






Universitat Autònoma de Barcelona

α β

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

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

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

Tesi doctoral

La integrina $\alpha9\beta1$ com a diana terapèutica en el càncer pediàtric

Memòria presentada per

Carla Molist Muñoz

Per optar al grau de

Doctora en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina

Tutor: Dr. José Miguel Lizcano de Vega

Directors:

Dr. Josep Roma Castanyer

Dra. Soledad Gallego Melcón

Doctoranda: Carla Molist Muñoz

Doctorat en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Universitat Autònoma de Barcelona

Agraïments

Aquesta tesi ha estat el resultat del treball d'uns anys on he après i madurat, i sou molts els que ho heu fet possible.

Moltes gràcies al grup de recerca d'oncologia pediàtrica de Vall d'Hebron, especialment al Dr. Josep Sánchez de Toledo i als meus directors, la Dra. Soledad Gallego i al Dr. Josep Roma. Sense la seva professionalitat i passió per la seva feina, aquesta tesi no hauria sigut possible. Els meus agraïments es fan extensius a tot l'equip humà que vaig conèixer al meu pas a Vall d'Hebron i al VHIR, sou uns autèntics cracs.

No voldria plasmar els meus agraïments personals a un treball públic, així que donaré les gràcies d'una manera personal i íntima a totes i cadascuna d'aquelles persones que han fet possible aquesta tesi, aportant el seu granet de sorra a nivell professional o personal. A tots i totes vosaltres, als que m'heu arrencat un somriure, compartit uns moments i sobretot escoltat, gràcies.

Vull dedicar aquesta tesi a qui més em va engrescar a fer-la, als meus pares, Sagi i Lúdia. Papa, gràcies pel teu suport, el teu entusiasme i el convenciment. Gràcies per ensenyar-me a fer bé les coses. Mama, gràcies per la teva insistència i pel teu suport incondicional. Tant de bo l'Èlia m'arribi a estimar com jo us estimo a vosaltres.

I a tu, Jaume. Gràcies per comprendre'm i aguantar-me en aquest capítol tan dur de la meua i nostra vida. T'estimo moltíssim.

Resum

El rabdomiosarcoma (RMS) és el sarcoma de parts toves més comú en la infància i el seu origen rau en les cèl·lules embrionàries precursors del múscul esquelètic. Histològicament se subdivideix en dos tipus: l'embrionari (RMSe) i l'alveolar (RMSa), diferint en presentació clínica, pronòstic i resposta a la teràpia, i és el RMSa el que presenta pitjor pronòstic. El neuroblastoma (NBL) és el tumor sòlid extracranial més habitual en la infància i el tercer càncer pediàtric més recurrent. Representa un 15% de les morts pediàtriques per càncer. Hi ha diversos factors que determinen l'afectació del tumor: l'edat al moment del diagnòstic, l'estadi, alteracions cromosòmiques, la histologia i l'estat de l'oncogen *N-MYC*.

La supervivència tant del RMS com del NBL se situa al 70%, però aquesta es redueix fins al 30% en els casos de RMS amb malaltia metastàtica i recidiva, i fins al 20% en els casos de NBL d'alt risc. Aquests casos s'associen a la disseminació del tumor a causa de la metàstasi, quan els tractaments regulars no són efectius. És en aquest context on existeix la necessitat d'estudi dels factors que regulen el procés metastàtic per tal d'identificar noves dianes terapèutiques i així millorar la supervivència d'aquest grup de pacients.

Les integrines són receptors transmembrana cel·lulars amb capacitat de transmetre senyal de l'exterior a l'interior de la cèl·lula i viceversa, que en modifiquen la plasticitat, adhesió i invasió cel·lular i estan implicades en processos patològics com la metàstasi. Anteriorment a aquesta tesi doctoral, el nostre grup d'investigació va suggerir per primera vegada la integrina $\alpha9\beta1$ com una proteïna clau en la invasió de les cèl·lules de RMS. En aquesta tesi doctoral es demostra el paper de la integrina $\alpha9\beta1$ en la invasió del RMS tant *in vitro* com *in vivo* mitjançant la seva inhibició genètica. Es mostra per primera vegada el paper del miR-7 i el miR-324 com a reguladors de la integrina $\alpha9\beta1$. També es descriu com l'expressió de la integrina $\alpha9\beta1$ en els tumors de RMS resulta en una tendència a una menor supervivència dels pacients, i posicionen la integrina $\alpha9\beta1$ com a un marcador de mal pronòstic en el RMS.

El caràcter invasiu de la integrina $\alpha9\beta1$ es demostra també en el NBL, on l'expressió de la proteïna en les seves línies cel·lulars és molt elevada i contundent.

[REDACTED]

En resum, en aquesta tesi doctoral es descriu el paper de la integrina $\alpha9\beta1$ en el RMS i el NBL i es demostra el rol d'aquesta en la metàstasi. [REDACTED]

Així doncs, es proposa la integrina $\alpha9\beta1$ com una nova diana terapèutica contra el procés metastàtic en el càncer pediàtric.

Abreviatures

°C	graus Celsius
aa	aminoàcids
Ab	anticòs
ADAM	<i>A Desintegrin And Metalloprotease</i>
ADMIDAS	<i>adjacent to MIDAS</i>
ALK	<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>
Amp	amplificat
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AP	amplificació parcial
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BIRC5	<i>Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat containing 5</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
c-MET	<i>hepatocyte growth factor receptor</i>
CAF	<i>cancer-associated fibroblast</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cm ²	centímetres quadrats
COSMIC	<i>Catalogue of somatic mutations in cancer</i>
cPep	pèptid cíclic
Ct	<i>treshold cycle</i>
CTC	<i>circulating tumour cell</i>

DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetil sulfòxid
dNTP	desoxiribonucleòtids trifosfat
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
dsDNA	<i>double strand DNA</i>
DTC	<i>disseminated tumour cell</i>
DTT	ditiotreitòl
EFS	<i>event-free survival</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FD	<i>Forkhead domain</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FN	Fibronectina
FOXO1	<i>Forkhead box protein O1</i>
G	Gauge
g	gram
GAP-43	<i>Neuromodulin</i>
GFR	<i>growth factor receptor</i>
GN	ganglioneuroma
GNB	ganglioneuroblastoma
h	hora
HD	<i>homeodomain</i>
HD	histologia desfavorable
HF	histologia favorable
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HVA	àcid homovanílic

ICCC-3	<i>International classification of childhood cancer third edition</i>
IGF2	<i>Insulin like growth factor 2</i>
ILK	<i>Integrin-linked kinase</i>
IMDM	<i>Iscoe's Modified Dulbecco's Medium</i>
INO80D	<i>INO80 complex subunit D</i>
INPC	<i>International Neuroblastoma Pathology Classification</i>
INRG	<i>International Neuroblastoma Risk Group</i>
INRGSS	<i>International Neuroblastoma Risk Group Staging System</i>
INSS	<i>International Neuroblastoma Staging System</i>
IRS	<i>Intergroup Rhabdomyosarcoma Study</i>
ITCC	<i>Innovative Therapies for Children with Cancer</i>
ITS-G	<i>Insulin-Transferrin-Selenium</i>
kg	quilogram
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
mA	mil-liampere
MAX	<i>Myc-associated factor X</i>
MDM2	<i>Murine double minute 2</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium with Earle's Balanced Salts</i>
MET	<i>mesenchymal-epithelial transition</i>
mg	mil-ligram
MIDAS	<i>metallic-ion-dependent adhesive site</i>
min	minuts
miRISCs	<i>miRNA-induced silencing complexes</i>
miRNA	microRNA
MIZ1	<i>Myc interacting zinc finger-1</i>
MKI	<i>mitosis-karyorrhexis index</i>
ml	mil-lilitre

mm	mil·límetre
mM	mil·limolar
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSC	<i>mesenchymal stem cells</i>
Mut	mutat
MYF	<i>myogenic factor</i>
MYOD	<i>Myoblast determination protein</i>
N-MYC	<i>N-myc proto-oncogene protein</i>
NA	no amplificat
NBL	neuroblastoma
NCOA1	<i>nuclear receptor coactivator 1</i>
ND	no determinat
ng	nanogram
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NICD	<i>Notch intracellular domain</i>
nM	nanomolar
nm	nanòmetre
NME1	<i>nucleoside diphosphate kinase 1</i>
ns	no significant
NSE	<i>Neuron specific enolase</i>
OMS	Organització Municipal de la Salut
p	p-valor
p53	<i>cellular tumor antigen p53</i>
PAX	<i>Paired box protein</i>
PB	<i>Paired box</i>
pb	parells de bases
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

PET	<i>positron emission tomography</i>
PHOX2B	<i>paired like homeobox 2B</i>
PPM1D	<i>Protein phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ dependent 1D</i>
PSI	<i>Plexin-semaphorin-integrin</i>
PTB	<i>phosphotyrosine-binding domain</i>
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i>
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RAS	<i>GTPase HRas</i>
RB	<i>Retinoblastoma-associated protein</i>
RETI-SEHOP	Registro Español de Tumores Infantiles
RMS	rabdomiosarcoma
RMSa	rabdomiosarcoma alveolar
RMSe	rabdomiosarcoma embrionari
rpm	revoluciones per minut
s	segon
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	<i>standard error of mean</i>
SF α 9	<i>short form α9 integrin</i>
SHH	<i>Sonic hedgehog protein</i>
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SIOPEN	<i>International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNC	sistema nerviós central
SNS	sistema nerviós simpàtic
SPF	<i>specific pathogen free</i>
ssRNA	<i>single strand RNA</i>
SyMBS	<i>synergistic metal ion-binding site</i>
TAD	<i>transactivation domain</i>

TAM	<i>tissue-associated macrophages</i>
TBS-T	<i>tris-Buffered Saline and Tween-20</i>
TEMED	N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina
TF	<i>tissue factor</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TNM	T:tumor, N: nòduls, M:metàstasi
TP53	<i>cellular tumor antigen p53</i>
TSG	<i>tumor suppressor gene</i>
U	unitat
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VIH	virus de la immunodeficiència humana
VMA	àcid vanililmandèlic
VSV-G	<i>vesicular stomatitis virus envelope G protein</i>
wt	<i>wild type</i>
μg	microgram
μl	microlitre
μM	micromolar
μm	micròmetre

Índex

Agraïments	i
Resum	iii
Abreviatures	v
1 Introducció	1
1.1 Càncer pediàtric	1
1.2 Sarcomes	4
1.2.1 Rabdomiosarcoma	6
1.2.1.1 Epidemiologia	6
1.2.1.2 Presentació clínica	7
1.2.1.3 Histopatologia i alteracions genètiques	8
1.2.1.4 Etiologia i evolució molecular	11
1.2.1.5 Factors pronòstics i estadificació	12
1.2.1.6 Malaltia metastàtica i recidivant	14
1.3 Neuroblastoma	15
1.3.1 Epidemiologia	15

1.3.2	Presentació clínica	16
1.3.3	Histopatologia i alteracions genètiques	16
1.3.4	Etiologia i evolució molecular	19
1.3.5	Factors pronòstics i estadificació	22
1.3.6	Malaltia metastàtica i recidivant	25
1.4	Metàstasi	27
1.5	Integrines	31
1.5.1	Estructura i classificació de les integrines	31
1.5.2	Canvis conformacionals, regulació de la funció i senyalització de les integrines	35
1.6	Integrina $\alpha 9\beta 1$	39
1.6.1	Lligands de la integrina $\alpha 9\beta 1$	40
1.6.2	Integrina $\alpha 9\beta 1$ i càncer	43
1.7	Teràpies contra les integrines	46
2	Hipòtesi i objectius	49
3	Material i mètodes	51
3.1	Mostres tumorals humanes	51
3.2	Cultius cel·lulars	51
3.2.1	Línies cel·lulars	51
3.2.2	Subcultiu cel·lular	53
3.2.3	Comptatge de cèl·lules	53
3.2.4	Descongelació i criopreservació	54

3.3	████████████████████	55
3.4	Plasmidis, transfecció, producció lentiviral i infecció	55
3.4.1	Plasmidis	57
3.4.2	Transfecció i producció lentiviral	58
3.4.3	Infecció	59
3.5	Anàlisi de l'expressió gènica	60
3.5.1	Extracció de l'RNA total i miRNA	60
3.5.2	Retrotranscripció	60
3.5.3	Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa	62
3.6	Extracció i detecció de proteïnes	64
3.6.1	Extracció de proteïnes	64
3.6.2	Quantificació de proteïnes	64
3.6.3	Preparació de les mostres	65
3.6.4	SDS-PAGE	66
3.6.5	<i>Western blot</i>	67
3.7	Immunohistoquímica	69
3.8	Assaig de creixement cel·lular	70
3.9	Assaig d'invasió <i>Transwell</i>	70
3.10	<i>Screening</i> de miRNAs i transfecció transitòria dels miRNAs	72
3.10.1	<i>Screening</i> de miRNAs que regulen la integrina $\alpha9\beta1$	73
3.10.2	Transfecció transitòria dels miRNAs	74
3.11	Assaig luciferasa	75

3.11.1	Generació del vector psiCHECK2-3'UTRITGA9	75
3.11.2	Transfeccions i assaig de l'activitat luciferasa	76
3.12	Models animals	78
3.13	Anàlisi estadístic	79
4	Resultats	81
4.1	La integrina $\alpha 9\beta 1$ està expressada en línies cel·lulars i tumors de RMS i NBL .	81
4.1.1	La integrina $\alpha 9\beta 1$ està expressada en línies cel·lulars i tumors de RMS	81
4.1.2	La integrina $\alpha 9\beta 1$ està expressada en línies cel·lulars de NBL	83
4.2	La infraregulació genètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ disminueix el creixement cel·lular	84
4.3	La infraregulació genètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ disminueix la invasió cel·lular .	87
4.4	La reducció de la capacitat proliferativa i invasiva de les cèl·lules de RMS i NBL després de la infraregulació de la integrina $\alpha 9\beta 1$ podria ser mediada per una disminució en la fosforilació de FAK	88
4.5	La infraregulació mitjançant miRNAs de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en línies de RMS reproduceix els efectes observats amb la seva inhibició genètica	90
4.5.1	El miR-7 i el miR-324 són els candidats seleccionats per la infraregulació epigenètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$	90
4.5.2	El miR-7 i el miR-324 són dianes directes de la integrina $\alpha 9\beta 1$	92
4.5.3	El miR-7 i el miR-324 disminueixen la fosforilació de FAK	92
4.5.4	El miR-7 i el miR-324 causen una reducció en el creixement i la invasió <i>in vitro</i>	94
4.6	La infraregulació genètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ disminueix la invasió <i>in vivo</i> .	95
4.7	Els pacients amb RMS que expressen la integrina $\alpha 9\beta 1$ tendeixen a una menor supervivència	97

1 | Introducció

1.1 Càncer pediàtric

El terme càncer pediàtric s'usa per descriure aquells casos de càncer que afecten individus menors de 15 anys. El càncer pediàtric representa entre el 0.5% i el 4.6% del total de càncers. És una malaltia infreqüent, amb una incidència anual global d'entre 50 i 200 casos per milió de nens [1]. A Espanya, es van diagnosticar un total de 1011 casos durant l'any 2016 [2]. Tot i la seva poca incidència és la segona causa de mort en infants entre 1 i 9 anys en països desenvolupats, i la primera són les lesions no intencionades [3]. La supervivència als 5 anys després del diagnòstic se situa de mitjana al 80% a països desenvolupats, com Europa i els Estats Units [4, 1].

L'OMS (Organització Mundial de la Salut) preveu un increment del 7% de nous casos de càncer infantil l'any 2035, un increment molt moderat comparat amb el 70% previst per al càncer d'adults. Aquesta previsió té en compte la mitjana del creixement de la fertilitat de la població global i la incidència i la mortalitat estable del càncer pediàtric actual [1]. Molts càncers pediàtrics són altament curables si es diagnostiquen en estadis primerencs i alguns tractaments són relativament senzills, barats i ben establerts. Malauradament, actualment menys del 40% dels pacients són diagnosticats i tractats correctament, sobretot als països subdesenvolupats. La probabilitat de sobreviure al càncer és més baixa a aquests països i no sempre disposen de cures pal·liatives [5].

El càncer infantil engloba un conjunt de diverses neoplàsies, que es classifiquen segons la seva localització anatòmica: els càncers hematològics són els que afecten la sang, el moll d'os i el sistema limfàtic. Els tumors cerebrals són càncers intracranials del SNC (Sistema nerviós central) i els tumors sòlids són extracranials i no hematològics. Aquests últims, a diferència dels càncers hematològics i els tumors cerebrals, poden provenir de les tres capes germinals que formen l'embrió: mesoderma, endoderma o ectoderma [6].

Els càncers pediàtrics són neoplàsies malignes diferents de les de l'adult pel que fa a la seva biologia, resposta al tractament i supervivència. La majoria dels càncers de l'adult són càncers epitelials. Les cèl·lules epitelials tumorals provenen d'una població de cèl·lules mare situades a l'òrgan madur que tenen com a funció fisiològica el reemplaçament cel·lular. L'exposició a agents externs i mutacions genòmiques són una de les fonts de malignitat per a les cèl·lules tumorals. Per contra, els càncers pediàtrics tenen un origen hematològic, mesenquimal o del sistema nerviós i la seva etiologia a vegades és encara desconeguda. El càncer pediàtric és el resultat de mutacions espontànies i es necessiten menys esdeveniments oncogènics comparat amb el càncer de l'adult pel seu desenvolupament i la progressió tumoral, tan sols dues mutacions són suficients per al seu desenvolupament [7, 8, 9].

Alguns càncers pediàtrics pertanyen al grup de càncers pediàtrics embrionaris o fetals, ja que s'originen en teixits fetals. Aquests tumors són diagnosticats majoritàriament en nens menors de 5 anys [5]. S'ha demostrat que s'originen directament d'una cèl·lula embrionària o bé a partir d'una cèl·lula prenatal més madura que ha adquirit propietats patològiques que afavoreixen la supervivència en l'ambient postnatal. Alguns dels tumors embrionaris fetals amb més evidència de cèl·lula d'origen són el retinoblastoma, el medul·loblastoma, el neuroblastoma i el tumor de Wilms. S'ha proposat un model de tumorigènesi embrionària que consta de tres esdeveniments (Figura 1.1): excés de proliferació de cèl·lules prenatales, resistència a la mort cel·lular i a l'apoptosi i inestabilitat genòmica [10].

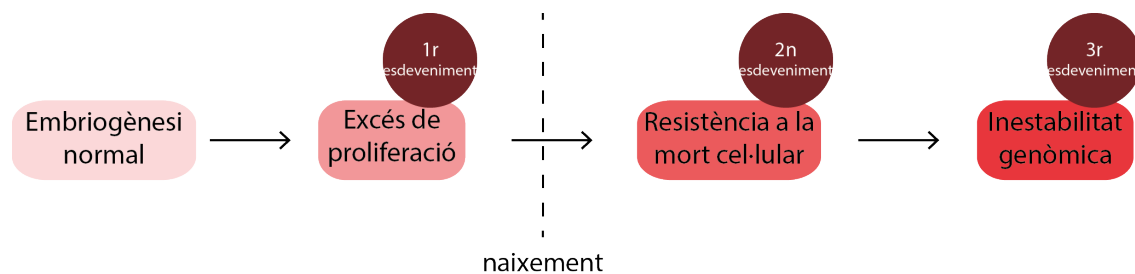


Figura 1.1. Model de tumorigènesi embrionària. Els càncers embrionaris amb evidència d'origen prenatal comparteixen les mateixes característiques: excés de proliferació prenatal en el teixit d'origen, mecanismes per sobreviure a l'ambient postnatal i inestabilitat genòmica [10].

Els càncers pediàtrics es poden classificar en dotze grups principals segons la tercera edició de la classificació internacional del càncer pediàtric (ICCC-3, *International classification of childhood cancer third editon*) (Taula 1.1) [11]. A la figura 1.2 es mostra la incidència de cada grup diagnòstic registrat per la RETI-SEHOP (Registro Español de Tumores Infantiles) en nens de 0-14 anys durant el període 1980-2016 a Espanya. Els càncers pediàtrics més freqüents són les leucèmies (26.5%), els tumors del SNC (21.2%) i els limfomes (13.1%). Els segueix el

grup IV, els tumors del sistema nerviós simpàtic (SNS) amb un 9.8%, en el qual els casos de neuroblastoma ocupen el 99% d'aquest grup. El grup IX representa el 6.9% del total de tots els càncers pediàtrics, i en aquest grup un 57% dels tumors són casos de rabdomiosarcoma [2].

Taula 1.1. Tipus de càncers pediàtrics segons la ICCC-3. Basat en [11].

Grups diagnòstics	
I	leucèmies, malalties mieloproliferatives i malalties mielodisplàstiques
II	limfomes i neoplàsies reticuloendotelials
III	SNC i neoplàsies intracranials i intraespinals
IV	neuroblastoma i altres tumors de cèl·lules nervioses perifèriques (SNS)
V	retinoblastoma
VI	tumors renals
VII	tumors hepàtics
VIII	tumors ossis malignes
IX	sarcomes de parts toves i sarcomes extraossis
X	tumors de la línia germinal, tumors trofoblàstics i neoplàsies de les gònades
XI	altres neoplàsies epitelials malignes i melanomes malignes
XII	altres neoplàsies malignes inespecífiques

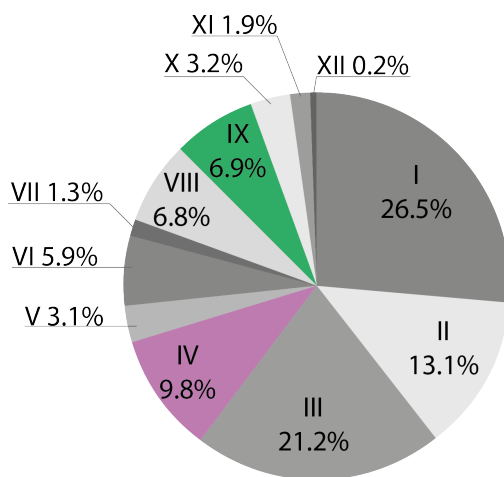


Figura 1.2. Distribució en percentatges dels diferents grups de càncer pediàtric registrat per la RETI-SEHOP a Espanya en nens de 0-14 anys durant el període 1980-2016. Dades extretes de [2].

Amb base a les dades de supervivència després de 5 anys del diagnòstic en pacients diagnosticats en el període 2000-2007 arreu d'Europa segons el grup diagnòstic, s'extreuen les dades mostrades a la taula 1.2, en la qual es reflecteixen els càncers amb millor i pitjor pronòstic durant aquest període [4].

Taula 1.2. Supervivència als 5 anys després del diagnòstic segons grup diagnòstic. Pacients arreu d'Europa diagnosticats durant el període 2000-2007. Basat en [4].

(a) Grups diagnòstics amb millor pronòstic

Grup diagnòstic i tumor	% supervivència
V: retinoblastoma	96.4%
IIa: limfoma de Hodgkin	95.4%
IIc: limfoma de Burkitt	90.2%
VIa: nefroblastoma i altres tumors renals no epiteliais	89.4%

(b) Grups diagnòstics amb pitjor pronòstic

Grup diagnòstic i tumor	% supervivència
IIIc: tumors embrionaris intracranials i intraespinals	57.1%
III: SNC i neoplàsies intracranials i intraespinals	57.5%
Ib: leucèmia mieloide aguda	62.7%
IXa: rabdomiosarcoma	67.7%

1.2 Sarcomes

Els sarcomes són tumors d'origen mesenquimal provinents del teixit connectiu. Són tumors rars, representen l'1% de tots els tumors de l'adult i el 21% dels tumors sòlids pediàtrics. Els sarcomes es divideixen en dos grans grups: els tumors ossis malignes i els sarcomes de parts toves [12]. A causa del seu origen en el mesoderma embrionari, els sarcomes no tenen un patró de distribució i poden aparèixer en qualsevol part del cos [13]. Els tumors ossis malignes se solen trobar en os o en cartílag, mentre que els sarcomes de parts toves sovint s'originen en els músculs, les articulacions, el greix, els nervis i els vasos sanguinis [12].

Els tumors ossis malignes pertanyen al grup VIII de la classificació internacional del càncer pediàtric. Representen el 6.9% de tots els tumors pediàtrics i l'any 2016 es van detectar 63 nous casos a Espanya [2]. A la taula 1.3 es poden observar els diferents subtipus de tumors ossis i la seva respectiva incidència en nens entre 0 i 14 anys diagnosticats a Espanya durant el període 1990-2016. El sarcoma d'Ewing i l'osteosarcoma o sarcoma osteogènic són els dos tipus de neoplàsies malignes pediàtriques òssies més comuns. El sarcoma d'Ewing és el tumor ossi més freqüent en nens de 0 a 10 anys, tot i que apareix preferentment durant la segona

dècada de vida (64%). El 75% de casos de sarcoma osteogènec es presenten entre els 12 i els 25 anys, coincidint amb el creixement puberal [14].

Taula 1.3. Classificació i incidència dels tumors ossis diagnosticats a Espanya en el període 1990-2016. Dades extretes de [2].

VIII	Tumors ossis	Incidència (%)
VIIIa	osteosarcomes	45
VIIIb	condrosarcomes	1.5
VIIIc	Ewing	51.6
VIIId	altres ossis especificats	1.5
VIIIe	altres ossis no especificats	0.4

Els sarcomes de parts toves o de teixits tous engloben un conjunt de més de 50 neoplàsies classificades a nivell histològic segons l'OMS (Taula 1.4). Els sarcomes de parts toves pertanyen al grup IX de la classificació internacional del càncer pediàtric, el qual representa el 6.9% del total. Durant l'any 2016 es van detectar 59 nous casos a Espanya [2]. A l'apartat 1.2.1 s'especifica en detall el rabdomiosarcoma, el càncer pediàtric de parts toves més comú i un dels càncers en què s'ha centrat aquesta tesi doctoral. En casos aïllats s'ha associat el desenvolupament dels sarcomes de parts toves amb factors genètics o ambientals, irradiacions, infeccions virals i deficiències immunitàries. Per tant, la majoria semblen originar-se *de novo*, sense factor aparent de causa. Això no obstant, algunes neoplàsies mesenquimàtiques malignes apareixen en el context de síndromes familiars de càncer [15].

Taula 1.4. Classificació i incidència dels sarcomes de teixits tous diagnosticats a Espanya en el període 1990-2016. Dades extretes de [2].

IX	Sarcomes de teixits tous i altres extraossis	Incidència (%)
IXa	rabdomiosarcomes	57.4
IXb	fibrosarcomes, tumors de les beines nervioses perifèriques i altres neoplàsies fibroses	8.7
IXc	sarcomes de Kaposi	0.1
IXd	altres sarcomes de teixits tous especificats	28
IXe	sarcomes de teixits tous no especificats	5.8

1.2.1 Rabdomiosarcoma

El rabdomiosarcoma (RMS) és un tumor maligne derivat de les cèl·lules mesenquimals primitives, anomenades rabdomioblasts, la diferenciació de les quals a múscul estriat madur és incompleta [16].

1.2.1.1 Epidemiologia

El RMS representa aproximadament el 5% de tots els tumors malignes que afecten a nens i adolescents, i la seva incidència anual és aproximadament de 5.3 casos per milió de nens menors de 15 anys [16]. És el tercer tumor sòlid extracranial més comú, després del neuroblastoma i el tumor de Wilms [17].

El RMS té una certa predisposició pel sexe masculí, és 1.4 vegades més comú en nens que en nenes [18, 17]. Existeix una distribució segons l'edat de presentació de la malaltia amb un pic dels 2 als 6 anys i un altre entre els 10 i els 18. Aproximadament dos terços dels casos de RMS són diagnosticats en nens menors de 6 anys [19]. Aquesta distribució reflecteix l'aparició dels dos subtipus histològics de RMS més freqüents: RMS embrionari (RMSe) i RMS alveolar (RMSa). La incidència del RMSe és major en nadons i nens però decreix en l'adolescència. Contràriament, la incidència del RMSa és baixa en infants i augmenta en nens més grans i adolescents [17].

La supervivència del RMS ha millorat notablement en els últims 50 anys. L'any 1970 la supervivència als 5 anys després del diagnòstic dels pacients amb RMS se situava al 25%. L'any 1972 es va crear el grup cooperatiu *Intergroup Rhabdomyosarcoma Study* (IRS), on gràcies a l'aplicació de quimioteràpia combinada i radioteràpia es va observar un increment de la taxa de resposta completa en nous pacients diagnosticats durant la dècada del 1970. A més, els resultats d'altres grups cooperatius van mostrar l'eficàcia dels tractaments multimodals. D'aquesta manera s'ha aconseguit augmentar la supervivència dels pacients amb RMS fins al 70% [20, 21, 4].

Els pacients amb RMS presenten amb més freqüència respecte a la població general anomalies congènites en el SNC i en l'aparell genitourinari. La majoria dels casos de RMS es desenvolupen de forma espontània, i presenten una major incidència de RMS els pacients amb la síndrome de Beckwith-Wiedemann, la síndrome de Gorlin, la neurofibromatosis tipus I, la síndrome de Li-Fraumeni i la síndrome alcohòlica fetal [16].

1.2.1.2 Presentació clínica

El RMS es pot presentar en gairebé qualsevol regió anatòmica i, per tant, la forma de presentació està subjecte a la localització del tumor primari. Les regions més freqüents són el cap i el coll, el tracte genitourinari i les extremitats. A la taula 1.5 s'especifica la freqüència i la localització de les regions dels tumors primaris de RMS. La majoria dels tumors de la regió genitourinària pertanyen al subtipus embrionari. Els tumors del cap i el coll pertanyen també majoritàriament al subtipus embrionari i rarament presenten propagació als nòduls limfàtics regionals. En canvi, el 50% dels tumors de les extremitats són del subtipus alveolar amb tendència a propagar-se als nòduls limfàtics regionals [22].

Taula 1.5. Localització del RMS. Basat en [16].

Regió anatòmica i freqüència	Localització i freqüència
genitourinària (25%)	bufeta i pròstata (15%)
	vagina i úter (10%)
cap i coll (25%)	parameningi (15%)
	no parameningi (10%)
extremitats (20%)	extremitats
òrbita (10%)	òrbita
altres (20%)	via biliar
	paret toràcica

Menys del 25% dels pacients presenten malaltia metastàtica al moment del diagnòstic. El pulmó és el lloc més freqüent de metastasi, seguit de l'os, la medulla òssia i els nòduls limfàtics [22].

1.2.1.3 Histopatologia i alteracions genètiques

El RMS pertany al grup dels tumors de cèl·lules petites rodones i blaves, juntament amb el neuroblastoma, el sarcoma d'Ewing i el limfoma. La clau pel diagnòstic del RMS és la presència de marcadors de diferenciació a múscul esquelètic. Cal una positivitat immunohistoquímica pels marcadors musculars com: miogenina, MYOD, actina, miosina específica de múscul, mioglobina i/o desmina [16, 19].

En la quarta i última edició de la classificació dels tumors de teixits tous i ossis presentada per l'OMS l'any 2013 s'estableixen els quatre subtipus principals de RMS (Taula 1.6): embrionari, alveolar, pleomòrfic i esclerosant o de cèl·lules fusiformes.

Taula 1.6. Subtipus principals del RMS: pronòstic, edat, freqüència i localització principal

Subtipus	Pronòstic	Edat	Freqüència*	Localització
embrionari	intermedi	<10 anys	70	cap i coll
alveolar	dolent	adolescents i adults joves	20	extremitats
pleomòrfic	dolent	homes adults	-	extremitats inferiors
esclerosant/de cèl·lules fusiformes	bo	0-10 anys i un segon pic centrat als 50 anys	10	regió paratesticular, extremitats, cap i coll

* Freqüència de RMS infantil.

El RMS de cèl·lules fusiformes representa el 10% dels casos de RMS infantil, percentatge que disminueix entre el 3 i 4.4% si es té en compte tots els casos de RMS [23]. Afecta principalment a homes joves i és el subtipus de RMS amb millor pronòstic quan afecta als nens, amb una supervivència als 5 anys després del diagnòstic del 88 al 95.5%. La supervivència dels pacients adults amb RMS de cèl·lules fusiformes se situa al 53% [24, 23]. Una variant del subtipus de RMS de cèl·lules fusiformes és el RMS esclerosant. Aquest afecta preferencialment a adults i els tumors es localitzen principalment a les extremitats i al cap i al coll. Els tumors de RMS esclerosant es caracteritzen per presentar un grau elevat de hialinització de la matriu extracel·lular i un patró de creixement pseudovascolar, i comparteixen característiques clínicopatològiques amb els tumors del subtipus alveolar i embrionari [25, 26].

El RMS pleomòrfic es presenta predominantment en homes adults de mitjana edat i està associat a un mal pronòstic, el 50-60% dels pacients presenten metàstasi al moment del diagnòstic i la mortalitat és superior al 70%. Els tumors de RMS pleomòrfic es localitzen en el teixit profund de les extremitats inferiors. Histològicament els tumors estan compostos per cèl·lules pleomòrfiques i sovint multinucleades, amb un citoplasma eosinofílic abundant i amb rabdmioblasts tenyits positivament pels marcadors miogènics [27].

Els dos subtipus de RMS més freqüents són el RMSa i el RMSe. El RMSe representa més dels dos terços del total dels casos de RMS i els tumors normalment es localitzen en el cap i el coll i en el tracte genitourinari. Microscòpicament, el RMSe és un tumor de cèl·lules fusiformes ric en estroma [22]. Es presenta en nens menors de 10 anys i la supervivència als 5 anys després del diagnòstic associada a aquest subtipus és del 80% [18, 28]. El RMS botrioide és un subtipus de RMSe que sovint es localitza a les vísceres recobertes d'epiteli, com per exemple la bufeta o la vagina, i presenta un pronòstic favorable [18].

El RMSa representa aproximadament el 20% dels casos de RMS, les seves ubicacions freqüents són les extremitats, el tronc i el perineu i té una alta predisposició a formar metàstasi. Microscòpicament, el RMSa està compost per cèl·lules petites i rodones, amb un aspecte cel·lular dens [22]. El RMSa té tendència a aparèixer en adolescents i adults joves, i la supervivència als 5 anys després del diagnòstic és del 52% [18, 28].

Els subtipus RMSe i RMSa presenten alteracions citogenètiques completament diferents. El 80% dels tumors de RMSa presenten una translocació cromosòmica específica associada: la translocació $t(2;13)(q13;q14)$, present en un 75% dels casos i la $t(1;13)(p36;q14)$, present en el 25% restant (Figura 1.3). Aquestes translocacions involucren als gens *PAX3* i *PAX7* localitzats als cromosomes 2 i 1, respectivament. Els dos gens estan involucrats en el desenvolupament embrionari del múscul esquelètic i una disrupció d'aquests provoca un desenvolupament muscular anormal. En ambdós casos la translocació crea un factor de transcripció quimèric amb *FOXO1*, es conserva el domini d'unió al DNA dels gens *PAX* i s'adquireix el domini transactivador de *FOXO1*. La proteïna quimèrica resultant s'uneix correctament als gens diana de *PAX* però amb un excés d'activació. Aquesta desregulació té efectes sobre la proliferació, l'apoptosi, la diferenciació i la mobilitat cel·lular. Els tumors de RMSa amb la translocació *PAX3-FOXO1* tenen un fenotip més agressiu, associant-se a tumors d'alt risc i amb un pitjor pronòstic. Contràriament, els tumors de RMSa positius per la translocació *PAX7-FOXO1* tendeixen a aparèixer en nens més joves, freqüentment a les extremitats, en forma de tumors localitzats i presenten millor supervivència [29]. El 20% restant dels tumors de RMSa que no presenten translocació formen un grup heterogeni amb característiques clíniques similars als tumors de RMSe.

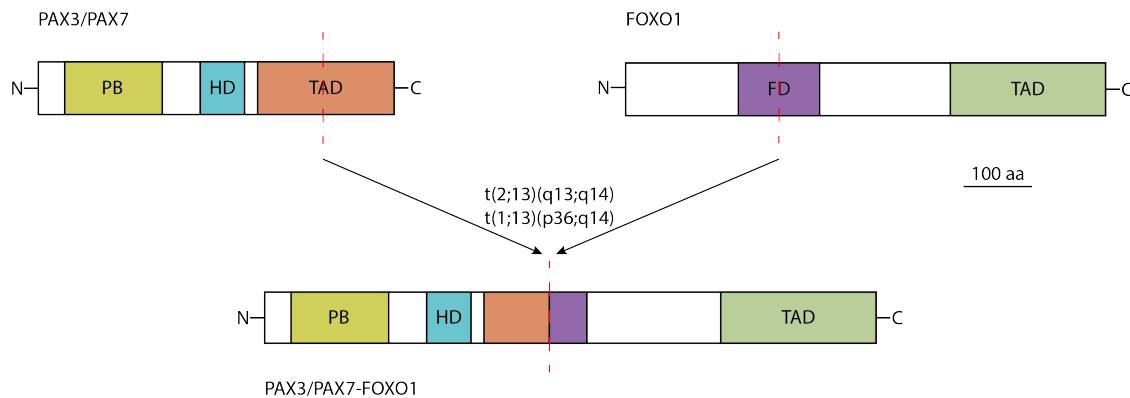


Figura 1.3. Representació de la translocació PAX/FOXO1 observada en el 80% dels casos de RMSa. Les translocacions $t(2;13)(q13;q14)$ i $t(1;13)(p36;q14)$ involucren als gens *PAX 3* i *7*, respectivament, i *FOXO1*. La proteïna quimèrica *PAX3/PAX7-FOXO1* conserva el domini d'unió al DNA dels gens *PAX* i adquireix el domini transactivador de *FOXO1*. Abreviatures: *FD* (*Forkhead domain*), *HD* (*Homeodomain*), *PB* (*Paired box*), *TAD* (*Transactivation domain*).

Això no obstant, s'ha descrit noves translocacions en els tumors de RMSa. Una és la translocació $t(2;2)(q35;p23)$, que genera una proteïna de fusió formada per *PAX3* i el receptor nuclear coactivador *NCOA1*, i presenta les mateixes propietats transactivadores que *PAX3-FOXO1* [18]. També s'ha descrit la fusió de *PAX3* amb *INO80D*, tot i que el comportament clínic d'aquesta variant és encara desconegut [30].

En canvi, no s'ha descrit translocacions específiques en els casos de RMSe. Aquest subtipus presenta aberracions cromosòmiques amb guanys i pèrdues de cromosomes. Els guanys més freqüents es donen en el cromosoma 2, 7, 8, 11, 12, 13q21 i 20; i les pèrdues en els 1p35-36.3, 6, 9q22, 14q21-32 i 17 [31]. Els tumors de RMSe presenten també pèrdua d'heterozigositat del cromosoma 11p15.5 o pèrdua d'imprompta d'aquesta regió. Tals fets provoquen la sobreexpressió del gen *IGF2*, la funció del qual és l'estimulació del creixement cel·lular [32].

La inactivació del gen supressor de tumor *TP53* i la sobreexpressió del gen *MDM2* (regulador de la degradació de p53) s'ha observat tant en el subtipus alveolar com en l'embrionari [33].

1.2.1.4 Etiologia i evolució molecular

El RMS és un tumor maligne d'origen mesenquimal i es considera que deriva d'una interrupció de la regulació del creixement i diferenciació del múscul esquelètic [17].

Diferents estudis suggereixen que l'origen del RMSe resideix en les cèl·lules satèl·lit musculars. Les cèl·lules satèl·lit musculars són precursors mioblàstics responsables del creixement postnatal, la reparació i el manteniment del múscul esquelètic; on és essencial l'expressió de PAX7 per l'especificació i el manteniment d'aquestes. Es creu que els tumors de RMSe provenen de les cèl·lules satèl·lit musculars, a causa de l'expressió de PAX7 i c-MET en tumors humans de RMSe [34, 35]. Altres autors apunten que les cèl·lules satèl·lit no són les úniques contribuïdores al desenvolupament dels tumors de RMS del subtipus embrionari, aportant que els mioblasts que expressen MYF6 són també capaços de formar tumors [36]. Altres autors discuteixen que l'origen del RMSe no pot estar restringit als progenitors musculars, ja que no explicaria com es produeixen casos de RMSe en llocs on el múscul estriat no hi és present, tals com la pròstata o la bufeta. La transdiferenciació de les cèl·lules progenitores mesenquimals, incloent-hi els progenitors del llinatge adipós, podrien ser també la cèl·lula d'origen dels tumors embrionaris que apareixen en els teixits on normalment no presenten múscul esquelètic. Hatley *et al.* van presentar un model de RMSe a partir de progenitors d'adipòcits marrons, els quals mitjançant l'activació de la via promoguda per SHH es transdiferenciaven en llinatge muscular sense donar lloc a múscul esquelètic madur, i formaven tumors al cap i al coll que mimetitzaven el RMSe humà a nivell histològic i molecular [37].

Contràriament, es va demostrar que les cèl·lules satèl·lit PAX7+ amb la translocació PAX3-FOXO1 no provocaven la formació de tumors de RMSa [38]. Se suggereix que els tumors de RMSa provenen de les cèl·lules amb diferenciació del llinatge miogènic que expressen MYF6 [39, 38], ja que aquestes sí són capaces de generar tumors de RMSa amb l'expressió de PAX3-FOXO1 i la inactivació de la via p53. Altres autors proposen les cèl·lules mare mesenquimals (MSC, de l'anglès *mesenchymal stem cells*) com a progenitores dels tumors de RMSa, ja que MSCs que expressen les translocacions PAX3-FOXO1 o PAX7-FOXO1, conjuntament amb la interrupció de la via p53/RB/RAS, formen tumors amb un perfil histològic, immunohistoquímic i genètic similar als tumors humans de RMSa. L'expressió de la translocació indueix la miogènesi esquelètica en cèl·lules mare mesenquimals amb l'expressió de MYOD i miogenina, però no MYF5 [40, 41].

1.2.1.5 Factors pronòstics i estadificació

Els factors pronòstics més importants en el RMS són [16]:

- Histologia. Favorable: embrionari. Desfavorable: alveolar.
- Estadi (classificació IRS). Favorable: grup I. Desfavorable: grups II-IV.
- Afectació ganglionar. Favorable: no afectació. Desfavorable: afectació ganglionar.
- Localització. Favorable: òrbita, cap i coll no parameningi, genitourinari no bufeta-pròstata. Desfavorable: la resta de localitzacions.
- Tamany. Favorable: $\leq 5\text{cm}$. Desfavorable: $> 5\text{cm}$.
- Edat. Favorable: <10 anys. Desfavorable: ≥ 10 anys.

La classificació més utilitzada per l'estadificació dels tumors de RMS és la classificació postoperatòria per grups de l'IRS (Taula 1.7) [16]. Els pacients són assignats a un grup clínic en funció de l'escissió del tumor i l'evidència de metàstasi als nòduls limfàtics o a òrgans distants després de l'examinació patològica o cirurgia [17]. Una segona classificació és la classificació TNM (T: tumor, N: nòduls, M: metàstasi). Aquesta es basa únicament en l'avaluació preoperatòria de la imatge i l'exploració física. Té en compte el lloc i la mida del tumor primari, el grau d'invasió, l'estat dels nòduls i la presència o absència de metàstasi [17, 21].

Taula 1.7. Classificació clínica dels tumors de RMS segons l'IRS. Basat en [16].

Grup	Descripció
I	malaltia localitzada completament extirpada
a	confinada al múscul o teixit d'origen
b	afectació per contigüïtat, infiltració fora del múscul o òrgan d'origen
II	extirpació macroscòpica total amb evidència d'extensió locoregional
a	tumor amb resecció macroscòpica total i residu microscòpic
b	malaltia regional amb afectació ganglionar extirpada completament sense residu microscòpic
c	malaltia regional amb afectació ganglionar amb extirpació macroscòpica total però amb evidència de malaltia microscòpica residual i/o afectació al gangli més distal de la resecció
III	extirpació incompleta amb malaltia residual macroscòpica
a	només després de la biòpsia
b	després de la resecció del tumor amb restes >50%
IV	malaltia metastàtica present al diagnòstic (pulmons, fetge, ossos, medul·la òssia, cervell, músculs i ganglis a distància)

Per tal d'adaptar la intensitat de la teràpia a cada pacient, el comitè de sarcomes de teixits tous del *Children's Oncology Group* va desenvolupar un sistema d'estratificació de risc on s'incorporava l'estadificació del pretractament (basada en el lloc anatòmic i l'estat TNM) i l'extensió de la malaltia després de la resecció quirúrgica (grup clínic), tal com es pot observar a la taula 1.8 [17]. Els pacients es divideixen en risc baix, intermedi o alt. En el grup de risc baix s'hi inclouen el 30% dels pacients amb RMS amb una supervivència després del diagnòstic del 95%. Tendeixen a ser tumors localitzats, d'histologia embrionària i es troben en llocs favorables. El grup de risc alt representa el 10% dels pacients amb una supervivència després del diagnòstic del 25%, en el qual hi ha principalment tumors metastàtics d'histologia alveolar. El 60% de casos de RMS pertanyen al grup de risc intermedi, amb una supervivència del 50-65% i amb una histologia heterogènia [42].

Taula 1.8. Estadificació dels pacients amb RMS basat en el risc. Adaptat de [17].

Grup de risc	Estadi pretractament ^a	Grup clínic	Lloc ^b	Histologia
baix 1	1 o 2	I o II	favorable o desfavorable	RMSe
	1	III	òrbita	RMSe
baix 2	1	III	favorable	RMSe
	3	I o II	desfavorable	RMSe
intermedi	2 o 3	III	desfavorable	RMSe
	1-3	I-III	favorable o desfavorable	RMSa
alt	4	IV	favorable o desfavorable	RMSe
	4	IV	favorable o desfavorable	RMSa

^a Estadi pretractament dependent del lloc del tumor primari.

^b Llocs favorables: tracte genitourinari, tracte biliar, cap i coll no parameningi i òrbita.

1.2.1.6 Malaltia metastàtica i recidivant

La disseminació metastàtica dels tumors dels pacients amb RMS pot ser tant per via hematògena com limfàtica. Els pacients amb malaltia metastàtica presenten en general una supervivència molt baixa, no superant el 20% [21].

Aproximadament un 30% dels pacients amb RMS experimenten recidives, i entre el 50 i el 95% d'aquests moren a causa de la progressió metastàtica [19]. El temps mitjà de supervivència des de la primera recaiguda és de 0.8 anys, i la taxa de supervivència estimada als 5 anys després de la primera recidiva és del 17% [43].

Hi ha una correlació entre la taxa de supervivència als 5 anys després de la recaiguda i el subtipus histològic del tumor. La taxa de supervivència als 5 anys és del 64%, 26% i 5% pels subtipus embrionari botrioide, embrionari i alveolar, respectivament [43]. Dins del subtipus alveolar, la translocació PAX3-FOXO1 és un factor de mal pronòstic: els pacients PAX3-FOXO1 amb metàstasi tenen una supervivència als 4 anys del 8%, mentre que la supervivència als 4 anys augmenta fins al 75% en els pacients amb metàstasi que presenten la translocació PAX7-FOXO1 [42].

Així, la taxa de supervivència després de la recaiguda està condicionada també factors al moment del diagnòstic, com el subtipus histològic, el grup i l'estadi. En els pacients amb RMSa, la taxa de supervivència als 5 anys després de la recidiva és del 40% pel grup I i del 3%

pels grups II, III i IV. En els pacients amb RMSe, la taxa de supervivència als 5 anys després de la recidiva és del 52% pels pacients que inicialment presenten estadi 1 o pertanyen al grup I de la malaltia, 20% pels estadis 2/3 o grup II/III i 12% pels pacients del grup IV. Els tumors de pacients amb RMSe amb estadi 1 o grup I que experimenten una recaiguda local o regional o bé els tumors de RMSa del grup I (corresponent aproximadament a un 20% dels pacients que recauen) tenen una supervivència als 5 anys després de la recaiguda d'aproximadament un 50%. El 80% dels pacients amb recidiva que no tenen les característiques “favorables” mencionades, presenten una supervivència mitjana estimada del 10% [43].

1.3 Neuroblastoma

1.3.1 Epidemiologia

El neuroblastoma (NBL) és el tumor sòlid extracranial més freqüent en la infància i el tercer càncer pediàtric més comú. Representa el 7% de tots els càncers pediàtrics tot i que causa el 15% de les morts per càncer en nens. Té una incidència anual de 10.5 casos per milió de nens a Europa i Nord Amèrica en menors de 15 anys i apareix en 1 de cada 7000 naixements. La distribució per edat es caracteritza per un pic d'incidència al primer any de vida, seguit d'una disminució a la meitat en els següents anys. Així, la mitjana d'edat del diagnòstic es situa als 20 mesos, i el 90% dels casos són diagnosticats durant els primers 6 anys de vida [44, 45]. Pel que fa a la distribució per sexe del NBL, els nens són diagnosticats amb taxes equivalents o lleugerament superiors que les nenes [46].

La supervivència als 5 anys després del diagnòstic varia en funció del grup diagnòstic, i és superior al 90% en els grups de risc baix i intermedi, mentre que la dels grups d'alt risc és del 40-50%. La mitjana de supervivència als 5 anys lliure de malaltia en global es situa al 70% [47, 4].

La gran majoria de tumors de NBL no estan lligats a casos familiars, fet que suggereix una taxa baixa de mutacions a la línia germinal. Només entre l'1 i el 2% dels tumors són casos familiars, i es transmeten de forma autosòmica dominant amb penetrància incompleta [47]. S'ha observat una major incidència de casos de NBL en pacients afectes de neurofibromatosis tipus I i síndrome de Beckwith-Wiedemann [48].

1.3.2 Presentació clínica

El NBL es pot originar al llarg de tota la cadena simpàtica, fet pel qual és variable la localització del tumor primari. La majoria dels tumors de NBL (65%) es localitzen a l'abdomen, especialment en els casos de nens més grans. Com a mínim la meitat dels tumors de NBL de l'abdomen estan associats a la glàndula adrenal o als ganglis simpàtics. El 21% dels casos de NBL s'originen al tòrax, sobretot en lactants. Altres localitzacions freqüents són el coll i la pelvis. Un 1% dels casos es diagnostiquen per les metàstasis sense que es pugui arribar a localitzar el tumor primari [44, 48].

Aproximadament el 50% dels pacients de NBL presenten un tumor localitzat, i un 35% d'aquests tenen dispersió regional als ganglis limfàtics al moment del diagnòstic. L'altra meitat dels tumors de NBL es presenten amb evidència de metàstasi hematògena. Els llocs més habituals de metastatització són els ossos, la medulla òssia, el fetge i els nòduls limfàtics; i amb menor freqüència els pulmons i el SNC [47, 49].

El diagnòstic es basa en una biòpsia del tumor o aspirat de moll d'os i posterior histopatologia, i en la determinació d'un increment dels nivells de catecolamines o dels seus metabòlits en orina i/o sèrum (dopamina, àcid vanililmandèlic (VMA) i àcid homovanílic (HVA)) [50, 47]. Pel 5-10% dels tumors que no produeixen catecolamines, el diagnòstic es basa en la immunohistoquímica positiva dels marcadors de NBL, tals com: neurofilaments, sinaptofisina, GAP-43, enolasa neuronal específica (NSE, *Neuron specific enolase*) i altres marcadors addicionals que puguin diferenciar el NBL dels altres tumors del grup de tumors de cèl·lules petites, rodones i blaves típiques del nen [49].

1.3.3 Histopatologia i alteracions genètiques

L'any 1984 es va establir la classificació de Shimada, on es relacionava les característiques histopatològiques dels tumors de NBL amb el comportament clínic d'aquests. Els tumors es van classificar com a favorables (HF: histologia favorable) o desfavorables (HD: histologia desfavorable) depenent de diversos factors: grau de diferenciació neuroblàstica, contingut de cèl·lules de Schwann a l'estroma, índex de mitosi-cariorrèxis (MKI, *mitosis-karyorrhexis index*) i edat al diagnòstic [51]. La classificació de Shimada es va modificar i des de l'any 1999 els tumors neuroblàstics es classifiquen seguint el sistema de classificació patològica internacional del neuroblastoma (INPC, *International Neuroblastoma Pathology Classification*). La INPC diferencia els tumors en quatre categories

morfològiques: neuroblastoma, ganglioneuroblastoma intermedi, ganglioneuroblastoma nodular i ganglioneuroma [52]. Les característiques histopatològiques de cadascuna de les categories es resumeix a la figura 1.4.

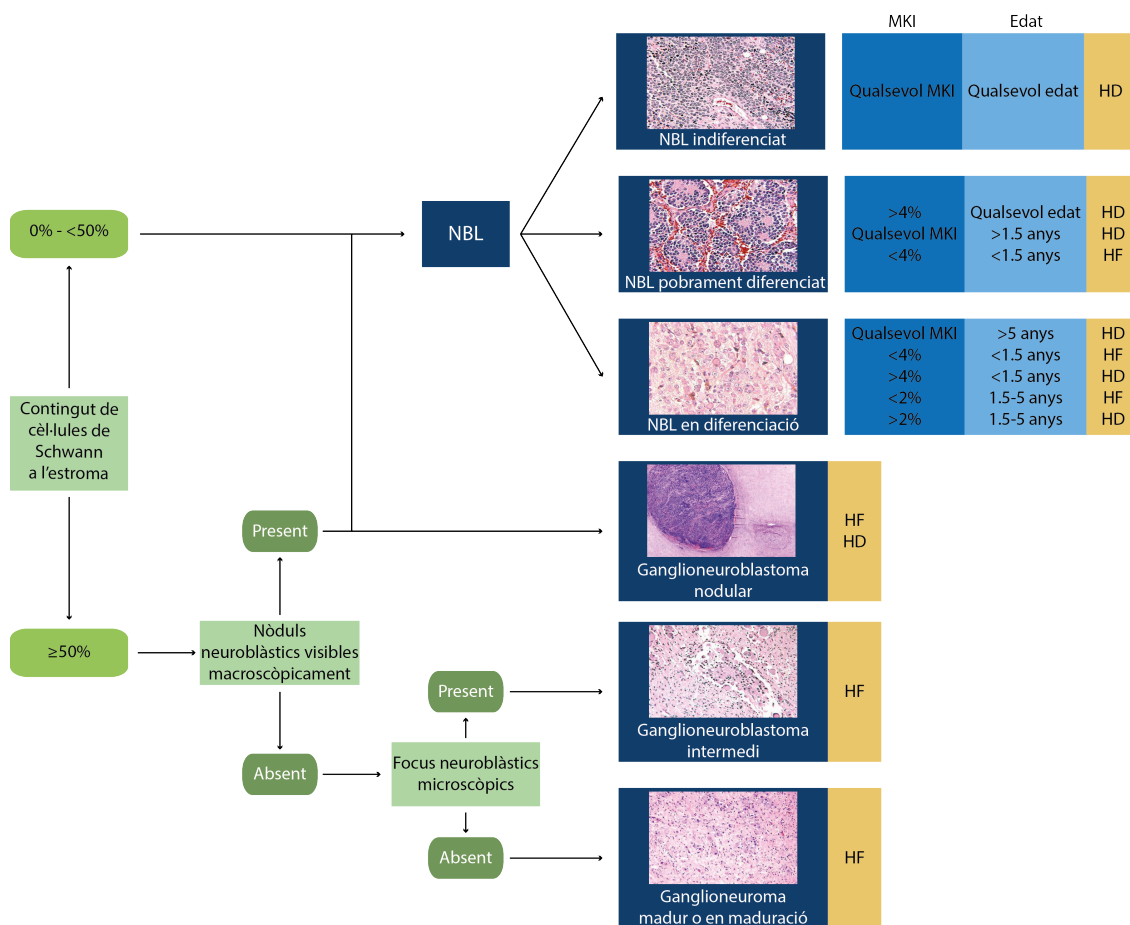


Figura 1.4. Classificació patològica internacional del NBL (INPC). Els tumors de NBL tenen un estroma pobre en cèl·lules de Schwann i estan formats per neuroblasts, cèl·lules rodones i petites que sovint no presenten diferenciació neural. Es subclassifiquen en 3 subgrups: NBL indiferenciat, NBL pobrament diferenciat i NBL en diferenciació. Els tumors que presenten diferenciació histològica parcial són el ganglioneuroblastoma intermedi (estroma ric en cèl·lules de Schwann) i el ganglioneuroblastoma nodular (compost, barreja d'estroma ric en cèl·lules de Schwann, estroma dominant i estroma pobre). El tumor més diferenciat és el ganglioneuroma, subdividit en ganglioneuroma en maduració o ganglioneuroma madur. Consisteixen en cèl·lules ganglionars en maduració o madures i un estroma ric en cèl·lules de Schwann [53, 52, 54]. Abreviatures: HD (histologia desfavorable), HF (histologia favorable), MKI (*mitosis-karyorrhexis index*). Imatges obtingudes de [54].

Algunes de les variables biològiques característiques dels tumors de NBL són les següents:

- El 20% dels tumors primaris de NBL presenten una amplificació de l'oncogen *N-MYC*, més freqüent en les formes avançades de la malaltia -estadi 4- (33%) i en menor proporció als estadis 1, 2, 3 i 4S (9%) [48]. S'associa a un mal pronòstic a causa

de la ràpida progressió tumoral i al fracàs del tractament [44]. N-MYC és un factor de transcripció que pertany a la família de protooncogens *MYC*, juntament amb *c-MYC* i *L-MYC*. N-MYC controla l'expressió de gens diana involucrats en processos cel·lulars fonamentals relacionats amb la proliferació, el creixement cel·lular, la síntesi proteica, el metabolisme, l'apoptosi i la diferenciació. La proteïna N-MYC està formada per un domini activador de la transcripció a l'extrem N-terminal, i a l'extrem C-terminal té un domini d'unió al DNA i un domini d'interacció amb proteïnes. N-MYC s'uneix a MAX i el complex recluta cofactors de transcripció i histones acetiltransferases per tal d'induir la transcripció. N-MYC també pot reprimir l'expressió de gens involucrats amb l'adhesió i la diferenciació quan s'uneix a altres factors de transcripció, tals com MIZ1 i SP1 [55].

- La deleció del braç curt del cromosoma 1 (1p), present en el 25-35% dels tumors de NBL. Aquesta deleció es correlaciona amb l'amplificació de N-MYC i amb un estadi avançat de la malaltia [44]. En els tumors que es presenta de forma aïllada està associat a un major risc de recidiva local [48].
- Les delecions en el braç llarg del cromosoma 11 (11q23), observades en els 26-44% dels tumors primaris de nens més grans. Tot i associar-se a un pronòstic desfavorable, es correlaciona inversament amb l'amplificació de N-MYC [48, 49].
- El guany d'1-3 còpies del cromosoma 17q, sovint a través de la translocació desequilibrada amb el cromosoma 1 o 11, pot correlacionar també amb un fenotip més agressiu. Els punts de ruptura de la regió 17q són variables, però un guany des del 17q22 fins al 17qterminal suggereix el guany d'un o més gens que proporcionen un avantatge selectiu. Els gens candidats inclouen *BIRC5*, *NME1* i *PPM1D*, els quals estan sobreexpressats en aquest subgrup de tumors [44].
- L'índex de DNA és un marcador pronòstic en els pacients menors de 2 anys amb malaltia disseminada. Els tumors triploides tenen millor pronòstic que els diploides o tetraploides, al no presentar aberracions genètiques estructurals. Els tumors diploides es caracteritzen per la presència d'aberracions genètiques i reorganitzacions cromosòmiques que contribueixen a l'agressivitat tumoral [48, 44].
- Mutacions germinals del gen *ALK* en la majoria de pacients amb NBL familiar (1% dels casos). També s'ha descrit anormalitats d'*ALK* en tumors esporàdics, incloent-hi l'amplificació genòmica (2-3%) i les mutacions sense sentit (8-12%). De moment, no hi ha una relació establerta entre les diferents mutacions descrites i la patogènesi de la malaltia [49, 56, 47]. Això no obstant, la mutació somàtica més freqüent d'*ALK*,

la F1174L, està associada a una ampliació de N-MYC, fet que suggereix un efecte cooperatiu en la formació del NBL [57]. ALK és una oncoproteïna de gran interès com a diana terapèutica i està creixent el nombre de teràpies dirigides contra ella [56].

- Mutacions en el gen *PHOX2B*, implicades en casos familiars de NBL. *PHOX2B* codifica per un factor de transcripció que promou la sortida del cicle cel·lular i la diferenciació neuronal, i juga un paper important en el desenvolupament de les neurones derivades de les cèl·lules de la cresta neural [58]. Les mutacions en el gen *PHOX2B* han sigut descrites només en un 2-6% dels casos familiars de NBL i rarament en NBL esporàdics, fet que indica que no és l'esdeveniment principal iniciador d'aquests tumors [59].

1.3.4 Etiologia i evolució molecular

Amb base a la localització del tumor primari i les característiques cel·lulars tumorals, està àmpliament acceptat que les cèl·lules tumorals de NBL provenen de les cèl·lules del llinatge simpatoadrenal derivades de la cresta neural durant el desenvolupament embrionari [58, 10]. Les cèl·lules tumorals mimetitzen el comportament de les cèl·lules del llinatge simpàtic en termes de creixement, migració i diferenciació [60]. Per aquest motiu, es vincula el NBL amb una embriogènesi defectuosa, i es defineix el NBL com un càncer embrionari [10].

Les cèl·lules de la cresta neural apareixen a l'embrió entre les setmanes tres i cinc de gestació en els plec neurals del que esdevindrà el nou tub neural, precursor del cervell i de la medul·la espinal. Durant la fusió dels plec neurals, les cèl·lules de la cresta neural perden les seves unions amb les cèl·lules veïnes i pateixen un procés de transició epiteli-mesènquima (EMT, de l'anglès *epithelial-mesenchymal transition*) [61]. Aquestes cèl·lules migren al llarg de l'embrió i donen lloc a diferents tipus cel·lulars: neurones perifèriques, neurones entèriques i glia, melanòcits, cèl·lules de Schwann, cèl·lules de l'esquelet craniofacial i cèl·lules de la medul·la adrenal [58] (Figura 1.5). Alguns tipus cel·lulars pateixen una posterior transició mesènquima-epiteli (MET, de l'anglès *mesenchymal-epithelial transition*), com és el cas de cèl·lules epitelials que formen el notocordi, els somites o els conductes nefrítics [61].

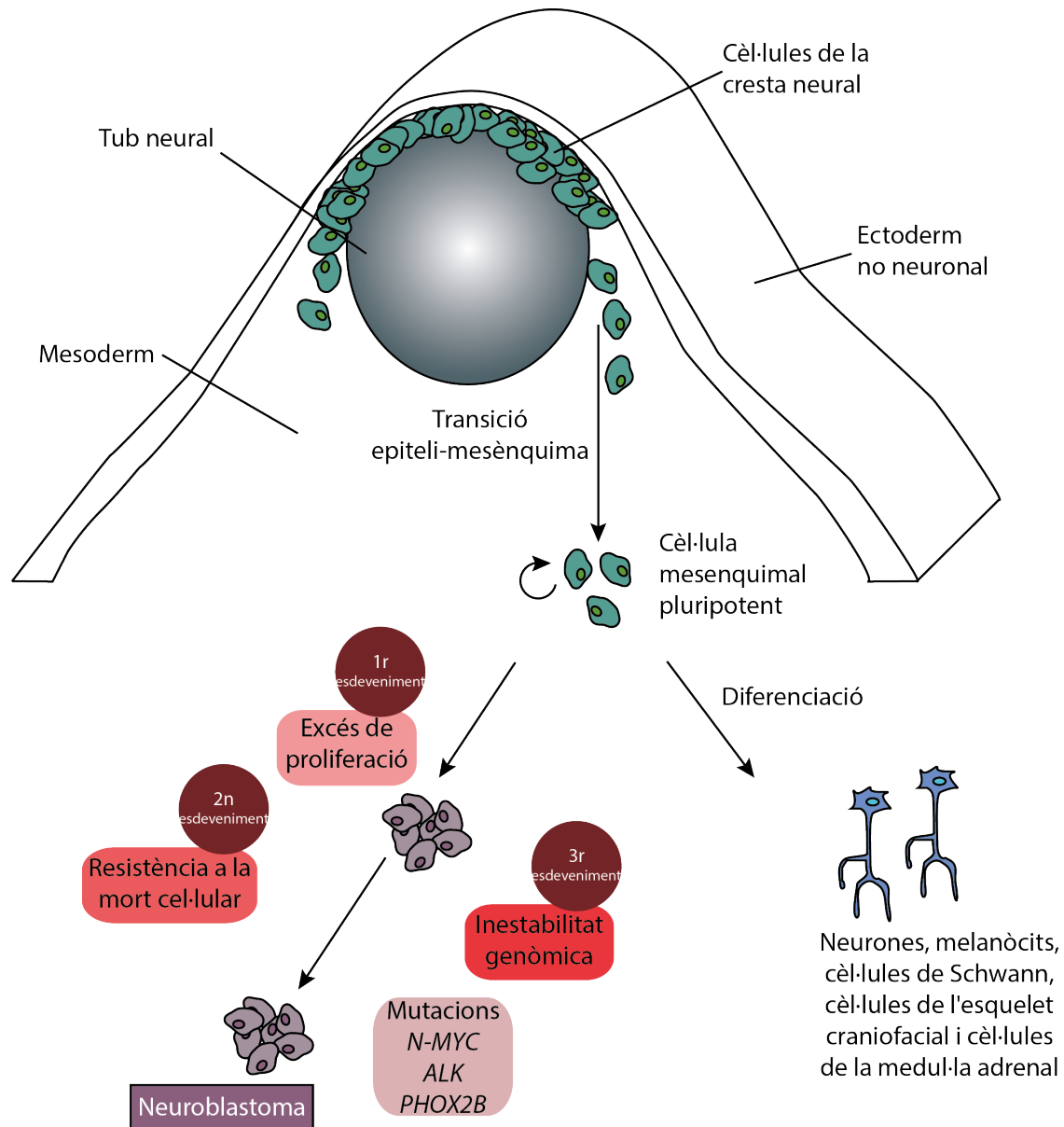


Figura 1.5. Procés de diferenciació de les cèl·lules de la cresta neural i origen del NBL. Les cèl·lules de la cresta neural pateixen una transició epiteli-mesènquima i migren al llarg de l'embrió, donant lloc a diferents tipus cel·lulars que esdevindran nous teixits i òrgans. L'origen embrionari del NBL rau en les cèl·lules de la cresta neural, que experimenten els tres esdeveniments descrits en els càncers embrionaris. La mutació de *N-MYC* és somàtica, mentre que les mutacions dels gens *ALK* i *PHOX2B* són germinals [10].

La inducció de la migració de les cèl·lules de la cresta neural és un procés complex que involucra interaccions de la placa neural, l'ectoderma no neuronal i el mesoderma. Aquestes interaccions activen el procés d'EMT i indueixen a les cèl·lules de l'epiteli neural a desenganxar-se per tal d'esdevenir cèl·lules mesenquimàtiques pluripotents i que puguin migrar a altres localitzacions. La delaminació és el conjunt d'esdeveniments que permeten

la separació física de les cèl·lules de la cresta neural del propi tub neural [62]. Pel procés d'EMT és necessària la coordinació de factors de transcripció i vies de senyalització cel·lulars, com també canvis en les unions cel·lulars i polaritat, en l'adhesió cel·lular i en la matriu extracel·lular [63].

Les vies de senyalització implicades en la transició epiteli-mesènquima de les cèl·lules de la cresta neural són similars a les que s'activen en els processos d'EMT durant la progressió tumoral [61]. Cal la integració de senyals extracel·lulars, com components de la matriu extracel·lular i els lligands secretats, tals com els de les famílies de $TGF\beta$, WNT, FGF i BMP. Aquests estímuls són produïts per les cèl·lules veïnes: les de la placa neural, l'ectoderma no neural i el mesoderma [64]. La via WNT indueix l'expressió de N-MYC, protooncògen necessari per a la migració, la diferenciació i la supervivència [65]. Els factors de transcripció implicats són, entre altres, Snail1, Snail2, Twist, SoxE, FoxD i ETS, els quals són essencials pel correcte desenvolupament de la cresta neural i la seva expressió està augmentada en molts càncers [62].

Els factors de transcripció implicats reprimeixen directament la transcripció de cadherines dels tipus I (E-cadherina, cadherina 6B i N-cadherina), i es perden tant les unions com la polaritat cel·lular. S'indueix la transcripció de les cadherines tipus II, com la cadherina 5 i 7, fet que fa augmentar la pèrdua d'adhesió i confereix una major capacitat de migració [66, 62]. Hi ha moltes altres proteïnes implicades en el procés d'EMT. Per exemple, hi ha un increment de l'expressió d'algunes MMPs, ADAMs i integrines. Aquestes molècules permeten la digestió de la matriu extracel·lular en la membrana basal del tub neural, fet necessari per aconseguir una migració completa [63].

El delicat equilibri entre mort cel·lular, proliferació, autorenovació, migració i diferenciació és crucial per a un desenvolupament neuronal correcte. Defectes en qualsevol dels mecanismes que controlen aquests processos poden promoure les cèl·lules en desenvolupament a la tumorigènesi [67].

1.3.5 Factors pronòstics i estadificació

Amb l'heterogeneïtat biològica i clínica que presenten els tumors de NBL és essencial definir estratificacions dels pacients per tal d'obtenir un millor resultat en els tractaments aplicats. Els factors pronòstics clínics i biològics més importants a l'hora de l'estratificació dels pacients són els següents [47]:

- Estadi (classificació INSS). Favorable: 1, 2, 4S. Desfavorable: 3, 4.
- Edat. Favorable: <547 dies. Desfavorable: \geq 547 dies.
- Histologia. Favorable o desfavorable segons la classificació INPC.
- Índex de DNA. Favorable: triploide. Desfavorable: diploide, tetraploide.
- Estat *N-MYC*. Favorable: no amplificat. Desfavorable: amplificat (>10 còpies).
- Estat de les zones cromosòmiques 1p36, 11q i 17q. Favorable: normal. Desfavorable: deleció, deleció i guany, respectivament.

Amb l'objectiu d'estandarditzar els elements característics més importants de la malaltia i facilitar l'intercanvi d'informació entre diferents institucions, es va formular la classificació INSS (*International Neuroblastoma Staging System*) l'any 1988 [68], posteriorment revisada l'any 1993 [50]. La classificació INSS està basada en paràmetres clínics, d'imatge i de cirurgia en la postcirurgia dels pacients i és utilitzada generalment pel pronòstic de la malaltia. Segons aquesta classificació el NBL es classifica en 4 estadis principals, resumits a la taula 1.9. L'estadi 1 comprèn els tumors localitzats amb resecció completa, mentre que els tumors localitzats parcialment extirpats amb o sense infiltració als ganglis limfàtics són classificats en els estadis 2 i 3 depenent de la quantitat de la resecció del tumor, de la invasió local i la infiltració als ganglis limfàtics. L'estadi 4 fa referència a l'existència d'una disseminació del tumor primari a ganglis limfàtics distants, altres òrgans o disseminació hematògena. Existeix un cas especial, l'estadi 4S (*4Special*), on la disseminació només es limita al fetge, a la pell i/o a la medul·la òssia amb poca infiltració. Els tumors de l'estadi 4S tenen un gran potencial de regressió espontània, al contrari dels tumors de l'estadi 4 que presenten una alta agressivitat [45].

Taula 1.9. Classificació INSS del NBL. Adaptat de [44].

Estadi	Descripció
1	tumor localitzat amb resecció completa amb malaltia residual microscòpica o sense. Nòduls limfàtics ipsilaterals negatius per tumor (els nòduls enganxats al tumor poden ser positius)
2A	tumor localitzat amb resecció incompleta, nòduls limfàtics ipsilaterals no adjacents negatius
2B	tumor localitzat amb o sense resecció completa amb nòduls limfàtics ipsilaterals no adjacents positius per tumor, nòduls limfàtics contralaterals negatius
3	tumor unilateral sense possible resecció, infiltrat a través de la línia mitja, amb implicació dels nòduls limfàtics regionals o sense; o tumor unilateral localitzat amb implicació dels nòduls limfàtics de la regió contralateral; o tumor en la línia mitja amb extensió bilateral per infiltració (impossible la resecció) o per implicació de nòdul limfàtics
4	qualsevol tumor primari amb disseminació a nòduls limfàtics distants, os, medul·la òssia, fetge, pell o altres òrgans (excepte els definits en l'estadi 4S)
4S	tumor primari localitzat (com està definit per als estadis 1, 2A o 2B), en infants amb edat inferior a l'any amb disseminació limitada a pell, fetge o medul·la òssia (<10% cèl·lules malignes)

L'any 2005 es va proposar una classificació més uniforme que la INSS, ja que aquesta al dependre de paràmetres quirúrgics no resultava universal a causa de la variabilitat de les tècniques usades en diversos centres. Es va crear la classificació internacional del neuroblastoma per grup de risc, la INRGSS (*International Neuroblastoma Risk Group Staging System*). Es van analitzar 8800 casos compresos entre l'any 1990 i l'any 2002 per tal de definir un sistema d'estratificació dels pacients al moment del diagnòstic abans de l'aplicació del tractament [69, 70]. La classificació es basa en la imatge tumoral en el moment del diagnòstic i els factors de risc són basats també en la imatge. L'INRG (*International Neuroblastoma Risk Group*) divideix els pacients en estadis, tal com es mostra a la taula 1.10. El grup L1 i L2 agrupen els tumors localitzats amb factors de risc basats en la imatge o sense, respectivament. L'estadi M correspon a la malaltia disseminada, i l'estadi MS inclou els tumors de NBL de pacients de 0 a 18 mesos d'edat i amb un patró específic de metàstasi [70].

Taula 1.10. Divisió de pacients per estadis en la classificació INRGSS. Adaptat de [70].

Estadi	Descripció
L1	tumor localitzat confinat a un compartiment del cos sense afectació d'estructures vitals
L2	tumor locoregional amb presència d'1 o més factors de risc basats en la imatge
M	malaltia metastàtica distant, excepte els casos inclosos a l'estadi MS
MS	malaltia metastàtica en pacients <18 mesos d'edat. Metàstasis presents en pell, fetge i/o medul·la òssia

La classificació INRGSS (Taula 1.11) incorpora aspectes genètics per l'estadificació dels pacients. Els factors més rellevants per tal de definir els grups són els següents: estadi INRG, edat, categoria histològica, grau de diferenciació del tumor, estat d'amplificació de l'oncogèn *N-MYC*, absència/presència d'aberracions al cromosoma 11q i índex de DNA. Com a resultat de la utilització d'aquests criteris s'obtenen 16 grups de pretractament de pacients estadísticament i/o clínicament diferents (llistats de la A a la R) (Taula 1.11) [69]. Les categories de risc són molt baix (A, B, C), baix (D, E, F), intermedi (G, H, I, J) o alt (K, N, O, P, Q, R). La supervivència als 5 anys després del diagnòstic és de >85%, >75% a ≤85%, ≥50% a ≤75% i <50, amb una proporció de pacients del 28.2%, 26.8%, 9% i 36.1%, respectivament als grups de risc molt baix, baix, intermedi i alt [69].

Taula 1.11. Classificació internacional del NBL en grup de risc segons INRG, INRGSS. Adaptat de [69].

Estadi INRG	Edat (mesos)	Categoria histològica	Grau de diferenciació tumoral	<i>N-MYC</i>	Aberració 11q	Índex de DNA	Pretractament de grup de risc
L1/L2		GN en maduració, GNB intermedi					A molt baix
L1		qualsevol excepte GN en maduració i GNB intermedi		NA			B molt baix
				Amp			K elevat
L2	<18	qualsevol excepte GN en maduració i GNB intermedi		NA	no		D baix
					sí		G intermedi
	≥18	GNB nodular, NBL	diferenciat o pobrament diferenciat o indiferenciat	NA	no		E baix
					sí		H intermedi
				Amp		N elevat	
M	<18			NA		hiperdiploide	F baix
	<12			NA		diploide	I intermedi
	De 12 a <18			NA		diploide	J intermedi
	<18			Amp			O elevat
	≥18						P elevat
MS	<18			NA	no		C molt baix
					sí		Q elevat
					Amp		R elevat

Amp: amplificat; GN: Ganglioneuroma; GNB: Ganglioneuroblastoma; NA: no amplificat; NBL: Neuroblastoma.

1.3.6 Malaltia metastàtica i recidivant

Aproximadament un 50% dels pacients amb NBL presenten metàstasi al moment del diagnòstic, i la quimioteràpia juga un paper important en el tractament, ja que tals pacients requereixen un tractament sistèmic [49]. Malgrat els recents avenços, molts pacients amb NBL d'alt risc presenten malaltia refractària que no respon a la teràpia o experimenten recurrència de la malaltia, i no hi ha tractaments curatius establerts per a la majoria d'aquests pacients [47].

El 25% dels pacients amb NBL experimenten recidiva, i la supervivència als 5 anys després de la primera recaiguda és del 20% [71]. D'aquests, un 50-60% corresponen a pacients amb NBL d'alt risc [72]. Els pacients que experimenten recidiva en un temps curt tenen un pronòstic desfavorable, aproximadament un 80% moren en els 2 anys següents i malauradament la majoria de recidives es presenten en aquestes condicions. Per contra, si la recidiva apareix més tard, la supervivència augmenta [71].

En un estudi recent de tres assaigs clínics dut a terme per la ITCC/SIOPEN (ITCC: *Innovative Therapies for Children with Cancer*, SIOPEN: *International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma*) van observar una supervivència mitjana de 12.5% i 5.7% en pacients amb NBL refractari i recidiva, respectivament. Les taxes de supervivència mitjanes eren de 27.9 mesos pels pacients amb malaltia refractària i 11 mesos pels pacients amb recidiva, confirmant les taxes baixes en ambdues cohorts de pacients [73].

1.4 Metàstasi

La recerca dels factors que regulen la metàstasi va començar l'any 1889 quan el Dr. Stephen Paget va analitzar dades post mortem de dones amb càncer i va observar l'alta freqüència de metàstasis als ovaris i la diferent incidència de metàstasis òssies associades a diferents tumors primaris. El Dr. Paget va concloure que la distribució de les cèl·lules metastàtiques a l'òrgan a metastatitzar no és casual i va suggerir la hipòtesi de la llavor i el sòl: les metàstasis es desenvolupen només quan la llavor (de l'anglès *seed*, referint-se a certes cèl·lules tumorals amb capacitat metastàtica) i el sòl (de l'anglès *soil*, referint-se als òrgans que proporcionen un microambient favorable al creixement de les llavors) són compatibles [74]. Des de llavors i fins ara, diferents autors han validat la complexa interacció entre les cèl·lules tumorals i el microambient de l'òrgan hoste com un dels determinants en la disseminació metastàtica d'un tumor. La hipòtesi de la llavor i el sòl és àmpliament acceptada i citada després de més de 120 anys, no obstant els termes s'han actualitzat: la llavor s'ha rebatejat com cèl·lula progenitora, cèl·lula mare tumoral, cèl·lula iniciadora de tumor o cèl·lula metastàtica; mentre que el sòl es defineix com els factors de l'òrgan hoste, l'estroma o el microambient [75].

Una visió moderna de la hipòtesi de la llavor i el sòl inclou els principis següents [76]:

- Els tumors són un grup heterogeni de cèl·lules amb diferent capacitat invasiva, metastàtica i d'angiogènesi.
- La metàstasi és un procés altament selectiu, exclusiu per una petita subpoblació de cèl·lules que existeixen en la neoplàsia heterogènia parental. Aquelles cèl·lules que són capaces d'envair, sobreviure a la circulació, extravasar i proliferar a un òrgan distant són les úniques que podran metastatitzar.
- El resultat de les metàstasis és dependent de la interacció de les cèl·lules metastàtiques -la llavor- i dels mecanismes homeostàtics de l'òrgan hoste -el sòl-.

El procés metastàtic representa el producte final d'un procés de múltiples etapes anomenat la cascada metastàtica, que implica la difusió de les cèl·lules canceroses a òrgans distants i la seva posterior adaptació al microambient del nou teixit [77]. En el tumor primari, les cèl·lules tumorals incrementen la seva mobilitat intrínseca adoptant programes cel·lulars que els hi permeten tant la invasió individual com la col·lectiva. La majoria de tumors sòlids es troben en xarxes complexes formades per matriu extracel·lular, membrana basal i vasculatura, les quals construeixen múltiples barreres físiques que les cèl·lules tumorals han de superar. Les

futures DTCs (DTCs, *disseminated tumour cells*) han de ser capaces de remodelar l'estroma que les envolta mitjançant la sobrerregulació de proteases extracel·lulars, com la família MMP, que digereixen la membrana basal i la matriu extracel·lular. Les integrines també tenen un paper en la remodelació de la matriu extracel·lular, augmenten les adhesions focals i activen la invasió cel·lular. Conseqüentment, l'activació de quinases com FAK o p-130Cas promouen l'entrecruament del col·lagen tipus I, i provoquen la malignitat cel·lular [78]. Per altra banda, les cèl·lules estromals que envolten les cèl·lules tumorals contribueixen a la seva disseminació induint la seva mobilitat mitjançant senyals paracrins. Els CAFs (CAFs, *cancer-associated fibroblasts*) i les cèl·lules infiltrades del sistema immunitari exerceixen funcions protumorigèniques, remodelen la matriu extracel·lular mitjançant enzims i permeten que el microambient del tumor afavoreixi la invasió cel·lular. Tanmateix, la hipòxia i la inflamació també actuen com inductors de la disseminació del tumor, probablement induint directament el procés de transició epiteli-mesènquima de les cèl·lules tumorals [79, 80] (Figura 1.6).

Un cop les cèl·lules tumorals han envaït l'estroma, han d'accedir al sistema circulatori per tal de tenir accés a altres òrgans. Els vasos sanguinis dels tumors presenten característiques anormals, incloses discontinuïtats en la membrana basal i unions fràgils entre cèl·lules, fet que facilita la intravasació de les cèl·lules tumorals. Els vasos limfàtics no presenten una membrana basal contínua ni unions estretes entre cèl·lules, fet que proveeix una ruta accessible de disseminació de les cèl·lules tumorals als nòduls limfàtics regionals [77]. La integrina $\beta 1$ activa CDC-42, i permet la interacció de les cèl·lules tumorals amb les cèl·lules epitelials i facilita així la migració transendotelial [81] (Figura 1.6). Les cèl·lules tumorals poden incrementar la permeabilitat dels vasos sanguinis en llocs on les cèl·lules endotelials normals presenten unions fortes (per exemple cervell o pulmons) per tal de promoure la migració transendotelial. En la intravasació també hi intervenen cèl·lules del sistema immunitari com els macròfags, que ajuden a les cèl·lules tumorals a entrar dins la circulació sanguínia [79].

Un cop aconseguida l'arribada al torrent sanguini, sigui directament o bé a través del sistema limfàtic, les cèl·lules tumorals han de sobreviure al transport i aconseguir parar-se a un òrgan distant adherint-se a les parets dels vasos. Les cèl·lules tumorals circulants o CTCs (CTCs, *circulating tumour cells*) han de vèncer als limfòcits reactius, que es troben en major concentració en circulació comparat amb el tumor primari. Les CTCs expressen CD47, molècula que bloqueja la fagocitosi per part dels macròfags. El receptor TrkB inhibeix l'anoikis de les CTCs activant la via PI3K-AKT [80]. Les plaquetes juguen un paper important en la protecció de les CTCs, ja que formen agregats protectors amb les cèl·lules tumorals i interfereixen en la fagocitosi per part del sistema immunitari tot impeding el

reconeixement per part d'aquest [79] (Figura 1.6).

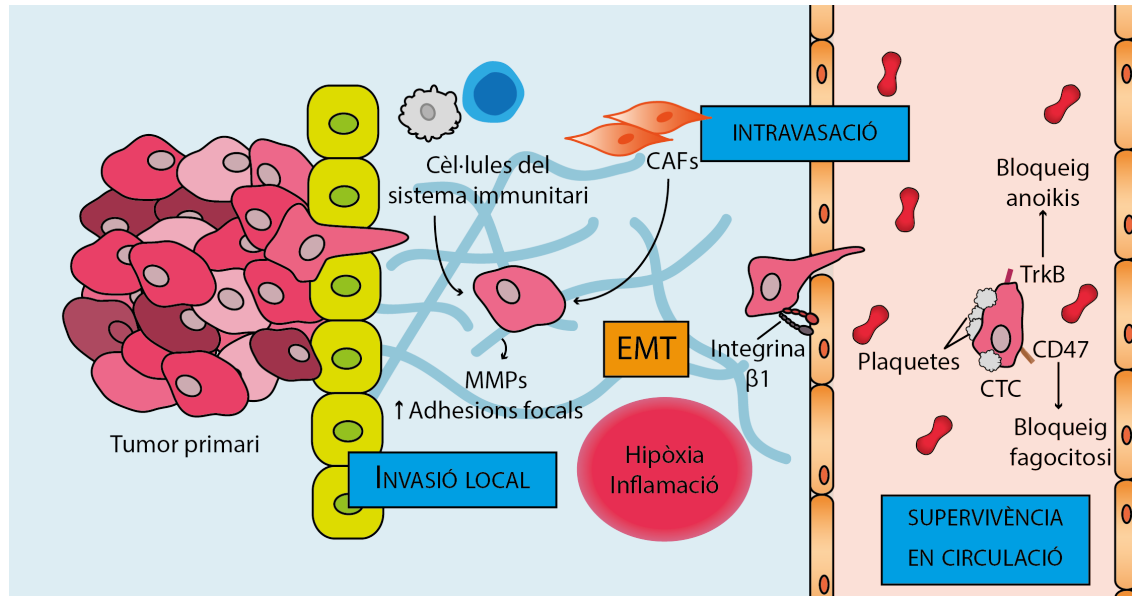


Figura 1.6. Representació dels primers passos de la cascada metastàtica. La cascada metastàtica consisteix en set etapes consecutives que ha de dur a terme una cèl·lula tumoral per tal d'aconseguir generar un tumor secundari. La invasió local i la disseminació de les cèl·lules tumorals circulants (CTCs) són els primers passos de la metàstasi. Les cèl·lules del tumor primari degraden la membrana basal i envaeixen localment la matriu extracel·lular i les capes de cèl·lules estromals per tal d'accedir al sistema circulatori. Les CTCs han de sobreviure en circulació i aconseguir parar-se a un òrgan distant i créixer per esdevenir macrometàstasi. A més de les capacitats de les cèl·lules tumorals, s'il·lustra l'ajuda d'altres factors que afavoreixen la progressió tumoral. Figura basada en [80].

Les cèl·lules metastàtiques surten del torrent sanguini -procés conegut com a extravasació- i s'instal·len en el parènquima dels teixits distants. La majoria de DTCs arriben al lloc metastàtic de manera individual i han de reactivar el creixement per generar una nova colònia i establir metàstasi, morir, o bé entrar en l'estat de latència. Per tant, encara que les cèl·lules tumorals aconseguixin instal·lar-se a un òrgan secundari, aquest fet no assegura la seva supervivència o expansió. El microambient del lloc secundari pot impedir la seva supervivència i creixement cel·lular. Alternativament, les cèl·lules poden sobreviure als mecanismes de defensa i romandre com a micrometàstasi latent, persistint a l'organisme al llarg del temps sense ser detectades [79].

L'estat de latència s'ha definit com una parada temporal mitòtica i del creixement, que pot ser deguda a una mala adaptació de les DTCs al nou estroma, ja que estan privades de les interaccions d'adhesió i senyalitzacions presents al tumor primari [80]. La latència es divideix en tres categories: la cel·lular, l'angiogènica i la latència mediada pel sistema immunitari. En la latència cel·lular, les cèl·lules tumorals es troben en un arrest a la fase G0-G1. Aquesta

parada és mediada per senyals del microambient, com les interaccions de les integrines amb la matriu extracel·lular o la desregulació de senyals mitogènics i d'estrès [79]. Tanmateix, el creixement als llocs secundaris és dependent de l'establiment d'un abastament sanguini adequat. La creació de nous vasos sanguinis limita el pas de micro- a macrometàstasi. La latència angiogènica es presenta en els tumors micrometastàtics que no creixen més d'1-2mm de diàmetre, degut a un balanç entre proliferació i apoptosi [79]. Finalment, les cèl·lules tumorals latents poden dur a terme immunoedició, infraexpressant antígens com MHC-I i proteïnes de la família LMP. D'aquesta manera poden sobreviure a la vigilància del sistema immunitari i crear nous tumors en un estat immunosupressor [79, 82]. El període de latència difereix entre els diferents tipus de càncer: en el càncer de pulmó de cèl·lules petites i en el pancreàtic, per exemple, la malaltia metastàtica tendeix a aparèixer al cap de poc temps després del diagnòstic; mentre que molts pacients amb càncer de mama i pròstata, melanoma o carcinoma de cèl·lules renals la malaltia metastàtica pot aparèixer després d'un període molt llarg de latència [80].

Per la culminació de la cascada metastàtica cal que es reiniciïn els programes de proliferació cel·lulars, i es generin creixements macroscòpics i clínicament detectables. Durant la colonització metastàtica les cèl·lules tumorals són dirigides a un microambient específic, conegut com el nínxol premetastàtic. Aquest microambient és diferent del teixit normal, està enriquit en citoquines i factors de creixement que proporcionen la invasió i l'angiogènesi en unes condicions hipòxiques. El creixement en aquest microambient únic es considera un procés autònom en el qual s'involucren interaccions complexes amb el tumor primari [83]. Les cèl·lules tumorals, tant als tumors primaris com a la circulació, poden alliberar factors solubles o microvesícules per convertir els llocs metastàtics incipients amb nínxols premetastàtics compatibles. Juntament amb altres tipus cel·lulars, remodelen el nou teixit per accelerar l'adhesió cel·lular, la invasió i la colonització [80]. Quan la ràtio de proliferació supera el d'apoptosi, s'indueix el pas de micro- a macrometàstasi, degut a senyals genètics, epigenètics o del microambient [84]. Els requeriments per la colonització metastàtica són similars a aquells que s'han identificat pels tumors primaris, incloent-hi la necessitat d'un estroma i un subministrament sanguini adequat [77, 85]. En el procés de reactivació i expansió hi intervenen molts factors, a més de la reactivació de certes vies de senyalització com la de PI3K-AKT. Cal que hi hagi una vascularització sostinguda, i el sistema immunitari i el de coagulació -amb el paper del factor tissular (TF, *tissue factor*)- ajuden a les cèl·lules tumorals a expandir-se. Els TAMs (TAMs, *Tumor-associated macrophages*) ajuden a l'extravassació i al creixement metastàtic [79].

El procés metastàtic és altament ineficient, menys del 0.02% de les cèl·lules tumorals que

entren al sistema circulatori acaben desenvolupant metàstasis macroscòpiques. Els models experimentals han servit per estudiar quins passos del procés són els limitants, i s'ha definit la colonització metastàtica com el pas més ineficient del procés [85, 86].

Mentre que la resecció quirúrgica i la teràpia adjuvant majoritàriament és efectiva en els tumors primaris, no ho esdevé normalment en la malaltia metastàtica a causa del caràcter sistèmic i la resistència de les cèl·lules tumorals disseminades als agents terapèutics existents. Aquest fet explica perquè la metàstasi és la responsable del 90% de les morts, i no la presència del tumor primari [87]. La detecció precoç i la millora de les teràpies han resultat en un augment de la supervivència dels pacients. Tot i això, la teràpia personalitzada sovint ofereix uns pocs mesos més de supervivència als pacients amb càncer avançat, i l'eficàcia de la teràpia adjuvant en reduir el risc de metàstasi ha arribat a una fase *plateau*. És crucial traslladar el coneixement de les cèl·lules metastàtiques i la seva interacció dinàmica amb els components estromals al tractament de pacients [80]. Així doncs, és vital la recerca dels factors que intervenen en el procés metastàtic i el desenvolupament d'agents terapèutics contra els passos claus de la cascada metastàtica per intentar frenar el procés.

1.5 Integrines

1.5.1 Estructura i classificació de les integrines

Les integrines pertanyen a una superfamília de receptors transmembrana glicoproteics tipus I. Es presenten en heterodímers compostos per una subunitat α i una β enllaçades per una unió no covalent. S'han descrit divuit subunitats α i 8 subunitats β , que donen lloc a vint-i-quatre heterodímers diferents en organismes vertebrats. No existeix homologia entre la subunitat α i la β , mentre que entre les diferents subunitats α i les diferents subunitats β existeix una identitat de seqüència del 30% i del 45%, respectivament. Els gens codificants per ambdues subunitats en humans es localitzen en diferents cromosomes [88]. Cada subunitat α i β està formada per un ectodomini gran (>700 aa), un únic domini transmembrana i una cua citoplasmàtica generalment curta (<70 aa) (Figura 1.7). La part N-terminal del domini extracel·lular de les subunitats α i β s'uneixen per tal de formar el cap de la integrina, que és el lloc d'unió al lligand. D'altra banda, els residus dels extrems C-terminals extracel·lulars de cada subunitat donen lloc a dues cames llargues que suporten el cap de la integrina [89].

La part N-terminal del domini extracel·lular de la subunitat α consta de set repeticions de 60aa de làmines β enrotllades formant una estructura d'hèlix enrotllada, i l'extrem C-terminal

de l'ectodomini de la subunitat α està compost pels dominis *Thigh*, *Calf-1* i *Calf-2*. Es distingeixen dos subgrups de subunitats α . El primer grup, on s'inclouen nou de les divuit subunitats α descrites ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, $\alpha 11$, αL , αM , αX , αD i αE), es caracteritza per la presència del domini I (Inserit o Interactiu) o domini A, d'uns 200aa, entre les repeticions 2 i 3 de les làmines β . El domini I és el responsable de la unió amb el lligand en el motiu anomenat MIDAS (MIDAS: *metallic-ion-dependent adhesive site*) amb la coordinació d'un ió Mg^{2+} . El segon grup de subunitats α es caracteritza per la presència d'un punt de tall proteolític a l'extradomini a prop de la regió transmembrana. L'escissió posttranscripcional del precursor de la cadena α dona lloc a dos fragments que resten associats per un pont disulfur (a excepció de l' $\alpha 4$). El fragment curt inclou una part petita del domini extracel·lular, el domini transmembrana i el domini citoplasmàtic, mentre que el fragment llarg conté la major part del domini extracel·lular. Aquest grup està compost per l' $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, αv , αIIb i αE , tot i que l' $\alpha 4$ és processada de forma diferent en dos fragments de la mateixa mida i aquests no estan units per un pont disulfur. En aquest subgrup on el domini $I\alpha$ és inexistent, el responsable de la unió amb el lligand és el domini $I\beta$ -present en la subunitat β - [90, 88, 91].

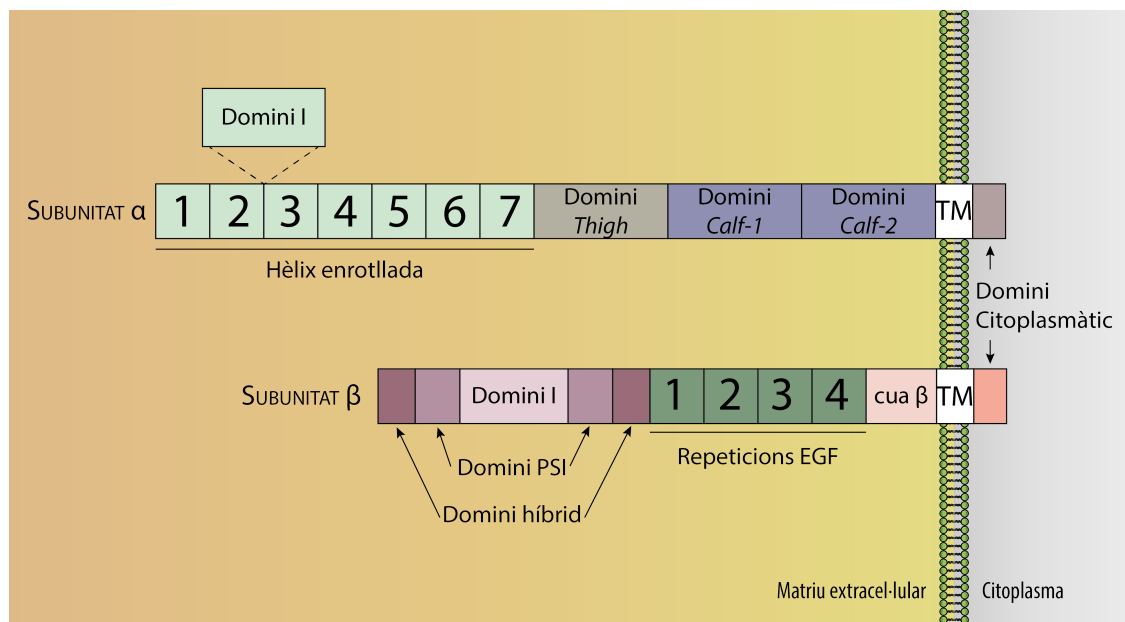


Figura 1.7. Estructura i dominis de les subunitats α i β de les integrines. La part N-terminal de la subunitat α consta de set repeticions de làmines β enrotllades formant una estructura d'hèlix enrotllada, i la part C-terminal consta dels dominis *Thigh*, *Calf-1* i *Calf-2*. Algunes subunitats α presenten el domini I entre les repeticions 2 i 3 de l'hèlix enrotllada. La subunitat β consta del domini híbrid, el domini PSI, el domini $I\beta$, quatre repeticions EGF riques en cisteïna i la cua β . Ambdues subunitats presenten un únic domini transmembrana (TM) i un domini citoplasmàtic generalment curt. Figura basada en [88].

El domini extracel·lular de la subunitat β està compost per vuit dominis: el domini PSI (PSI: *plexin-semaphorin-integrin*), el domini híbrid, el domini $I\beta$, quatre repeticions EGF riques en cisteïna i la cua β . El domini $I\beta$ és estructuralment molt similar al domini I de certes subunitats α , ja que conté un motiu MIDAS flanquejat pel motiu ADMIDAS (ADMIDAS: *adjacent to MIDAS*) i el motiu SyMBS (*synergistic metal ion-binding site*). Tant el motiu ADMIDAS com el SyMBS lliguen preferencialment ions Ca^{2+} . El motiu ADMIDAS és considerat un motiu regulador negatiu, ja que inhibeix l'activació de la integrina reforçant la forma inactiva d'aquesta. En canvi, el motiu SyMBS té una funció reguladora positiva, ja que exerceix una sinergia amb el motiu MIDAS a l'hora de la unió amb el lligand [92].

L'àrea entre el domini $I\beta$ i la superfície de l'hèlix enrotllada de la subunitat α sembla ser crucial per l'heterodimerització, que es dona dins la cèl·lula abans que la integrina sigui transportada a la superfície. L'especificitat de la selecció de les cadenes α i β rau en aquestes superfícies de contacte. Generalment, a la cèl·lula hi ha un excés de subunitats β i són les subunitats α les que determinen la quantitat de receptor que serà transportat a la superfície cel·lular [90].

Les cues citoplasmàtiques d'ambdues subunitats són curtes, no superant els 75aa excepte la β_4 , composta per 1000aa incloent quatre repeticions de fibronectina tipus III. Existeix un alt grau d'homologia entre les cues citoplasmàtiques de les subunitats β , mentre que les de les subunitats α difereixen entre elles conservant només el domini GFFKR a prop de la regió transmembrana, necessària per a l'associació amb la cua β . La majoria de cues citoplasmàtiques β contenen un o dos motius NPXY/F, motiu que forma part de la seqüència de reconeixement canònica pels dominis PTB (PTB: *phosphotyrosine-binding domain*, domini d'unió a fosfotirosines), present en moltes proteïnes de senyalització i del citoesquelet. La fosforilació de la tirosina (Y) en el motiu NPXY/F és una manera de regular les interaccions de les integrines amb proteïnes intracel·lulars. Tant la cua citoplasmàtica α com la β són capaces d'unir-se a proteïnes intracel·lulars tals com la talina, que es lliga a filaments d'actina i forma una connexió amb el citoesquelet, essencial per les funcions mediades per les integrines [88].

El lloc d'unió amb el lligand es forma en la regió de la intersecció entre el domini $I\beta$ i la cadena α , i és aquesta última la que determina l'especificitat pel lligand [90]. Es distingeixen quatre grups principals dins la classificació de les integrines en funció de l'especificitat pel lligand: receptors de RGD, receptors de col·lagen, receptors de laminina i receptors específics de leucòcits (Figura 1.8). La seqüència RGD és la seqüència clàssica d'unió a les integrines, i 1/3 del total de les integrines són capaces de reconèixer-la. Aquesta seqüència es presenta en lligands com la fibronectina, la vitronectina i el fibrinogen. La seqüència GFOGER

(O=hidroxiprolina) és la seqüència de reconeixement de diferents tipus de col·lagen [93, 90]. Existeix redundància en les interaccions entre els lligands de la matriu extracel·lular i les integrines. Diverses integrines s'uneixen al mateix lligand tot i que amb diferent afinitat, i al mateix temps un mateix lligand pot ser reconegut per diverses integrines. Tot i això, cada integrina té una funció específica i única, tal com mostren els models *knock-out*, i tot i que la majoria d'heterodímers estan àmpliament expressats en molts teixits, alguns tenen l'expressió restringida a un tipus cel·lular. Per exemple, l' $\alpha IIb\beta 3$ es troba només en les plaquetes, l' $\alpha 6\beta 4$ només en queratinòcits i l' $\alpha E\beta 7$, l' $\alpha 4\beta 7$, l' $\alpha 4\beta 1$ i la família de $\beta 2$ està restringida als leucòcits [88].

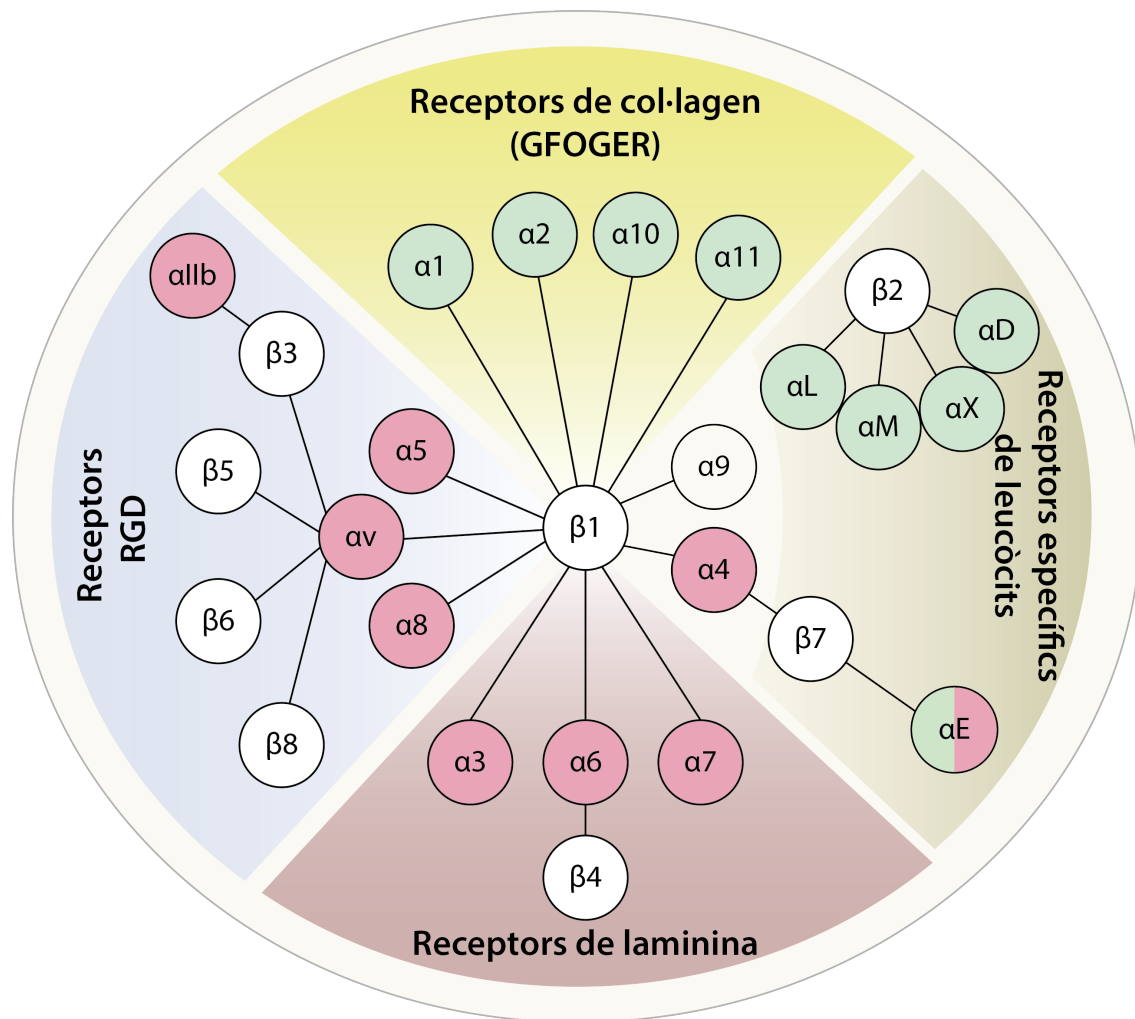


Figura 1.8. Classificació de la família de les integrines en funció del seu lligand. Existeixen un total de 24 heterodímers diferents, els quals agrupats en funció de l'especificitat al seu lligand es reparteixen en els quatre grups principals: receptors de col·lagen, receptors de la seqüència RGD, receptors de laminina i receptors específics de leucòcits. Les 9 subunitats α que presenten el domini I estan representades en verd, mentre que les que presenten el tall proteolític estan representades en rosa. Figura adaptada de [90].

Les interaccions mediades per les integrines amb la matriu extracel·lular són necessàries per a l'adhesió, l'organització del citoesquelet, la migració, la proliferació, la diferenciació, la invasió i la supervivència de les cèl·lules en un context ampli de processos biològics incloent la fertilització, la implantació i desenvolupament embrionari, la resposta immune, la resorció òssia i l'agregació plaquetària. Les integrines participen en processos patològics com la inflamació, la cicatrització, l'angiogènesi i la metastasi [94].

1.5.2 Canvis conformacionals, regulació de la funció i senyalització de les integrines

Moltes integrines no són constitutivament actives, poden estar expressades a la superfície cel·lular amb un estat inactiu en el qual no transmeten senyal i no estan unides al seu lligand. Els canvis conformacionals de l'heterodímer de la integrina individual i el *clustering* dels diferents heterodímers per tal de formar heterooligòmers influencien a la regulació de l'activació de les integrines i a la unió amb el lligand [93]. Els ectodominis de les integrines es poden presentar en tres estats conformacionals: la conformació tancada amb el cap doblat, la conformació estesa amb el cap tancat i la conformació estesa amb el cap obert; corresponent a l'estat de baixa afinitat pel lligand, activat i activat i unit al lligand, respectivament [95]. Per altra banda, el *clustering* pot ser induït intracel·lularment pel reclutament de complexos proteics multivalents als dominis citoplasmàtics de les integrines o bé extracel·lularment mitjançant lligands que s'uneixin als ectodominis per homodimerització (β amb β o α amb α). El *clustering* d'integrines és important per a la senyalització, el reciclatge d'integrines i la transducció de forces mecàniques. Aquestes estructures inclouen els complexos focals (adhesió transitòria present en la migració cel·lular i que pot donar lloc a una adhesió focal més estable), les adhesions focals, les sinapsis immunològiques i la invadopodia de les cèl·lules tumorals [95, 91]. La formació de *clusters* és essencial per tal que la cèl·lula s'adhereixi a la matriu extracel·lular, fet vital per la viabilitat cel·lular. El patró cel·lular d'expressió de les integrines determina a quins components de la matriu extracel·lular es pot unir una cèl·lula, així com aquesta pot respondre al seu microambient [96].

Les integrines són els únics receptors transmembrana que poden passar el senyal de manera bidireccional, i gràcies a aquesta doble comunicació les integrines actuen com a unitats de transducció de força i coordinen la polimerització d'actina del citoesquelet per regular funcions biològiques importants com la proliferació, l'expressió gènica, la supervivència cel·lular i la motilitat cel·lular [97]. En el context del càncer, els processos mediat per les integrines són aprofitats per les cèl·lules tumorals per promoure la invasió i la supervivència i crear

un microambient favorable al creixement tumoral i a la disseminació metastàtica [96]. Així, les integrines no només poden induir canvis a nivell intracel·lular -senyalització anomenada de fora a dins, *out-in signalling*-, sinó que els senyals intracel·lulars poden causar canvis extracel·lulars -senyalització de dins a fora, *in-out signalling*- (Figura 1.9).

Senyalització de dins a fora (*in-out signalling*): La senyalització des de dins la cèl·lula per tal d'activar les integrines és gràcies a la interrupció de la interacció del domini transmembrana i del citoplasmàtic entre la subunitat α i β . La talina-1 és capaç d'unir-se a la cua citoplasmàtica de la subunitat β per dos punts d'unió per tal de crear aquesta disrupció, i és reclutada a la membrana plasmàtica per senyals intracel·lulars com RAP1 i RIAM, proteïnes de la subfamília de les proteïnes GTPases RAS. La proteïna kindlina també té un paper clau en l'activació de la subunitat β , coopera amb la talina-1 en l'activació. S'ha descrit alguns supressors endògens d'integrines, proteïnes que poden competir pel lloc d'unió a la cua citoplasmàtica de la subunitat β o bé poden reduir l'afinitat de la interacció entre la cua citoplasmàtica i la talina-1 gràcies a fosforilacions que interfereixen en les interaccions [98, 91]. Les interaccions entre els dominis citoplasmàtics de les integrines amb proteïnes citoplasmàtiques donen lloc a un canvi conformacional de les integrines, i permet l'activació dels receptors i incrementen l'afinitat pels lligands de la matriu extracel·lular [91].

Senyalització de fora a dins (*out-in signalling*): Les integrines són capaces de transmetre l'àmplia gamma de canvis intracel·lulars un cop són activades pel seu lligand i agrupades en *clusters*. Els canvis immediats (0-10min) a nivell intracel·lular són un increment de fosforilacions en tirosines de substrats específics, i un increment de la concentració de segons missatgers lipídics com PIP2 i PIP3. Els canvis a mitjà termini (10-60min) consisteixen en reorganitzacions del citoesquelet que permeten a les cèl·lules adoptar la forma específica per tal d'iniciar la dispersió, la polarització i la migració. Els canvis a llarg termini (>60min) són canvis en vies de senyalització i en l'expressió gènica que influeixen en la supervivència, el creixement i la diferenciació cel·lular [97].

L'activació finalitza quan intracel·lularment es separen les dues cues citoplasmàtiques a conseqüència de la unió de la talina a la cua β . La separació espacial facilita la formació de les adhesions focals i els complexos de senyalització necessaris pels efectes *downstream* [94]. Com que les cues de les integrines no tenen activitat catalítica pròpia, cal que s'uneixin a molècules accessòries per contribuir a la reorganització de l'esquelet i a l'activitat catalítica de les adhesions focals [97]. Les proteïnes que es poden unir a les cues citoplasmàtiques estan determinades normalment per les modificacions posttraduccionals dels dominis

citoplasmàtics, i la fosforilació d'aquestes proteïnes creen llocs d'unió a proteïnes addicionals. Les integrines poden senyalitzar gràcies a l'acció de receptors tirosina-quinasa (*PTK receptors*) o bé per connexions amb receptors no tirosina quinasa (com és el cas de la proteïna FAK) [77, 99].

La connexió entre les integrines i el citoesquelet és una xarxa d'interaccions transitòries i dinàmiques entre les proteïnes de les adhesions focals i l'actina F, que facilita la connexió entre les integrines relativament estàtiques lligades a la matriu extracel·lular i la xarxa dinàmica de l'actina F. La talina és l'enllaç entre les integrines i el citoesquelet d'actina. Després de la unió de la talina a la subunitat β , es produeix el reclutament de proteïnes per les adhesions naixents tals com la vinculina, que estabilitza la interacció talina-actina tot creant un enllaç directe entre ambdues proteïnes. L'associació forta de les integrines amb l'actina F transmeten les forces de tracció cap a la matriu extracel·lular, mentre que una unió més feble dona lloc a la separació de l'actina amb les integrines, deixant el cos cel·lular lliscar per adhesió. Aquest fet permet una regulació precisa i local de la motilitat de la cèl·lula gràcies a la connexió integrina-actina. Existeixen moltes altres proteïnes associades al citoesquelet i reguladores d'aquest com la ILK (*integrin-linked kinase*), que regula la força d'adhesió reforçant la connexió actina-integrina i estabilitzant l'estat de *cluster* de les integrines. Molècules com FAK, kindlina, paxilina i tensina modulen la connexió entre les integrines i l'actina [97].

FAK és una proteïna tirosina quinasa intracel·lular que participa en les adhesions focals. El gen codificant per la proteïna, *PTK2*, està localitzat al cromosoma 8q24.3 en els humans. La proteïna FAK conté un domini FERM a l'extrem N-terminal, un domini quinasa al centre i el domini C-terminal inclou la seqüència FAT (Figura 1.9). La seqüència FAT dirigeix FAK a les adhesions focals, i promou la seva colocalització amb les integrines a través de la interacció amb proteïnes associades a integrines tals com la paxilina i la talina. Els residus de tirosina situats al llarg d'aquests dominis són claus per regular les funcions de FAK, ja que serveixen de lloc d'unió d'altres proteïnes de senyalització i també per regular la pròpia activitat catalítica de FAK [95, 100].

Hi ha molts tipus d'esdeveniments senyalitzadors que poden activar FAK. Quan les integrines s'activen mitjançant la senyalització de fora a dins la cèl·lula i les proteïnes talina i paxilina s'uneixen a les cues citoplasmàtiques de les integrines, recluten i activen FAK. FAK pot actuar com a quinasa o com a *scaffold protein* [100]. Quan FAK es troba inactiva, els dominis FERM i quinasa estan units bloquejant l'accés al lloc catalític d'autofosforilació del residu Y397. En l'estat actiu, el domini FERM és desplaçat per una proteïna activadora (la cua citoplasmàtica β o altres activadors), i permet la ràpida autofosforilació de Y397. Tal fosforilació requereix la dimerització de FAK, mediada via FERM:FERM i FERM:FAT en

posició *trans* [100]. Un cop FAK és autofosforilat, s'exposa el lloc d'unió pel domini SH2 de la família de quinases SRC, les quals fosforilen tirosines addicionals de FAK (Y526 i Y527), i donen lloc a l'activació completa de FAK. L'activació mútua del complex FAK/SRC inicia una cascada de fosforilacions i noves interaccions de proteïnes que activen múltiples vies de senyalització (Figura 1.9) [95].

La invasió cel·lular requereix la transició a fenotips mòbils assolits gràcies a canvis en les adhesions focals i la dinàmica del citoesquelet, alteracions en l'expressió de MMPs i a la inducció de l'EMT. S'ha descrit el paper de FAK en aquests processos, i s'ha confirmat el caràcter proinvasiu de FAK en càncer. Tot i que la via canònica de senyalització de FAK es relaciona amb la formació, la maduració i la renovació de les adhesions focals, FAK participa també en diverses vies promovent la supervivència i el creixement tumoral, la proliferació, la migració, la invasió i l'angiogènesi [100, 101].

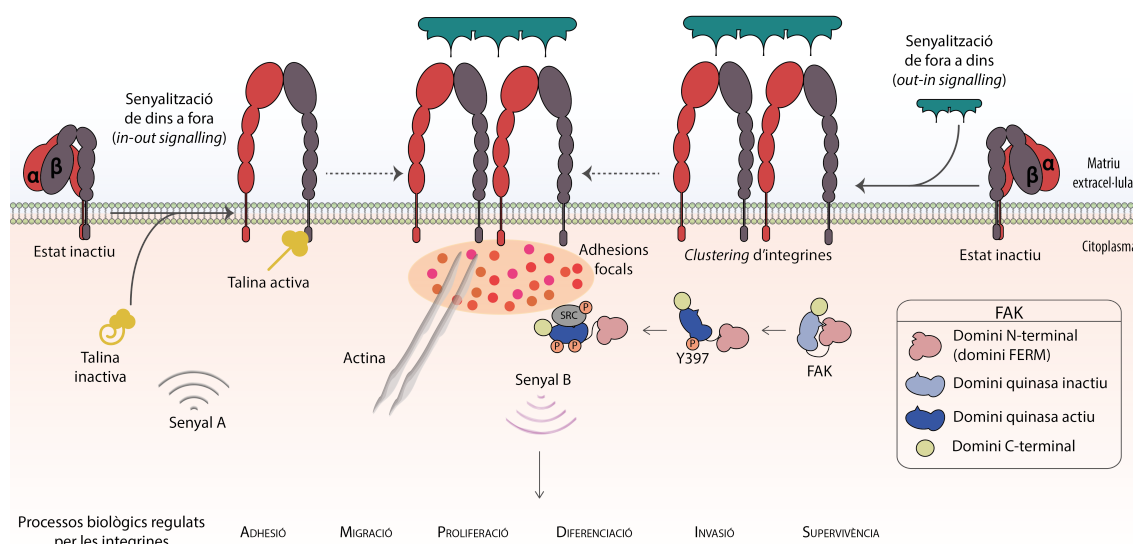


Figura 1.9. Representació de la senyalització de les integrines. Les integrines són els únics receptors que poden passar el senyal de manera bidireccional. Des de dins la cèl·lula, s'emete un senyal (senyal A) que activa la talina i aquesta procedeix a l'activació de les integrines (senyalització de dins a fora, *in-out signalling*). Per altra banda, un lligand extracel·lular pot activar les integrines fent que es doni el *clustering* d'aquestes i es passa el senyal a dins la cèl·lula (senyal B, senyalització de fora a dins, *out-in signalling*). Es representa l'autofosforilació de FAK en la tirosina 397, fet que dona lloc a l'activació completa de FAK. FAK es localitza en les adhesions focals cel·lulars. A partir d'aquest punt són activades múltiples vies de senyalització que donen lloc als canvis biològics esmentats. Imatge basada en [91, 96].

A part dels senyals i vies intracel·lulars que poden activar les integrines per elles mateixes, s'ha descrit la connexió entre la senyalització de les integrines i la de receptors de factors

de creixement (GFR, *growth factor receptor*). Les integrines i els GFR poden col·laborar a diferents nivells: les integrines poden unir-se directament als factors de creixement i promoure la seva activació, poden activar els GFR de manera independent de lligand i poden també confluir a la mateixa via de senyalització augmentant el senyal. Amb aquesta connexió s'incrementa la multifuncionalitat de les integrines i la complexitat dels senyals iniciats a la matriu extracel·lular i conseqüentment les vies intracel·lulars que són capaces d'activar, i afecta a última instància el control del destí cel·lular [102].

1.6 Integrina $\alpha 9\beta 1$

La subunitat de la integrina $\alpha 9$ va ser descrita per primera vegada l'any 1993, i es va identificar la subunitat $\beta 1$ com la seva parella. Forma una subfamília amb l' $\alpha 4$, que dona lloc a les integrines $\alpha 9\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ i $\alpha 4\beta 7$ [103]. Les dues subunitats α comparteixen un 39% d'identitat de seqüència en els seus aminoàcids, i aquesta subfamília és una de les més noves i especialitzades de les famílies d'integrines en termes d'evolució, i són presents exclusivament en organismes vertebrats [93]. El gen que codifica per l' $\alpha 9\beta 1$ es localitza al braç curt del cromosoma 3, més concretament al locus 3p21.3. La integrina $\alpha 9\beta 1$ (altrament anomenada ITGA9) està àmpliament expressada en les cèl·lules dels teixits normals, tals com les del múscul esquelètic i llis, múscul cardíac, hepatòcits, cèl·lules epitelials, queratinòcits, neutròfils, osteoclasts i oòcits; mentre que generalment no es troba expressada en limfòcits (al contrari de la $\alpha 4$) ni en l'endoteli [103, 104]. El grup heterogeni de cèl·lules que expressa la integrina $\alpha 9\beta 1$ suggereix que té un paper en diferents teixits i remarca la importància d'aquesta en l'organisme vertebrat [104].

Com s'ha comentat anteriorment, les integrines es poden presentar en diferents estats d'activació a la superfície cel·lular, regulats en part per la conformació del seu ectodomini. Fins al moment, s'ha identificat dos estats conformacionals per la integrina $\alpha 9\beta 1$, i tenen comportaments cel·lulars diferents: en l'estat d'alta afinitat unit amb el lligand indueix les adhesions focals, mentre que en l'estat d'activitat activat media l'adhesió cel·lular i la migració [105].

S'ha descrit una isoforma truncada de la subunitat $\alpha 9$ anomenada SF $\alpha 9$ (*short form $\alpha 9$ integrin*) que consta de 632aa, mancada del domini transmembrana i citoplasmàtic. Aquesta s'ha observat coexpressada a la superfície cel·lular en la línia cel·lular de RMS RD juntament amb la forma sencera de l' $\alpha 9\beta 1$, i actua com a modulador tot promovent l'adhesió dependent de l' $\alpha 9\beta 1$ a través del domini citoplasmàtic de la forma sencera d'aquesta [106].

1.6.1 Lligands de la integrina $\alpha 9\beta 1$

S'ha descrit múltiples lligands de la integrina $\alpha 9\beta 1$, alguns dels quals són comuns amb l' $\alpha 4$. Tot i això, els respectius models animals *knockout* presenten diferents fenotips, i es confirma que les dues integrines tenen funcions diferents *in vivo* [104]. A continuació es llisten els lligands més estudiats de l' $\alpha 9\beta 1$.

ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease): Les ADAMs són una gran família de proteïnes transmembrana tipus I, totes elles formades pels dominis pro, metal·loproteasa, desintegrina, ric en cisteïna, *EGF-like*, transmembrana i la cua citoplasmàtica C-terminal. Presenten tant activitat proteolítica com d'adhesió cel·lular. Es troben implicades en processos biològics com la remodelació de la matriu extracel·lular i l'adhesió cel·lular, i en processos patològics com el desenvolupament tumoral [107]. Existeix redundància en les interaccions entre les integrines i les ADAMs: una integrina es pot unir a vàries ADAMs i una ADAM pot ser reconeguda per diferents integrines (Taula 1.12).

Taula 1.12. Interaccions entre ADAMs i integrines. Basat en [107].

	$\alpha 2\beta 1$	$\alpha 4\beta 1$	$\alpha 4\beta 7$	$\alpha 5\beta 1$	$\alpha 6\beta 1$	$\alpha 6\beta 4$	$\alpha 9\beta 1$	$\alpha v\beta 5$	$\alpha v\beta 3$
ADAM2		✓			✓		✓		
ADAM7		✓	✓				✓		
ADAM9	✓				✓	✓	✓	✓	
ADAM12		✓					✓		
ADAM15				✓			✓		✓
ADAM17				✓					
ADAM19		✓		✓					
ADAM23									✓
ADAM28		✓	✓				✓		
ADAM33		✓		✓			✓		

El domini desintegrina present en les ADAMs és el domini d'unió a les integrines, en el qual la seqüència RGD no hi és present a excepció de l'ADAM15. La seqüència RGD de l'ADAM15 és necessària per unir-se a la integrina $\alpha v\beta 3$, en canvi, la interacció ADAM15- $\alpha 9\beta 1$ és independent de la seqüència RGD, ja que és la seqüència RX_6DLPEF la responsable de la unió [108]. La seqüència RX_6DLPEF està parcialment conservada entre les diferents ADAMs

que s'uneixen a l' $\alpha 9\beta 1$ (Figura 1.10), i és el motiu d'interacció entre les ADAMs i la integrina $\alpha 9\beta 1$.

hADAM2	437	LFMSKERMCRPSFEECDLPEYCNSSASCPEN	469
hADAM7	452	QIKKAGSICRPKDECFPEMCTGHSPACPKD	483
hADAM8	458	KVKPAGELCRPKKDMCDLEEFCDGRHPECPED	489
hADAM9	465	RFLPGGTLCRGKTSECDVPEYCNSSQFCQPD	496
hADAM12	474	QLKPAGTACRDSSNSCDLPEFCTGASPHCPAN	505
hADAM15	472	QLRPSGWQCRPTRGDCDLPEFCPGDSSQCPPD	503
hADAM28	457	QFKKAGMVCRPAKDECDLPEMNGKSGNCPDD	488
hADAM33	467	LLKPAGALCRQAMGDCDLPEFCTGTSSHCPPD	498

Figura 1.10. Alineament de les seqüències d'aminoàcids (BLAST) dels llocs d'unió de les formes humanes d'ADAMs amb la integrina $\alpha 9\beta 1$. El motiu de reconeixement conservat entre les diferents ADAMs es mostra en gris. Els números corresponen a la posició dels aminoàcids en l'estructura primària de la proteïna.

Fibronectina (FN): És una glicoproteïna de la matriu extracel·lular, la qual es presenta en la forma plasmàtica (pFN) i la forma cel·lular (cFN). La pFN és secretada pels hepatòcits i circula pel torrent sanguini, mentre que la cFN és present a la matriu extracel·lular dels teixits. La cFN és produïda pels fibroblasts, les cèl·lules epitelials i altres tipus cel·lulars. Conté dos dominis codificats per *splicing* alternatiu anomenats extra domini A (EDA) i extra domini B (EDB). S'ha descrit la unió de l' $\alpha 9\beta 1$ i l' $\alpha 4\beta 1$ amb el domini EDA de la cFN a través de la seqüència EDGIHEL [109], i provoca canvis en la morfologia cel·lular com la formació de filopòdia *in vitro* [110] i la formació de les vàlvules limfàtiques [111] quan s'uneix exclusivament a la integrina $\alpha 9\beta 1$.

Tenascina-C: És una proteïna de la matriu extracel·lular que s'ha observat sobrerregulada en el procés de cicatrització de ferides, en l'estroma de cèl·lules tumorals i en melanoma metastàtic. Com a mínim set integrines són capaces d'unir-se a la tenascina-C. En el cas de la integrina $\alpha 9\beta 1$, s'hi uneix per la seqüència AEIDGIEL, present en la tercera repetició del domini tipus III de FN de la tenascina-C, anomenat TNfn3 [112, 104].

Osteopontina: És una proteïna de la matriu extracel·lular implicada en diversos processos biològics com la cicatrització de ferides, la remodelació de teixits, la resposta immunitària i la vascularització; fet pel qual s'ha estudiat el seu paper en condicions fisiopatològiques,

especialment en càncer, on s'ha proposat com un marcador potencial i una diana terapèutica contra el càncer [104]. S'ha descrit la interacció entre l' $\alpha 9\beta 1$ i la seqüència SVVYGLR de l'osteopontina en neutròfils *in vivo* [113].

Emilin-1 (Elastic microfibril interface-located protein 1): És una glicoproteïna present a la matriu extracel·lular que s'uneix a l' $\alpha 9\beta 1$ i a l' $\alpha 4\beta 1$. La seva interacció amb l' $\alpha 9\beta 1$ és necessària per al manteniment de l'homeòstasi de la pell com també juga un paper fonamental en la formació i manteniment de les vàlvules limfàtiques [104, 114, 115]. S'ha descrit que quan s'uneix a l' $\alpha 4\beta 1$ provoca una reducció en la proliferació cel·lular *in vitro*, i inhibeix la via de senyalització RAS-ERK [116].

VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1): És una proteïna d'adhesió endotelial que es va identificar com a lligand de l' $\alpha 9\beta 1$ l'any 1999 en els neutròfils, en els quals media l'extravasació d'aquests als llocs d'inflamació [117]. A més, la unió de VCAM-1 i la integrina $\alpha 9\beta 1$ provoca un retard en l'apoptosi espontània dels neutròfils [118].

Factors de creixement: S'ha descrit la interacció entre l' $\alpha 9\beta 1$ i els factors de creixement endotelials vasculars (VEGFs, *Vascular Endothelial Growth Factor*) VEGF-A, -C i -D. La unió de l' $\alpha 9\beta 1$ amb el motiu EYP de VEGF-A indueix la migració de les cèl·lules endotelials i canceroses, a més de presentar un paper en l'angiogènesi. VEGF-C i VEGF-D contribueixen també a l'angiogènesi i a la limfangiogènesi, fet que explica perquè el model *knockout* de l' $\alpha 9\beta 1$ presenta un sistema limfàtic aberrant [104].

També s'ha descrit la interacció de l' $\alpha 9\beta 1$ amb el factor de creixement NGF (NGF, *nerve growth factor*), en la qual s'indueixen cascades de senyalització proproliferatives [119]. Es forma un complex específic entre la integrina $\alpha 9\beta 1$ i el receptor p75NTR, el qual mostra una activació superior de la via de senyalització MAPK-Erk 1/2 i la via AKT després de la inducció amb el factor de creixement NGF, i provoca un augment de la migració i la proliferació cel·lular [120].

Desintegrines: Són molècules capaces d'inhibir les integrines, obtingudes a partir dels verins de serp de la família Viperidae. Es classifiquen en tres famílies en funció del motiu de reconeixement: RGD, MLD i R/KTS; i és la família heterodimèrica MLD específica per la subfamília de l' $\alpha 9\beta 1$, l' $\alpha 4\beta 1$ i l' $\alpha 4\beta 7$. Les desintegrines són considerades moduladors

d'integrines, ja que mimetitzen el lloc d'unió a diferents lligands. S'ha descrit les desintegrines EC3 i VLO5 com a reguladors de l' $\alpha 9\beta 1$, les quals mimetitzen el seu lloc d'unió amb VCAM-1 en el cas de l'EC3 i amb la tenascina-C, i l'osteopontina i VEGF-A en el cas de VL05 [121].

1.6.2 Integrina $\alpha 9\beta 1$ i càncer

La integrina $\alpha 9\beta 1$ està expressada en una gran varietat de tipus cel·lulars i s'ha demostrat que té un paper important en alguns processos biològics. Conseqüentment, l'expressió aberrant d'aquesta o els canvis en la seva funcionalitat donen lloc a condicions patològiques com el càncer.

Tal com s'ha esmentat anteriorment, la integrina $\alpha 9\beta 1$ està situada al locus 3p21.3. Aquest cromosoma té un paper important en càncer, ja que el seu braç curt (3p) conté diverses regions que inclouen gens supressors de tumors (TSG, *tumor suppressor gene*). S'han estudiat les aberracions genètiques o epigenètiques (deleció i metilació, respectivament) freqüents d'aquesta regió. Les aberracions genètiques poden ser causades per pèrdues d'heterozigositat (LOH, *loss of heterozygosity*) descrites en alguns tipus de càncer les quals involucren regions del cromosoma 3p. La hipermetilació de les illes CpG localitzades en regions promotores és una de les causes d'aberracions epigenètiques, atès que la hipermetilació s'ha observat com un mecanisme freqüent d'inactivació dels TSGs, i contribueixen així a la transformació maligne de les cèl·lules tumorals [122]. Gràcies a la tecnologia dels microarrays de NotI, on s'analitzen simultàniament les delecions i metilacions dels cromosomes, s'han pogut identificar alguns gens supressors de tumors que podrien servir com a marcadors de mal pronòstic pels diferents càncers estudiats. Conseqüentment, entre ells, s'ha proposat el gen de la *ITGA9* com un gen supressor de tumors en algun tipus de càncer. Concretament, s'ha descrit la deleció o la metilació del gen de la *ITGA9* en el 28% dels tumors de càncer d'ovari [123], en el 30% de les mostres analitzades de càncer de còlon [124] i en el 24% de tumors d'estadis primerencs de càncer de cap i coll [125]. En concordança, en un estudi de càncer de mama, es van identificar un 16% dels tumors sense expressió de la *ITGA9*, ja que presentaven delecions o mutacions genètiques; mentre que un 25% dels tumors presentaven una infraexpressió significativa de la *ITGA9*, on la hipermetilació del promotor era la causa de la infraexpressió [126]. També es va observar la deleció o la metilació de la *ITGA9* en el 42% de les mostres de càncer de cèrvix [127] i en el 45% de les mostres de càncer de pulmó no microcític (NSCLC: *non small cell lung cancer*) [128], on es va confirmar la metilació del promotor per seqüenciació per bisulfit. Els autors van analitzar els nivells d'expressió d'mRNA de la *ITGA9*, els quals mostraven una disminució respecte als teixits normals en el 89% de les mostres de càncer de cèrvix i un

85% en les mostres del càncer de pulmó. Les discordances dels resultats podrien ser degudes a la presència d'RNAs d'interferència [127]. Finalment, es va identificar també la *ITGA9* com un possible gen supressor de tumors en mostres de carcinoma nasofaríngi, en el qual es va observar una infraregulació de la *ITGA9* en les mostres tumorals respecte al teixit control tant a nivell d'mRNA com de proteïna, i es correlacionava amb un estat de metilació del seu promotor [129].

S'ha descrit 313 mutacions en tumors humans en el gen de la *ITGA9* en la base de dades COSMIC (COSMIC, *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) (Taula 1.13). Les mutacions identificades són presents en el 0.88% de les mostres analitzades (313 mutacions en un total de 35658 mostres), fet que suggereix que les mutacions en el gen de la *ITGA9* no són tant importants per la progressió tumoral comparat amb les delecions o les metilacions.

Taula 1.13. Distribució de les mutacions somàtiques observades en la *ITGA9* en tots els tipus de càncer*

Nombre de mostres	%	Tipus de mutació
227	72.52	mutació amb canvi de sentit
63	20.13	mutació silenciosa
11	3.51	mutació sense sentit
4	1.28	canvi en el marc de lectura

* Les mutacions somàtiques es van comprovar a www.cancer.sanger.ac.uk/cosmic a data de 26/05/2019.

Contràriament, altres autors descriuen la integrina $\alpha 9\beta 1$ com un oncogèn, el qual presenta un paper important en la metàstasi i en la progressió de fenotips malignes. Es va descriure la sobreregulació de la *ITGA9* en tumors primaris i línies cel·lulars de càncer de pulmó microcític (SCLC, *small cell lung cancer*) [130]. En un estudi independent del mateix tipus de càncer, es va correlacionar l'elevada expressió d'integrina $\alpha 9\beta 1$ amb una menor supervivència dels pacients [131]. De manera similar, l'expressió de la integrina $\alpha 9\beta 1$ es correlaciona significativament amb una menor supervivència lliure de malaltia i amb una reducció de la supervivència global en el càncer de mama triple negatiu basal [132]. Es va detectar l'expressió de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en més del 50% dels tumors primaris d'adenocarcinoma de còlon, mentre que l'expressió d'aquesta era absent en el teixit normal de còlon adult [133]. En un altre estudi amb teixits de càncer de còlon es va observar una correlació inversa significativa

entre els nivells d'E-cadherina i integrina $\alpha 9\beta 1$, i es va involucrar la integrina $\alpha 9\beta 1$ amb el fenotip metastàtic mesenquimal [134]. També s'ha descrit el paper de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en la progressió del glioblastoma amb la seva interacció amb el factor de creixement NGF. L'expressió *in vivo* de l' $\alpha 9\beta 1$ en els astrocitomes es correlaciona amb l'increment del grau d'aquest tumor, i és màxima l'expressió de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en el glioblastoma (l'estadi més avançat d'astrocitoma) [135].

S'ha estudiat el rol de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en l'angiogènesi, descrit tant *in vitro* com *in vivo* amb cèl·lules de melanoma. Quan la integrina $\alpha 9\beta 1$ s'uneix a l'osteopontina, augmenta l'expressió de COX-2 i MMP-9 en macròfags, i es modula així el creixement i l'angiogènesi del tumor [136]. S'ha descrit el paper de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en la limfangiogènesi de cèl·lules de càncer de còlon: el tractament amb endostatina inhibeix la interacció entre l'EDA i l' $\alpha 9\beta 1$, fet que causa una reducció dels nivells d'ambdues proteïnes i es redueix la limfangiogènesi tant *in vitro* com *in vivo* [137].

La implicació de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en la invasió també ha estat objecte d'estudi. S'ha descrit que les cèl·lules de càncer de còlon amb elevada expressió d'integrina $\alpha 9\beta 1$ són les que promouen la transició epiteli-mesènquima, i presenten una major invasió tumoral [134]. Es va observar com la integrina $\alpha 9\beta 1$ està implicada en el procés d'EMT independentment de l'inductor TGF- β : la integrina $\alpha 9\beta 1$ forma un complex amb β -catenina i E-cadherina, que es dissocia quan l' $\alpha 9\beta 1$ interacciona amb el seu lligand. En conseqüència, es produeix la fosforilació de SRC i β -catenina, i s'indueix la transició epiteli-mesènquima [131]. El paper de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en invasió va ser descrit en càncer de mama. El bloqueig de la integrina $\alpha 9\beta 1$ produeix una reducció de la motilitat cel·lular *in vitro* i una reducció de metàstasi als nòduls limfàtics en un model de xenograft ortotòpic [138]. El nostre grup d'investigació també va descriure el paper de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en la invasió cel·lular, més concretament va identificar la integrina $\alpha 9\beta 1$ juntament amb la N-cadherina com una de les proteïnes proinvasives en el RMS [139]. Finalment, s'ha descrit que la integrina $\alpha 9\beta 1$ és necessària per a la supervivència i proliferació de les cèl·lules tumorals a llocs secundaris, i es suggereix que la integrina $\alpha 9\beta 1$ és necessària per a l'adhesió de les cèl·lules de medul·loblastoma a les meninges (procés conegut com a disseminació leptomeníngea). De manera concordant, es va observar un increment de l'expressió de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en tumors primaris de medul·loblastoma amb extensió leptomeníngea, comparat amb la baixa expressió de la integrina en el cervell normal i en tumors primaris de medul·loblastoma sense infiltració [140].

1.7 Teràpies contra les integrines

Les integrines estan implicades en molts processos patològics, fet que genera la necessitat de recerca de teràpies dirigides per bloquejar la seva funció. Fins al dia d'avui, s'han aprovat a nivell comercial quatre molècules bloquejants d'integrines, indicades per la trombosi i per malalties autoimmunes. El natalizumab és l'anticòs monoclonal humanitzat contra l' $\alpha4\beta1$ per tractar l'esclerosi múltiple i la malaltia de Chron. L'abciximab (anticòs monoclonal quimèric), el tirofiban (molècula petita) i l'intrifiban (pèptid cíclic) es dirigeixen contra l' $\alphaIIb\beta3$ i són indicats per a la prevenció de complicacions trombòtiques després d'intervencions coronàries percutànies [141, 142].

Bloquejar la funció de les integrines per tractar el càncer és una àrea de recerca contínua i s'han desenvolupat una gran quantitat de molècules per tal d'interferir en les interaccions integrina-lligand. També són unes molècules interessants pel seu *crosstalk* amb receptors de factors de creixement [96]. Estudis preclínic han demostrat que els antagonistes d'integrines inhibeixen el creixement afectant tant a les cèl·lules tumorals com a les associades al tumor, majoritàriament les de l'endoteli angiogènic [96]. Estructuralment, les molècules dirigides contra les integrines es poden classificar en tres categories principals:

- Molècules petites inhibidores. Tot i que diferents molècules han demostrat la seva eficàcia en estudis preclínic, cap d'elles s'ha traslladat de moment a la clínica [143].
- Anticòs monoclonals (mAb). S'ha desenvolupat el volociximab (Taula 1.14), on en estudis preclínic es va inhibir l'angiogènesi tumoral mitjançant el bloqueig de la interacció entre l' $\alpha5\beta1$ i la fibronectina [143]. S'ha completat els assaigs clínics fase II amb tumors de melanoma metastàtic, càncer de pàncrees metastàtic, carcinoma de cèl·lules renals metastàtic, càncer avançat d'ovari, càncer peritoneal primari i càncer de pulmó no microcític. El volociximab va ser ben tolerat tant en monoteràpia com en combinació amb radioteràpia, i va presentar resultats prometedors en tots els assaigs excepte en els tumors de càncer d'ovari [144]. Tot i això, no hi ha assaigs clínics posteriors previstos de moment. Un altre exemple d'anticòs monoclonal és l'etaracizumab (Taula 1.14), dirigit contra la integrina $\alpha v\beta3$ i el qual impedeix la seva unió als lligands vitronectina i fibrinogen. S'ha dut a terme assaigs clínics fase II amb pacients amb melanoma metastàtic, carcinoma de cèl·lules renals metastàtic, càncer de pròstata metastàtic independent d'androgen i càncer de còlon avançat refractari a l'irinotecan, els quals estan tots finalitzats. S'ha publicat els resultats de l'assaig

amb els pacients amb melanoma, en el qual no es va observar una millora amb el tractament de l'anticòs [145]. Un tercer anticòs monoclonal que ha arribat en fase II és l'intetumumab (Taula 1.14), dirigit contra l' $\alpha v\beta 3$ i l' $\alpha v\beta 5$. Els resultats dels assaigs clínics duts a terme amb pacients amb càncer de pròstata metastàtic resistent a la castració i amb melanoma estadi IV no han estat positius [146, 147]. Finalment, també ha arribat a fase II l'anticòs abituzumab (Taula 1.14), dirigit contra la integrina $\alpha v\beta x$. L'assaig clínic va ser dut a terme amb pacients amb càncer de còlon metastàtic amb KRAS *wild-type*. No es va observar cap millora en la resposta dels pacients que van rebre l'anticòs juntament amb el tractament normal respecte als pacients amb el tractament normal. Tot i això, l'estudi suggereix una possible millora en els pacients amb alta expressió de la integrina $\alpha v\beta 6$, una observació que necessita estudis posteriors però suggereix una possible millora en l'estadificació dels pacients [148].

- Inhibidors peptídics. L'ATN-161 (Taula 1.14) és un pèptid inhibidor que bloqueja el lloc d'unió entre l' $\alpha 5\beta 1$ i la fibronectina (seqüència PHSRN). S'ha efectuat assaigs clínics fase II amb tumors de carcinoma de cèl·lules renals avançat i de glioma maligne recurrent, i tot i estar finalitzats, no s'ha publicat resultats sobre els assaigs. L'inhibidor d'integrines més prometedora és el Cilengitide (Taula 1.14), un pèptid cíclic basat en la seqüència RGD capaç de reconèixer l' $\alpha v\beta 3$ i l' $\alpha v\beta 5$. Es van dur a terme assaigs clínics fase II sense efectes clínics positius en tumors de càncer de pròstata resistent a la castració [149, 150] i amb pacients amb càncer de pulmó no microcític avançat [151]. Tanmateix, es van efectuar assaigs clínics fase III amb pacients diagnosticats de glioblastoma amb el promotor metilat del gen *MGMT*. Malauradament, no es va observar millora clínica quan el Cilengitide es va addicionar a la quimioteràpia estàndard dels pacients [152].

Taula 1.14. Inhibidors d'integrines contra el càncer en assaigs clínics fases II o III. Actualitzat de [141].

Fase clínica	Dirigit a	Molècula	Sinòms	Classe de molècula	Estat ^a
fase III	$\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$	Cilengitide	EMD 121974, EMD 85189, NSC-707544	cPep	C
	$\alpha 5\beta 1$	ATN-161	-	Pep	C
fase II	$\alpha 5\beta 1$	volociximab	M-200, EOS-200-4	mAb	C
	$\alpha v\beta 3$	etaracizumab	MED-522, hLM609, Vitaxin-2, Abergrin	mAb	C
	$\alpha v\beta x^b$	intetumumab	CNTO-95	mAb	C
	$\alpha v\beta x^b$	abituzumab	DI17E6, EMD-525797	hu-mAb	C

C: assaigs completats; cPep: pèptid cíclic; hu-mAb: anticòs humanitzat monoclonal; mAb: anticòs monoclonal; Pep: pèptid.

^a L'estat dels assaigs clínics va ser comprovat a www.clinicaltrials.gov a data de 27/05/2019.

^b βx indica que va dirigit a totes les cadenes β que s'uneixen a la subunitat α indicada.

Així doncs, malgrat tots els esforços per tal de desenvolupar molècules contra l'acció de les integrines, i els resultats prometedors *in vitro* i en estudis preclínics, els assaigs clínics han estat decebedors. A més a més, i al contrari de les molècules petites, tant els anticòs monoclonals com els inhibidors peptídics de moment han de ser administrats per via parenteral, fet que limita el seu ús com a teràpia de llarga durada [143]. Així doncs, continua existint la necessitat de recerca de noves molècules per tal de bloquejar les integrines.

2 | Hipòtesi i objectius

La supervivència global del rabdomiosarcoma i el neuroblastoma se situa al 70%, però disminueix fins al 30% en els casos de RMS amb malaltia metastàtica i recidiva, i fins al 20% en els casos de NBL d'alt risc. Aquests casos s'associen a la disseminació del tumor a causa de la metastasi, en els quals els tractaments regulars no són efectius. L'ús de nous fàrmacs dirigits específicament contra certes dianes moleculars com a complement dels tractaments actuals podrien fer millorar les taxes de supervivència, especialment en els casos metastàtics i refractaris a les teràpies convencionals.

És necessària, doncs, la recerca dels factors que regulen el procés metastàtic per tal de trobar noves dianes terapèutiques i així millorar la supervivència dels pacients amb malaltia metastàtica i recidiva. La integrina $\alpha9\beta1$ és una proteïna amb un paper en la invasió i disseminació metastàtica, i anteriorment a l'estudi que ens ocupa, el nostre grup de recerca ja havia descrit un paper proinvasiu de la integrina $\alpha9\beta1$ en el RMS. Amb aquestes evidències, plantejem la hipòtesi que la integrina $\alpha9\beta1$ podria ser una bona diana terapèutica, i que representaria una nova estratègia per evitar la formació de les metastasis en el RMS i en altres tumors pediàtrics.

L'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral és obtenir un coneixement més profund del paper de la integrina $\alpha9\beta1$ en els tumors pediàtrics, amb la finalitat d'aconseguir bloquejar-la i poder arribar a disminuir-ne la càrrega metastàtica. Per tal d'assolir aquest objectiu, es van establir els següents objectius parcials:

1. Anàlisi de l'expressió de la integrina $\alpha9\beta1$ en cèl·lules i tumors de RMS i NBL.
2. Estudi de l'efecte de la inhibició de la integrina $\alpha9\beta1$ a nivell genètic mitjançant shRNAs en el creixement i invasió cel·lular tant *in vitro* com *in vivo*.
3. Estudi de la fosforilació de la proteïna FAK com a possible mecanisme intracel·lular responsable dels canvis en el comportament cel·lular.

4. *Screening* i posterior selecció dels miRNAs reguladors específics de la integrina $\alpha9\beta1$. Estudi de l'efecte dels miRNAs seleccionats en el creixement i invasió *in vitro* i anàlisi de la fosforilació de FAK en les cèl·lules amb l'expressió dels miRNAs.

5. [Redacted text block]

6. [Redacted text block]

7. [Redacted text block]

3 | Material i mètodes

3.1 Mostres tumorals humanes

Les mostres congelades de tumors primaris de RMS utilitzades en aquest treball provenien de la nostra col·lecció privada (ISCH C.0002311), les quals van ser recollides després del procediment quirúrgic i congelades a -80°C . Les mostres van ser utilitzades per l'extracció i anàlisi d'RNA i proteïna, com es descriu als apartats 3.5 i 3.6, respectivament. El procediment va ser autoritzat amb el consentiment informat d'acord amb la declaració de Hèlsinki de tots els pacients o els seus tutors legals, depenent de l'edat del pacient. L'estudi va ser aprovat pel Comitè Ètic d'Investigació Clínica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron.

3.2 Cultius cel·lulars

3.2.1 Línies cel·lulars

A la taula 3.1 es mostra un resum de les característiques del panell de línies cel·lulars de RMS i NBL utilitzades durant aquest estudi.

Totes les línies cel·lulars de RMS van ser cultivades i mantingudes amb *Minimum Essential Medium with Earle's Balanced Salts* (MEM, Biowest), complementat amb el 10% de sèrum fetal boví (FBS, *fetal bovine serum*; Sigma-Aldrich), 2mM de L-glutamina, 1mM de piruvat sòdic, 1x aminoàcids no essencials, 100U/ml de penicil·lina i 0.1mg d'estreptomicina (tots ells de Biowest). Les línies RH30, RH4, RUCH2 i HTB-82 van ser adquirides a l'*American Type Culture Collection* (ATCC), mentre que la línia RD va ser cedida pel Dr. Beat Schäfer i la línia CW9019 va ser generada al laboratori de la Dra. Jaclyn Biegel.

Totes les línies cel·lulars de NBL van ser cultivades i mantingudes amb *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM, Thermo Fisher Scientific), complementades amb el 20% de sèrum fetal boví (Sigma-Aldrich), 1% *Insulin-Transferrin-Selenium* (ITS-G, Thermo Fisher Scientific), 100U/ml de penicil·lina i 100µg/ml d'estreptomicina (els dos de Thermo Fisher Scientific) i 5µg/ml de *Plasmocin Prophylactic* (InvivoGen). Totes les línies cel·lulars de NBL es van adquirir a l'ATCC.

La línia cel·lular HEK293T, utilitzada per a la producció de partícules lentivirals i per l'assaig luciferasa, va ser cultivada amb *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Thermo Fisher Scientific), complementat amb el 10% de sèrum fetal boví (Sigma-Aldrich), 1x aminoàcids no essencials, 100U/ml de penicil·lina i 0.1mg d'estreptomicina (tots ells de Biowest). Aquesta línia també es va adquirir a l'ATCC.

Tots els cultius es van mantenir a 37°C en incubadors amb camisa d'aire amb una atmosfera saturada del 95% d'aire i 5% de CO₂.

Taula 3.1. Característiques de les línies cel·lulars utilitzades de RMS i NBL

(a) Característiques de les línies cel·lulars utilitzades de RMS

Nom	Histologia	Translocació	Metastàtica	Localització
RH30	alveolar	PAX3-FOXO1	sí	medul·la òssia (metàstasi)
RH4	alveolar	PAX3-FOXO1	sí	mama (metàstasi)
CW9019	alveolar	PAX7-FOXO1	ND	ND
RUCH2	embrionari	-	sí	vagina (tumor primari)
HTB-82	embrionari	-	sí	braç (tumor primari)
RD	embrionari	-	sí	pelvis (tumor primari)

ND: no determinat.

(b) Característiques de les línies cel·lulars utilitzades de NBL

Nom	Estadi	Edat	Estat N-MYC	Estat p53	Estat ALK
IMR-32	4	2 anys	amplificat	funcional	AP, wt
SH-SY5Y	4	4 anys	no amplificat	funcional	+/- F1174L Mut
CHLA-90	4	8 anys	no amplificat	no funcional	F1245V Mut
SK-N-BE(2)	4	26 mesos	amplificat	no funcional	NA, wt
BE(2)-C	4	26 mesos	amplificat	no funcional	NA, wt

AP: amplificació parcial; wt: *wild type*; Mut: mutat; NA: no amplificat.

3.2.2 Subcultiu cel·lular

Totes les línies cel·lulars utilitzades van ser mantingudes en cultius monocapa, dels quals es realitzaven subcultius quan aquests presentaven una confluència aproximada del 80%. En tots els casos, els subcultius no es mantenien en circulació més de dos mesos per tal de conservar les característiques de la línia cel·lular original.

Per tal de subcultivar les línies, es descartava el medi del flascó i es feia un rentat amb PBS (*phosphate buffered saline*, Biowest). Tot seguit se l'hi adicionava tripsina-EDTA al 0.05% en DPBS (*dulbecco's phosphate buffered saline*, Biowest) per tal de trencar els enllaços cèl·lula-cèl·lula de manera enzimàtica i desenganxar les cèl·lules del plàstic. El procés tenia lloc a l'incubador, ja que a 37°C és la temperatura a la qual la tripsina presenta la seva activitat màxima. Al cap d'aproximadament 5min, s'addicionava medi complet fresc, inhibint així l'activitat de la tripsina i es recollia la suspensió cel·lular. Després de centrifugar la suspensió a 1200rpm durant 5min, el pellet compost per les cèl·lules, es resuspensia amb el medi adequat i es sembrava a un nou flascó o placa a la dilució pertinent. Les dilucions utilitzades depenien de la línia cel·lular, i van variar des d'una 1/3 fins a una 1/10.

3.2.3 Comptatge de cèl·lules

En aquelles ocasions on la sembra requeria un nombre concret i precís de cèl·lules per experiments posteriors, s'usava el comptador automàtic cel·lular EVETM (NanoEnTek). El pellet cel·lular es resuspensia amb un volum conegut de medi complet i es prenia 10 μ l, els quals s'hi adicionava 10 μ l de blau de tripà 0.4% (NanoEnTek). El blau de tripà és un colorant que permet diferenciar les cèl·lules vives de les mortes, ja que aquest penetra a les membranes de les cèl·lules mortes mentre que les cèl·lules viables són excloses de la tinció. Seguidament es carregaven 10 μ l de la mescla a la cambra del portaobjectes EVETM. Un cop optimitzada la imatge que proporcionava l'aparell, on es distingien les cèl·lules vives de les mortes gràcies al colorant blau de tripà, la màquina realitzava el comptatge de les cèl·lules presents a la mostra. El procediment es repetia tres vegades per minimitzar errors humans.

3.2.4 Descongelació i criopreservació

És molt important mantenir un estoc de línies criopreservades per tal de mantenir les característiques originals de la línia cel·lular i evitar possibles contaminacions. La criopreservació té com a objectiu mantenir la viabilitat i funcionalitat cel·lular a temperatures molt baixes (-80°C o -196°C). El procés és necessari per mantenir totes les línies cel·lulars sense necessitat de mantenir-les en cultiu cel·lular.

Per tal de criopreservar les línies cel·lulars, a partir del pellet es resuspenien les cèl·lules amb medi de congelació format per medi complet amb un 10% de dimetil sulfòxid (DMSO, Sigma-Aldrich). El DMSO s'usa com a crioprotector, ja que és un solvent bipolar apròtic, hidrosoluble i de baix pes molecular. Preveu l'acumulació excessiva d'electròlits i altres substàncies durant el procés de congelació i la formació de cristalls de gel que trenquen l'estructura de la membrana cel·lular. Tot i això, el DMSO resulta tòxic a temperatura ambient, raó per la qual el procés de congelació i descongelació cel·lular ha de ser ràpid.

1ml de la suspensió cel·lular amb medi de congelació es va transferir dins de criovials (Thermo Fisher Scientific), els quals es van col·locar al recipient de congelació Mr. FostyTM (Thermo Fisher Scientific) i al congelador de -80°C . El sistema està dissenyat per aconseguir una velocitat de refrigeració de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, velocitat òptima per a la conservació de les cèl·lules. Al cap de 24h els vials es van dipositar al tanc de nitrogen líquid, on es conservaren a llarg termini a una temperatura de -196°C .

El procés de descongelació de les cèl·lules també ha de ser un procés ràpid per tal d'obtenir la màxima viabilitat cel·lular. Així, es descongelava el vial al bany a una temperatura de 37°C i s'hi adicionava medi fresc per tal de diluir el DMSO. La suspensió cel·lular es sembrava a flascons de 75cm^2 . El dia següent es realitzava un canvi de medi amb medi complet per l'eliminació total del DMSO.

3.3




3.4 Plasmidis, transfecció, producció lentiviral i infecció

Els shRNAs (*short hairpin RNA*) estan basats en el mecanisme dels RNA d'interferència de degradació d'un RNA missatger (mRNA) concret, i provoquen una disminució de l'expressió de la proteïna que aquest codifica (Figura 3.1). Els shRNAs són RNAs de doble cadena transcrits per la cèl·lula a partir d'un constructe de DNA que codifica per la seqüència d'una cadena d'RNA i la seva complementària, es pleguen i creen una molècula d'RNA de doble cadena amb un *hairpin loop*. D'aquesta manera, l'shRNA és produït contínuament per la pròpia maquinària cel·lular. Els shRNAs són transcrits per la RNA polimerasa III al nucli de les cèl·lules transfectades i processats per la RNAasa DROSHA i la proteïna DGCR8, i es creen els precursors inicials, anomenats pre-shRNAs. Els pre-shRNAs són estructures de doble cadena de 19-29pb connectades per una regió d'RNA de cadena única (*loop*) amb dos nucleòtids penjant al 3'. Són transportats al citoplasma mitjançant la proteïna *Exportin-5*. Un cop al citoplasma, els pre-shRNAs són tallats per DICER i TRBP/PACT, s'elimina el *hairpin* i es crea un siRNA (RNA petit d'interferència, *small interfering RNA*) de doble cadena de 20-25 nucleòtids amb dos nucleòtids al 3' penjant a cada extrem. L'siRNA actiu és processat pel complex RISC. La cadena guia de l'siRNA s'uneix al complex RISC amb l'ajuda de la proteïna AGO-2 i altres proteïnes d'unió a cadenes dobles d'RNA, mentre que la cadena complementària de l'siRNA és degradada. Quan existeix una homologia perfecta entre l'siRNA i l'mRNA diana, s'indueix la degradació de l'mRNA. En el cas d'una complementarietat parcial, el complex RISC reprimeix la traducció de l'mRNA. El resultat final és l'impediment de la traducció a proteïna d'un determinat gen diana (Figura 3.1).

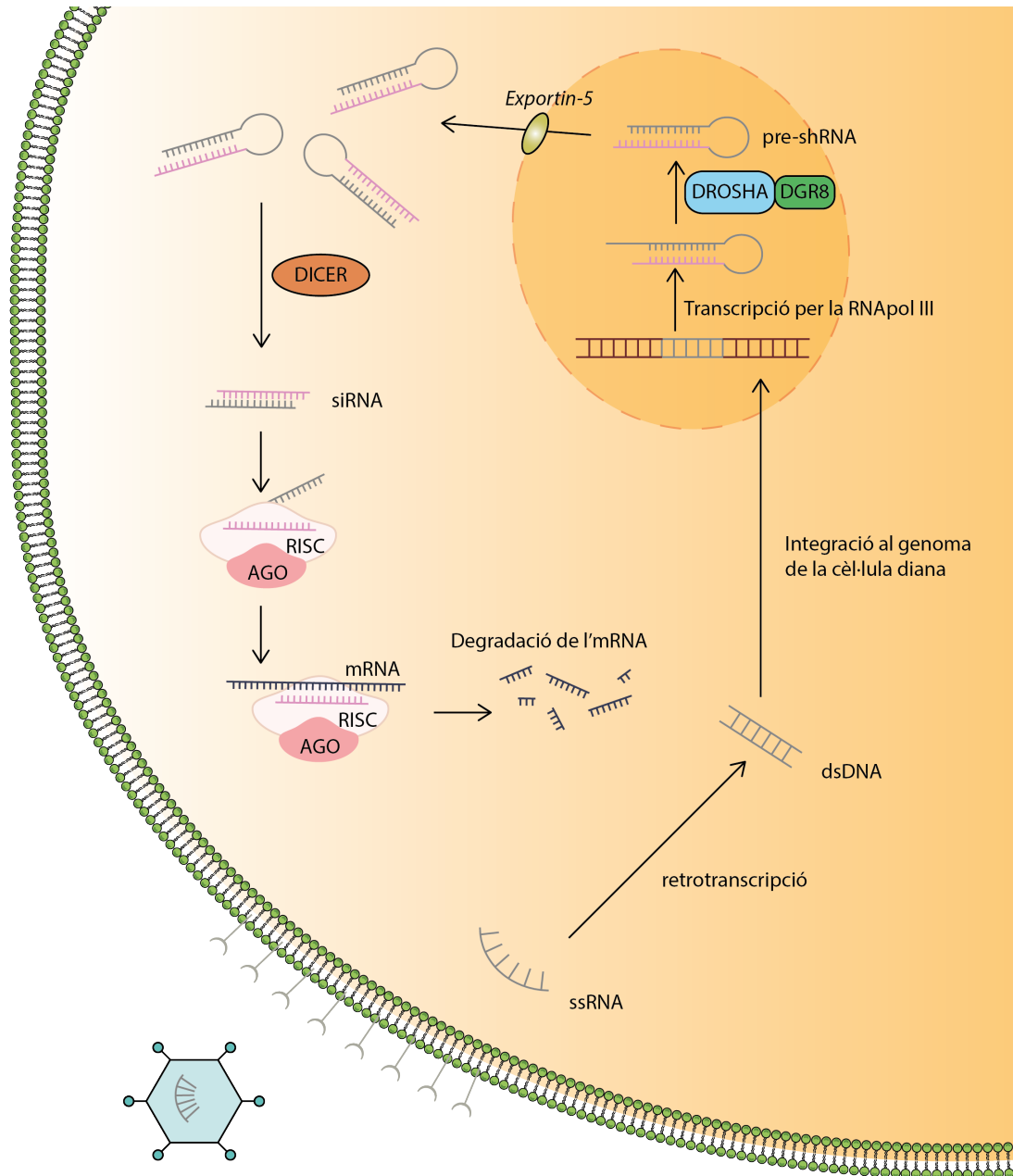


Figura 3.1. Representació esquemàtica del mecanisme d'infraregulació gènica mitjançant shRNAs.

Amb l'ajuda del lentivirus s'introdueix l'shRNA, el qual s'integra al genoma de la cèl·lula hoste. L'shRNA és transcrit i processat per les proteïnes nuclears DROSHA i DGR8, i es crea el pre-shRNA. Aquest es transporta al citoplasma mitjançant la proteïna *Exportin-5*. El pre-shRNA és processat per DICER, generant l'siRNA, la cadena guia de la qual activa el complex RISC i recluta l'mRNA diana. Finalment l'mRNA és degradat, ja que s'impedeix la seva traducció. Abreviatures: dsDNA (*double strand DNA*, DNA de doble cadena), mRNA (*messenger RNA*, RNA missatger), shRNA (*short hairpin RNA*), siRNA (*small interfering RNA*, RNA petit d'interferència), ssRNA (*single strand RNA*, RNA de cadena única).

3.4.1 Plasmidis

La infraregulació genètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ va ser realitzada mitjançant la transducció vírica de shRNAs clonats en el vector lentiviral pGIPZ (Thermo Fisher Scientific). Els vectors lentivirals deriven del virus de la immunodeficiència humana 1 (VIH-1) i són una bona eina gràcies a l'alta eficiència de transducció tant en cèl·lules mitòtiques com en cèl·lules no mitòtiques, la integració al genoma i una subseqüent expressió estable dels transgens tan *in vitro* com *in vivo*.

S'han desenvolupat tres generacions de vectors per a la producció de lentivirus. A cada generació s'ha millorat la bioseguretat, ja que s'ha dividit els elements necessaris per a la formació dels virus en plasmidis independents. En aquest treball es van usar els vectors lentivirals de segona generació, que consisteixen en la cotransfecció de tres vectors, representats a la figura 3.2. La divisió dels components en un sistema de tres plasmidis permet el lliurament del gen d'interès sense l'expressió de proteïnes virals en les cèl·lules diana, i significaria que caldrien com a mínim dues recombinacions per donar lloc a un virus competent VIH-1 durant la producció del vector.

Els tres vectors cotransfectats a la línia cel·lular HEK293T per la generació de partícules lentivirals (Figura 3.2) van ser:

- El vector lentiviral, portador de l'shRNA del gen d'interès. Aquest vector conté el material genètic que es transferirà i s'integrarà al genoma de la cèl·lula diana. Conté el transgen i elements activadors en posició *cis*: LTR 3' i 5', Ψ i RRE. Aquests elements són necessaris per a l'encapsidació, la transcripció inversa i la integració al genoma de la cèl·lula hoste. La capacitat transcripcional de l'LTR es perd un cop el vector és transferit a la cèl·lula, ja que aquest és dependent del gen *TAT*, que està localitzat a un vector independent no integratiu. Així, l'activitat promotora del 5'LTR és mínima i el transgen és activat mitjançant un promotor intern (CMV). Aquest fet minimitza el risc d'aparició de partícules recombinants competents. El vector incorpora el gen de resistència a l'antibiòtic puromicina, necessari per a la selecció de les cèl·lules que expressin el vector.
- Vector psPAX2, el vector d'empaquetament per la producció de partícules lentivirals. Conté els gens *GAG*, *POL*, *TAT* i *REV* sota el control d'un promotor robust CAG per l'expressió eficient de les proteïnes d'empaquetament com també per la transcriptasa inversa i la integrasa.

- Vector pMD2.G, que codifica pel plasmidi de la càpsida. Aquest vector codifica per a la glicoproteïna G del virus de l'estomatitis (VSV-G, *vesicular stomatitis virus envelope G protein*). L'ús de la VSV-G augmenta el tropisme respecte a la proteïna GP160 del virus original del VIH-1. A més, es redueix la possible recombinació, ja que s'eliminen seqüències homòlogues entre el plasmidis de la càpsida i el del vector lentiviral. La proteïna VSV-G es troba sota el control del promotor CAG.

Els vectors psPAX2 i pMD2.G no contenen senyals d'empaquetament ni LTRs, per tal d'evitar la transmissió de partícules virals i reduir la possibilitat de formació de lentivirus replicatius competents. A més a més, els elements codificants es troben en posició *trans* respecte al vector portador del gen d'interès.

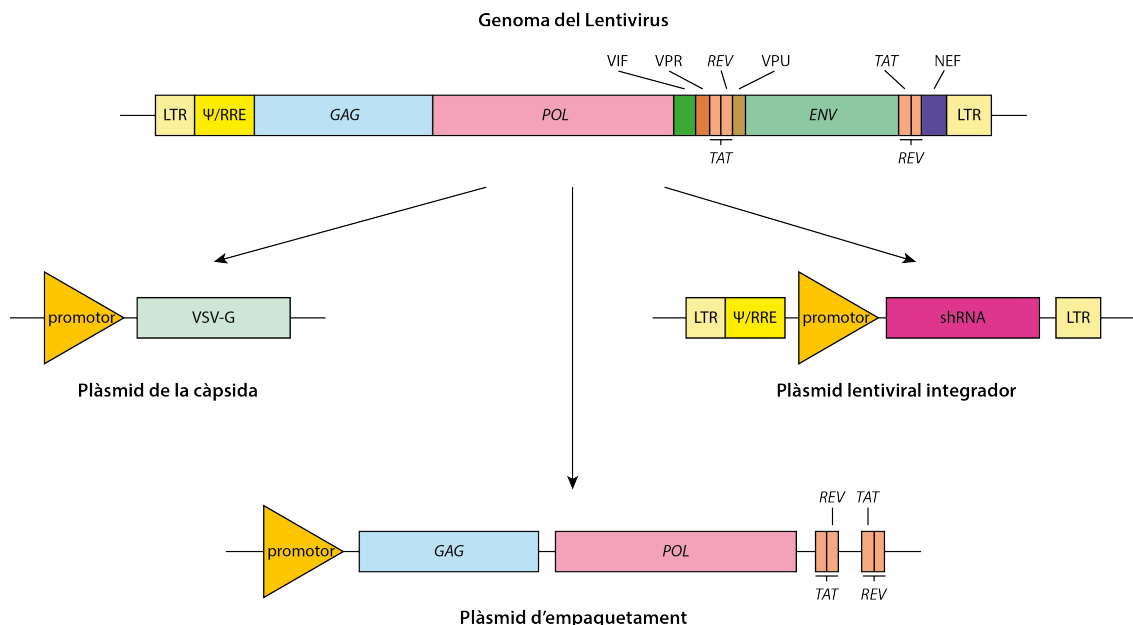


Figura 3.2. Representació de la segona generació de plasmidis lentivirals. El genoma lentiviral és editat i distribuït en els tres plasmidis corresponents al sistema de la segona generació lentiviral. Les proteïnes accessòries VIF, VPR, VPU i NEF presents al genoma del lentivirus són eliminades del plasmidi d'empaquetament, i el gen lentiviral *ENV* es substitueix pel codificant de la proteïna VSV-G. D'aquesta manera només queden quatre dels nou gens inicials virals del VIH-1: *GAG*, *POL*, *TAT* i *REV*. En els tres plasmidis s'introdueix un promotor robust per assegurar la transcripció dels gens codificants.

3.4.2 Transfecció i producció lentiviral

Es van sembrar 4×10^6 cèl·lules HEK293T en plaques de 100mm amb un recobriment previ de gelatina al 0.1% (Sigma-Aldrich) per cada vector. Al cap de 24h, es duia a terme la transfecció amb Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific) dels diferents plasmidis

seguint les instruccions del fabricant. Per cada placa la quantitat de vector introduït va ser: $12\mu g$ del vector lentiviral pGIPZ, $8\mu g$ del vector psPAX2 i $4\mu g$ del vector MD2.G. Després de 36h, es recollia el sobrenedant de les plaques, el qual contenia els virus. Aquest es centrifugava 5min a 1200rpm i es filtrava amb un filtre de $0.45\mu m$. El sobrenedant amb els virus es reservava a $-80^{\circ}C$ o s'utilitzava directament per infectar les cèl·lules de RMS o NBL (apartat 3.4.3).

3.4.3 Infecció

Per dur a terme la infecció de les cèl·lules diana, aquestes es sembraven en una placa de 60mm per assolir el dia següent una confluència d'aproximadament el 40%. S'aspirava el medi i s'addicionava el sobrenedant amb les partícules víriques a una proporció d'1/2 amb medi MEM o IMDM sense antibiòtic per les línies cel·lulars de RMS o NBL, respectivament. A les 24h es canviava el medi amb medi fresc sense antibiòtic. L'endemà es procedia a la selecció de les cèl·lules infectades amb puromicina a la concentració d' $1\mu g/ml$ (Sigma-Aldrich).

Per tal de comprovar l'eficiència de la infraregulació genètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ es van avaluar els nivells d'expressió de l'mRNA de la *ITGA9* mitjançant RT-qPCR (apartat 3.5) i els nivells de la proteïna mitjançant *Western blot* (apartat 3.6) de cada clon obtingut. Els vectors utilitzats per la infraregulació genètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ van ser V3LHS_388097 (shRNA#1), V3LHS_388100 (shRNA#2), V2LHS_133447 (shRNA#3) i V3LHS_388097 (shRNA#4). Tant el vector pGIPZ com els diferents vectors dels shRNAs contra la integrina $\alpha 9\beta 1$ es van adquirir a GE Healthcare Dharmacon.

Els assaigs funcionals es van realitzar a partir del dia 7 d'infecció i en absència de puromicina.

3.5 Anàlisi de l'expressió gènica

3.5.1 Extracció de l'RNA total i miRNA

Es va extreure l'RNA total de les línies cel·lulars i dels tumors de pacients amb el kit *RNeasy Mini* (Qiagen) seguint les instruccions del fabricant. Aquest kit es basa en la unió selectiva de l'RNA total a les membranes de sílice de les columnes. Primerament, es lisen i s'homogeneïtzen les mostres amb un tampó desnaturalitzant ric en guanidina-tiocianat, el qual inactiva les RNAses. S'addiciona etanol per tal de precipitar el DNA i obtenir les condicions favorables d'unio de l'RNA a la membrana. Seguidament la mostra es diposita a la columna, on l'RNA total es lliga a la membrana i els contaminants s'eliminen gràcies a rentats successius. L'RNA s'elueix amb aigua lliure d'RNAases. Aquest kit permet purificar molècules d'RNA més grans de 200 nucleòtids.

Per tal d'extreure els microRNAs (miRNAs) procedent de les línies cel·lulars es va utilitzar el kit *miRNeasy Mini* (Qiagen) seguint les instruccions del fabricant. Aquest kit permet purificar molècules d'RNA total, miRNAs i altres molècules petites d'RNA. En primer lloc, les cèl·lules s'homogeneïtzen amb el reactiu de lisi QIAzol. Després de l'addició de cloroform, l'homogeneïtzat es separa en la fase orgànica i aquosa per centrifugació. L'RNA es manté en la fase aquosa, mentre que el DNA i les proteïnes resten en la fase orgànica o la interfase. Es recull la fase aquosa, s'addiciona etanol i es passa per la columna on l'RNA s'uneix a la membrana. El fenol i altres contaminants s'eliminen amb rentats posteriors. L'RNA s'elueix amb aigua lliure d'RNAases.

L'RNA es va analitzar i quantificar amb l'espectrofotòmetre NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). L'RNA es va reservar a -80°C per experiments posteriors.

3.5.2 Retrotranscripció

La retrotranscripció o transcripció inversa és la síntesi de DNA a partir d'un motlle d'RNA, és a dir, la generació del DNA complementari (cDNA, *complementary DNA*). La transcriptasa inversa fa servir encebadors complementaris a l'extrem 3' de l'mRNA i sintetitza la cadena de DNA complementària a l'mRNA. El DNA complementari s'utilitza com a motlle per l'anàlisi de l'expressió gènica mitjançant qPCR (reacció en cadena de la polimerasa quantitativa, *quantitative polymerase chain reaction*; apartat 3.5.3).

L'RNA es va retrotranscriure mitjançant la transcriptasa inversa del virus de la leucèmia murina de Moloney (M-MLV, *Moloney Murine Leukemia Virus*; Promega) seguint les instruccions del fabricant. 2µg d'RNA es van incubar amb 1µg d'encebadors aleatoris (*random primers*, Thermo Fisher Scientific) durant 5min a 70°C, temperatura que permet la desnaturalització de les estructures secundàries de l'RNA i la hibridació dels encebadors. Seguidament les mostres es van dipositar en gel per evitar la formació de noves estructures secundàries i es van incubar amb 5µl del tampó de reacció de M-MLV 5x (Promega), 1.25µl de desoxiribonucleòtids trifosfat 10mM (dNTPs, Thermo Fisher Scientific) i 200U de M-MLV (Promega) durant 1h a 37°C per l'elongació del cDNA.

La síntesi del DNA complementari dels miRNAs es va dur a terme mitjançant el kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Per assegurar l'especificitat de l'assaig i al contrari de la retrotranscripció convencional on s'usen encebadors aleatoris, aquest sistema fa ús d'encebadors específics en *stem-loop* per cada miRNA a retrotranscriure (Figura 3.3).

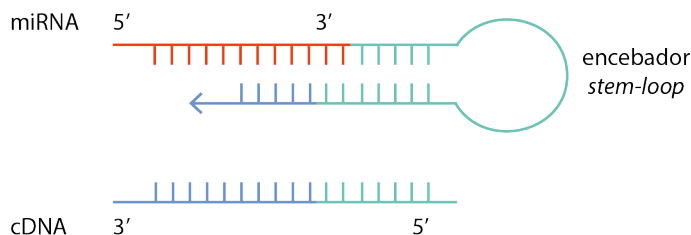


Figura 3.3. Representació de la retrotranscripció dels miRNAs amb encebadors en *stem-loop*.

La retrotranscripció dels miRNAs extrets de línies cel·lulars es va dur a terme amb encebadors específics en *stem-loop* per cada miRNA a transcriure. Amb aquest sistema s'assegura una major especificitat respecte a la retrotranscripció convencional. Abreviatures: cDNA (*complementary DNA*, DNA complementari), miRNA (microRNA).

Per a la generació del DNA complementari dels miRNAs es va utilitzar l'enzim comercial MultiScribe™, una versió recombinant de la transcriptasa inversa del virus de la leucèmia murina de Moloney (rMoMuLV). La retrotranscripció dels miRNAs es va obtenir a partir de 12.5ng d'RNA juntament amb 3µl de l'encebador específic per cada miRNA 5x, 1.5µl del tampó de la retrotranscripció 10x, 50U de la retrotranscriptasa MultiScribe™, 3.8U d'inhibidor de la RNAsa i 0.15µl de dNTPs 100mM (tots els reactius d'Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Es van incubar les mostres 5min en gel i posteriorment es van incubar al termociclador amb el programa següent: 30min a 16°C, 30min a 42°C i 5min finals a 85°C.

Totes les reaccions de retrotranscripció van ser mantingudes a -20°C fins que es van fer servir per a la reacció en cadena de la polimerasa quantitativa (apartat 3.5.3).

3.5.3 Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa

L'anàlisi de l'expressió dels mRNAs i miRNAs es va realitzar mitjançant PCR quantitativa (qPCR) amb l'ús de la tecnologia de les sondes TaqMan (Thermo Fisher Scientific). La qPCR permet mesurar mitjançant fluorescència la quantitat de DNA sintetitzat, ja que l'emissió de la fluorescència produïda a la reacció és proporcional a la quantitat de DNA amplificat. Per cada mostra es calcula el número de cicle en el qual el lector comença a detectar un increment de la fluorescència significatiu respecte la fluorescència basal, denominat *Ct* (*threshold cycle*). El *Ct* és inversament proporcional a la concentració inicial de DNA diana present a la mostra.

La tecnologia de les sondes TaqMan són sondes basades en la hidròlisi i transfereixen l'energia des d'un donador fluorescent (*reporter*) a un acceptor (*quencher*). Les sondes tenen el *reporter* a l'extrem 5' i el *quencher* a l'extrem 3', localitzant-se a prop en l'espai. D'aquesta manera, quan la sonda es manté intacta, la fluorescència emesa pel *reporter* és absorbida pel *quencher*. Les sondes estan dissenyades per tal que hibridin dins del segment del DNA diana flanquejat pels encebadors. Quan l'encebador hibrida amb el DNA diana en l'acció de síntesi del DNA de la Taq polimerasa (polimerasa de *Thermus aquaticus*), que presenta activitat 5' exonucleasa, s'hidrolitza l'extrem 5' de la sonda produint-se l'alliberació del fluorocrom donador. El *reporter* i el *quencher* queden allunyats en l'espai, i la fluorescència emesa pel donador no és absorbida per l'acceptor i sí per l'equip (Figura 3.4).

Les reaccions de PCR es van dur a terme en plaques de 384 pous amb un volum final de 10 μ l per pou. En el cas de la qPCR de l'mRNA total les proporcions per pou eren les següents: 0.5 μ l de cDNA, 5 μ l de *Master Mix* -conté la DNA polimerasa, els dNTPs, el clorur de magnesi i el tampó de reacció-, 0.5 μ l de la sonda TaqMan -inclou els encebadors- i 4 μ l d'aigua DEPC (tots els reactius de Thermo Fisher Scientific). En el cas de la qPCR dels miRNAs les proporcions per pou eren: 0.7 μ l de cDNA, 5 μ l de *Master Mix*, 0.5 μ l de la sonda TaqMan i 3.8 μ l d'aigua DEPC. Totes les reaccions es van realitzar per triplicat. A la taula 3.2 es mostren les sondes utilitzades per la detecció dels nivells d'expressió de la *ITGA9*, on s'utilitza el *TBP* com a control intern; i les sondes per la detecció de l'expressió del miR-7 i el miR-324, on s'utilitza en aquest cas l'RNU44 com a control intern.

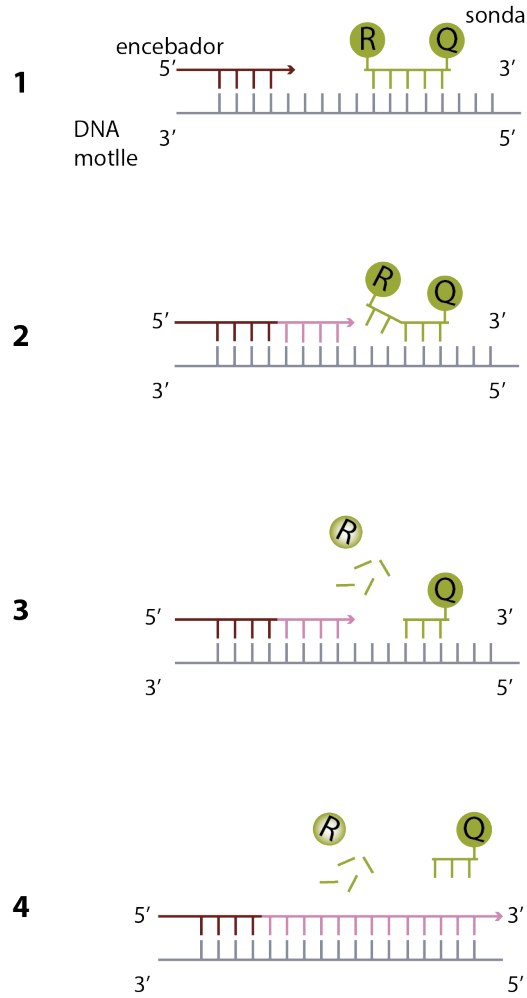


Figura 3.4. Representació de la tecnologia de les sondes TaqMan. **1.** La sonda TaqMan està formada per un fluorocrom donador (R, *reporter*) i un acceptor (Q, *quencher*), la qual hibrida amb la cadena del DNA motlle diana. **2.** A mesura que la Taq polimerasa exerceix l'activitat 5' exonucleasa s'allibera el *reporter*. **3.** La separació física entre el *reporter* i el *quencher* permet la detecció de la fluorescència per l'equip. **4.** Polimerització completa de la cadena de DNA.

Taula 3.2. Sondes TaqMan utilitzades

Gen	Sonda	miRNA	Sonda
<i>ITGA9</i>	Hs00979865_m1	hsa-miR-7-5p	000268
<i>TBP</i>	Hs00172424_m1	hsa-miR-324-5p	000539
		RNU44	001094

Es van realitzar 40 cicles d'amplificació en el termociclador amb detecció de fluorescència ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) amb el següent programa d'amplificació: 50°C durant 3min, 95°C durant 10min i 40 cicles de 95°C durant 15s i 60°C durant 1min. L'anàlisi de les

dades es va realitzar amb el programari *7900HT Sequence Detection Systems 2.3* (Applied Biosystems). Els nivells relatius de cada mRNA o miRNA analitzat es van expressar com a $-\Delta Ct$ o quantificats amb el mètode comparatiu $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ [153].

3.6 Extracció i detecció de proteïnes

3.6.1 Extracció de proteïnes

Tant en els casos dels teixits humans com les cèl·lules procedents dels cultius cel·lulars, l'extracció de proteïnes es va dur a terme en gel i de manera mecànica per tal d'evitar la degradació o modificacions de les proteïnes, i es va obtenir així un extracte proteic representatiu de les condicions fisiològiques. El tampó de lisis utilitzat en les extraccions de proteïnes va ser el tampó de lisis i extracció RIPA (Thermo Fisher Scientific) suplementat amb el còctel d'inhibidors de proteases (Sigma-Aldrich). En els casos on es volia estudiar l'estat de les fosforilacions de les proteïnes, es va addicionar inhibidors de fosfatases (Thermo Fisher Scientific) al tampó de lisis.

En el cas de l'extracció de proteïnes a partir de teixits humans congelats, es va fer servir l'homogeneïtzador *Pellet pestle* (Sigma-Aldrich). Una mostra petita de tumor congelat es va homogeneïtzar amb el tampó de lisis. En el cas de l'extracció de proteïnes a partir de cèl·lules en cultiu, es va realitzar un rentat amb PBS i es van disgregar les cèl·lules fent ús d'un rascador juntament amb el tampó de lisis.

En tots els casos, els homogeneïtzats es van fer passar per agulles de 0.4G i es van incubar durant 3min a 95°C per facilitar l'homogeneïtzació i inhibir l'activitat de les proteases. Es van centrifugar durant 10min a 13000rpm i es va traspasar el sobrenedant, contenint l'extracte proteic cel·lular total, a un tub nou.

Les mostres van ser immediatament congelades a -20°C.

3.6.2 Quantificació de proteïnes

La quantificació de les mostres es va dur a terme amb el kit *DC Protein Assay* (Biorad). El kit consisteix en un assaig colorimètric quantitatiu després de la solubilització de la mostra amb detergent i en absència d'agents quelants. La reacció està basada en l'assaig Lowry [154],

que consta de dues reaccions químiques. La primera reacció és la reducció dels ions Cu^{2+} en condicions alcalines, els quals formen un complex amb els enllaços peptídics (reacció de Biuret). La segona és la reducció del reactiu de Folin-Ciocalteu pel complex coure-enllaços peptídics. El desenvolupament del color és degut principalment als aminoàcids tirosina i triptòfan. Les proteïnes es redueixen amb el reactiu Folin i perden entre un i tres àtoms d'oxigen, produeixen una o més espècies reduïdes, i presenten un color blau que es lleix a una absorbància de 750nm.

La quantificació de proteïnes es va realitzar mitjançant la comparació amb una recta de calibratge amb una solució d'una proteïna estàndard seleccionada, en aquest cas BSA (albúmina de sèrum boví, de l'anglès *bovine serum albumin*). La recta de calibratge de BSA comprenia un rang des de 0 a 2mg/ml. Es va fer una dilució 1/5 de les mostres a quantificar i es van addicionar $5\mu\text{l}$ d'aquesta al pou d'una placa de 96 pous (efectuant 3 rèpliques de cada mostra). Es va afegir a cada pou $25\mu\text{l}$ de la mescla dels reactius S (solució surfactant) i A (solució alcalina de tartrat de coure) en una proporció 1/50. Seguidament es van afegir $200\mu\text{l}$ per pou del reactiu B (reactiu Folin) i es va incubar la placa durant 15min a temperatura ambient. Es va realitzar la lectura de l'absorbància a 750nm en un lector d'absorbàncies (BioTeK) i es va determinar la concentració de cada mostra extrapolant els resultats obtinguts de la recta patró.

3.6.3 Preparació de les mostres

Després de la quantificació de les mostres, aquestes van ser preparades per la seva anàlisi posterior mitjançant SDS-PAGE (electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; apartat 3.6.4) i *Western blot* (apartat 3.6.5). Entre 20 i $30\mu\text{g}$ de proteïna es van mesclar amb el tampó de càrrega Laemmli (250mM Tris pH 6.8, 10% SDS, 50% glicerol i 0.5% blau de bromofenol) al 10% de ditiotreitòl (DTT) 1M (tots els reactius de Sigma-Aldrich) i van ser desnaturalitzats a 95°C durant 5min.

El DTT és un agent reductor que trenca els ponts disulfur entre els grups tiol dels residus de cisteïna, i permet la separació de les cadenes polipeptídiques. L'SDS és un detergent aniónic que desnaturalitza les proteïnes, ja que trenca les interaccions no covalents que determinen les seves estructures terciàries i quaternàries. L'SDS s'uneix amb fermesa a les proteïnes i les fa adoptar una forma cilíndrica. La majoria de proteïnes s'uneixen a l'SDS amb la mateixa proporció, 1.4g d'SDS per cada gram de proteïna (corresponent aproximadament a 1 molècula de SDS per cada 2 residus d'aminoàcids). La gran càrrega negativa que proporciona l'SDS

a les proteïnes emmascara les càrregues proteïques intrínseques, de manera que les proteïnes tractades amb SDS tendeixen a presentar relacions càrrega/massa idèntiques i formes similars. Conseqüentment, la posterior electroforesi de proteïnes en un gel de poliacrilamida amb SDS separa les macromolècules únicament per ordre de les seves masses moleculars per l'efecte de filtració per gel.

3.6.4 SDS-PAGE

L'electroforesi és una tècnica basada en la migració d'ions en un camp elèctric, i és àmpliament utilitzada per la separació analítica de molècules biològiques. L'electroforesi en gel de poliacrilamida en presència d' SDS (SDS-PAGE) és el mètode utilitzat per la separació de proteïnes en funció del seu pes molecular en aquest treball doctoral.

Els gels de poliacrilamida es formen a partir de la polimerització de l'acrilamida amb l'acció de l'agent entrecruador, bisacrilamida, ambdós en presència del 10% d' SDS per garantir les condicions desnaturalitzants. La reacció de polimerització s'inicia per un sistema redox: el TEMED (N,N,N,N'-tetrametilètilendiamina) catalitza la formació de radicals lliures que dirigeixen la reacció a partir de l'ió persulfat ($S_2O_8^{2-}$), que s'afegeix en forma d'APS i actua com a iniciador. La porositat del gel la determina les proporcions relatives d'acrilamida i bisacrilamida presents (rang de 60:1 a 20:1), on el porus és més petit quant més quantitat de bisacrilamida vs acrilamida s'usa. El percentatge total d'acrilamida/bisacrilamida determina el rang de separació del gel i normalment els gels es denominen en funció de tal percentatge. La majoria de proteïnes es separen bé en un rang del 5-12%. Un menor percentatge correspon a una mida major del porus, i per tant és indicat per a la separació de proteïnes de gran volum i viceversa.

Per tal d'augmentar la resolució dels gels es va utilitzar el sistema discontinu, en el qual s'usen dos tipus de gels: un gel denominat concentrador (*stacking*) amb una mida gran de porus no restrictiu que es forma sobre un segon gel anomenat separador (*resolving*). En aquest sistema cada tipus de gel es prepara amb tampons de diferent pH i força iònica, i el tampó d'electroforesi és un tercer tipus de tampó. El gel concentrador està format per Tris-HCl 1M pH 6.8, mentre que el separador per Tris-HCl 1.5M pH 8.8, i el tampó d'electroforesi per Tris-glicina-SDS pH 8.3. La mobilitat d'una proteïna en el gel concentrador es troba entre la mobilitat dels ions Cl^- del gel i la mobilitat de l'ió Gly^- del tampó de mostra. Per tant, entre els dos fronts hi ha una zona de baixa conductivitat i gran diferència de voltatge, de manera que les proteïnes es concentren en una zona molt reduïda entre els dos ions. Un cop

en el gel separador, per contra, el pH bàsic d'aquest afavoreix la ionització de la glicina de manera que els ions migren a través dels polipèptids concentrats, just per darrere dels ions clorur. A partir d'aquest moment les proteïnes migren a través del gel separador en una zona de voltatge i pH uniforme de manera que es separen segons la seva mida (Figura 3.5).

Per tal de conèixer el pes molecular de les proteïnes de la mostra, es va utilitzar el marcador de pes molecular *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Bio-Rad). Les electroforesis de gels del 8-12% d'acrilamida/bisacrilamida es van elaborar en cubetes d'electroforesi *Mini-PROTEAN* (Bio-Rad) amb el tampó d'electroforesi (250mM Tris, 1.92M glicina, 1% SDS), a un amperatge constant de 35mA/gel.

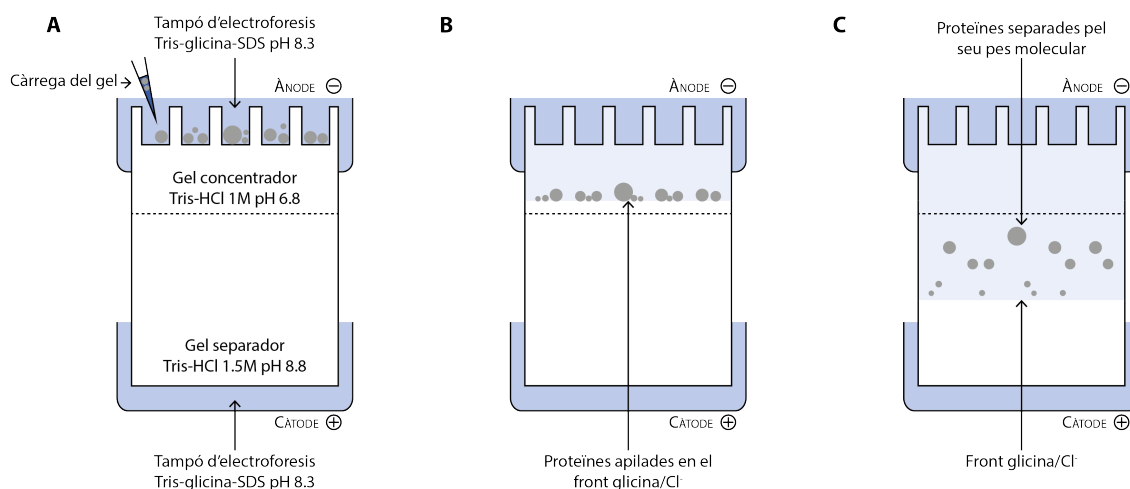


Figura 3.5. Representació de l'electroforesi SDS-PAGE utilitzant el sistema discontinu. **A:** el gel de poliacrilamida està format per dos tipus de gels: el concentrador o *stacking* i el separador o *resolving*. Els dos gels es preparen amb diferents tampons, i presenten diferent pH i força iònica. Pel tampó d'electroforesi s'usa un tercer tampó. **B:** a mesura que s'aplica el corrent elèctric, les proteïnes s'apilen en el gel concentrador degut a la baixa conductivitat i a la gran diferència de voltatge entre el front dels ions clorur i glicina. **C:** un cop les proteïnes passen al gel separador, presenten més mobilitat gràcies al pH bàsic i migren en funció de la seva massa.

3.6.5 Western blot

El *Western blot* és una tècnica d'immunodetecció de proteïnes. Després de la separació de les proteïnes contingudes en la mostra mitjançant SDS-PAGE, aquestes es transfereixen a una membrana i les proteïnes d'interès es detecten mitjançant l'ús d'anticossos específics.

Així doncs, després de l'SDS-PAGE, les proteïnes presents al gel van ser transferides a membranes de PVDF (difluorur de polivinilidè, de l'anglès *polyvinylidene difluoride*) amb porus de $0.45\mu\text{m}$ (GE Healthcare Life Sciences), prèviament activades en metanol durant

1min. El sandvitx de l'electrotransferència es va muntar en cassets en l'ordre següent: esponja - 2 papers Whatman - gel SDS-PAGE - 2 papers Whatman - esponja, en presència del tampó de transferència (10% tampó Tris/glicina (25mM Tris i 192mM glicina), 20% metanol i 70% H₂O). Les transferències es van realitzar en cubetes *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad) a 200mA durant 2h a 4°C.

Un cop transferides, les membranes es van bloquejar amb TBS-T (tampó Tris salí amb Tween-20 (Sigma-Aldrich), de l'anglès *Tris-Buffered Saline and Tween-20*; 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl i 0.1% Tween-20) al 5% de BSA (Sigma-Aldrich) durant 1h a temperatura ambient i amb agitació. El bloqueig de les membranes evita la unió inespecífica dels anticossos posteriorment utilitzats. Les membranes van ser incubades amb la dilució indicada d'anticòs primari (Taula 3.3) amb el tampó de bloqueig durant tota la nit a 4°C en agitació. L'endemà es van dur a terme tres rentats de 10min amb TBS-T en agitació per eliminar l'excés d'anticòs primari. Posteriorment, les membranes van ser incubades en agitació durant 1h a temperatura ambient amb la dilució pertinent dels anticossos secundaris adequats, els quals estaven conjugats amb l'enzim HRP (peroxidasa de rave picant, de l'anglès *horseradish peroxidase*) (Taula 3.4). Es van tornar a realitzar tres rentats de 10min amb TBS-T en agitació, aquesta vegada per eliminar l'excés d'anticòs secundari i pel revelat es van incubar les membranes amb *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection* (GE Healthcare Life Sciences) durant 5min sense agitació. Aquest reactiu està format per solucions de peròxid i luminol, les quals reaccionen en presència de l'HRP conjugat a l'anticòs secundari. Més concretament, el luminol és oxidat en presència de l'enzim HRP i dona llum. La llum emesa va ser detectada mitjançant films fotogràfics *SuperRX Fuji Medical X-RAY* (Fujifilm).

Per tal de quantificar els resultats obtinguts en el *Western blot*, es van escanejar els films i les imatges van ser quantificades amb el programari *Image J* (Domini públic). Els valors de la proteïna d'interès es van normalitzar als valors d'actina de cada carril.

Taula 3.3. Especificacions dels anticossos primaris utilitzats

Anticòs	Antigen*	Espècie	Dilució	Referència	Casa comercial
anti-Actina	43 kDa	cabra	1:10000	sc-1616	Santa Cruz Biotechnology
anti-ITGA9	150kDa	ratolí	1:1000	H00003680-M01	Novus Biologicals
anti-p-FAK	125kDa	conill	1:1000	3283	Cell Signaling Technology
anti-FAK	125kDa	conill	1:1000	3285	Cell Signaling Technology

* Pes molecular.

Taula 3.4. Especificacions dels anticossos secundaris utilitzats

Anticòs	Dilució	Referència	Casa comercial
anti-Ig cabra	1:2000	P044901-2	Agilent Technologies
anti-Ig conill	1:10000	A0545	Sigma-Aldrich
anti-Ig ratolí	1:2000	P026002-2	Agilent Technologies

3.7 Immunohistoquímica

La immunohistoquímica permet la localització d'epítops proteics en seccions de teixits mitjançant l'ús d'anticossos específics. La immunohistoquímica la va realitzar el grup de Patologia Molecular dels sarcomes i altres tumors de l'Hospital Universitari Virgen del Rocío de Sevilla. Es va dur a terme a partir d'un *tissue microarray* de trenta-dos tumors de RMS, provinents del Biobanc de l'Hospital Universitari Virgen del Rocío.

Les mostres es van fixar en formol i es van incloure en parafina. Per eliminar l'excés de parafina, seccions de $5\mu\text{m}$ dels blocs es van dipositar durant tota la nit en una estufa a 65°C . Posteriorment, es van desparafinar submergint-les en xilè i etanol al 100% i es van hidratar submergint-les en concentracions decreixents d'etanol. Després de rentats amb PBS al 0.5% de tritó per a la permeabilització dels teixits, es va dur a terme la recuperació antigènica. La fixació i inclusió dels teixits altera l'estructura tridimensional de les proteïnes, fet que provoca que no siguin reconegudes pels anticossos utilitzats. Mitjançant tècniques de desemascament s'aconsegueix restaurar la conformació dels epítops. En aquest cas, es va realitzar la recuperació antigènica amb l'olla a pressió amb tampó citrat pH 6. Les seccions es van submergir en una solució aquosa d' H_2O_2 al 3% per tal d'esgotar l'activitat peroxidasa endògena del teixit, d'aquesta manera s'evita interferències al revelat. Posteriorment, les seccions van ser cobertes amb una solució bloquejant (*Blocking reagent*, Roche) per bloquejar els llocs d'unió inespecífics i es van incubar amb l'anticòs primari anti-ITGA9 (Novus Biologicals, referència H00003680-M01) a una dilució de 1:200 durant tota la nit a 4°C . Després dels rentats amb PBS-Tween per eliminar l'excés d'anticòs primari, les mostres es van incubar amb l'anticòs secundari conjugat amb peroxidasa i el substrat cromogènic 3,3'-diaminobenzidina per desenvolupar la immunoreactivitat, d'acord amb les instruccions del fabricant (EnVision, Dako). Les seccions es van contratenyir lleugerament amb hematoxilina i es van muntar en DPX (BDH Laboratories).

La immunohistoquímica va ser valorada per dos especialistes de manera independent, els quals

van avaluar l'expressió citoplasmàtica positiva o negativa de la integrina $\alpha 9 \beta 1$ en cada cas. A continuació, es va realitzar un estudi estadístic on es va tenir en compte l'expressió de la proteïna i els diferents paràmetres clínicopatològics, proporcionats pel Biobanc de l'Hospital Universitari Virgen del Rocío.

3.8 Assaig de creixement cel·lular

Les cèl·lules pertanyents a les diferents condicions es van sembrar a baixa densitat en plaques de 6 pous. El nombre de cèl·lules es va optimitzar en funció de la línia cel·lular: 30.000 cèl·lules/pou per la línia RD, 15.000 cèl·lules/pou per la línia BE(2)-C, 90.000 cèl·lules/pou per la línia CHLA-90 i 25.000 cèl·lules/pou per la línia RH30. Al cap de 5 dies postsebra, es van tripsinitzar i comptar les cèl·lules presents mitjançant el comptador cel·lular *Z1 Coulter Particle Counter* (Beckman Coulter). [REDACTED]

[REDACTED] Cada condició va ser analitzada com a mínim en tres assaigs independents.

3.9 Assaig d'invasió *Transwell*

L'assaig *Transwell* permet quantificar *in vitro* la capacitat d'invasió cel·lular. La tècnica es basa en la capacitat de les cèl·lules tumorals per degradar la matriu extracel·lular i envair l'estroma, extravasar i formar metàstasi. L'assaig promou la invasió cel·lular mitjançant quimiotaxis en un sistema de dues càmeres separades per una membrana porosa recoberta de *Matrigel*, el qual simula la matriu extracel·lular. Les cèl·lules amb medi sense sèrum es dipositen en la càmera superior i es promou la quimiotaxi dipositant a la càmera inferior medi ric amb sèrum. Es quantifica el nombre de cèl·lules presents en la superfície inferior de la membrana a un temps determinat, que són les cèl·lules amb capacitat d'invasió que han degradat el *Matrigel* (Figura 3.6).

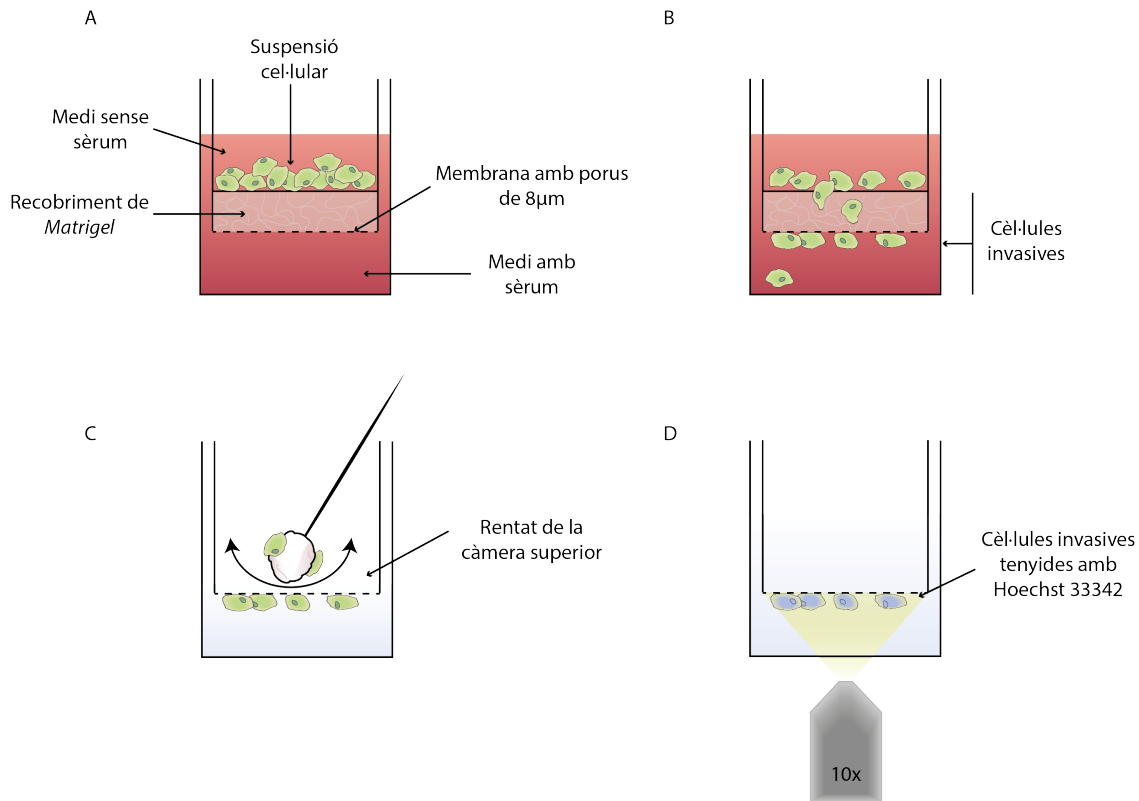


Figura 3.6. Representació de l'assaig d'invasió *Transwell*. **A:** els inserts *Transwell* estan formats per dues càmeres separades per una membrana de polycarbonat amb porus de $8\mu\text{m}$ que es cobreix de *Matrigel*, simulant la matriu extracel·lular. La suspensió cel·lular es col·loca a la càmera superior, resuspesa amb medi lliure d'FBS. **B:** les cèl·lules amb capacitat invasiva degraden el *Matrigel* i envaeixen fins a la càmera inferior, atretes pel quimiogradient present, ja que a la part inferior s'hi diposita medi amb FBS. **C:** al cap de 24h d'incubació, es fixen les cèl·lules presents en la part inferior de la membrana i es renten les restes cel·lulars i de *Matrigel* de la càmera superior amb l'ajuda d'un bastonet de cotó i rentats de PBS. **D:** les cèl·lules es tenyeixen amb una solució de Hoechst 33342, es visualitzen amb un microscopi d'epifluorescència i es realitza el comptatge d'aquestes.

Es van utilitzar inserts *Transwell* de 6.5mm de diàmetre de membrana de polycarbonat amb porus de $8\mu\text{m}$, encaixant amb plaques de 24 pous (Corning). El recobriments de *Matrigel Growth Factor Reduced* (Corning) es va dur a terme amb una dilució 1/3 amb medi sense FBS, i es va dipositar $25\mu\text{l}$ a cada insert. Aquest es va deixar polimeritzar a 37°C durant 20min. Es van sembrar 10^5 cèl·lules resuspeses amb un volum de $100\mu\text{l}$ amb medi sense FBS a la càmera superior, mentre que a la inferior s'hi van afegir $600\mu\text{l}$ per pou de medi amb FBS per tal de crear el gradient químic. Es van fer tres replicats de cada condició. Les cèl·lules es van incubar en condicions normals de cultiu, i 24h després es van aspirar les dues càmeres i es va fixar la membrana amb una solució de paraformaldehid al 4%, amb $100\mu\text{l}$ a la càmera superior i $600\mu\text{l}$ a la inferior. Passats 10min es va passar suaument un bastonet de cotó a la càmera superior per netejar la membrana de restes cel·lulars i el *Matrigel* restant,

i es van fer tres rentats amb PBS. Es van tenyir les cèl·lules fixades de la membrana amb 100 μ l a la càmera superior i 600 μ l a la inferior amb una solució de Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific) a una concentració de 5ng/ml durant 10min. El Hoechst és un colorant fluorescent permeable de cadenes dobles de DNA. Es va fer un últim rentat amb PBS i es van obtenir cinc fotos representatives de cada insert amb un microscopi invertit d'epifluorescència (Nikon) amb l'objectiu de 10x (Figura 3.6). Es van comptar les cèl·lules presents als camps fotografiats i els gràfics es van representar en tant per cent respecte al control. L'assaig es va repetir com a mínim tres vegades per a cada condició a estudiar. [REDACTED]

[REDACTED] En el cas dels assaigs d'invasió amb les cèl·lules transfectades amb els miRNAs, l'assaig es duia a terme un dia després de la transfecció.

3.10 Screening de miRNAs i transfecció transitòria dels miRNAs

Els miRNAs són RNAs petits de 21-25 nucleòtids no codificants, altament conservats evolutivament i actuen a nivell posttranscripcional com a repressors de l'expressió gènica. Els miRNAs reconeixen seqüències específiques principalment en la regió 3'UTR dels seus gens diana. En animals, els miRNAs presenten complementarietat de bases només en una regió de 6-7 nucleòtids anomenada *seeding region*.

Els gens que codifiquen pels miRNAs són transcrits per la RNA polimerasa II, i donen lloc al precursor primari o pri-miRNA, d'uns 100 nucleòtids de longitud i amb l'estructura del cap en 5' i la cua de poli(A) a l'extrem 3'. El pri-miRNA, el qual adopta una estructura en *hairpin loop*, és processat per DROSHA (RNAsa de tipus III) i el seu cofactor DGCR8, i es genera el pre-miRNA. Aquest és una molècula de 70-80 nucleòtids en forma de *hairpin loop* i amb dos nucleòtids desaparellats a l'extrem 3'. Un cop exportat al citoplasma mitjançant la proteïna *Exportin-5*, és processat per DICER que talla el *hairpin loop* generant un dúplex d'aproximadament 21 nucleòtids i extrems protuberants en 3'. Una de les dues cadenes és degradada i l'altra esdevé el miRNA madur, que s'associa amb diferents proteïnes com per exemple TRBP i proteïnes de la família AGO, i forma uns complexos silenciadors induïts per miRNA, anomenats miRISCs (*miRNA-induced silencing complexes*).

Funcionalment, els miRNAs tenen la capacitat d'impedir la traducció a través de diferents mecanismes. Si existeix una complementarietat perfecta amb l'mRNA diana, aquest és

degradat directament. En cas contrari, la unió miRNA/mRNA provoca la desestabilització de l'mRNA o bé la seva traducció a proteïna esdevé menys eficient.

3.10.1 Screening de miRNAs que regulen la integrina $\alpha 9\beta 1$

Es va dur a terme una predicció dels miRNAs que es podien unir al 3'UTR de la *ITGA9* mitjançant tres algorismes diferents: PicTar, TargetScan i miRanda. A la figura 3.7 es poden veure el nombre de miRNAs predits per cada algorisme i els miRNAs que són comuns entre un o més algorismes. El miR-125a, miR-132, miR-148a i miR-148b van ser els quatre miRNAs que els tres algorismes van predir. Els deu miRNAs comuns predits per TargetScan i miRanda van ser: miR-7, miR-134, miR-194-5p, miR-203a, miR-212-3p, miR-296-3p, miR-324-5p, miR-340-5p, miR-410 i miR-431-5p. Es va decidir prendre aquests miRNAs com a possibles candidats, a excepció del miR-148b, ja que la seqüència d'unió al 3'UTR és pràcticament idèntica a la del miR-148a. D'aquesta manera, el nombre de candidats va ser d'un total de tretze, resumida a la taula 3.5.

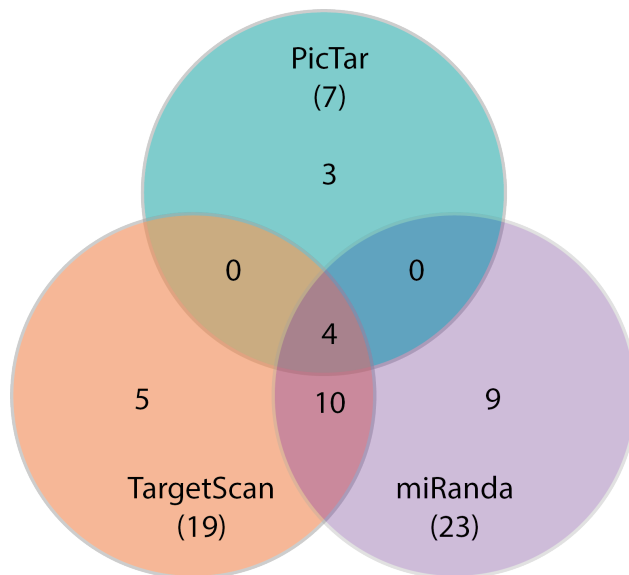


Figura 3.7. Representació de l'screening dels miRNAs que regulen la *ITGA9*. La predicció dels miRNAs que es podien unir al 3'UTR de la *ITGA9* es va dur a terme amb els algorismes PicTar, TargetScan i miRanda. Es van prendre com a candidats un total de tretze miRNAs. El nombre de candidats predits per cada algorisme s'indica entre parèntesis.

3.10.2 Transfecció transitòria dels miRNAs

Es van sembrar 200.000 cèl·lules de la línia cel·lular RD i 225.000 cèl·lules de la línia cel·lular CW9019 en plaques de 6 pous. Al cap de 24h es van transfectar els complexos liposomals formats pels mítics dels miRNAs o controls i Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific), seguint les instruccions del fabricant. Els mítics dels miRNAs són RNAs petits de doble cadena químicament modificats que mimetitzen els miRNAs endògens. Mitjançant la seva transfecció, es permet l'anàlisi funcional mitjançant la sobrerregulació de l'activitat dels miRNAs. La concentració dels mítics dels miRNAs (Taula 3.5, tots ells de GE Healthcare Dharmacon) era de 50nM, i la dels controls (*MiRIDIAN microRNA mimic Negative Control #1 (C-1)* i *MiRIDIAN microRNA mimic Negative Control #2 (C-2)*, ambdós de GE Healthcare Dharmacon) era de 25nM. En totes les transfeccions es va dur a terme una transfecció extra amb el mímic *miRIDIAN microRNA Mimic Transfection Control* com a control positiu de la transfecció a una concentració de 25nM (GE Healthcare Dharmacon). Aquest és un mímic d'un miRNA marcat amb Dy547 que no presenta cap diana en cèl·lules eucariotes, i permet així visualitzar l'eficiència de la transfecció a través d'un microscopi d'epifluorescència. En ambdues línies cel·lulars la quantitat de Lipofectamina utilitzada va ser de 3 μ l per pou.

Després de 72h de la transfecció, es processaven les cèl·lules transfectades per l'anàlisi de proteïna o RNA i miRNA (apartats 3.6 i 3.5, respectivament). En el cas dels assaigs funcionals amb cèl·lules transfectades, els assaigs es van dur a terme un dia després de la transfecció.

Taula 3.5. Llista i seqüència dels miRNAs candidats a unir-se al 3'UTR de la *ITGA9*

	miRNA	Seqüència	Referència
1	miR-125a-5p	UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA	C-300624-05-0005
2	miR-132-3p	U AACAGUCUACAGCCAUGGUCG	C-300599-06-0005
3	miR-148a-3p	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU	C-300540-05-0005
4	miR-7	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU	C-300546-07-0005
5	miR-134	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG	C-300628-05-0005
6	miR-194-5p	UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA	C-300641-05-0005
7	miR-203a	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG	C-300562-03-0005
8	miR-212-3p	U AACAGUCUCCAGUCACGGCC	C-300567-03-0005
9	miR-296-3p	GAGGGUUGGGUGGAGGCUCUCC	C-301076-01-0005
10	miR-324-5p	CGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUGU	C-300704-03-0005
11	miR-340-5p	UUAUAAAGCAAUGAGACUGAUU	C-301081-01-0005
12	miR-410	AAUAUAACACAGAUGGCCUGU	C-300740-03-0005
13	miR-431-5p	UGUCUUGCAGGCCGUCAUGCA	C-300729-03-0005

3.11 Assaig luciferasa

3.11.1 Generació del vector psiCHECK2-3'UTRITGA9

Per quantificar la capacitat de repressió que exercien els miRNAs en el transcrit del gen de la *ITGA9* es va clonar el 3'UTR de la *ITGA9* a continuació del gen *Rluc*, codificant per la luciferasa Renilla, en el vector psiCHECK-2 (Promega), amb la finalitat de dur a terme l'assaig luciferasa.

Es va amplificar un fragment de 490pb del 3'UTR de la *ITGA9* per PCR convencional a partir del DNA genòmic de la línia cel·lular RD. El fragment escollit contenia tant el lloc d'unió del miR-7 com el del miR-324. Per amplificar i clonar de forma dirigida el fragment seleccionat es van dissenyar encebadors, on a l'extrem 5' s'hi van addicionar les dianes de dos enzims de restricció; (1) XhoI en l'encebador directe (*forward*): 5'-GTCGAGTGCCACACCAGTCACATGA-3', i (2) NotI en el revers (*reverse*): 5'-GCCGCCGCCAGCAAGTTCCAAAGTACGGT-3'.

Per a l'amplificació es va utilitzar la DNA polimerasa *Platinum Pfx* (Thermo Fisher Scientific), ja que proporciona una amplificació molt fidel gràcies a la seva activitat *proofreading* (activitat exonucleasa 3'→5'). La PCR es va dur a terme amb 1µl del DNA genòmic complementari, 1.5µl de desoxiribonucleòtids trifosfat 10mM (dNTPs), 5µl del tampó de la polimerasa *Platinum Pfx* 10x, 1µl de MgSO₄ 50mM, 10µl de la solució *enhancer* 10x, 1.5µl i 1.5µl d'encebadors *forward* i *reverse* 10µM, 2.5U de la DNA polimerasa *Platinum Pfx* i 27.5µl d'aigua DEPC en un volum final de 50µl, tots els reactius de Thermo Fisher Scientific. Es va ciclar al termociclador d'acord amb el programa següent: 10min a 94°C, 38 cicles compostos per 15s a 94°C, 30s a 58°C i 45s a 72°C, finalitzat per 10min a 72°C.

Es va córrer la reacció de PCR en un gel al 2% d'agarosa (Merck Millipore), i la banda corresponent al 3'UTR de la *ITGA9* es va purificar amb el kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen). Es va lligar el producte purificat al vector comercial pCR-Blunt (Thermo Fisher Scientific), seguint les instruccions del fabricant. 1µl de la lligació es va transformar en bacteris competents (Thermo Fisher Scientific) segons el protocol facilitat per la casa comercial. Es va purificar el DNA plasmídic de les colònies viables i es va analitzar la incorporació del 3'UTR mitjançant la digestió simultània amb XhoI i NotI (New England Biolabs), a més de seqüenciar l'insert obtingut i comprovar que la seqüència fos correcta.

Es va dur a terme la lligació amb la proporció 3:1 de psiCHECK2 i insert, ambdós correctament digerits i purificats, i es va afegir 1µl de tampó de la T4 lligasa 10x i 2.5U de T4 lligasa (ambdós de Roche) en un volum final de 10µl. La reacció es va mantenir a 23°C durant 16h. 5µl de la lligació es van transformar en bacteris competents, i les colònies viables es van comprovar amb la doble digestió.

3.11.2 Transfeccions i assaig de l'activitat luciferasa

L'assaig luciferasa quantifica la repressió que exerceixen els miRNAs sobre el 3'UTR del transcrit d'un gen, i mesura la quantitat de repressió de luminiscència de la luciferasa Renilla. Breument, en una cotransfecció del vector i el miRNA en qüestió, si el miRNA s'uneix al 3'UTR s'impedeix la traducció de la luciferasa i no es produeix la reacció lumínica que aquesta catalitza (Figura 3.8).

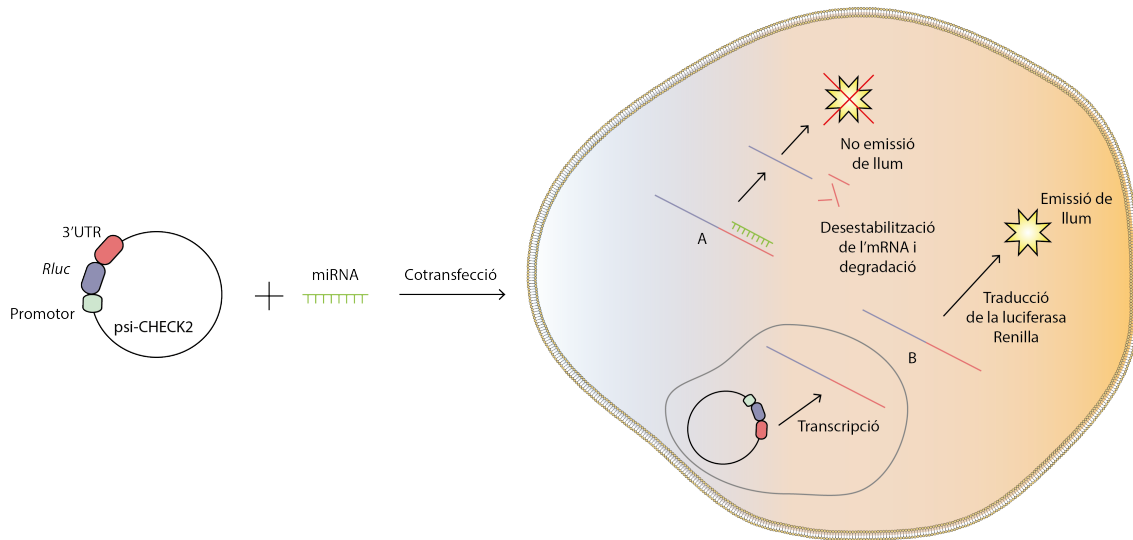


Figura 3.8. Representació de l'assaig luciferasa. L'assaig consisteix en la cotransfecció del vector psi-CHECK2 amb el 3'UTR de la *ITGA9* clonat a continuació del gen *Rluc* juntament amb els miRNAs d'interès. En el cas que el miRNA hibridi en el 3'UTR (**A**), dona lloc a la desestabilització de l'mRNA i una conseqüent no emissió de llum. En cas contrari (**B**), es tradueix la proteïna Renilla i amb presència del substrat emet fluorescència, la qual és posteriorment quantificada.

Es van sembrar cèl·lules HEK293T en plaques de 96 pous a una densitat de 20.000 cèl·lules/pou amb un volum final de $100\mu\text{l}$ /pou amb medi sense antibiòtic, i es van efectuar cinc rèpliques per cada condició. Prèviament, es va dur a terme un recobriment de poly-D-Lys (Sigma-Aldrich) a les plaques per tal d'assegurar l'adhesió cel·lular. Les cèl·lules van ser cotransfectades 24h després usant Lipofectamina 2000 amb 50ng del vector psiCHECK2-3'UTRITGA9 o psiCHECK2-wt i 25nM del mimíc del miR-7, miR-324 o bé el C-1. Els complexos liposomals que contenen el vector i el miRNA van preparar-se en un volum final de $50\mu\text{l}$ a part. Aquests van ser afegits a les plaques de 96 pous amb les HEK293T sembrades, on prèviament s'havien descartat $50\mu\text{l}$ de medi, amb un volum total de $150\mu\text{l}$. Les cèl·lules es van incubar a 37°C i 5% de CO_2 . Passades 24h, es va dur a terme l'assaig luciferasa.

Per l'assaig luciferasa es va utilitzar el sistema *Dual-Glo Luciferase Assay* (Promega) i es va seguir les instruccions del fabricant. Breument, es va aspirar el medi de les cèl·lules HEK293T i es van afegir $50\mu\text{l}$ del reactiu DualGlo i $50\mu\text{l}$ de PBS. El reactiu DualGlo permet la lisi de les cèl·lules i actua de substrat de la luciferasa provinent de la cuca de llum. La luminiscència de la luciferasa va ser mesurada en un lector Appliskan (Thermo Fisher Scientific). Seguidament es van afegir $50\mu\text{l}$ del reactiu Stop&Glo, el qual absorbeix la luminiscència de la luciferasa de la cuca de llum i actua de substrat de la Renilla. Finalment la luminiscència de la luciferasa Renilla va ser mesurada. La luciferasa provinent de la cuca de llum s'expressa de

forma constitutiva a les cèl·lules que s'han transfectat, fet que serveix com a control de la transfecció. D'aquesta manera, l'activitat luciferasa de la Renilla de cada condició va ser normalitzada amb l'activitat luciferasa de la cuca de llum de la mateixa condició. Els efectes dels diferents miRNAs sobre el 3'UTR de la *ITGA9* es van analitzar relativitzant el valor normalitzat de l'activitat luciferasa de la Renilla amb el valor obtingut amb el vector buit. Els gràfics dels assaigs luciferasa presentats corresponen a un únic experiment, representatiu de tres rèpliques experimentals.

3.12 Models animals

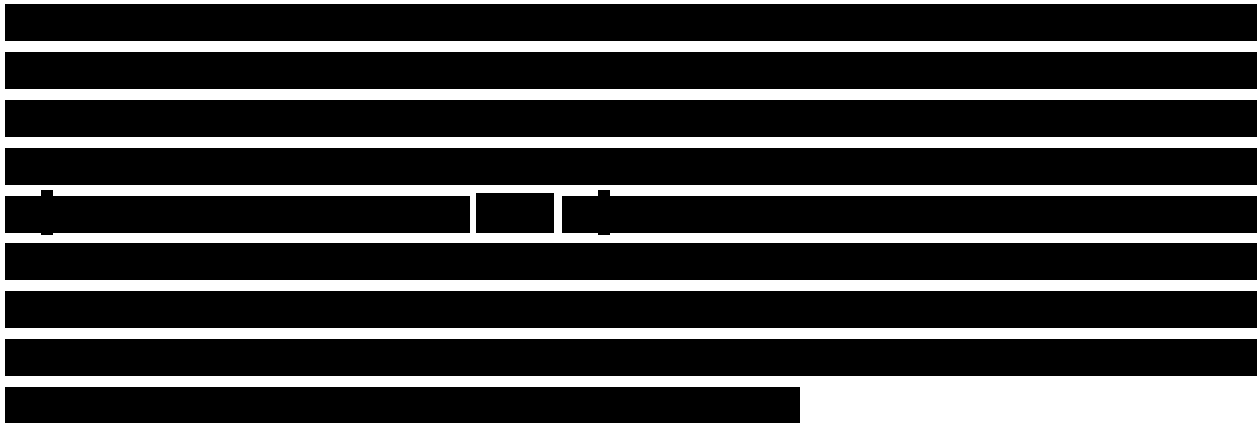
Pels models animals d'aquesta tesi doctoral es van utilitzar ratolins femelles de la soca SCID-Beige adquirits a les quatre setmanes d'edat a Charles River Laboratories. Els animals van ser estabulats a 22°C amb períodes de llum de dotze hores, amb dieta estàndard i aigua *ad libitum*. Es van estabular en condicions SPF (*specific pathogen free*, lliure de patògens específics). El protocol va ser prèviament aprovat pel Comitè d'Ètica d'Experimentació Animal del VHIR (CEEA 30/14).

Els ratolins immunodeprimits SCID-Beige (Fox Chase SCID Beige Mouse, nomenclatura CB17.Cg-Prkdc^{scid}Lyst^{bg}/Cr1) presenten les dues mutacions recessives autosòmiques SCID (Prkdc^{scid}) i beige (Lyst^{bg}). El gen *PRKDC* és un gen de reparació del DNA, i la seva disfunció provoca la falta de recombinació somàtica dels gens V(D)J de les immunoglobulines i els receptors TCR dels limfòcits T, fet que bloqueja la diferenciació dels limfòcits B i T. Els ratolins SCID presenten nivells molt baixos o nuls d'immunoglobulines en sèrum. L'absència de cèl·lules T i B madures explica la incapacitat d'aquests animals per generar una resposta immune, tant humoral com cel·lular. La mutació beige en el gen *LYST* resulta en una activitat reduïda de les cèl·lules NK.

Per a la generació del model de metàstasi, les cèl·lules tumorals van ser injectades a la vena de la cua dels ratolins SCID-Beige. El pes dels ratolins va ser controlat cada dos dies. Quan els ratolins presentaven una pèrdua del 20% del seu pes o bé les metàstasis formades resultaven visibles, els animals es van sacrificar per dislocació cervical i es van realitzar necròpsies per l'avaluació de les metàstasis formades. Es van recollir mostres d'aquestes, les quals es van parafinar i es van dur a terme talls histològics i tincions d'hematoxilina i eosina, per comprovar posteriorment a nivell microscòpic la presència de metàstasi.

Per observar l'efecte de la inhibició genètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ sobre la formació de metàstasi *in vivo*, es van infectar de manera estable cèl·lules de la línia cel·lular RD amb

vectors lentivirals codificant per l'shRNA contra aquesta proteïna (shRNA#1). Els ratolins es van dividir en dos grups, el primer va ser injectat amb 2×10^6 cèl·lules RD transduïdes amb el vector buit pGIPZ (n=5) i l'altre amb 2×10^6 cèl·lules RD amb la infraexpressió de la integrina $\alpha 9\beta 1$ (n=6). Les cèl·lules es van resuspendre amb PBS estèril i es van mantenir en gel fins al moment de ser injectades. El volum d'injecció era de $200 \mu\text{l}$ /ratolí. Els ratolins van ser prèviament anestesiats amb ketamina a la concentració de 100mg/kg, injectada intraperitonealment.



va representar l'evolució dels ratolins mitjançant l'*event-free survival* (EFS), és a dir, el temps que els ratolins es presenten lliures de metàstasi. Com a criteri general, es va determinar el temps lliure de metàstasi dues setmanes abans que el ratolí comencés a perdre pes de manera contínua o bé quan les metàstasis eren visibles. Es va descartar de l'estudi els ratolins la causa de mort dels quals era desconeguda.

3.13 Anàlisi estadístic

Els resultats mostrats representen la mitjana \pm SEM (*standard error of mean*, error estàndard de la mitjana). L'anàlisi estadística de les dades es va realitzar amb el programari *GraphPad Prism* (GraphPad Software Inc.). Els tests estadístics que es van realitzar van ser els següents:

- Prova de T de Student: prova d'hipòtesis que permet determinar si existeixen diferències significatives entre les mitjanes de dos grups de dades que segueixen una distribució normal.
- Test Log-rank: prova d'hipòtesis que permet determinar si existeixen diferències significatives entre dues corbes de supervivència.

- Test exacte de Fisher: prova de significació estadística que permet determinar si existeixen diferències significatives en les taules de contingència.
- Test *two-way ANOVA* (*analysis of variance*, anàlisi de la variància): prova de significació estadística que permet determinar si existeixen diferències significatives entre dos grups en diferents temps a l'espai.

En tots els casos es va acceptar els resultats significatius amb un p-valor <0.05 i es va mostrar la significança com: *p-valor <0.05 ; **p-valor <0.01 i ***p-valor <0.001 .

4 | Resultats

4.1 La integrina $\alpha 9\beta 1$ està expressada en línies cel·lulars i tumors de RMS i NBL

4.1.1 La integrina $\alpha 9\beta 1$ està expressada en línies cel·lulars i tumors de RMS

Es van analitzar els nivells d'mRNA i proteïna de la integrina $\alpha 9\beta 1$ de sis línies cel·lulars de RMS dels subtipus histològics més freqüents: alveolar amb translocació PAX3-FOXO1 (RH30 i RH4), alveolar amb translocació PAX7-FOXO1 (CW9019) i embrionari (RD, HTB-82 i RUCH2) (Figura 4.1). Els nivells d'expressió d'mRNA d'*ITGA9* de les línies alveolars era similar entre ells, i la línia CW9019 era la que presentava nivells superiors d'mRNA. En el cas del subtipus embrionari, les línies cel·lulars HTB-82 i RUCH2 van presentar una expressió similar a les línies alveolars. En canvi, la línia RD va mostrar el valor més elevat de $-\Delta Ct$ de totes les línies analitzades, i va ser la línia de RMS que més expressió d'mRNA presentava (Figura 4.1, A). Els nivells de proteïna del mateix panell de línies de RMS van confirmar la tendència obtinguda mitjançant l'anàlisi de l'mRNA: la línia cel·lular RD és la que presentava nivells més elevats d'integrina $\alpha 9\beta 1$, seguida per la línia CW9019 (Figura 4.1, B).

Es va dur a terme l'anàlisi de l'mRNA de la *ITGA9* de vint-i-tres tumors de pacients amb RMS (nou RMSa i catorze RMSe) amb el múscul com a teixit de referència (Figura 4.1, C). Més del 90% dels pacients van presentar una expressió mitjana superior a 1, fet que significa una expressió d'*ITGA9* superior respecte al teixit control. Els pacients amb RMSe van mostrar nivells d'integrina $\alpha 9\beta 1$ superiors als pacients amb RMSa, malgrat que la diferència no va ser significativa. També es van analitzar els nivells d'integrina $\alpha 9\beta 1$ per *Western blot* de vuit mostres de pacients amb RMS, quatre del subtipus alveolar i quatre del subtipus

embrionari. Set dels vuit pacients amb RMS van presentar l'expressió de la proteïna (Figura 4.1, D), i es van confirmar els resultats anteriors i, per tant, l'expressió de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en el RMS.

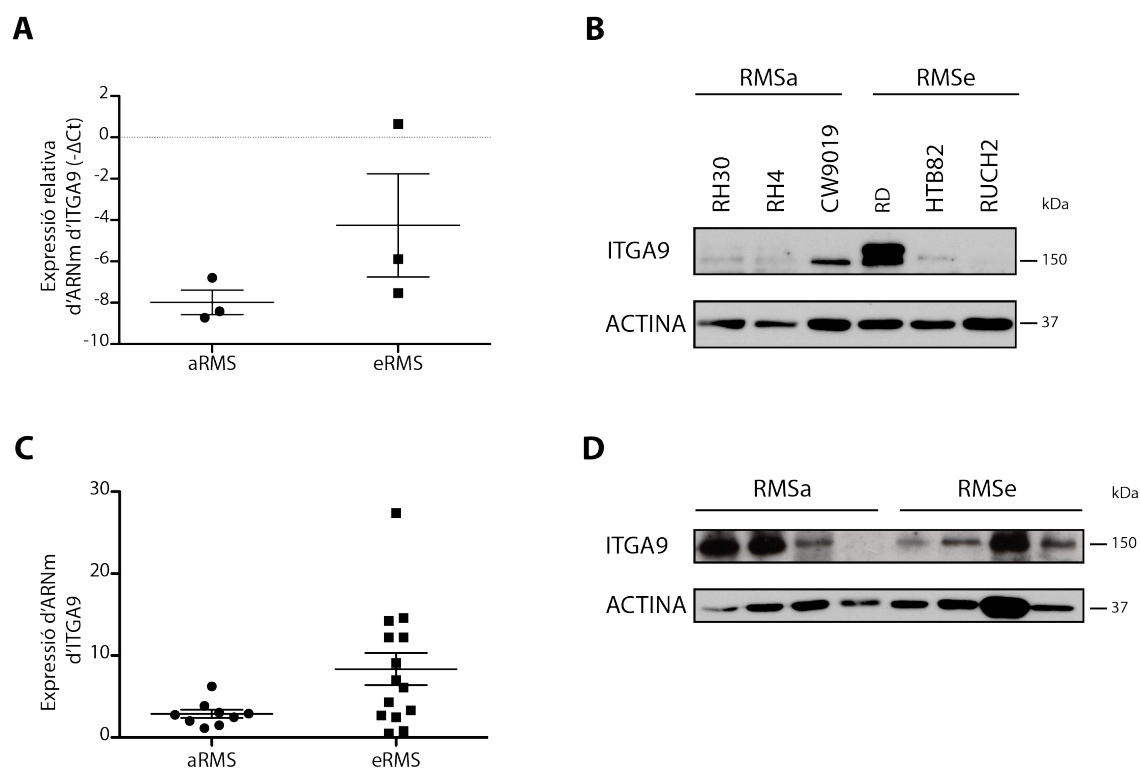


Figura 4.1. Expressió de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en línies cel·lulars i tumors de RMS. **A:** anàlisi dels nivells d'mRNA de la *ITGA9* de sis línies cel·lulars de RMS (RH30, RH4, CW9019, RD, HTB-82 i RUCH2) mitjançant RT-qPCR, dividides en funció del subtipus histològic (RMSa: alveolar; RMSe: embrionari). Els valors s'expressen en $-\Delta Ct$ i les línies horitzontals representen la mitjana dels valors obtinguts amb la seva SEM respectiva. **B:** imatges de *Western blot* on es mostren els nivells de la integrina $\alpha 9\beta 1$ (*ITGA9*) de les mateixes línies cel·lulars de RMS. L'actina es va utilitzar com a control de càrrega. **C:** RT-qPCR d'expressió de la *ITGA9* en tumors de pacients amb RMS (nou RMSa i catorze RMSe). Els valors van ser normalitzats respecte a l'expressió d'mRNA de la *ITGA9* del teixit de referència (múscul). Les línies horitzontals representen la mitjana dels valors obtinguts amb la seva SEM respectiva. **D:** imatges de *Western blot* que mostren els nivells de la integrina $\alpha 9\beta 1$ (*ITGA9*) de vuit tumors de RMS (quatre RMSa i quatre RMSe). L'actina es va utilitzar com a control de càrrega.

4.1.2 La integrina $\alpha 9\beta 1$ està expressada en línies cel·lulars de NBL

Es van analitzar els nivells d'mRNA i proteïna de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en cinc línies cel·lulars de NBL, totes elles pertanyents a l'estadi 4 de la malaltia. Referent als nivells d'expressió d'mRNA de la *ITGA9*, la línia cel·lular BE(2)-C era la que presentava els nivells més elevats, i la línia SK-N-BE(2) era la línia que mostrava menor expressió. En conjunt, les línies de NBL van presentar valors de $-\Delta Ct$ més elevats que les línies cel·lulars de RMS analitzades (Figura 4.2, A). Els resultats obtinguts mitjançant RT-qPCR es van confirmar per *Western blot*, totes les línies de NBL analitzades van presentar nivells elevats d'integrina $\alpha 9\beta 1$, i va ser la línia cel·lular BE(2)-C la que més expressió presentava, seguida per les línies CHLA-90 i SH-SY5Y, i finalment la que menor expressió mostrava era la SK-N-BE(2) (Figura 4.2, B).

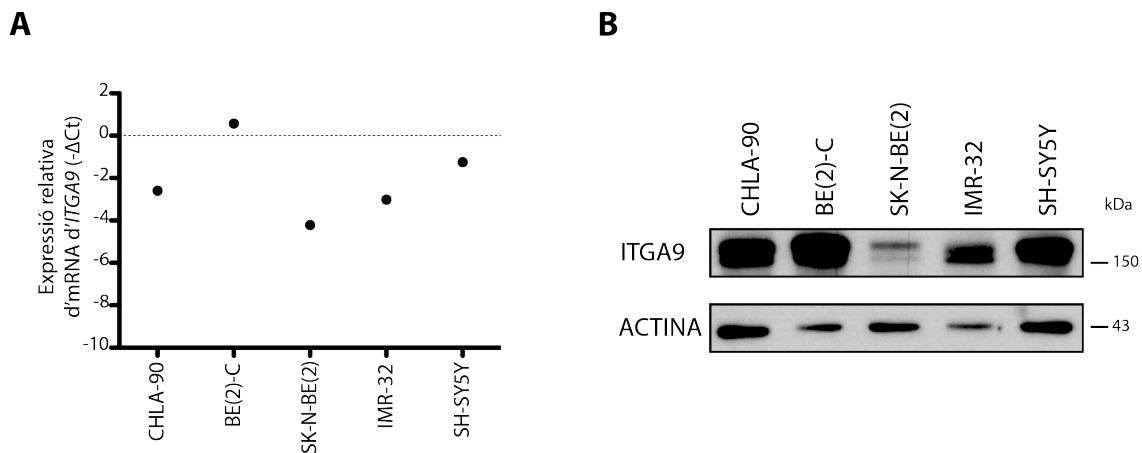


Figura 4.2. Expressió de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en línies cel·lulars de NBL. **A:** anàlisi dels nivells d'mRNA de la *ITGA9* de cinc línies cel·lulars de NBL (CHLA-90, BE(2)-C, SK-N-BE(2), IMR-32 i SH-SY5Y) mitjançant RT-qPCR, totes elles corresponents a l'estadi 4 de la malaltia. Els valors s'expressen en $-\Delta Ct$. **B:** imatges de *Western blot* de l'expressió de la integrina $\alpha 9\beta 1$ (ITGA9) de les cinc línies cel·lulars de NBL esmentades. L'actina es va utilitzar com a control de càrrega.

4.2 La infraregulació genètica de la integrina $\alpha9\beta1$ disminueix el creixement cel·lular

Es va dur a terme la generació de quatre línies cel·lulars amb l'expressió estable de l'shRNA contra la integrina $\alpha9\beta1$ mitjançant la transducció vírica de l'shRNA clonat en el vector lentiviral pGIPZ. Els quatre clons (shRNA#1, shRNA#2, shRNA#3 i shRNA#4) es van generar en la línia de RMS embrionària RD i es van analitzar els nivells d'expressió d'mRNA i proteïna de la integrina $\alpha9\beta1$ per tal de determinar quins clons eren capaços d'infraregular l'expressió de la proteïna (Figura 4.3). L'anàlisi d'mRNA de la *ITGA9* dels clons va indicar la disminució significativa respecte a la línia RD infectada amb el vector buit en tots els shRNA utilitzats (Figura 4.3, A), i va ser l'shRNA#1 i l'shRNA#2 els que van presentar una reducció més important en l'expressió d'mRNA de la *ITGA9*. La disminució de la integrina $\alpha9\beta1$ en els clons es va observar també per *Western blot*, concordant amb els resultats de la RT-qPCR (Figura 4.3, B). Tot i que l'shRNA#4 també va mostrar una forta inhibició a nivell de proteïna, es van seleccionar l'shRNA#1 i l'shRNA#2 per assaigs posteriors, ja que inhibien eficientment l'expressió de la integrina $\alpha9\beta1$, tant a nivell d'mRNA com de proteïna.

El paper de la infraexpressió de la integrina $\alpha9\beta1$ *in vitro* es va analitzar utilitzant les línies cel·lulars de RMS RD i RH30 i les línies de NBL BE(2)-C i CHLA-90. Les línies cel·lulars RD i BE(2)-C són les que presenten els nivells més elevats d'integrina $\alpha9\beta1$, la línia CHLA-90 presenta nivells moderats i la línia RH30 expressa nivells molt baixos, fet pel qual es va utilitzar com a control negatiu dels experiments. Amb tal objectiu, es van generar línies amb l'expressió estable dels shRNAs seleccionats anteriorment en les línies RD, BE(2)-C, CHLA-90 i RH30 i es va comprovar la inhibició de la integrina $\alpha9\beta1$ mitjançant *Western blot* (Figura 4.3, C). Ambdós shRNA inhibien l'expressió de la integrina $\alpha9\beta1$ en les línies RD, BE(2)-C, CHLA-90 i RH30.

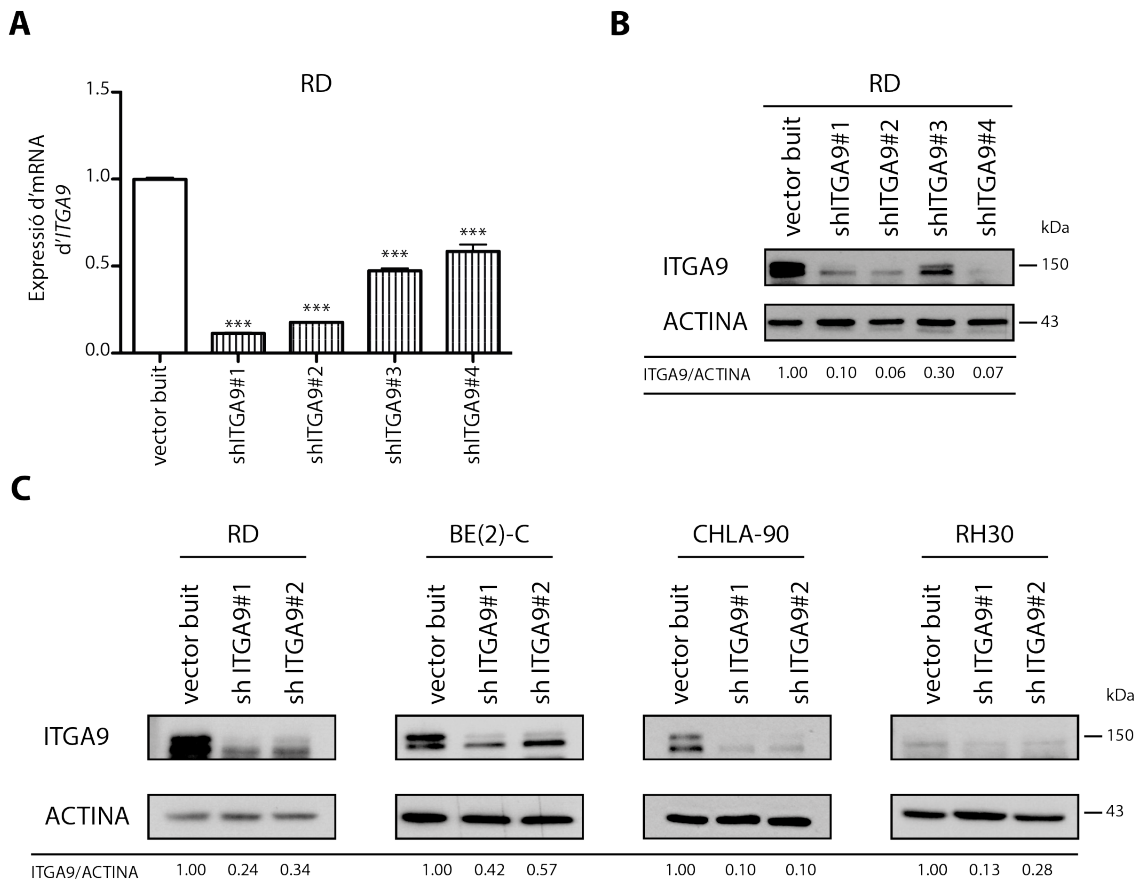


Figura 4.3. Avaluació de la inhibició genètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en les línies RD, BE(2)-C, CHLA-90 i RH30. **A:** anàlisi de l'mRNA de la *ITGA9* mitjançant RT-qPCR dels quatre clons amb expressió estable de l'shRNA comparat amb la infecció del vector buit en la línia RD. Els resultats representen la mitjana \pm SEM de tres mesures independents. Significació estadística: *** $p < 0.001$. **B:** imatges de *Western blot* de la integrina $\alpha 9\beta 1$ (ITGA9) dels quatre clons deficientes per la integrina $\alpha 9\beta 1$ en la línia RD i el seu control, la mateixa línia infectada amb el vector buit. L'actina es va utilitzar com a control de càrrega. La quantificació dels nivells de proteïna de cada clon expressant l'shRNA es va comparar respecte al clon transduït amb el vector buit. **C:** imatges de *Western blot* on es mostren els nivells de la integrina $\alpha 9\beta 1$ (ITGA9) en els clons estables obtinguts mitjançant la transducció lentiviral dels shRNA#1 i shRNA#2 en les línies RD, BE(2)-C, CHLA-90 i RH30, respectivament. L'actina es va utilitzar com a control de càrrega. La quantificació de la integrina $\alpha 9\beta 1$ de cada línia cel·lular expressant l'shRNA es va comparar respecte al seu control (la mateixa línia cel·lular transduïda amb el vector buit).

Per tal d'avaluar el paper de la infraregulació genètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en el creixement cel·lular de les línies cel·lulars de RMS i NBL, es van dur a terme assaigs de creixement cel·lular *in vitro*. Es van sembrar a baixa densitat cel·lular la mateixa quantitat de cèl·lules per cada condició, i al cap de 5 dies postsembrada es van comptar les cèl·lules presents. Es va avaluar el paper de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en el creixement cel·lular mitjançant la seva infraregulació genètica en les línies cel·lulars RD, BE(2)-C, CHLA-90 i RH30 (Figura 4.4). Es va observar una disminució significativa del creixement en les cèl·lules que expressaven els dos shRNAs

en la línia RD respecte a les cèl·lules control (Figura 4.4, A). En canvi, en les línies BE(2)-C i CHLA-90 la disminució del creixement observada era menor, i va ser significativa respecte al vector buit només en el cas de les cèl·lules amb l'expressió de l'shRNA#1 (Figura 4.4, B, C). En el cas de la línia RH30, les línies cel·lulars infectades amb els dos shRNAs no van tenir cap efecte en el creixement cel·lular comparat amb el creixement de les cèl·lules expressant el vector buit (Figura 4.4, D).

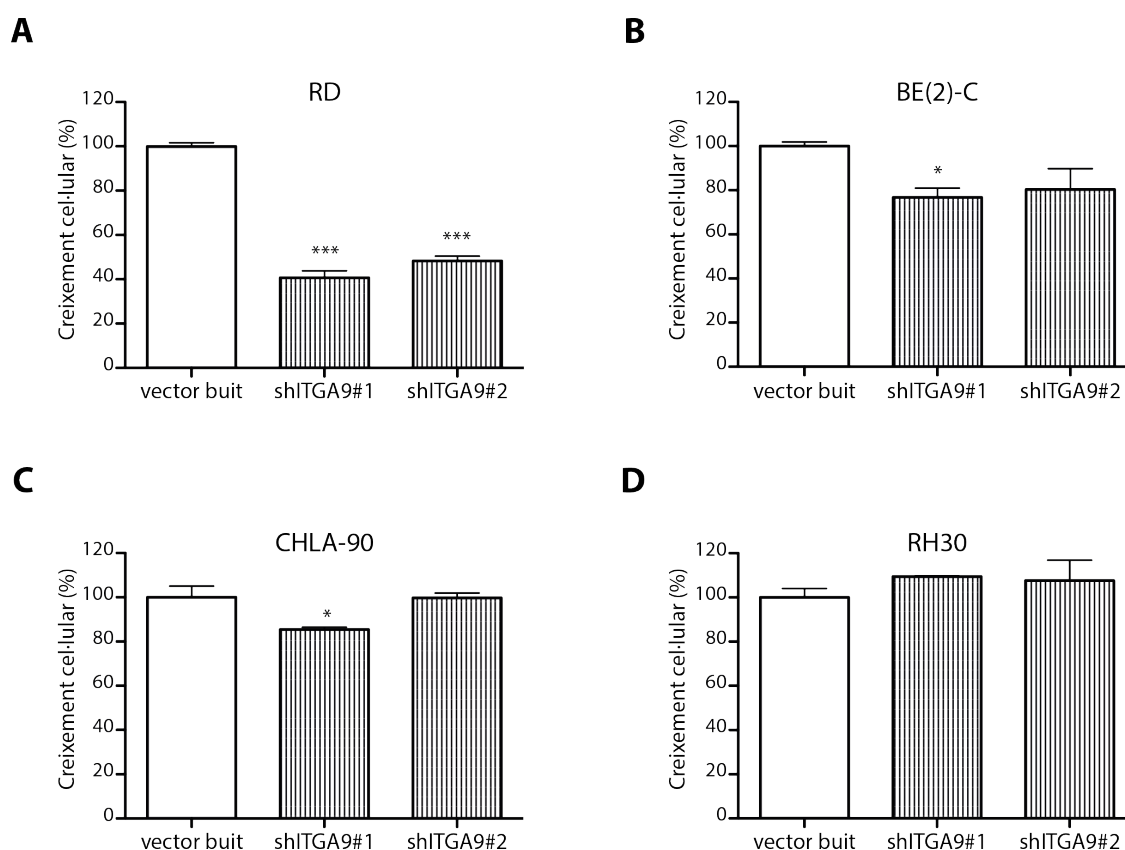
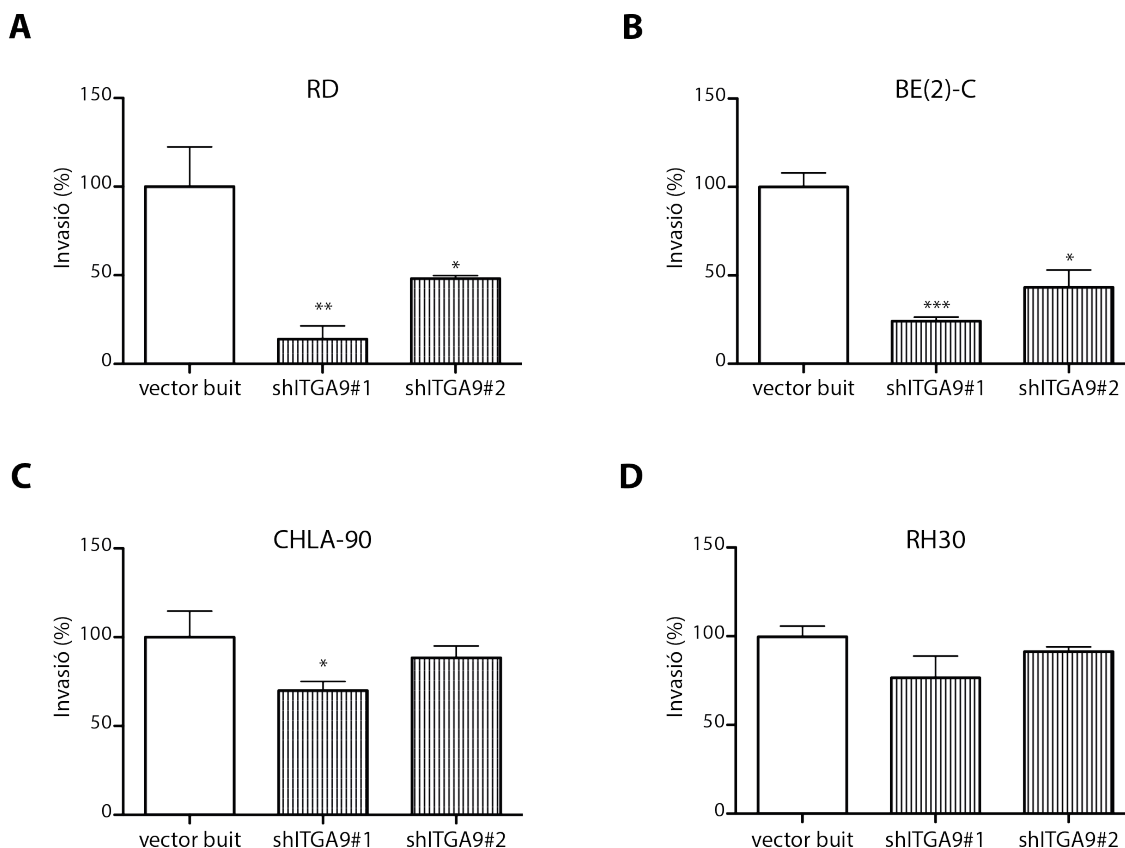


Figura 4.4. Efectes de la infraregulació genètica de la integrina $\alpha9\beta1$ en el creixement cel·lular. A-D: les cèl·lules amb infraregulació de la integrina $\alpha9\beta1$ es van sembrar a la mateixa concentració i van ser comptades 5 dies postincubació. Les línies cel·lulars utilitzades van ser RD, BE(2)-C, CHLA-90 i RH30, respectivament. Els resultats van ser referits als seus controls (cèl·lules transduïdes amb el vector buit) i es representa la mitjana \pm SEM de tres assaigs independents. Significació estadística: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

4.3 La infraregulació genètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ disminueix la invasió cel·lular

Treballs anteriors del nostre grup d'investigació van suggerir el paper clau de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en la invasió cel·lular en les cèl·lules de RMS [139]. Per determinar la implicació de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en la invasió cel·lular es van dur a terme assaigs *Transwell* en les línies deficientes per la proteïna (Figura 4.5). En les línies amb alta expressió de la integrina $\alpha 9\beta 1$ es va observar una reducció significativa del 87% i 76% de la invasió en el cas de les línies amb l'expressió de l'shRNA#1 i del 52% i 57% en les línies amb l'expressió de l'shRNA#2 en les línies RD i BE(2)-C, respectivament (Figura 4.5, A, B). En el cas de la línia CHLA-90, la qual presenta nivells moderats d'integrina $\alpha 9\beta 1$, només es va observar una reducció significativa del 30% de la invasió en la línia amb l'expressió estable de l'shRNA#1 respecte al control (Figura 4.5, C). Tal com era d'esperar, no es van observar diferències significatives en la invasió de les línies transfectades amb els shRNAs en la línia RH30 (Figura 4.5, D). Aquests resultats indiquen la importància de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en el procés invasiu cel·lular.



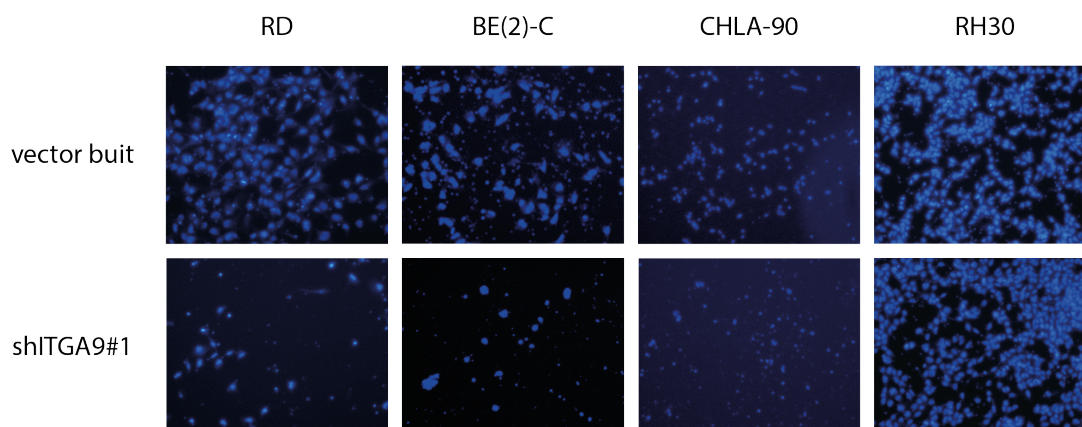
E

Figura 4.5. Efectes de la infraregulació genètica de la integrina $\alpha9\beta1$ en la invasió cel·lular. **A-D:** es van dur a terme assaigs *Transwell* amb les línies deficientes per la integrina $\alpha9\beta1$ per tal d'avaluar el paper d'aquesta en la invasió cel·lular. Les línies analitzades van ser RD, BE(2)-C, CHLA-90 i RH30, respectivament. Els resultats van ser referits als seus controls (cèl·lules transduïdes amb el vector buit) i es representa la mitjana \pm SEM de tres assaigs independents. Significació estadística: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. **E:** fotografies dels assaigs *Transwell* de les diferents línies cel·lulars utilitzades. Es mostra un camp representatiu de la superfície inferior de les membranes *Transwell*, on les cèl·lules que van travessar els porus de la membrana i es van dipositar a la superfície inferior d'aquesta van ser tenyides amb Hoechst 33342 i comptades.

4.4 La reducció de la capacitat proliferativa i invasiva de les cèl·lules de RMS i NBL després de la infraregulació de la integrina $\alpha9\beta1$ podria ser mediada per una disminució en la fosforilació de FAK

FAK és una de les primeres proteïnes intracel·lulars que pateix un canvi conformacional després de l'activació de les integrines, on el primer pas per a la seva activació és l'autofosforilació a la tirosina 397. Amb l'objectiu d'estudiar la senyalització intracel·lular mediada per la disminució de la integrina $\alpha9\beta1$, es van analitzar mitjançant *Western blot* els nivells totals de la proteïna FAK i la seva forma fosforilada en les línies deficientes per la integrina $\alpha9\beta1$ (Figura 4.6). Els nivells d'expressió de la proteïna FAK no van variar en cap de les línies amb la infraregulació de l' $\alpha9\beta1$ respecte als seus controls, mentre sí que es reduïen els nivells de la seva forma fosforilada en totes les línies cel·lulars amb la infraregulació genètica de la integrina $\alpha9\beta1$ en comparació amb la línia control transduïda amb el vector buit. Així doncs, la infraregulació genètica de l' $\alpha9\beta1$ no feia variar els nivells

4.4. La reducció de la capacitat proliferativa i invasiva de les cèl·lules de RMS i NBL després de la infraregulació de la integrina $\alpha 9\beta 1$ podria ser mediada per una disminució en la fosforilació de FAK

cel·lulars de FAK però sí que va provocar la disminució dels nivells de FAK activat, tal com es pot observar en la reducció de la ràtio p-FAK/FAK, la qual cosa suggereix que l'activació intracel·lular de la integrina $\alpha 9\beta 1$ és mediada per la fosforilació de FAK en la tirosina 397.

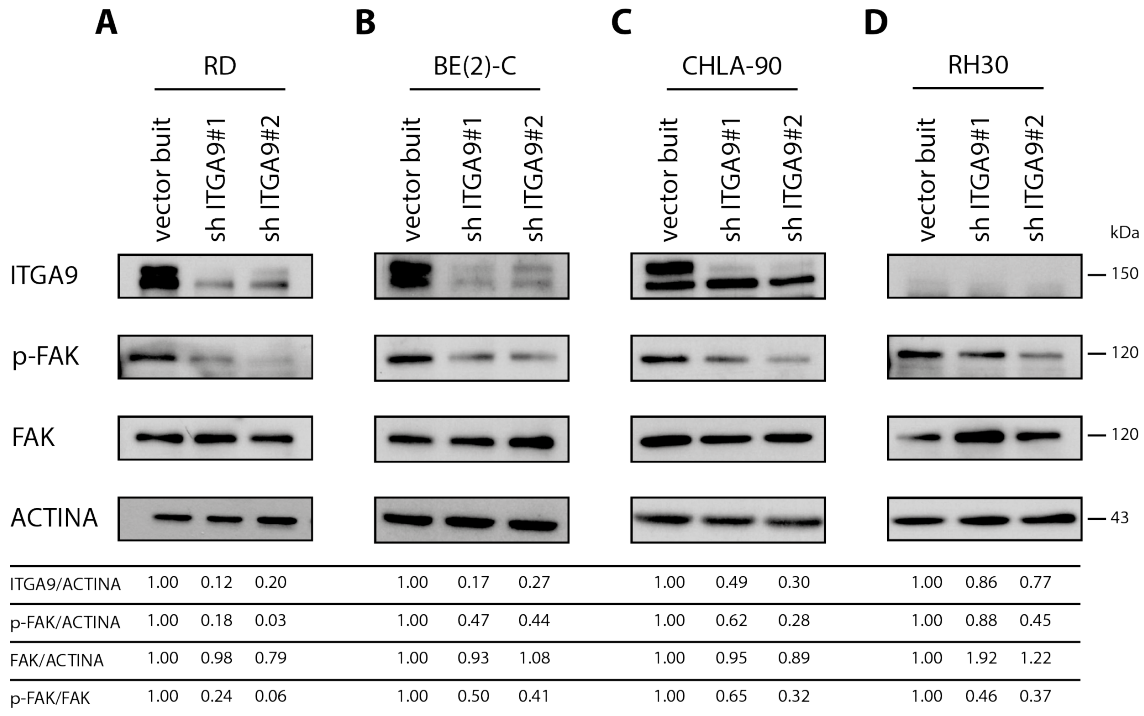


Figura 4.6. La infraregulació genètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ disminueix els nivells de fosforilació de FAK mantenint els nivells de FAK total. A-D: imatges de *Western blot* de les línies RD, BE(2)-C, CHLA-90 i RH30 amb la inhibició genètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ on es mostren els nivells de proteïna de la integrina $\alpha 9\beta 1$ (ITGA9), la forma fosforilada de FAK a la tirosina 397 (p-FAK) i FAK total. Es va utilitzar l'actina com a control de càrrega. La quantificació dels nivells de proteïna de cada línia cel·lular amb la infraregulació genètica mitjançant els shRNAs es va comparar respecte al seu control (la mateixa línia cel·lular transduïda amb el vector buit).

4.5 La infraregulació mitjançant miRNAs de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en línies de RMS reproduceix els efectes observats amb la seva inhibició genètica

4.5.1 El miR-7 i el miR-324 són els candidats seleccionats per la infraregulació epigenètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$

Els microRNAs (miRNAs) són molècules petites d'ARN (22 nucleòtids) no codificants que tenen la capacitat de regular l'expressió gènica mitjançant la complementarietat de bases amb l'mRNA del gen diana. D'aquesta manera, els miRNAs esdevenen un mecanisme de regulació epigenètica i una possible eina terapèutica. Donat que no existia fins al moment cap estudi publicat sobre quins miRNAs regulaven la integrina $\alpha 9\beta 1$, es va decidir dur a terme un *screening* dels potencials miRNAs reguladors de l' $\alpha 9\beta 1$ basat en tres algoritmes independents (PicTar, TargetScan i miRanda). Es van transfectar transitòriament els tretze miRNAs candidats en les dues línies cel·lulars de RMS que mostraven més expressió de la integrina $\alpha 9\beta 1$: RD i CW9019. Ambdues línies van ser infectades també amb dos mímic de miRNAs els quals no tenen cap efecte en cèl·lules animals, i es van utilitzar com a controls negatius (C-1 i C-2). Passades 72h, es van analitzar els nivells d'expressió de l' $\alpha 9\beta 1$ a nivell d'mRNA i proteïna (Figura 4.7). L'expressió d'*ITGA9* a nivell d'mRNA en la línia RD va disminuir significativament respecte al mímic control negatiu 1 (C-1) en tots els miRNAs analitzats, llevat del miR-296 que l'augmentava significativament (Figura 4.7, A). Per contra, en la línia CW9019 els nivells d'mRNA de la *ITGA9* van augmentar significativament respecte al C-1 en set miRNAs (miR-296, miR-340, miR-410, miR-431, miR-125, miR-134 i miR-194), van disminuir en dos dels miRNAs transfectats (miR-324 i miR-203), i no es van veure afectats en quatre miRNAs (miR-7, miR-132, miR-148 i miR-212) (Figura 4.7, B). Amb referència als nivells de proteïna, en les cèl·lules transfectades amb cada miRNA es va observar una disminució de la integrina $\alpha 9\beta 1$ superior al 50% amb el miR-324, miR-7 i miR-194 en la línia RD i amb el miR-296, miR-324, miR-7, miR-125, miR-132, miR-134 en la línia CW9019 (Figura 4.7, C). Conseqüentment, es van escollir el miR-7 i el miR-324 com a candidats per a posteriors experiments, donat que eren els miRNAs que disminuïen els nivells de la integrina $\alpha 9\beta 1$ a nivell de proteïna en les dues línies cel·lulars utilitzades.

4.5. La infraregulació mitjançant miRNAs de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en línies de RMS reproduceix els efectes observats amb la seva inhibició genètica

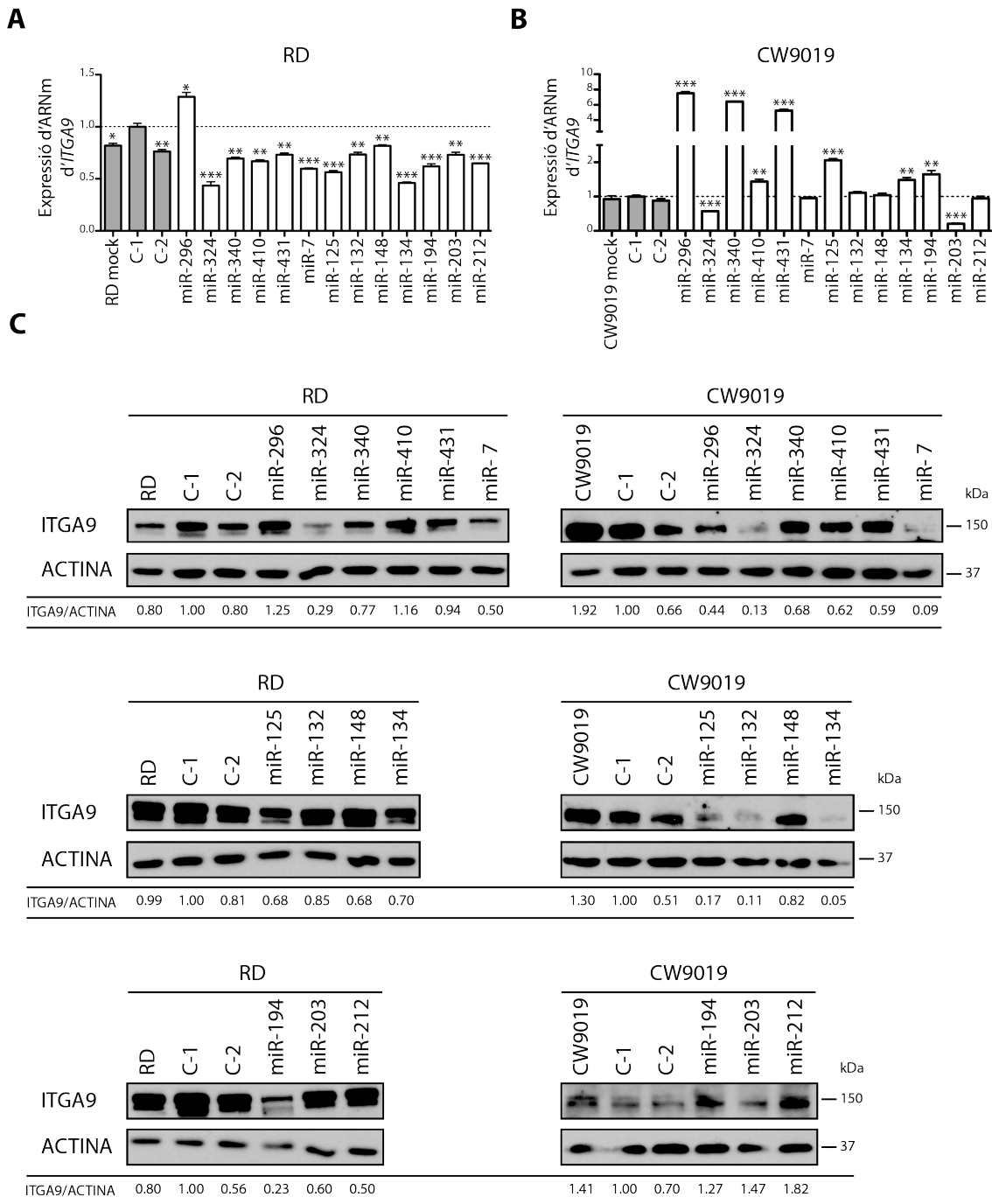


Figura 4.7. Selecció dels miRNA que regulen la integrina $\alpha 9\beta 1$. **A, B:** RT-qPCR d'expressió de la *ITGA9* de les cèl·lules transfectades amb els potencials miRNAs reguladors de l' $\alpha 9\beta 1$ després de 72h en les línies cel·lulars de RMS RD i CW9019, respectivament. Els valors es van normalitzar respecte a l'expressió d'mRNA de la *ITGA9* de les cèl·lules de cada línia, transfectades amb el mimic control negatiu 1 (C-1). Significació estadística: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. **C:** imatges de Western blot de l'expressió de la integrina $\alpha 9\beta 1$ (*ITGA9*) després de 72h de la transfecció amb els miRNAs en les línies cel·lulars de RMS RD i CW9019. L'actina va ser utilitzada com a control de càrrega. La quantificació dels nivells de l' $\alpha 9\beta 1$ en cada transfecció es va comparar respecte als nivells d' $\alpha 9\beta 1$ de la línia cel·lular corresponent transfectada amb el C-1.

4.5.2 El miR-7 i el miR-324 són dianes directes de la integrina $\alpha 9\beta 1$

Per tal de determinar si els miRNAs seleccionats eren dianes directes de la integrina $\alpha 9\beta 1$, en primer lloc es va amplificar un fragment de 490pb del 3'UTR de la *ITGA9* per PCR convencional a partir del DNA genòmic de la línia cel·lular RD. El fragment es va clonar a continuació del gen *Rluc* codificant per la luciferasa Renilla en el vector comercial psiCHECK2. Finalment, es va dur a terme l'assaig luciferasa cotransfectant el nou vector psi-CHECK2-3'UTRITGA9 juntament amb el miR-7, el miR-324 o el mímic control C-1 en cèl·lules HEK293T (Figura 4.8). En el cas de la cotransfecció dels dos miRNAs en el vector *wild type*, no es van observar diferències respecte a l'activitat luciferasa del C-1. Contràriament, sí que es va observar una reducció significativa de l'activitat luciferasa després de la transfecció d'ambdós miRNAs en el vector psi-CHECK2-3'UTRITGA9 respecte a l'activitat del C-1, fet que indica una modulació directa del transcrit de la *ITGA9* pel miR-7 i pel miR-324 (Figura 4.8, A).

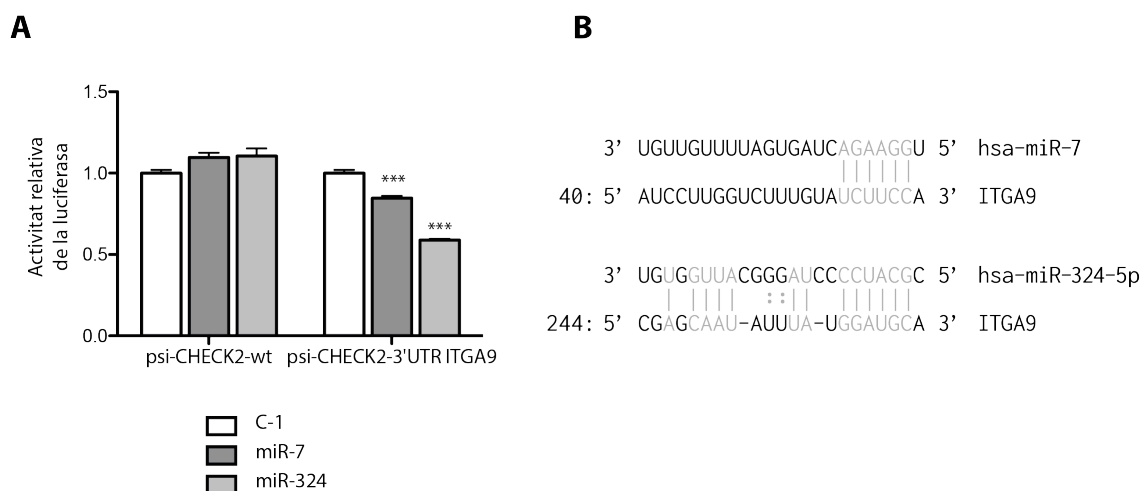


Figura 4.8. El miR-7 i el miR-324 s'uneixen directament al 3'UTR de la *ITGA9*. Es va cotransfectar el vector indicat (psi-CHECK2-wt o psi-CHECK2-3'UTRITGA9) i el miR-7, el miR-324 o el C-1 en cèl·lules HEK293T. 24h després de la transfecció, es va dur a terme l'assaig luciferasa (**A**). Els resultats es representen com la mitjana \pm SEM de tres assaigs independents. L'activitat luciferasa presentada per cada miRNA es relativitza a l'activitat luciferasa presentada pel C-1 en cadascun dels vectors utilitzats. Significació estadística: *** $p < 0.001$. **B**: representació del lloc d'unió del miR-7 i del miR-324 en el transcrit del gen de la *ITGA9*. Els números corresponen a la posició de les bases del transcrit de l'*ITGA9*. La regió on es dona la complementarietat de bases (*seeding region*) es mostra en gris.

4.5.3 El miR-7 i el miR-324 disminueixen la fosforilació de FAK

Per confirmar l'eficiència de la transfecció, es van analitzar mitjançant RT-qPCR els nivells dels miRNAs després de la transfecció en les línies cel·lulars RD i CW9019 mitjançant una

sonda específica per cadascun d'ells. La transfecció transitòria del miR-7 o del miR-324 va provocar un augment dels nivells endògens dels miRNAs transfectats en les línies cel·lulars RD i CW9019 (Figura 4.9, A), fet que suggereix que els possibles efectes fenotípics i canvis intracel·lulars seran causats per l'acció de tals miRNAs.

Sabent que tant el miR-7 com el miR-324 s'uneixen al 3'UTR de la *ITGA9* i causen una disminució dels nivells de proteïna, i amb el coneixement previ de l'efecte de la infraregulació genètica de la *ITGA9*, es van estudiar els nivells de proteïna FAK i de la seva forma fosforilada en les cèl·lules transfectades amb els dos miRNAs. La transfecció del miR-7 va provocar una reducció dels nivells de p-FAK en ambdues línies cel·lulars i, tot i que també es va observar una disminució de l'expressió de FAK total, va ser superior la reducció de la forma fosforilada d'aquesta. En canvi, la transfecció amb el miR-324 va causar una reducció dels nivells de la fosforilació de FAK en la tirosina 397 no modulant la quantitat de FAK total present en les línies RD i CW9019 (Figura 4.9, B).

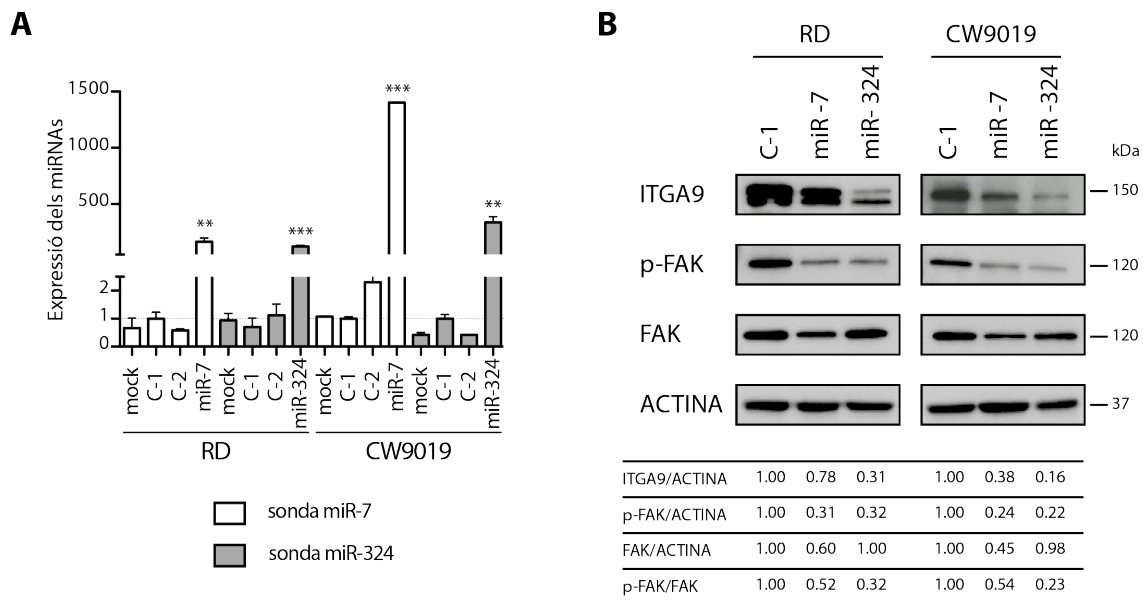


Figura 4.9. Canvis intracel·lulars després de la transfecció amb el miR-7 i el miR-324. A: RT-qPCR d'expressió del miR-7 i miR-324 de les línies RD i CW9019 72h posttransfecció amb el C-1, miR-7 o miR-324. Els valors es van normalitzar respecte a l'expressió de miR-7 o miR-324 de les cèl·lules transfectades amb el C-1, i els resultats es van representar com la mitjana \pm SEM de tres assaigs independents. Significació estadística: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. **B:** imatges de Western blot de l'expressió de la integrina $\alpha 9\beta 1$ (ITGA9), la forma fosforilada de FAK en la tirosina 397 (p-FAK) i FAK de les línies RD i CW9019 després de la transfecció amb el C-1, miR-7 o miR-324. Es va utilitzar l'actina com a control de càrrega. La quantificació dels nivells de cada proteïna es va comparar respecte als nivells d'aquesta presentada per la línia cel·lular corresponent transfectada amb el C-1.

4.5.4 El miR-7 i el miR-324 causen una reducció en el creixement i la invasió *in vitro*

Es va avaluar la capacitat de creixement i invasió de les cèl·lules de RMS després de la transfecció amb el miR-7 o el miR-324 (Figura 4.10). La transfecció amb el miR-7 va resultar en un efecte inhibitori significatiu del creixement cel·lular tant en la línia RD (Figura 4.10, A) com en la línia CW9019 (Figura 4.10, B). En canvi, el miR-324 va ser més efectiu en la inhibició del creixement de la línia RD que el miR-7 (Figura 4.10, A) però sense causar cap efecte en el creixement cel·lular de la línia CW9019 (Figura 4.10, B). En l'avaluació dels canvis en la invasió cel·lular després de la transfecció amb els miRNAs, el miR-7 va mostrar efectes antiinvasius significatius en ambdues línies cel·lulars (Figura 4.10, C, D), mentre que altra vegada el miR-324 va presentar un percentatge major d'inhibició de la invasió que el miR-7 en la línia RD (Figura 4.10, C), sense mostrar cap efecte en la línia CW9019 (Figura 4.10, D).

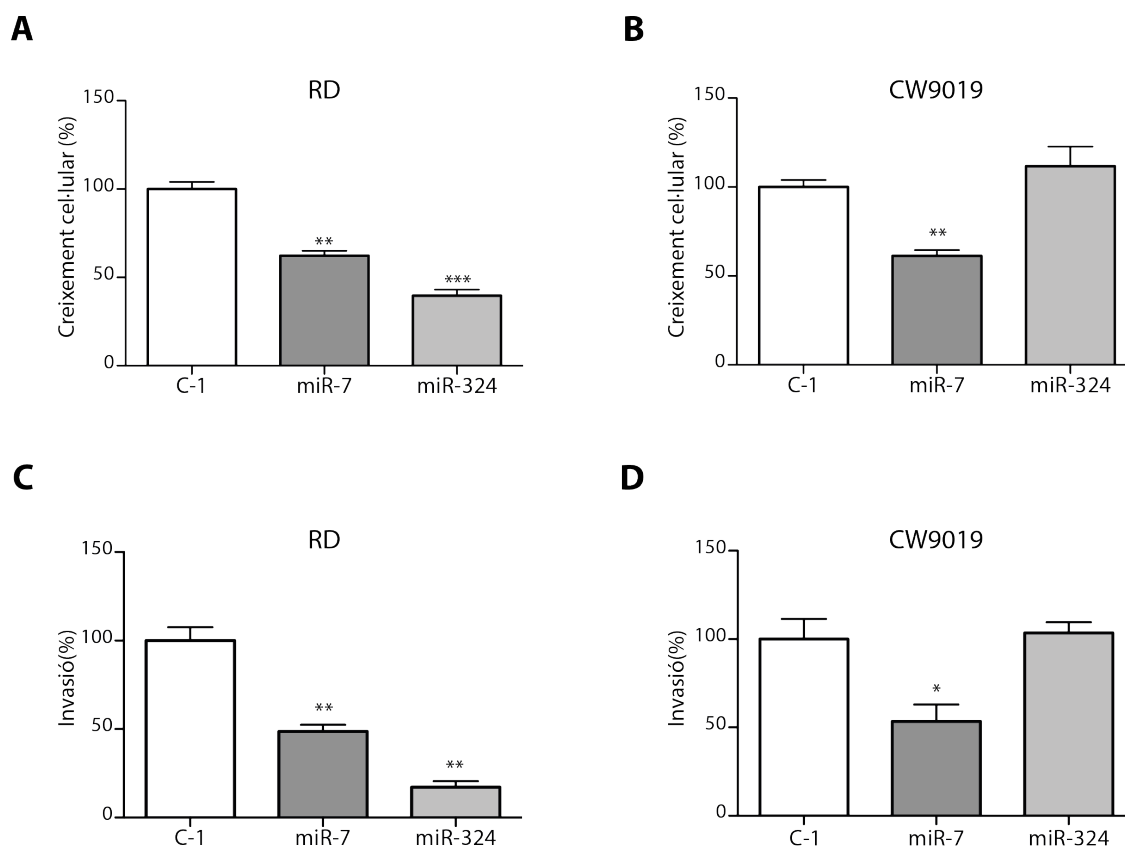


Figura 4.10. Efectes de la infraregulació epigenètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ sobre el creixement i la invasió cel·lular. A, B: assaigs de creixement cel·lular. Les cèl·lules transfectades amb el C-1, miR-7 o miR-324 es van sembrar a la mateixa concentració i van ser comptades 5 dies postincubació. Les línies cel·lulars utilitzades van ser RD i CW9019, respectivament. Els resultats van ser referits a les cèl·lules transfectades amb el C-1 i es va representar la mitjana \pm SEM de tres assaigs independents. Significació estadística: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. **C, D:** assaigs d'invasió. Es van dur a terme assaigs *Transwell* amb les cèl·lules transfectades amb el C-1, miR-7 o miR-324 en les línies cel·lulars RD i CW9019, respectivament. El gràfic mostra els resultats obtinguts de tres assaigs independents, i es representa la mitjana \pm SEM d'aquests. Es va utilitzar les cèl·lules de la mateixa línia cel·lular transfectada amb el C-1 com a control. Significació estadística: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

4.6 La infraregulació genètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ disminueix la invasió *in vivo*

Comparant els resultats dels experiments de creixement i invasió *in vitro* amb la inhibició genètica i epigenètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$, es va observar que la integrina $\alpha 9\beta 1$ presentava un paper més rellevant i consistent entre les diferents línies analitzades en la invasió cel·lular. Conseqüentment, es va decidir confirmar l'efecte antiinvasiu de la integrina $\alpha 9\beta 1$ *in vivo*. Es van injectar 2×10^6 cèl·lules de la línia RD amb la infraregulació genètica de l' $\alpha 9\beta 1$ (shITGA9#1) a la vena de la cua de ratolins SCID-Beige. Es van estudiar les metàstasis formades en els ratolins amb les cèl·lules deficientes d'integrina, i el grup control eren els ratolins injectats amb el mateix nombre de cèl·lules RD transduïdes amb el vector buit.

El pes corporal dels ratolins va ser controlat al llarg de l'experiment, i no es van observar diferències significatives entre els dos grups d'estudi (Figura 4.11, A). Els ratolins injectats amb les cèl·lules de RMS amb el silenciament genètic de la integrina $\alpha 9\beta 1$ van presentar un retard en la formació de metàstasi. A més, un menor nombre de ratolins injectats amb les cèl·lules amb la inhibició genètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ van desenvolupar metàstasi, exhibint diferències significatives respecte al grup control ($p = 0.0487$) (Figura 4.11, B). Respecte al desenvolupament i quantitat de metàstasis comptabilitzades al moment del sacrifici, quatre dels cinc ratolins (80%) van desenvolupar metàstasi en el grup control, dos dels quals van presentar una metàstasi i els dos ratolins restants en van formar dues. En canvi, tres dels sis ratolins (50%) van presentar metàstasi en el grup amb la inhibició de la integrina $\alpha 9\beta 1$ i aquests ratolins van formar només una única metàstasi, malgrat que la diferència no va ser significativa (Figura 4.11, C).

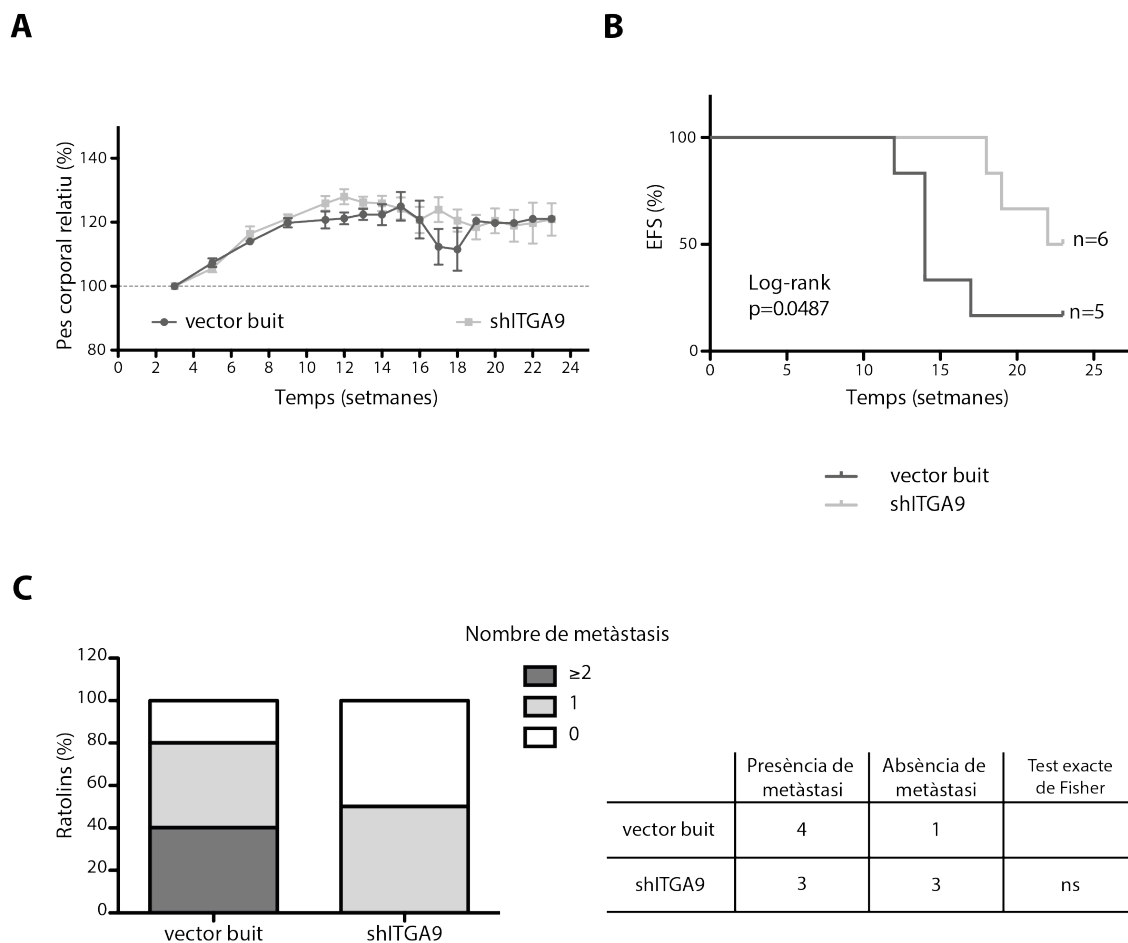


Figura 4.11. La inhibició genètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ provoca una disminució de la formació de metàstasi *in vivo*. **A:** pes corporal relatiu dels ratolins amb el silenciament genètic de la integrina $\alpha 9\beta 1$ i els ratolins control al llarg de l'experiment. Cada punt del gràfic representa la mitjana \pm SEM dels pesos dels ratolins presents en el mateix grup en el temps indicat. **B:** *Event-free survival* (EFS, supervivència lliure d'esdeveniments) del model murí genètic de metàstasi on es mostra la supervivència lliure de metàstasi dels ratolins amb la injecció a la vena de la cua de cèl·lules RD amb la infraregulació de la integrina $\alpha 9\beta 1$ (shITGA9#1) i la supervivència del grup control (injectat amb cèl·lules transduïdes amb el vector buit). **C:** representació gràfica del percentatge de ratolins amb presència o absència de metàstasi dels dos grups indicats i el nombre de metàstasi identificades en el moment de sacrifici. ns= no significat.

4.7 Els pacients amb RMS que expressen la integrina $\alpha 9\beta 1$ tendeixen a una menor supervivència

La presència de la integrina $\alpha 9\beta 1$ es va analitzar mitjançant tincions immunohistoquímiques amb seccions de tumors humans de RMS. La immunohistoquímica es va realitzar amb col·laboració amb el grup de Patologia Molecular dels sarcomes i altres tumors de l'Hospital Universitari Virgen del Rocío de Sevilla. Les tincions es van dur a terme a partir d'un *tissue microarray* de trenta-dos tumors de RMS, dels quals es coneixia la seva evolució clínica. El marcatge de la integrina $\alpha 9\beta 1$ va ser positiu en dotze de les trenta-dues mostres totals analitzades, i es va reafirmar la presència de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en els tumors de pacients amb RMS. Relacionant la presència o absència de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en les mostres de tumors amb la supervivència dels pacients, es va obtenir una tendència en la qual els pacients amb marcatge positiu per la integrina $\alpha 9\beta 1$ presentaven una menor supervivència (Figura 4.12). Malgrat que no es va assolir una significació estadística, es mostra una clara tendència ($p=0.0914$), la qual cosa suggereix que la integrina $\alpha 9\beta 1$ podria ser una proteïna present en els pacients amb pitjor pronòstic, que són aquells pacients amb malaltia metastàtica.

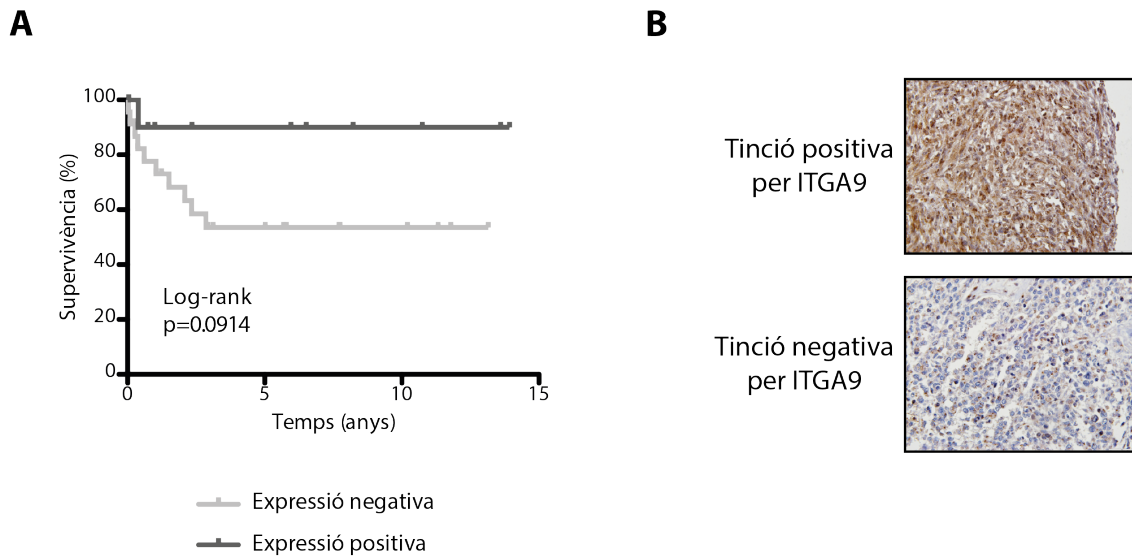


Figura 4.12. Anàlisi immunohistoquímica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en tumors de RMS. A: supervivència dels pacients amb RMS analitzats dividits en funció del marcatge positiu o negatiu per la integrina $\alpha 9\beta 1$ (dotze i vint, respectivament). **B:** fotografies representatives del marcatge tumoral per la integrina $\alpha 9\beta 1$ (ITGA9).

4.8

[Redacted text block]

4.8.1

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

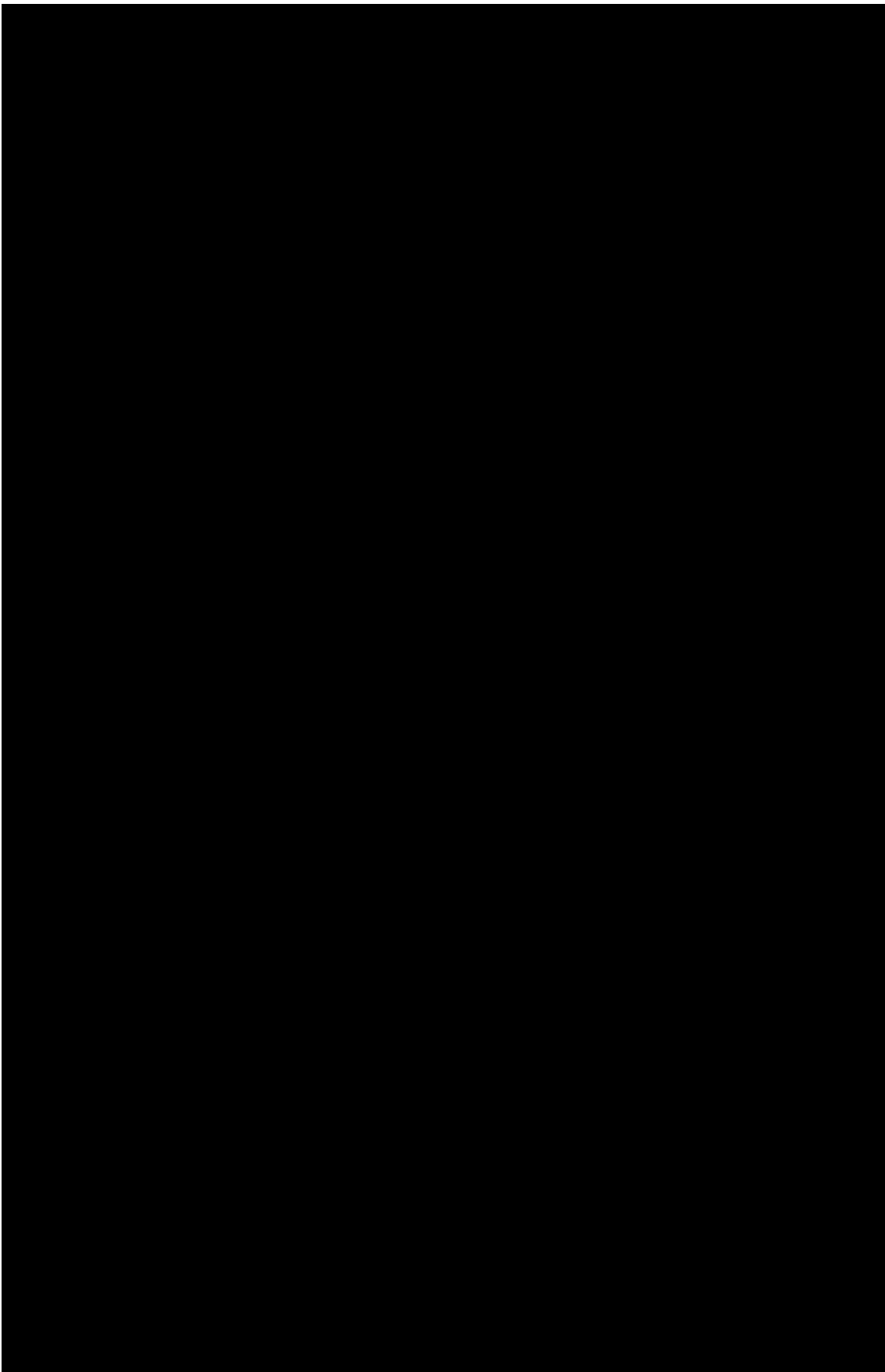
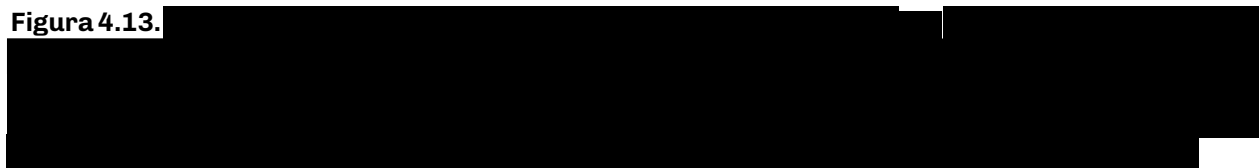


Figura 4.13.



4.8.2

[Redacted text]

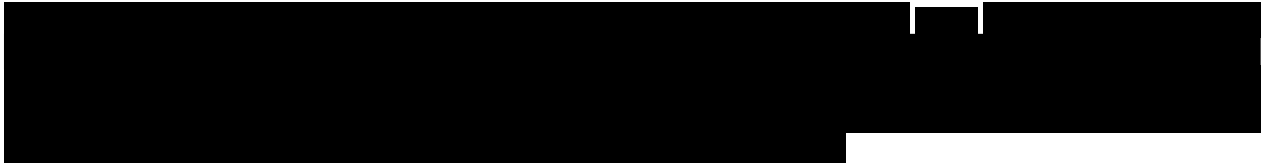
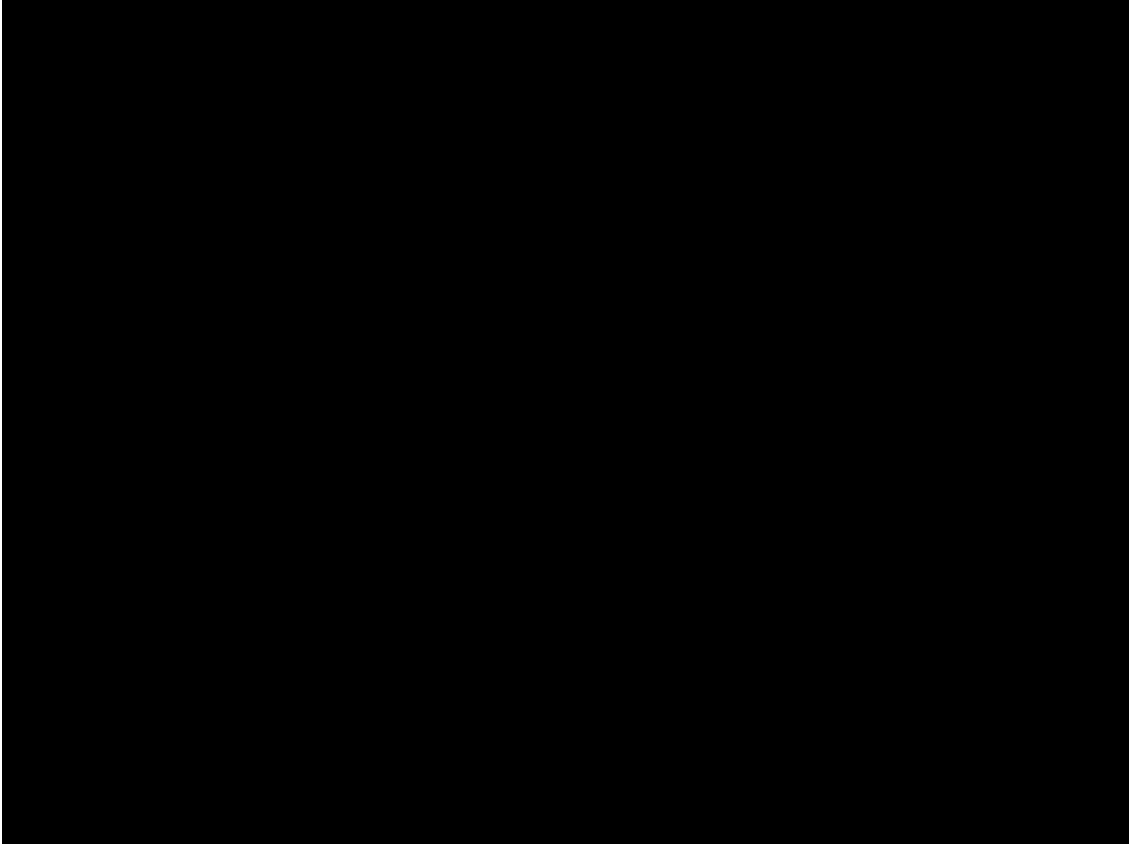
[Redacted text]

4.8.

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]



4.9

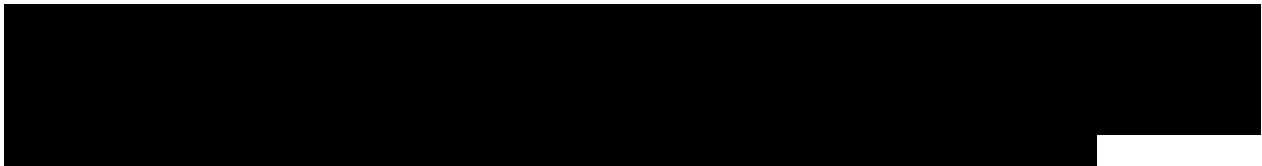
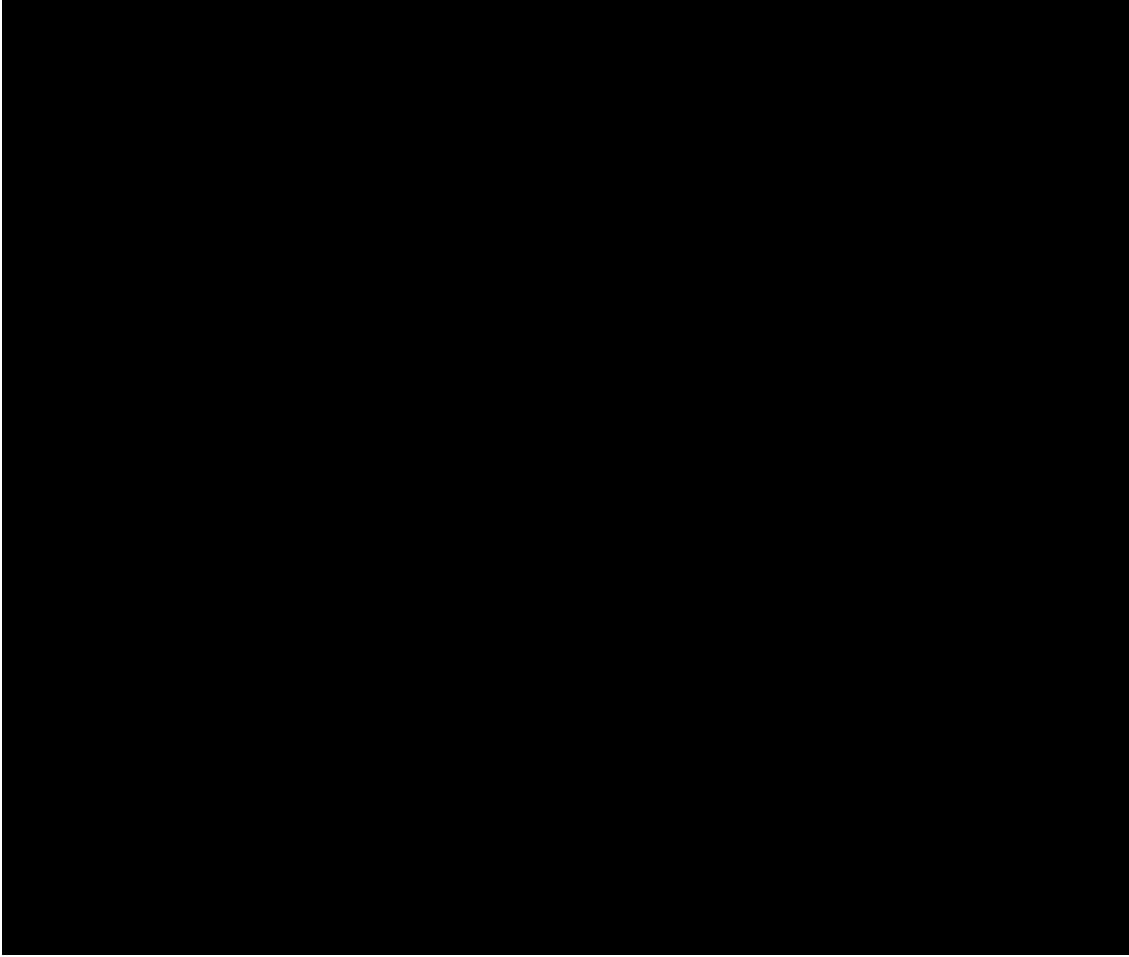


4.9.

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]



4.10



4.11.

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

4.11

[Redacted text]

[Redacted text]

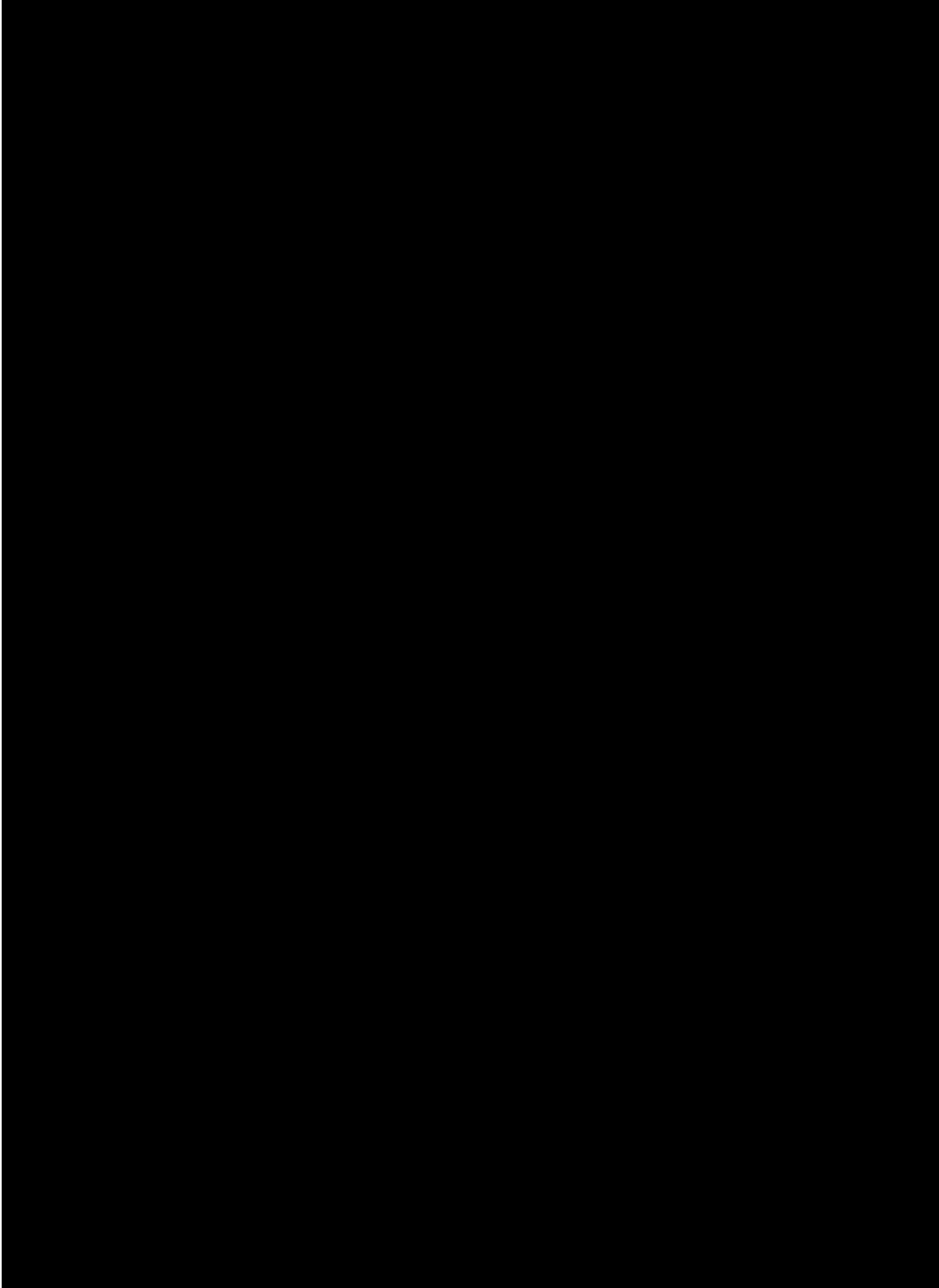
[Redacted text]

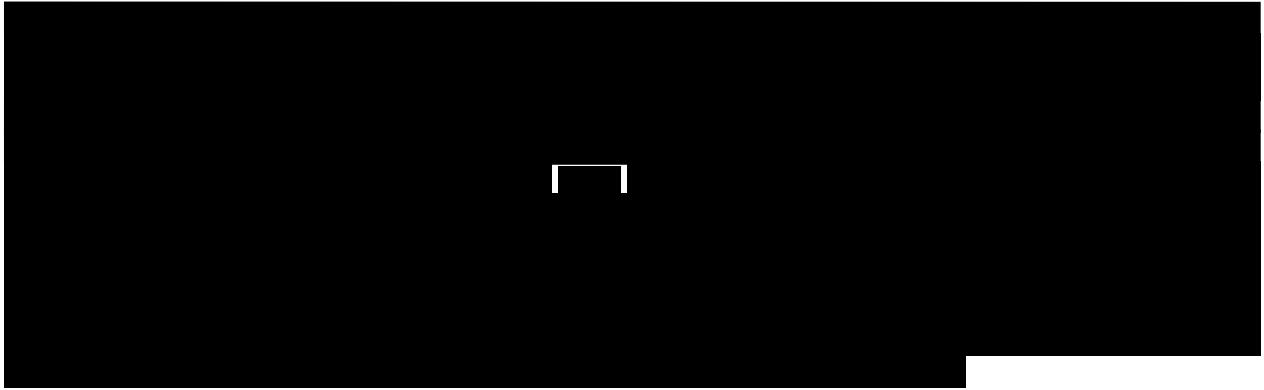
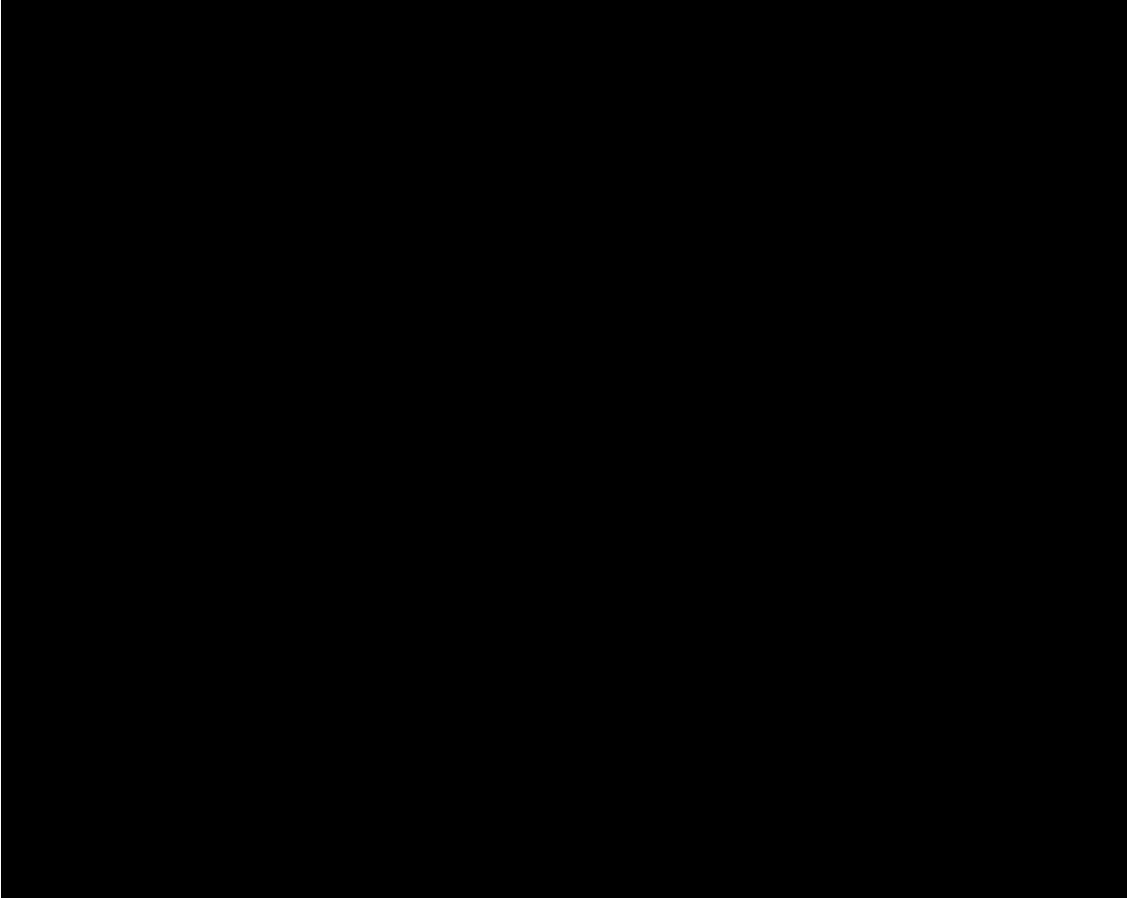
[Redacted text]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]





5 | Discussió

Les integrines són una gran família de proteïnes transmembrana formades per una subunitat α i una β , que donen lloc a 24 heterodímers diferents en els humans [88]. Són els únics receptors cel·lulars que poden transmetre el senyal de manera bidireccional, des de dins a fora de la cèl·lula i viceversa. D'aquesta manera, la cèl·lula pot participar en la remodelació de la matriu extracel·lular a partir de l'activació intracel·lular de les integrines (senyalització de dins a fora, *in-out signalling*); i les modulacions de l'entorn cel·lular poden ser captades per la cèl·lula a través dels múltiples lligands de les integrines, produint canvis a nivell cel·lular (senyalització de fora a dins, *out-in signalling*) [91, 93]. Les integrines participen en un context ampli de processos biològics, incloent-hi la fertilització, la implantació i desenvolupament embrionari, la resposta immune, la resorció òssia i l'agregació plaquetària. La desregulació de la seva expressió o activació pot donar lloc a processos patològics com la inflamació, cicatrització, angiogènesi i metàstasi [94].

La integrina $\alpha9\beta1$ és una de les integrines més noves en termes d'evolució. Com altres integrines, l' $\alpha9\beta1$ s'ha observat expressada en diversos teixits dels organismes vertebrats, la qual cosa suggereix que duu a terme diferents funcions en l'organisme. Així doncs, l'expressió aberrant d'aquesta dona lloc a condicions patològiques com el càncer [104]. Diferents autors han descrit la integrina $\alpha9\beta1$ com una proteïna proinvasiva que juga un paper molt important en la invasió i disseminació metastàtica. Ha estat descrita en alguns càncers de l'adult com el càncer de pulmó microcític [130, 131], mama [132], adenocarcinoma de còlon [133, 134] i glioblastoma [135]. En aquests, la integrina $\alpha9\beta1$ s'ha vist sobrerregulada en estadis metastàtics i en alguns casos la seva expressió s'ha pogut correlacionar amb una menor supervivència dels pacients.

Malgrat l'existència de diferents estudis sobre la integrina $\alpha9\beta1$ en càncer, cap d'ells fan referència a algun tipus de càncer pediàtric. L'any 2012 el nostre grup d'investigació va descriure per primera vegada el paper proinvasiu de la integrina $\alpha9\beta1$ en el RMS. Es va demostrar la importància de la N-cadherina i la integrina $\alpha9\beta1$ en les cèl·lules de RMS en la

migració i invasió cel·lular, i es va proposar un nou mecanisme d'inducció d'aquestes proteïnes mediat per l'activació de la via de Notch. Amb els antecedents de la implicació de la via de senyalització en la motilitat i la invasió en els sarcomes pediàtrics [155, 156], es va descriure com Hes1 i NICD (*Notch Intracellular Domain*) s'uneixen a les regions promotores dels gens codificants per la N-cadherina i la integrina $\alpha9\beta1$, relacionant la interacció directa entre la via de Notch i la inducció de l'expressió d'ambdues proteïnes [139].

També es va demostrar que la N-cadherina i la integrina $\alpha9\beta1$ són proteïnes implicades *per se* amb la migració i la invasió en el RMS. Es van dur a terme assaigs de cicatrització de ferides i d'invasió en cèl·lules amb l'activació constitutiva de la via Notch, en presència o absència d'anticossos bloquejants contra les dues proteïnes. En els assaigs de migració, l'addició de l'anticòs bloquejant de l'N-cadherina no només revertia l'efecte produït per l'activació de la via sinó que la migració disminuïa significativament respecte al control. Aquest efecte no es va reproduir amb l'addició de l'anticòs contra la integrina $\alpha9\beta1$ en la migració cel·lular. En el cas dels assaigs d'invasió, l'addició de l'anticòs contra la N-cadherina no mostrava la inhibició completa respecte a la invasió amb l'activació de la via. Per contra, es va observar que les cèl·lules amb l'activació de la via Notch i amb la presència de l'anticòs bloquejant de la integrina $\alpha9\beta1$, mostraven una reducció significativa de la invasió respecte a les cèl·lules amb l'activació de la via i les cèl·lules transfectades amb el vector buit. Aquests resultats suggerien un paper proinvasiu específic per cada proteïna, i posicionen la N-cadherina com una proteïna important per la migració cel·lular i la integrina $\alpha9\beta1$ amb un paper clau en la invasió del RMS [139]. Conseqüentment, la integrina $\alpha9\beta1$ és una proteïna candidata a una teràpia dirigida a reduir la metastasi en aquesta neoplàsia, línia de treball que requereix una focalització especial, ja que malauradament els pacients amb RMS metastàtic continuen presentant un mal pronòstic. Aquest va ser el context a partir del qual es va començar aquesta tesi doctoral.

5.1 La integrina $\alpha9\beta1$ en el RMS i el NBL

En aquest treball s'ha demostrat per primera vegada com la integrina $\alpha9\beta1$ podria ser una diana terapèutica en el RMS i el NBL. En primer lloc, es van analitzar els nivells d'expressió de la integrina $\alpha9\beta1$ a nivell d'RNA i proteïna en línies cel·lulars de RMS i NBL. L'expressió de la integrina $\alpha9\beta1$ en la bateria de les línies cel·lulars de RMS analitzades era irregular, i era la línia RD la que presentava els nivells més elevats de la proteïna i l'escollida per futurs experiments en la caracterització funcional de la integrina. Per contra, la línia RH30 es va

escollir com a control negatiu dels experiments, ja que presentava nivells molt baixos de la proteïna. Pel que fa al NBL, les cinc línies cel·lulars analitzades presentaven expressió de la integrina $\alpha 9\beta 1$. La línia de NBL que mostrava els nivells menors d'integrina $\alpha 9\beta 1$ era la SK-N-BE(2), mentre que la línia BE(2)-C era la que els presentava més elevats. Des de l'any 1973 s'ha revelat la presència de tres tipus cel·lulars en les línies de NBL: les anomenades tipus N, S i I. Les tipus N (neuroblàstic/neuroendocrí) provenen de llinatges específics de la cresta neural, mentre que les del tipus S tenen el seu origen en cèl·lules precursors de les cèl·lules de Schwann i melanoblàstiques. El tercer fenotip, les cèl·lules tipus I, mostren una morfologia i característiques intermèdies entre les N i les S. Tenint en compte el seu potencial oncogènic, les tipus S no semblen malignes, ja que no tenen la capacitat de formar tumors en ratolins atímics. Per contra, les tipus N formen tumors en un 30-100% dels ratolins atímics inoculats, mentre que el fenotip I és el que mostra una major capacitat per formar tumors [157]. La línia SK-N-BE(2) pertany al fenotip N, mentre que el subclon BE(2)-C, obtingut a partir d'aquesta, correspon al fenotip I. La línia BE(2)-C presenta un caràcter més invasiu, i, en concordança, presenta nivells d'integrina $\alpha 9\beta 1$ molt més elevats que la seva línia parental, la qual cosa suggereix que la integrina $\alpha 9\beta 1$ exerceix un paper en el fenotip invasiu de les línies de NBL. Es van escollir les línies BE(2)-C i CHLA-90 pels experiments *in vitro*, ja que eren les dues línies que presentaven els nivells més elevats d'integrina $\alpha 9\beta 1$.

Diferents autors apunten que la integrina $\alpha 9\beta 1$ podria exercir el paper d'un gen supressor de tumors en alguns càncers, ja que en el seu locus cromosòmic (3p21.3) s'hi ha observat aberracions genètiques o epigenètiques, que confereixen a aquests tumors un caràcter agressiu. S'ha descrit la deleció o la metilació del gen de la *ITGA9* aproximadament en el 30% dels tumors de cap i coll [125], càncer d'ovari [123] i còlon [124], i en el 40% de les mostres de càncer de cèrvix [127] i de càncer de pulmó no microcític [128]. En el cas del RMS, Qiao-xin Li et al. van dur a terme un estudi cromosòmic amb un total de 25 mostres, en el qual es va descriure la pèrdua del 3p en el 30% dels tumors de RMSa estudiats [158]. La pèrdua del 3p, juntament amb la pèrdua de l'11p i 6p i el guany en 2p, 12q, 6p, 9q, 10q, 1p, 2q, 6q, 8q, 15q i 18q podria estar relacionat amb la carcinogènesi del RMS, ja que el patró corresponia a casos de RMSa amb translocació. En canvi, no es va observar la pèrdua del 3p en cap dels casos de RMSe [159]. Tot i això, altres estudis d'alteracions cromosòmiques en el RMS no van descriure la pèrdua en el 3p [18]. Referent al NBL, es va observar un subgrup de pacients (15%, 9/59) amb la deleció del braç curt del cromosoma 3, correlacionat amb menor supervivència [160]. Ruediger Spitz et al. van observar també delecions en el cromosoma 3p en el 15% dels tumors de NBL (22/144), a més de desequilibris en el 3% (4/144) dels tumors analitzats. Es va observar un pitjor pronòstic d'aquells pacients amb NBL d'estadis localitzats o estadi 4S que presentaven anomalies en el 3p i a l'11q, en comparació amb els

pacients sense alteracions [161]. Tot i que en un article més recent no es va poder confirmar tal correlació, sí que es va identificar un subgrup de pacients amb delecions al 3p lligat a la pèrdua de l'11q. Aquest subgrup de pacients presentava una edat més avançada al moment del diagnòstic. La mitjana d'edat era de 41 mesos [162]. També es va descriure la pèrdua del 3p en el 14% (4/29) de les mostres de NBL d'adolescents i adults, que representa el 3% del total de casos de NBL [163].

En aquesta tesi es van analitzar els nivells d'expressió de l'RNA de la *ITGA9* d'un total de 23 mostres de pacients amb RMS provinents de la col·lecció privada del nostre grup d'investigació. Més del 90% dels pacients van presentar l'expressió de la integrina $\alpha9\beta1$ sobreregulada respecte al teixit de referència, el del múscul sa. Tot i no ser significatiu, es va observar una major expressió de l'RNAm de la *ITGA9* en els casos de RMSa respecte als RMSa. Aquest fet podria estar relacionat amb les delecions de la *ITGA9* que s'han descrit en alguns casos de RMSa [159]. L'expressió de la integrina $\alpha9\beta1$ es va confirmar a nivell proteic en 8 mostres de pacients amb RMS. Amb la col·laboració del grup de Patologia Molecular dels sarcomes i altres tumors de l'Hospital Universitari Virgen del Rocío de Sevilla es va dur a terme una tinció immunohistoquímica d'un *tissue microarray* de 32 pacients amb RMS. Cal destacar la dificultat que suposa aconseguir un *tissue microarray* d'aquest tipus de càncer degut a la baixa incidència de la malaltia, i encara més disposar de les dades clíniques i seguiment de cada pacient. Les mostres integrants del *tissue microarray* es van dividir segons la tinció positiva o negativa per la integrina $\alpha9\beta1$. Els resultats van mostrar una tendència de menor supervivència en els pacients amb marcatge positiu per la integrina $\alpha9\beta1$, amb una $p=0.0914$. Seria desitjable augmentar el nombre de mostres i tincions, ja que probablement s'aconsegueixi la significació estadística tot confirmant la tendència obtinguda. Així doncs, els resultats indiquen que l'expressió de la integrina $\alpha9\beta1$ podria ser un marcador de mal pronòstic en el RMS, ja que els pacients positius per aquesta proteïna presenten un temps de supervivència menor. Aquests resultats són consistents amb els estudis publicats en càncer de pulmó microcític i amb càncer de mama, on l'expressió de la integrina $\alpha9\beta1$ en el tumor es correlaciona amb un temps de vida més curt del pacient [131, 132].

Encara que s'hagi descrit un percentatge baix de tumors tant de RMS com de NBL que presenten pèrdues en el cromosoma 3p, els nostres resultats apunten a la presència de la proteïna integrina $\alpha9\beta1$ en les línies cel·lulars i en la majoria dels tumors d'ambdós càncers pediàtrics. Per tant, descrivim la integrina $\alpha9\beta1$ com un oncògen en el RMS i el NBL. Conseqüentment, proposem la integrina $\alpha9\beta1$ com una diana terapèutica aplicable en la gran majoria dels pacients amb RMS i NBL.

5.2 La integrina $\alpha 9\beta 1$ està implicada en el creixement cel·lular

Per tal d'estudiar els efectes funcionals de la integrina $\alpha 9\beta 1$, es va infraregular la integrina $\alpha 9\beta 1$ en les línies cel·lulars RD i RH30 de RMS i en les línies BE(2)-C i CHLA-90 de NBL. Es van generar clons estables amb la infraregulació genètica de la proteïna mitjançant la transducció vírica de dos shRNAs clonats en el vector lentiviral pGIPZ. En tots els casos, es va comprovar la disminució de l'expressió de la integrina $\alpha 9\beta 1$ a nivell proteic. Es van dur a terme assaigs de proliferació cel·lular, en els quals es va observar una reducció significativa del creixement cel·lular en les línies positives per integrina $\alpha 9\beta 1$ RD, BE(2)-C i CHLA-90 (Figura 5.1, B). Les línies infectades amb els dos shRNAs de la línia RD van disminuir significativament el creixement cel·lular respecte al control. Tot i això, en les línies BE(2)-C i CHLA-90 la reducció es va observar en un dels dos clons, i aquesta va ser del 20%. Tal com era d'esperar, no es van observar canvis en el creixement dels clons de la línia RH30 respecte al control, ja que la línia cel·lular presenta nivells molt baixos de la proteïna. El paper de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en la proliferació cel·lular s'ha descrit en càncers de l'adult: en cèl·lules de càncer de mama, la proliferació *in vitro* de les cèl·lules expressant la integrina $\alpha 9\beta 1$ no es va veure afectada amb l'addició d'un anticòs contra aquesta, fet que suggereix que la proliferació no era depenent de la integrina $\alpha 9\beta 1$. Tot i això, en el model *in vivo* sí que es va observar una reducció del volum del tumor primari en els ratolins tractats amb l'anticòs contra la integrina $\alpha 9\beta 1$ [138]. Per altra banda, s'ha demostrat que el creixement cel·lular *in vivo* de les cèl·lules de càncer de pulmó és mediat en part per la integrina $\alpha 9\beta 1$, atès que les cèl·lules amb sobreexpressió de la integrina injectades al flanc dels ratolins formaven tumors tres vegades més grans que els que es formaven amb la injecció de les cèl·lules control. Quan s'infraregulava la integrina $\alpha 9\beta 1$ mitjançant shRNA, les cèl·lules amb absència d'expressió de la integrina formaven tumors primaris més petits que els formats per les cèl·lules transfectades amb el vector buit [131]. Tot i que en aquesta tesi doctoral no es va dur a terme el model *in vivo* de tumor primari amb la infraregulació de la integrina $\alpha 9\beta 1$ per confirmar el paper d'aquesta en la proliferació cel·lular, agrupant els resultats obtinguts i els diferents articles publicats es pot concloure que la integrina $\alpha 9\beta 1$ està implicada en el creixement cel·lular de les cèl·lules de RMS i NBL i fem la hipòtesi que es reproduiria l'efecte observat *in vitro* en un possible model animal posterior.

En aquest treball doctoral es van utilitzar miRNAs com a eina per a la infraregulació epigenètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en les cèl·lules de RMS. Els miRNAs són molècules petites d'RNA no codificants que actuen a nivell posttranscripcional com a repressors de l'expressió

gènica. Funcionalment, els miRNAs impedeixen la traducció a proteïna mitjançant la complementarietat amb la regió 3'UTR del transcrit del gen diana. A part de ser una eina per a la infraregulació de proteïnes, tenen un paper àmpliament descrit en la progressió tumoral i la formació de metàstasi, fet que ha obert noves oportunitats per a la intervenció terapèutica. En el moment de l'inici del treball doctoral no hi havia cap publicació referent als miRNAs que regulen la integrina $\alpha 9\beta 1$. Degut a aquest desconeixement, es va dur a terme un *screening* de 14 miRNAs potencials en les dues línies de RMS amb major expressió d'integrina $\alpha 9\beta 1$: RD i CW9019. Es van seleccionar el miR-7 i el miR-324 com a candidats pels estudis posteriors, ja que van ser els dos miRNAs que més reprimien l'expressió de la integrina $\alpha 9\beta 1$ a nivell de proteïna en les dues línies cel·lulars de RMS analitzades. Es va demostrar la interacció directa entre els dos miRNAs amb el transcrit de la integrina $\alpha 9\beta 1$ mitjançant l'assaig luciferasa, i es va confirmar que el miR-7 i el miR-324 eren dianes directes de la integrina $\alpha 9\beta 1$. En els assaigs de creixement cel·lular, es va observar una reducció significativa de la proliferació cel·lular en la línia RD amb l'expressió ectòpica del miR-7 i del miR-324, però en la línia CW9019 es va observar una reducció significativa de la proliferació només amb la transfecció del miR-7. Les divergències en els resultats ens van suggerir que el miR-7 podria presentar altres dianes en les línies cel·lulars de RMS, les quals podrien ser causants de la reducció en la proliferació. Una de les múltiples dianes descrites del miR-7 és la proteïna FAK. S'ha observat que l'expressió ectòpica del miR-7 disminueix la proliferació cel·lular en cèl·lules de càncer de mama [164], en les de càncer de pulmó no microcític [165] i en les de glioma [166]. En tots els casos presentava FAK com a diana directa. A partir dels efectes fenotípics observats amb els dos miRNAs en les línies utilitzades, es conclou que els efectes observats amb l'expressió ectòpica del miR-7 van ser deguts a la infraregulació de la integrina $\alpha 9\beta 1$ i també a l'infraregulació de FAK (vegeu apartat 5.4). Per contra, els efectes observats amb el miR-324 es van associar exclusivament a la disminució de la integrina $\alpha 9\beta 1$. En la línia cel·lular RD, amb expressió abundant d'integrina $\alpha 9\beta 1$, es va observar un efecte clar en la reducció de la proliferació quan s'incrementaven els nivells de miR-324, fet que reduïa el nivell d'integrina, en concordança amb la reducció observada en la mateixa línia cel·lular amb la inhibició genètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ (Figura 5.1, C). En canvi, la línia CW9019, la qual presenta nivells molt més baixos d'integrina $\alpha 9\beta 1$, tot i que el miR-324 va ser capaç de reduir els nivells de la proteïna, no es van observar canvis en la proliferació cel·lular. Així doncs, la línia CW9019 es comportaria com la línia RH30, la qual tot i respondre a la inhibició de la integrina $\alpha 9\beta 1$, no va presentar canvis en la proliferació degut a la no suficient expressió d'aquesta.

5.3 La integrina $\alpha9\beta1$ té un paper clau en la invasió cel·lular

S'ha descrit diferents rols de la integrina $\alpha9\beta1$ en el càncer, i un dels que més s'ha estudiat és el de la invasió. Anteriorment el nostre grup d'investigació va suggerir la integrina $\alpha9\beta1$ com una de les proteïnes implicades en la invasió de les cèl·lules de RMS [139], i en aquest treball doctoral s'ha comprovat que la integrina $\alpha9\beta1$ presenta un paper clau en la invasió cel·lular tant *in vitro* com *in vivo*. Amb la inhibició genètica de la integrina $\alpha9\beta1$ mitjançant la transducció vírica de shRNAs específics contra la proteïna, es va demostrar que les línies cel·lulars de RMS i NBL amb absència d'expressió d'integrina $\alpha9\beta1$ presentaven una disminució significativa de la invasió respecte al control. A diferència dels assaigs de creixement cel·lular, els resultats dels assaigs d'invasió van ser més consistents: es va observar una reducció de la invasió de més del 50% en els dos clons amb les línies amb més expressió d'integrina $\alpha9\beta1$, RD i BE(2)-C (Figura 5.1, B). Amb concordança amb els resultats obtinguts, s'han publicat articles confirmant el paper invasiu de la integrina $\alpha9\beta1$ en diversos càncers epitelials, com el càncer de mama i el de pulmó microcític. En càncer de mama, el bloqueig de la integrina $\alpha9\beta1$ mitjançant un anticòs va resultar en una disminució significativa de la invasió *in vitro*, indicant que la integrina està implicada en el procés d'invasió [138]. De manera independent i en el mateix càncer, es va observar com la sobreexpressió de la integrina $\alpha9\beta1$ promovia una major invasió *in vitro* [132]. En càncer de pulmó microcític es va observar que la presència de la integrina $\alpha9\beta1$, expressada de manera endògena o bé sobreexpressant-la, augmentava la invasió cel·lular i aquesta es veia reduïda en presència d'un anticòs específic contra la proteïna [131]. D'aquesta manera es conclou que el paper de la integrina $\alpha9\beta1$ en la invasió cel·lular no queda restringit en els càncers epitelials de l'adult, sinó que també s'observa en casos de càncers pediàtrics com el RMS i el NBL.

Els efectes observats en la invasió cel·lular *in vitro* es van confirmar *in vivo* en el RMS mitjançant la injecció de cèl·lules RD amb la infraregulació genètica de la integrina $\alpha9\beta1$ a ratolins SCID-Beige. Un nombre menor dels ratolins injectats amb les cèl·lules amb absència d'expressió d'integrina $\alpha9\beta1$ van desenvolupar metàstasi comparat amb el grup control i la diferència va ser estadísticament significativa. Daichi Ota et al. van observar una reducció del nombre de metàstasis amb l'addició de l'anticòs bloquejant en el model *in vivo* de metàstasi de cèl·lules de càncer de mama [138]. De la mateixa manera, les cèl·lules de càncer de pulmó amb la infraregulació genètica de la integrina $\alpha9\beta1$ injectades en ratolins van desenvolupar un nombre menor de metàstasis comparat amb els ratolins control. En un segon model *in vivo* amb la sobreexpressió de la integrina, els ratolins que sobreexpressaven la proteïna van

presentar major nombre de metàstasis a fetge i a pulmó [131]. Així, en aquest treball doctoral s'ha demostrat la importància de la integrina $\alpha 9\beta 1$ en la invasió cel·lular en el RMS tant *in vitro* com *in vivo*.

Es van dur a terme assaigs *Transwell* amb la inhibició epigenètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ amb la transfecció transitòria del miR-7 i del miR-324. Es va observar el mateix patró obtingut en els assaigs de proliferació: la línia RD es va mostrar sensible a la inhibició de la invasió amb l'expressió ectòpica del miR-7 i del miR-324, mentre que en la línia CW9019 es va observar una reducció de la invasió només amb l'expressió del miR-7. Està àmpliament descrit que el miR-7 és diana de la proteïna FAK, i s'ha observat una reducció de la invasió *in vitro* amb la sobreexpressió del miR-7, concordant amb la infraregulació de FAK en cèl·lules de càncer de cèrvix, en línies cel·lulars de glioblastoma i en cèl·lules de càncer de mama [167, 168, 166, 164]. D'acord amb els nostres resultats i els articles ja publicats, es conclou que l'efecte del miR-7 sobre la invasió cel·lular no és degut només a la infraregulació de la integrina $\alpha 9\beta 1$, sinó també de la proteïna FAK (vegeu apartat 5.4).

Per altra banda, el miR-324 va presentar un efecte inhibitori del creixement i la invasió cel·lular en la línia RD superior a la que es va observar amb el miR-7 (Figura 5.1, C). També va mostrar una major reducció de l'activitat luciferasa que el miR-7, la qual cosa significa que el miR-324 presenta una unió millor al 3'UTR del transcrit de la *ITGA9*. Conseqüentment, la inhibició dels nivells de proteïna era major amb l'expressió del miR-324 comparada amb la del miR-7. Amb aquests resultats, i sumant el fet que el miR-324 sigui capaç de reduir la proliferació i invasió únicament en la línia amb més expressió d'integrina $\alpha 9\beta 1$, concloem que el miR-324 és una diana específica i potent contra la integrina $\alpha 9\beta 1$. Les dianes descrites del miR-324 són els gens *ETS1*, *SP1* i *GLI1*. En cèl·lules d'hepatocarcinoma es va descriure el rol del miR-324 en la invasió cel·lular, i es va demostrar que la seva sobreexpressió reduïa la migració i la invasió *in vitro*. Es van identificar els gens *ETS1* i *SP1* com a dianes directes del miR-324-5p, els quals modulen els nivells de MMP9 i MMP2, metal·loproteases que presenten un paper en la invasió cel·lular en aquest càncer [169]. Altres autors apunten que el miR-324-5p té com a diana directa *GLI1*, i han descrit la inhibició del cycle cel·lular en cèl·lules de glioblastoma amb la sobreexpressió del miR-324-5p [170]. S'ha demostrat que la inhibició de *GLI1* té un efecte en el creixement del RMS [171]. Tot i això, els resultats obtinguts amb la línia cel·lular CW9019 ens indiquen que aquestes dianes descrites del miR-324 no ho serien en les cèl·lules de RMS, ja que no es van observar canvis en la proliferació ni en la invasió cel·lular.

L'any 2016 es va publicar el primer article relacionant la integrina $\alpha 9\beta 1$ i els miRNAs que aquesta regula, en el qual es va demostrar que el miR-125b és una diana directa de la integrina

$\alpha 9\beta 1$. Similarment als nostres resultats, quan es van restaurar els nivells de miR-125b a les cèl·lules de melanoma s'inhibia la migració i la invasió tant *in vitro* com *in vivo*. Així doncs, sobreexpressant el miR-125b i amb la subseqüent inhibició de la integrina $\alpha 9\beta 1$, s'inhibia el fenotip maligne del melanoma [172]. A més, es va observar com l'augment de l'expressió de la integrina $\alpha 9\beta 1$ es correlacionava inversament amb els nivells de miR-125b en mostres de tumors de melanoma. Aquests resultats apunten que la integrina $\alpha 9\beta 1$ és responsable de la invasió cel·lular en el melanoma, i suggereixen el miR-125b com a futura eina pel tractament d'aquest [172]. De la mateixa manera, s'ha descrit alguns miRNAs que regulen la invasió cel·lular i la metastasi en diferents càncers, i tenen diverses integrines com a diana. Per exemple, en càncer de còlon, el miR-30e-5p regula la ITGA6 i la ITGB1 inhibint la invasió i la metastasi [173]. El miR-9-3p podria arribar a ser una eina terapèutica en el carcinoma nasofaríngi, ja que la seva sobreexpressió inhibeix la proliferació i la invasió *in vitro* infra regulant la ITGB1 i la ITGAV [174]. Finalment, la família del miR-199 inhibeix la migració i invasió cel·lular en el càncer de cap i coll, infra regulant la ITGA3 [175]. Cal fer esment que, en tots aquests casos, els miRNAs en qüestió es trobaven infra regulats en els teixits cancerosos respecte als teixits control. En aquesta tesi doctoral no es van arribar a analitzar els nivells de miR-7 i miR-324 en mostres tumorals de RMS, tot i que s'ha descrit la infra regulació del miR-7 en tumors de RMS comparat amb el múscul esquelètic normal [176]. Així doncs, es podria plantejar la hipòtesi que els casos dels tumors amb sobreexpressió d'integrina $\alpha 9\beta 1$ podria ser causat, en part, per la infra regulació dels nivells de miR-7 i miR-324.

Encara que en aquest treball s'hagin utilitzat únicament els miRNAs com a eina per a infra regular la integrina $\alpha 9\beta 1$, hi ha la possibilitat d'utilitzar els miRNAs pel tractament oncològic. Per primera vegada hem descrit que el miR-7 i el miR-324 tenen activitat supressora de tumors en el RMS i esdevenen diana directa de la integrina $\alpha 9\beta 1$. Hem demostrat també el paper metastàtic d'aquesta proteïna mitjançant la seva infra regulació. Així doncs, s'obre una possible oportunitat terapèutica mitjançant l'expressió de tals miRNAs en els pacients amb RMS.

5.4 Mecanisme intracel·lular de la integrina $\alpha 9\beta 1$

Està àmpliament descrit que la integrina $\alpha 9\beta 1$ té un paper important en la progressió tumoral, més concretament en la invasió metastàtica del tumor primari. Tot i això, hi ha poca informació publicada sobre els canvis intracel·lulars provocats per l'activació de la integrina $\alpha 9\beta 1$. En els casos dels càncers epitelials on es descriu el rol de la integrina $\alpha 9\beta 1$, es demostra el caràcter invasiu a través de la pèrdua de marcadors epitelials i el guany de marcadors mesenquimals (disminució de E-cadherina i augment de N-cadherina, vimentina, snail, ...), corresponent a la justificació del procés EMT [131]. En el cas del RMS i NBL, ambdós càncers pediàtrics, les cèl·lules tumorals no presenten un fenotip epitelial, fet pel qual impossibilita l'estudi dels marcadors clàssics del procés d'EMT.

Un cop demostrat que la integrina $\alpha 9\beta 1$ és important per la progressió tumoral en el RMS i el NBL, es va estudiar quin mecanisme estava relacionat amb la integrina $\alpha 9\beta 1$ a nivell intracel·lular. Sabent que una de les primeres proteïnes amb les quals interaccionen les integrines intracel·lularment és FAK, i que el primer pas per a la senyalització és l'autofosforilació de la tirosina 397, es van estudiar els nivells de les dues formes de la proteïna mitjançant *Western blot* en les línies cel·lulars de RMS i NBL després de la infraregulació genètica i epigenètica de la integrina. Els nivells de FAK no van variar en les cèl·lules de RMS i NBL amb la infraregulació genètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$ comparades amb les cèl·lules infectades amb el vector buit. Per contra, els nivells de la fosforilació de FAK en la tirosina 397 (p-FAK), sí que van disminuir en tots els clons de les cèl·lules de RMS i NBL amb absència d'expressió d'integrina $\alpha 9\beta 1$. Així doncs, la reducció de la capacitat proliferativa i invasiva de les cèl·lules de RMS i NBL després de la infraregulació de la integrina $\alpha 9\beta 1$ és mediada per la disminució en la fosforilació de FAK (Figura 5.1, B). De la mateixa manera, els nivells de FAK en les cèl·lules RD i CW9019 transfectades amb el miR-324 es van mantenir com els de les cèl·lules transfectades amb el control, mentre que l'expressió de p-FAK es va reduir (Figura 5.1, C). En canvi, en les cèl·lules transfectades amb el miR-7 es va observar una disminució de les dues formes de FAK en les dues línies cel·lulars analitzades. Aquest fet demostra la hipòtesi que el miR-7 té com a diana la proteïna FAK en les cèl·lules de RMS. Tot i això, la ràtio p-FAK/FAK després de la transfecció amb el miR-7 és inferior a 1, fet que significa que la reducció de FAK total va ser més dèbil que la de la seva forma fosforilada. Així doncs, la reducció de la fosforilació de FAK no és deguda només a la disminució dels nivells de FAK total sinó també a la disminució de l'expressió de la integrina $\alpha 9\beta 1$ (Figura 5.1, D).

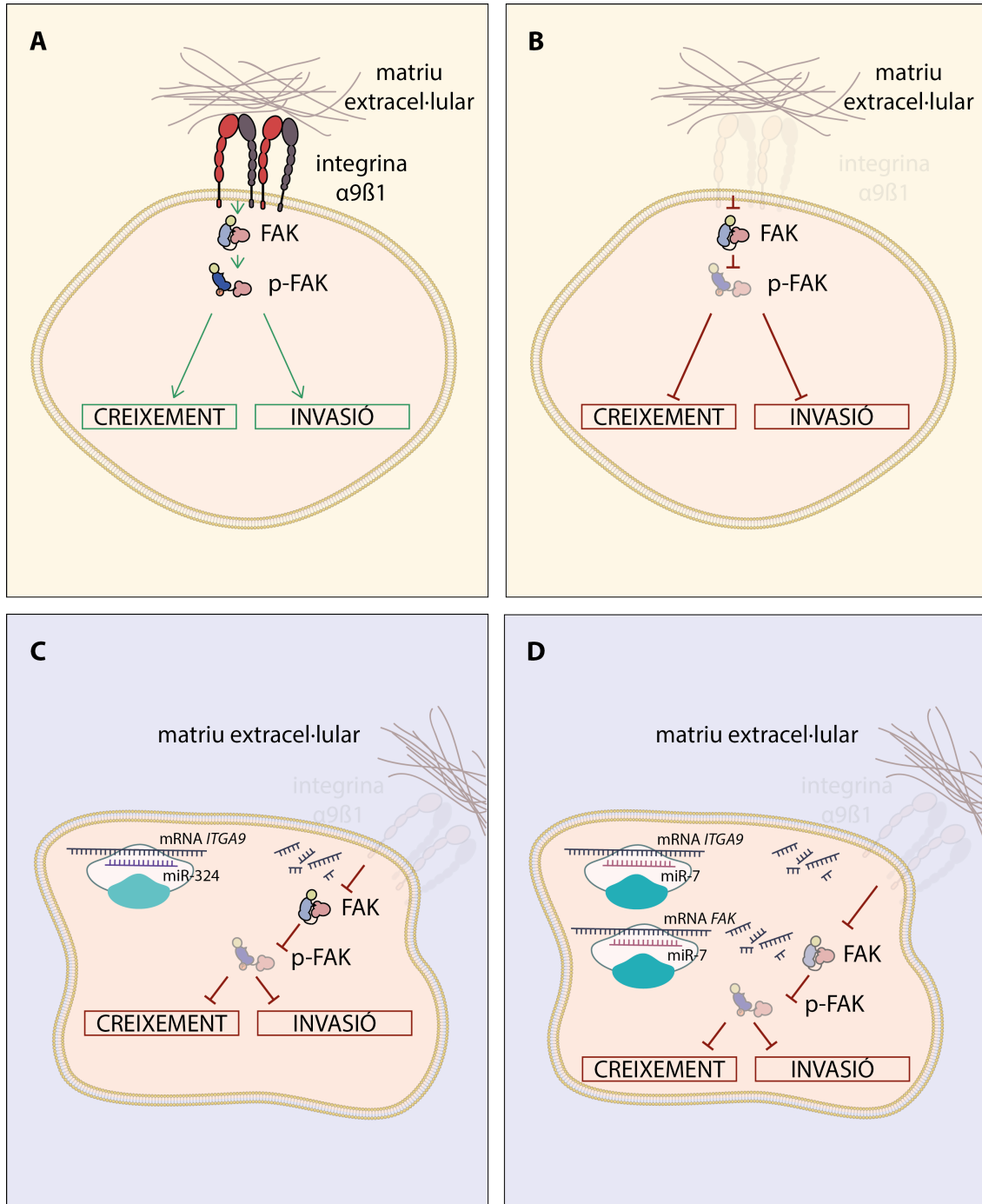


Figura 5.1. Representació esquemàtica dels efectes fenotípics observats després de la infraregulació de la integrina $\alpha 9\beta 1$. **A:** amb presència de la integrina $\alpha 9\beta 1$, les cèl·lules tumorals en condicions normals duen a terme el creixement i invasió cel·lular. **B:** mitjançant la infraregulació genètica de la integrina $\alpha 9\beta 1$, s'observa una reducció tant del creixement com de la invasió i una inhibició de la fosforilació de la proteïna FAK. **C:** mitjançant l'expressió ectòpica del miR-324 s'aconsegueix una disminució dels nivells de la integrina $\alpha 9\beta 1$, que al seu torn redueix els nivells de la fosforilació de FAK i s'observa una reducció en el creixement i invasió cel·lular. **D:** mitjançant l'expressió ectòpica del miR-7, no només aconseguim una disminució dels nivells de la integrina $\alpha 9\beta 1$ sinó també de FAK. Fenotípicament també s'observa una disminució en el creixement i la invasió cel·lular.

Es va observar una reducció de la forma fosforilada de FAK (p-FAK) després de la infraregulació de la integrina $\alpha9\beta1$ en totes les línies cel·lulars utilitzades de RMS i NBL, incloses en les línies on no es van observar canvis a nivell funcional. És a dir, tant amb la infraregulació genètica de la integrina $\alpha9\beta1$ en la línia RH30 com en les cèl·lules CW9019 després de la transfecció del miR-324 es va observar una disminució dels nivells de p-FAK. En ambdós casos també es va observar una reducció en els nivells de la integrina $\alpha9\beta1$. Tot i això, a causa dels nivells basals baixos de proteïna que presenten aquestes dues línies cel·lulars i la subseqüent mínima inhibició de la via a nivell intracel·lular, la inhibició específica de la integrina $\alpha9\beta1$ no va resultar ser efectiva per aconseguir reduir el creixement i invasió en aquestes línies cel·lulars.

S'ha descrit una gran varietat de dianes de FAK, les quals exerceixen un paper en moltes vies de senyalització de diferents processos relacionats amb la tumorigènesi i la progressió metastàtica. Les integrines i altres estímuls extracel·lulars poden induir senyals de supervivència mediat per FAK impedit la mort cel·lular mitjançant processos com l'anoikis i l'apoptosi. D'aquesta manera, les cèl·lules canceroses poden anul·lar l'anoikis i promoure la supervivència cel·lular en absència de senyals d'adhesió mitjançant la senyalització de FAK. Així doncs, la senyalització mediada per FAK promou senyals antiapoptòtics i de supervivència, activant vies com PI3K/Akt, resultant en un efecte de resistència a l'apoptosi [100, 101]. Per altra banda, s'ha descrit diversos mecanismes en els quals l'activitat catalítica de FAK regula la transició de G1 a S. Amb la disrupció de la fibronectina de la matriu extracel·lular, se suprimeix la fosforilació de la tirosina de FAK i provoca en un retard en la transició del cicle cel·lular [100]. FAK també té un paper en la metàstasi, on controla aspectes com la migració cel·lular, la polarització cel·lular, la regulació de la dinàmica de les adhesions focals, la reorganització de les estructures del citoesquelet, la invasió, la transició epiteli-mesènquima i l'angiogènesi. En aquesta tesi doctoral s'ha estudiat el paper de la integrina $\alpha9\beta1$ en el caràcter invasiu en les cèl·lules de RMS i NBL, i s'ha observat com la seva inhibició comporta una disminució de la fosforilació de la tirosina 397 de FAK, la primera que cal per a l'activació completa d'aquesta. Un cop FAK s'ha activat, es combina amb moltes altres proteïnes per acabar resultant en el fenotip invasiu cel·lular. Hi ha estudis on es demostra que l'expressió i fosforilació de FAK estan sobrerregulats en càncers invasius i línies cel·lulars [100]. S'ha descrit la sobrerregulació de FAK en tumors humans d'estadis avançats de càncer de l'adult com en mama i en còlon [177, 178], pàncrees [179], ovari [180] i pulmó [181], entre d'altres.

L'any 2016 es va publicar el primer article en el qual es relaciona FAK amb el RMS, on es va estudiar l'expressió de FAK en línies cel·lulars i en pacients amb RMS. En assaigs

in vitro amb la inhibició de FAK, van observar una reducció de la proliferació de les línies cel·lulars RD i RH30 lligada a un augment de l'apoptosi. Els resultats van ser confirmats en un model *in vivo*, en el que es reduïa el volum del tumor primari i l'expressió de FAK i la seva forma fosforilada era menor que en els tumors control [182]. Per contra, són una cinquantena de resultats publicats relacionant FAK amb el NBL. Respecte a la presència de FAK en tumors de NBL, es va detectar l'expressió de la proteïna en més del 70% dels tumors analitzats, i es va observar com la seva expressió era major en tumors d'estadi 4 de la malaltia amb *N-MYC* amplificat [183]. Mitjançant assaigs d'immunoprecipitació es va demostrar que *N-MYC* s'uneix al promotor de FAK i n'augmenta la seva expressió *in vitro* i *in vivo* [184]. La inhibició de FAK *in vitro* resulta en una disminució de la supervivència cel·lular, la migració i la invasió, sobretot en aquelles línies cel·lulars amb amplificació de *N-MYC*. També es va comprovar *in vivo* amb la línia SK-N-BE(2), amb *N-MYC* amplificat, on es va observar una reducció en el nombre de metàstasis [185].

Hi ha diversos blocadors comercials al mercat que són inhibidors de FAK. Algun d'ells, com el PF-00562271, va ser testat en fase I en un assaig clínic en tumors sòlids avançats de l'adult, i va presentar un perfil segur que posicionava a FAK com una bona diana terapèutica [186]. El GSK2256098, que inhibeix FAK unint-se al lloc de fosforilació de la tirosina 397, va demostrar una disminució de la proliferació cel·lular, motilitat i supervivència *in vitro* en cèl·lules de càncer pancreàtic [187]. S'ha publicat els resultats de la fase I en pacients amb tumors sòlids avançats tractats amb aquest inhibidor. Té un perfil de seguretat acceptable i presenta una activitat clínica remarcable, essent capaç de reduir un 80% la forma fosforilada de FAK en els tumors [188]. També s'han presentat resultats encoratjadors en fase I en pacients amb recidiva de glioblastoma [189]. Un segon inhibidor de la fosforilació de FAK a la Y397 és el Defactinib (VS-6063, PF-04554878), que ja ha superat amb èxit els assaigs clínics de fase I [190, 191] i s'han publicat recentment els resultats de l'assaig clínic fase II amb pacients afectats de mesotelioma pleural maligne. Malauradament, no es va aconseguir una millora de la supervivència després de l'administració oral del Defactinib respecte al placebo, la qual cosa fa descartar el Defactinib com una teràpia de manteniment pels pacients amb mesotelioma pleural maligne [192]. De moment no s'han publicat els resultats dels altres assaigs clínics efectuats amb el Defactinib.

La senyalització mediada per la fosforilació de FAK és l'inici de moltes vies de senyalització per a moltes altres proteïnes, a part de les integrines -i no solament la integrina $\alpha 9\beta 1$ -. Qi Jiang et al. van descriure els efectes fenotípics de l'inhibidor d'integrines rLj-RGD3 en cèl·lules de càncer d'ovari. La molècula és una toxina derivada de l'espècie de peix *Lampetra japonica* (Martens, 1868), i conté tres motius RGD. Per tant, està dirigida a totes les integrines que

contenen tal motiu. Aquesta molècula és capaç de bloquejar la migració i la invasió de les cèl·lules de càncer d'ovari, lligat a una disminució dels nivells de p-FAK [193]. Hi ha una diversitat de molècules amb motiu RGD testades *in vitro*. En cèl·lules de càncer de mama, es va observar com s'inhibia la migració i la invasió amb una molècula dirigida al motiu RGD, inhibint la fosforilació de FAK i suprimint la via de senyalització FAK/Akt/ERK, tot impeding la interacció entre les integrines $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ i $\alpha 5\beta 1$ i les MMP-2/-9 [194]. Cheng Du et al. van estudiar el complex que forma la integrina $\alpha v\beta 3$ amb el canal de calci BKCa, i com aquest promou el creixement i la invasió en cèl·lules de càncer de pròstata mediat per la fosforilació de FAK [195].

En aquest treball doctoral per una banda s'ha identificat la inhibició intracel·lular de la proteïna FAK mitjançant la reducció dels nivells d'autofosforilació de la tirosina 397 després del bloqueig de la integrina $\alpha 9\beta 1$. Tal com s'ha descrit, alguns autors proposen com a diana la pròpia proteïna FAK i hi ha assaigs clínics actius amb molècules inhibidores de FAK. Per altra banda, caldria una recerca més exhaustiva per saber quina és la via de senyalització completa que s'interromp amb la inhibició de la integrina $\alpha 9\beta 1$, ja que FAK, al seu torn, pot induir múltiples vies.

5.5

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

5.6 Implicacions terapèutiques

Malgrat l'evolució de les teràpies en els pacients amb RMS i l'augment de la supervivència en aquest tipus de càncer durant els últims 30 anys, els pacients amb RMS metastàtic continuen tenint un baix pronòstic i la principal causa de mort en aquests pacients és la presència de metastasi [19]. En el NBL, molts dels pacients d'alt risc presenten malaltia refractària i no disposem actualment de cap tractament per a ells [47]. Malauradament la situació és extensible en alguns càncers de l'adult, on la supervivència als 5 anys després del diagnòstic decreix del 80-90% al 10-20% en els casos amb presència de metastasi. La majoria dels pacients amb càncer moren per la metastasi, fet pel qual el control d'aquesta hauria de ser una de les missions urgents en el tractament del càncer [196]. La identificació dels components moleculars i mecanismes que controlen el procés metastàtic és vital per tal de desenvolupar teràpies dirigides focalitzades a reduir la metastasi en aquests tipus de neoplàsies.

Les integrines han resultat ser àmbit d'estudi al llarg dels anys com a dianes atractives per la intervenció terapèutica gràcies a l'accessibilitat al lloc d'unió al lligand. S'han publicat estudis preclínic on mostren resultats prometedors amb molècules bloquejants específiques d'integrines, tals com els anticossos monoclonals intetumumab o abituzumab i el pèptid cíclic RGD Cilengitide. Tot i això, quan aquestes drogues s'han avaluat en diferents tipus de càncers en assaigs clínics, han mostrat una eficàcia moderada i cap d'elles ha estat aprovada de moment pel tractament del càncer. Per exemple, estudis *in vitro* i estudis preclínic van demostrar que la inhibició de les integrines seria eficient per sensibilitzar el càncer de mama i el glioblastoma a la radioteràpia [197, 198]. Malgrat això, addicionant el Cilengitide al tractament no es va aconseguir millorar la supervivència dels pacients amb glioblastoma en l'assaig clínic fase III realitzat. D'acord amb els resultats obtinguts, es va decidir aturar el desenvolupament del Cilengitide com a agent antitumoral, tot i que els autors no van descartar les integrines com una diana potencial pel glioblastoma [152]. Arran de la poca eficàcia del Cilengitide, s'ha obert pas al desenvolupament de nous antagonistes d'integrines amb patrons d'unió diferents. Gran part dels nous agents bloquejants pertanyen al grup de molècules petites inhibidores, i s'està treballant per al seu desenvolupament com a molècules anticanceroses en el tractament del glioblastoma [199].

Les estratègies terapèutiques actuals, incloent-hi el Cilengitide i tots els anticossos utilitzats fins al moment en assaigs clínics, s'han dissenyat per interferir en la interacció entre la integrina i el lligand. Hi ha noves evidències que descriuen que la senyalització mediada per les integrines pot efectuar-se en alguns casos independentment del lligand de la matriu extracel·lular [200]. D'aquest fet, sumat a les resistències que puguin arribar a desenvolupar les cèl·lules canceroses, n'ha sorgit la necessitat de desenvolupar noves estratègies terapèutiques alternatives, com la d'aprofitar el perfil específic d'expressió de les integrines en el tumor. Així doncs, s'està treballant en la línia d'utilitzar les integrines RGD com a antígens associats al tumor per lliurar de manera selectiva i específica agents antitumorals [201]. Per exemple, hi ha estudis positius en immunoteràpia, en els que es va desenvolupar un pèptid específic RGD fusionat amb el domini Fc de la immunoglobina G2a, i es va administrar juntament amb IL-2. Es va aconseguir activar la resposta de cèl·lules T CD8⁺ i cèl·lules NK i millorar la supervivència en models preclínic de melanoma, càncer de còlon i fibrosarcoma [202]. Tot i això, els resultats d'aquests estudis estan de moment en fase preclínica.

Malgrat que aquest treball s'ha centrat en la caracterització ██████████ de la integrina $\alpha 9\beta 1$, han sorgit projectes paral·lels d'inhibició *downstream*. Així, a causa de la complexitat de les funcions de les integrines i el seu *crossstalk* amb els factors de creixement, alguns autors

aposten per l'estratègia d'inhibir la senyalització de les integrines a través de molècules per sota d'elles més que les mateixes integrines, i FAK és, com ja hem comentat, una bona candidata [96]. D'altra banda, en els últims anys s'ha descrit que algunes de les vies de senyalització mediades per integrines estan implicades en el desenvolupament de resistència als medicaments [201]. A tall d'exemple, s'ha descrit la resistència de diferents càncers epitelials com els de pulmó, mama i pàncrees a inhibidors de receptors tirosina quinasa com l'erlotinib. S'ha observat com l'activació de la via no canònica de la integrina $\alpha v \beta 3$ pot donar lloc a la resistència i a la concessió de propietats de cèl·lules mare a les cèl·lules tumorals. Molecularment, la integrina $\alpha v \beta 3$ s'uneix a KRAS, que recluta Ra1B i TBK1, activen la via de senyalització NF κ B i promouen la malignitat cel·lular. A més, la capacitat de resistència a l'erlotinib és independent de la unió amb el lligand de la integrina. Els autors proposen una teràpia combinada de l'erlotinib juntament amb un inhibidor *downstream* de la via de senyalització de l' $\alpha v \beta 3$, per tal de sensibilitzar aquells tumors resistents a la inhibició dels receptors tirosina quinasa [203]. Així doncs, tot i el *crossstalk* que poden presentar les integrines amb els factors de creixement s'ha de tenir en compte les integrines com a una diana *per se* amb l'objectiu d'inhibir les vies cel·lulars que les integrines poden activar i donar lloc a la malignitat cel·lular.

A més de ser dianes terapèutiques, diverses integrines com l' $\alpha v \beta 3$, l' $\alpha v \beta 6$ i l' $\alpha 5 \beta 1$, són considerades sondes per estudis d'imatge del càncer per determinar el pronòstic i l'eficàcia dels tractaments. S'ha dut a terme un assaig clínic usant la imatge PET (*positron emission tomography*) per avaluar la càrrega tumoral i l'angiogènesi mitjançant un pèptid RGD específic per l' $\alpha v \beta 3$, i s'està duent a terme un altre assaig amb un pèptid específic contra l' $\alpha v \beta 6$ en pacients amb càncer pancreàtic per tal de detectar els tumors i avaluar la resposta al tractament [201].

En aquest treball doctoral s'ha aprofundit sobre el coneixement de la integrina $\alpha 9 \beta 1$ en el RMS i el NBL. S'ha demostrat la seva implicació en el comportament maligne de les cèl·lules tumorals, amb un paper moderat en el creixement cel·lular però un important rol en la invasió. Les integrines són dianes terapèutiques ideals per la seva fàcil accessibilitat com a receptors de superfície que interaccionen amb lligands extracel·lulars. [REDACTED]

[REDACTED] La nostra proposta i la nostra diana obre la porta a una nova modalitat de tractament. D'aquesta manera, una teràpia dirigida a la inhibició de la metàstasi podria contribuir a reduir el percentatge de

tumors primaris que intenten metastatitzar, amb l'objectiu de disminuir el tant per cent de pacients que experimenten recidives i augmentar la supervivència d'aquest grup. Cal destacar també l'amplitud que podria agafar aquest projecte, ja que no està restringit a un càncer específic sinó que seria aplicable a tots aquells càncers, tant pediàtric com d'adults, que presentessin la integrina $\alpha 9\beta 1$ com una proteïna proinvasiva.

6 | Conclusions

Primera. S'ha detectat una expressió significativa de la integrina $\alpha9\beta1$ en un terç del conjunt de les línies cel·lulars de RMS utilitzades i en la majoria dels tumors humans de RMS analitzats.

Segona. Els pacients amb RMS amb tinció positiva per la integrina $\alpha9\beta1$ tendeixen a presentar una menor supervivència.

Tercera. El 100% de les línies de NBL analitzades, totes elles pertanyents a l'estadi 4 de la malaltia, mostren una expressió elevada de la integrina $\alpha9\beta1$.

Quarta. La inhibició genètica de la integrina $\alpha9\beta1$ redueix modestament el creixement cel·lular *in vitro*.

Cinquena. La inhibició genètica de la integrina $\alpha9\beta1$ redueix la invasió *in vitro* i *in vivo*. Totes les línies positives per la integrina $\alpha9\beta1$ han mostrat una reducció significativa i robusta en la inhibició de la invasió.

Sisena. La inhibició genètica de la integrina $\alpha9\beta1$ disminueix els nivells de fosforilació de FAK sense afectar els nivells de FAK total.

Setena. El miR-7 i el miR-324 són dianes directes de la integrina $\alpha9\beta1$ i tenen la capacitat d'infraregular-la a nivell d'mRNA i proteïna.

Vuitena. El miR-7 presenta un efecte antiproliferatiu i antiinvasiu en les línies positives per la integrina $\alpha9\beta1$ de RMS. El miR-324 presenta un efecte antiproliferatiu i antiinvasiu més específic, exclusiu en la línia RD.

Novena. El miR-7 i el miR-324 provoquen una disminució de la fosforilació de FAK. El miR-7, a diferència del miR-324, també té efecte en la reducció dels nivells totals de FAK.

Desena. [Redacted]
[Redacted]

Onzena. [Redacted]
[Redacted]
[Redacted]

Dotzena. [Redacted]
[Redacted]

Tretzena. Amb el conjunt de resultats, una teràpia basada en la inhibició de la integrina $\alpha9\beta1$ podria reduir el potencial metastàtic de les cèl·lules tumorals.

Bibliografía

- [1] Bernard W. Stewart and Christopher P. Wild. World Cancer Report 2014. *IARC*, (224):630, 2014.
- [2] R Peris Bonet, E Pardo Romaguera, I Ríos Martín, N Sayas Sánchez, and S Valero Poveda. Registro Español de Tumores Infantiles. Cáncer infantil en España. Estadísticas 1980 - 2016. *Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad*, pages 1 – 75, 2017.
- [3] Melonie Heron. Deaths: Leading Causes for 2013. *National Vital Statistics Reports*, 65(2), 2016.
- [4] Gemma Gatta, Laura Botta, Silvia Rossi, Tiiu Aareleid, Magdalena Bielska-Lasota, Jacqueline Clavel, Nadya Dimitrova, Zsuzsanna Jakab, Peter Kaatsch, Brigitte Lacour, Sandra Mallone, Rafael Marcos-Gragera, Pamela Minicozzi, Maria José Sánchez-Pérez, Milena Sant, Mariano Santaquilani, Charles Stiller, Andrea Tavilla, Annalisa Trama, Otto Visser, and Rafael Peris-Bonet. Childhood cancer survival in Europe 1999-2007: Results of EUROCARE-5-a population-based study. *The Lancet Oncology*, 15(1):35–47, 2014.
- [5] American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2014. 2014.
- [6] X Chen, A Pappo, and M A Dyer. Pediatric solid tumor genomics and developmental pliancy. *Oncogene*, 34(41):5207–15, 2015.
- [7] John M Maris and Christopher T Denny. Focus on embryonal malignancies. *Cancer cell*, 2(6):447–50, dec 2002.
- [8] Jennifer Rushton and Dolores López-Terrada. Molecular and genetic basis of childhood cancer. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 9(1-6):211–34, 2010.
- [9] K Pritchard-Jones. Genetics of childhood cancer. *British medical bulletin*, 52(4):704–723, 1996.

-
- [10] G M Marshall, D R Carter, B B Cheung, T Liu, M K Mateos, J G Meyerowitz, and W A Weiss. The prenatal origins of cancer. *Nature reviews. Cancer*, 14(4):277–289, 2014.
- [11] Eva Steliarova-Foucher, Charles Stiller, Brigitte Lacour, and Peter Kaatsch. International classification of childhood cancer, third edition. *Cancer*, 103(7):1457–1467, 2005.
- [12] Zachary Burningham, Mia Hashibe, Logan Spector, and Joshua D Schiffman. The epidemiology of sarcoma. *Clinical sarcoma research*, 2(1):14, 2012.
- [13] Guy Lahat, Alexander Lazar, and Dina Lev. Sarcoma Epidemiology and Etiology: Potential Environmental and Genetic Factors. *Surgical Clinics of North America*, 88(3):451–481, 2008.
- [14] A. Muñoz Villa. Tumores óseos. Rbdomiosarcomas. *Pediatría Integral*, XVI(7):533–539, 2012.
- [15] F. Mertens C.D.M. Fletcher, K. Unni. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. *Cancer*, 177(3):1365–76, 2002.
- [16] S Gallego. Sarcoma de partes blandas. Sánchez de Toledo J, Ortega JJ. In *Manual práctico de hematología y oncología pediátricas*, pages 303–312. España. Ergon, 2010.
- [17] Roshni Dasgupta and David A. Rodeberg. Update on rhabdomyosarcoma. *Seminars in Pediatric Surgery*, 21(1):68–78, 2012.
- [18] Xin Sun, Wei Guo, Jacson K. Shen, Henry J. Mankin, Francis J. Hornicek, and Zhenfeng Duan. Rhabdomyosarcoma: Advances in Molecular and Cellular Biology. *Sarcoma*, 2015:1–14, 2015.
- [19] Arnold C Paulino and Mehmet Fatih Okcu. Rhabdomyosarcoma. *Current problems in cancer*, 32(1):7–34, 2008.
- [20] By William M Crist, James R Anderson, Jane L Meza, Christopher Fryer, R Beverly Raney, Frederick B Ruymann, John Breneman, Stephen J Qualman, Eugene Wiener, Moody Wharam, Thom Lobe, Bruce Webber, Harold M Maurer, and Sarah S Donaldson. Intergroup Rhabdomyosarcoma Study-IV: results for patients with nonmetastatic disease. *Journal of Clinical Oncology*, 19(12):3091–3102, 2001.

- [21] David Rodeberg and Charles Paidas. Childhood rhabdomyosarcoma. *Seminars in Pediatric Surgery*, 15(1):57–62, 2006.
- [22] R Dagher and L Helman. Rhabdomyosarcoma: an overview. *The oncologist*, 4(1):34–44, 1999.
- [23] Puneet Kaur, Anureet Kaur, Anil Kumar Suri, and Harsh Malik. Spindle Cell Variant of Embryonal Rhabdomyosarcoma: A Rare Entity with Diagnostic Challenges. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 10(8):ED17–8, aug 2016.
- [24] Sarah Jayne Carroll and Laurentia Nodit. Spindle cell rhabdomyosarcoma: A brief diagnostic review and differential diagnosis. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 137(8):1155–1158, 2013.
- [25] Julie C Robinson, Mary S Richardson, Brad W Neville, Terrence A Day, and Angela C Chi. Sclerosing rhabdomyosarcoma: report of a case arising in the head and neck of an adult and review of the literature. *Head and neck pathology*, 7(2):193–202, jun 2013.
- [26] Amandeep Kumar, Manmohan Singh, Mehar C Sharma, Sameer Bakshi, and Bhawani S Sharma. Pediatric sclerosing rhabdomyosarcomas: a review. *ISRN oncology*, 2014:640195, 2014.
- [27] Thomas Mentzel and Cornelius Kuhnen. Spindle cell rhabdomyosarcoma in adults: clinicopathological and immunohistochemical analysis of seven new cases. *Virchows Archiv. European Journal of Pathology*, 449(5):554–560, 2006.
- [28] Brian Belyea, Julie Grondin Kephart, Jordan Blum, David G Kirsch, and Corinne M Linardic. Embryonic signaling pathways and rhabdomyosarcoma: contributions to cancer development and opportunities for therapeutic targeting. *Sarcoma*, 2012:406239, 2012.
- [29] J. Roma, A. Masià, A. Almazán-Moga, M. Rebull, P. Velasco, S. Gallego, and J. Sánchez De Toledo. Translocaciones cromosómicas en los sarcomas de partes blandas: De la biología molecular a la aplicación clínica. *Anales de Pediatría*, 76(2), 2012.
- [30] Jack F. Shern, Li Chen, Juliann Chmielecki, Jun S. Wei, Rajesh Patidar, Mara Rosenberg, Lauren Ambrogio, Daniel Auclair, Jianjun Wang, Young K. Song, Catherine Tolman, Laura Hurd, Hongling Liao, Shile Zhang, Dominik Bogen, Andrew S. Brohl, Sivasish Sindiri, Daniel Catchpoole, Thomas Badgett, Gad Getz, Jaume Mora, James R. Anderson, Stephen X. Skapek, Frederic G. Barr, Matthew

- Meyerson, Douglas S. Hawkins, and Javed Khan. Comprehensive genomic analysis of rhabdomyosarcoma reveals a landscape of alterations affecting a common genetic axis in fusion-positive and fusion-negative tumors. *Cancer Discovery*, 4(2):216–231, 2014.
- [31] J A Bridge, J Liu, V Weibolt, K S Baker, D Perry, R Kruger, S Qualman, F Barr, P Sorensen, T Triche, and R Suijkerbuijk. Novel genomic imbalances in embryonal rhabdomyosarcoma revealed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization: an intergroup rhabdomyosarcoma study. *Genes, chromosomes & cancer*, 27(4):337–44, apr 2000.
- [32] S Zhan, D N Shapiro, and L J Helman. Activation of an imprinted allele of the insulin-like growth factor II gene implicated in rhabdomyosarcoma. *The Journal of clinical investigation*, 94(1):445–8, jul 1994.
- [33] Carla De Giovanni, Lorena Landuzzi, Giordano Nicoletti, Pier-Luigi Lollini, and Patrizia Nanni. Molecular and cellular biology of rhabdomyosarcoma. *Future Oncology*, 5(9):1449–1475, nov 2009.
- [34] N Tiffin, R D Williams, J Shipley, and K Pritchard-Jones. PAX7 expression in embryonal rhabdomyosarcoma suggests an origin in muscle satellite cells. *British journal of cancer*, 89(2):327–32, jul 2003.
- [35] Richard Sharp, Juan A. Recio, Chamelli Jhappan, Toshiyuki Otsuka, Shiquan Liu, Yanlin Yu, Wenjing Liu, Miriam Anver, Fariba Navid, Lee J. Helman, Ronald A. DePinho, and Glenn Merlino. Synergism between INK4a/ARF inactivation and aberrant HGF/SF signaling in rhabdomyosarcomagenesis. *Nature Medicine*, 8(11):1276–1280, oct 2002.
- [36] Brian P Rubin, Koichi Nishijo, Hung-I Harry Chen, Xiaolan Yi, David P Schuetze, Ranadip Pal, Suresh I Prajapati, Jinu Abraham, Benjamin R Arenkiel, Qing-Rong Chen, Sean Davis, Amanda T McCleish, Mario R Capecchi, Joel E Michalek, Lee Ann Zarzabal, Javed Khan, Zhongxin Yu, David M Parham, Frederic G Barr, Paul S Meltzer, Yidong Chen, and Charles Keller. Evidence for an unanticipated relationship between undifferentiated pleomorphic sarcoma and embryonal rhabdomyosarcoma. *Cancer cell*, 19(2):177–91, feb 2011.
- [37] Mark E. Hatley, Wei Tang, Matthew R. Garcia, David Finkelstein, Douglas P. Millay, Ning Liu, Jonathan Graff, Rene L. Galindo, and Eric N. Olson. A Mouse Model of Rhabdomyosarcoma Originating from the Adipocyte Lineage. *Cancer Cell*, 22(4):536–546, 2012.

- [38] Charles Keller, Mark S Hansen, Cheryl M Coffin, and Mario R Capecchi. Pax3 : Fkhr interferes with function : implications for alveolar rhabdomyosarcoma cell of origin. *Genes & development*, (18):2608–2613, 2004.
- [39] Charles Keller, Benjamin R Arenkiel, Cheryl M Coffin, Nabeel El-bardeesy, Ronald a Depinho, and Mario R Capecchi. Alveolar rhabdomyosarcomas in conditional Pax3:Fkhr mice: cooperativity of Ink4a/ARF and Trp53 loss of function. *Genes & Development*, 18:2614–2626, 2004.
- [40] Yue Xin Ren, Friedrich Graf Finckenstein, Diana A. Abdueva, Violette Shahbazian, Brile Chung, Kenneth I. Weinberg, Timothy J. Triche, Hiroyuki Shimada, and Michael J. Anderson. Mouse mesenchymal stem cells expressing PAX-FKHR form alveolar rhabdomyosarcomas by cooperating with secondary mutations. *Cancer Research*, 68(16):6587–6597, 2008.
- [41] Elizabeth Charytonowicz, Carlos Cordon-Cardo, Igor Matushansky, and Mel Ziman. Alveolar rhabdomyosarcoma: Is the cell of origin a mesenchymal stem cell? *Cancer Letters*, 279(2):126–136, 2009.
- [42] Poul H B Sorensen, James C Lynch, Stephen J Qualman, Roberto Tirabosco, Jerian F Lim, Harold M Maurer, Julia A Bridge, William M Crist, Timothy J Triche, and Frederic G Barr. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR Gene Fusions Are Prognostic Indicators in Alveolar Rhabdomyosarcoma: A Report From the Children’s Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*, 20(11):2672–2679, 2002.
- [43] By Alberto S Pappo, James R Anderson, William M Crist, Moody D Wharam, Phillip P Breitfeld, Douglas Hawkins, R Beverly Raney, Richard B Womer, David M Parham, Steven J Qualman, and Holcombe E Grier. Survival After Relapse in Children and Adolescents With Rhabdomyosarcoma: A Report From the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, 17(11):3487–3493, 1999.
- [44] John M. Maris, Michael D. Hogarty, Rochelle Bagatell, and Susan L. Cohn. Neuroblastoma. *Lancet*, 369(9579):2106–2120, 2007.
- [45] Meredith S. Irwin and Julie R. Park. Neuroblastoma: Paradigm for precision medicine. *Pediatric Clinics of North America*, 62(1):225–256, 2015.
- [46] Julia E. Heck, Beate Ritz, Rayjean J. Hung, Mia Hashibe, and Paolo Boffetta. The epidemiology of neuroblastoma: A review. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 23(2):125–143, 2009.

-
- [47] Sarah B. Whittle, Valeria Smith, Erin Doherty, Sibao Zhao, Scott McCarty, and Peter E. Zage. Overview and recent advances in the treatment of neuroblastoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 2017.
- [48] J Sánchez de Toledo Codina and J.J. Ortega Aramburu. Neuroblastoma. In *Manual práctico de hematología y oncología pediátricas*, chapter 22, pages 281–290. 2010.
- [49] Ingrid Ora and Angelika Eggert. Progress in treatment and risk stratification of neuroblastoma: Impact on future clinical and basic research. *Seminars in Cancer Biology*, 21(4):217–228, 2011.
- [50] G M Brodeur, J Pritchard, F Berthold, N L Carlsen, V Castel, R P Castelberry, B De Bernardi, A E Evans, M Favrot, and F Hedborg. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 11(8):1466–77, aug 1993.
- [51] H Shimada, J Chatten, W A Newton, N Sachs, A B Hamoudi, T Chiba, H B Marsden, and K Misugi. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 73(2):405–16, aug 1984.
- [52] Hiroyuki Shimada, Umehara Shunsuke, Yoichi Hachitanda, Atsuko Nakagawa, Shoko Goto, Robert B. Gerbing, Daniel O. Stram, John N. Lukens, and Katherine K. Matthay. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children’s Cancer Group. *American Cancer Society*, 92(9):2451–2461, 2001.
- [53] Garrett M. Brodeur. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature Reviews Cancer*, 3(3):203–216, 2003.
- [54] Hiroyuki Shimada and Inge M Ambros. Pathology of Peripheral Neuroblastic Tumors. In Nai-Kong V. Cheung and Susan L. Cohn, editors, *Neuroblastoma*, chapter 8, pages 87–95. Springer, 2005.
- [55] Martin Eilers and Robert N Eisenman. Myc’s broad reach. *Genes & development*, 22(20):2755–66, oct 2008.
- [56] Maria Rosaria Esposito, Sanja Aveic, Anke Seydel, and Gian Paolo Tonini. Neuroblastoma treatment in the post-genomic era. *Journal of biomedical science*, 24(1):14, feb 2017.

- [57] Anna M Azarova, Gargi Gautam, and Rani E George. Emerging importance of ALK in neuroblastoma. *Seminars in cancer biology*, 21(4):267–75, oct 2011.
- [58] N K Cheung and M A Dyer. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nature reviews. Cancer*, 13(6):397–411, 2013.
- [59] Vera van Limpt, Alexander Schramm, Arjan Lakeman, Peter van Sluis, Alvin Chan, Max van Noesel, Frank Baas, Huib Caron, Angelika Eggert, and Rogier Versteeg. The Phox2B homeobox gene is mutated in sporadic neuroblastomas. *Oncogene*, 23(57):9280–8, oct 2004.
- [60] Yoshiko Takahashi, Douglas Sipp, and Hideki Enomoto. Tissue interactions in neural crest cell development and disease. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6148):860–3, aug 2013.
- [61] Hervé Acloque, Meghan S. Adams, Katherine Fishwick, Marianne Bronner-Fraser, and M. Angela Nieto. Epithelial-mesenchymal transitions: The importance of changing cell state in development and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 119(6):1438–1449, 2009.
- [62] Eric Theveneau and Roberto Mayor. Neural crest delamination and migration: From epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Developmental Biology*, 366(1):34–54, 2012.
- [63] Pablo H Strobl-Mazzulla and Marianne E Bronner. Epithelial to mesenchymal transition: new and old insights from the classical neural crest model. *Seminar Cancer Biology*, 100(2):130–134, 2012.
- [64] K Shyamala, Sarita Yanduri, H C Girish, and Sanjay Murgod. Neural crest: The fourth germ layer. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*, 19(2):221–9, 2015.
- [65] Laura Kerosuo and Marianne Bronner-Fraser. What is bad in cancer is good in the embryo: Importance of EMT in neural crest development. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 23(3):320–332, 2012.
- [66] Alexander Gheldof and Geert Berx. Cadherins and epithelial-to-mesenchymal transition. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 116:317–336, 2013.
- [67] John Inge Johnsen, Per Kogner, Ami Albiñ, and Marie Arsenian Henriksson. Embryonal neural tumours and cell death. *Apoptosis*, 14(4):424–438, 2009.

- [68] G M Brodeur, R C Seeger, A Barrett, F Berthold, R P Castleberry, G D'Angio, B De Bernardi, A E Evans, M Favrot, and A I Freeman. International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 6(12):1874–81, dec 1988.
- [69] Susan L. Cohn, Andrew D J Pearson, Wendy B. London, Tom Monclair, Peter F. Ambros, Garrett M. Brodeur, Andreas Faldum, Barbara Hero, Tomoko Iehara, David Machin, Veronique Mosseri, Thorsten Simon, Alberto Garaventa, Victoria Castel, and Katherine K. Matthay. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: An INRG task force report. *Journal of Clinical Oncology*, 27(2):289–297, 2009.
- [70] Tom Monclair, Garrett M. Brodeur, Peter F. Ambros, Hervé J. Brisse, Giovanni Cecchetto, Keith Holmes, Michio Kaneko, Wendy B. London, Katherine K. Matthay, Jed G. Nuchtern, Dietrich Von Schweinitz, Thorsten Simon, Susan L. Cohn, and Andrew D J Pearson. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: An INRG Task Force report. *Journal of Clinical Oncology*, 27(2):298–303, 2009.
- [71] Wendy B London, Victoria Castel, Tom Monclair, Peter F Ambros, Andrew D J Pearson, Susan L Cohn, Frank Berthold, Akira Nakagawara, Ruth L Ladenstein, Tomoko Iehara, and Katherine K Matthay. Clinical and biologic features predictive of survival after relapse of neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group project. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(24):3286–92, aug 2011.
- [72] John M Maris. Recent advances in neuroblastoma. *The New England journal of medicine*, 362(23):2202–11, jun 2010.
- [73] Lucas Moreno, Herve Rubie, Amalia Varo, Marie Cecile Le Deley, Loredana Amoroso, Aurelie Chevance, Alberto Garaventa, Marion Gambart, Francisco Bautista, Dominique Valteau-Couanet, Birgit Geoerger, Gilles Vassal, Xavier Paoletti, and Andrew D J Pearson. Outcome of children with relapsed or refractory neuroblastoma: A meta-analysis of ITCC/SIOPEN European phase II clinical trials. *Pediatric Blood and Cancer*, 64(1):25–31, 2017.
- [74] S Paget. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer metastasis reviews*, 8(2):98–101, aug 1989.

- [75] Isaiah J. Fidler and George Poste. The "seed and soil" hypothesis revisited. *The Lancet Oncology*, 9(8):808, 2008.
- [76] Isaiah J. Fidler. Critical Determinants of Metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, 12(2):89–96, 2002.
- [77] Wenjun Guo and Filippo G Giancotti. Integrin signalling during tumour progression. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(10):816–826, 2004.
- [78] Kandice R Levental, Hongmei Yu, Laura Kass, Johnathon N Lakins, Mikala Egeblad, Janine T Erler, Sheri F T Fong, Katalin Csiszar, Amato Giaccia, Wolfgang Weninger, Mitsuo Yamauchi, David L Gasser, and Valerie M Weaver. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell*, 139(5):891–906, nov 2009.
- [79] Daniela F Quail and Johanna A Joyce. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine*, 19(11):1423–37, nov 2013.
- [80] Liling Wan, Klaus Pantel, and Yibin Kang. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. *Nature Medicine*, 19(11):1450–1464, 2013.
- [81] Nicolas Reymond, Jae Hong Im, Ritu Garg, Francisco M Vega, Barbara Borda d'Agua, Philippe Riou, Susan Cox, Ferran Valderrama, Ruth J Muschel, and Anne J Ridley. Cdc42 promotes transendothelial migration of cancer cells through $\beta 1$ integrin. *The Journal of cell biology*, 199(4):653–68, nov 2012.
- [82] Patricia S. Steeg. Targeting metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 16(4):201–218, 2016.
- [83] Lida a Mina and George W Sledge. Rethinking the metastatic cascade as a therapeutic target. *Nature reviews. Clinical oncology*, 8(6):325–332, 2011.
- [84] María Soledad Sosa, Paloma Bragado, and Julio A Aguirre-Ghiso. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nature reviews. Cancer*, 14(9):611–22, sep 2014.
- [85] Scott Valastyan and Robert A. Weinberg. Tumor Metastasis : Molecular Insights and Evolving Paradigms. 147(2):275–292, 2012.
- [86] James E Talmadge and Isaiah J. Fidler. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective James. *Cancer Research*, 70(14):5649–5669, 2010.

-
- [87] Gaorav P. Gupta and Joan Massagué. Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell*, 127(4):679–695, 2006.
- [88] Yoshikazu Takada, Xiaojing Ye, and Scott Simon. The integrins. *Genome biology*, 8(5):215, 2007.
- [89] T.-L. Tong-Lay Lau, Chungho Kim, Mark H Ginsberg, and Tobias S Ulmer. The structure of the integrin α IIb β 3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *The EMBO journal*, 28(9):1351–1361, 2009.
- [90] Malgorzata Barczyk, Sergio Carracedo, and Donald Gullberg. Integrins. *Cell and Tissue Research*, 339(1):269–280, 2010.
- [91] Sanford J. Shattil, Chungho Kim, and Mark H. Ginsberg. The final steps of integrin activation: the end game. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(4):288–300, 2010.
- [92] Kun Zhang and JianFeng Chen. The regulation of integrin function by divalent cations. *Cell Adhesion and Migration*, 6(1):20–29, 2012.
- [93] Richard O Hynes. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, 110:673–687, 2002.
- [94] Melissa Millard, Srinivas Odde, and Nouri Neamati. Integrin targeted therapeutics. *Theranostics*, 1:154–88, feb 2011.
- [95] Jihe Zhao and Jun-Lin Guan. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer & Metastasis Reviews*, 2009(January):35–49, 2009.
- [96] Hellyeh Hamidi, Mika Pietilä, and Johanna Ivaska. The complexity of integrins in cancer and new scopes for therapeutic targeting. *British Journal of Cancer*, (August):1017–1023, 2016.
- [97] Kyle R Legate, Sara a Wickström, Reinhard Fässler, Reinhard Fa, and Sara a Wickstro. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. pages 397–418, 2009.
- [98] F. Ye, C. Kim, and M. H. Ginsberg. Molecular mechanism of inside-out integrin regulation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9(1 S):20–25, 2011.
- [99] Satyajit K. Mitra and David D. Schlaepfer. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(5):516–523, 2006.

- [100] Brian Y. Lee, Paul Timpson, Lisa G. Horvath, and Roger J. Daly. FAK signaling in human cancer as a target for therapeutics. *Pharmacology & therapeutics*, 146:132–149, 2015.
- [101] Florian J Sulzmaier, Christine Jean, and David D Schlaepfer. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nature reviews. Cancer*, 14(9):598–610, sep 2014.
- [102] Johanna Ivaska and Jyrki Heino. Cooperation Between Integrins and Growth Factor Receptors in Signaling and Endocytosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1):291–320, 2011.
- [103] Elise L. Palmer, Curzio Rüegg, Ronald Ferrando, Robert Pytela, and Dean Sheppard. Sequence and tissue distribution of the integrin $\alpha 9$ subunit, a novel partner $\beta 1$ that is widely distributed in epithelia and muscle. *Journal of Cell Biology*, 124(3), dec 1994.
- [104] Anette M. Høyve, John R. Couchman, Ulla M. Wewer, Kiyoko Fukami, and Atsuko Yoneda. The newcomer in the integrin family: Integrin $\alpha 9$ in biology and cancer. *Advances in Biological Regulation*, 52(2):326–339, 2012.
- [105] Magnus C. Lydolph, Marie Morgan-Fisher, Anette M. Høyve, John R. Couchman, Ulla M. Wewer, and Atsuko Yoneda. $\alpha 9\beta 1$ Integrin in melanoma cells can signal different adhesion states for migration and anchorage. *Experimental Cell Research*, 315(19):3312–3324, 2009.
- [106] Shigeyuki Kon, Amha Atakilit, and Dean Sheppard. Short form of $\alpha 9$ promotes $\alpha 9\beta 1$ integrin-dependent cell adhesion by modulating the function of the full-length $\alpha 9$ subunit. *Experimental Cell Research*, 317(12):1774–1784, 2011.
- [107] Joaquín Arribas, Joan J. Bech-Serra, and Belén Santiago-Josefat. ADAMs, cell migration and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(1):57–68, 2006.
- [108] Koji Eto, Clotilde Huet, Takehiko Tarui, Sergey Kupriyanov, Hai Zhen Liu, Wilma Puzon-McLaughlin, Xi Ping Zhang, Dean Sheppard, Eva Engvall, and Yoshikazu Takada. Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin $\alpha 9\beta 1$. Implications for sperm-egg binding and other cell interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 277(20):17804–17810, 2002.
- [109] Yung-Feng Liao, Philip J Gotwals, Victor E Koteliensky, Dean Sheppard, and Livingston Van De Water. The EIIIA Segment of Fibronectin Is a Ligand for

- Integrins alpha 9beta 1 and alpha 4beta 1 Providing a Novel Mechanism for Regulating Cell Adhesion by Alternative Splicing. *Journal of Biological Chemistry*, 227(17):14467–14474, 2002.
- [110] Arti V Shinde, Christopher Bystroff, Chunyu Wang, Mariette G Vogelesang, Peter A Vincent, Richard O Hynes, and Livingston Van De Water. Identification of the peptide sequences within the EIIIA (EDA) segment of fibronectin that mediate integrin alpha9beta1-dependent cellular activities. 283(5):2858–2870, 2008.
- [111] Eleni Bazigou, Sherry Xie, Chun Chen, Anne Weston, Naoyuki Miura, Lydia Sorokin, Ralf Adams, Andrés F. Muro, Dean Sheppard, and Taija Makinen. Integrin- α 9 Is Required for Fibronectin Matrix Assembly during Lymphatic Valve Morphogenesis. *Developmental Cell*, 17(2):175–186, 2009.
- [112] Y Yokosaki, E L Palmer, a L Prieto, K L Crossin, M a Bourdon, R Pytela, and D Sheppard. The integrin alpha 9 beta 1 mediates cell attachment to a non-RGD site in the third fibronectin type III repeat of tenascin. *The Journal of biological chemistry*, 269(43):26691–26696, 1994.
- [113] Norihisa Nishimichi, Fumiko Higashikawa, Hiromi H Kinoh, Yoshiko Tateishi, Haruo Matsuda, and Yasuyuki Yokosaki. Polymeric osteopontin employs integrin alpha9beta1 as a receptor and attracts neutrophils by presenting a de novo binding site. *The Journal of biological chemistry*, 284(22):14769–76, may 2009.
- [114] Carla Danussi, Alessandra Petrucco, Bruna Wassermann, Eliana Pivetta, Teresa Maria Elisa Modica, Lisa Del Bel Belluz, Alfonso Colombatti, and Paola Spessotto. EMILIN1- α 4/ α 9 integrin interaction inhibits dermal fibroblast and keratinocyte proliferation. *The Journal of Cell Biology*, 195(1):131–145, oct 2011.
- [115] Carla Danussi, Lisa Del Bel Belluz, Eliana Pivetta, Teresa Maria Elisa Modica, Andres Muro, Bruna Wassermann, Roberto Doliana, Patrizia Sabatelli, Alfonso Colombatti, and Paola Spessotto. EMILIN1- α 9 β 1 integrin interaction is crucial in lymphatic valve formation and maintenance. *Molecular and cellular biology*, 33(22):4381–94, nov 2013.
- [116] Teresa Maria Elisa Modica, Orlando Maiorani, Giulio Sartori, Eliana Pivetta, Roberto Doliana, Alessandra Capuano, Alfonso Colombatti, and Paola Spessotto. The extracellular matrix protein EMILIN1 silences the RAS-ERK pathway via α 4 β 1 integrin and decreases tumor cell growth. 8(16):27034–27046, 2017.

- [117] Yasuyuki Taooka, John Chen, Ted Yednock, and Dean Sheppard. The Integrin $\alpha 9\beta 1$ Mediates Adhesion to Activated Endothelial Cells and Transendothelial Neutrophil Migration through Interaction with Vascular Cell Adhesion Molecule-1. *The Journal of Cell Biology*, 145(2), 1999.
- [118] E. A. Ross, Mike R Douglas, See Heng Wong, Emma J Ross, S John Curnow, Gerard B Nash, Ed Rainger, Dagmar Scheel-Toellner, Janet M Lord, Mike Salmon, and Christopher D Buckley. Interaction between integrin alpha9beta1 and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) inhibits neutrophil apoptosis. *Blood*, 107(3):1178–1183, oct 2005.
- [119] Izabela Staniszevska, Ilker K. Sariyer, Shimon Lecht, Meghan C. Brown, Erin M. Walsh, George P. Tuszynski, Mahmut Safak, Philip Lazarovici, and Cezary Marcinkiewicz. Integrin $\alpha 9\beta 1$ is a receptor for nerve growth factor and other neurotrophins. *Journal of Cell Science*, 121(4):504–513, feb 2008.
- [120] Erin M. Ventresca, Shimon Lecht, Piotr Jakubowski, Rachel A. Chiaverelli, Michael Weaver, Luis Del Valle, Keren Ettinger, Galit Gincberg, Avi Priel, Alex Braiman, Philip Lazarovici, Peter I. Lelkes, and Cezary Marcinkiewicz. Association of p75NTR and $\alpha 9\beta 1$ integrin modulates NGF-dependent cellular responses. *Cellular Signalling*, 27(6):1225–1236, jun 2015.
- [121] Erin M. Walsh and Cezary Marcinkiewicz. Non-RGD-containing snake venom disintegrins, functional and structural relations. *Toxicon*, 58(4):355–362, 2011.
- [122] Shikhar Sharma, Theresa K Kelly, and Peter A Jones. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1):27–36, jan 2010.
- [123] Vladimir Kashuba, Alexey A. Dmitriev, George S. Krasnov, Tatiana Pavlova, Ilya Ignatjev, Vasily V. Gordiyuk, Anna V. Gerashchenko, Eleonora A. Braga, Surya P. Yenamandra, Michael Lerman, Vera N. Senchenko, and Eugene Zabarovsky. Noti microarrays: Novel epigenetic markers for early detection and prognosis of high grade serous ovarian cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(10):13352–13377, 2012.
- [124] G V Gerashchenko, V V Gordiyuk, I Ya Skrypkina, S M Kvasha, O O Kolesnik, D D Ugryn, T V Pavlova, E R Zabarovsky, A V Rynditch, and V I Kashuba. Screening of epigenetic and genetic disturbances of human chromosome 3 genes in colorectal cancer. *Ukrains'kyi biokhimichnyi zhurnal*, 81(4):81–7, 1999.

- [125] Amlan Ghosh, Susmita Ghosh, Guru Prasad Maiti, Mohammad Golam Sabbir, Eugene R. Zabarovsky, Anup Roy, Susanta Roychoudhury, and Chinmay Kumar Panda. Frequent alterations of the candidate genes hMLH1, ITGA9 and RBSP3 in early dysplastic lesions of head and neck: Clinical and prognostic significance. *Cancer Science*, 101(6):1511–1520, 2010.
- [126] Luydmila A. Mostovich, Tatiana Y. Prudnikova, Aleksandr G. Kondratov, Dina Loginova, Pavel V. Vavilov, Valentina I. Rykova, Sergei V. Sidorov, Tatiana V. Pavlova, Vladimir I. Kashuba, Eugene R. Zabarovsky, and Elvira V. Grigorieva. Integrin alpha9 (ITGA9) expression and epigenetic silencing in human breast tumors. *Cell Adhesion and Migration*, 5(5):395–401, 2011.
- [127] Vera N. Senchenko, Natalia P. Kisseljova, Tatyana A. Ivanova, Alexey A. Dmitriev, George S. Krasnov, Anna V. Kudryavtseva, Grigory V. Panasenko, Evgeny B. Tsitrin, Michael I. Lerman, Fyodor L. Kissel'jov, Vladimir I. Kashuba, and Eugene R. Zabarovsky. Novel tumor suppressor candidates on chromosome 3 revealed by NotI-microarrays in cervical cancer. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*, 8(4):409–420, 2013.
- [128] Alexey A. Dmitriev, Vladimir I. Kashuba, Klas Haraldson, Vera N. Senchenko, Tatiana V. Pavlova, Anna V. Kudryavtseva, Ekaterina A. Anedchenko, George S. Krasnov, Irina V. Pronina, Vitalij I. Loginov, Tatiana T. Kondratieva, Tatiana P. Kazubskaya, Eleonora A. Braga, Surya P. Yenamandra, Ilya Ignat'jev, Ingemar Ernberg, George Klein, Michael I. Lerman, and Eugene R. Zabarovsky. Genetic and epigenetic analysis of non-small cell lung cancer with NotI-microarrays. *Epigenetics*, 7(5):502–513, 2012.
- [129] Imran Nawaz, Li-Fu Hu, Zi-Ming Du, Khalid Moumad, Ilya Ignatyev, Tatiana V. Pavlova, Vladimir Kashuba, Malin Almgren, Eugene R. Zabarovsky, and Ingemar Ernberg. Integrin $\alpha 9$ gene promoter is hypermethylated and downregulated in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*, 6(31):31493–31507, 2015.
- [130] K Hibi, K Yamakawa, R Ueda, Y Horio, Y Murata, M Tamari, K Uchida, T Takahashi, Y Nakamura, and T Takahashi. Aberrant upregulation of a novel integrin alpha subunit gene at 3p21.3 in small cell lung cancer. *Oncogene*, 9(2):611–9, feb 1994.
- [131] S K Gupta, S Oommen, M-C Aubry, B P Williams, and N E Vlahakis. Integrin $\alpha 9\beta 1$ promotes malignant tumor growth and metastasis by potentiating epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*, 32(2):141–150, 2013.

- [132] Michael D. Allen, Reza Vaziri, Michael Green, Claude Chelala, Adam R. Brentnall, Sally Dreger, Sabarinath Vallath, Harriet Nitch-Smith, Jane Hayward, Robert Carpenter, Deborah L. Holliday, Rosemary A. Walker, Ian R. Hart, and J. Louise Jones. Clinical and functional significance of $\alpha 9\beta 1$ integrin expression in breast cancer: A novel cell-surface marker of the basal phenotype that promotes tumour cell invasion. *Journal of Pathology*, 223(5):646–658, 2011.
- [133] Nuria Basora, Nathalie Desloges, Qing Chang, Yamina Bouatrouss, Jean Gosselin, Jacques Poisson, Dean Sheppard, and Jean Francois Beaulieu. Expression of the alpha9beta1 integrin in human colonic epithelial cells: Resurgence of the fetal phenotype in a subset of colon cancers and adenocarcinoma cell lines. *International Journal of Cancer*, 75(5):738–743, 1998.
- [134] Juanjuan Ou, Yuan Peng, Jia Deng, Hongming Miao, Jie Zhou, Lin Zha, Rongbin Zhou, Liqing Yu, Hang Shi, and Houjie Liang. Endothelial cell-derived-fibronectin extra domain A promotes colorectal cancer metastasis via inducing epithelialmesenchymal transition. *Carcinogenesis*, 35(7):1661–1670, 2014.
- [135] Meghan C Brown, Izabela Staniszevska, Philip Lazarovici, George P Tuszynski, Luis Del Valle, and Cezary Marcinkiewicz. Regulatory effect of nerve growth factor in alpha9beta1 integrin-dependent progression of glioblastoma. *Neuro-oncology*, 10(6):968–80, dec 2008.
- [136] S Kale, R Raja, D Thorat, G Soundararajan, T V Patil, and G C Kundu. Osteopontin signaling upregulates cyclooxygenase-2 expression in tumor-associated macrophages leading to enhanced angiogenesis and melanoma growth via $\alpha 9\beta 1$ integrin. *Oncogene*, 33(18):2295–2306, 2014.
- [137] Juanjuan Ou, Jianjun Li, Feng Pan, Ganfeng Xie, Qi Zhou, Haihui Huang, and Houjie Liang. Endostatin suppresses colorectal tumor-induced lymphangiogenesis by inhibiting expression of fibronectin extra domain a and integrin $\alpha 9$. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(8):2106–2114, 2011.
- [138] Daichi Ota, Masashi Kanayama, Yutaka Matsui, Koyu Ito, Naoyoshi Maeda, Goro Kutomi, Koichi Hirata, Toshihiko Torigoe, Noriyuki Sato, Akinori Takaoka, Ann F. Chambers, Junko Morimoto, and Toshimitsu Uede. Tumor- $\alpha 9\beta 1$ integrin-mediated signaling induces breast cancer growth and lymphatic metastasis via the recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Journal of Molecular Medicine*, 92(12):1271–1281, 2014.

- [139] A Masià, A Almazán-Moga, P Velasco, J Reventós, N Torán, J Sánchez de Toledo, J Roma, and S Gallego. Notch-mediated induction of N-cadherin and $\alpha 9$ -integrin confers higher invasive phenotype on rhabdomyosarcoma cells. *British Journal of Cancer*, 107(8):1374–1383, 2012.
- [140] Paul Fiorilli, Darren Partridge, Izabela Staniszevska, Jin Y Wang, Maja Grabacka, Kelvin So, Cezary Marcinkiewicz, Krzysztof Reiss, Kamel Khalili, and Sidney E Croul. Integrins mediate adhesion of medulloblastoma cells to tenascin and activate pathways associated with survival and proliferation. 88(11):1143–1156, 2009.
- [141] Simon L. Goodman and Martin Picard. Integrins as therapeutic targets. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(7):405–412, 2012.
- [142] Klaus Ley, Jesus Rivera-Nieves, William J Sandborn, and Sanford Shattil. Integrin-based Therapeutics: Biological Basis, Clinical Use and New Drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(3):173–183, 2016.
- [143] Sumit Goswami. Importance of integrin receptors in the field of pharmaceutical & medical science. *Advances in Biological Chemistry*, 3(2):224–252, 2013.
- [144] Salah Almokadem and Chandra P Belani. Volociximab in cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 12(2):251–257, feb 2012.
- [145] Peter Hersey, Jeffrey Sosman, Steven O’Day, Jon Richards, Agop Bedikian, Rene Gonzalez, William Sharfman, Robert Weber, Theodore Logan, Manuela Buzoianu, Luz Hammershaimb, John M Kirkwood, and Etaracizumab Melanoma Study Group. A randomized phase 2 study of etaracizumab, a monoclonal antibody against integrin $\alpha(v)\beta(3)$, + or - dacarbazine in patients with stage IV metastatic melanoma. *Cancer*, 116(6):1526–34, mar 2010.
- [146] A. Heidenreich, S. K. Rawal, K. Szkarlat, N. Bogdanova, L. Dirix, A. Stenzl, M. Welslau, G. Wang, F. Dawkins, C. J. De boer, and D. Schrijvers. A randomized, double-blind, multicenter, phase 2 study of a human monoclonal antibody to human αv integrins (intetumumab) in combination with docetaxel and prednisone for the first-line treatment of patients with metastatic castration-resistant prostate c. *Annals of Oncology*, 24(2):329–336, 2013.
- [147] S O’Day, A Pavlick, C Loquai, D Lawson, R Gutzmer, J Richards, D Schadendorf, J A Thompson, R Gonzalez, U Trefzer, P Mohr, C Ottensmeier, D Chao, B Zhong, C J de Boer, C Uhlir, D Marshall, M E Gore, Z Lang, W Hait, P Ho, and CNTO

- 95 Investigators. A randomised, phase II study of intetumumab, an anti- αv -integrin mAb, alone and with dacarbazine in stage IV melanoma. *British Journal of Cancer*, 105(3):346–352, jul 2011.
- [148] E. Élez, I. Kocáková, T. Höhler, U. M. Martens, C. Bokemeyer, E. Van Cutsem, B. Melichar, M. Smakal, T. Csoszi, E. Topuzov, R. Orlova, S. Tjulandin, F. Rivera, J. Straub, R. Bruns, S. Quaratino, and J. Taberero. Abituzumab combined with cetuximab plus irinotecan versus cetuximab plus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: the randomised phase I/II POSEIDON trial. *Annals of Oncology*, 26(1):132–140, jan 2015.
- [149] Ajjai Alva, Susan Slovin, Stephanie Daignault, Michael Carducci, Robert DiPaola, Ken Pienta, David Agus, Kathleen Cooney, Alice Chen, David C. Smith, and Maha Hussain. Phase II study of Cilengitide (EMD 121974, NSC 707544) in patients with non-metastatic castration resistant prostate cancer, NCI-6735. A study by the DOD/PCF prostate cancer clinical trials consortium. *Investigational New Drugs*, 30(2):749–757, apr 2012.
- [150] Deborah A. Bradley, Stephanie Daignault, Charles J. Ryan, Robert S. DiPaola, David C. Smith, Eric Small, Mitchell E. Gross, Mark N. Stein, Alice Chen, and Maha Hussain. Cilengitide (EMD 121974, NSC 707544) in asymptomatic metastatic castration resistant prostate cancer patients: a randomized phase II trial by the prostate cancer clinical trials consortium. *Investigational New Drugs*, 29(6):1432–1440, dec 2011.
- [151] J. Vansteenkiste, F. Barlesi, C. F. Waller, J. Bennouna, C. Gridelli, E. Goekkurt, D. Verhoeven, A. Szczesna, M. Feurer, J. Milanowski, P. Germonpre, H. Lena, D. Atanackovic, M. Krzakowski, C. Hicking, J. Straub, M. Picard, W. Schuette, and K. O’Byrne. Cilengitide combined with cetuximab and platinum-based chemotherapy as first-line treatment in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients: results of an open-label, randomized, controlled phase II study (CERTO). *Annals of Oncology*, 26(8):1734–1740, aug 2015.
- [152] Roger Stupp, Monika E Hegi, Thierry Gorlia, Sara C Erridge, James Perry, Yong-Kil Hong, Kenneth D Aldape, Benoit Lhermitte, Torsten Pietsch, Danica Grujicic, Joachim Peter Steinbach, Wolfgang Wick, Rafał Tarnawski, Do-Hyun Nam, Peter Hau, Astrid Weyerbrock, Martin J B Taphoorn, Chiung-Chyi Shen, Nalini Rao, László Thurzo, Ulrich Herrlinger, Tejpal Gupta, Rolf-Dieter Kortmann, Krystyna Adamska, Catherine McBain, Alba A Brandes, Joerg Christian Tonn, Oliver Schnell, Thomas Wiegel, Chae-Yong Kim, Louis Burt Nabors, David A Reardon, Martin J van den

- Bent, Christine Hicking, Andriy Markivskyy, Martin Picard, Michael Weller, European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC), Canadian Brain Tumor Consortium, and CENTRIC study team. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 15(10):1100–8, sep 2014.
- [153] K J Livak and T D Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25:402–408, 2001.
- [154] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1):265–275, 1951.
- [155] Josep Roma, Anna Masià, Jaume Reventós, Josep Sánchez De Toledo, and Soledad Gallego. Notch pathway inhibition significantly reduces rhabdomyosarcoma invasiveness and mobility in vitro. *Clinical Cancer Research*, 17(3):505–513, 2011.
- [156] Pingyu Zhang, Yanwen Yang, Patrick A. Zweidler-McKay, and Dennis P M Hughes. Critical role of notch signaling in osteosarcoma invasion and metastasis. *Clinical Cancer Research*, 14(10):2962–2969, 2008.
- [157] Jeanette D Walton, David R Kattan, Sharon K Thomas, Barbara A Spengler, Hong-Fen Guo, June L Biedler, Nai-Kong V Cheung, and Robert A Ross. Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 6(6):838–45, 2004.
- [158] QX Li, F Li, W Zhang, X Liu, YQ Ma, XL Shi, and N Miao. [Profile of chromosomal imbalances in 10 cases of primary alveolar rhabdomyosarcoma analyzed by comparative genomic hybridization]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 8:571–6, 2009.
- [159] Qiao-xin Li, Chun-xia Liu, Cai-pu Chun, Yan Qi, Bin Chang, Xin-xia Li, Yun-zhao Chen, Wei-xia Nong, Hong-an Li, and Feng Li. Chromosomal imbalances revealed in primary rhabdomyo-sarcomas by comparative genomic hybridization. *Chinese medical journal*, 122(11):1277–82, jun 2009.
- [160] K Ejeskär, H Aburatani, J Abrahamsson, P Kogner, and T Martinsson. Loss of heterozygosity of 3p markers in neuroblastoma tumours implicate a tumour-suppressor locus distal to the FHIT gene. *British journal of cancer*, 77(11):1787–91, jun 1998.

- [161] Ruediger Spitz, Barbara Hero, Karen Ernestus, and Frank Berthold. Deletions in chromosome arms 3p and 11q are new prognostic markers in localized and 4s neuroblastoma. *Clinical Cancer Research*, 9(1 I):52–58, 2003.
- [162] Jo Vandesompele, Michael Baudis, Katleen De Preter, Nadine Van Roy, Peter Ambras, Nick Bown, Christian Brinkschmidt, Holger Christiansen, Valérie Combaret, Maria Lastowska, James Nicholson, Anne O’Meara, Dominique Plantaz, Raymond Stallings, Bénédicte Brichard, Caroline Van Den Broecke, Sylvia De Bie, Anne De Paepe, Geneviève Laureys, and Frank Speleman. Unequivocal delineation of clinicogenetic subgroups and development of a new model for improved outcome prediction in neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology*, 23(10):2280–2299, 2005.
- [163] Katia Mazzocco, Raffaella Defferrari, Angela Rita Sementa, Alberto Garaventa, Luca Longo, Marilena De Mariano, Maria Rosaria Esposito, Francesca Negri, Davide Ircolò, Elisabetta Viscardi, Roberto Luksch, Paolo D’Angelo, Arcangelo Prete, Aurora Castellano, Paolo Massirio, Giovanni Erminio, Anna Rita Gigliotti, Gian Paolo Tonini, and Massimo Conte. Genetic abnormalities in adolescents and young adults with neuroblastoma: A report from the Italian Neuroblastoma group. *Pediatric Blood and Cancer*, 62(10):1725–1732, oct 2015.
- [164] Xiangjun Kong, Gaopeng Li, Yan Yuan, Yan He, Xiaoli Wu, Weijie Zhang, Zhengsheng Wu, Tingting Chen, Wenyong Wu, Peter E Lobie, and Tao Zhu. MicroRNA-7 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer cells via targeting FAK expression. *PloS one*, 7(8):e41523, 2012.
- [165] Qi Cao, Zheng-Dao Mao, Yu-Jia Shi, Yi Chen, Yun Sun, Qian Zhang, Lei Song, Li-Ping Peng, Qi Cao, Zheng-Dao Mao, Yu-Jia Shi, Yi Chen, Yun Sun, Qian Zhang, Lei Song, and Li-Ping Peng. MicroRNA-7 inhibits cell proliferation, migration and invasion in human non-small cell lung cancer cells by targeting FAK through ERK/MAPK signaling pathway. *Oncotarget*, 7(47):77468–77481, 2016.
- [166] Dai-Jung Chung, Chau-Jong Wang, Chia-Wei Yeh, and Tsui-Hwa Tseng. Inhibition of the Proliferation and Invasion of C6 Glioma Cells by Tricin via the Upregulation of Focal-Adhesion-Kinase-Targeting MicroRNA-7. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(26):6708–6716, jul 2018.
- [167] Zhenfeng Hao, Jishi Yang, Chenghai Wang, Yaoyao Li, Yu Zhang, Xiaoyun Dong, Liulin Zhou, Jing Liu, Yanqing Zhang, and Jing Qian. MicroRNA-7 inhibits metastasis

- and invasion through targeting focal adhesion kinase in cervical cancer. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(1):480–7, 2015.
- [168] De-gang Wu, Ying-yi Wang, Li-gang Fan, Hui Luo, Bin Han, Li-hua Sun, Xie-feng Wang, Jun-xia Zhang, Lei Cao, Xi-rui Wang, Yong-ping You, and Ning Liu. MicroRNA-7 regulates glioblastoma cell invasion via targeting focal adhesion kinase expression. *Chinese medical journal*, 124(17):2616–21, sep 2011.
- [169] Liangqi Cao, Binhui Xie, Xuwei Yang, Huihong Liang, Xiaofeng Jiang, Dawei Zhang, Ping Xue, De Chen, and Zili Shao. MiR-324-5p Suppresses Hepatocellular Carcinoma Cell Invasion by Counteracting ECM Degradation through Post-Transcriptionally Downregulating ETS1 and SP1. *PloS one*, 10(7):e0133074, 2015.
- [170] H. S. Xu, H. L. Zong, M. Shang, X. Ming, J. P. Zhao, C. Ma, and L. Cao. MiR-324-5p inhibits proliferation of glioma by target regulation of GLI1. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 18(6):828–832, 2014.
- [171] A Almazán-Moga, P Zarzosa, C Molist, P Velasco, J Pyczek, K Simon-Keller, I Giralt, I Vidal, N Navarro, M F Segura, A Soriano, S Navarro, O M Tirado, J C Ferreres, A Santamaria, R Rota, H Hahn, J Sánchez de Toledo, J Roma, and S Gallego. Ligand-dependent Hedgehog pathway activation in Rhabdomyosarcoma: the oncogenic role of the ligands. *British Journal of Cancer*, 117(9):1314–1325, oct 2017.
- [172] Jie Zhang, Sijia Na, Caiyue Liu, Shuting Pan, Junying Cai, and Jiaxuan Qiu. MicroRNA-125b suppresses the epithelial-mesenchymal transition and cell invasion by targeting ITGA9 in melanoma. *Tumor Biology*, 37(5):5941–5949, 2016.
- [173] Sara Laudato, Nitin Patil, Mohammed L. Abba, Joerg H. Leupold, Axel Benner, Timo Gaiser, Alexander Marx, and Heike Allgayer. P53-induced miR-30e-5p inhibits colorectal cancer invasion and metastasis by targeting ITGA6 and ITGB1. *International Journal of Cancer*, jun 2017.
- [174] Yu Ding, Yinghua Pan, Shan Liu, Feng Jiang, and Junbo Jiao. Elevation of miR-9-3p suppresses the epithelial-mesenchymal transition of nasopharyngeal carcinoma cells via down-regulating FN1, ITGB1 and ITGAV. *Cancer Biology & Therapy*, 14:1–11, jun 2017.
- [175] Keiichi Koshizuka, Toyoyuki Hanazawa, Naoko Kikkawa, Takayuki Arai, Atsushi Okato, Akira Kurozumi, Mayuko Kato, Koji Katada, Yoshitaka Okamoto, and Naohiko Seki.

- Regulation of ITGA3 by the anti-tumor miR-199 family inhibits cancer cell migration and invasion in head and neck cancer. *Cancer Science*, jun 2017.
- [176] Francesca Megiorni, Samantha Cialfi, Heather P McDowell, Armando Felsani, Simona Camero, Alessandro Guffanti, Barry Pizer, Anna Clerico, Alessandra De Grazia, Antonio Pizzuti, Anna Moles, and Carlo Dominici. Deep Sequencing the microRNA profile in rhabdomyosarcoma reveals down-regulation of miR-378 family members. *BMC cancer*, 14(1):880, 2014.
- [177] W G Cance, J E Harris, M V Iacocca, E Roche, X Yang, J Chang, S Simkins, and L Xu. Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 6(6):2417–23, jun 2000.
- [178] Amy L Lark, Chad A Livasy, Lynn Dressler, Dominic T Moore, Robert C Millikan, Joseph Geradts, Mary Iacocca, David Cowan, Debbie Little, Rolf J Craven, and William Cance. High focal adhesion kinase expression in invasive breast carcinomas is associated with an aggressive phenotype. *Modern Pathology*, 18(10):1289–1294, oct 2005.
- [179] Rajani Kanteti, Surinder K Batra, Frances E Lennon, and Ravi Salgia. FAK and paxillin, two potential targets in pancreatic cancer. *Oncotarget*, 7(21):31586–601, may 2016.
- [180] Arkene Levy, Khalid Alhazzani, Priya Dondapati, Ali Alaseem, Khadijah Cheema, Keerthi Thallapureddy, Paramajot Kaur, Saad Alobid, and Appu Rathinavelu. Focal Adhesion Kinase in Ovarian Cancer: A Potential Therapeutic Target for Platinum and Taxane-Resistant Tumors. *Current Cancer Drug Targets*, 18, jul 2018.
- [181] Stephana Carelli, Giorgia Zadra, Valentina Vaira, Monica Falleni, Luca Bottiglieri, Mario Nosotti, Anna Maria Di Giulio, Alfredo Gorio, and Silvano Bosari. Up-regulation of focal adhesion kinase in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 53(3):263–271, sep 2006.
- [182] Alicia M Waters, Laura L Stafman, Evan F Garner, Smitha Mruthyunjayappa, Jerry E Stewart, Elizabeth Mroczek-Musulman, and Elizabeth A Beierle. Targeting Focal Adhesion Kinase Suppresses the Malignant Phenotype in Rhabdomyosarcoma Cells. *Translational oncology*, 9(4):263–73, aug 2016.

- [183] Lauren Gillory and Elizabeth A. Beierle. Targeting Focal Adhesion Kinase in Neuroblastoma. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 10(10):714–721, 2010.
- [184] Elizabeth A Beierle. MYCN, neuroblastoma and focal adhesion kinase (FAK). *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 3:421–33, jan 2011.
- [185] Michael L. Megison, Jerry E. Stewart, Hugh C. Nabers, Lauren A. Gillory, and Elizabeth A. Beierle. FAK inhibition decreases cell invasion, migration and metastasis in MYCN amplified neuroblastoma. *Clinical & Experimental Metastasis*, 30(5):555–568, jun 2013.
- [186] Jeffrey R Infante, D Ross Camidge, Linda R Mileskin, Eric X Chen, Rodney J Hicks, Danny Rischin, Howard Fingert, Kristen J Pierce, Huiping Xu, W Gregory Roberts, S Martin Shreeve, Howard A Burris, and Lillian L Siu. Safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic phase I dose-escalation trial of PF-00562271, an inhibitor of focal adhesion kinase, in advanced solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30(13):1527–33, may 2012.
- [187] Jianliang Zhang, Di-Hua He, Maria Zajac-Kaye, and Steven N Hochwald. A small molecule FAK kinase inhibitor, GSK2256098, inhibits growth and survival of pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cell Cycle*, 13(19):3143–3149, oct 2014.
- [188] J. C. Soria, H. K. Gan, S. P. Blagden, R. Plummer, H. T. Arkenau, M. Ranson, T. R. J. Evans, G. Zalcman, R. Bahleda, A. Hollebecque, C. Lemech, E. Dean, J. Brown, D. Gibson, V. Peddareddigari, S. Murray, N. Nebot, J. Mazumdar, L. Swartz, K. R. Auger, R. A. Fleming, R. Singh, and M. Millward. A phase I, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of GSK2256098, a focal adhesion kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Annals of Oncology*, page mdw427, oct 2016.
- [189] Nicholas F Brown, Matthew Williams, Hendrik-Tobias Arkenau, Ronald A Fleming, Jerry Tolson, Li Yan, Jianping Zhang, Lisa Swartz, Rajendra Singh, Kurt R Auger, Laurie Lenox, David Cox, Yvonne Lewis, Christophe Plisson, Graham Searle, Azeem Saleem, Sarah Blagden, and Paul Mulholland. A study of the focal adhesion kinase inhibitor GSK2256098 in patients with recurrent glioblastoma with evaluation of tumor penetration of [11C]GSK2256098. *Neuro-Oncology*, 20(12):1634–1642, nov 2018.
- [190] Toshio Shimizu, Kazuya Fukuoka, Masayuki Takeda, Tutomu Iwasa, Takeshi Yoshida, Joanna Horobin, Mitchell Keegan, Lou Vaickus, Ajit Chavan, Mahesh Padval, and Kazuhiko Nakagawa. A first-in-Asian phase 1 study to evaluate safety, pharmacokinetics and clinical activity of VS-6063, a focal adhesion kinase (FAK)

- inhibitor in Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77(5):997–1003, may 2016.
- [191] Suzanne F. Jones, Lillian L. Siu, Johanna C. Bendell, James M. Cleary, Albiruni R. A. Razak, Jeffrey R. Infante, Shuchi S. Pandya, Philippe L. Bedard, Kristen J. Pierce, Brett Houk, W. Gregory Roberts, S. Martin Shreeve, and Geoffrey I. Shapiro. A phase I study of VS-6063, a second-generation focal adhesion kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Investigational New Drugs*, 33(5):1100–1107, oct 2015.
- [192] Dean A. Fennell, Paul Baas, Paul Taylor, Anna K. Nowak, David Gilligan, Takashi Nakano, Jonathan A. Pachter, David T. Weaver, Arnaud Scherpereel, Nick Pavlakis, Jan P. van Meerbeeck, Susana Cedrés, Luke Nolan, Hedy Kindler, and Joachim G.J.V. Aerts. Maintenance Defactinib Versus Placebo After First-Line Chemotherapy in Patients With Merlin-Stratified Pleural Mesothelioma: COMMAND-A Double-Blind, Randomized, Phase II Study. *Journal of Clinical Oncology*, 37(10):790–798, apr 2019.
- [193] Qi Jiang, Qingwei Li, Jianmei Han, Meng Gou, Yuanyuan Zheng, Bowen Li, Rong Xiao, and Jihong Wang. rLj-RGD3 induces apoptosis via the mitochondrial-dependent pathway and inhibits adhesion, migration and invasion of human HeyA8 cells via FAK pathway. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96:652–668, 2017.
- [194] Qianqian Jiang, Yu Pan, Yupeng Cheng, Huiling Li, Dandan Liu, and Hui Li. Lunasin suppresses the migration and invasion of breast cancer cells by inhibiting matrix metalloproteinase-2/-9 via the FAK/Akt/ERK and NF- κ B signaling pathways. *Oncology Reports*, 36(1):253–62, may 2016.
- [195] Cheng Du, Zhendong Zheng, Danqi Li, Li Chen, Na Li, Xiaomin Yi, Yang Yang, Fang Guo, Wenchao Liu, Xiaodong Xie, and Manjiang Xie. BKC α promotes growth and metastasis of prostate cancer through facilitating the coupling between α v β 3 integrin and FAK. *Oncotarget*, 7(26), 2016.
- [196] Makoto Mark Taketo. Reflections on the spread of metastasis to cancer prevention. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*, 4(3):324–8, mar 2011.
- [197] Ting Hu, Rui Zhou, Yanxia Zhao, and Gang Wu. Integrin α 6/Akt/Erk signaling is essential for human breast cancer resistance to radiotherapy. *Scientific Reports*, 6(1):33376, dec 2016.
- [198] Tom Mikkelsen, Chaya Brodie, Susan Finnis, Michael E. Berens, Jessica L. Rennert, Kevin Nelson, Nancy Lemke, Stephen L. Brown, Diane Hahn, Berend

- Neuteboom, and Simon L. Goodman. Radiation sensitization of glioblastoma by cilengitide has unanticipated schedule-dependency. *International Journal of Cancer*, 124(11):2719–2727, jun 2009.
- [199] Mayra Paolillo, Massimo Serra, and Sergio Schinelli. Integrins in glioblastoma: Still an attractive target? *Pharmacological Research*, 113:55–61, 2016.
- [200] Rachel Barrow-McGee, Naoki Kishi, Carine Joffre, Ludovic Ménard, Alexia Hervieu, Bakhouché A Bakhouché, Alejandro J Noval, Anja Mai, Camilo Guzmán, Luisa Robbez-Masson, Xavier Iturrioz, James Hult, Caroline H Brennan, Ian R Hart, Peter J Parker, Johanna Ivaska, and Stéphanie Kermorgant. Beta 1-integrin-c-Met cooperation reveals an inside-in survival signalling on autophagy-related endomembranes. *Nature communications*, 7:11942, 2016.
- [201] Hellyeh Hamidi and Johanna Ivaska. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 18(9):533–548, 2018.
- [202] Byron H Kwan, Eric F Zhu, Alice Tzeng, Harun R Sugito, Ahmed A Eltahir, Botong Ma, Mary K Delaney, Patrick A Murphy, Monique J Kauke, Alessandro Angelini, Noor Momin, Naveen K Mehta, Alecia M Maragh, Richard O Hynes, Glenn Dranoff, Jennifer R Cochran, and K Dane Wittrup. Integrin-targeted cancer immunotherapy elicits protective adaptive immune responses. *The Journal of experimental medicine*, 214(6):1679–1690, jun 2017.
- [203] Laetitia Seguin, Shumei Kato, Aleksandra Franovic, M Fernanda Camargo, Jacqueline Lesperance, Kathryn C Elliott, Mayra Yebra, Ainhua Mielgo, Andrew M Lowy, Hatim Husain, Tina Cascone, Lixia Diao, Jing Wang, Ignacio I Wistuba, John V Heymach, Scott M Lippman, Jay S Desgrosellier, Sudarshan Anand, Sara M Weis, and David A Cheresh. An integrin β 3-KRAS-RalB complex drives tumour stemness and resistance to EGFR inhibition. *Nature cell biology*, 16(5):457–68, may 2014.