

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE SEVILLA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER



Xenoinjertos de tumores derivados de pacientes como modelos para la búsqueda de biomarcadores de sensibilidad a fármacos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Marco Perez

DIRECTORES:
Amancio Carnero Moya
Rocío García Carbonero

Sevilla 2017

**Alla mia famiglia che mi ha sempre sostenuto
e a Silvia e ai miei figli che hanno
arricchito la mia vita**

Agradecimientos

Finalmente é arrivato il momento di presentare la tesi di dottorato. Quando iniziai questa lunga tappa, appena arrivato in Spagna, ero mosso dall'interesse e dalla curiositá di addentrarmi nel mondo della ricerca, ma non ero certo di riuscire in questa nuova esperienza. È stato grazie all'appoggio di tante persone che mi hanno incoraggiato ed aiutato durante questi anni che ho potuto raggiungere il traguardo di presentare la tesi di dottorato. E per questo che ognuno di loro merita un piccolo spazio ed un ringraziamento speciale.

Vorrei ringraziare in primo luogo Amancio Carnero, grazie per avermi accettato nel tuo gruppo e per aver creduto in me. Grazie a te sono riuscito a conoscere cosa significhi fare scienza e a capire fino in fondo questo mondo così bello e allo stesso modo così difficile. Spero di poter continuare a lavorare e collaborare con te.

Grazie a Luis Paz Ares e Rocío García Carbonero, é anche grazie al vostro appoggio che sono riuscito a stabilirmi in questa città e poter realizzare il sogno di presentare la tesi di dottorato. La vostra dedicazione al lavoro ed il vostro ottimismo sono stati un esempio tanto nel lavoro come nella vita.

Grazie a tutti i miei colleghi e compagni di viaggio che hanno fatto si che questa tappa della mia vita così ardua si trasformasse in un momento goliardico. Grazie Sonia e Irene per aver condiviso con me parte della tesi e per i vostri consigli, mi sono stati di grande aiuto. La vostra sinceritá e correttezza nel lavoro sono un modello da seguire. La verdad es que se echan de menos las visitas en vuestro despacho y muchos más momentos. Grazie Cristina, la tua allegria, il tuo ottimismo e il tuo essere amica oltre che collega mi hanno dato una marcia in piú. Grazie a tutti i miei colleghi del laboratorio, Sandra, Blanca, Javi, Dani, Eva, Manu, Antonio, Lola, Jose Manuel, Ricardo, Ana Ognuno di voi ha riempito la mia vita e reso piú facile i momenti difficili.

Vorrei ringraziare anche i miei amici d'infanzia, grazie per esserci sempre e per sforzarvi a mantenere i contatti nonostante la distanza. É grazie a voi che credo nel valore dell'amicizia, nutro per voi un enorme stima.

Grazie a Matias, Rosario, Cristina y Angelo, da quando sono arrivato a Siviglia mi avete accolto e fatto sentire come un figlio e un fratello ed avete reso la distanza dai miei cari e dalla mia casa molto piu corta.

Grazie alla mia famiglia e ai miei genitori. Grazie per l'aiuto, il sostegno, l'amore e per tutto ciò che avete insegnato a me e a Toni. Spero un giorno di poter ricambiare i vostri sforzi. Tutti i traguardi che ho raggiunto li ho realizzati anche grazie a voi. Non avremmo potuto desiderare genitori migliori.

A Silvia, gracias por estar a mi lado, por quererme, por haberme dado a Valeria. Gracias a ti mi vida es mejor y tiene más sentido.

El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS) bajo la dirección del **Dr. Amancio Carnero Moya** y de la **Dra. Rocío García Carbonero**

Abreviaturas y términos en inglés

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero.

ATP: adenosina trifosfato.

BSA: albúmina de suero bovino.

Checkpoint: punto de control del ciclo celular.

CDK: quinasa dependiente de ciclina.

CPCNP: cáncer de pulmón de células no pequeñas.

C-terminal: extremo carboxi terminal de la proteína.

CTP: citidina trifosfato.

DMEM: medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco.

DMSO: dimetilsulfoxido.

EDTA: ácido etileno diamino tetracético.

EGFR: receptor de factor de crecimiento epidérmico.

Enhancer: potenciador

ER: receptor estrogénico.

FBS: suero fetal bovino.

FDG: fluorodeoxiglucosa.

GIST: tumor del estroma gastrointestinal.

GTP: guanosina trifosfato.

HER2: factor de crecimiento epidérmico.

IHQ: inmunohistoquímica.

LB: medio de cultivo de bacterias Luria-Bertani.

Microarray: chip de ADNc.

MSI: inestabilidad de microsatélites.

MTT: thiazolyl Blue Tetrazolium Blue.

N-terminal: extremo amino terminal de la proteína.

Pb: pares de bases.

PBS: tampón fosfato salino.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PDX: patient derived xenografts.

PET: tomografía por emisión de positrones.

PP2: protein fosfatasa 2.

RNase H: ribonucleasa H.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

RT-PCR: transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa.

RTK: receptores tirosinas quinasas.

nRTK: tirosinas quinasa no receptores.

SA- β gal: β -galactosidasa asociada a senescencia.

SCID: severe combined immunodeficiency.

SDS: dodecil sulfato sodico.

SG: supervivencia global.

shRNA: horquilla corta de ARN, complementaria a ARNm.

SLE: supervivencia libre de enfermedad.

SLP: supervivencia libre de progresión.

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido.

SOD: superóxido dismutasa.

TMA: microarray tisular.

TTP: timidina trifosfato.

WB: western blot.

Wt: wild type.

Índice

Introducción	1
1. Medicina personalizada en el tratamiento del cáncer	2
2. Desarrollo de fármacos antineoplásicos	2
3. Los modelos PDX en cáncer	6
4. Los sarcomas	8
5. Desregulación de ciclo celular en cáncer	8
6. MAP17	10
7. El cáncer colorrectal	11
8. Las proteínas SRC	14
Objetivos	17
Materiales y métodos	19
9. Reactivos biológicos	20
9.1. Antibióticos	20
9.2. Fármacos o compuestos antitumorales	20
9.3. Vectores	20
9.4. Cepas bacterianas	20
9.5. Líneas celulares	20
9.6. Anticuerpos	21
10. Técnicas básicas de biología molecular	22
10.1. Extracción de ADN total desde líneas celulares y desde tejidos	22
11. Técnicas de análisis a nivel de ADN	23
11.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar el estado mutacional de <i>PDGFR</i>	23
11.2. Estudio mutacional del gen <i>KRAS</i>	23
11.3. Estudio mutacional de los genes <i>PI3K</i> y <i>BRAF</i>	24
11.4. Análisis de inestabilidad de microsatélites (MSI)	24
12. Técnicas de expresión a nivel de ARN	25
12.1. Extracción de ARN total desde líneas celulares y desde tejidos	25
12.2. Transcripción reversa y PCR	25

12.3. Muestras usadas en PCR cuantitativa a tiempo real.....	25
12.4. PCR cuantitativa a tiempo real	26
12.5. Microarray	26
12.6. PCR Array	27
13. Técnicas de análisis de expresión a nivel de proteína	27
13.1. Extracción de proteínas totales	27
13.2. Western blot	28
14. Técnicas de inmunohistoquímica.....	28
14.1. Preparación de las muestras para análisis de inmunohistoquímica	28
14.2. Análisis de expresión de Ki67, p-SRC y MAP17 (PDZK1IP1).....	29
15. Cultivos celulares	29
15.1. Cultivo y conservación de las líneas celulares	29
15.2. Transfección de células	30
15.3. Selección de células transfectadas o infectadas.....	30
16. Ensayos celulares.....	30
16.1. Ensayo citotóxico con PP2, Oxaliplatino, Palbociclib y Bortezomib	30
16.2. Visualización con cristal violeta	31
16.3. Visualización con MTT	31
16.4. Inmunofluorescencia y análisis de Foci de 53BP1	31
16.5. Actividad SA-βgal asociada a senescencia.....	32
17. Ensayos <i>in vivo</i>	32
17.1. Generación de modelos PDX de metástasis hepáticas colorrectales y sarcomas.....	32
17.2. Preparación de las muestras	33
17.3. Implantación de las muestras en ratones inmunosuprimidos	34
17.4. Seguimiento	34
17.5. Evaluación del crecimiento tumoral de los tumores subcutáneos	35
17.6. Evaluación del crecimiento tumoral de los tumores ortotopicos a través de tomografía por emisión de positrones (PET).....	35
17.7. Necropsia y análisis patológico	35

18. Ensayos <i>in vivo</i> con fármacos	35
18.1. Tratamiento con Dasatinib	35
18.2. Tratamiento con Oxaliplatino	36
18.3. Tratamiento combinado Dasatinib más Oxaliplatino	36
18.4. Tratamiento con 5 Fluorouracilo	36
18.5. Tratamiento combinado Dasatinib más 5 Fluorouracilo	36
18.6. Tratamiento con Palbociclib	36
18.7. Tratamiento con Bortezomib	36
18.8. Análisis estadístico de los datos obtenidos y software de análisis	37
Resultados	38
19. Eficacia de la inhibición de CDK4 en sarcomas	39
19.1. Análisis transcriptómico de muestras de sarcomas	39
19.2. Palbociclib induce senescencia en líneas celulares de sarcomas de diferentes orígenes	40
19.2.1. Efecto de Palbociclib sobre el ciclo celular	43
19.2.2. Los niveles de <i>CDK4</i> determinan la respuesta a Palbociclib en un panel de líneas celulares de sarcomas	43
19.2.3. Relación funcional entre niveles de <i>CDK4</i> y respuesta a Palbociclib ...	45
19.3. Palbociclib induce senescencia en las líneas parentales y en las que sobreexpresan CDK4 wild type	47
20. Generación y caracterización de una plataforma de PDX de sarcomas.....	50
20.1. Análisis del perfil transcriptómico de los modelos subcutáneos (PDX)....	50
21. Efecto de la inhibición <i>in vivo</i> de CDK4	51
22. Expresión de MAP17 en sarcoma como factor pronóstico de supervivencia.	58
22.1. Descripción de la cohorte de pacientes y expresión de MAP17	58
22.2. Expresión de MAP17 en sarcomas humanos	59
23. Eficacia del tratamiento con Bortezomib en sarcomas y su dependencia de MAP17	63
23.1. La respuesta a Bortezomib en líneas celulares de sarcomas depende de los niveles de MAP17	63

23.2. <i>In vivo</i> , los sarcomas que sobreexpresan MAP17 son más sensibles a Bortezomib	66
24. Efecto citotóxico de Oxaliplatino en un panel de líneas de cáncer colorrectal.....	71
25. Efecto de la sobreexpresión de p-SRC	73
25.1. La sobreexpresión de p-SRC en líneas celulares de carcinoma colorrectal induce quimioresistencia a Oxaliplatino	73
26. Generación y caracterización de modelos PDX de metástasis hepática de cáncer colorrectal.....	75
26.1. Los modelos ortotópicos muestran características morfológicas y fenotípicas comparables a la de los tumores humanos de origen	76
26.3. Los modelos ortotópicos muestran las mismas características genéticas que los tumores originales de que derivan	78
26.3. Niveles de p-SRC en los modelos PDX de metástasis hepáticas de cáncer colorrectal	79
27. Efecto <i>in vivo</i> de la inhibición de p-SRC en la metástasis colorrectales.....	80
Discusión	85
28. Discusión	86
28.1. La eficacia de la inhibición de CDK4 en sarcoma depende de los niveles de ARNm <i>CDK4</i> y <i>p16</i>	86
28.2. Eficacia del tratamiento con Bortezomib en sarcomas con altos niveles de MAP17 (PDZK1IP1).....	89
28.3. Dasatinib sensibiliza al tratamiento con Oxaliplatino las metástasis hepáticas de cáncer colorrectal que sobreexpresen altos niveles de p-SRC....	91
28.4. Perspectivas futuras	92
Conclusiones	94
Bibliografía.....	96
Anexo (Publicaciones).....	113

Resumen

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con él. Se prevé además que el número de nuevos casos aumente aproximadamente un 70% en los próximos 20 años. Esto hace de esta enfermedad un problema de salud pública a escala mundial. A pesar de los grandes esfuerzos en la caracterización molecular de varios tipos de cáncer, y la búsqueda de nuevos abordajes terapéuticos, no se han logrado los resultados esperados. La investigación básica y los ensayos clínicos son componentes esenciales en el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos en oncología. El uso de modelos preclínicos es un punto clave de cada aspecto del desarrollo de fármacos.

Debido a la limitación de la estrategia convencional en el desarrollo de nuevos compuestos antitumorales, en el presente trabajo proponemos el uso de modelos de xenoinjertos derivados directamente de pacientes (PDX) como herramienta idónea para los estudios biológicos de eficacia de fármacos asociados a biomarcadores en oncología.

En este trabajo hemos generado modelos PDX de sarcomas y de metástasis hepática de cáncer colorrectal obtenidos implantando directamente la biopsia de pacientes en ratones inmunodeprimidos. El objetivo es generar modelos experimentales que reflejan lo más posible la enfermedad tumoral observada en la clínica y estudiar la resistencia y/o sensibilidad a fármacos. Estos modelos PDX generados mantenían las características fenotípicas, genéticas y moleculares de los tumores de origen.

A continuación estudiamos la señalización desregulada en sarcomas mediante análisis transcriptómico de muestras tumorales humanas frente a muestras no tumorales. Encontramos una sobre regulación en las rutas de ciclo celular. Entre los mecanismos que contribuyen a la desregulación del ciclo celular decidimos explorar en las líneas celulares y en los modelos PDX de sarcomas el efecto de la inhibición de CDK4 mediante Palbociclib, el primer inhibidor de CDK4 aprobado para usos clínicos en humanos. Encontramos que, si los tumores tenían altos niveles de ARNm de *CDK4* y bajos niveles de ARNm de *p16* respondían a la inhibición de CDK4.

Centramos también nuestra atención en MAP17 una pequeña proteína no glicosilada que se encuentra sobreexpresada en muchos tipos de tumores incluyendo sarcomas. Observamos que los sarcomas con altos niveles de MAP17 tenían peor pronóstico. Datos previos del laboratorio nos indicaban que MAP17 determinaba la sensibilidad al inhibidor de proteosoma Bortezomib en líneas celulares de cáncer de mama y por eso decidimos explorar esa ruta. Encontramos que al aumentar la expresión de MAP17 incrementaba la sensibilidad a Bortezomib, tanto en líneas

celulares como en nuestros modelos PDX de sarcomas. Esos resultados nos sugerían que Bortezomib podría considerarse como posible terapia para los pacientes con sarcomas que al diagnóstico presentan altos niveles de MAP17.

Por último buscamos una alternativa terapéutica para el tratamiento de las metástasis hepáticas colorrectales que a día de hoy no tienen ninguna opción de tratamiento. En particular centramos nuestra atención en SRC, un receptor citoplasmático de tipo tirosina quinasa que se encuentra sobreexpresado en el carcinoma colorrectal, cuya desregulación parece estar implicada en varios procesos relacionados con la carcinogénesis y cuya activación está implicada en la resistencia a varios agentes quimioterápicos. Por esa razón buscamos posibles mecanismos que pudieran revertir esa resistencia y por lo tanto resensibilizar los tumores quimiorrefractarios a la terapia convencional. Encontramos que altos niveles de p-SRC podrían definir la resistencia o sensibilidad a Oxaliplatino y que la inhibición de p-SRC a través de su inhibidor Dasatinib sensibilizaba al tratamiento con Oxaliplatino las metástasis hepáticas de cáncer colorrectal que sobreexpresen altos niveles de p-SRC.

Introducción

1. Medicina personalizada en el tratamiento del cáncer

El campo de la oncología está evolucionando en las últimas décadas, asistiendo a un rápido cambio en su enfoque terapéutico. Hemos pasado de terapias generalizadas a un enfoque más personalizado, tratando de caracterizar molecularmente cada tumor y llevando esto a un abordaje más selectivo desde un punto de vista clínico [1]. Ejemplo de ello son el abordaje del cáncer, el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) o el cáncer de mama, que han sufrido radicales cambios en su manejo en los últimos 20 años [2]. A pesar de lo dicho, el desarrollo de tratamientos dirigidos a una diana específica no ha supuesto en todos los casos una mejora en supervivencia global de los pacientes. Siguen existiendo, no obstante, entidades neoplásicas en las que no se han identificado biomarcadores de eficacia y que por lo tanto aun no son candidatas a recibir una terapia personalizada. Por otro lado, la investigación centrada en la medicina personalizada en cáncer tiene múltiples tareas pendientes. Carecemos, en muchas ocasiones, de un conocimiento exhaustivo de las bases moleculares de respuesta a los tratamientos dirigidos, que lleva a veces a orientar de manera errónea los ensayos clínicos con estas terapias. La evidencia actual pone en relieve diferencias notables en la sensibilidad a dichas terapias entre los distintos pacientes, hecho que sugiere mayor potencial en la personalización de los tratamientos.

Por todas esas razones, se hace necesario identificar más y mejores biomarcadores, que sean realmente predictivos de respuesta, con el fin último de generar una mejora significativa en la personalización del cáncer, que se traduzca en mejoras en perfil de toxicidad y en control de la enfermedad.

2. Desarrollo de fármacos antineoplásicos

En adultos la mayoría de los tumores sólidos avanzados no son curables con el armamento terapéutico convencional actualmente disponible [3]. La introducción de terapias dirigidas, como los inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o los antiangiogénicos entre otros, ha mejorado discretamente la supervivencia de algunas neoplasias [4-7]. Sin embargo los tratamientos farmacológicos dirigidos a dianas moleculares específicas son eficaces si la diana es inhibida por el fármaco y la ruta que inhiben es relevante para la supervivencia celular (“adicción oncogénica”). El motivo del elevado nivel de fracasos en los ensayos clínicos con nuevas drogas es, entre otros, el fallo de alguno de estos dos requisitos fundamentales. La estrategia convencional de desarrollo de nuevos fármacos en oncología, basada en una selección de dosis por toxicidad máxima tolerada y una

evaluación empírica de la eficacia, no ha resultado muy productiva. El desarrollo de los inhibidores de EGFR en el cáncer de pulmón es un ejemplo ilustrativo de ello. La actividad de estos fármacos fue muy limitada en la población no seleccionada en la que se realizó el ensayo inicialmente, si bien estudios más recientes han descubierto factores moleculares involucrados en la susceptibilidad o resistencia a estos agentes, lo cual permite seleccionar más adecuadamente a los pacientes y mejorar el beneficio terapéutico que aportan [8-12].

Estos factores moleculares, o “marcadores”, han sido descubiertos después de haber tratado a miles de pacientes con estos fármacos, en muchos casos sin beneficio clínico alguno, con alta toxicidad y un elevado coste económico. Es por lo tanto posible, que muchos agentes hayan fracasado en la clínica porque fueron ensayados en población no seleccionada y su potencial efecto terapéutico quedó “diluido” por la inclusión de pacientes que no se beneficiaron del tratamiento. Además, el fracaso de alguno de estos fármacos, por ejemplo el inhibidor de EGFR (Gefitinib), fue posiblemente también causado por la selección de una dosis terapéutica insuficiente para ejercer un efecto farmacodinámico en pacientes con receptor nativo no mutado. Todo ello indica que el desarrollo de tests adecuados para la monitorización farmacodinámica y para una selección de dosis adecuada es crítico en el desarrollo de nuevos fármacos.

En el momento en que se inician los ensayos clínicos, la limitada información disponible sobre los factores que determinan la eficacia del tratamiento es uno de los motivos que condiciona el alto índice de fracasos que sufren los fármacos antineoplásicos en su desarrollo. Los ensayos preclínicos al día de hoy aún suelen realizarse en líneas celulares comerciales sometidas a múltiples pases en cultivo, y en xenoinjertos derivados de esas líneas celulares (Figura 1). Para los agentes citotóxicos, la correlación entre la actividad antineoplásica observada en estos modelos animales y aquella observada en humanos es pobre [13, 14]. Si bien estos modelos tumorales son humanos en origen, se encuentran en un medio artificial y probablemente no reproducen adecuadamente la enfermedad neoplásica tal y como se observa en la clínica. De hecho, la adaptación de las células tumorales a las condiciones de laboratorio, con múltiples pases en cultivo durante largos periodos de tiempo, origina alteraciones genéticas que dan lugar a células tumorales distintas del tumor parental [13].

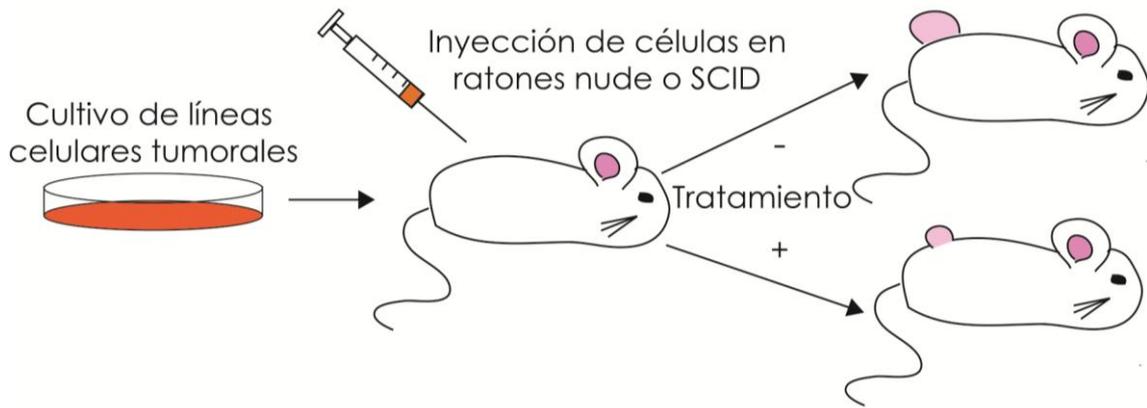


Figura 1. Xenoinjertos derivados de líneas celulares. Se muestra un esquema del procedimiento para la inducción de tumores en ratones a partir de líneas celulares comerciales

Tanto la investigación básica como los ensayos clínicos son componentes esenciales del proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Los agentes que son activos en estudios preclínicos son seleccionados para continuar su desarrollo e iniciar ensayos clínicos tempranos (Fase I-II). Esta selección se hace asumiendo que la actividad observada para un determinado compuesto en modelos preclínicos se traduce en cierta eficacia clínica de ese compuesto. Es decir asumiendo que los modelos tumorales de laboratorio son predictivos.

Existen dos aproximaciones potenciales:

- **orientada al compuesto**, en la cual se asume que un determinado fármaco puede ser potencialmente activo en todos los cánceres si presenta actividad preclínica frente a un tipo de **neoplasia** concreta.
- **orientada a la enfermedad**, en la cual se asume que un fármaco activo en estudios preclínicos frente a un determinado tumor predice la actividad de dicho compuesto frente al mismo tipo de tumor en la clínica.

Ninguna de estas dos aproximaciones ha sido demostrada de manera clara por los estudios realizados hasta la fecha. En cualquier caso, cualquier estudio que pretenda responder a esta cuestión sufre de un sesgo inherente al hecho de que los compuestos que no son activos en modelos preclínicos nunca son evaluados en el hombre.

El empleo de modelos preclínicos de cáncer para la selección de fármacos con actividad antineoplásica potencial fue iniciado en Estados Unidos en los años 50 liderado por el National Cancer Institute (NCI). Las estrategias de cribado utilizadas

hasta 1990 estaban esencialmente orientadas al compuesto e involucraban un pequeño número de aloinjertos tumorales fundamentalmente murinos. Diversos estudios demostraron, no obstante, que estos modelos tenían un valor predictivo muy pobre [13, 15, 16] y tendían a seleccionar compuestos activos frente a leucemias humanas y linfomas [17-19]. Por ello, en 1990 el NCI introdujo un panel de cribado orientado a la enfermedad neoplásica que incluía 60 líneas celulares de los tumores humanos más frecuentes [20-24].

Esta plataforma de cribado estaba diseñada de tal manera que cada tipo tumoral estaba representado por un panel de líneas celulares que incluían distintos subtipos histológicos y perfiles de resistencia a drogas. Con ello se pretendía seleccionar fármacos con alta potencia y/o actividad selectiva frente a determinados tipos tumorales. El NCI ha examinado la correlación entre la actividad de los fármacos en modelos preclínicos de xenografts y aquella observada en ensayos clínicos de fase II [25] y las principales conclusiones de este análisis son las siguientes:

- con la excepción del carcinoma no microcítico de pulmón, existe una pobre correlación entre la actividad observada para un determinado tipo de tumor en xenografts de tumores humanos y en ensayos clínicos de fase II;
- con la excepción de los cánceres de colon y mama, los xenografts de líneas celulares de tumores humanos no predecían la actividad clínica del compuesto en otros tipos tumorales;
- los compuestos que no eran activos en al menos un tercio de todos los xenografts evaluados tenían altas probabilidades de no ser activos en la clínica.

Otros estudios de rastreo preclínico han empleado modelos de cáncer humano orientados al tumor, obteniendo tanto resultados positivos (el modelo era predictivo) como negativos (el modelo no predecía la actividad clínica del compuesto) en distintos tipos de neoplasias humanas [13, 25, 26]. En cualquier caso, todos ellos han basado sus conclusiones en la observación de tendencias más que en análisis estadísticos rigurosos. Por otro lado, estos estudios han empleado definiciones dicotómicas de actividad antineoplásica tanto preclínica como clínica, basados en puntos de corte arbitrarios no validados (ej. un 20% de tasas de respuesta en ensayos clínicos de fase II; un 42% en xenografts de líneas celulares de humanos y grafts murinos). Por todo ello, el proceso de descubrimiento de nuevos agentes antineoplásicos requiere una

plataforma preclínica en la cual el ensayo de fármacos pueda ser realmente predictivo de la actividad esperada en humanos.

Actualmente los modelos preclínicos disponibles no son muy adecuados para alcanzar estos objetivos. Los xenografts de líneas celulares no reconstituyen la arquitectura ni el microambiente del cáncer humano y acarrear mutaciones adaptativas no presentes en el tumor original.

3. Los modelos PDX en cáncer

El uso de modelos preclínicos es un componente clave en cada aspecto de la investigación traslacional en cáncer, desde el entendimiento biológico de la enfermedad hasta el desarrollo de nuevos tratamientos. En los últimos años se ha observado un creciente interés en la aplicación de modelos preclínicos en cáncer que puedan ser realmente predictivos de la enfermedad en la clínica, entre ellos los xenoinjertos de tumores derivados directamente de pacientes o “*patient derived tumor xenografts*” (PDXs).

Los modelos PDX no son nuevos; ya en los años 80 algunos trabajos mostraban una alta correlación entre la respuesta clínica a citotóxicos en adultos y la respuesta observada en los modelos PDX [27, 28]. El proceso de generar modelos PDX a partir de material en fresco del tumor primario o del tumor metastásico es una técnica ampliamente descrita en la literatura [29-32]. Se basa en transferir el tumor primario directamente desde el paciente al ratón. Para este fin, el tumor, obtenido en fresco de la resección quirúrgica o de la biopsia (Figura 2, F0), se recorta mecánicamente o enzimáticamente en trozos pequeños, descartando la parte necrótica y se implanta en un ratón inmunodeprimido (por ejemplo Nude-SCID) (Figura 2-F1), bien sólo, con matrigel, o enriquecido con fibroblastos humanos (Figura 2).

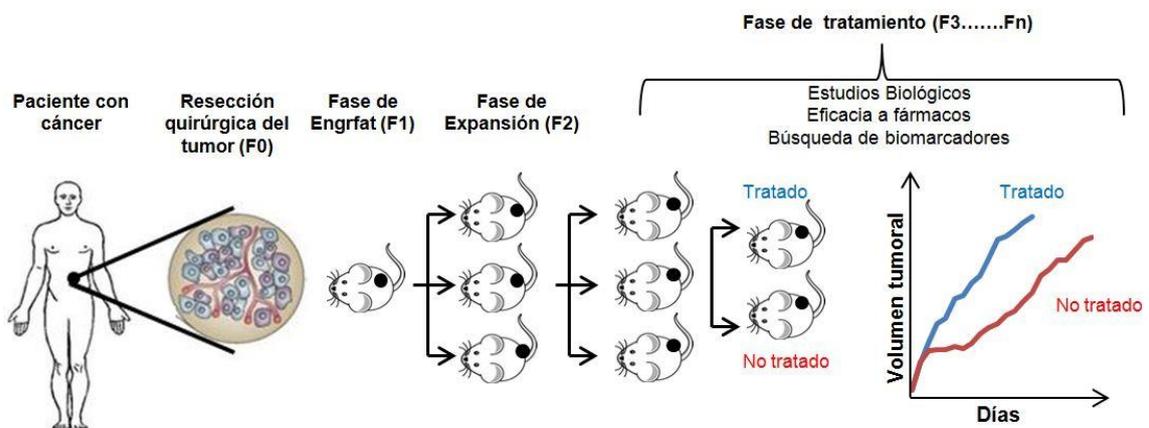


Figura 2. Representación esquemática de la generación de modelos PDX y fases de los estudios

La implantación con matrigel aporta nutrientes al tejido recién implantado, mientras que el enriquecimiento con fibroblastos humanos quiere compensar el reclutamiento de la matriz extracelular huésped-específico al tumor recién implantado. Cuando los tumores han crecido (F1), se reimplantan en otra cohorte con el fin de expandir la muestra (F2-F3 etc.). El tiempo requerido para el éxito de la implantación es variable, generalmente entre 1 mes y 1 año. Tras la fase de expansión de las muestras (desde pocos meses hasta un año dependiendo del tumor), las muestras se reimplantan generando cohortes de tumores iguales en ratones inmunodeprimidos para empezar los estudios biológicos, los estudios pre-clínicos de eficacia a fármacos, o la búsqueda de biomarcadores de respuesta (F3...Fn). Esos estudios suelen desarrollarse en generaciones tempranas (F2-F4), y se denominan ensayos Fase 0 [31, 33] aunque se haya visto que la propagación ratón-ratón del tumor no parece aportar sustanciales cambios en las características del tumor [26, 34]. Estos estudios han comparado la respuesta a tratamientos de modelos PDX en varios pasos y han mostrado una respuesta estable entre las distintas generaciones, dando más apoyo a la estabilidad fenotípica de esos modelos. A pesar de que diferentes grupos han desarrollado técnicas específicas de implantación, el sitio más común para la implantación es la región dorsal (implantación subcutánea), aunque la implantación ortotópica, en el mismo órgano de procedencia del tumor, puede ser una mejor alternativa cuando es posible. En algunos casos, independientemente del origen del tumor, se ha implantado el tumor primario en la capsula renal con el fin de incrementar la eficiencia de crecimiento del tumor [35-37]. Se considera que la implantación ortotópica reproduce más exactamente el tumor de origen, tanto histológicamente como en su perfil transcripcional [38, 39]. Esto es debido sobre todo al efecto del microambiente, ya que el efecto entre el tumor y el estroma es específico de tejido [43]. Diversos estudios muestran alguna variación en la expresión de genes asociados al compartimiento del estroma humano, debido a que el tumor acaba reclutando estroma del organismo huésped [40, 41]. Al mismo tiempo son reproducibles los SNP y las variaciones de número de copias cromosómicas [38, 39].

En definitiva, los modelos PDX mantienen, a nivel fenotípico, histológico y molecular, las características del tumor primario y reproducen adecuadamente la enfermedad tal y como se observa en la clínica. Por tanto, ofrecen una excelente herramienta para el estudio biológico del tumor y para evaluar el efecto de compuestos contra el cáncer. No obstante, con el aumento de reimplantaciones, el tumor implantado, comienza a ser invadido con células estromales de ratón, y hay que tener en cuenta esta mezcla de subpoblaciones a la hora de diseñar los análisis y experimentos.

En ese trabajo nos hemos centrado en la creación de una plataforma de modelos PDX de metástasis hepática de cáncer colorrectal a través de la implantación ortotópica del tumor en ratones inmunodeprimidos, y una plataforma de sarcomas a través de implantación subcutánea.

4. Los sarcomas

Los sarcomas son un grupo heterogéneo de tumores poco frecuentes, constituidos por una amplia variedad de subtipos histológicos, que requieren un tratamiento multidisciplinario, especializado y complejo. La gran mayoría de sarcomas son esporádicos con etiología desconocida, aunque existen varias predisposiciones genéticas asociadas a tipos de sarcoma específicos [42, 43]. El análisis taxonómico de los sarcomas ha identificado aproximadamente 60 subtipos histológicos de sarcomas y más de 50 tumores benignos [44]. Los sarcomas se agrupan generalmente en dos grandes categorías en función de sus características moleculares: aquellos que presentan un cariotipo diploide o casi diploide con alteraciones genéticas simples, como el sarcoma de Ewing, y los sarcomas con un cariotipo complejo y desequilibrado como los osteosarcomas. La cirugía es la terapia estándar para el tratamiento de los sarcomas, aunque en pacientes con enfermedad no resecable o con tumor residual, tras la cirugía, se asocia también la radioterapia. Los pacientes con enfermedad metastásica se tratan con quimioterapia sistémica, generalmente Doxorubicina o Ifosfamida. Este tratamiento ha resultado ser efectivo en pacientes que presentan tumor localizado, incrementando la supervivencia global [45]. Sin embargo, para muchos tumores que resultan quimiorrefractarios o resistentes a los tratamientos o para los pacientes con enfermedad metastásica, se necesitan nuevos tratamientos. Aunque en los últimos años se han producido avances notables en el conocimiento de la patología y de la biología molecular de esta enfermedad, el tratamiento clínico ha evolucionado de forma más discreta y, en la práctica, los resultados no son siempre los óptimos. Los tratamientos para los sarcomas incluyen Gemcitabina, Ifosfamida y recientemente la Trabectedina [46-49]. Al día de hoy pocas alteraciones genéticas son dianas directas para la terapia, y se necesita más conocimiento de la biología molecular de esos tumores y de posibles alteraciones diana para futuras terapias. Al mismo tiempo se necesita buscar biomarcadores de eficacia que permitan optimizar el tratamiento, evitando toxicidad inútil.

5. Desregulación de ciclo celular en cáncer

La regulación aberrante del ciclo celular es una característica intrínseca del cáncer. Son varios los mecanismos que contribuyen a la desregulación del checkpoint

de G1-S [50, 51]. Estos mecanismos incluyen, entre otros, la amplificación o la mutación de *CDK4*, la amplificación de los genes que codifican para la CICLINA de tipo D y la delección o el silenciamiento de los genes *CDKN2A/B*, que codifican para la familia perteneciente a los inhibidores de *INK4*, p16 y p15 [52-54].

La desregulación del ciclo celular es crucial para varios procesos de transformación oncogénicos, sugiriendo que las células cancerígenas dependen de una actividad aumentada de CDK4/6 [55-60]. Por otro lado, el desarrollo normal de muchos tejidos puede llevarse a cabo en ausencia de los complejos CICLINA-D-CDK4/6 [61]. Mediante cepas de ratones genéticamente modificados, algunos estudios genéticos han proporcionado una evidencia directa del papel de Cdk4 en el desarrollo tumoral. En ratones que carecen de la *Ciclina-D1* no se observaba desarrollo de tumor mamario tras inducción con el oncogén HerB2, que se encuentra frecuentemente sobre expresado en tumores de mama [62, 63]. Además ratones que expresan una forma mutada de la Ciclina-D1, que se une pero no es capaz de activar Cdk4, son resistentes a la inducción de la tumorigenesis inducida por ErbB2 [57].

Algunos estudios han mostrado que el silenciamiento de *Cdk4*, en células tumorales de mama inducidas por ErbB2, elimina sus propiedades oncogénicas [57]. La pérdida de *Cdk4* ha sido también implicada en la incapacidad del mutante activo Kras G12 de inducir cáncer de pulmón y de c-Myc de desarrollar tumores cutáneos [55, 60, 64]. Por todas esas razones CDK4 parece representar una importante diana terapéutica para el tratamiento del cáncer [65, 66].

Actualmente varios inhibidores de CDK4 y CDK6 están siendo testados en fase clínica II/III [67, 68], y entre ellos el primero que ha sido testado y aprobado para uso en humanos es el Palbociclib (PD03329919). El Palbociclib está indicado para el tratamiento del cáncer de mama metastásico o localmente avanzado, positivo para receptor estrogénico (ER) y negativo para el receptor 2 de crecimiento epidérmico (HER2), en combinación con un inhibidor de la aromatasa o en combinación con Fulvestrant en mujeres que hayan recibido hormonoterapia previa [69]. Palbociclib ha sido probado en rabdiosarcomas y liposarcomas con amplificación génica de *CDK4* [70, 71] siendo capaz de inducir una parada del ciclo celular *in vitro* y un retraso del crecimiento tumoral en xenografts. Recientemente se ha terminado un ensayo clínico de fase II en pacientes con liposarcomas bien diferenciados o que muestran amplificación de *CDK4* [72]. Estudios preclínicos han demostrado que Palbociclib induce la parada en G1 de las células positivas para pRB y que induce parada de crecimiento de varios tumores en xenografts [63, 68, 73, 74]. En diferentes modelos de cáncer el tratamiento con Palbociclib no solo ejerce un efecto citostático

sino que también induce mecanismos de muerte celular a través de mecanismos de apoptosis [75]. El único mecanismo conocido de resistencia a la inhibición de CDK4/6 es la pérdida de función de pRB [55, 68, 74, 76], además han sido propuestos otros mecanismos como la pérdida de p16, la sobreexpresión de *CICLINA-D1* o elevados niveles de CDK2 [68, 77, 78]. En este trabajo, hemos probado la inhibición de CDK4 usando Palbociclib en el tratamiento de los sarcomas y hemos explorado posibles marcadores de eficacia que no sean dependientes del subtipo histológico de sarcoma.

6. MAP17

MAP17 (DD96, PDZK1IP1) es una pequeña proteína no glicosilada asociada a la membrana [79, 80]. En condiciones normales se encuentra localizada sólo en las células tubulares renales de los adultos [81, 82]. Posee dos dominios transmembrana y un dominio de unión a PDZ en su extremo carboxilo terminal [83, 84] (Figura 3).

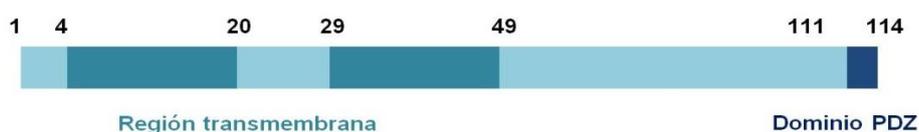


Figura 3. Representación de la estructura de la proteína MAP17. Se observan las regiones transmembranas y el dominio de unión a PDZ en el extremo carboxilo terminal.

El dominio de unión a PDZ es capaz de unirse a varias proteínas con un dominio PDZ, como el de NHRF3, NaPilla y NHe3 [81, 82, 84]. MAP17 aumenta las capacidades tumorigénicas de las células tumorales, induciendo un aumento en las especies reactivas de oxígeno (ROS) [85]. Además las células tumorales que sobreexpresan MAP17 muestran un incremento en la capacidad proliferativa tanto *in vitro* como *in vivo*, y una reducción de la apoptosis [85, 86]. MAP17 se sobreexpresa en una gran variedad de carcinomas humanos, cáncer de cérvix, de mama, de próstata y ovario [87] y su sobreexpresión esta correlacionada con la progresión tumoral [82, 87, 88]. Mientras que adenomas o tumores benignos y tejidos normales raramente expresan MAP17, la gran mayoría (50-90%) de tumores metastásicos expresan altos niveles de la proteína y presentan un fenotipo más des-diferenciado [82, 86-89]. Estos hechos marcan la relevancia de este gen en el proceso de tumorigenesis y en el desarrollo del tumor.

Sabemos que en las células en condiciones de homeostasis existe un balance entre la producción de ROS y la capacidad celular de detoxificar el estrés oxidativo inducido por ROS, gracias a la actividad de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y otras sustancias antioxidantes como el glutatión o la vitamina C.

Una acumulación de ROS, inducida por un aumento de la expresión de MAP17, sería suficiente para determinar la activación de señales que pueden influenciar los procesos de regulación celulares y tumorigénicos. Por otro lado parece existir un límite por encima del cual la acumulación de ROS mueve la balanza hacia la muerte celular programada [88]. Esto explicaría por qué varios tipos de cánceres que sobreexpresan MAP17 se benefician de tratamientos que inducen un aumento en ROS [88, 90, 91]. En este sentido MAP17 podría incrementar la eficacia de las terapias que inducen este aumento de ROS, y ser considerado un biomarcador de mejor pronóstico en esos tumores. Resumiendo, podríamos considerar MAP17 no solo un marcador de malignidad, sino también un biomarcador de sensibilidad a todos aquellos fármacos que inducen un aumento del estrés oxidativo.

En trabajos previos del laboratorio con células de cáncer de mama y xenografts, vimos que la expresión de MAP17 determinaba la sensibilidad a Bortezomib, y que la inhibición del estrés oxidativo abolía la capacidad de MAP17 de inducir la sensibilización al fármaco [92]. Por lo tanto los altos niveles de MAP17 podrían considerarse como predictivos de respuesta en todos aquellos pacientes tratados con Bortezomib. En ese trabajo hemos explorado la relevancia de la expresión de MAP17 en sarcomas y buscando nuevas alternativas terapéuticas hemos testado como los altos niveles de MAP17 podrían ser determinantes en la respuesta a Bortezomib.

7. El cáncer colorrectal

El carcinoma colorrectal es la tercera neoplasia más frecuente en el varón (tras el cáncer de pulmón y de próstata) y la segunda en la mujer (tras el cáncer de mama), con una incidencia mundial de 1.400.000 de casos nuevos por año (32.000 en España). A nivel mundial ocupa el tercer lugar en incidencia, representando un 9% de todos los tumores malignos diagnosticados [93,94]. Es responsable de aproximadamente 694.000 fallecimientos anuales, siendo la cuarta causa de muerte por cáncer en ambos sexos. La incidencia no ha parado de aumentar a lo largo de las últimas décadas en países desarrollados, en parte debido a los cambios en los hábitos alimentarios y el sedentarismo. Su prevalencia también ha aumentado tanto por el aumento de incidencia como por la mejora experimentada en los abordajes terapéuticos y, en consecuencia, en la supervivencia de estos pacientes. La supervivencia global (SG) de pacientes con cáncer colorrectal depende de múltiples factores, siendo el más importante el estadio tumoral, definido por la profundidad de penetración del tumor en la pared intestinal (T), por el número de ganglios afectados por el tumor (N) y por la presencia o no de metástasis (M) [95].

Al diagnóstico, aproximadamente el 14% de los pacientes diagnosticados de cáncer de colon se presenta con un tumor en estadio I, el 28% con un tumor en estadio II, el 37% en un estadio III y un 21% con un estadio metastásico. El hígado es el órgano más frecuentemente metastatizado en el cáncer colorrectal. Aproximadamente un 15% de los pacientes presenta metástasis hepática en el momento del diagnóstico, mientras que alrededor del 50% las acaba desarrollando a lo largo de la enfermedad. Se estima que casi la mitad de los pacientes que fallecen por cáncer colorrectal presenta metástasis hepáticas en la autopsia, y que las metástasis representan la causa del fallecimiento en la mayoría de esos casos [96].

El tratamiento estándar inicial del cáncer de colon localizado es la cirugía abierta de resección del tumor primario y de los ganglios linfáticos regionales. Cuando se diagnostican en estadios tempranos, estadios I y II, limitado al intestino, (Figura 4) la resección quirúrgica puede curar un alto porcentaje de pacientes (85-90% en estadio I; 70-75% en estadio II). Una vez que la enfermedad se ha extendido a los ganglios regionales (estadio III), la probabilidad de recidiva tras la cirugía aumenta notablemente (40-50%) y está indicado el empleo de quimioterapia adyuvante postquirúrgica para reducir el riesgo de recurrencia. Globalmente, aproximadamente el 20-30% de los pacientes se diagnostican en estadios avanzados o metastásicos (estadio IV) y el 50% de los pacientes con enfermedad resecable (estadios I-III) eventualmente recidivan tras la cirugía. Una vez diseminada, la enfermedad es esencialmente incurable y con un mal pronóstico, con menos del 5% de supervivientes a los 5 años.

Varias combinaciones terapéuticas, que incluyen fluoropirimidinas, Oxaliplatino y/o Irinotecan, con o sin el uso de anticuerpos monoclonales contra VEGF o EGFR, representan el estándar de tratamiento para el cáncer colorrectal metastásico. Estos tratamientos inducen respuestas objetivas en un 40-60% de los casos, no obstante generalmente esas respuestas no son completas ni muy duraderas en el tiempo, y se asocian a supervivencias que no exceden los 24 meses. Más recientemente, se ha visto que la resección quirúrgica completa de la enfermedad metastásica, cuando es factible, ofrece una alternativa terapéutica potencialmente curativa a largo plazo, con tasas de supervivencia a 5 años del 20 al 50% según las series [97, 98]. A pesar de los avances, el cáncer colorrectal metastásico sigue siendo incurable para pacientes con enfermedad no resecable..

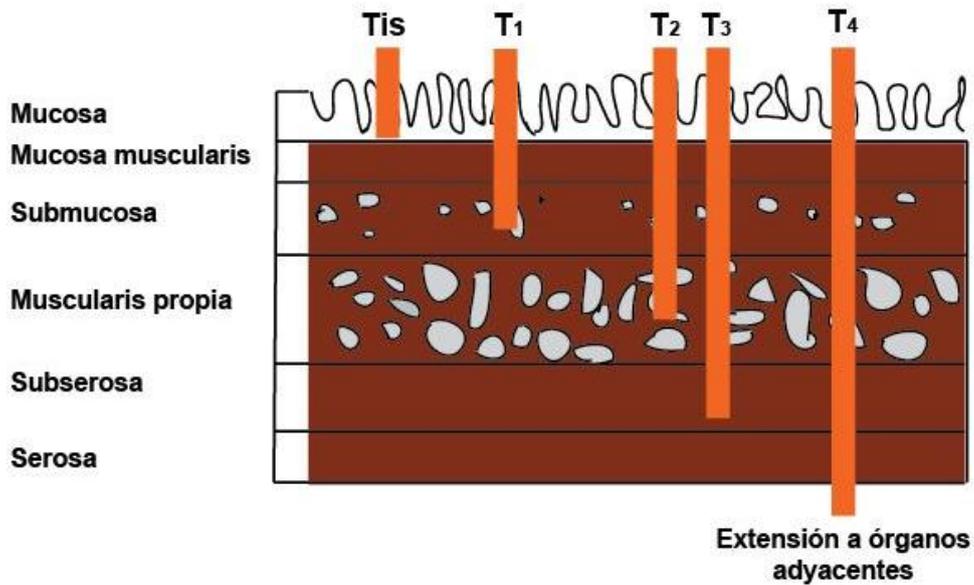


Figura 4. Cáncer colorrectal: estadificación y penetración de la mucosa.

Uno de los fármacos más comúnmente empleado tanto en el tratamiento adyuvante de los estadios precoces resecados como en el tratamiento de la enfermedad avanzada es el Oxaliplatino. El Oxaliplatino es un agente quimioterápico derivado del platino que forma aductos con el ADN bloqueando su replicación, con parada del ciclo celular resultante, y muerte celular [99, 100]. Los mecanismos de resistencia a los agentes derivados del platino son variados, como la disminución de la afluencia de platino, mejora en el sistema de reparación y aumento en la capacidad de detoxificación mediado por glutatión y metalotioneínas [99, 101]. La reversión de los mecanismos de resistencia ha demostrado ser un desafío en parte debido a la incapacidad de modular farmacológicamente estas rutas. Recientemente, la familia de las quinasas SRC ha sido implicada en la resistencia a fármacos [98-99]. SRC es el prototipo de una familia de nueve miembros, y se activa por numerosos estímulos de crecimiento, migratorios y de estrés [100]. En líneas celulares de carcinoma colorrectal y en tumores primarios los niveles de expresión de SRC fosforilado (p-SRC) y su actividad se han encontrados elevados comparados con las células de mucosa de colon normal [101]. SRC, además parece incrementarse sensiblemente en las metástasis hepáticas colorrectales comparadas con las que derivan de otros tipos tumorales [102, 103], y su aumento está relacionado con un peor pronóstico de supervivencia en los pacientes [104].

Profundizar en el conocimiento de las bases moleculares que determinan la génesis y progresión tumoral, así como su susceptibilidad individual a las distintas

estrategias terapéuticas, es un gran reto que sin duda contribuirá a mejorar el manejo clínico de estos pacientes y su supervivencia a largo plazo.

8. Las proteínas SRC

Las proteínas de la familia de SRC pertenecen a una familia de receptores citoplasmáticos de tipo tirosinas quinasas que actúan como complejos de señalización implicados en diferentes funciones celulares [105]. Las tirosinas quinasas están implicadas en transferir un grupo fosfato desde el ATP hacia los residuos de tirosinas presentes en secuencias específicas de aminoácidos en la proteínas diana. Esta categoría puede ser dividida a su vez en 2 grupos: las tirosinas quinasas receptores (RTK) y las tirosinas quinasa no receptores (nRTK).

Las RTK son receptores de membrana con actividad tirosina quinasa y poseen un dominio extracelular para la interacción con el ligando, una porción transmembrana y un dominio quinasa intracelular. La interacción del ligando con la porción extracelular del receptor de membrana determina su dimerización. Dicha dimerización conlleva la activación de la quinasa a través de un mecanismo de autofosforilación del dominio catalítico intracelular, que permite la transducción de la señal en el interior de la célula.

Las nRTK son moléculas que transmiten la señal pero no presentan una porción extracelular ni una porción transmembrana, aunque pueden tener un enlace directo con receptores de membrana. Estas moléculas transmiten la señal en respuesta a estímulos externos a través de dominios con actividad quinasa, actividad regulatoria o de modulación de la interacción proteína-proteína.

SRC pertenece al grupo de la nRTK y es un miembro de una familia de 9 miembros que juegan un papel clave en la transducción de señales intracelulares directamente relacionado con mecanismos de proliferación celular, diferenciación, angiogenesis, migración, invasión, adhesión y apoptosis [106-108]. La familia SRC incluye: SRC, LYN, FYN, YES, FGR, HCK, LCK and BLK. Todos los miembros de la familia poseen un dominio poco conservado y tres dominios homólogos conservados (SH1-SH2-SH3). Su actividad está regulada por procesos de fosforilación/defosforilación. En su forma inactiva el residuo Tyr 527 en el dominio carboxiterminal es fosforilado por la proteína quinasa CSK (Figura 5). La defosforilación en este residuo induce un cambio conformacional con consecuente autofosforilación en el residuo de tirosina 418 en el bucle de activación, promoviendo la activación de su actividad quinasa [109, 110].

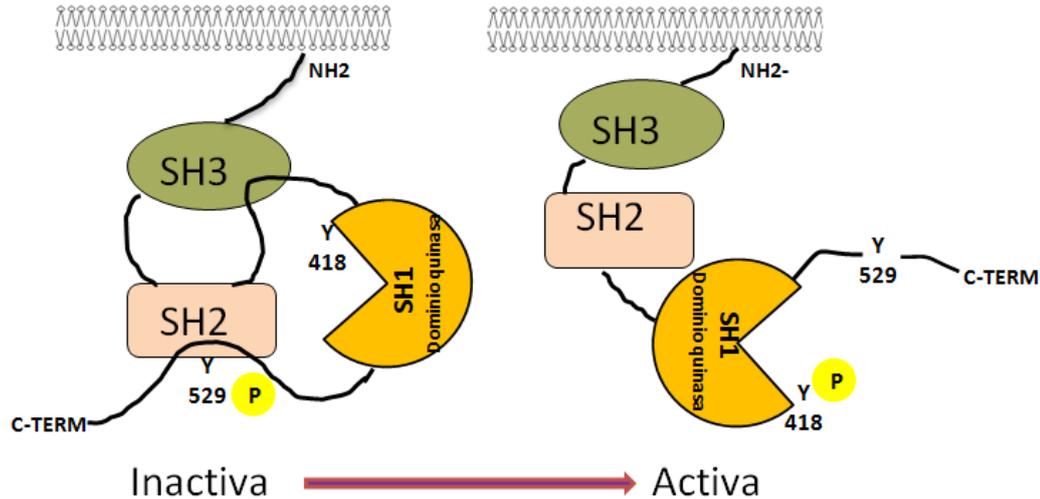


Figura 5. Imagen de la proteína SRC. La proteína SRC está compuesta por 4 dominios (SH1-SH2-SH3-SH4). El dominio SH4 se encuentra en la porción N-terminal y contiene una secuencia de mirostilación importante para el anclaje a la membrana. El dominio SH3, rico en prolina, es capaz de interactuar con otras proteínas o consigo misma. El dominio SH2 puede reconocer residuos de tirosina fosforilados, necesarios para la regulación de la actividad de la proteína. La región SH1 contiene el dominio de quinasa y el residuo Y418, fosforilado por el dominio quinasa.

Generalmente el 90-95 % de SRC se encuentra en un estado inactivo, sin embargo cuando hay mutaciones en el dominio tirosina 527, en SH2, SH3 o alteraciones en la actividad quinasa de la proteína CSK, SRC se encuentra en un estado constitutivamente activado. SRC ha sido implicado en una miríada de procesos que están desregulados en cáncer, además estudios recientes sugieren que la activación de SRC es crítica para mecanismos que regulan la progresión tumoral y la metástasis [108]. En el carcinoma colorrectal la desregulación de SRC parece estar implicada en varios procesos relacionados con la carcinogénesis, aunque los mecanismos moleculares no han sido aun plenamente dilucidados, además SRC activado está implicado en la resistencia a varios agentes quimioterapicos [111]. Estudios preclínicos realizados en líneas celulares de sarcomas y carcinoma ovárico muestran que la activación de SRC está relacionada con la resistencia a los platinos y que esta resistencia puede ser revertida a través de inhibidores farmacológicos específicos de SRC [112, 113]. En otro estudio en células de cáncer de colon humano se ha demostrado que la expresión de un dominante negativo en la actividad quinasa de SRC, determina el incremento de la capacidad del Oxaliplatino de inducir fenómenos apoptóticos. Por otro lado la activación de SRC, además de estar implicada en proceso de carcinogénesis en cáncer colorrectal, y en la resistencia a fármacos, se ha visto que se asocia a peor pronóstico [104]. Como resultado han

comenzado numerosos estudios clínicos en tumores sólidos con inhibidores de la familia de SRC [111, 114].

En conclusión, predecir en que células tumorales la inhibición de SRC podría ser un marcador de respuesta a los tratamientos con quimioterápicos y entender mejor a través de que mecanismo ayudaría a seleccionar que pacientes pueden beneficiarse de agentes inhibidores de SRC.

Objetivos

1. Generación de una plataforma *in vivo* (modelos PDX) de sarcomas y metástasis hepáticas de tumores colorrectales que sean potencialmente predictivos de respuesta a fármacos.
2. Comparación del perfil fenotípico, histológico y molecular entre los PDX generados y los tumores de origen.
3. Identificación de biomarcadores que nos permitan predecir la respuesta a los tratamientos en uso en la medicina oncológica.
4. Búsqueda de nuevas opciones terapéuticas que puedan aplicarse a pacientes que al día de hoy no tienen ninguna opción de tratamiento.

Materiales y métodos

9. Reactivos biológicos

9.1. Antibióticos

Geneticina Sulfato-G418 (Santa Cruz), Ampicilina/Streptomicina (Sigma), Fungizona (Sigma), Puromicina (Nucliber).

9.2. Fármacos o compuestos antitumorales

Dasatinib (CAS 302962-49-8-Deltaclon), Oxaliplatino (Accord), 5-Fluoruracilo (Accord) Palbociclib (PD0332991- Pfizer), Bortezomib (Janssen), PP2 (Sigma). Palbociclib fué una gentil donación de Pfizer.

9.3 Vectores

pCMV6-neo (vector retroviral con resistencia a neomicina), pCMV6-neo-CDK4 (wt CDK4 clonado en el vector pCMV6-neo) pCMV6-neo-CDK4-R24C (mutante CDK4-R24C clonado en el vector pCMV6-neo) pBabepuro (vector Retroviral con resistencia a puromicina), pBabepuro c-SRC (c-SRC clonado el el vector pBabepuro), pBabepuro-Map17 (Map17 clonado el el vector pBabepuro), pRetroSuper (vector de expresión de shARNs con resistencia a puromicina). c-SRC fue una gentil donación de Jorge Martín Pérez (IIB-CSIC).

9.4 Cepas bacterianas

Todos los plásmidos utilizados se propagaron en la cepa de E. Coli DH5-Alpha. Se crecieron en un medio LB (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l NaCl pH 7.0) a 37°C, con agitación, durante 16h.

9.5 Líneas celulares

En la tabla 1 se recogen las líneas celulares usadas en el siguiente trabajo, incluyendo el medio de cultivo, el origen y el tipo celular que representan.

Tabla 1: Características de las líneas celulares utilizadas

Línea celular	Especie	Tipo celular	Medio de cultivo	Crecimiento	Origen
SW48	Humana	Cáncer colorrectal	L15	Adherente	ATCC
SW480	Humana	Cáncer colorrectal	L15	Adherente	ATCC
LoVo	Humana	Cáncer colorrectal	F12 HAM+10%FBS	Adherente	ATCC
T84	Humana	Cáncer colorrectal	DMEM F12+10FBS	Adherente	ATCC
Colo-205	Humana	Cáncer colorrectal	RPMI 1640 +10%FBS	En suspensión	ATCC
LS174-T	Humana	Cáncer colorrectal	DMEM+10%FBS	Adherente	ATCC
HT-29	Humana	Cáncer colorrectal	McCoy-5A+10%FBS	Adherente	ATCC

LS180	Humana	Cáncer colorrectal	DMEM+10%FBS	Adherente	ATCC
A673	Humana	Sarcoma de Ewing	Ham F10+10%FBS	Adherente	ATCC
AA	Humana	Leiomiomasarcoma	Ham F10+10%FBS	Adherente	Nuestro grupo
AW	Humana	Liposarcoma	Ham F10+10%FBS	Adherente	Nuestro grupo
AX	Humana	Liposarcoma	Ham F10+10%FBS	Adherente	Nuestro grupo
AZ	Humana	Tumor Fibroso	Ham F10+10%FBS	Adherente	Nuestro grupo
BC	Humana	MPNST	Ham F10+10%FBS	Adherente	Nuestro grupo
BD	Humana	Sarcoma de Ewing	Ham F10+10%FBS	Adherente	Nuestro grupo
BG	Humana	Fibrosarcoma mixoide	Ham F10+10%FBS	Adherente	Nuestro grupo
CE	Humana	Rabdiosarcoma	Ham F10+10%FBS	Adherente	Nuestro grupo
IBIS DA	Humana	MPNST	Ham F10+10%FBS	Adherente	Nuestro grupo
IBIS DD	Humana	Mixofibrosarcoma	Ham F10+10%FBS	Adherente	Nuestro grupo
SAOS2	Humana	Osteosarcoma	DMEM+10%FBS	Adherente	ATCC
SW872	Humana	Liposarcoma	DMEM+10%FBS	Adherente	ATCC
1455	Humana	Liposarcoma	Ham F10+10%FBS	Adherente	ATCC
CP0024	Humana	Leiomiomasarcoma	RPMI 1640 +10%FBS	Adherente	Nuestro grupo
CP0038	Humana	Leiomiomasarcoma	RPMI 1640 +10%FBS	Adherente	Nuestro grupo
HT1080	Humana	Fibrosarcoma	EMEM (EBSS) + 2mM	Adherente	ATCC
SKUT-1	Humana	Leiomiomasarcoma	DMEM+10%FBS	Adherente	ATCC
93T449	Humana	Liposarcoma +10%FBS	DMEM+10%FBS	Adherente	ATCC

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo. **MPNST:** Tumor maligno de vaina nerviosa periférica.

9.6 Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en esta tesis, así como su procedencia, especie, tipo (monoclonal o policlonal), aplicaciones y diluciones empleadas se detallan en la tabla 2.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Proveedor	Dilución	Dilución
		WB	IHQ
SRC (EG107) (Policlonal conejo)	Abcam Ab32102	1:2500	1:100
p-SRC (Y418) (Policlonal conejo)	Abcam Ab4816	1:1000	1:100
P44/42 MAPK (Monoclonal conejo)	Cell Signaling 137F5	1:1000	
p-P44/42 MAPK (Thr202/204) (Monoclonal ratón)	Cell Signaling 9106	1:2000	
CDK2 (Policlonal conejo)	Santacruz sc-163	1:200	
CDK4 (Monoclonal ratón)	Abcam Ab3112	1 µg/ml	
CICLINA D1 (Monoclonal conejo)	Abcam Ab16663	1:5000	
pAKT (Ser-473) (Monoclonal conejo)	Abcam Ab81283	1:10000	
pRb (Ser 807/811) (Policlonal conejo)	Cell Signaling 9308	1:1000	
pRb (Ser795) (Policlonal conejo)	Abcam Ab47474	1:1000	
pRb (Ser780) (Monoclonal conejo)	Abcam Ab173289	1:1000	
RB (Monoclonal ratón)	BD Pharmingen 554136	1:500	

p-p107(Ser 975) (Policlonal conejo)	Santacruz sc-130209	1:200	
p130 (phospho S672) (Monoclonal conejo)	Abcam Ab76255	1:5000	
CDKN2A/p16INK4a (Monoclonal conejo)	Abcam Ab108349	1:1000	
p21 (Policlonal conejo)	Abcam Ab7960	1:500	
p53 (FL-393) (Policlonal conejo)	Santa Cruz sc-6243	1:200	
KI-67 MIB-1 (Monoclonal ratón)	DakoM7240		1:100
α-TUBULINA (Monoclonal ratón)	Sigma T6557	1:10000	
Histona H2AXp (Ser139) (Monoclonal ratón)	Millipore 05-636	1:1000	
HRP/DAB	Dako K5007		20ul
NFKB-p65 (Policlonal ratón)	Abcam Ab6502	1:2000	
p-NFKB-p65 (Ser536) (Monoclonal ratón)	Cell signaling 3033	1:1000	
LC3B (Policlonal ratón)	Abcam Ab48394	1ug/ml	
SQSTM1 / p62 (Policlonal ratón)	Abcam Ab109012	1:10000	
CK 20 (Monoclonal ratón)	Dako M7019		1:50
53BP1 (Policlonal ratón)	Novus Biol. NB100-304	1:100	
Cabra anti-conejo (Policlonal)	Abcam Ab6721	1:5000	
Burro anti-raton (Policlonal)	Rockland 605-731-002	1:5000	
Cabra anti-raton 680 (Monoclonal)	Invitrogen A21057	1:5000	

WB: western blot; IHQ: inmunohistoquímica

10. Técnicas básicas de biología molecular

10.1 Extracción de ADN desde líneas celulares y desde tejidos

El ADN total de líneas celulares se purificó con kit de Extracción (Qiagen) según las indicaciones del fabricante. A las células en monocapa, lavadas con PBS, se les añadió 1 ml del reactivo y utilizando un rascador se despegaron las células y se pasaron a un tubo de 1.5 ml, después se centrifugaron 5 minutos a 300 x g y se extrajo el sobrenatante. El pellet de células se resuspendió en 200µl de PBS y 20µl proteína K. Añadimos después 200µl de buffer de digestión y pusimos la muestra en agitación a 56°C durante 10 minutos. Tras la incubación añadimos a la muestra 200µl de etanol absoluto y agitamos la muestra con vortex. Se puso entonces la mezcla desde el eppendorf en columna y se centrifugó 1 minuto a 8000 x g con el fin de retener el ADN en la columna. Tras lavar la muestra en columna se eluyó con H₂O para extracción del ADN.

Para la extracción de ADN desde tejidos, las muestras de tejido humano y de ratón se purificaron con kit de extracción (Qiagen) según las indicaciones del fabricante. Antes de empezar el proceso de extracción de ADN y ARN, 25µg de cada muestra se sumergieron en nitrógeno líquido y se disgregaron con un mortero. A los pequeños fragmentos generados se les añadió 180µl de buffer de digestión y 20µl de proteinasa K y se dejaron en agitación a 56°C durante 2 horas. Una vez que el tejido

se ha lisado completamente, se procedió con el mismo protocolo descrito en el apartado “Extracción de ADN desde líneas celulares”.

11. Técnica de análisis a nivel de ADN

11.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar el estado mutacional de *PDGFR β*

La amplificación de fragmentos de ADN por PCR se realizó mediante un procedimiento estándar. Se preparó una mezcla que contenía 0.25mM de desoxirribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2.5 mM de MgCl₂, 1U de polimerasa Taq y un buffer comercial. Se usó para amplificar las muestras una cantidad de 100ng de ADN. Las reacciones se realizaron en termocicladores XP Cycler. Las condiciones de reacción fueron 3 minutos a 95°C, 40 ciclos de amplificación (30 segundos a 95°C, 40 segundos a 58°C, 1 minutos a 72°C) y una extensión final de 5 minutos a 72°C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se secuenciaron con secuenciador ABI 310 (Applied Biosystems).

Cebadores usados para amplificar el exón 19 de *PDGR β*:

Secuencia: GGATGGACATGGGAACTGTG

Secuencia: GGCATGAGTGGTCGAAG

11.2 Estudio mutacional del gen *KRAS*

En análisis mutacional se ha realizado por RT-PCR diseñando un set de 7 pares de sondas taqman de discriminación alélica (una para la secuencia silvestre y la otra para la probable secuencia mutada) para detectar 6 mutaciones en el codón 12 de *KRAS* y una en el codón 13 (Tabla 3). La amplificación del ADN se ha realizado usando aproximadamente 60ng de cada ADN en un volumen final de 10µl. La muestra se ha amplificado con un set de cebadores y con 8 diferentes cebadores reporter (uno para la secuencia silvestre y uno para cada una de las mutaciones). En cada reacción de RT-PCR se ha usado un control positivo por cada mutación y un control negativo como control de contaminación de los reactivos.

Secuencia de los cebadores:

Forward: AGGCCTGCTGAAAATGACTGAATAT

Reverse: GCTGTATCGTCAAGGCACTCTT

Tabla 3. Lista de mutaciones del gen *KRAS* analizadas y secuencia de los reporters

Gen	Exón	Cambio aminoácido	Reporter 1	Reporter 2
<i>KRAS</i>	12	p.Gly12Ser (G12S)	TTGGAGCTCGTGCCGT	TTGGAGCTGGTGCCGT
<i>KRAS</i>	12	p.Gly12Arg (G12R)	TTGGAGCTGGTGCCGT	TGGAGCTGATGGCGT
<i>KRAS</i>	12	p.Gly12Cys (G12C)	CCTACGCCACCAGCT	CTACGCCACAAGCT
<i>KRAS</i>	12	p.Gly12Asp (G12D)	CCTACGCCACCAGCT	CTACGCCAGCAGCT
<i>KRAS</i>	12	p.Gly12Ala (G12A)	CTACGCCACCAGCTC	CTACGCCACTAGCTC
<i>KRAS</i>	12	p.Gly12Val (G12V)	CTACGCCACCAGCTC	ACGCCAACAGCTC
<i>KRAS</i>	13	p.Gly13Asp (G13D)	TGGTGCCGTAGGCA	CTGGTGACGTAGGCA

11.3 Estudio mutacional de los genes *PI3K* y *BRAF*

Para detectar las 4 mutaciones más relevantes en *PI3K* (p.E542K, p.E545K, p.E545D, p.H1047R) y la mutación en *BRAF* (V600E) se ha realizado un estudio mutacional a través de sonda “taqman mutation detection” (Applied Biosystems). El estudio mutacional se llevó a cabo mediante un termociclador ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los resultados obtenidos fueron analizados con el software “Mutation Detector” (Applied Biosystems).

11.4. Análisis de inestabilidad de microsatélites (MSI)

Para detectar la presencia o no de inestabilidad de microsatélites (MSI) se realizó una amplificación de ADN de las muestras de tejido normal y tumoral del mismo paciente. Para la amplificación se mezclaron 2ng de ADN con una mezcla de reactivos según las indicaciones del fabricante (Promega). El sistema de análisis de MSI incluye cebadores marcados con fluorescencia para la co-amplificación de siete marcadores, entre ellos cinco marcadores de repetición de mononucleótidos (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24y MONO-27) y dos marcadores de 5 nucleótidos (Penta C y Penta D). Los marcadores de mononucleótidos se utilizaron para la determinación de MSI, y los de 5 nucleótidos se utilizan para detectar una potencial contaminación. Los productos de PCR amplificados se separaron por electroforesis capilar utilizando un ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) y los datos fueron analizados con GeneMapper® software (Applied Biosystems). Los datos de inestabilidad de microsatélites se obtuvieron comparando los perfiles alélicos de marcadores de microsatélites, generados por la amplificación de ADN, entre la muestra normal y la muestra tumoral. Los alelos que estaban presentes en la muestra tumoral pero no en la muestra normal indicaban la presencia de MSI.

12. Técnica de análisis de expresión a nivel de ARN

12.1. Extracción de ARN total desde líneas celulares y desde tejido

El ARN total de líneas celulares se purificó con kit de Extracción (Qiagen) según las indicaciones del fabricante. A las células en monocapa, lavadas con PBS, se les añadió 1 ml del reactivo y utilizando un rascador, se centrifugó 5 minutos a 300 x g y se extrajo el sobrenatante. Se le añadió al pellet 700µl de Qiazol y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 minutos. Para la separación de las fases, se añadieron 140µl de cloroformo y se agitó con vortex durante 15 segundos. Tras la incubación de la muestra durante 2-3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó 15 minutos a 12000 x g a 4°C. Se transfirió la interfase acuosa a otro tubo y se le añadió 1.5 volumen de etanol al 100% y se resuspendió varias veces. Se puso entonces la mezcla en columnas y se centrifugó por 1 minuto a 8000g. Tras varios pasos con bufferes para limpiar la columna, se eluyó con 30µl de H₂O libre de ARN.

Para la extracción de ARN desde tejido hemos seguido el mismo protocolo de disgregación de las muestras descrito en el apartado “Extracción de ADN total desde tejidos” y se ha usado el mismo Kit de extracción usado para la extracción de ARN desde líneas celulares descrito en el apartado “Extracción de ARN total desde líneas celulares”.

12.2. Transcripción reversa y PCR

La transcripción reversa se realizó mediante el “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits” (Applied Biosystems). Para la retrotranscripción se mezclaron 1µg de ARN total, diluido en agua en un volumen total de 25 µl, y 25 µl de mezcla de reacción, contenientes un buffer de transcripción reversa, una mezcla de dNTP, cebadores de secuencia aleatoria y la enzima retrotranscriptasa. Esta mezcla se incubó 25°C durante 10 minutos, después 2 horas a 37°C y por último 5 minutos a 80°C. Tras la incubación el ADNc se conservó a -20°C.

12.3. Muestras usadas en PCR cuantitativa a tiempo real

Se utilizó tejido tumoral de los 9 modelos PDX de sarcomas generado a partir de las muestras humanas procedentes del Banco de Tumores del Hospital Virgen del Rocío (Sevilla, España). Todas las muestras procedían de material sobrante tras el diagnóstico y fueron anonimizadas. El proyecto ha sido aprobado por el comité ético del Hospital Virgen del Rocío (acta 01/2013 y acta 01/2012). Las muestras de biopsias se recogieron y se congelaron a -80°C inmediatamente después de su extracción. Todos los tumores fueron histológicamente examinados para confirmar el diagnóstico.

12.4. PCR cuantitativa a tiempo real

El ARN total fue extraído del tejido tumoral del ratón, directamente de la biopsia humana o de las líneas celulares tumorales dependiendo del caso, con el kit miRNAeasy (Qiagen). El kit de ARN nano Lab Chip (Agilent, CA) se utilizó para cuantificar y determinar la integridad del ARN total aislado. Para determinar la expresión de *CDK4*, *CICLINA D1*, *p16* y *MAP17* se utilizó la tecnología RT-PCR cuantitativa a tiempo real. La cuantificación se hizo con un termociclador ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems, Foster City, CA) y los datos fueron analizados con el software *RQ Manager*. El programa de PCR consistió en una desnaturalización a 95°C durante 10 minutos y 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos; la hibridación y la polimerización se realizaron a 60°C durante 1 minuto. Los cebadores y la sonda taqman para *CDK4*, *CICLINA D1*, *p16* y *MAP17* fueron comprados de Applied Biosystems (Thermofisher). Para normalizar los resultados obtenidos se usó como control endógeno la sonda *GADPH* y β -*ACTINA* (Applied Biosystems-Thermofisher). Cada reacción se hizo por triplicado con cada ADNc de tejido tumoral. En la tabla 4 la lista de las sondas taqman usadas.

Tabla 4. Lista de sondas taqman utilizadas

Sondas taqman	Numero de bases	Proveedor	Referencia
<i>CDK4</i>	65	Thermofisher	Hs01565683g1
<i>CICLINA D1</i>	57	Thermofisher	Hs0076653m1
<i>p16</i>	115	Thermofisher	Hs00923894m1
<i>MAP17</i>	68	Thermofisher	Hs00173779m1
<i>GADPH</i>	58	Thermofisher	Hs03929097g1
β - <i>ACTINA</i>	171	Thermofisher	Hs99999903m1

12.5. Microarray

El array que hemos usado es el Prime View y el Kit Human Gene Expression Array GeneChip 3 IVT PLUS (Affymetrix, USA). El Kit genera copias complementarias al ARN (cARN) desde el Poly (A) ARN. En un segundo paso en la reacción de retrotranscripción 100ng de ARN de cada muestra se han convertido a ADNc de un único filamento, y por último a un doble filamento de ADNc. Se usaron simultáneamente dos enzimas, la ADN polimerasa y la RNase H para degradar el ARN y a la vez sintetizar el ADNc a doble filamento.

La hibridación se ha llevado a cabo en el instrumento *Gene Chip Hybridation 645* a una temperatura de 45°C a 60 repeticiones por minuto durante 16 horas, después los chip se lavaron (Gene Chip fluidic station 450- Affymetrix) y escanearon (Gene Chip

Scanner 3000 7G, Affymetrix). Finalmente los datos se adquirieron a través de un software.

12.6. PCR Array

El PCR ARRAY es un método altamente sensible y fiable que combina el rendimiento de una PCR en tiempo real y la tecnología de un microarray para detectar la expresión de muchos genes simultáneamente. Su amplio rango dinámico permite cuantificar en tiempo genes con alta y baja expresión en la misma muestra frente a un control. El ARN total fue extraído del tejido tumoral y no tumoral (normal) de las biopsias humanas o de las líneas celulares de sarcomas, según el caso, como descrito en el apartado de “extracción de ARN desde tejido”. Primero se retrotranscribieron las muestra de ARN. Pasamos después a unir el ADNc obtenido con una mezcla de reacción y a cargarlo en la placa del array MIHS-102Z (Qiagen). Una vez realizada la PCR a tiempo real se procedió a analizar los datos usando el software de análisis “miScript miRNA PCR Array”obtenido.

13. Técnicas de análisis de expresión a nivel de proteína

13.1. Extracción de proteínas totales

Las células se lavaron con PBS dos veces y se añadió sobre ellas un volumen de 1ml de RIPA buffer (tampón de lisis). Se dejaron las células en agitación con el buffer durante 10 minutos, después se recogieron los lisados mediante unos rascadores y se echaron en un tubo de 2ml. Las muestras se sometieron a 3 ciclos de 15 segundos de sonicación y se eliminaron los restos de material de desecho celular por centrifugación a 15000 x g durante 15 minutos a 4°C. Como último paso se recojió el sobrenadante y se guardó a -80°C. También se obtuvieron lisados de proteína a partir de tejidos de ratón y de muestras de tejidos humanos. En ese caso, antes de añadir el buffer de lisis, se procedió a disgregar las muestras con un mortero usando nitrógeno líquido. Una vez disgregadas las muestras se dejaron en agitación con el buffer de lisis durante 30 minutos a 4°C, y se ha procedido con el mismo protocolo de extracción de proteínas desde células. La cuantificación de los extractos proteicos se realizó usando el método Bradford modificado (BioRad), según las instrucciones del fabricante, utilizando como control el quick Start Bovin Serum Albumin (BSA) Standard Test (BioRad).

Tampón de lisis RIPA: Tris-HCl 25mM pH 8, NP-40 (IGEPAL) 1%, NaCl 150mM. Además, añadimos inhibidores de fosfatasas (un inhibidor general de fosfatasas: $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 20mM, un inhibidor de serín treonín fosfatasas, más un inhibidor

de tirosina fosfatasa: Na_3VO_4 1mM, o un coctel de inhibidores de fosfatasa (Sigma-P5726), e inhibidores de proteasas (Sigma-P8340) EDTA 5mM, SDS 0.1% y desoxicolato sódico.

13.2. Western blot

La inmunodetección de proteínas sobre membranas de PDVF (Whatman) o nitrocelulosa (Amersham) se realizó de acuerdo a un protocolo estándar. Los extractos proteicos se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (con una concentración dependiente del tamaño de la proteína a detectar) 6-15% o en geles prefabricados TGX Precast Protein 3 Gels (BioRad).

Después de determinar la cantidad apropiada de proteína, las muestras se disolvieron en tampón de carga (Tris-HCl 62.5mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 1%, 2-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.0025%) y se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-SDS en tampón de electroforesis (5X: Tris HCl 0.13 M, glicina 0.95 M, SDS 0.5%). Se procedió después a transferir las proteínas a una membrana de PDVF o nitrocelulosa según el caso, utilizando un equipo Mini Trans-Blot Cell (BioRad) o PROTEAN II xi Cell (BioRad). La transferencia se realizó a 400mA durante 2 horas (equipo Midi Trans-Blot Cell) o over night a 30mA (equipo PROTEAN II xi Cell) en buffer de transferencia (TrisHCl 0.025M, glicina 0.2M, 20% metanol). Las membranas se bloquearon durante 2 horas o toda la noche según el caso en agitación. El tampón de bloqueo contenía PBS 1%, Tween 20 al 0.01% y 4% de BSA o 4% de leche en polvo desnatada. Se incubaron sucesivamente con la dilución adecuada de anticuerpo primario y una dilución de 1:5000 – 1:10000 del anticuerpo secundario conjugado con peroxidada o marcado con un fluorocromo (diluido en tampón de bloqueo). La detección se realizó mediante una reacción quimioluminiscente (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) y la visualización con películas. Para cuantificar las bandas de proteínas, el sistema de detección utilizado fue una reacción quimioluminiscente (ECL, Amersham Pharmacia Biotech), utilizamos un escáner de BioRad para escanear la película y el programa “quantity one” para hacer la cuantificación.

14 Técnicas de inmunohistoquímica

14.1 Preparación de las muestras para análisis de inmunohistoquímica

Se usaron secciones de 5µm de los bloques de parafina. Las matrices de tejidos se desparafinaron en xilol y se rehidrataron en una serie gradada de alcoholes. A continuación se bloqueó la actividad peroxidasa endógena introduciendo las

secciones en una solución acuosa de H₂O₂ al 3% durante 30 minutos y, después se bloquearon los antígenos inespecíficos cubriendo las secciones con tampón de bloqueo al 1X (ROCHE) durante 1 hora a temperatura ambiente.

14.2. Análisis de expresión de Ki67 de p-SRC y MAP17 (PDZK1IP1)

Para la tinción con Ki67 las secciones se incubaron con el anticuerpo primario anti Ki67 (clon MIB-1-Dako) durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Tras lavar con tampón Tris 0.05 M, se aplicó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y el sustrato cromogénico 3.3' diaminobenzidina de acuerdo con el protocolo facilitado por el fabricante (EnVision, Dako). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina y se montaron en DPX (BDH Laboratories). Para la tinción con p-SRC las secciones se incubaron con el anticuerpo primario anti-fosfo-SRC Y418 (1:300) diluido en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Tras lavar con tampón Tris 0.05 M, se aplicó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa y el sustrato cromogénico 3.3' diaminobenzidina de acuerdo con el protocolo facilitado por el fabricante (EnVision, Dako). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina y se montaron en DPX (BDH Laboratories). Como control negativo se usaron secciones incubadas con tampón de bloqueo en lugar de anticuerpo primario. Se evaluaron al menos 10 campos utilizando un aumento de 200x; y se puntuaron como baja expresión si menos del 25% de las células tumorales estaban teñidas intensamente y alta expresión si más del 25% de las células tumorales estaban teñidas intensamente. Para la tinción con MAP17 las secciones de 3µm se seccionaban desde los bloques de TMA y se incubaron con el anticuerpo primario anti-MAP17 (1:4) diluido en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Después de la incubación, la inmunodetección se realizó con el sistema de visualización EnVision (Dako, Glostrup-Dinamarca) usando el sustrato cromogénico 3.3' diaminobenzidina, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La inmunotinción se realizó en un dispositivo 500 Techmate inmunotinción automático (DAKO) y se realizó una evaluación de doble ciego por microscopía. La puntuación de la muestra se realizó por análisis microscópico semi-cuantitativa, teniendo en cuenta la intensidad de la señal y el porcentaje de la tinción. Se utilizó la puntuación obtenida por los niveles de intensidad (1, 2 o 3).

15. Cultivos celulares

15.1. Cultivos y conservación de las líneas celulares

Las líneas se cultivaron en medio suplementado con glutamina (Sigma/Gibco), 10% de suero fetal bovino (FBS; Sigma), 100 u/ml de penicilina, 100 µg/ml de

estreptomycin y 1 µg/ml de fungizona (anfotericina B; Gibco), manteniéndolas en un incubador humidificado a 37°C en una atmosfera de 5% CO₂. Las células se crecieron en placas de 10 cm (Falcón) y se subcultivaron cada 2-3 días mediante tratamiento con tripsina/EDTA (Sigma). Para su almacenamiento a largo plazo, las células se conservaron en un contenedor de nitrógeno líquido, en criotubos de 2 ml, en su medio de cultivo normal o FBS, con 10% de dimetilsulfoxido (DMSO). Para descongelar un vial, se sumergió en un baño de agua a 37°C se centrifugó el contenido en 5 ml de medio con suero y las células se resuspendieron en su medio de cultivo habitual.

15.2. Transfección de células

El procedimiento se realizó en dos pasos, en el primero el ADN se mezcló con el enhancer y con un buffer que le confirió las condiciones salinas óptimas para una eficiente condensación del ADN. Tras 2-5 minutos de incubación a temperatura ambiente en el segundo paso se añadió el effectene al complejo ADN-enhancer. El complejo effectene-ADN-enhancer se mezcló al medio completo y se añadió directamente al cultivo celular. Tras 24 horas de incubación se procedió con la selección de los clones transfectados. La cantidad utilizada de cada reactivo dependió del tipo de placa de cultivo utilizada siguiendo las instrucciones del fabricante.

15.3. Selección de células transfectadas o infectadas

Tras 24 horas incubación se comenzó la selección con el antibiótico apropiado, dependiendo del caso, G418 (*Sigma*) o puromicina, a una concentración de 0.5-1µg/ml respectivamente, manteniéndolo durante el tiempo necesario (que vendrá dado por la muerte de las células control sin transfectar). Una vez seleccionado los clones para mantener las colonias seleccionadas reducimos la concentración del antibiótico a la mitad para evitar seleccionar clones sin el ADNc.

16. Ensayos celulares

16.1. Ensayo citotóxico con PP2 y Oxaliplatino, Palbociclib y Bortezomib

Se preparó una solución de fármaco en agua desionizada, o DMSO según los requerimientos de solubilidad de cada fármaco, a una concentración madre de 10mM a 300 mM dependiendo del fármaco (generalmente 100x de la concentración máxima a alcanzar en la placa de ensayo) en una placa de 96 pocillos en concentraciones decrecientes a 1/3. Las líneas celulares se sembraron en placas de 96 pocillos (2000-3000 células por pocillo, dependiendo de la línea celular). 24 horas después de la siembra se aplica el tratamiento con concentraciones decrecientes y se mantienen en condiciones normales durante 96 horas.

El Palbociclib (PD-0332991) se preparó en una solución en agua desionizada a una concentración madre de 300mM en una placa de 96 pocillos, el Bortezomib se preparó en una solución en agua desionizada a una concentración madre de 30mM, el Oxaliplatino se preparó una solución en agua desionizada a una concentración madre de 10mM en una placa de 96 pocillos y PP2 se preparó una solución en DMSO en a una concentración madre de 30m.

16.2. Visualización con cristal violeta

Después de 96 horas de tratamiento las placas de 96 pocillos se lavaron dos veces con PBS y las células adherentes se fijaron con una solución de glutaraldehído al 0.5% durante 30 minutos. Posteriormente se tiñeron durante 30 minutos con una solución al 0.1% de cristal violeta. La intensidad de de la tinción, directamente proporcional al número de células adherentes se cuantificó midiendo la absorbancia a 595nm usando un lector de microplacas (BioRad).

16.3. Visualización con MTT

Después de 96 horas de tratamiento se añadió a las placas de 96 pocillos 20 µL de reactivo MTT a una concentración de 5 mg/ml y se incubó a 37°C en oscuridad por un periodo entre 2 y 4 horas hasta que no se formó un precipitado violeta. Se añadió después 100µl de dimetilsulfoxido (DMSO) para disolver los cristales formados y se dejó en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La intensidad de la tinción se midió a 595nm usando un lector de microplacas (BioRad).

16.4. Inmunofluorescencia y análisis de Foci de 53BP1

Las células se sembraron en portaobjetos de vidrio y se cultivaron en las condiciones requeridas, entonces los cristales se fijaron con paraformaldeido al 4% durante 5 minutos a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PBS, se permeabilizaron con triton X-100 al 5% y por último se lavaron dos veces con PBS.

Las células fijadas se incubaron después en solución de bloqueo (PBS al 3% en BSA) a 37°C durante 1 hora, seguido de una incubación de 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo anti 53BP1 (Novus Biologicals NB100-304).

Tras un lavado con PBS las células se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con peroxidadas en una solución de bloqueo durante 1 hora en oscuridad. Los núcleos se tiñeron con DAPI y los cristales se montaron con la solución de montaje Prolong Gold Antifade (Life Technologies). Las muestras se visualizaron a través de un microscopio confocal (Leica TCS-SP2-AOBS-UV). La intensidad de

fluorescencia se midió en un mínimo de 300 células por condición usando el software Leica Confocal. La significancia estadística se calculó usando un test de Student.

16.5. Actividad SA- β gal asociada a senescencia

La actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β gal) se midió como se ha descrito previamente [115], salvo que las células se incubaron en 5-Bromo-4Cloro-Indolils-D-Galactopiranosido (*X-Gal*) a pH 5.5 para aumentar la sensibilidad del ensayo.

Las células senescentes se fijaron con glutaraldehído 0.5%, se lavaron 2 veces con MgCl₂ 1mM en PBS, se tiñeron con la solución de tinción de *X-Gal* durante 3 horas a 37°C, se lavaron con agua 2 veces y se guardaron a 4°C y en oscuridad hasta el análisis. El porcentaje de células que expresaban SA- β Gal se cuantificó al microscopio examinando más de 300 células y en tres repeticiones independientes.

17. Ensayo *in vivo*

17.1. Generación de modelos PDX de metástasis hepáticas colorectales y sarcomas

Los modelos PDX de metástasis hepáticas colorectal se generaron a partir de muestras humanas obtenidas de metástasis hepáticas resecadas de pacientes con cáncer colorectal metastásico y fueron implantadas en el hígado de ratones desnudos. Los modelos PDX de sarcomas se generaron a partir de muestras humanas resecadas de pacientes con sarcoma de origen muy heterogéneo y fueron implantadas subcutáneamente en ratones desnudos. El consentimiento informado ha sido previamente aprobado por el Comité Ético de Investigación clínica del Hospital Virgen del Rocío (acta 01/2013 y acta 01/2012). La información clínica se ha obtenido de la historia clínica del paciente por personal con formación y dedicación específica. El tratamiento de los datos de carácter personal se ha realizado de acuerdo a la normativa vigente, el RD 223/2004 de 6 de Febrero y la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de Diciembre sobre protección de datos de carácter personal.

De entre las metástasis hepáticas implantadas solo en torno al 40% se constituyeron en línea PDX ortotópica (Tabla 5), similar al porcentaje de los sarcomas implantados de forma subcutánea (Tabla 6).

Tabla 5. Orden de muestras de metástasis hepática colorrectal implantada ortotópicamente que se constituyeron en modelos PDX.

Muestra	Diagnostico Histológico	Fecha Implante
C003	Metástasis Hepática colorrectal	19/05/11
C005	Metástasis Hepática colorrectal	10/06/11
C009	Metástasis Hepática colorrectal	14/07/11
C010	Metástasis Hepática colorrectal	28/07/11
C012	Metástasis Hepática colorrectal	03/10/11
C013	Metástasis Hepática colorrectal	17/10/11
C016	Metástasis Hepática colorrectal	23/11/11
C018	Metástasis Hepática colorrectal	23/01/12
C021	Metástasis Hepática colorrectal	12/03/12
C022	Metástasis Hepática colorrectal	20/03/12
C025	Metástasis Hepática colorrectal	14/05/12
C034	Metástasis Hepática colorrectal	25/02/13
C035	Metástasis Hepática colorrectal	04/03/13
C036	Metástasis Hepática colorrectal	08/04/13
C037	Metástasis Hepática colorrectal	12/04/13
C042	Metástasis Hepática colorrectal	13/06/13
C043	Metástasis Hepática colorrectal	24/06/13
C044	Metástasis Hepática colorrectal	24/06/13
C045	Metástasis Hepática colorrectal	01/07/13
C046	Metástasis Hepática colorrectal	10/07/13

Tabla 6. Orden de muestras de sarcomas implantadas subcutáneamente en ratones desnudos que se constituyeron en modelos PDX.

Muestra	Diagnostico Histológico	Fecha implante
S11	Mixofibrosarcoma de alto grado	17/05/2011
S14	Tumor maligno de vaina nerviosa periférica, grado 2.	21/09/2011
S16	Mixofibrosarcoma grado 2.	22/11/2011
S21	Sarcoma sinovial monofásico	15/02/2012
S23	Sarcoma pleomórfico indiferenciado	20/03/2012
S25	Sarcoma pleomórfico indiferenciado	01/04/2012
S27	Recidiva de sarcoma pleomórfico de alto grado	24/04/2012
S28	Liposarcoma mixoide de células redondas grado 2	15/05/2012
S29	Leiomiomasarcoma	06/06/2012

17.2. Preparación de la muestra

El tejido excedente del análisis anatomopatológico de los tumores resecaados se implantó, antes de 2 horas desde la resección en ratones desnudos (Athymic Nude

Foxn1nu-Harlan) en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS) de acuerdo al protocolo aprobado por comité de uso y cuidado animal del IBIS. El tejido excedente se cortó en piezas de 2-3 mm de espesor, eliminando áreas de tejido necrótico, y manteniéndolo en medio F10-Ham (Sigma) suplementado con glutamina (Gibco), 10% de suero fetal bovino (FBS; Sigma), 100 u/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 1 mg/ml de fungizona (anfotericina B; Gibco/Invitrogen).

17.3. Implantación de la muestra en ratones inmunosuprimidos

Bajo anestesia por vía intraperitoneal con Diazepam (Valium 5 mg/ml-Roche) y Ketamina hidrocloreto (KETOLAR 50 mg/ml- Pfizer) en proporción 1:3, en un volumen de 100µl los tumores fueron implantados mediante una incisión en ratones hembra de 5-6 semanas, depositando una pieza tumoral en el lóbulo hepático derecho del ratón (Figura 6). Para los implantes subcutáneos se practicaba una incisión de la dermis cerca de la nalga depositando subcutáneamente una pieza tumoral en cada ratón.

17.4. Seguimiento

Tras la cirugía de implante, los ratones se observaron y pesaron diariamente para asegurar la recuperación y observar posibles disminuciones de peso o síntomas de enfermedad o estrés. Cuando los ratones mostraron señales de malestar se sacrificaron y los tumores se recolectaron y reimplantaron de manera similar para asegurar un crecimiento exponencial adecuado.

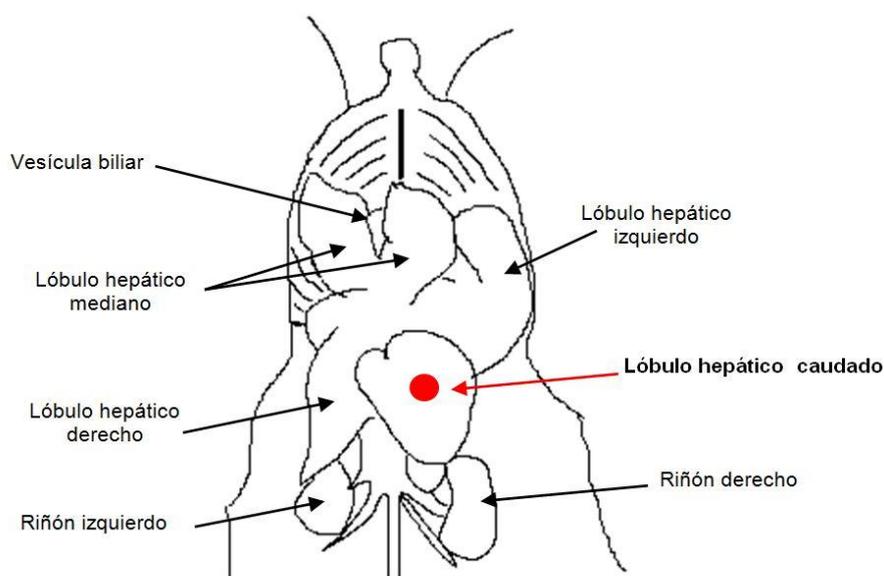


Figura 6. Anatomía de ratón. La flecha roja y el círculo indican el lugar del implante de las metástasis hepáticas colorrectales.

17.5. Evaluación del crecimiento tumoral de los tumores subcutáneos

El crecimiento del tumor se evaluó a través de un calibre, midiendo el tamaño tumoral dos veces por semana. Para valorar el tamaño se usó la fórmula $(\text{alto} \times \text{por ancho})^2 / 2$.

17.6. Evaluación del crecimiento tumoral de los tumores ortotópicos a través de tomografía por emisión de positrones (PET)

En este caso se utilizó el radionúclido 6-fluorodeoxiglucosa (FDG). El radiofármaco se administró en la vena de la cola a través de una sonda intravenosa (IV) entre 4 y 6 semanas después del implante del xenoinjerto. Luego, a través del escáner PET se detectaron los positrones emitidos por la descomposición de los radionúclidos.

17.7 Necropsia y análisis patológico

Una vez sacrificados los animales, se realizó la necropsia y se recogieron muestras de determinados tejidos para realizar el análisis histológico. Las muestras se fijaron en formalina al 4% tamponada durante 24 horas. Tras un proceso de deshidratación con etanol a distintas concentraciones y xilol, se introdujeron en parafina a 65°C, obteniendo bloques de los que se hicieron cortes de 2µm en micrótopo automático. A continuación se realizaron cortes de 3µm que se tiñeron con hematoxilina y eosina y/o incubaron con diferentes anticuerpos como se describe en el apartado de "Técnica de inmunohistoquímica". También se recogieron muestras de tejidos normales y tumorales que se congelaron a -80°C. Algunos de estos tejidos congelados se disgregaron y lisaron con solución de lisis para extracción de ARN y proteínas como se describe en el apartado (extracción de ARN desde tejidos) y se utilizaron para analizar determinadas proteínas por western blot y niveles de ARN de algunos genes por PCR a tiempo real (RT PCR).

18 Ensayos *in vivo* con fármacos

18.1. Tratamiento con Dasatinib

Se preparó una disolución de Dasatinib (CAS 302962-49-8) a una concentración de 4.5 mg/ml en agua a pH 2.5. Se trataron ratones de entre 3 y 4 meses de edad por vía intraperitoneal, 5 semanas después de la implantación de la muestra. La dosis final fue de 0.45 mg en un volumen final de 100 µl, 5 veces por semana durante 4 semanas.

18.2. Tratamiento con Oxaliplatino

Se preparó una disolución del fármaco a una concentración de 1 mg/ml en suero fisiológico. Se trataron ratones de entre 3 y 4 meses de edad por vía intraperitoneal, 5 semanas después de la implantación de la muestra. La dosis final fue de 0.1 mg en un volumen final de 100 µl, 5 veces por semana durante 4 semanas.

18.3. Tratamiento combinado Dasatinib más Oxaliplatino

La combinación de fármacos se ha preparado a la misma concentración y con el mismo esquema del tratamiento único, es decir Dasatinib 4.5 mg/ml en un volumen final de 100 µl 5 veces por semana y Oxaliplatino 1 mg/ml en un volumen final 100 µl 2 veces por semana durante 4 semanas.

18.4. Tratamiento con 5 Fluorouracilo

Se preparó una disolución del fármaco a una concentración de 2 mg/ml en suero fisiológico. Se trataron ratones de entre 3 y 4 meses de edad por vía intraperitoneal, 5 semanas después de la implantación de la muestra. La dosis ha sido de 0.2 mg en un volumen final de 100 µl 2 veces por semana durante 4 semanas.

18.5. Tratamiento combinado Dasatinib más 5 Fluorouracilo

La combinación de fármacos se ha preparado a la misma concentración y con el mismo esquema del tratamiento único, es decir Dasatinib 4.5 mg/ml en un volumen final de 100 µl 5 veces por semana y Fluorouracilo 2 mg/ml en un volumen final de 100 µl 2 veces por semana durante 4 semanas.

18.6. Tratamiento con Palbociclib

Se preparó una disolución del fármaco a una concentración de 20 mg/ml en agua. Se suministró el fármaco a ratones de entre 2 y 3 meses de edad por vía oral, 2 semanas después de la implantación de la muestra. La dosis ha sido de 2 mg en un volumen final de 100 µl 7 veces por semana durante 3 semanas.

18.7. Tratamiento con Bortezomib

Se preparó una disolución del fármaco a una concentración de 1 mg/ml en suero fisiológico. Se trataron ratones de entre 2 y 3 meses de edad por vía intraperitoneal, 2 semanas después de la implantación de la muestra. La dosis ha sido de 0.1 mg en un volumen final de 100 µl 5 veces por semana durante 4 semanas.

18.8. Análisis estadístico de los datos obtenidos y software de análisis.

Utilizamos el programa informático GraphPad PRISM o el software SPSS 22.0, dependiendo del tipo de análisis, para todos los análisis estadísticos. Para correlacionar la sensibilidad *in vitro* con los niveles de ARNm y de proteínas, para determinar la significación estadística de la inmunofluorescencia y del análisis por microscopia confocal de los Foci de 53BP1 aplicamos un test de student. Usamos el método de Kaplan Meier para todos los análisis de supervivencia, aplicando el modelo de regresión de Cox para ajustar las variables y obtener los valores de significación estadística (p) y de Hazard Ratio. Valores de p menores a 0.05 ($p < 0.05$) fueron considerados estadísticamente significativos. Usamos en análisis de regresión logística multivariante para el cálculo de las “odds ratio” (OR) y los intervalos de confianza (95%). Para calcular la dependencia entre las variables cuantitativas utilizamos un test de correlación de Pearson. Realizamos una curva COR para determinar un punto de cohorte para la expresión de MAP17. Para comparar la distribución en supervivencia entre la baja y la alta expresión de MAP17 se utilizó la prueba de Mantel-Cox. Para el ensayo de apoptosis se utilizó el software BD FACS DIVA 8.0 Los valores de IC50 fueron calculados usando el software GraphPad Prism. La cuantificación relativa de ARNm y los análisis estadísticos de qPCR se realizó usando el software RQ Manager 1.2.1.

Resultados

19. Eficacia de la inhibición de CDK4 en sarcomas

19.1. Análisis transcriptómico de muestras de sarcomas

En primer lugar, con objeto de estudiar la señalización desregulada en sarcomas, decidimos realizar un perfil transcriptómico completo de varios subtipos histológicos de sarcomas de pacientes intervenidos en el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla, y los comparamos con los correspondientes tejidos normales. En análisis computacional de los datos obtenidos reveló una sobre regulación en las rutas de ciclo celular y replicación del ADN (Figura 7A) y una baja representación en las rutas del sistema inmune y de presentación antigénica (Figura 7B). También realizamos un array de miARN (micro ARN) y encontramos una reducción de la expresión en los miARN implicados en la ruta de los receptores tirosina quinasa y en la ruta de ciclo celular (Figura 7C).

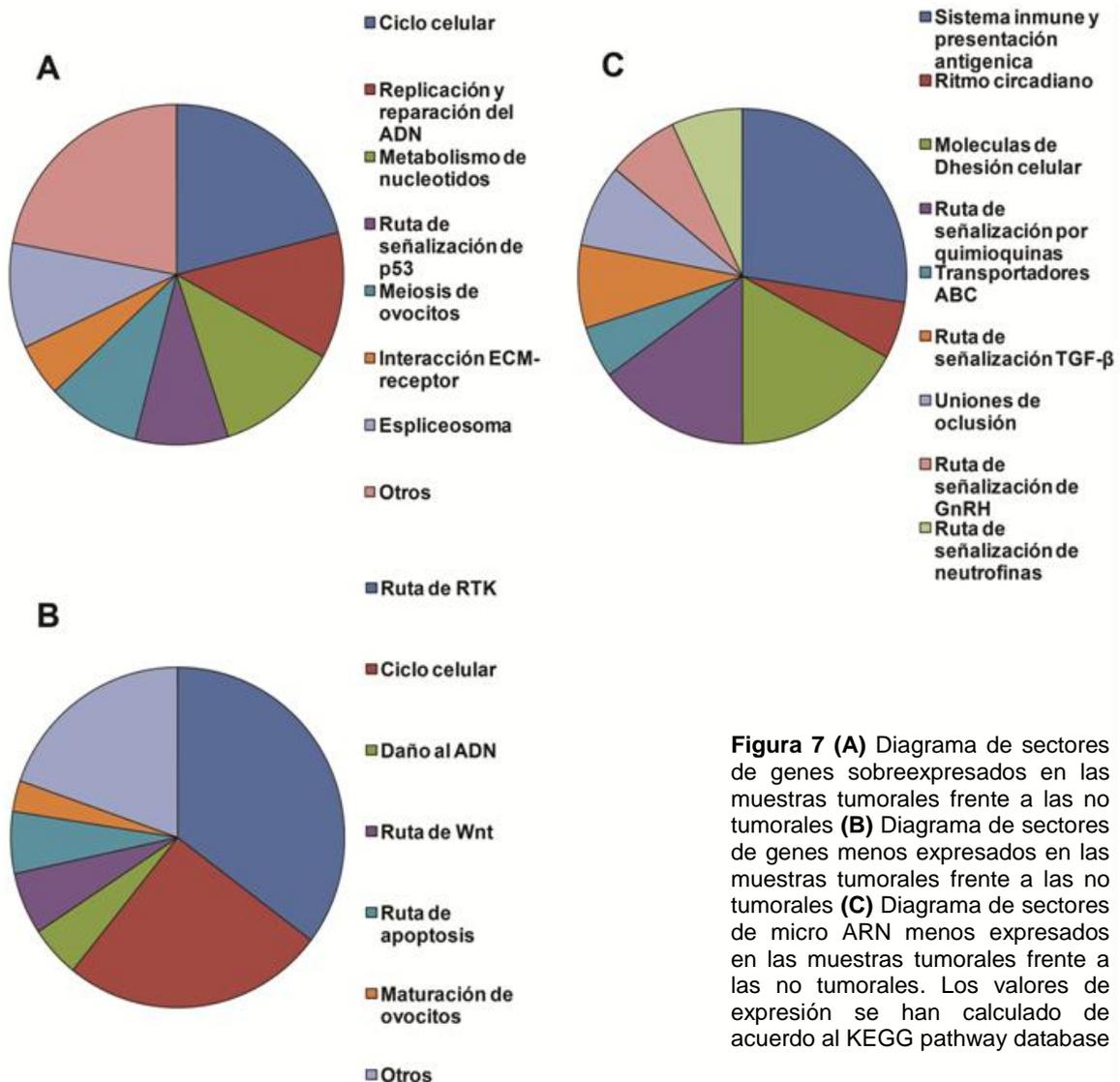


Figura 7 (A) Diagrama de sectores de genes sobreexpresados en las muestras tumorales frente a las no tumorales **(B)** Diagrama de sectores de genes menos expresados en las muestras tumorales frente a las no tumorales **(C)** Diagrama de sectores de micro ARN menos expresados en las muestras tumorales frente a las no tumorales. Los valores de expresión se han calculado de acuerdo al KEGG pathway database

Aunque en los últimos años se han producido avances notables en el conocimiento de la patología y de la biología molecular de los sarcomas, aun no se ha logrado una caracterización adecuada de los perfiles moleculares de los varios subtipos histológicos de sarcomas y apenas se han identificado alteraciones genéticas que sean dianas directa para futuras terapias. Quizá la única excepción son los GIST, donde la inhibición de la quinasa c-KIT induce una respuesta parcial o una estabilización de la enfermedad en aproximadamente el 80% de los pacientes [44]. Este hecho nos ha llevado a pensar que una amplia variedad de sarcomas podrían mostrar una dependencia de una particular quinasa, y que la inhibición de estas proteínas podría ser eficaz para todos los subtipos histológicos positivos para ese biomarcador.

La desregulación del ciclo celular es crucial para varios procesos de transformación oncogénicos y son varios los mecanismos que contribuyen a dicha desregulación, entre otros, la amplificación o la mutación de los genes que codifican para las ciclinas dependientes de quinasas, CDK4 y CDK6 [52, 54]. CDK4 y CDK6 se consideran esenciales para el proceso de transición G1/S y han sido elegidos, mayoritariamente CDK4, como diana terapéutica en varios tipos de cánceres. Entre los varios inhibidores de CDK4/6 actualmente en fase clínica el primero que ha sido testado y aprobado para uso en humanos es el Palbociclib (PD03329919).

En este trabajo, hemos probado la inhibición de CDK4 usando Palbociclib en el tratamiento de los sarcomas y hemos explorado posibles marcadores de eficacia.

19.2. Palbociclib induce senescencia en líneas celulares de sarcomas de diferentes orígenes

Para averiguar el efecto de la inhibición de CDK4, decidimos tratar con Palbociclib 10 líneas celulares de sarcomas, generadas directamente a partir de muestras de pacientes y 2 líneas comerciales de origen muy heterogéneo y con diferente cariotipo (Tabla 7) [10, 11]. En todos los casos obtuvimos valores de IC50 en el rango de μM (Tabla 7).

Tras analizar la sensibilidad a Palbociclib de las líneas celulares de sarcomas, decidimos explorar en profundidad el efecto generado por la inhibición de CDK4. Por eso seleccionamos 4 líneas celulares de distintas características para medir el efecto producido (AA, AX, AW, BG). En primer lugar analizamos el proceso de senescencia midiendo la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β gal). Encontramos que el tratamiento con Palbociclib inducía la parada del ciclo celular y la entrada en senescencia de todas las líneas celulares tratadas, que se identificaba con un incremento de la tinción con SA- β gal. (Figura 8A). Tras 4 días de tratamiento con

Palbociclib observamos un aumento de actividad de β -galactosidasa (SA- β gal) de 2.4 veces (AA), de 2.5 veces (AX), de 2.2 veces (AW) y de 4.3 veces (BG) (Figura 8A). Por otro lado también observamos que el tratamiento con Palbociclib inducía un aumento de expresión de Foci de 53BP1, frente al control, respectivamente de 2 veces (AA), 4.8 veces (AX) de 2 veces (AW) y de 5.9 veces (BG) (Figura 8B).

Tabla 7. Cariotipo de varias líneas celulares de sarcomas. En la tabla se representa nuestro panel de líneas celulares de sarcomas, incluyendo líneas poco pasadas generadas en nuestro laboratorio. Se incluye el correspondiente cariotipo y los valores de IC50 para el tratamiento con Palbociclib.

Líneas celular	Tipo de sarcoma	Cariotipo	IC50 Palbociclib (μ M)
AW	Liposarcoma	46,XY/47 +3/50%/50%	16.44 \pm 1.62
AA	Leiomiomasarcoma	55-63<3n>XXY,-3,-4,-8,i(8)(q10),add(8)(p23), der(11)t(5?;11)(q13;p15),-12,-13,-14,-16,der(1;7)(t(17;?) (p?;?)), -18,-22, mar 1-3	26.63 \pm 2.20
SW872	Liposarcoma	(5)t(5;?)(q31;?)1,dre(5)t(5;?)(q31;?)2,der(6)t(6;?)(q15:?),der(7)t(7;?)(q36;?),t(15q16q	15.79 \pm 0.13
BD	Sarcoma de Ewing	46, XY	23.07 \pm 2.33
AX	Liposarcoma	62-65,<3n>,-3,-4,-5,+7,der(7)t(7;?),add(8)(p?),i(8)(q10),-9,-11,der(11)t(5;11),-13, add(14)(q32),-15,x2,-16,-18,+1-4mar cp5]	16.90 \pm 0.20
BG	Fibrosarcoma mixoide	44-49.XY,der(1)t(1;3)(q12;p12).-3,-4,+6,+7x2,der(11) t(10;11;15),-13x2,-15,+der(16)t(16;?)(q12;?),del(17)(p11.2) +20[cp4]	20.96 \pm 0.04
BC	MPNST	46, XX	12.43 \pm 1.01
AZ	Tumor fibroso	46,XX/47,XX+8/50%/50%	17.42 \pm 5.46
A673	Sarcoma de Ewing	46~47,XX,der(1)t(1;9)p36;q22,der(3)del(3)(p21) del(3)(q21),del(4)(q21q31),(5;8)(q33;q21),der(9)t(9;13)(q22;q14),+der(11)t(11;13)(p13;q14),der(13)t(1;13)p36;q14,der(13)t(11;13)(q13;q14)(11;22)(q24;q12),der(16)t(3;16)(q21?;q22),der(22)t(11;22) (q24;q12) [cp15].	8.95 \pm 0.40
CE	Rabdomiosarcoma	46, XY	15.72 \pm 1.17
DA	MPNST	ND	25.9 \pm 1.34
DD	Fibrosarcoma mixoide	ND	16.65 \pm 0.15

El IC50 ha sido calculado como resultado de valores medios de un triplicado de tres experimentos realizado independientemente. MPNST= tumor maligno de vaina nerviosa periférica. ND=No detectado

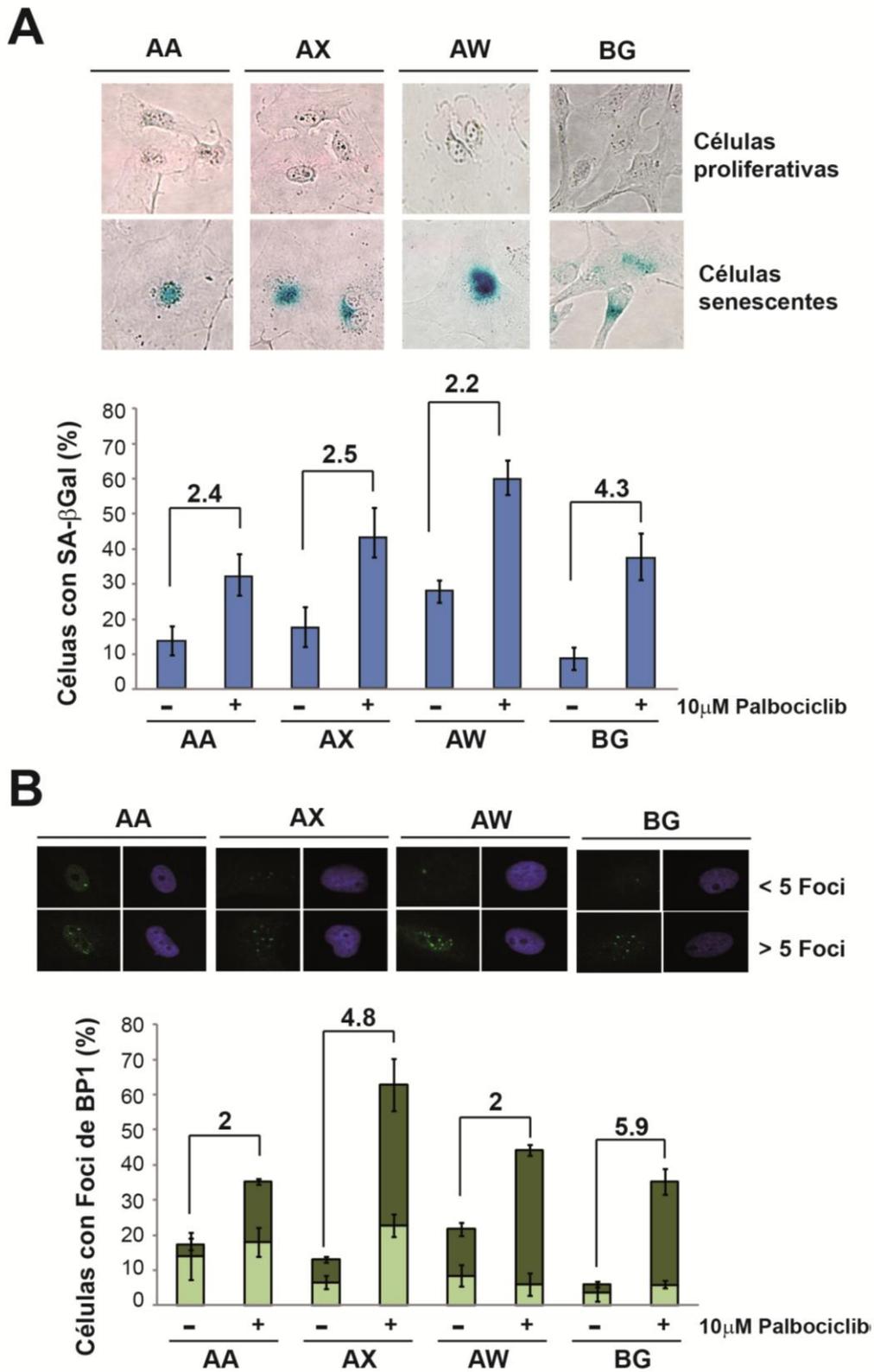


Figura 8. Senescencia en líneas celulares de sarcomas de diferentes orígenes. (A) Análisis de senescencia asociado a actividad β -galactosidasa (SA- β gal). Imagen representativa y cuantificación de SA- β gal en las líneas celulares de sarcomas AA, AX, AW y BG en presencia o ausencia de Palbociclib 10 μ M. Todas las líneas tratadas mostraban fenotipo senescente, que se identificaba con un incremento de la tinción con SA- β gal **(B) Análisis de los niveles de Foci 53BP1.** Imagen representativa y cuantificación de Foci de 53BP1 en las líneas celulares de sarcomas AA, AX, AW y BG en presencia o ausencia de Palbociclib 10 μ M. Se observa como el tratamiento induce un aumento de los Foci en todos los casos.

19.2.1. Efecto de Palbociclib sobre el ciclo celular

Pasamos entonces a estudiar los cambios inducidos sobre algunas proteínas de ciclo celular tras el tratamiento con Palbociclib. Como esperábamos, la inhibición de CDK4 mediante Palbociclib se acompañaba con la inhibición de la fosforilación de Rb en todas las líneas celulares tratadas, (AA, AX, AW, BG), sin embargo no detectábamos cambios significativos en los niveles de p16 ni de p21, salvo en la línea celular BG, la única línea celular con p53 wild type, en la que el tratamiento inducía un importante incremento de p21 (Figura 9).

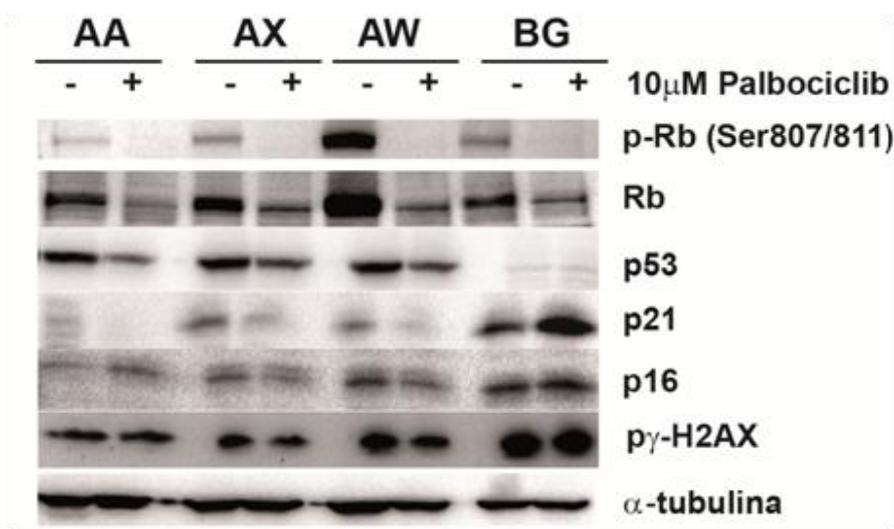


Figura 9. Estudio de los niveles proteicos de p-Rb, Rb, p53, p21, p16 y p γ -H2AX. Western blot de varias proteínas de ciclo celular en las líneas celulares de sarcomas AA, AX, AW y BG en presencia o ausencia de Palbociclib 10 μ M.

19.2.2. Los niveles de *CDK4* determinan la respuesta a Palbociclib en un panel de líneas celulares de sarcomas.

El siguiente paso fue explorar como la actividad de Palbociclib se relacionaba con alguna característica molecular de las líneas celulares. Había sido ya descrito en diferentes modelos que la actividad de Palbociclib correlacionaba con los niveles de p16 o *CICLINA-D1* [77, 78], por esa razón decidimos caracterizar nuestras líneas celulares para esas moléculas, así como con los niveles de CDK4 y el estado mutacional de p53 (Figura 10). Encontramos niveles variables entre las diferentes líneas celulares, además de diferente estado mutacional de p53. Pasamos después a analizar la correlación que había con la respuesta a Palbociclib. Observamos que no había ninguna correlación entre la sensibilidad al compuesto y la complejidad del cariotipo (Figura 11). Encontramos además que la sensibilidad *in vitro* a Palbociclib se correlacionaba con altos niveles de *CDK4*, tanto de ARNm (test de student, $p=0.017$)

como de proteínas (test de student, $p=0.077$), sin embargo encontramos que no había ninguna correlación con los niveles celulares de *p16*, *CICLINA-D1*, *estatus de p53* o cariotipo (Figura 11).

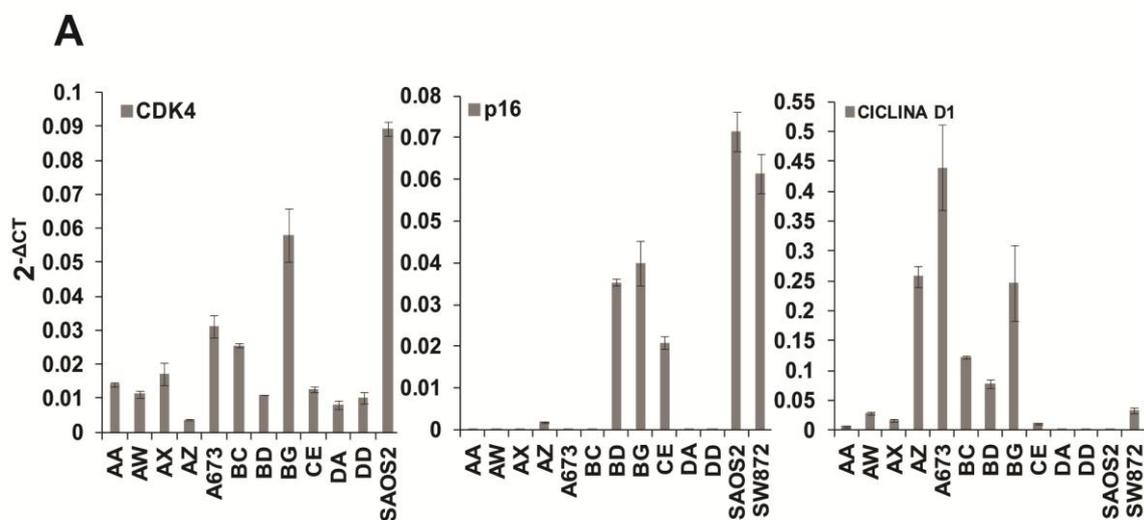


Figura 10. (A) Niveles de ARNm de *CDK4*, *P16* y *CICLINA-D1* en un panel de líneas celulares de sarcomas. Se muestran los niveles de expresión de ARNm de un panel de líneas celulares de sarcomas. Los niveles se han medido en triplicado por RT-PCR y los resultados se han normalizado con GADPH. **B) Tabla esquemática con los niveles proteicos y de ARNm de *CDK4*, *p16* y *CICLINA-D1* y con el estado mutacional de *p53* en el panel de líneas celulares de sarcomas (1):** 1: presencia de ARNm; 0: ausencia de ARNm, **(2):** 1: sobreexpresión de la proteína ; 0: ausencia o bajos niveles de la proteína, **(3):** 1: altos niveles de la proteína; 0: niveles normales de la proteína, **(4):** 1: altos niveles de ARNm; 0: niveles normales o negativos de ARNm. Estos fueron los niveles dicotómicos considerados para la correlación de la Figura 11

Para profundizar en los datos obtenidos, es decir en la correlación entre niveles de *CDK4* y sensibilidad al inhibidor de *CDK4*, decidimos tratar un panel de líneas celulares de sarcomas con Flavopiridol, otro inhibidor de las ciclinas dependientes de quinasas. El análisis de los IC50 mostró una correlación entre la

sensibilidad al compuesto y los niveles *CDK4* (Figura 12), sin embargo no encontramos ninguna correlación entre sensibilidad a Flavopiridol y niveles de *p16*, *CICLINA-D1* o subtipo histológico del tumor.

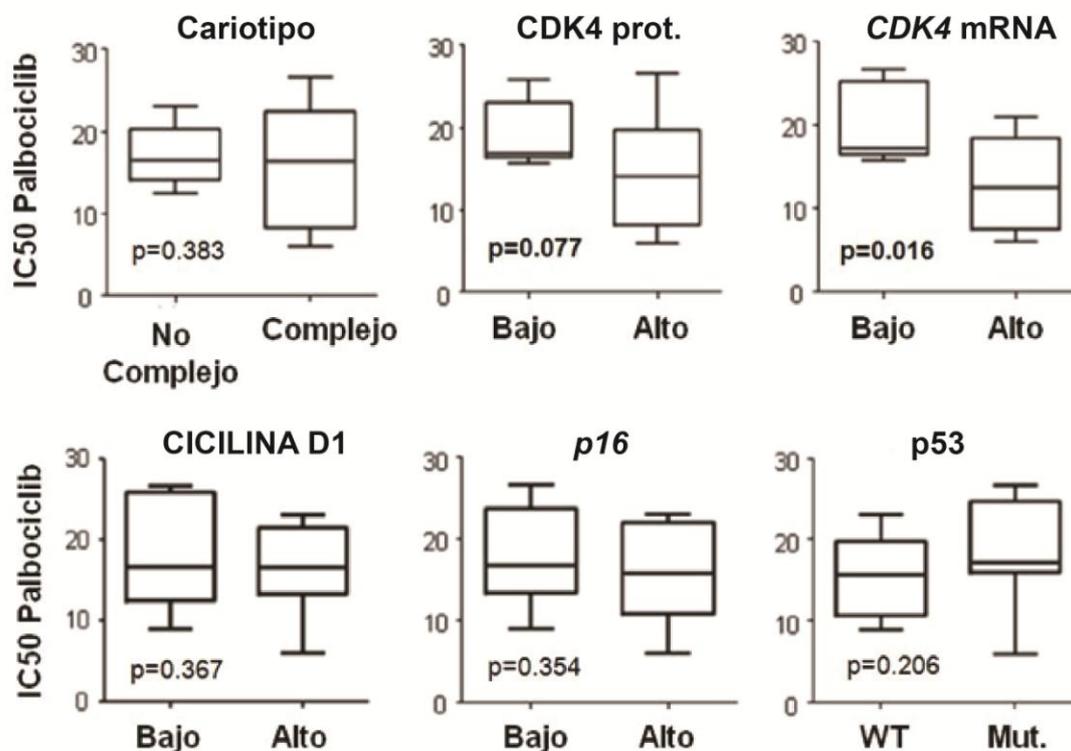


Figura 11. Representación esquemática de correlación. Se muestra la correlación entre los niveles de *CDK4*, *CICLINA D1*, *p16*, *p53*, cariotipo de las líneas celulares y la sensibilidad a Palbociclib.

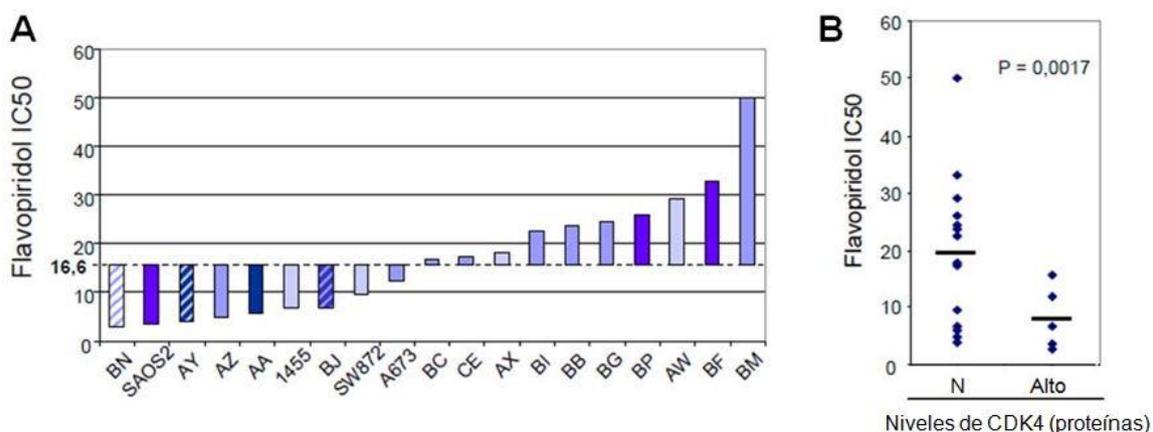


Figura 12. Sensibilidad a Flavopiridol. (A) Representación esquemática de los niveles de IC50 de Flavopiridol en un panel de líneas celulares de sarcomas (B) Correlación entre los niveles de *CDK4* y los niveles de IC50 de las líneas celulares de sarcomas.

19.2.3. Relación funcional entre niveles de *CDK4* y respuesta a Palbociclib.

Para estudiar la relación funcional entre los niveles de *CDK4* y la respuesta a Palbociclib, sobreexpresamos *CDK4 wild type* en 2 líneas celulares diferentes de sarcoma, las líneas AW y AX, y comprobamos la expresión de ARNm de las líneas transfectadas (Figura 13A). Ya que se había descrito que un mutante activo de *CDK4*, el *CDK4 (R24C)*, mutación presente en tumores humanos, posee la habilidad de no ser inhibido por los miembros de la familia de *INK4* (*p16*, *p15*, *p18* y *p19*) [116], decidimos sobreexpresar dicho mutante en las mismas líneas celulares y explorar la respuesta a Palbociclib.

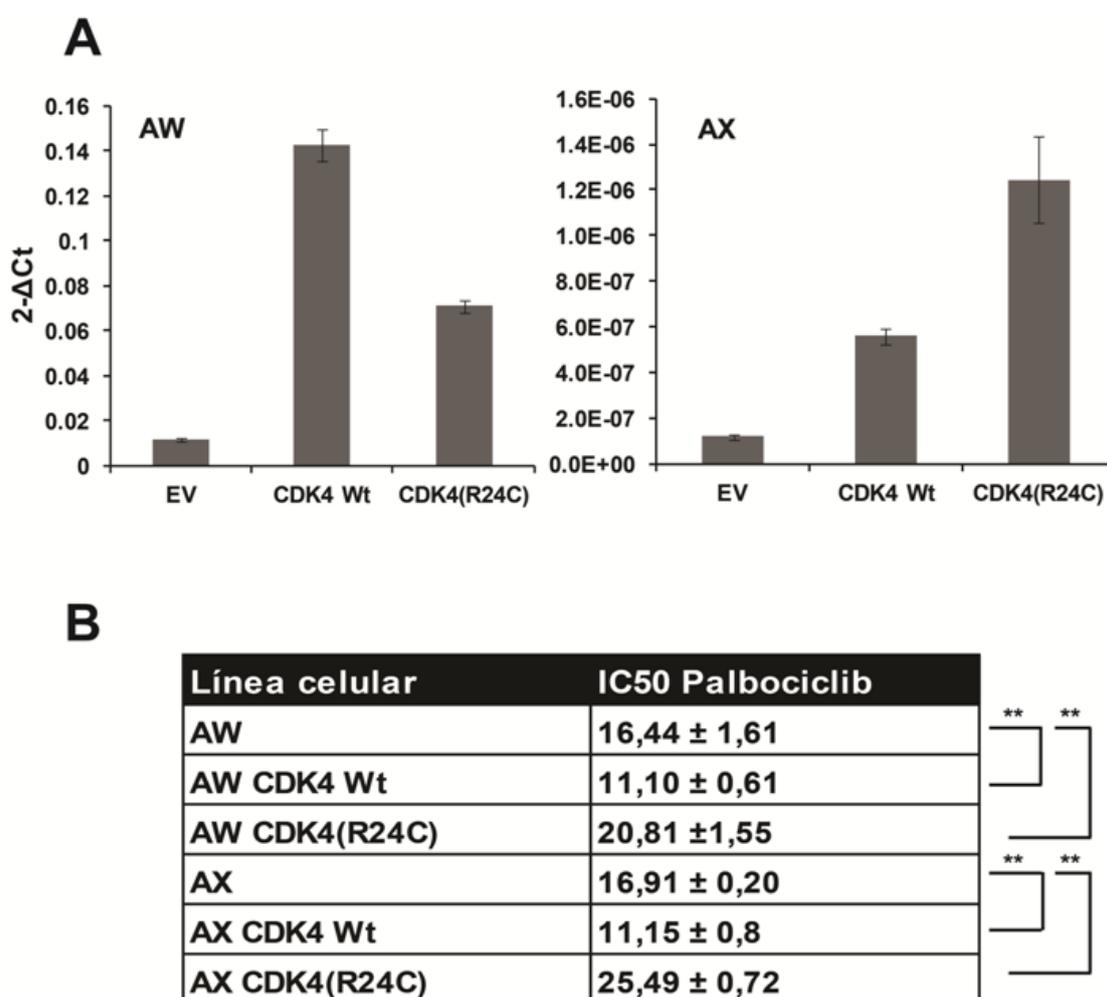


Figura 13. (A) Representación de los niveles de ARNm de *CDK4* en las líneas parentales AW y AX y en las líneas transfectadas. Se transfectaron las líneas AW y AX con el *CDK4 Wt* y con el mutante *CDK4 (R24C)*, después comprobamos la transfección midiendo los niveles de ARNm de *CDK4*, normalizados al control *GADPH*. **(B) Valores de IC50 con Palbociclib.** Se realizaron experimentos de IC50 con las líneas transfectadas y parentales. La tabla indica los valores de IC50 ± la desviación estándar. Las células que sobreexpresaban el *CDK4 Wt* mostraban más sensibilidad al tratamiento que las líneas celulares Wt, mientras las que sobreexpresaban el mutante *CDK4 (R24C)* eran más resistentes, (ANOVA, $P < 0.0001$).

El análisis de los valores de IC50 evidenciaba un aumento de sensibilidad a Palbociclib en las células que sobreexpresaban CDK4 *wild type* frente al control (11.10 μ M frente a 16.44 μ M para la línea AW y 11.15 μ M frente a 16.91 μ M para la línea AX), mientras que la sobreexpresión del mutante CDK4 (R24C) inducía un aumento de la resistencia en ambas líneas celulares (20.81 μ M frente a 16.44 μ M para la línea AW y 25.49 μ M frente a 16.44 μ M para la línea AW) (Figura 13B).

19.3. Palbociclib induce senescencia en las líneas parentales y en las que sobreexpresan CDK4 *wild type*.

A continuación analizamos el efecto de Palbociclib en las líneas con aumento de CDK4. Primero analizamos si el tratamiento con Palbociclib inducía senescencia, comparando la tinción con SA- β Gal y la presencia de Foci de 53BP1 entre las líneas celulares parentales (AW-EV y AX-EV) y las correspondientes líneas celulares transfectadas que sobreexpresaban CDK4 *wild type* (AW-CDK4 y AX-CDK4) y las líneas celulares que sobreexpresaban el mutante (AW-CDK4-R24C y AX-CDK4-R24C). Encontramos que el tratamiento con Palbociclib inducía senescencia en las líneas parentales y en las líneas que sobreexpresaban CDK4 *wild type* (Figura 14B). De hecho, tras el tratamiento con Palbociclib, observamos un aumento de tinción con SA- β Gal de 2.2 y 3.5 veces en las líneas celulares AW EV y AW CDK4 Wt y de 3.5 y 2.2 veces en las líneas celulares AX-EV y AX-CDK4 Wt respectivamente. Por otro lado no se observaba una clara inducción de senescencia en las células que sobreexpresaban el mutante CDK4-R24C (Figura 14A), donde el incremento de tinción con SA- β Gal era moderada.

También constatamos que, tras el tratamiento, la inducción de Foci de 53BP1 era más evidente en las líneas parentales y en las líneas que sobreexpresaban el CDK4 Wt, con un incremento de los Foci de 2 veces para las líneas AW (AW EV y AW CDK4 Wt) y de 2.8 y 3.2 veces para las líneas AX (AX-EV y AX-CDK4 Wt) respectivamente (Figura 14B). También en ese caso observamos que en las líneas celulares que sobreexpresaban el mutante (AW CDK4-R24C y AX CDK4-R24C) no había inducción de Foci tras el tratamiento. Observamos también que los niveles de marcadores de senescencia se correlacionaban positivamente con una reducción de los niveles de pRB (Figura 15). Realizamos además una inmunodetección de células apoptóticas por Anexina V y observamos que las células que sobreexpresaban el mutante de CDK4 mostraban preferentemente apoptosis, aunque también detectábamos, en menor proporción, apoptosis en las células parentales y en las que sobreexpresaban el CDK4 *wild type* (Figura 16).

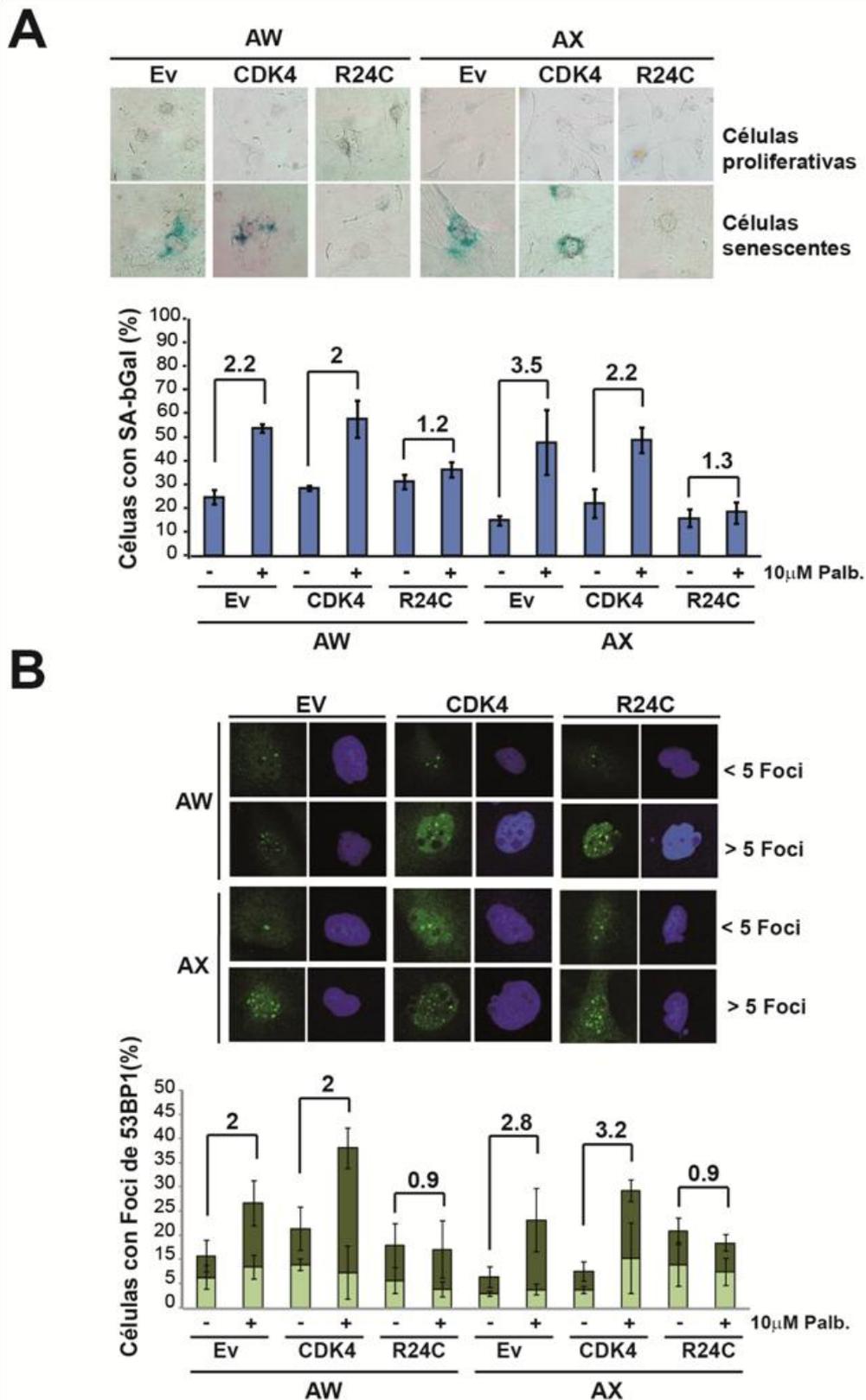


Figura 14. El tratamiento con Palbociclib induce la presencia de Foci de 53BP1, sobre todo en las células *wild type* y en la que sobreexpresan *CDK4 wild type*. (A) Imagen representativa y cuantificación de SA β -Gal en las líneas celulares de sarcomas AW y AX tranfectadas con el vector vacío (Ev), con el plasmido sobreexpresando *CDK4* (CDK4) o con el mutante *CDK4-R24C* (R24C) después del tratamiento con Palbociclib 10µM. (B) Imagen representativa y cuantificación de Foci de 53BP1 en las líneas celulares de sarcomas AW y AX tranfectadas con el vector vacío (Ev), con el plasmido sobreexpresando *CDK4* (CDK4) o con el mutante *CDK4-R24C* (R24C) después del tratamiento con Palbociclib (10Mm).

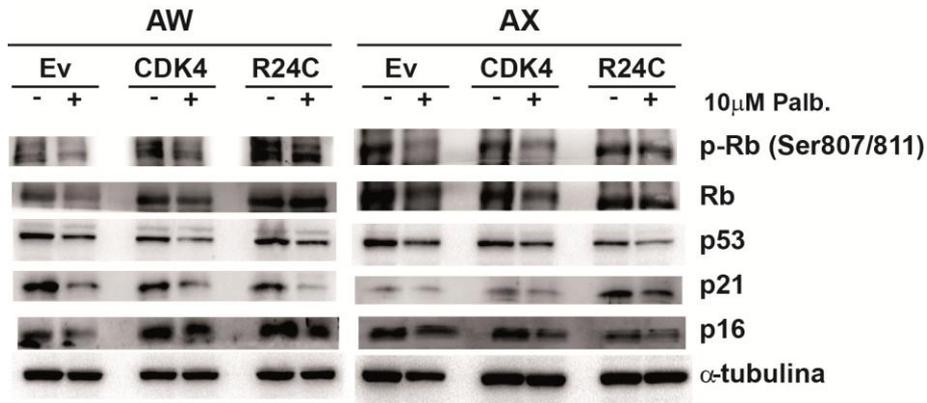


Figura 15. Western Blot de marcadores de senescencia en las líneas celulares de sarcomas AW y AX transfectadas con el vector vacío (Ev), con el plasmido sobrexpresando *CDK4* (CDK4) o con el mutante *CDK4-R24C* (R24C) después del tratamiento con Palbociclib 10 μ M.

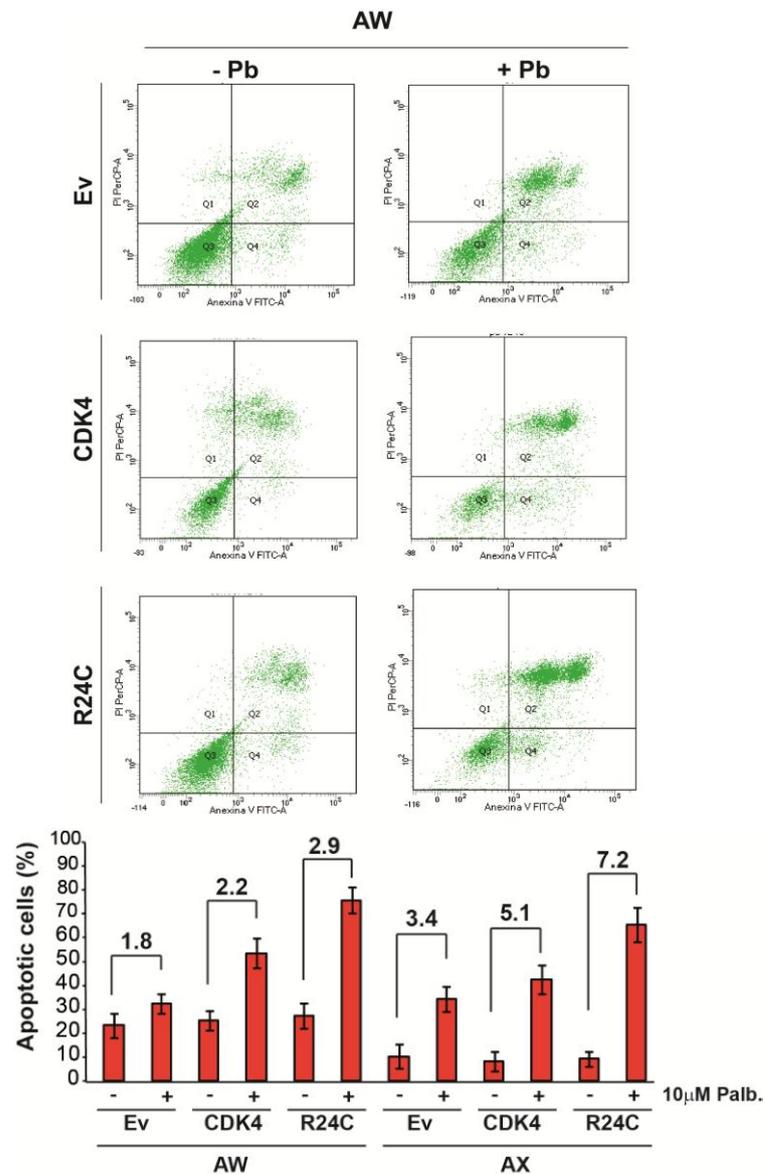


Figura 16. Las células transfectada con el plasmido mutante *CDK4R24C* muestran preferentemente fenómenos apoptóticos tras el tratamiento con Palbociclib. **A)** Inmunodetección de células apoptóticas, por Anexina V, entre las células AW y AX transfectadas con el vector vacío (Ev), con el plasmido sobrexpresando *CDK4* (CDK4) o con el mutante *CDK4-R24C* después del tratamiento con Palbociclib 10 μ M . **B)** Representación esquemática de los resultados.

20. Generación y caracterización de una plataforma de PDX de sarcomas

Con el fin de establecer una plataforma *in vivo* para ensayar nuevos fármacos en sarcomas, implantamos subcutáneamente muestras tumorales procedentes de pacientes directamente en ratones desnudos. Los tumores se implantaron en ratones hembras atímicos (nu/nu) de 4 a 6 semanas de edad (según el protocolo descrito en el apartado de materiales y métodos). Tras la cirugía de implante, los ratones se siguieron diariamente y se sacrificaron cuando los tumores alcanzaron un volumen de 1500 mm³. Las muestras recolectadas se reimplantaron nuevamente siguiendo el mismo protocolo de la muestra primaria. De los 24 tumores implantados, 9 de ellos crecieron suponiendo una eficacia de crecimiento del 37.5% (Tabla 8).

Tabla 8. Lista y diagnóstico histológico de los modelos PDX establecidos.

Modelo PDX	Diagnostico histológico
S11	Mixofibrosarcoma de alto grado
S14	Tumor maligno de vaina nerviosa periférica
S16	Mixofibrosarcoma
S21	Sarcoma sinovial monofásico
S23	Sarcoma pleomorfo indiferenciado
S25	Sarcoma pleomorfo indiferenciado
S27	Recidiva de sarcoma Pleomorfo
S28	Liposarcoma mixoide de células redondas
S29	Leiomiomasarcoma

20.1 Análisis del perfil transcriptómico de los modelos subcutáneos (PDX)

Para estudiar el grado de similitud entre los PDX de sarcomas y los tumores humanos primarios de origen, decidimos comparar el perfil transcriptómico completo de los PDXs y de los correspondientes tumores humanos. La comparación del perfil transcriptómico completo mostraba un nivel de similitud medio del 93% (Figura 17), indicando que los modelos PDX eran muy parecidos a los tumores de origen tanto cualitativa como cuantitativamente en la expresión de ARNm.

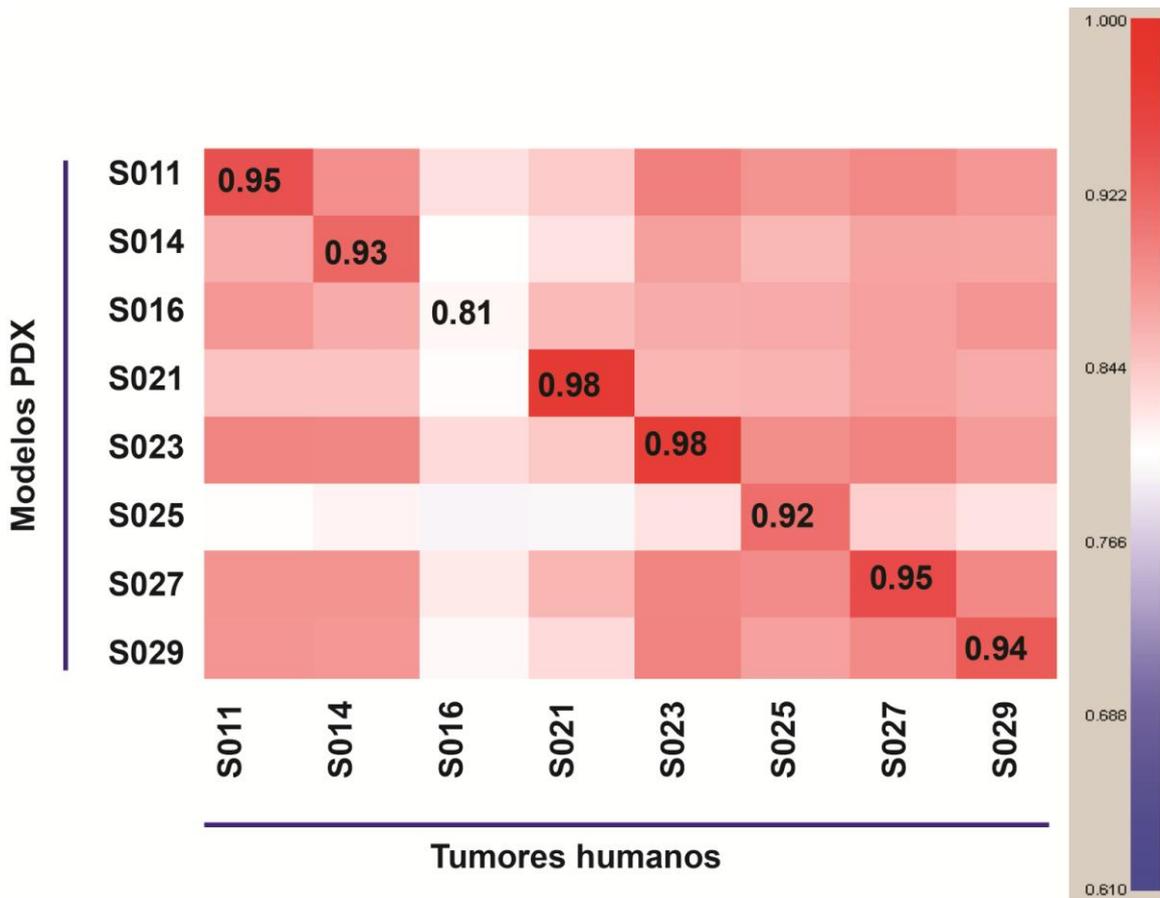


Figura 17. Correlación entre los modelos PDX y los correspondientes tumores humanos. Se muestra correlación de Pearson del perfil transcriptómico de los modelos PDX frente a los tumores humanos de origen ($0.81 < r < 0.95$). Los valores de correlación se han obtenido mediante el Affymetrix console software. Se observa que los modelos PDX tienen perfil transcriptómico muy parecido a los tumores originales.

21. Efecto de la inhibición *in vivo* de CDK4

Ya que habíamos obtenido resultados que nos indicaban que los sarcomas eran sensibles a Palbociclib *in vitro* y que había una correlación entre los niveles de *CDK4* y la sensibilidad al fármaco decidimos trasladar nuestros resultados a un ensayo *in vivo*, usando los PDX de sarcomas generados. El primer paso fue medir los niveles de ARNm de la *CICLINA-D1*, *p16* y *CDK4* con el fin de seleccionar nuestros modelos en función de esos marcadores. Decidimos seleccionar 6 de los 9 modelos generados, 2 con altos niveles de *CDK4* (S11 y S16) que además expresaban altos niveles de *CICLINA-D1*; 2 con altos niveles de *p16* (S23 y S27) y dos con niveles normales de *CDK4* y con bajos niveles de *CICLINA-D1* y que no expresaban *p16* (S14 y S29) (Figura 18).

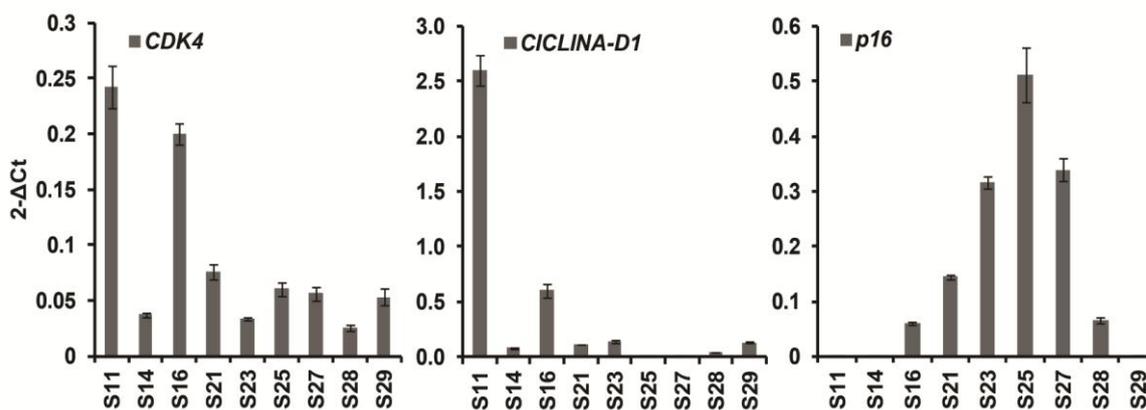


Figura 18. Niveles de expresión de CDK4, CICLINA-D1 y p16. Se muestran los niveles de ARNm de CDK4, CICLINA-D1 y p16 de los modelos PDX normalizados al control GADPH.

Para el ensayo con Palbociclib implantamos subcutáneamente 12 ratones que distribuimos aleatoriamente por cada modelo PDX seleccionado, 6 ratones como controles y 6 ratones para ser tratados. Cuando el tumor alcanzó un tamaño de 50 mm³ de volumen comenzamos el tratamiento con 100 mg/Kg de Palbociclib, o con suero fisiológico en los ratones controles. El tratamiento se suministró por vía oral todos los días durante tres semanas y los ratones se siguieron diariamente hasta que el tumor alcanzó un volumen de 1500 mm³, momento en que se sacrificaron y se estrajeron los tumores.

Para comprobar el efecto del tratamiento sobre la capacidad proliferativa de los tumores, decidimos sacrificar, el último día de tratamiento, dos ratones control y dos tratados de cada tumor implantado y medir los niveles del marcador de proliferación KI67. Encontramos un efecto variable en los diferentes tipos de sarcomas tratados. En los tumores S11, S14 y S23 observamos una clara disminución en la capacidad proliferativa, mientras que en otro tumor como el S29 no observamos ningún efecto en la tinción con KI67 (Figura 19).

También quisimos comprobar si el tratamiento con Palbociclib inducía una disminución en varias proteínas implicadas en el ciclo celular. Por esta razón comparamos los niveles de expresión de dichas proteínas. Pudimos apreciar que Palbociclib inducía una disminución en todas las proteínas analizadas (Figura 20), con un claro efecto sobre la fosforilación de Rb, tanto en los tumores que respondían como en los que no respondían, confirmando así la actividad del fármaco sobre CDK4 en todos los modelos. (Figura 20).

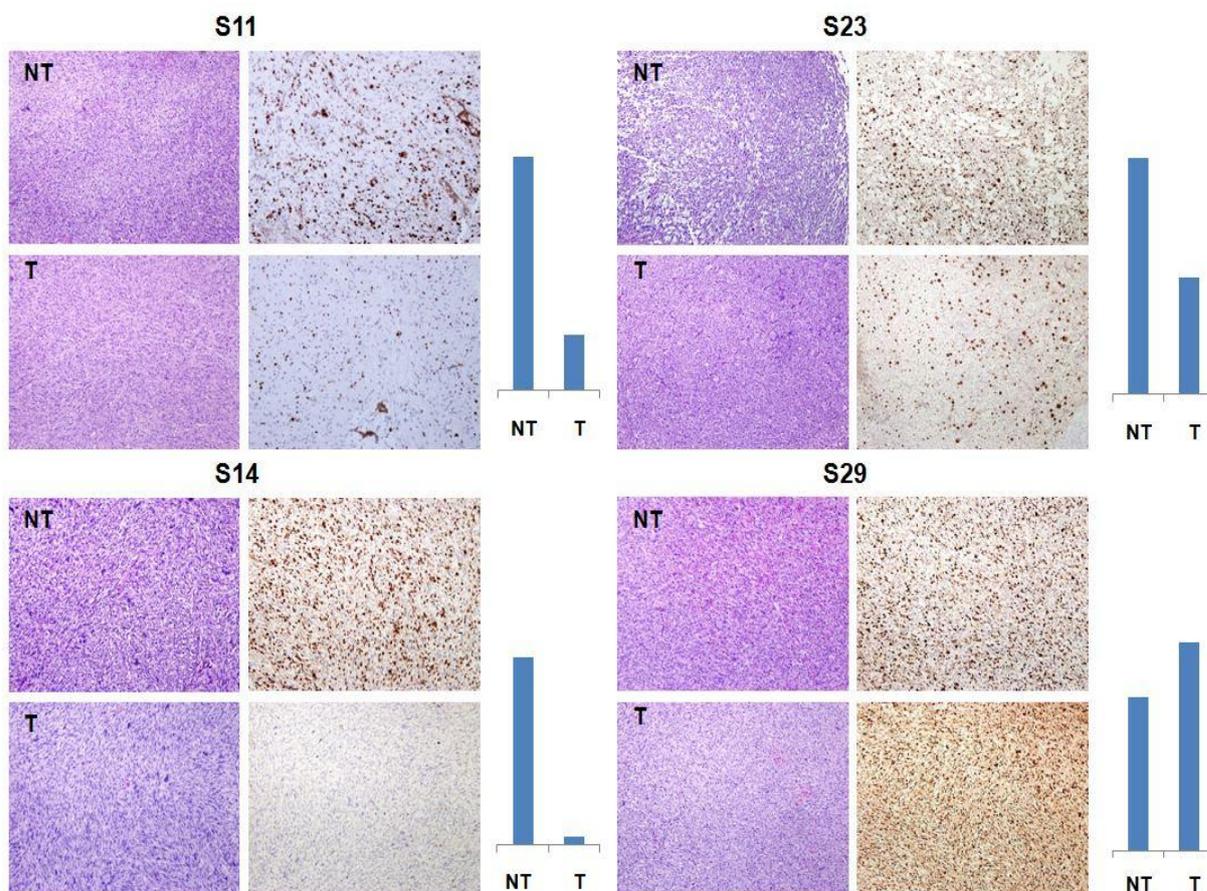


Figura 19. Efecto de Palbociclib en la proliferación *in vivo*. Los sarcomas se implantaron subcutáneamente y se crecieron hasta un volumen de 50 mm³, en ese momento empezaba el tratamiento con Palbociclib 2mg/dosis durante 3 semanas (7 días por semana) por vía oral. El día después de la última dosis de tratamiento, se sacrificaba un ratón no tratado y uno tratado de cada modelo PDX. En la imagen se muestra una tinción con Hematoxilina-Eosina (izquierda) y de Ki67 (derecha) de los tumores resecados. NT= no tratados T= tratados.

Al mismo tiempo observamos diferentes comportamientos en respuesta a la inhibición de CDK4. Aunque todos los tumores mostraban inicialmente una inhibición en el crecimiento del tumor durante el tratamiento (Figura 21), vimos que los diferentes sarcomas tratados tenían un comportamiento muy diferente entre ellos. Los tumores que expresaban altos niveles de *CDK4*, como el S11 y el S16, ambos mixofibrosarcomas, respondían bien al tratamiento. Observamos en el tumor S16 una reducción del tamaño tumoral y en algunos casos la remisión total de la enfermedad, mientras en el tumor S11 el tratamiento con el inhibidor de CDK4 retrasaba notablemente el crecimiento tumoral y como resultado los ratones tratados sobrevivían el doble de tiempo que los ratones controles (Figura 21).

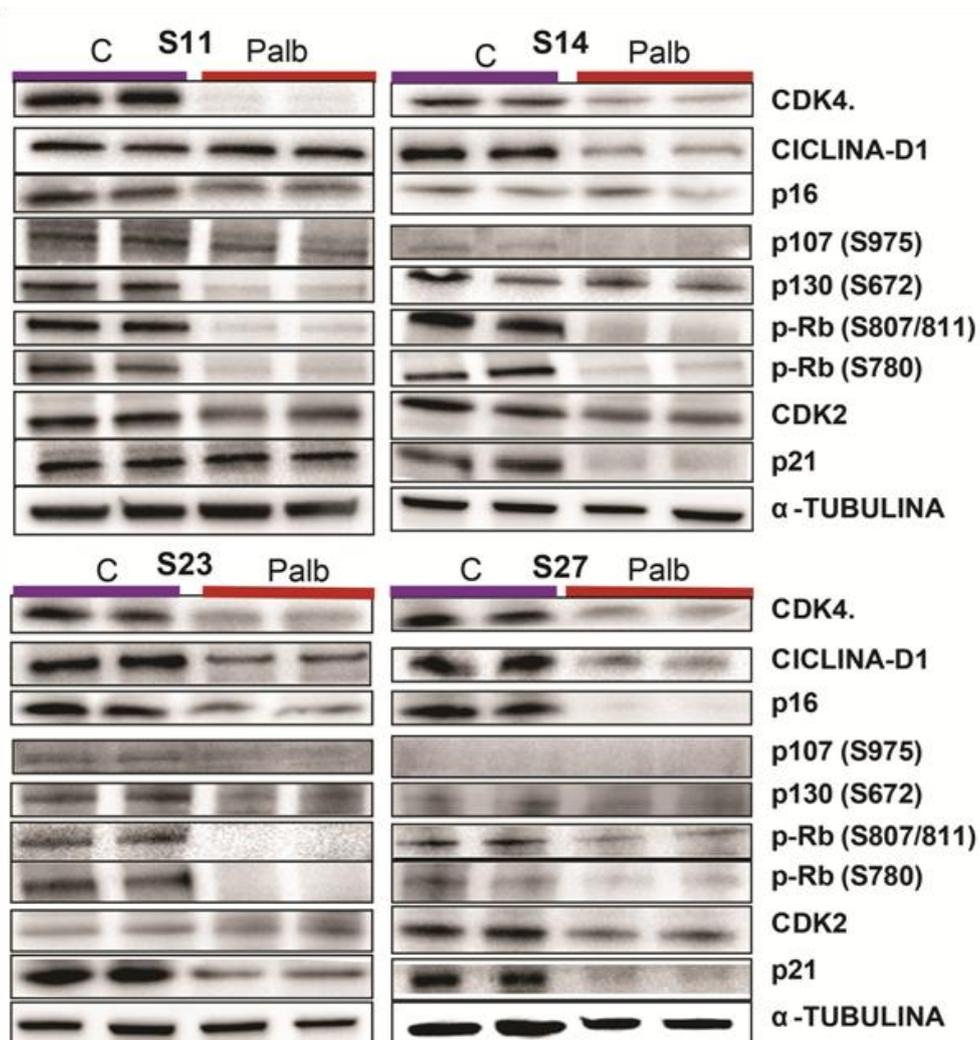
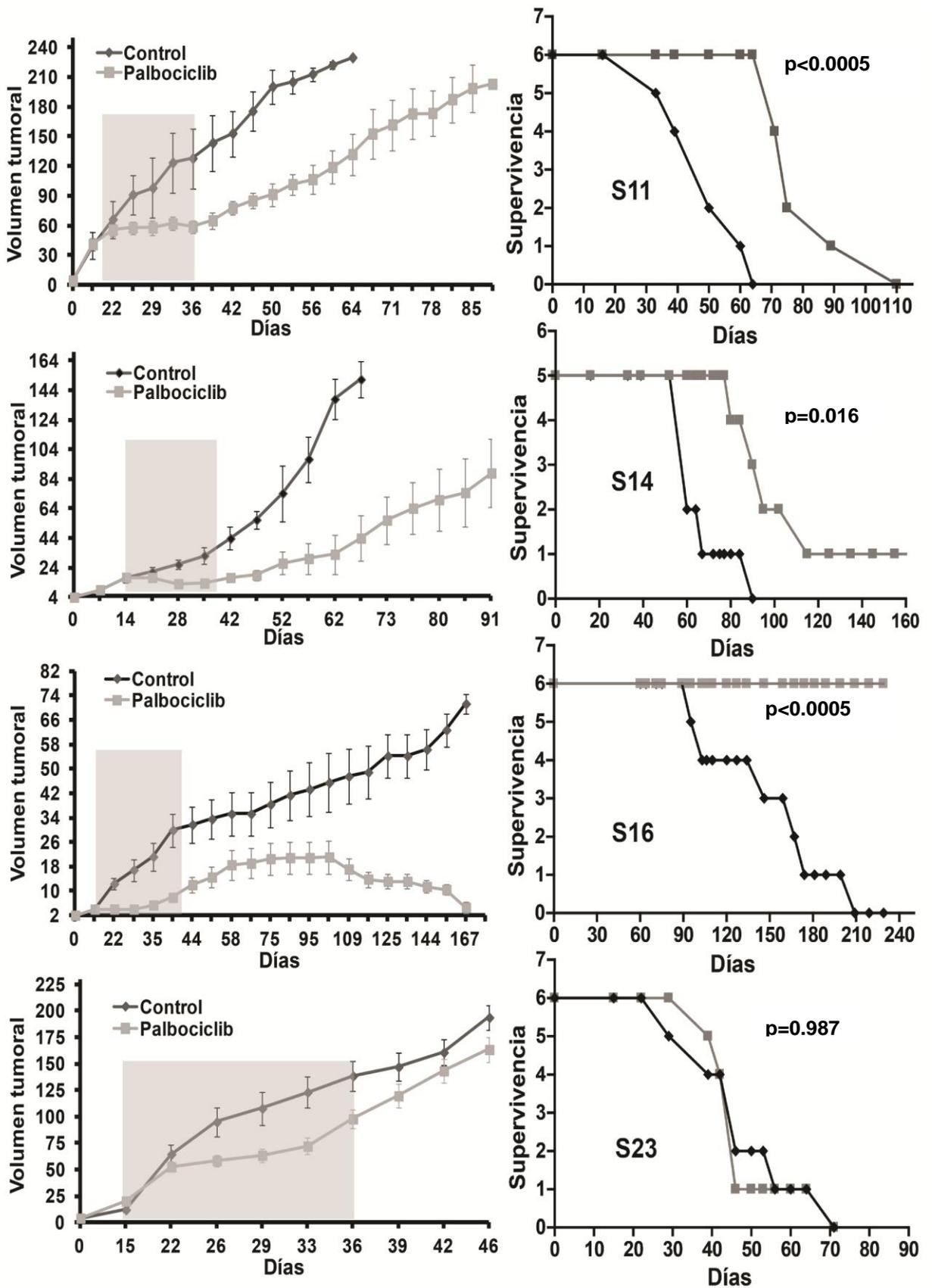


Figura 20. Valoración *in vivo* de los niveles de varias proteínas tras el tratamiento con Palbociclib. Se muestran los niveles proteicos por western blot de diferentes proteínas implicadas en el ciclo celular. Se procesaron los tumores controles y tratados de cada engraft el último día de tratamiento y se midieron por western blot los niveles de proteínas de CDK4, CICLINA-D1, p16, p107 (S975), p130 (S672), pRb (S807/811), pRb (S780), CDK2, p21, y α -TUBULINA (control). La figura muestra 2 tumores controles y 2 tratados de cada engraft. C= control Palb= Palbociclib.

Por otro lado los dos tumores con altos niveles de *p16* y con niveles normales de *CDK4*, como el S23 y el S27, dos sarcomas pleomorficos, mostraban una respuesta inicial al tratamiento, pero al final del tratamiento recuperaban el crecimiento más rápidamente que los controles y no se observaba diferencia de supervivencia entre los dos grupos (Figura 21).

Por último, los dos tumores con niveles normales de *CDK4* y bajos niveles de *p16* mostraban una respuesta muy heterogénea. El MPNST S14 respondía a la inhibición de *CDK4* con una clara reducción del crecimiento tumoral, además en uno de los casos se observaba la remisión total de la enfermedad y como consecuencia el ratón sobrevivía.



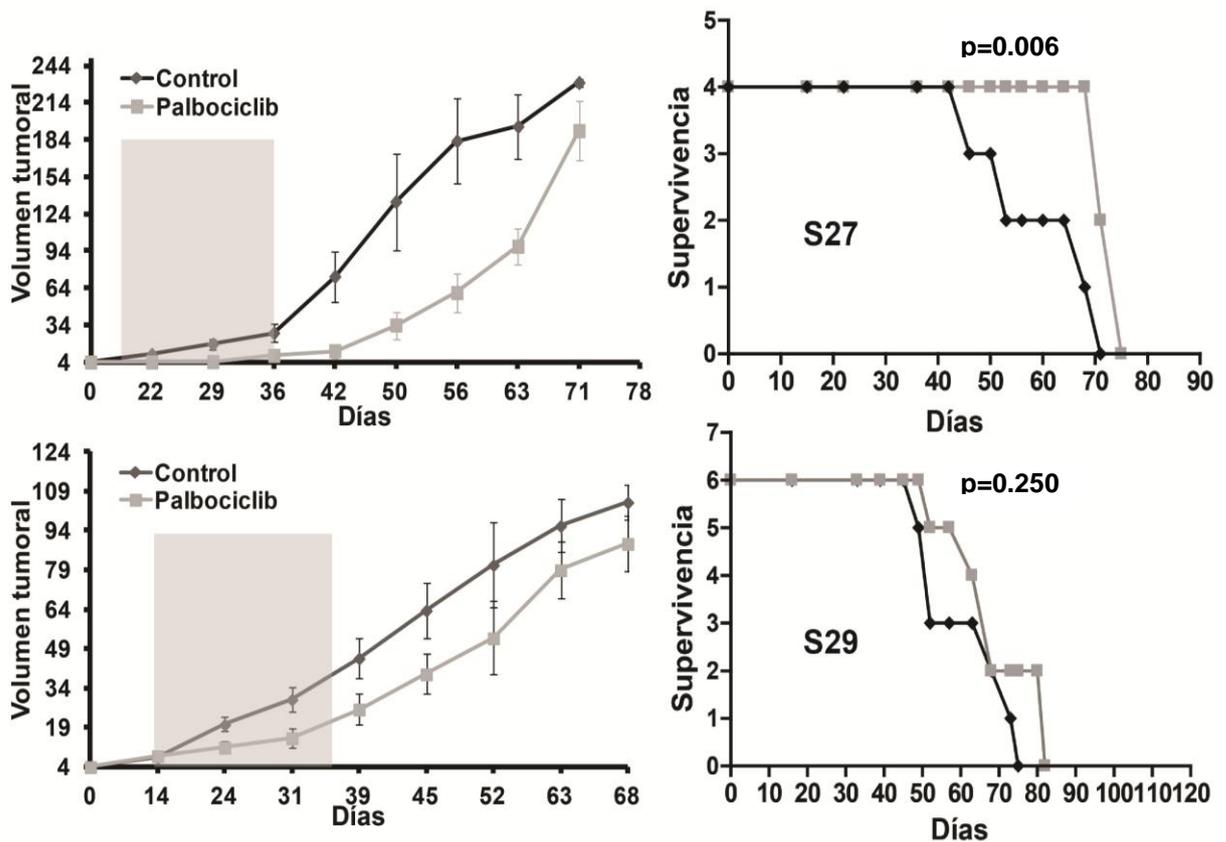


Figura 21. Efecto de Palbociclib en los modelos PDX de sarcomas. Los sarcomas se implantaron subcutáneamente y se crecieron hasta un volumen de 50 mm³, en ese momento empezamos el tratamiento con Palbociclib 2mg/dosis durante 3 semanas (7 días por semana) por vía oral. Los tumores se midieron 2 veces por semana y se sacrificaron cuando el tumor alcanzó un volumen de 1500 mm³ El gráfico muestra el tamaño de todos los tumores (izquierda) ± la desviación estándar (DS/√n) y la curva de supervivencia de todos los ratones (derecha).

Por otro lado el leiomioma S29 respondía inicialmente al tratamiento, pero la recuperación del crecimiento tras el tratamiento se reflejaba solo en una ligera mejoría en supervivencia frente a los controles no tratados (Figura 21).

No sabemos si un segundo ciclo de tratamiento con el inhibidor podría haber sido eficaz en los sarcomas que no habían respondido al tratamiento ya que todos parecían responder a la primera dosis. Los datos se correlacionaban con los resultados que habíamos obtenido previamente *in vitro*, y nos indicaban que los tumores que presentaban altos niveles de *CDK4* respondían mejor al tratamiento con Palbociclib.

Al final del experimento extrajimos todos los tumores que habían crecido y analizamos los niveles de diferentes proteínas que podían estar involucradas en la respuesta al fármaco o en el re-crecimiento de los tumores. Esto nos servía para estudiar la evolución tumoral durante el tratamiento e identificar algún determinante

molecular que podría haber sido inducido por el tratamiento y que podría estar implicado en mecanismos de resistencia. Con ese fin analizamos los niveles proteicos de algunas proteínas implicadas en el ciclo celular en los tumores tratados y no tratados en 5 de los 6 modelos de PDX (Figura 22). En uno de los modelos PDX (S16), obtuvimos una total remisión de la enfermedad tumoral y no pudimos recolectar muestra de los tumores implantados en la cohorte de ratones tratados. Pudimos observar, en general, que los tumores no tratados mantenían altos los niveles de CDK4, mientras que la contraparte tratada mostraba una neta reducción de los niveles de dicha proteína (Figura 22).

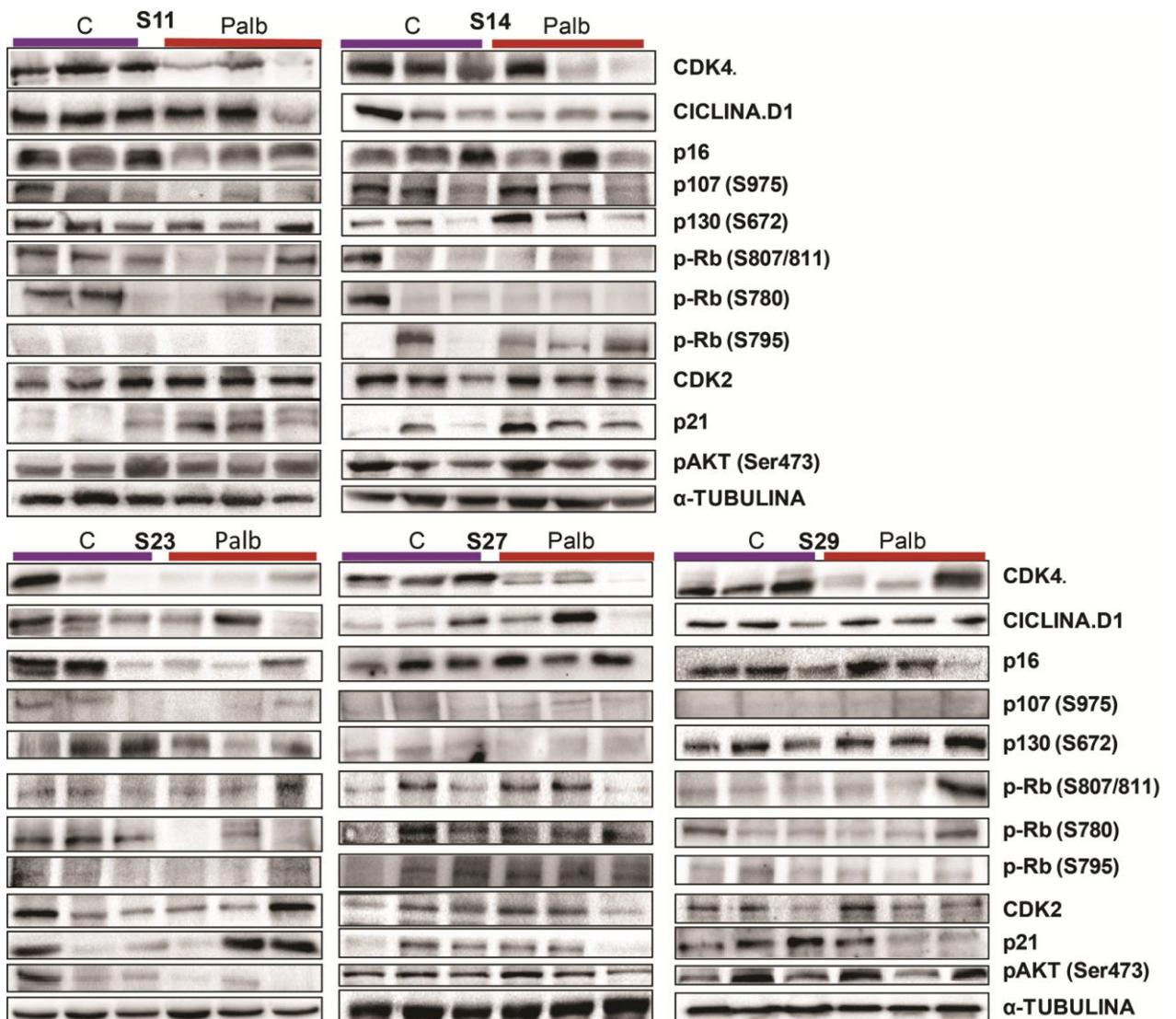


Figura 22. Valoración de los niveles de varias proteínas en los tumores tratados y no tratados. Se recogieron los tumores de 3 ratones control y de 3 ratones tratados por cada engraft cuando el tumor alcanzó un volumen de 1500 mm³. Se midieron por western blot los niveles de las proteínas CDK4, CICLINA-D1, p16, p107 (S975), p130 (S672), pRb (S807/811), pRb (S780), CDK2, p21, y se normalizaron con los niveles de alpha-TUBULINA.

Observamos también una cierta heterogeneidad entre los tumores tratados. Algunos de ellos mantenían altos niveles de CDK4 tras el tratamiento, lo que señalaba una evolución independiente de los distintos tumores. En cuanto al estado de fosforilación de Rb, también observamos un comportamiento muy heterogéneo entre los clones. En nuestro análisis el aumento de fosforilación de pRb no parecía ser un determinante de re-crecimiento tras el tratamiento. Al mismo tiempo no encontramos ninguna asociación entre los niveles de CICLINA D1, de p16, de AKT fosforilado ni de CDK2 y el re-crecimiento de los tumores tratados (Figura 22). Sorprendentemente pudimos observar un incremento de p21 en los ratones tratados, incluso entre los que mostraban una respuesta al fármaco (S16 y S11).

22. Expresión de MAP17 en sarcoma como factor pronóstico de supervivencia

22.1. Descripción de las cohortes de pacientes y expresión de MAP17

Ya que en trabajos previos del laboratorio habíamos observado que MAP17 era un factor pronóstico de agresividad tumoral en varios tipos de cánceres [85, 87, 88], decidimos explorar su relevancia en sarcomas. En primer lugar analizamos la expresión de MAP17 en una cohorte de pacientes que había tenido un seguimiento clínico durante toda la progresión de la enfermedad. La cohorte de pacientes analizada estaba distribuida equitativamente entre hombres (53%), y mujeres (47%) y presentaba una edad media de 51 años al diagnóstico de la enfermedad, con una distribución entre 20 y 72 años (Tabla 9). La histología era muy variable e incluía principalmente, liposarcomas (18.8%, n=13), sarcomas pleomorficos indiferenciados (17.4%, n= 12) y leiomiomas (31.9%, n=22). Otros tipos histológicos menos representados en la cohorte incluían los hemangiopericitomas (4.3%, n=3), sarcomas sinoviales (4.3%, n=3), sarcomas neurogenicos (4.3%, n=3), fibrosarcomas (7.2 %, n= 5), fibrosarcoma mixoide (1.5%, n=1), angiosarcoma (1.5%, n=1), y sarcoma mesenquimal (1.5%, n=1). La mayoría de esos tumores eran metastásicos al día del diagnóstico (76%) y los restantes eran tumores localmente avanzados. El tratamiento recibido fue Doxorubicina 75 mg/m², administrado intravenoso un día cada 3 semanas por 6 ciclos en la mitad de los casos, mientras que la otra mitad recibía Doxorubicina 60 mg/m² y Trabectedina 1.1 mg/m², ambos administrados intravenoso un día cada 3 semanas por 6 ciclos (Tabla 9). Esta cohorte ha sido reportada en Javier Martin Broto et al [117]. Para la valoración de la expresión de MAP17 se amplió esa serie con varias muestras (de las cuales no disponíamos de información clínica) con el fin de evaluar las expresión de MAP17 en diferentes subtipos histológicos de sarcomas.

Tabla 9. Características de la cohorte de pacientes y tratamiento recibido

Pacientes (N=69)	
Genero	
Hombres	53.6% (37)
Mujeres	46.4% (32)
Edad	
	51 [20-72]
Histología	
Liposarcoma	18.8% (13)
Sarcoma pleomorfo indiferenciado	17.4%(12)
Hemangiopericitoma	4.3% (3)
Leiomioma	31.9% (22)
Sarcoma sinovial	4.3% (3)
Sarcoma neurogénico	4.3% (3)
Fibrosarcomas	7.2% (5)
No clasificados	5.8% (4)
Sarcomas fibromixoides	1.5% (1)
Angiosarcomas	1.5% (1)
Sarcoma mesenquimal	1.5% (1)
Otros	1.5% (1)
Estadio	
Localmente avanzado	23.2% (16)
Metastásico	76.8% (53)
Tratamiento	
Doxorubicina 75mg/ m ² 1 día cada 3 semanas x 6 ciclos	50.7% (35)
Trabectedina 1.1mg/m ² + Doxorubicina 60mg/ m ² 1 día cada 3 semanas x 6 ciclos	49.3% (34)

22.2 Expresión de MAP17 en sarcomas humanos

Analizamos la expresión por inmunohistoquímica de MAP17 (Figura 23) en la cohorte de pacientes y en las muestras complementarias. La expresión de cada tumor fue analizada en duplicado y se asignó un valor de 0, 1+, 2+ o 3+ dependiendo de la intensidad y del porcentaje de la tinción. Finalmente se calculó un valor medio de expresión de cada tumor y pasamos a calcular la curva ROC para establecer un punto de corte entre baja y alta expresión de MAP17 (Figura 24).

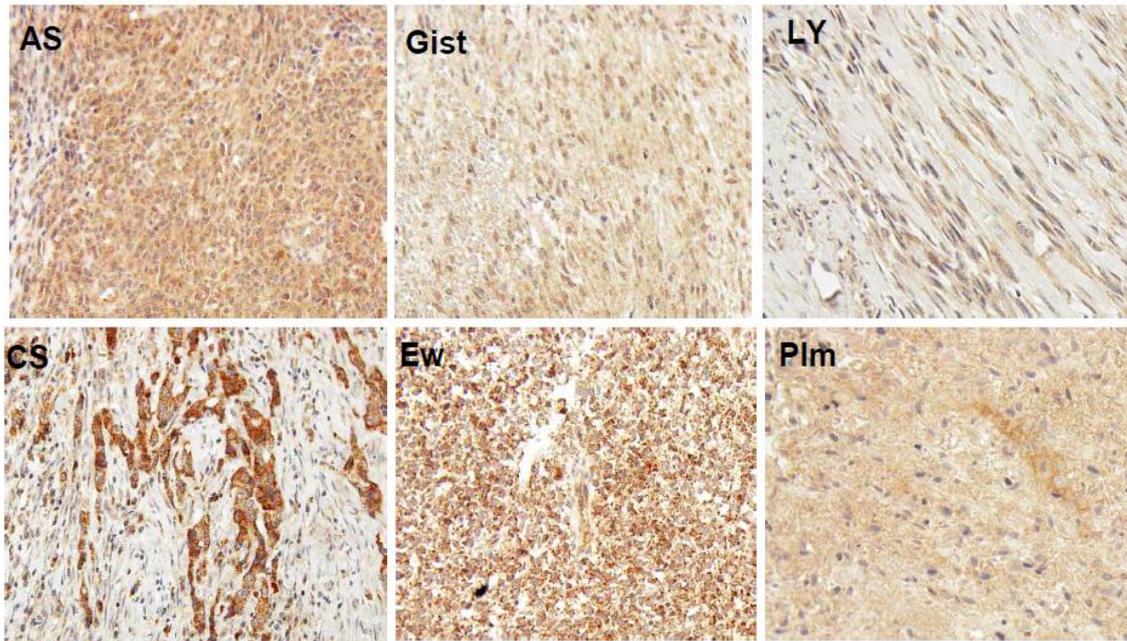


Figura 23. Imagen representativa de la tinción de MAP17 en muestras humanas de sarcomas. Angiosarcoma (AS), GIST (Gist), Condrosarcoma (CS), Leiomyosarcoma (LY), Sarcoma de Ewing (Ew), sarcoma pleomorfo (Plm).

Usando el punto de corte de 0.75 (sensibilidad=0.76 y especificidad=0.54) pasamos a analizar las correlaciones entre la expresión de MAP17 y los datos de supervivencia global (SG), de la supervivencia libre de progresión (SLP) y de la supervivencia libre de enfermedad (SLE). El análisis de las curvas Kaplan-Meier nos indicaba que los niveles de MAP17 eran predictivos de peor supervivencia libre de enfermedad ($p=0.03$) y libre de progresión ($p=0.033$), mientras que no observábamos correlación significativa entre los niveles de MAP17 y la supervivencia global (Figura 24). Esos pacientes habían sido tratados con Doxorubicina en monoterapia o en combinación con Trabectedina, por lo que pasamos a analizar la SLE, la SLP y la SG en función del tratamiento. Observamos que los datos de supervivencia mostraban la misma tendencia en los pacientes tratados solo con Doxorubicina (Figura 25A), salvo en los datos de supervivencia global donde existía una fuerte tendencia a una mayor supervivencia para los pacientes con baja expresión de MAP17. Observamos también que en los pacientes tratados con Doxorubicina más Trabectedina, MAP17 no tenía ninguna relevancia pronóstica (Figura 25B). Realizamos además un análisis multivariante con varios factores pronósticos para determinar el potencial impacto de la expresión de MAP17 en el pronóstico de los pacientes con sarcomas y encontramos que la presencia de altos niveles de MAP17 es un predictor independiente de las otras variables clínicas (Tabla 11).

Se analizaron 101 muestras para la expresión de MAP17 por inmunohistoquímica. El 39% de ellas presentaba altos niveles de expresión y fue considerado positivo para la expresión de MAP17 teniendo en consideración la curva ROC (Figura 26A). Constatamos además que la distribución de los tumores no estaba asociado a ningún subtipo histológico (Figura 26B) y además había una correlación directa y estadísticamente significativa entre expresión de MAP17 y el grado tumoral (Anova, $p < 0.05$) (Figura 26C).

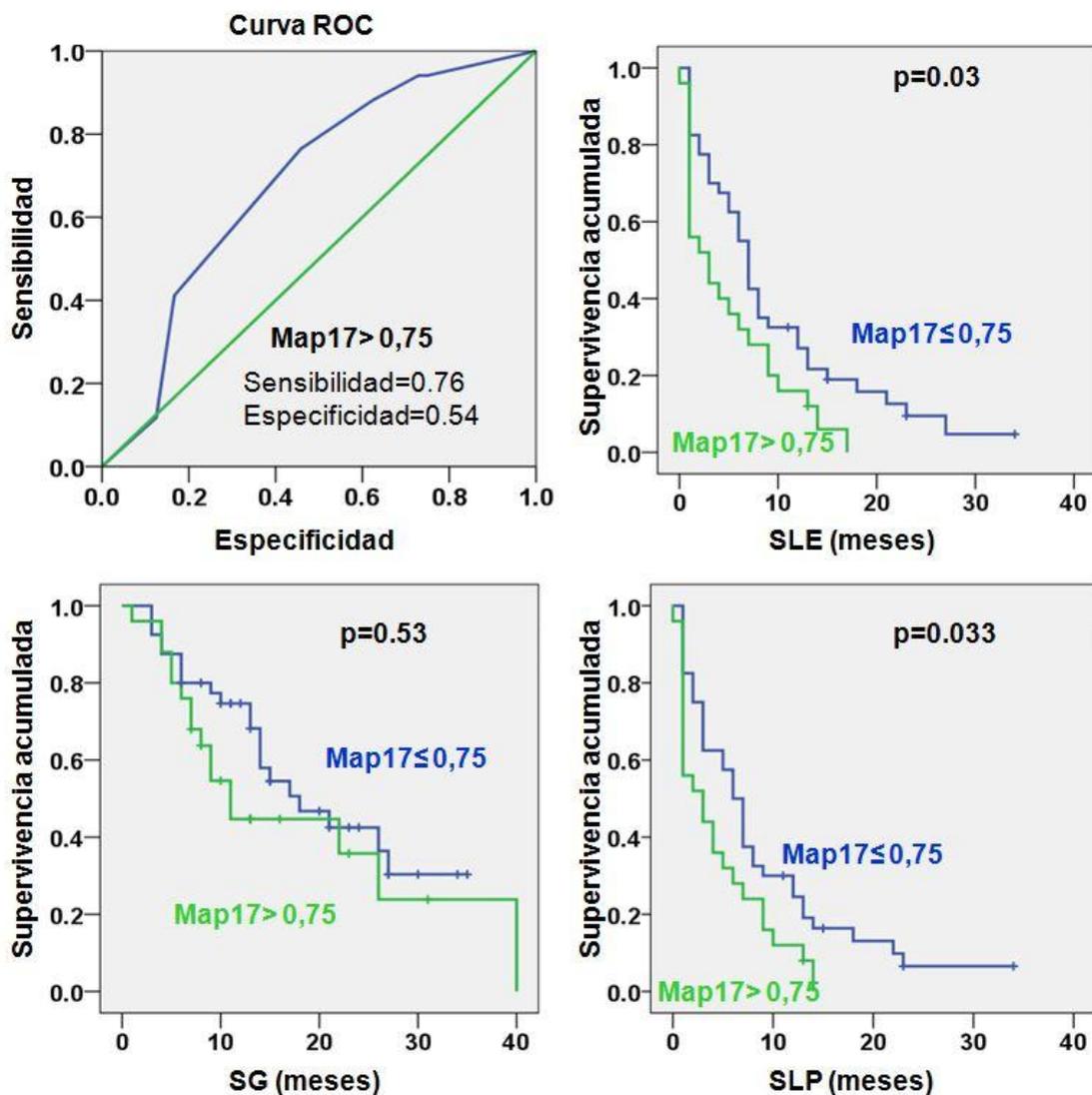


Figura 24. Correlación entre niveles de MAP17 y supervivencia en sarcomas. La curva ROC para MAP17 muestra un punto de corte de $MAP17 = 0,75$, con una sensibilidad=0,76 y una especificidad de=0,54. Se muestra la correlación entre la expresión de MAP17 y los datos de supervivencia global (SG), supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia libre de enfermedad (SLE).

En definitiva, nuestros datos mostraban que un 40% de los sarcomas presentaban altos niveles de MAP17 al diagnóstico, independientemente del subtipo histológico del tumor. Además los altos niveles de MAP17 estaban relacionados con

un alto grado tumoral y eran predictivos de mal pronóstico en los pacientes tratados en monoterapia con Doxorubicina o tratados con Doxorubicina y Trabectedina.

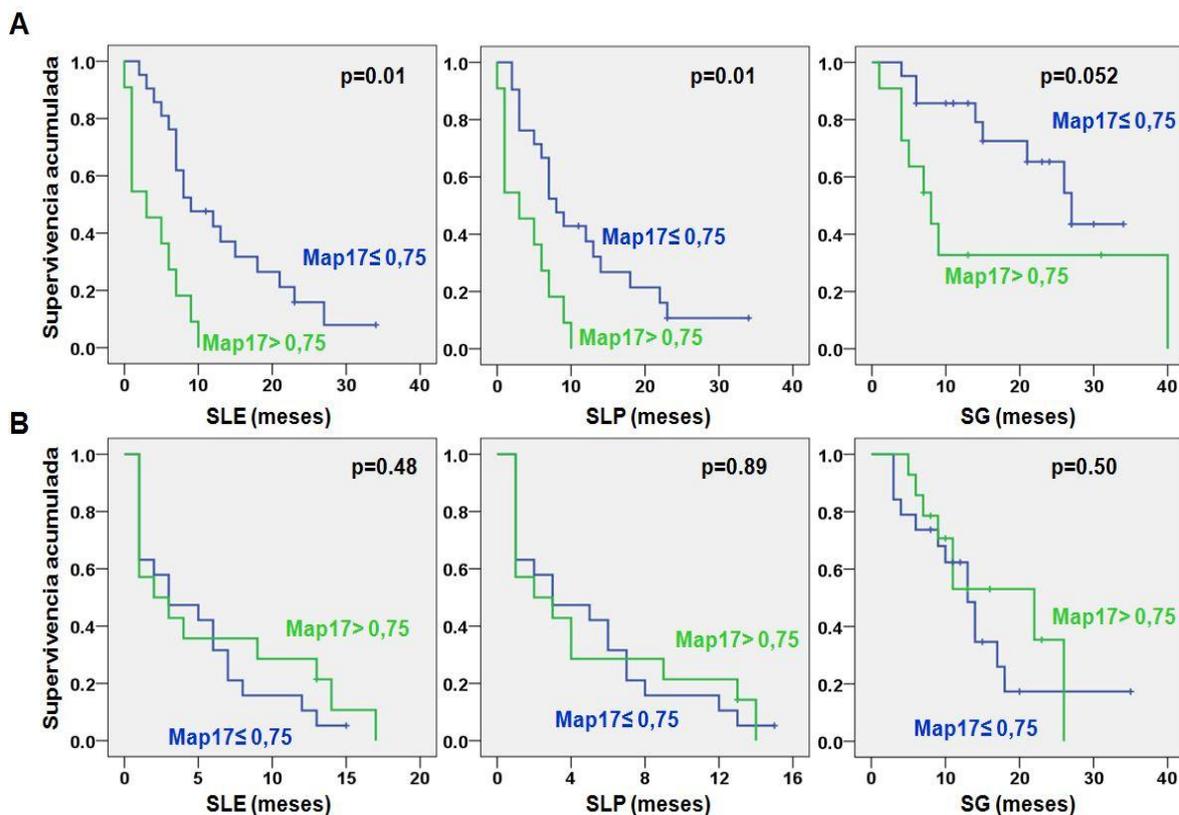


Figura 25. Correlación entre los niveles de MAP17 y la respuesta clínica en función del tratamiento. A) Correlación de la expresión de MAP17 y la supervivencia global (SG), la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en pacientes tratados con Doxorubicina N=35 **B)** Correlación de la expresión de MAP17 y la supervivencia global (SG), la supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en pacientes tratados con Doxorubicina más Trabectedina N= 34.

	SLE		SLP		SG	
	Correlación de Pearson	p-valor	Correlación de Pearson	p-valor	Correlación de Pearson	p-valor
MAP17	-0.268	0.015	-0.268	0.016	-0.142	0.129
Radioterapia	-0.155	0.134	-0.143	0.154	0.162	0.123
Diferenciación	-0.216	0.06	-0.167	0.116	-0.245	0.038
Enfermedad metastásica	-0.191	0.085	-0.125	0.187	-0.207	0.069
Extensión T4	-0.114	0.208	-0.157	0.130	-0.207	0.069

Tabla 11: Análisis multivariante. Se muestra MAP17 es un predictor independiente de las otras variables clínicas.

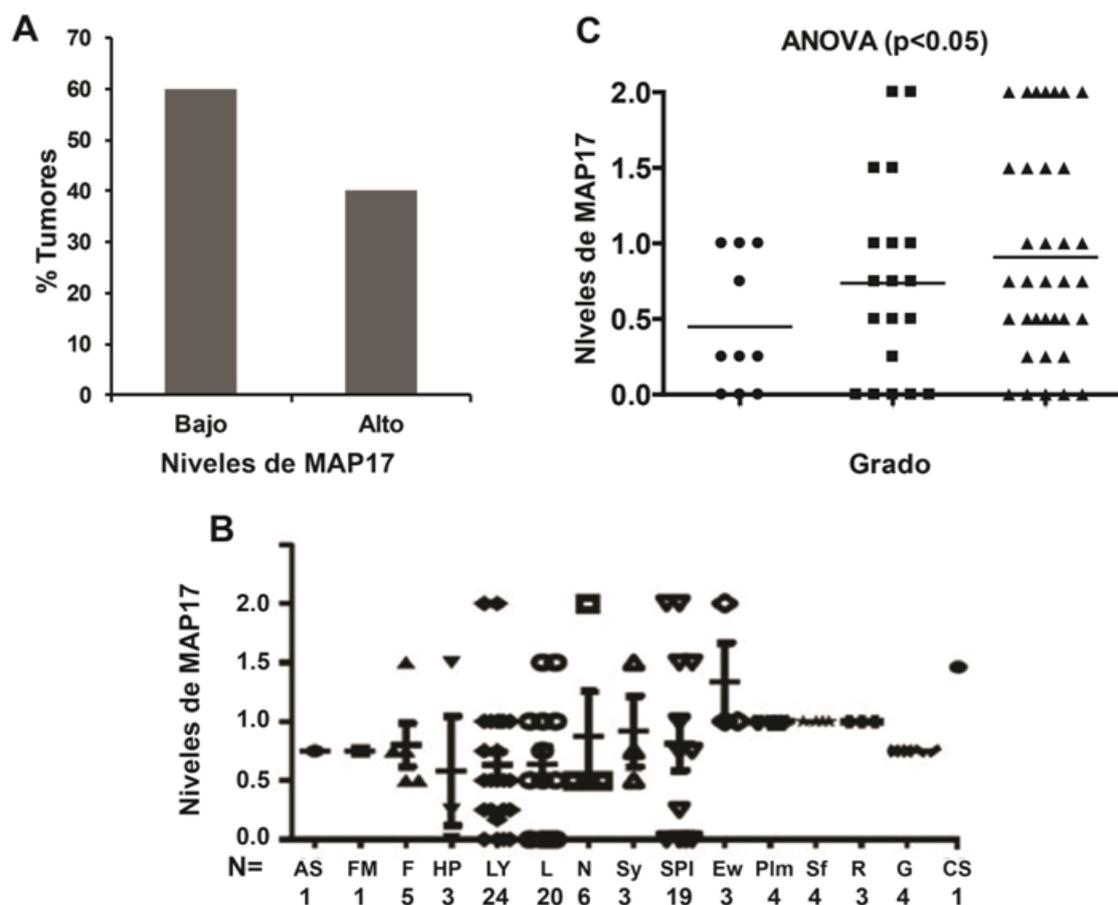


Figura 26. Expresión de MAP17 en sarcomas. **A)** Distribución en % de las muestras en función de los niveles de expresión de MAP17 **B)** Correlación entre los niveles de MAP17 y el grado tumoral. Los valores representados son, para el grado 1=0,45, para el grado 2=0,66 y para el grado 3=0,90. Para establecer la correlación entre los niveles proteicos de MAP17 y el grado tumoral realizamos un test de Anova (p<0.05). **C)** Distribución de la expresión de MAP17 entre los diferentes subtipos histológicos de sarcomas. Angiosarcomas (AS), fibromixosarcoma mixoide (FM), fibrosarcoma (F), hemangioperitoma (HP) leyomiosarcoma (Ly), liposarcomas (L), sarcoma sinovial (Sy) sarcoma pleomorfo indiferenciado (SPI), sarcoma de Ewing (Ew), rdbomiosarcoma (R), sarcoma fusocelular (Fs) GIST (G), sarcoma pleomorfo (Plm), condrosarcoma (CS).

23. Eficacia del tratamiento con Bortezomib en sarcomas y su dependencia de MAP17

23.1. La respuesta a Bortezomib en líneas celulares de sarcomas depende de los niveles de MAP17

Ya que los pacientes con altos niveles de MAP17 mostraban un peor pronóstico de la enfermedad, nos preguntamos si podíamos encontrar una alternativa terapéutica para esos pacientes. Decidimos entonces testar el Bortezomib, que habíamos observado que tenía eficacia en células tumorales de cáncer de mama que sobreexpresaban MAP17 [92]. Para ese fin, primero decidimos analizar el nivel de

ARNm de MAP17 en un panel de líneas celulares de sarcomas y correlacionarlo con la respuesta a Bortezomib. Utilizamos 16 líneas celulares de sarcomas de origen heterogéneo [10, 11] y las tratamos con diferentes concentraciones de Bortezomib. Obtuvimos valores de IC50 en el orden de nM (Tabla 12), con valores distribuidos entre 10 y 500 nM. Al mismo tiempo, para averiguar si existía una correlación entre respuesta y niveles de MAP17, medimos en todas las líneas los niveles basales de ARNm. Encontramos una expresión de ARNm de MAP17 distinta entre las líneas celulares. Distribuimos las líneas celulares en función de los niveles de ARNm de MAP17 en tres grupos, aquellas con niveles de MAP17 no detectables (BP, CE, SAOS2, CP0024 SKUT-1, HT-1080 y CP0038), aquellas con valores bajos de MAP17 (AA, AW, BG and BD) y aquellas con niveles altos de MAP17 (BC, AZ, AX, SW872 and 93T449) (Tabla 12).

Tabla 12. Valores de IC50 a Bortezomib y niveles de ARNm de MAP17 de las líneas celulares de sarcomas. Los valores de IC50 y los niveles de ARNm de MAP17 se han calculado como media de tres experimentos independientes por triplicado, los valores se muestran como $2^{-\Delta CT}$. Se muestran en verde las líneas celulares que expresan altos niveles de MAP17, en naranja las que expresan bajos niveles y en rojo aquella en que no había niveles detectables.

Línea celular	Tumor de origen	IC50 Bortezomib	MAP17($2^{-\Delta CT}$)
93T449	Liposarcoma	35.9 ± 3.75	0.000132199
AA	Leiomiomasarcoma	20.65 ± 0.75	6.21882E-05
AW	Liposarcoma	30.95 ± 8.5	0.00011437
AX	Liposarcoma	19.3 ± 5.2	0.000534323
AZ	Fibrosarcoma	92.89 ± 0.92	0.001050201
BC	MPNST	32.5 ± 9.8	0.00025699
BD	Sarcoma de Ewing	149.7 ± 17.42	0.000111012
BG	Fibrosarcoma mixoide	28.99 ± 5.8	7.64036E-05
BP	Osteosarcoma	502 ± 56.6	2.32244E-05
CE	Rabdomiosarcoma	15.53 ± 2.9	4.55244E-05
CP0024	Leiomiomasarcoma	30.75 ± 5.46	2.84148E-05
CP0038	Leiomiomasarcoma	43.65 ± 9.78	2.52213E-05
HT1080	Fibrosarcoma	15.88 ± 2.37	1.68955E-05
SAOS-2	Osteosarcoma	52.78 ± 9.5	1.30192E-05
SKUT1	Leiomiomasarcoma	10.95 ± 2.46	5.58532E-05
SW872	Liposarcoma	1.13 ± 2.36	0.000262208

El análisis de la correlación entre los niveles de MAP17 y la respuesta a Bortezomib mostraba una tendencia (Anova, $p=0.1$) y nos indicaba que las células con altos niveles de MAP17 eran más sensibles al Bortezomib que aquellas con bajos niveles de MAP17 (Figura 27A). Para confirmar los datos obtenidos decidimos

sobreexpresar un vector con ADNc de MAP17 en dos de las líneas celulares con bajos niveles de expresión, las AA y AW (Figura 27B) y calculamos los valores de IC50 a Bortezomib de esas líneas en comparación con las líneas celulares que expresaban solo el vector vacío. Encontramos que al aumentar la expresión de MAP17 incrementaba 2-3 veces la sensibilidad a Bortezomib (Figura 27C).

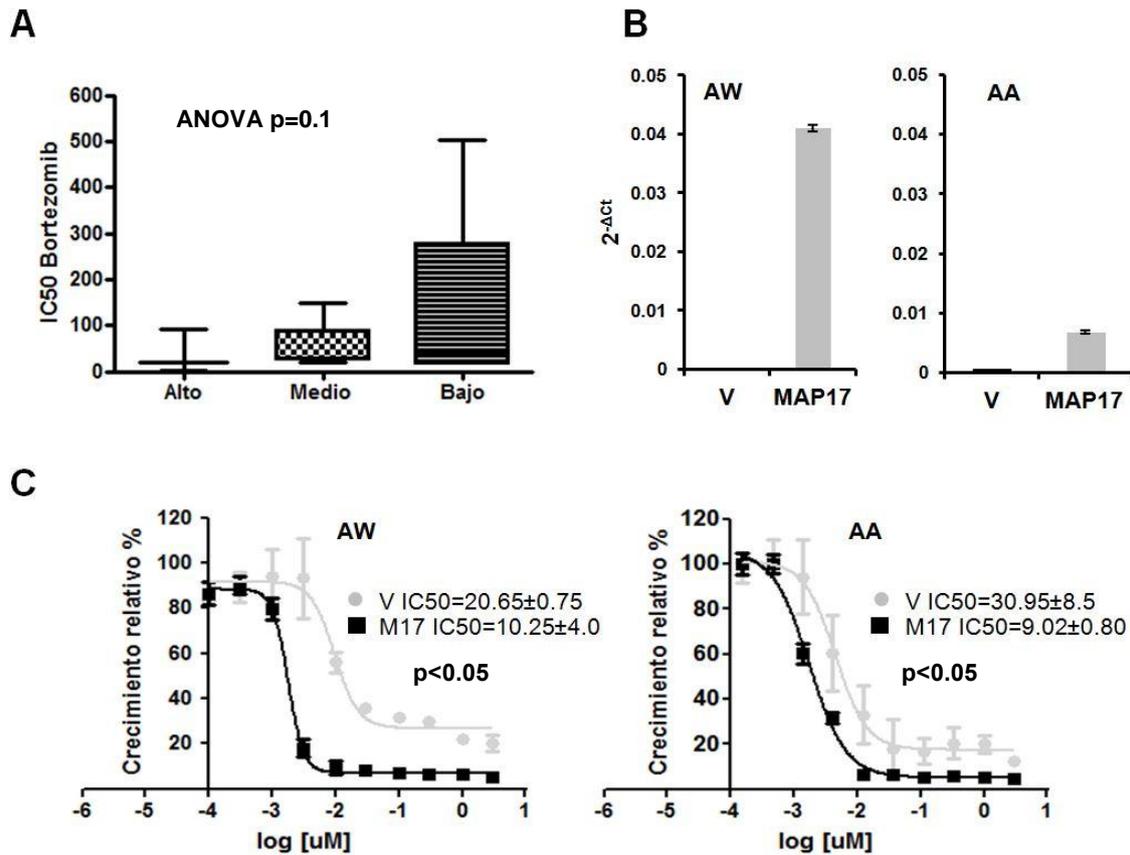


Figura 27. Correlación entre los niveles de MAP17 y sensibilidad a Bortezomib. **A)** Correlación entre los niveles de MAP17 y la sensibilidad a Bortezomib en un panel de 16 líneas celulares de sarcoma. Las líneas celulares se han dividido en función de los niveles de MAP17: Líneas celulares con niveles muy bajo y apenas detectables de MAP17, (Bajo)= (BP, CE, A673, SAOS2, SKUT-1, HT-1080 and CP0038), células con niveles bajo pero detectables de MAP17, (Medio)= (AA, AW, BG and BD) y células con niveles altos de MAP17, (Alto)= (BC, AZ, AX, SW872 and 93T449). El análisis de la correlación entre los niveles de ARNm de MAP17 y el IC50 a Bortezomib se realizó mediante test de Anova, $p=0.1$. **B)** Niveles de ARNm de MAP17 en líneas celulares que expresaban ectópicamente el ADNc de MAP17 (MAP17) o el vector vacío (V). La figura muestra los niveles de ARNm de MAP17 realizado en tres experimentos independientes. **C)** La curva muestra el IC50 de las líneas celulares expresando ectópicamente el ADNc de MAP17 (MAP1) o el vector vacío (V). El IC50 se ha calculado como la media \pm la desviación estándar de 4 experimentos independientes realizados en triplicado.

Para confirmar esos resultados, decidimos reducir los niveles de MAP17 en una de las líneas celulares con niveles endógenos de MAP17 elevados, la línea AX. Para ese fin sobreexpresamos un shARN contra MAP17, reduciendo los niveles de

MAP17 en torno al 50% (Figura 28A), y comprobamos la sensibilidad a Bortezomib (Figura 28B). Observamos un 50% de reducción en la sensibilidad al fármaco, en la línea con el aumento de 2 veces en los niveles de MAP17 (Figura 27C).

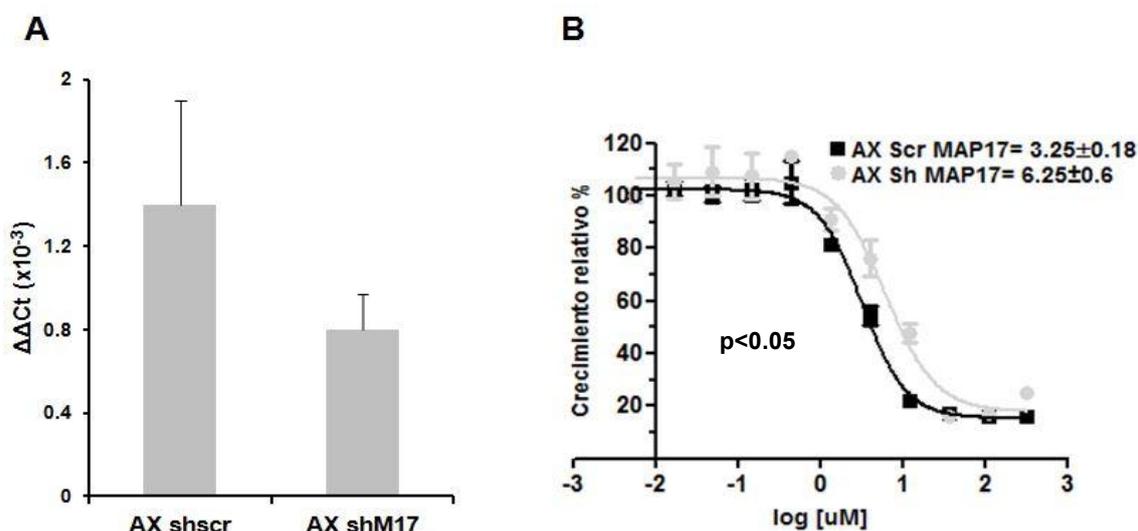


Figura 28. Correlación entre los niveles de MAP17 y sensibilidad a Bortezomib. **A)** Niveles de expresión de ARNm de MAP17 por Q-RT-PCR. Se realizaron tres repeticiones independientes realizadas por triplicado, de la línea AX que sobreexpresa un shARN de MAP17 (AX shM17) y del control (AX shscr). **B)** Curva de IC50 a Bortezomib de la línea AX que sobreexpresa un shARN frente a MAP17 (AX shM17) en comparación con el control (AX shscr). Los valores de IC50 se muestran con \pm la desviación estándar resultante de 4 experimentos independientes realizados en triplicado.

23.2 *In vivo*, los sarcomas que sobreexpresan MAP17 son más sensibles a Bortezomib

Para confirmar nuestros resultados decidimos probar la eficacia de Bortezomib *in vivo*. De nuestro panel de PDX de sarcomas seleccionamos 4 modelos en función de sus niveles de expresión de ARNm de MAP17. (Figura 29 A). Para el ensayo *in vivo* implantamos 12 ratones por cada modelo PDX y distribuimos aleatoriamente 6 ratones en el grupo control y 6 ratones en el grupo que recibió el tratamiento con Bortezomib. El tratamiento se suministró durante 4 semanas (5 días a la semana) con Bortezomib (1 mg/Kg peso en una solución de 0.9% de NaCl) o suero fisiológico en el grupo control (solución de 0.9% NaCl). Tras analizar los datos de supervivencia y de crecimiento de los tumores, encontramos que los PDX que expresaban altos niveles de MAP17 (S16) respondían eficazmente al tratamiento con Bortezomib (Figura 30). En esos PDX obteníamos una desaparición del tumor en el grupo de tumores tratados y como consecuencia todos los ratones sobrevivían. Por otro lado el modelo S11, con niveles intermedios de MAP17, respondía parcialmente al tratamiento con Bortezomib y obteníamos una disminución en el crecimiento tumoral y una mejora en

supervivencia del 25% (Figura 30). Sin embargo, los modelos que tenían baja expresión o que no expresaban MAP17 (S14 y S29) no respondían al tratamiento (Figura 30).

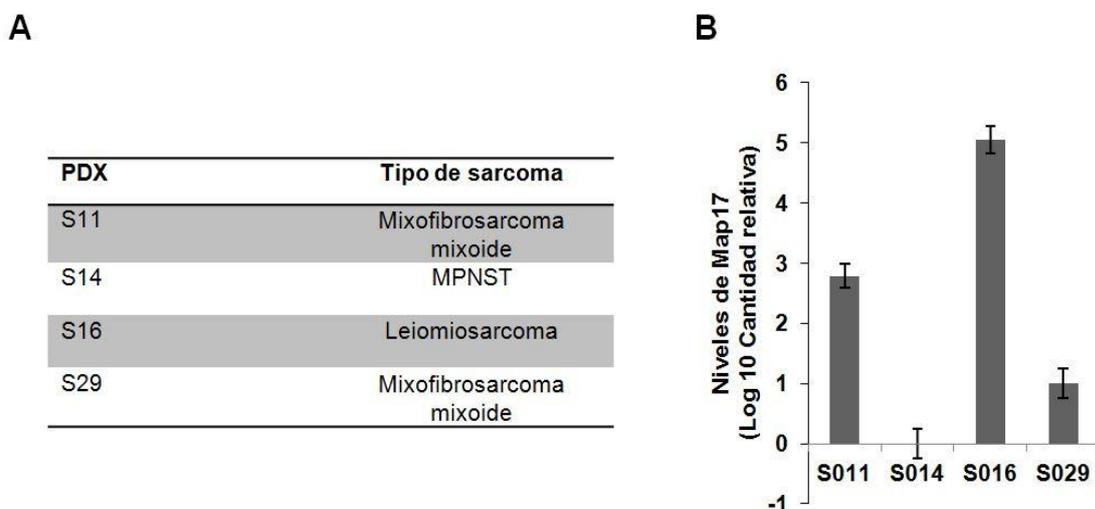


Figura 29. Modelos PDX usados para el ensayo *in vivo* con Bortezomib **A)** Subtipos histológicos de los modelos PDX del estudio **B)** Niveles de ARNm de MAP17 de los modelos PDX seleccionados.

En definitiva, nuestros datos *in vivo* con los modelos PDX de sarcomas, confirmaban los datos *in vitro* y nos sugerían que Bortezomib podría considerarse como posible terapia para los pacientes con sarcomas que al diagnóstico presentan altos niveles de MAP17.

En trabajos previos del laboratorio, con células de cáncer de mama habíamos demostrado que MAP17 previene la activación de NFκB inducida por Bortezomib, inhibiendo así su efecto citoprotector mediado por autofagia [92]. Decidimos entonces explorar si esos marcadores correlacionaban también con nuestros modelos PDX antes de recibir el tratamiento con Bortezomib. Por eso decidimos medir en los modelos PDX utilizados los niveles de NFκB, de su forma activa (fosforilada en el residuo de Serina 536) y de dos marcadores de autofagia (p62 y LC3B). Pudimos observar que los modelos PDX que respondían al tratamiento con Bortezomib (S16) mostraban niveles sensiblemente más bajos de NFκB activado (medido como p65 fosforilado en la Serina 536) y de autofagia (medido como incremento de p62 y LC3B) (Figura 31). Los tumores que no respondían (S14 y S29) presentaban niveles más altos de NFκB activado y de marcadores de autofagia confirmando así el papel de esos factores en la respuesta a Bortezomib (Figura 31). Obtuvimos datos similares con las líneas celulares AA y AW, en las que la sobreexpresión de MAP17 reducía la activación de NFκB y por lo tanto de autofagia (Figura 32). Constatamos, además, que en las líneas celulares de sarcoma, MAP17 prevenía la activación citoprotectora de

NFkB y la autofagia inducida por Bortezomib, así como se había descrito en nuestro trabajo previo con células de cáncer de mama (Figura 33) [92]. La inhibición inducida por MAP17 de esta ruta citoprotectora podría explicar el incremento de sensibilidad al fármaco que habíamos encontrado *in vivo*.

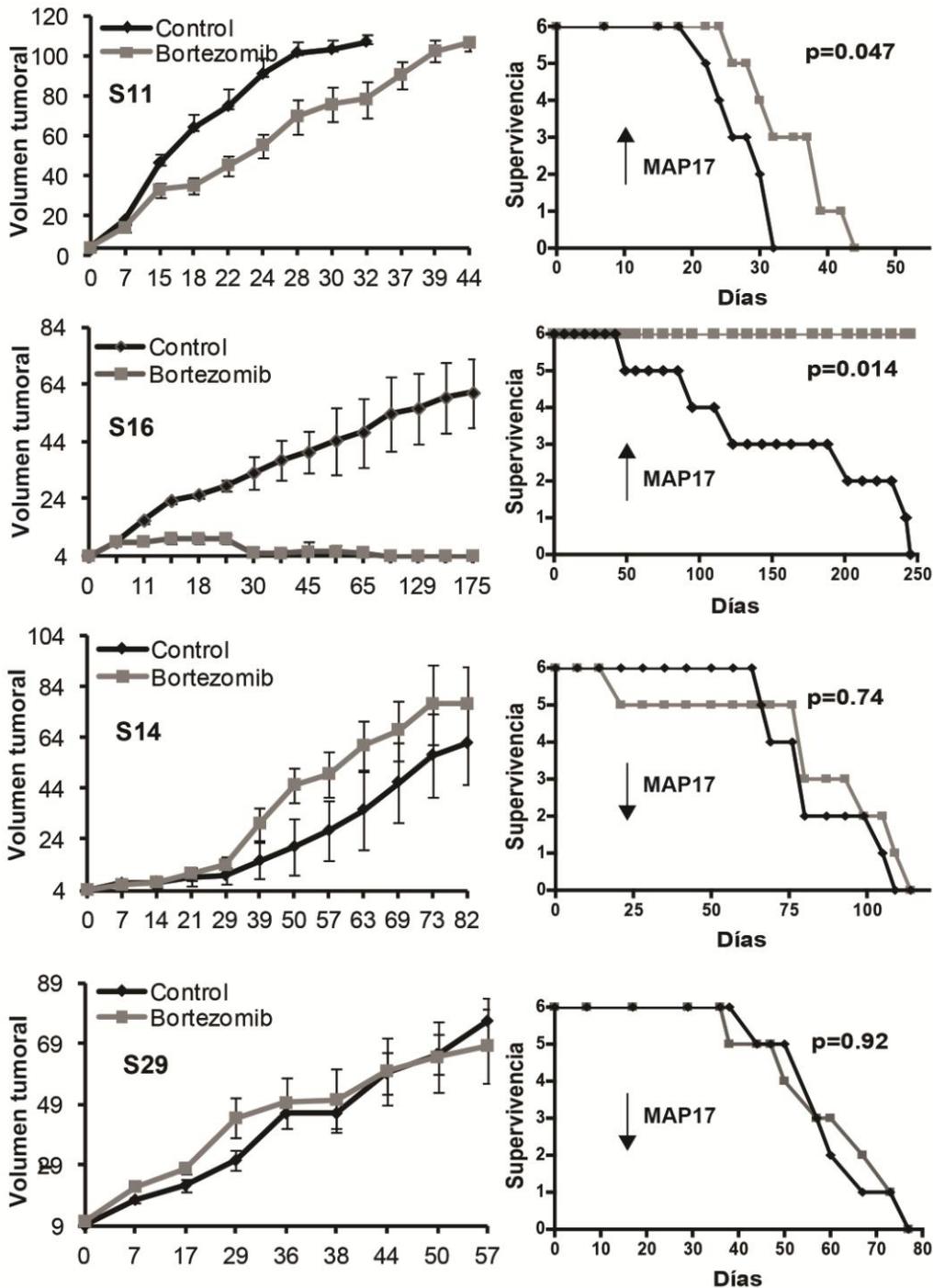


Figura 30. Efecto de Bortezomib *in vivo*. En la parte izquierda se muestra el tamaño tumoral \pm la desviación estándar (DS/\sqrt{n}). La parte derecha muestra los datos de supervivencia de los ratones, sacrificados cuando el tumor alcanzó 1000 mm^3 . Los sarcomas fueron implantados subcutáneamente, y se trataron cuando el tumor alcanzó un volumen de 20 mm^3 . El tratamiento se suministró durante 4 semanas (5 días a la semana) con Bortezomib (1 mg/Kg peso en una solución de 0.9% de NaCl) o suero fisiológico (0.9% NaCl). Los ratones fueron monitorizados diariamente y pesados dos veces por semana.

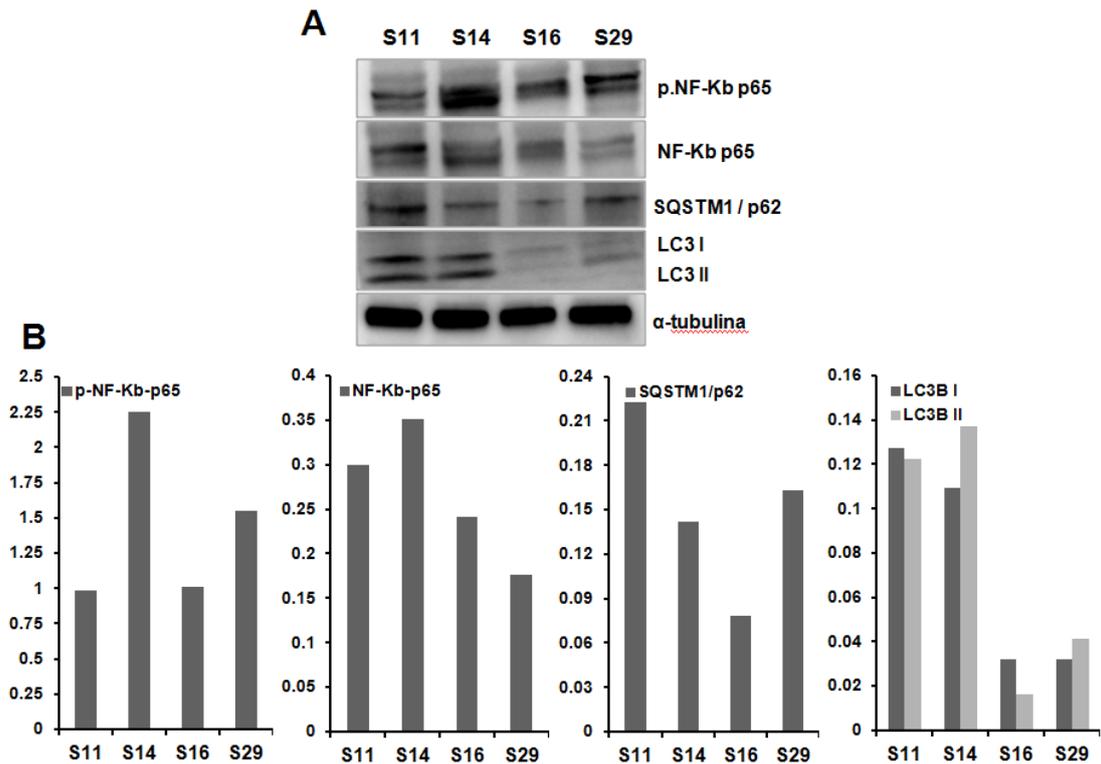


Figura 31. Niveles de NFkB y autofagia en modelos PDX de. A) Western Blot de NFkB-p65, p.NF-Kb-p65 (Ser536), LC3B, p62 y α -tubulina en los modelo PDX seleccionados. **B)** Cuantificación de los niveles de NFkB-p65, p.NFkB-p65 (Ser536), p62 y LC3B en relación a los niveles proteicos de α -tubulina.

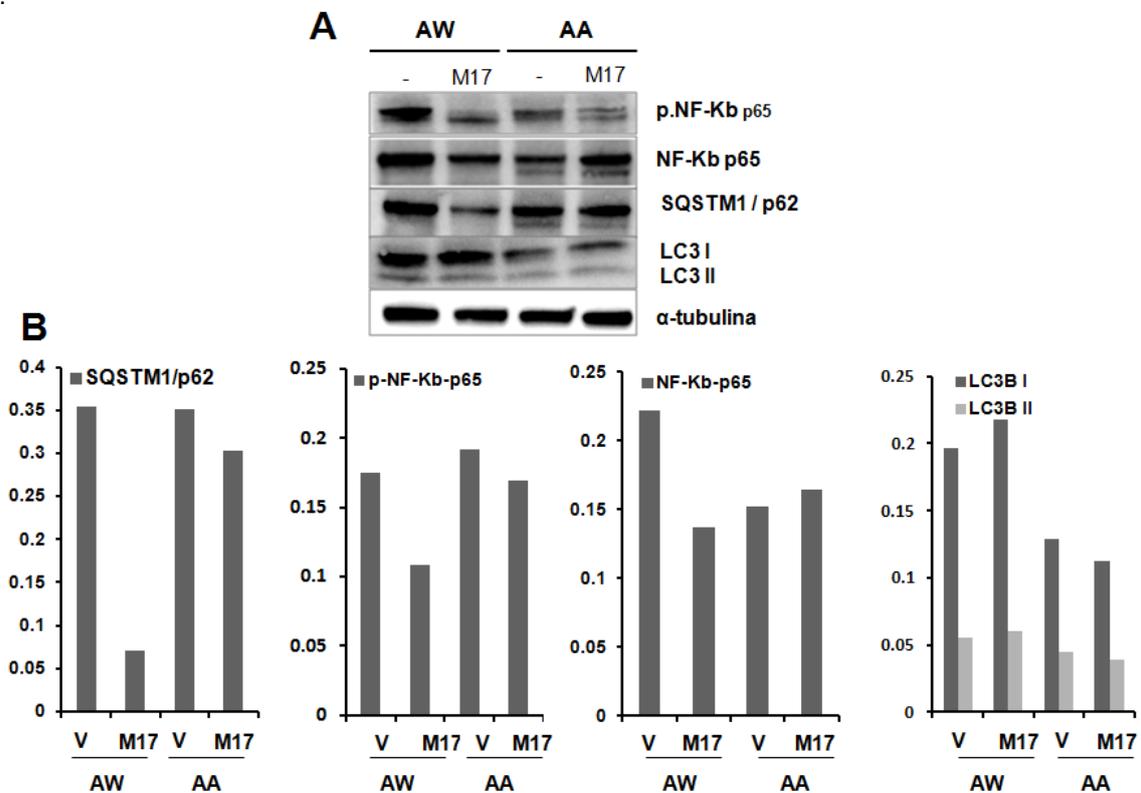


Figura 32. Niveles de NFkB y autofagia en las líneas celulares de sarcoma. A) Western Blot de NFkB-p65, p.NF-Kb-p65 (Ser536), LC3B, p62 y α -tubulina en las líneas celulares de sarcoma AA y AW, trasfectadas con el vector vacío o con el ADNc de MAP17. **B)** Cuantificación de los niveles de NFkB-p65, p.NFkB-p65 (Ser536), p62 y LC3B en relación a los niveles proteicos de α -tubulina.

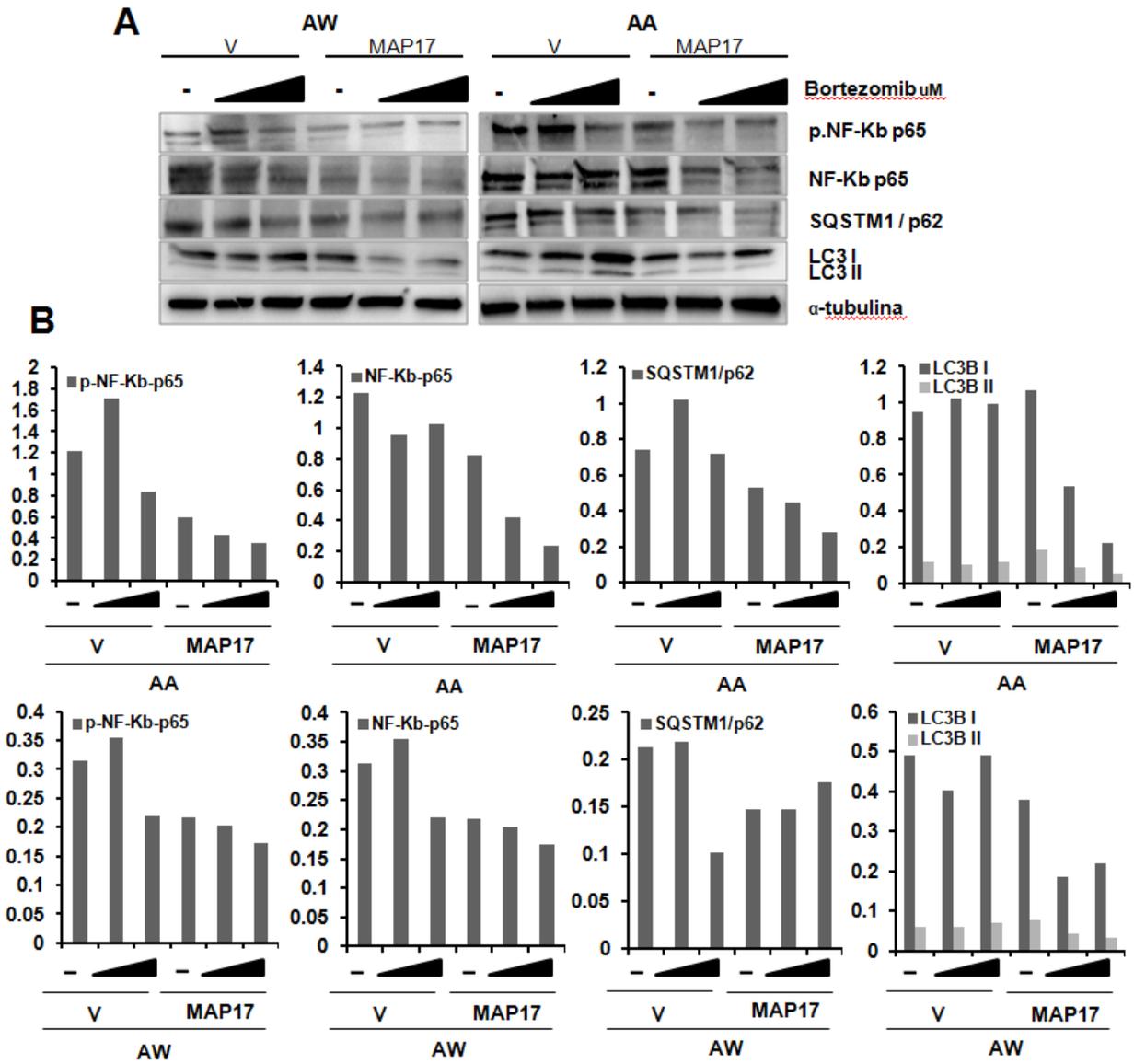


Figura 33. Niveles de NF κ B y autofagia en modelos PDX de sarcomas y en líneas celulares que expresan MAP17. A) Western Blot de NF κ B-p65, p.NF-Kb-p65 (Ser536), LC3B,p62 y α -tubulina en las líneas celulares de sarcoma AA y AW, transfectada con el vector vacío, o con el ADNc de MAP17 en respuesta a concentraciones crecientes de Bortezomib. **B)** Cuantificación de los niveles de NF κ B-p65, p.NF κ B-p65 (Ser536), p62 y LC3B en relación a los niveles proteicos de α -tubulina.

24. Efecto citotóxico de Oxaliplatino en un panel de líneas de cáncer colorrectal

Uno de los objetivos de ese trabajo era buscar marcadores para identificar pacientes con cáncer colorrectal que pudieran responder al tratamiento con Oxaliplatino. Datos previos del laboratorio sugerían que altos niveles de p-SRC podrían definir la resistencia o sensibilidad a Oxaliplatino. Por esta razón, lo primero que hicimos fue usar un panel de 8 líneas celulares de carcinoma colorrectal que fueron caracterizadas por la presencia de mutaciones con importante relevancia clínica, como *KRAS-BRAF* y *PI3K* (Tabla 13).

Tabla13. Estado mutacional de las líneas celulares de cáncer colorrectal del estudio

Línea celular	Mutaciones <i>KRAS</i>	Mutación <i>BRAF V600E</i>	Mutaciones <i>PI3K</i>
COLO 205	<i>Wild type</i>	Mutada	<i>Wild type</i>
HT29	<i>Wild type</i>	Mutada	<i>Wild type</i>
LS174T	G12D	<i>Wild type</i>	p.H1047R
LS180	G12D	<i>Wild type</i>	p.H1047R
LOVO	G13D	Mutada	p.H1047R
T84	G13D	<i>Wild type</i>	p.E542K/ p.H1047R
SW480	G12V	<i>Wild type</i>	<i>Wild type</i>
SW48	<i>Wild type</i>	<i>Wild type</i>	<i>Wild type</i>

Caracterizamos en las 8 líneas celulares los niveles de SRC activado (fosforilación en el residuo de tirosina 418, p-SRC) y buscamos una correlación con sus efectores en la misma cascada, p-P42/44 MAPK. Observamos que 4 líneas celulares, COLO 205, HT29, LS174T y LS180 presentaban SRC en un estado activado (p-SRC), mientras las demás líneas celulares, LOVO, SW48, SW480 y T84 no presentaban SRC en su forma activa (Figura 34). Observamos también que los altos niveles de p-SRC correlacionaban con un incremento en los niveles de SRC total y con P42/44 MAPK en su forma activa (p-P42/44 MAPK). Constatamos además que la activación de p-P42/44 MAPK correlacionaba con los niveles de p-SRC pero no con el estado mutacional de *KRAS*, *BRAF* y *PI3K* (Tabla13 y Figura 34).

Con el fin de observar si existía alguna correlación entre los niveles de p-SRC y la sensibilidad a Oxaliplatino, tratamos las 8 líneas de cáncer colorrectal con diferentes concentraciones de Oxaliplatino y procedimos a analizar los valores de IC50 obtenidos. Los valores de IC50 oscilaban entre 1 y mayores que 100µM, como en el caso de la HT29 y LS180 (Tabla 14). Observamos además que dichos valores de IC50 correlacionaban, en general, con los niveles de SRC activado (p-SRC), de forma que

las líneas celulares con altos niveles de SRC activado mostraban resistencia a Oxaliplatino, salvo la línea COLO 205 que no mostraba quimioresistencia a pesar de los altos niveles de p-SRC (Tabla 14). Vimos también que los valores de IC50 estaban influenciados por los niveles de P42/P44 MAPK fosforilado, aunque el número de líneas celulares analizadas era pequeño para sacar una conclusión robusta.

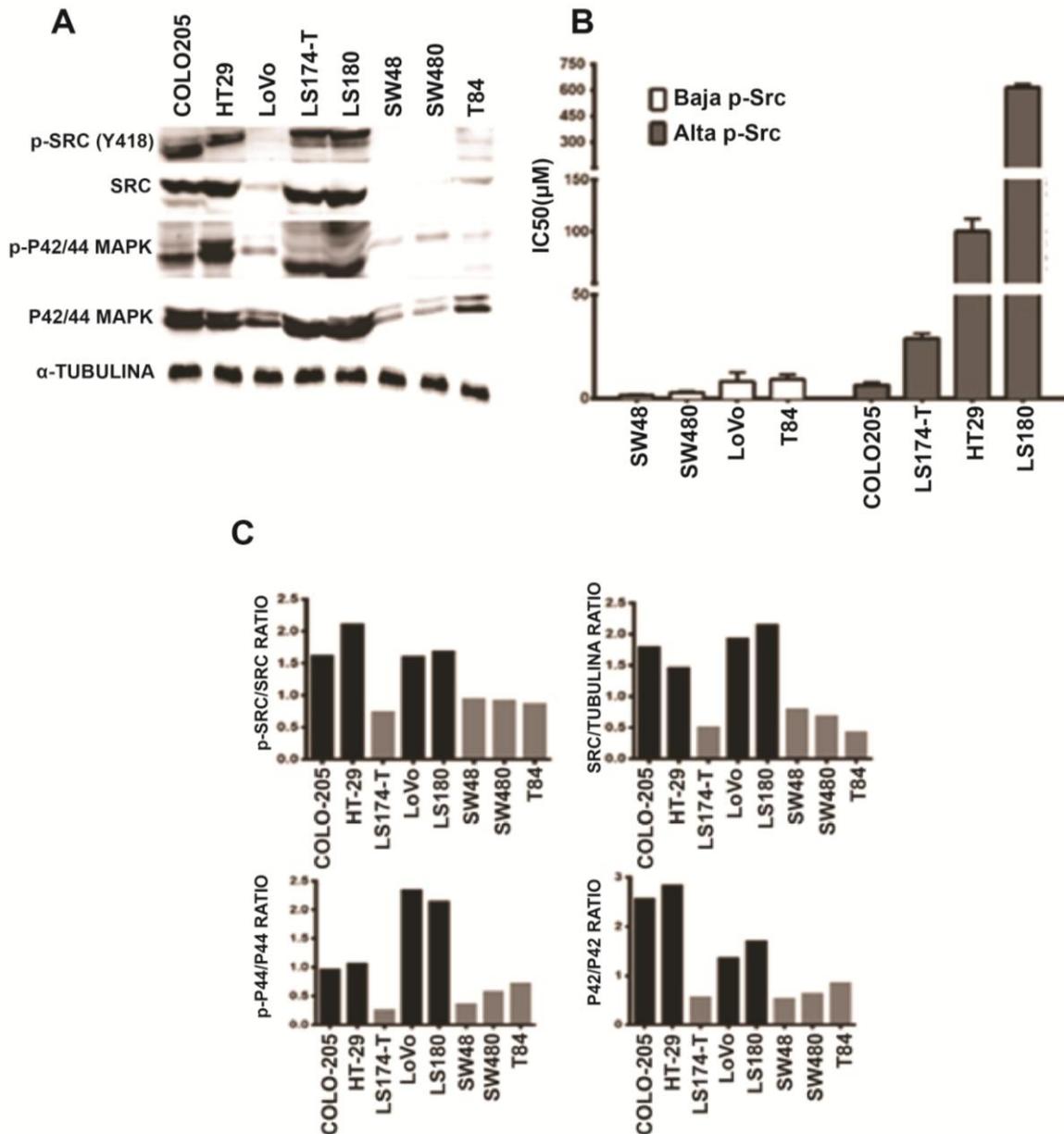


Figura 34. Caracterización de los niveles proteicos de las líneas celulares de cáncer colorrectal usadas en ese estudio. A) Niveles proteicos de p-SRC, SRC, p-P42/p44 MAPK y P42/p44 MAPK en las líneas celulares de cáncer colorrectal **B)** Efecto citotóxico de Oxaliplatino en correlación con los niveles de SRC activado (p-SRC). Los valores de IC50 están separados en 2 diferentes grupos en función de los niveles de p-SRC. **C)** Cuantificación de los western blot. La cuantificación se realizó en relación a la expresión de la α -TUBULINA.

Tabla 14. Quimiosensibilidad a Oxaliplatino de las líneas celulares de cáncer colorrectal

Línea celular	IC50 (µM)
	Oxaliplatino
SW48	1.47 ± 0.4
SW 480	5.50 ± 1.6
LoVo	8.29 ± 4.4
T84	8.20 ± 1.4
COLO-205	6.43 ± 1.2
LS174-T	29 ± 2.4
HT29	100 ± 2.1
LS180	616 ± 6.2

25. Efecto de la sobreexpresión de p-SRC

25.1. La sobreexpresión de p-SRC en líneas celulares de carcinoma colorrectal induce quimioresistencia a Oxaliplatino

A pesar de haber examinado un número limitado de líneas celulares, decidimos sobreexpresar constitutivamente *SRC* para estudiar la relación funcional entre los niveles de p-SRC y la respuesta a Oxaliplatino (Figura 27). Elegimos dos de las líneas de carcinoma colorrectales, la T84 y la SW480, que presentaban bajo niveles de expresión de la proteína. Tras la transfección comprobamos los niveles de p-SRC y de su efector MAPK en las líneas transfectadas (Figura 35A). Observamos que la sobreexpresión de *SRC* llevaba a la activación de p-SRC en estas líneas celulares, con la consiguiente activación de MAPK (Figura 35A). Además constatamos que la inhibición farmacológica de p-SRC con un inhibidor específico, PP2 [118, 119], reducía la activación de MAPK en estas líneas celulares (Figura 35B). Los resultados obtenidos confirmaban que la activación de MAPK en las líneas celulares de cáncer colorrectal es más dependiente de los niveles de p-SRC que del estado mutacional de *BRAF*, *KRAS* o *PI3K*.

Para comprender mejor el efecto de la activación de *SRC* en la sensibilidad a Oxaliplatino, tratamos las líneas celulares transfectadas con el fármaco. El análisis de los valores de IC50 confirmaba nuestros resultados previos, observando que las líneas celulares que sobreexpresaban ectópicamente p-SRC mostraban valores de IC50 dos veces más altos que las líneas celulares parentales que expresaban el vector vacío (Tabla 15).

Realizamos también un ensayo con el fármaco PP2 y con PP2 más Oxaliplatino para ver si la inhibición de p-SRC surtía algún efecto en la sensibilidad de

las líneas transfectadas. Observamos que la quimioresistencia a Oxaliplatino se revertía inhibiendo p-SRC a través de su inhibidor PP2 (Tabla 15).

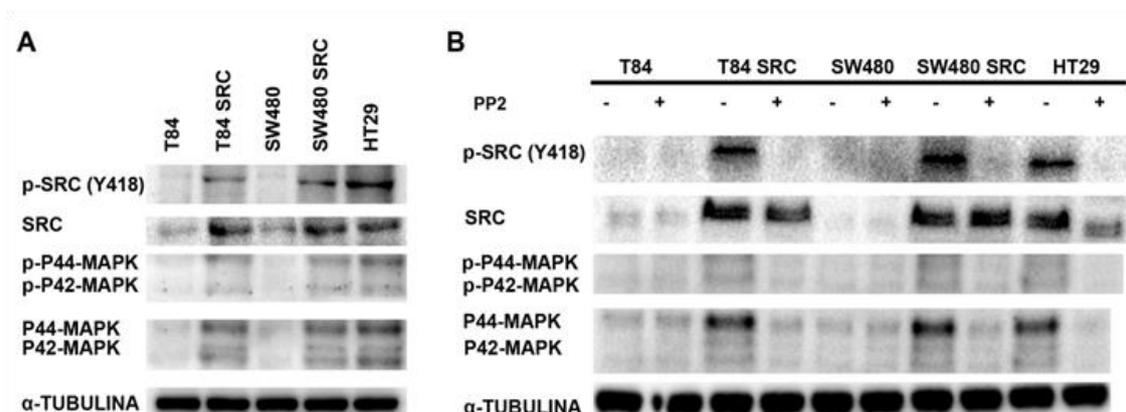


Figura 35. A) Valoración de los niveles proteicos de p-SRC, SRC p-P42/p44 MAPK y P42/p44 MAPK en las líneas celulares parentales T84, SW480 y HT29, con niveles endógenos normales de SRC y en dos líneas transfectadas con ADNc de SRC (T84SRC y SW480SRC) **B)** Valoración de los niveles proteicos de p-SRC, SRC p-P42/p44 MAPK y P42/p44 MAPK en las líneas celulares parentales T84, SW480 y HT29 con niveles endógenos normales de SRC y en las líneas transfectadas con ADNc de SRC (T84 SRC y SW480 SRC) en presencia (+) y en ausencia (-) de PP2 un inhibidor específico de la actividad de SRC.

Tabla 15. Representación esquemática de los valores de IC50 de PP2, Oxaliplatino y de la combinación de los dos fármacos en las líneas parentales, T84 Y SW480 y transfectadas con el plásmido sobreespresando SRC. En el subgrupo de tratamiento que recibían Oxaliplatino más PP2 los valores de IC50 se calculaban a una concentración constante de PP2 de 10µM.

Línea celular	Mut RAS/RAF	IC50 (µM)		
		PP2	Oxaliplatino	Oxaliplatino + PP2
SW480	G12V (KRAS)	14.85 ± 3.8	5.50 ± 1.6	1.23 ± 1.3
SW480 SRC	G12V (KRAS)	16.67 ± 6.8	10.44 ± 2.3	3.29 ± 1.0
T84	Wild Type	11.53 ± 3.2	8.20 ± 1.4	1.80 ± 2.2
T84 SRC	Wild Type	11.64 ± 5.2	14.75 ± 2.1	6.39 ± 1.7
HT-29	V600E (BRAF)	7.98 ± 9.93	100 ± 2.1	8.97 ± 1.1

Ya que los tumores colorrectales suelen también tratarse con 5-FU (30), decidimos explorar *in vitro* cómo p-SRC podría ser de relevante en la respuesta a ese compuesto. Por lo tanto tratamos las mismas líneas celulares con 5-FU y calculamos los valores IC50. En este caso no encontramos ninguna correlación entre la respuesta a 5-FU y los niveles de p-SRC (Tabla 16), de hecho la inhibición de p-SRC con PP2 no sensibilizaba las células al tratamiento con 5-FU (Tabla 16). Por lo tanto, nuestros datos sugieren que la quimioresistencia inducida por p-SRC es específica a Oxaliplatino.

Tabla 16. Valores de IC50 a 5-FU de las líneas de adenocarcinoma colorrectal. Representación esquemática de los valores de IC50 de PP2 y de 5-FU del panel de 8 líneas celulares de cáncer colorrectal. En el subgrupo de tratamiento que recibía 5-FU más PP2 los valores de IC50 se calculaban a una concentración constante de PP2 de 10µM.

Líneas celulares	IC50 (µM)		
	5-FU	PP2	5-FU + PP2
SW48	16.1 ± 3.2	14.78 ± 3.6	16.4
SW480	21.5 ± 3.4	18.75 ± 3.2	17.3 ± 2.4
SW480 SRC	25.1 ± 2.1	15.58 ± 4.7	12 ± 4.1
LoVo	17 ± 2.3	14.21 ± 3.3	18.5 ± 3.6
T84	19.3 ± 4.6	13.42 ± 2.8	9.8 ± 4.3
T84 SRC	12.7 ± 4.1	13.78 ± 3.5	7.3 ± 3.7
COLO-205	8.9 ± 1.6	12.88 ± 3.4	9.2 ± 2.4
LS174	27.42 ± 3.6	18.61 ± 4.2	23.47 ± 4.8
HT-29	23.9 ± 4.5	10.23 ± 4.5	8.7 ± 2.3
LS180	3.69 ± 1.7	16.41 ± 5.7	4.5 ± 2.6

26. Generación y caracterización de modelos PDX de metástasis hepática de cáncer colorrectal

Con el fin de establecer una plataforma *in vivo* para ensayar nuevos fármacos en las metástasis hepáticas colorrectales, implantamos 46 muestras tumorales procedentes de pacientes intervenidos de metástasis hepática de cáncer colorrectal.

De los 46 tumores implantados, 20 de ellos crecieron, con una eficacia de crecimiento del 42.5% (tabla 17). Dichas muestras han sido reimplantadas nuevamente siguiendo el mismo protocolo de la muestra primaria. En todos los casos pudimos observar el crecimiento del xenoinjerto en el hígado (Figura 36).



Figura 36. Xenoinjerto creciendo en el hígado del ratón. Representación de 3 ejemplos de metástasis hepática colorrectal creciendo ortotópicamente en el hígado de ratón.

Establecimos una colaboración para hacer un seguimiento eventual mediante PET de la masa tumoral implantada. La figura 37 muestra una comparativa del hígado de un ratón operado, pero no implantado (control) con un ratón implantado

(implantado) tras 2 meses de la operación. La flecha muestra la localización del tumor implantado (o lugar de la operación).

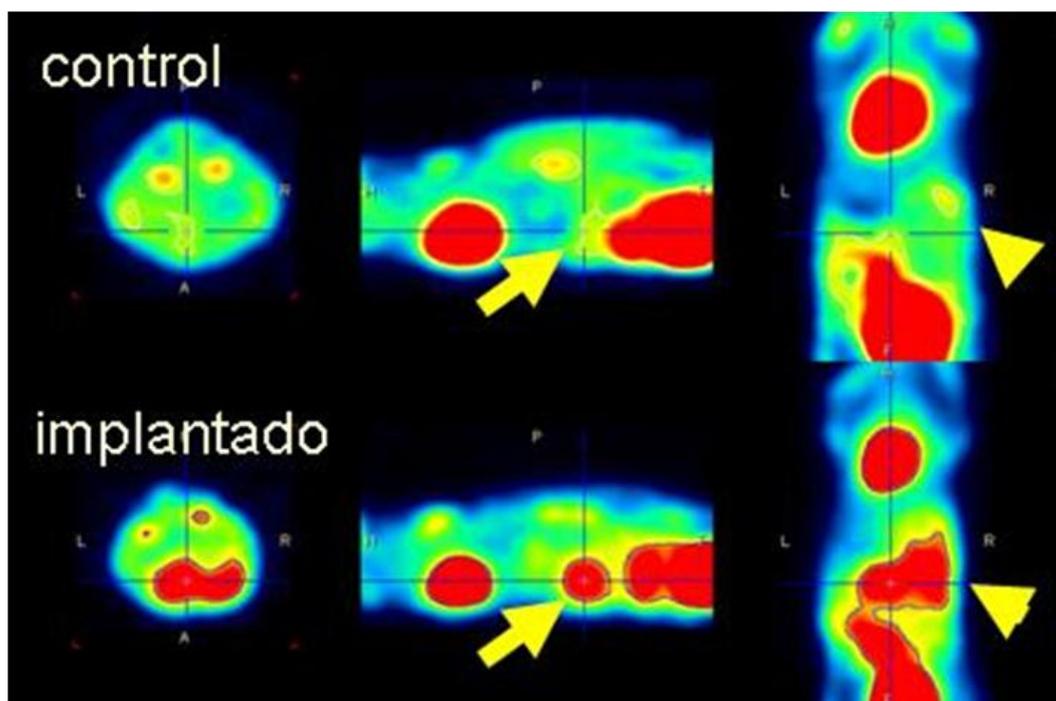


Figura 37. Análisis comparativo por Micro PET de la captación de 6 Flúor-deoxi-glucosa (FDG). Las flechas indican la localización del implante ortotópico. Control=Ratón operado pero no implantado. Implantado=Ratón con implante ortotópico en hígado.

26.1. Los modelos ortotópicos muestran características morfológicas y fenotípicas comparables a la de los tumores humanos de origen

Se realizaron bloques de tejido fijado en parafina de los tumores primarios y de los tumores hepáticos que habían crecido, para compararlos. Cortes de tejidos de 0.3µm se tiñeron con hematoxilina eosina y se analizaron por microscopia. Observamos que los tumores generados en el animal exhibían características morfológicas y fenotípicas similares a los tumores primarios humanos (Figura 38).

Comparamos además más muestras de cada tumor y de diferentes pases (F1-F2), para lograr una adecuada representación de la heterogeneidad tumoral y observamos que el fenotipo tumoral se mantenía invariable también en el segundo pase en el animal. Valoramos también la expresión por inmunohistoquímica de la citoqueratina 20, una citoqueratina de bajo peso molecular que generalmente se expresa en el epitelio gastrointestinal. La presencia de citoqueratina 20 en los tumores murinos nos confirmaba el origen colorrectal del tumor (Figura 39). Observamos también que el xenoinjerto generado tenía un crecimiento delimitado y no se detectaba invasión del parénquima hepático del ratón (Figura 40).

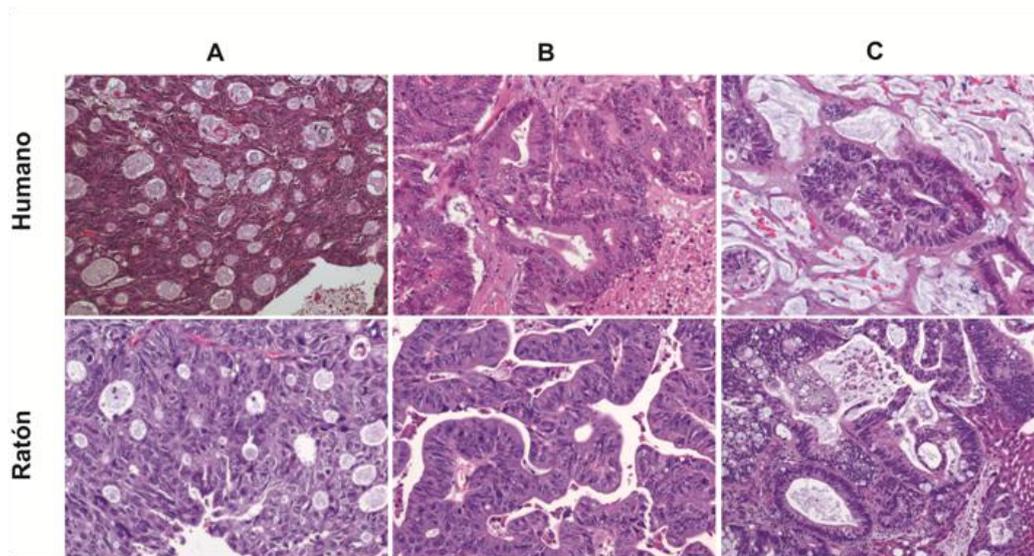


Figura 38. Representación de imágenes histológicas teñidas con hematoxilina-eosina: Se muestran tres imágenes histológicas de tres tumores humanos (A, B, C) y abajo los correspondientes tumores creciendo en el ratón.

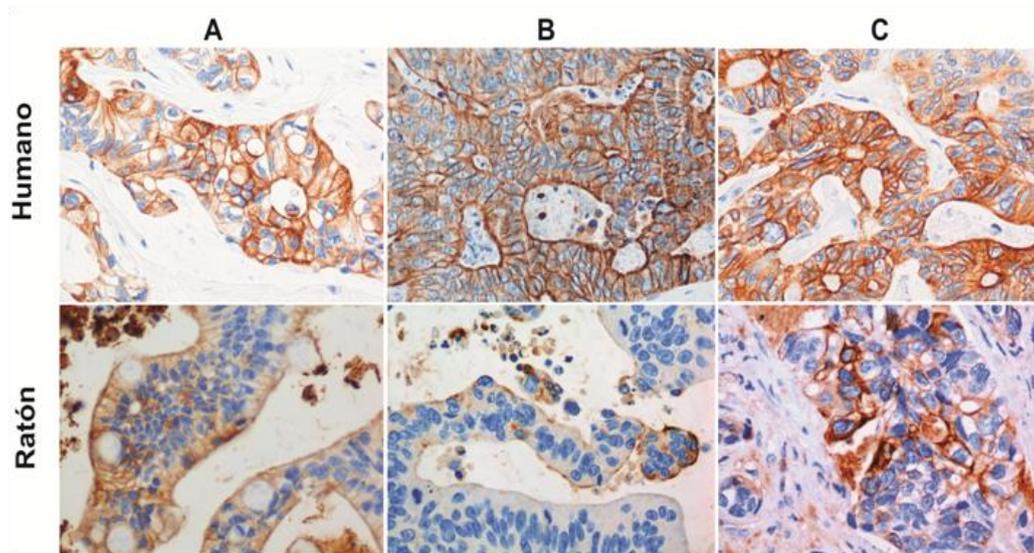


Figura 39. Representación de imágenes histológicas teñidas con citoqueratina 20 del tumor primario y de los correspondientes xenoinjertos: En la parte de arriba se muestran tres imágenes histológicas de tres tumores humanos (A-B-C), y abajo los correspondiente engraft en el ratón.

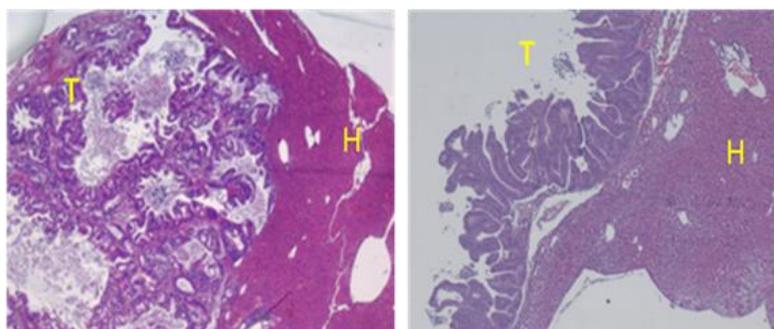


Figura 40. Representación de imágenes histológicas de los xenoinjertos. Se muestran dos imágenes histológicas de tumores creciendo en el hígado del ratón. Se observa como el tumor no infiltra el parénquima hepático. T = Tumor, H= Hígado de ratón

26.2. Los modelos ortotópicos muestran las mismas características genéticas que los tumores originales de los que derivan

Con el fin de averiguar el grado de similitud entre los xenoinjertos y los tumores de origen humano, decidimos realizar un estudio mutacional de varios genes con implicaciones importantes en la clínica del cáncer. Por eso estudiamos en esas muestras varias mutaciones a cargo de los genes *KRAS*, *BRAF*, *PI3K* y *PDGFR β* (Tabla 17). Incluimos *PDGFR β* ya que habíamos encontrado un SNP en una serie propia y pensábamos que podía tener relación con la sensibilidad a los tratamientos. Pudimos observar un alto grado de correspondencia entre los xenoinjertos generados y los tumores humanos. Solo en dos casos (marcados en rojo en la tabla 17), uno en tumor humano y el otro en xenoinjertos de ratón encontramos una mutación presente en solo uno de ellos. Ese hecho probablemente ha ocurrido por la alta heterogeneidad tumoral, responsable de que hayamos realizado el estudio mutacional con parte de la biopsia humana sin la mutación, implantando en el ratón la parte del tumor que presentaba la mutación, o viceversa.

	TUMORES HUMANOS				MODELOS PDX			
	Mut. Kras	Mut. PI3K	BRAF V600E	PDGFR β Ex. 19	Mut. Kras	Mut. PI3K	BRAF V600E	PDGFR β Ex. 19
N. 3	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
N. 5	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
N. 9	G12S	WT	WT	c.2601 A>G	G12S	WT	WT	c.2601 A>G
N. 10	G12C	WT	Mut	c.258740T>A c.2601 A>G (GG)	G12C	WT	Mut	c.2587 40T>A c.2601 A>G (GG)
N. 12	G12D	WT	WT	WT	G12D	WT	WT	WT
N. 13	WT	WT	WT	WT	G12D	WT	WT	WT
N. 16	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
N. 18	G12C	E545K	WT	c.2601 A>G	G12C	E545K	WT	c.2601 A>G
N. 21	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
N. 22	G12D	WT	WT	WT	G12D	WT	WT	WT
N. 25	G12D	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
N. 34	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
N. 35	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
N. 36	WT	E542K	WT	c.2601 A>G	WT	E542K	WT	c.2601 A>G
N. 37	G12S	WT	WT	WT	G12S	WT	WT	WT
N. 42	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
N. 43	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
N. 45	G12V	WT	WT	c.2601 A>G	G12V	WT	WT	WT
N. 46	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT

Tabla 17. Lista de mutaciones de los tumores primarios y de los correspondiente modelos PDX. En la parte izquierda de la tabla se representan los tumores humanos y el correspondiente perfil mutacional, el parte derecha la lista correspondiente de modelos PDX generados con su perfil mutacional.

Realizamos también el estudio de inestabilidad de microsatélites (MSI). En la clínica, los datos de inestabilidad de microsatélites se usan sobre todo en estadio 2, en ese estadio los pacientes con inestabilidad de microsatélites parecen tener mejor pronóstico y menor sensibilidad a las fluoropirimidinas [120, 121]. También en ese caso observamos una concordancia entre los tumores primarios y los correspondientes xenoinjertos, no mostrando inestabilidad de microsatélites (MSI) en ninguno de los casos analizados (Figura 41).

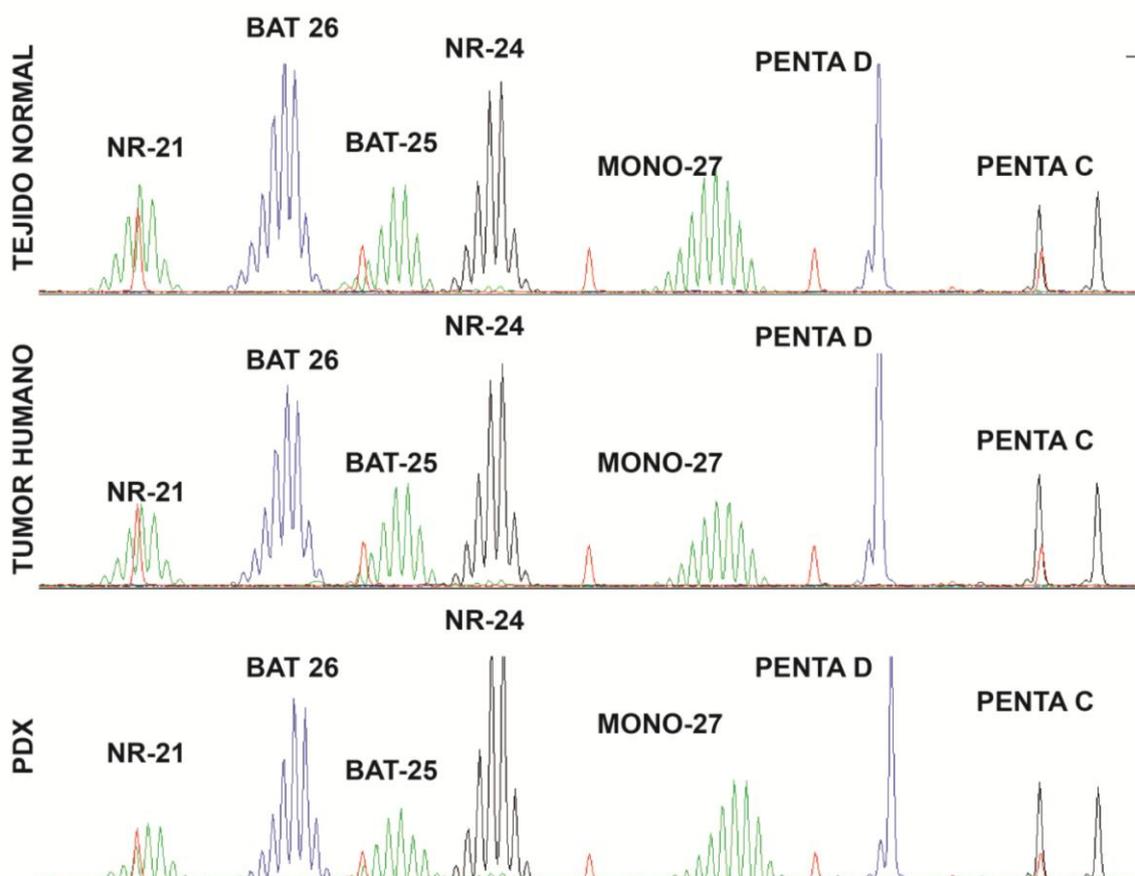


Figura 41. Análisis de inestabilidad de microsatélites (MSI). Se muestra en la parte de arriba el patrón alélico de una muestra de tejido no tumoral de paciente (TEJIDO NORMAL), al centro una muestra tumoral del mismo paciente y abajo el PDX correspondiente. La ausencia de nuevos alelos en el tejido tumoral frente al tejido normal indica la ausencia de inestabilidad de microsatélites (MSI). La ausencia de nuevos alelos en el modelo PDX indica que el patrón alélico se ha mantenido invariable en el tumor generado en el ratón.

26.3. Niveles de p-SRC en los modelos PDX de metástasis hepáticas de cáncer colorrectal

Habíamos observado en los ensayos con las líneas celulares colorrectales que los niveles proteicos de p-SRC determinaban la sensibilidad a Oxalipaltino, de forma que las líneas con alto nivel de p-SRC mostraban mayor sensibilidad al fármaco. Habíamos también explorado como la inhibición de p-SRC parecía no ser relevante en

la respuesta a 5FU. Decidimos entonces trasladar esos resultados a los ensayos *in vivo*. A tal fin, medimos los niveles proteicos de SRC total, de su forma activa fosforilada en la tirosina 418 (p-SRC), de P42/44 MAPK y de su forma activa fosforilada (p-P42/44 MAPK) en los PDX generados (Figura 42).

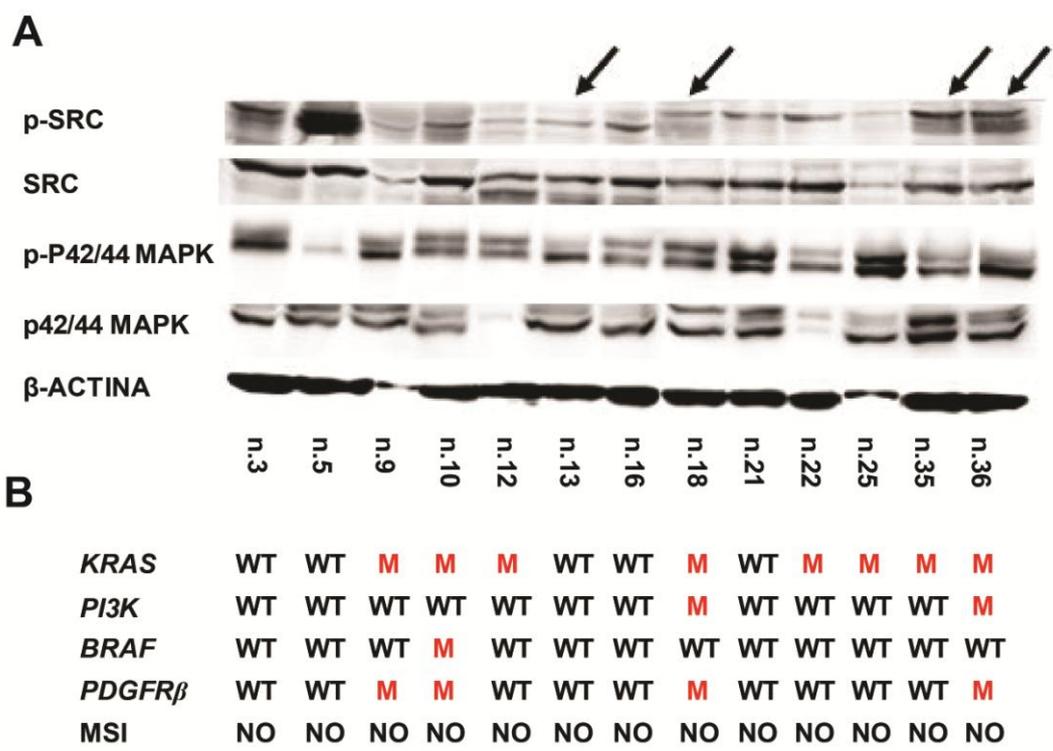


Figura 42. A) Niveles proteicos en los modelos PDX. Se muestran los niveles proteicos de SRC total (SRC) de su forma activada p-SRC (fosforilada en la tirosina 418), de p-P42/44 MAPK, de P42/44 MAPK y del control de carga β -ACTINA. **B) Estado mutacional de los modelos PDX.** Representación esquemática del estado mutacional de *KRAS*, *BRAF*, *PI3K* y *PDGFRβ*. M=mutado, WT=wild type. La figura muestra también el análisis de inestabilidad de microsatélites (MSI).

27. Efecto *in vivo* de la inhibición de p-SRC en la metástasis colorrectales

Seleccionamos 4 modelos PDX (Figura 42, marcados con flechas) en función de los niveles de expresión de p-SRC. 2 de los modelos tenían bajo niveles de p-SRC (C13-C18) y los otros 2 tenían altos niveles de p-SRC (C35-C36). Uno de los modelos PDX con bajos niveles de p-SRC, no presentaba ninguna mutación en *KRAS*, *RAF*, *PI3K* y *PDGFRβ* y no presentaba inestabilidad de microsatélites (Figura 42), sin embargo el modelo C18, también con bajos niveles de p-SRC, presentaba mutaciones en *KRAS* y *PI3K* mientras no la tenía en *BRAF* ni presentaba inestabilidad de microsatélites. Por otro lado los 2 modelos con altos niveles de p-SRC, el C35 y el C36

presentaban mutación en *KRAS*, pero no en *BRAF*. El modelo C36 también mostraba una mutación activante en *PI3K*.

Para corroborar la relación niveles de p-SRC y sensibilidad a Oxaliplatino, usamos un inhibidor de p-SRC, el Dasatinib. Dasatinib es un inhibidor relativamente específico de la quinasa BCR-ABL y de las quinasas de la familia SRC junto con otras quinasas oncogénicas específicas, incluyendo c-KIT, los receptores quinasa de la efrinas (EPH) y el receptor de PDGF β . Se utiliza en el tratamiento de adultos con leucemia mieloide crónica y en pacientes con leucemia linfoblástica aguda con cromosoma filadelfia positivo (Ph+) y crisis blástica linfoide procedente de una leucemia mieloide crónica.

Para el ensayo *in vivo* implantamos ortotópicamente en el hígado de ratón los 4 modelos PDX de metástasis hepática colorrectal seleccionados. Se implantaron 24 ratones que aleatoriamente se distribuyeron en 6 ratones por cada grupo; control (que recibieron solo suero fisiológico), tratados con Oxaliplatino, tratados con Dasatinib o que recibieron la combinación de ambos tratamientos (Dasatinib más Oxaliplatino). Tras 15 días, necesarios para asegurarnos el correcto injerto de los tumores implantados, un ratón de cada cohorte se sacrificó para examinar el crecimiento del tumor (Figura 44A). Un día después del último día de tratamiento, sacrificamos un ratón de cada grupo de tratamiento y de cada modelo PDX implantado y analizamos un corte del tejido para valorar la expresión de p-SRC. Encontramos un claro efecto en la inhibición de p-SRC en el hígado de los ratones tratados con Dasatinib (Figura 44B).

Para explorar el efecto de los diferentes tratamientos, los ratones fueron tratados durante 4 semanas. Seguimos la evolución de todos los animales implantados hasta el sacrificio por razones humanitarias. En ese momento los sacrificamos y realizamos la necropsia, anotando la fecha de sacrificio y todas las alteraciones macroscópicas observadas. En todos los casos observamos crecimiento del tumor delimitado en el lugar del implante, y sólo en muy pocos casos pudimos observar crecimiento en otra localización, como estomago o peritoneo, debido probablemente a que una parte del tumor implantado había salido del lugar del implante más que a una real capacidad metastásica del tumor. En el análisis de supervivencia observamos que no había una diferencia significativa entre los ratones no tratados y los ratones tratados solo con Dasatinib u Oxaliplatino, independientemente de los niveles de expresión de p-SRC.

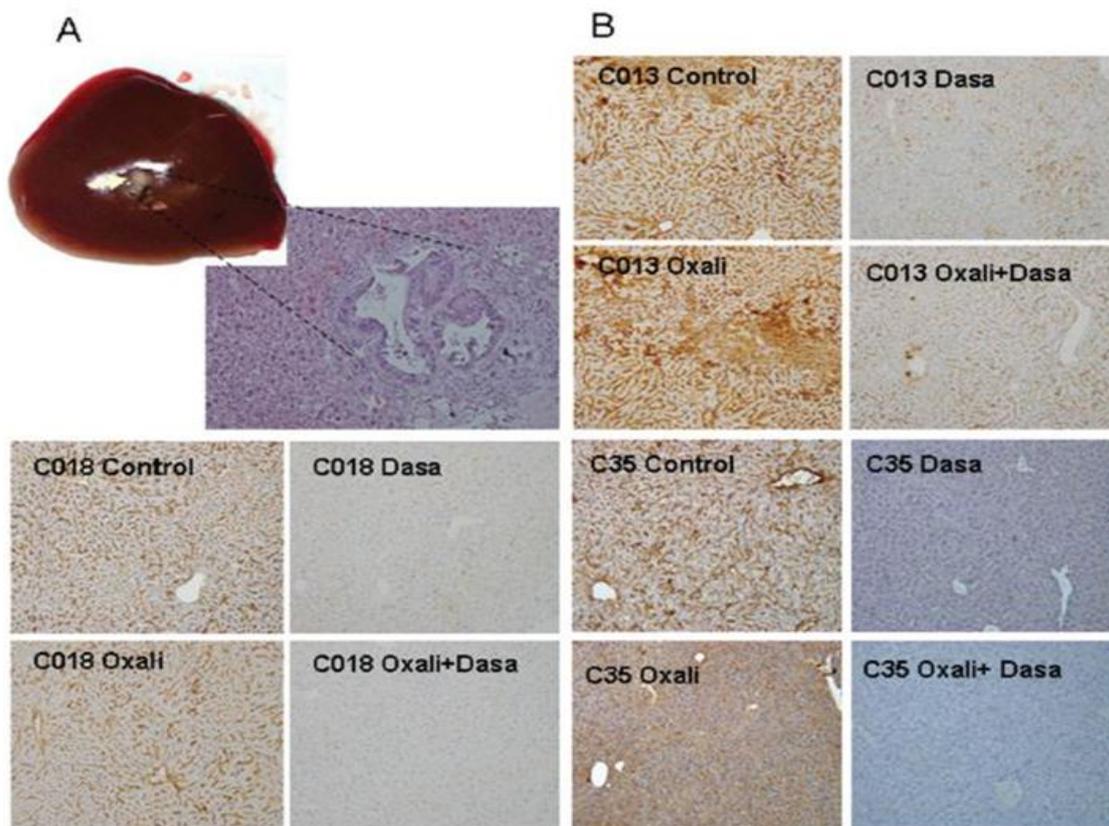


Figura 44. Implante ortotópico de metástasis colorrectal humana creciendo en hígado de ratón al principio del tratamiento. Las 4 metástasis hepáticas colorrectales se implantaron ortotópicamente en el hígado de ratón y se dejaron crecer 15 días. Tras ese tiempo sacrificamos un ratón de cada cohorte para examinar el crecimiento del tumor. **A)** La figura muestra una representación macroscópica por inmunohistoquímica del tumor creciendo (líneas) y el mismo tumor creciendo en hígado. **B)** Valoración por inmunohistoquímica de la expresión de p-SRC (fosforilación en la tirosina 418) en los varios subgrupos de tratamiento (Control, Dasatinib, Oxaliplatino y Oxaliplatino+Dasatinib).

Sin embargo, observamos una clara y estadísticamente significativa mejoría en la supervivencia de los ratones con alto niveles de p-SRC tratados con la combinación de Dasatinib más Oxaliplatino. Además en algunos casos, como el C35 y C36, observábamos una remisión total de la enfermedad tumoral, (Figura 45A). Esta mejoría en supervivencia no se observaba en los ratones con bajos niveles de p-SRC. El análisis del tamaño tumoral al final del experimento ponía en evidencia un volumen tumoral similar, aunque heterogéneo, sugiriendo que la supervivencia era determinada por el volumen tumoral. (Figura 46). Además comprobamos que el aumento de eficacia al tratamiento con Oxaliplatino inducido por la co-suministración de Dasatinib, observados en los ratones con metástasis hepática colorrectal, era específico para el Oxaliplatino. Realizando el mismo experimento con 5FU, otro compuesto en uso en estadios avanzado de cáncer colorrectal, no observamos una mejoría en supervivencia entre los ratones que habían recibido 5FU y los que habían recibido la combinación de los dos tratamientos, 5-FU más Dasatinib (Figura 45B).

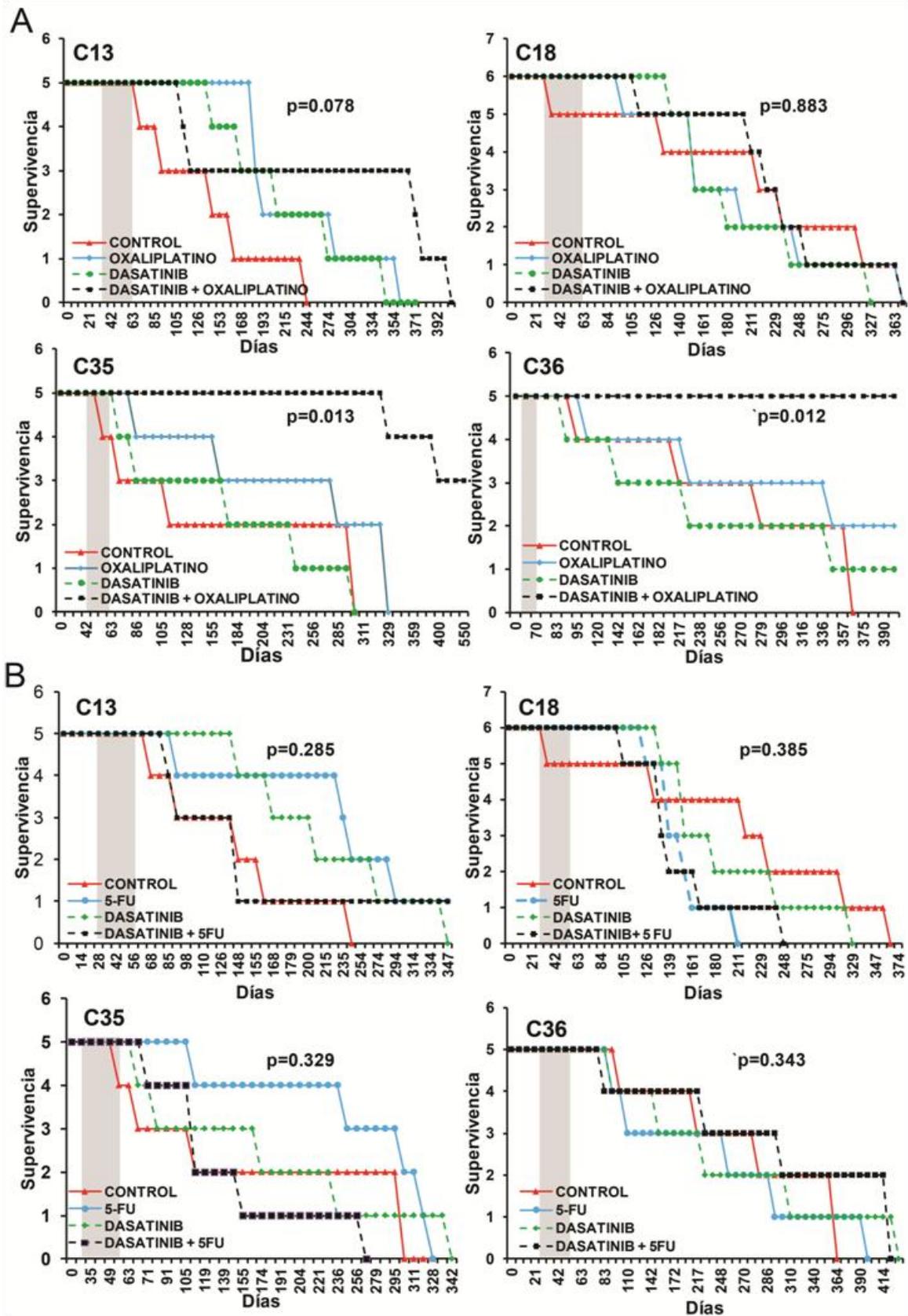


Figura 45. Curvas de supervivencia de la cohorte de ratones tratados. **A)** Cohorte de ratones tratados: Control (rojo), Oxaliplatino (azul), Dasatinib (verde) Dasatinib + Oxaliplatino (negro). **(B)** Cohorte de ratones tratados: Control (rojo), 5FU (azul), Dasatinib (verde) Dasatinib + 5FU (negro). La barra gris vertical indica el tiempo de tratamiento.

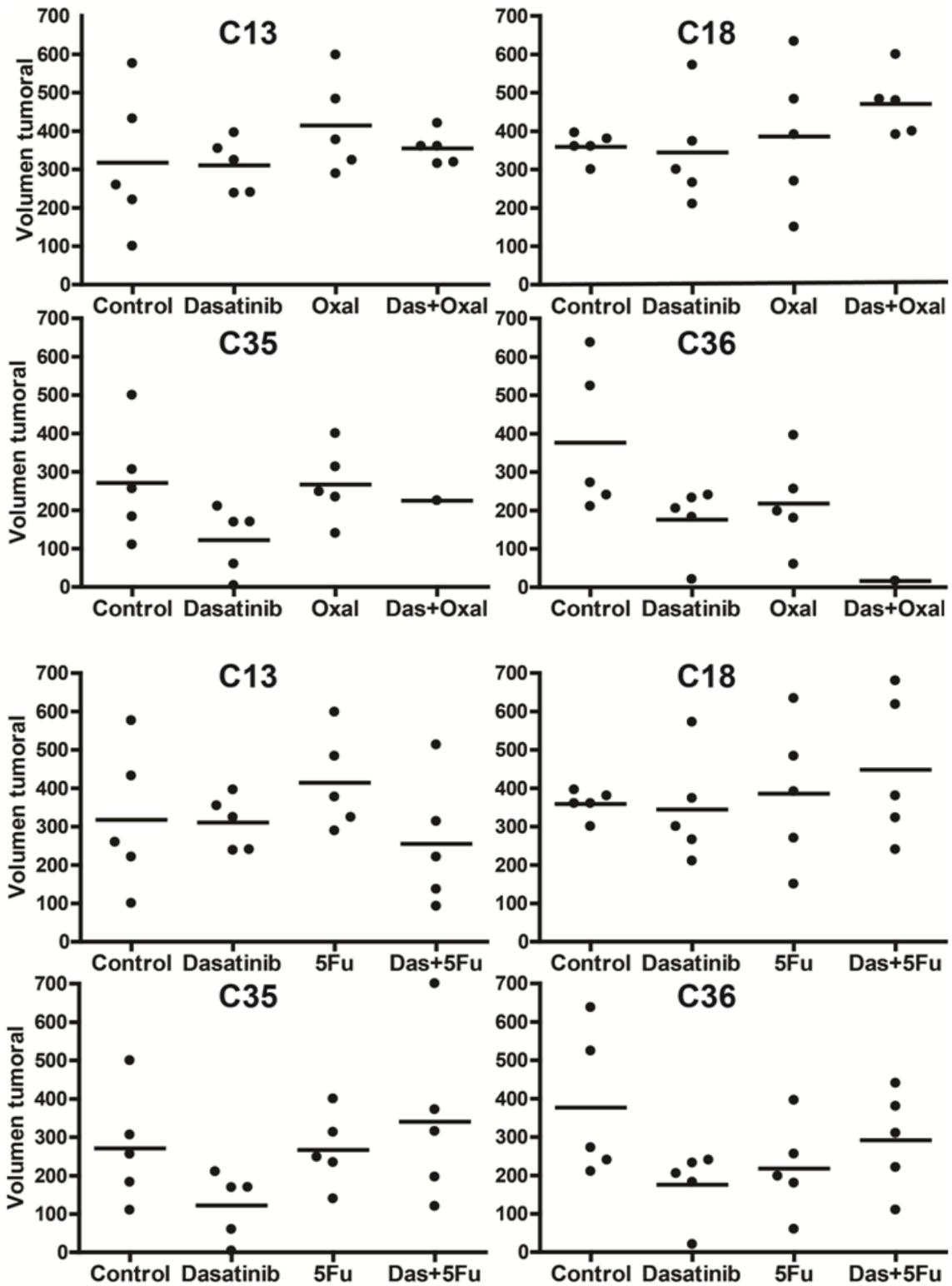


Figura 46. Representación del tamaño tumoral al final del experimento. Se representa volumen tumoral medio de los subgrupos de tratamiento. Cada punto representa el volumen tumoral de un ratón.

Discusión

28. Discusión

A pesar de todos los esfuerzos en la caracterización molecular de los múltiples tipos de tumores, y del desarrollo de terapias cada vez más dirigidas a una diana específica, aun se necesitan más avances en el tratamiento del cáncer. Parte de esos avances deberían centrarse en el descubrimiento de nuevos agentes antineoplásicos y en la identificación de biomarcadores que sean realmente predictivos de respuesta. Todo ello requiere una plataforma preclínica que reproduzca lo más posible la heterogeneidad tumoral y en la cual el ensayo de fármacos pueda ser realmente predictivo de la actividad esperada en humanos. Por esa razón nuestros primeros esfuerzos se han centrado en la realización de plataformas tumorales (modelos PDX), obtenidas a través de la implantación de las biopsias humanas en ratones desnudos, y en asegurarnos que los modelos generados mantuviesen las mismas características fenotípicas, morfológicas y genéticas de los tumores de origen. Los modelos PDX (de sarcomas y de metástasis hepáticas colorrectales) establecidos durante el periodo de tesis han sido caracterizados fenotípicamente y genéticamente para confirmar la similitud al tumor humano de origen. Los análisis de inmunohistoquímica, los análisis mutacionales y el análisis del perfil transcriptómico han demostrado que los modelos PDX generados son prácticamente idénticos al tumor primario de origen, confirmándose así como una herramienta idónea para el fin propuesto al principio del trabajo.

28.1. La eficacia de la inhibición de CDK4 en sarcoma depende de los niveles de ARNm de *CDK4* y *p16*

Los inhibidores de CDK4 muestran actividad *in vitro* frente a una gran variedad de cánceres y actividad antitumoral en pacientes con cáncer de mama, o líneas celulares de linfomas, sarcomas y otros tumores [68, 122-124]. Actualmente se están produciendo muchos esfuerzos para identificar biomarcadores de respuesta a tratamientos y para lograr entender los mecanismos que están detrás de la resistencia a los inhibidores de CDK4 [68, 123]. Estudiamos el efecto de la inhibición de CDK4 en sarcomas, un tipo tumoral con limitadas opciones terapéuticas, examinando el efecto de un inhibidor de CDK4, el Palbociclib, en un panel de líneas celulares de sarcomas y en nuestros modelos PDX. Observamos que el tratamiento de esos sarcomas con Palbociclib correlacionaba con los niveles de ARNm de *CDK4* y de *p16*, de forma que los tumores que expresan altos niveles de ARNm de *CDK4* medio/bajos de *p16*, y no los que expresan bajos niveles de ARNm de *CDK4* y altos de *p16*, respondían al tratamiento.

Por otro lado observamos que *CDK4-R24C*, un mutante presente en los tumores humanos que no es inhibido por los miembros de la familia de INK4 (p15, p16, p18, p19), resultaba más resistente al tratamiento. Los mecanismos que están detrás de este resultado no son del todo claros. Palbociclib se une al complejo CICLINA-CDK4/6 [125, 126]. Es posible que la mutación en R24C de CDK4 altere la conformación del dominio de enlace para el ATP determinando una disminución de la afinidad de Palbociclib por el mutante de *CDK4*. Creemos que son necesarios estudios cristalográficos que analicen la unión entre el compuesto y el mutante o el WT para sacar una conclusión correcta.

Ha sido descrito en la literatura que la eficacia en la inhibición de CDK4 requiere que el tumor exprese un pRb que funcione [63, 127]. La pérdida de pRb determina que la proliferación celular sea independiente de CDK4/6 y determina por tanto un mecanismo de resistencia a los inhibidores de CDK4/6. Por otro lado han sido descritos que algunas líneas celulares que expresan una función normal de pRb, resultan resistentes a la inhibición de CDK4/6, indicando por lo tanto que existen otros mecanismos de escape [68, 128]. En este sentido el aumento de los niveles de *p16* podría servir como un marcador de deficiencia en pRb [128, 129]. Nuestros estudios *in vivo* han sugerido que el alto nivel de *p16* es un marcador de peor respuesta a Palbociclib, incluso en presencia de pRb activo, como se ha demostrado por las diferentes fosforilaciones (Figura 22). Hemos encontrado un claro patrón de respuesta a los inhibidores de CDK4. Encontramos que los 2 sarcomas que expresaban altos niveles de *CDK4* (S11 y S16) respondían al tratamiento, mientras los dos que expresaban altos niveles de *p16* y niveles normales de *CDK4* (S23 Y S27) mostraban poca respuesta al tratamiento. Sin embargo, entre los tumores con niveles normales de *CDK4*, pero bajo de *p16*, observamos una cierta heterogeneidad, con uno de ellos que parecía responder al tratamiento (MPNST-S14), mientras el otro no (Leiomiomasarcoma-S29). Al mismo tiempo esos dos tumores mostraban niveles de KI67 diferentes, de forma que la respuesta de esos tumores no resultó fácil de analizar. Es posible que los leiomiomasarcomas en general, o ese tumor en particular, sean refractarios al tratamiento con Palbociclib *in vivo*. Es también posible que bajo algunas condiciones moleculares (niveles normales de *CDK4*, medio/bajos de *CICLINA* y bajos de *p16*) la respuesta sea peor que en la condición de total ausencia de *p16*.

Además, aunque no observamos una correlación con el tejido de origen en las líneas celulares, constatamos que los 2 tumores que respondían eran ambos mixofibrosarcomas y los 2 que claramente no respondían eran sarcomas pleomorficos, sugiriendo una posible correlación entre la respuesta y el subtipo histológico del tumor.

Para confirmar esa hipótesis se necesitarían más experimentos en una cohorte más amplia de esos tumores. En línea con los resultados obtenidos con el tumor S14 (MPNST), merece la pena mencionar que esos tumores son sensibles a Sorafenib, probablemente debido a la inhibición de MEK y ERK, la supresión de CICLINA D1, y la hipofosforilación de pRb en el sitio específico para CDK4 que conlleva al paro del ciclo celular [130]. Esta evidencia sugiere que Sorafenib, inhibiendo la ruta de MAPK, inhibiría CDK4 indicando que Palbociclib podría servir como nueva herramienta terapéutica en los MPNST.

Buscando posibles mecanismos de resistencia analizamos los niveles proteicos de p16, de pRb y de varias proteínas con implicación en el ciclo celular y observamos que, en las líneas celulares, no había ninguna correlación entre la respuesta al fármaco y la expresión de p16 (Figura 9), además detectábamos pRb en todos los tumores (Figura 20 y 22). Por otro lado no observábamos un claro incremento de pRb ni de p16 en los tumores que volvían a crecer tras el tratamiento, indicando que existía otro mecanismo de resistencia. Fue interesante encontrar un aumento de expresión de p21 en los tumores tratados frente a los tumores no tratados (Figura 22). No sabemos si este incremento ha contribuido a parar el ciclo celular ralentizando el crecimiento del tumor o si solamente ha acompañado el recrecimiento del tumor

Es posible que Palbociclib pueda ser aplicado a diferentes subtipos histológicos de sarcomas, especialmente a los que expresan altos niveles de *CDK4* y bajos niveles de *p16*. Datos similares han sido reportados recientemente para el dermatofibrosarcoma protuberans [75], además un incremento de actividad de CDK4 debido a una mutación activadora, a amplificación génica, o a la inhibición de los señales de inhibición de CDK4 a través del silenciamiento de *p16* han sido sugeridos como eventos causantes la iniciación y promoción tumoral. De hecho, la amplificación de *CDK4* ha sido descrita en sarcomas, glioblastomas y cáncer de mama [131, 132], mientras que la activación de *CDK4* por mutación ha sido reportada en melanoma [133].

La presencia de mutaciones activadoras en CDK4 han sido menos frecuentemente asociadas en tumores que la amplificación de CDK4. Nuestros datos sugieren que los sarcomas que presentan mutaciones activadoras no son candidatos para el tratamiento con Palbociclib. A día de hoy no se ha descrito de forma fehaciente como las alteraciones en CDK4 pueden predecir la respuesta a los inhibidores de CDK4, y queda por aclarar la asociación entre aumento de actividad de CDK4 y la sensibilidad al fármaco. Por otro lado la pérdida de *p16* ha sido consistentemente asociada a la sensibilidad al tratamiento con esos inhibidores. Estudios preclínicos en liposarcomas han sugerido que la amplificación de *CDK4* puede predecir un aumento

de respuesta a los inhibidores de CDK4 [71, 72, 134], sin embargo en glioblastomas y melanomas, la amplificación o sobreexpresión de CDK4 ha sido asociada a resistencia al tratamiento o no ha mostrado ninguna asociación [135]. Nuestros datos han evidenciado una correlación directa entre los niveles de ARNm de *CDK4* y la respuesta a los inhibidores de CDK4. Hay que remarcar que los inhibidores de CDK4 no deberían mostrar eficacia en tumores en los que falta Rb activa o que muestran sobreexpresión de p16. Para dar fuerza a los datos que hemos obtenidos hay que destacar un ensayo clínico de fase II en pacientes con liposarcomas, que ha demostrado que el tratamiento con Palbociclib se asociaba a una mejoría en supervivencia libre de progresión en tumores que expresaban pRb y tenían una amplificación de *CDK4* [136].

En resumen, nuestros datos apoyan la eficacia de los inhibidores de CDK4 en los sarcomas que muestren una sobreexpresión de ARNm de *CDK4* y bajos niveles de ARNm de *p16* son predictivos de poca eficacia con Palbociclib. Por otro lado, hemos mostrado que los tumores que presentan la mutación activadora *CDK4-R24C* son más resistentes a Palbociclib, pero podrían ser candidatos al tratamiento con otros inhibidores de CDK4, con otro mecanismo de acción. En definitiva nuestros datos dan fuerza a los datos publicados previamente en la idoneidad de la inhibición de CDK4 para los tumores ciclo celular dependientes y apoyan el uso de nuevos ensayos clínicos dirigidos para otros tipos de sarcomas.

Hay que destacar que este trabajo ha dado lugar al ensayo clínico de fase II multicéntrico de “Palbociclib en segunda línea de sarcomas avanzados con sobreexpresión CDK4” (GEIS-51 -Número EudraCT: 2016-004039-19).

28.2. Eficacia del tratamiento con Bortezomib en sarcomas con altos niveles de MAP17 (PDZK1IP1)

MAP17 es una proteína sobreexpresada en gran parte de los tumores en estadios avanzados (estadio II y III), y no expresada en tejidos normales o en tumores en estadios tempranos. MAP17 puede ser considerada un biomarcador independiente de malignidad. En nuestro laboratorio habíamos mostrado previamente que la sobreexpresión de MAP17 correlacionaba con el estadio tumoral en tumores de ovarios, de cérvix, de laringe y próstata [80, 86]. Además, que las células de carcinoma mamario, pero no las células epiteliales normales, que expresan MAP17, mostraban un incremento en la capacidad tumorigenica caracterizada por un aumento

en la capacidad de proliferación [86]. El aumento en las propiedades proliferativas inducidas por MAP17 está asociado a un aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), y el tratamiento de las células que sobreexpresan MAP17 con antioxidantes conlleva a una reducción de su capacidad tumorigénica [80]. Además mostramos previamente que la inhibición de ROS con tratamientos antioxidantes inhibía también el efecto de MAP17 en la activación de NFκB y autofagia, restaurando así la resistencia a Bortezomib e indicando que las especies reactivas de oxígeno están involucradas en ese proceso [92].

Establecido así el papel de MAP17 en cáncer y habiendo observado que su sobreexpresión correlacionaba con alto grado tumoral y poca diferenciación en varios tipos de cánceres, hipotetizamos que terapias que puedan contrarrestar el efecto inducido por MAP17 podrían conducir a una aplicación prometedora en el tratamiento de los sarcomas con mal pronóstico. En principio analizamos la expresión de MAP17 en sarcomas humanos y observamos que un 40% de ellos tenían alta expresión, además estos pacientes presentaban peor pronóstico independientemente del subtipo histológico. (Figura 26). Observamos además que las líneas celulares de sarcoma y los modelos PDX *in vivo* con altos niveles de MAP17 respondían a Bortezomib (Figura 27A y 30), un inhibidor del proteosoma que ha sido ya aprobado para el tratamiento de mieloma múltiple y linfomas de células del manto [137, 138].

Ya que en trabajos previos habíamos observado que MAP17 determinaba la sensibilidad a Bortezomib en células de tumores de mama, inhibiendo el efecto citoprotector mediado por la activación de NFκB y la autofagia, hipotetizamos que altos niveles de MAP17 podrían ser usados para seleccionar pacientes con sarcomas para los que ese tratamiento no está indicado. Encontramos que MAP17 incrementaba la sensibilidad en sarcoma y que correlacionaba con los niveles de NFκB fosforilados y con mecanismos de autofagia, medidos como niveles de p62/LC3II (Figura 30, 31, 32), confirmando así la relevancia de esas dos rutas.

Por lo tanto la inhibición de la autofagia y de la ruta de NFκB podría cooperar con Bortezomib en la respuesta en sarcomas. En esta línea podría ser interesante comprobar si la respuesta a Bortezomib o a otro inhibidor del proteosoma [139], en combinación con autofagia o con inhibidores de NFκB, en sarcomas que expresen MAP17.

Al día de hoy han comenzado varios ensayos clínicos con Bortezomib en monoterapia o en combinación con otros tratamientos en pacientes con sarcomas [140, 141] y podría ser interesante analizar además los resultados de los ensayos clínicos en relación a la expresión de MAP17. Por otro lado, en ese trabajo observamos que MAP17 es un marcador de peor supervivencia libre de progresión

independientemente del subtipo tumoral. Así mismo MAP17 no tiene ningún papel en la respuesta a los tratamientos comunes (Figura 24 y 25).

El tratamiento de los sarcomas incluye la cirugía y/o radioterapia, siendo esta última una modalidad de tratamiento usada como adyuvante en combinación con otros tratamientos sistémicos. Los pacientes con enfermedad metastásica se tratan con quimioterapia, generalmente Doxorubicina más Ifosfamida [45]. Al día de hoy no tenemos suficiente información para estudiar el papel de MAP17 como marcador pronóstico en los tumores no resecables tratados con radioterapia o en combinación con otra quimioterapia (ej. Ifosfamida), pero sin duda merece la atención investigarlo.

En definitiva, nuestros resultados aportan evidencia de que algunos pacientes con sarcomas (los que sobreexpresan MAP17) podrían beneficiarse del tratamiento con Bortezomib. En especial podría aplicarse para pacientes en segunda o tercera línea de tratamiento, que al día de hoy tienen limitadas opciones terapéuticas.

28.3. Dasatinib sensibiliza al tratamiento con Oxaliplatino las metástasis hepáticas de cáncer colorrectal que sobreexpresen altos niveles de p-SRC

A pesar de los avances en el desarrollo de nuevos agentes quimioterápicos, el cáncer colorrectal sigue siendo esencialmente una enfermedad incurable, ya que todos los pacientes acaban desarrollando resistencia al tratamiento con resultado de progresión de la enfermedad y muerte. Por lo tanto, se necesitan nuevas estrategias terapéuticas que resensibilicen los tumores a esos tratamientos. Con este fin, en el presente trabajo hemos demostrado que uno de los mediadores de sensibilidad/resistencia a Oxaliplatino es la tirosina quinasa SRC. Además, el efecto sensibilizador de p-SRC es específico para Oxaliplatino y no afecta a la respuesta a otro tratamiento comunemente usado en el tratamiento del cáncer colorrectal, como el 5 Fluorouracilo. Observamos además que p-SRC (fosforilación en la tirosina 419) es un buen biomarcador para predecir la capacidad de Dasatinib en resensibilizar a Oxaliplatino *in vivo*.

Dasatinib es un inhibidor de SRC/ABL, que actúa también para otras proteínas de la familia de las quinasa de SRC y receptores de las tirosinas quinasa como c-KIT, PDGFR α , PDGFR β , que ha sido ya aprobado para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y leucemia linfoblástica aguda positiva por el cromosoma Philadelphia [142]. Al día de hoy, el uso en monoterapia para tumores sólidos no ha mostrado aun resultados prometedores [143, 144]. Sin embargo el uso de inhibidores de SRC en combinación con otros tratamientos antitumorales parece ser más alentador.

Actualmente están en marcha varios ensayos clínicos para evaluar esas

combinaciones en tumores sólidos y en metástasis hepáticas colorrectales, que facilitarán la comprensión del mecanismo de este enfoque terapéutico [113, 145].

Nuestros datos *in vivo* han evidenciado que la combinación de Dasatinib y Oxaliplatino, en modelos murinos (PDX) de metástasis hepática colorrectal, reduce el crecimiento tumoral frente a los ratones tratados en monoterapia con Oxaliplatino (Figura 45A).

Está probado que el Oxaliplatino activa SRC a través de un mecanismo dependiente de ROS y que Dasatinib media la inhibición de SRC sensibilizando las células a Oxaliplatino [146]. Nuestros datos *in vivo* e *in vitro*, muestran que la inhibición de SRC es efectiva solo en las metástasis hepáticas colorrectales con altos niveles de p-SRC (fosforilación en la tirosina 419), que además está correlacionado con un incremento de actividad de MAPK. Por otro lado, se ha descrito que en las metástasis hepáticas colorrectales, las mutaciones en *KRAS* son un biomarcador predictivo de resistencia a Cetuximab. También se ha visto que, en líneas celulares de cáncer colorrectal, el tratamiento con Dasatinib es más eficaz que Cetuximab, y que la combinación de ambos compuestos muestra mejores efectos antiproliferativos *in vivo* e *in vitro* [147, 148]. Coherente con esos datos, hemos observado en nuestros modelos *in vivo* y en nuestros experimentos *in vitro*, que la presencia de mutaciones en *KRAS* no tiene relevancia en la capacidad de Dasatinib de quimiosensibilizar los tumores a Oxaliplatino. También observamos que Dasatinib no tenía ningún efecto sobre la sensibilización a otro tratamiento de primera elección en cáncer colorrectal, el 5-FU. No sabemos el mecanismo molecular del porqué Dasatinib no sensibiliza los tumores al tratamiento con 5-FU, es posible que los altos niveles de ROS inducido por 5-FU puedan influenciar la respuesta activando aun más SRC [149]. Este aumento en activación podría hacer las células aun más dependientes de la actividad de SRC, generando un mecanismo de supervivencia a través de un mecanismo de adicción oncogénica.

Resumiendo, Dasatinib sensibiliza las metástasis hepáticas colorrectales a Oxaliplatino en modelos PDX, y su efecto es visible solo en los tumores que expresan altos niveles de p-SRC (fosforilación en la tirosina 419). Como resultado podríamos afirmar que altos niveles de fosforilación de SRC pueden considerarse un buen marcador pronóstico y predictivos, de fácil aplicación en ensayos clínicos en curso.

28.4. Perspectivas futuras

Los modelos PDX han demostrado mantener las características fenotípicas y genéticas del tumor original y reflejar la patología tumoral, su crecimiento y la evolución de la enfermedad. En el presente trabajo hemos generado varios modelos

PDX de sarcomas y de metástasis hepática colorrectal, con la finalidad de encontrar biomarcadores que nos permitieran sensibilizar los tumores a tratamientos en uso en la medicina oncológica y poder buscar nuevas opciones terapéuticas. Nuestros resultados han puesto en evidencia la importancia de la caracterización molecular de los tumores y de la búsqueda de biomarcadores de resistencia y/o sensibilidad a los tratamientos, para un correcto abordaje terapéutico en la medicina del cáncer. Durante la realización de este trabajo hemos identificado nuevas posibilidades terapéuticas en el tratamiento de los sarcomas y un marcador de sensibilidad a un tratamiento en uso en el cáncer colorrectal. Además uno de nuestros trabajos ha dado lugar a un ensayo clínico de fase II en segunda línea de sarcomas avanzados que quizás podrá aplicarse para pacientes que al día de hoy no tienen ninguna opción terapéutica.

Podemos concluir afirmando que se hace necesario identificar más y mejores biomarcadores, que sean predictivos de respuesta, con el fin último de generar una mejora significativa en la personalización del cáncer que se traduzca en mejoras en perfil de toxicidad y en control de la enfermedad. Los modelos de xenoinjertos derivados de pacientes (PDX) y su alto potencial, clínicamente relevante, hace que se estén convirtiendo en una parte integral del proceso de desarrollo de fármacos y que deban considerarse como una herramienta esencial para el reto de la mejor personalización en cáncer.

Conclusiones

1. Los modelos PDX de sarcomas y de metástasis hepática de cáncer colorrectal generados en el presente trabajo son muy similares a los tumores primarios de origen, confirmándose así como una buena herramienta para estudiar la eficacia terapéutica.
2. El inhibidor de CDK4 Palbociclib ha mostrado eficacia en las líneas celulares y en nuestros modelos PDX de sarcomas con elevados niveles de *CDK4* y bajos niveles de *p16*, por lo tanto, los sarcomas que muestren una sobreexpresión de ARNm de *CDK4* y bajos niveles de ARNm de *p16* podrían ser candidatos al tratamiento con inhibidores de CDK4.
3. El 40% de los sarcomas presentan altos niveles de MAP17 al diagnóstico. Además los altos niveles de MAP17 son predictivos de peor pronóstico.
4. El inhibidor del proteasoma Bortezomib ha mostrado eficacia en las líneas celulares y en nuestros modelos PDX de sarcomas que presentan altos niveles de MAP17.
5. La sobreexpresión de p-SRC en líneas celulares y en modelos PDX de carcinoma colorrectal induce resistencia a Oxaliplatino pero no a 5-FU.
6. La inhibición farmacológica de p-SRC en las líneas celulares de cáncer colorrectal, así como en nuestros modelos PDX de metástasis hepática de cáncer colorrectal determina una sensibilización al tratamiento con Oxaliplatino. La combinación de los dos tratamientos solo es eficaz cuando los niveles de p-SRC son elevados.

Bibliografía

- [1] Dancey JE, Bedard PL, Onetto N, Hudson TJ. The genetic basis for cancer treatment decisions. *Cell* 2012;148:409-20.
- [2] Garraway LA. Genomics-driven oncology: framework for an emerging paradigm. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2013;31:1806-14.
- [3] Ely S. Personalized medicine: individualized care of cancer patients. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 2009;154:303-8.
- [4] Clement-Duchene C, Wakelee H. Antiangiogenic agents and vascular disrupting agents for the treatment of lung cancer: a review. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2010;5:129-39.
- [5] Fasolo A, Sessa C. Translational research in phase I trials. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* 2009;11:580-8.
- [6] Karpel-Massler G, Schmidt U, Unterberg A, Halatsch ME. Therapeutic inhibition of the epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas: where do we stand? *Molecular cancer research : MCR* 2009;7:1000-12.
- [7] Zahorowska B, Crowe PJ, Yang JL. Combined therapies for cancer: a review of EGFR-targeted monotherapy and combination treatment with other drugs. *Journal of cancer research and clinical oncology* 2009;135:1137-48.
- [8] Eichhorn PJ, Gili M, Scaltriti M, Serra V, Guzman M, Nijkamp W, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase hyperactivation results in lapatinib resistance that is reversed by the mTOR/phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BEZ235. *Cancer research* 2008;68:9221-30.
- [9] Serra V, Markman B, Scaltriti M, Eichhorn PJ, Valero V, Guzman M, et al. NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer research* 2008;68:8022-30.

- [10] Moneo V, Serelde BG, Fominaya J, Leal JF, Blanco-Aparicio C, Romero L, et al. Extreme sensitivity to Yondelis (Trabectedin, ET-743) in low passaged sarcoma cell lines correlates with mutated p53. *Journal of cellular biochemistry* 2007;100:339-48.
- [11] Moneo V, Serelde BG, Leal JF, Blanco-Aparicio C, Diaz-Uriarte R, Aracil M, et al. Levels of p27(kip1) determine Aplidin sensitivity. *Molecular cancer therapeutics* 2007;6:1310-6.
- [12] Dempke WC, Heinemann V. Resistance to EGF-R (erbB-1) and VEGF-R modulating agents. *European journal of cancer* 2009;45:1117-28.
- [13] Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L. Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2003;9:4227-39.
- [14] Rubio-Viqueira B, Hidalgo M. Direct in vivo xenograft tumor model for predicting chemotherapeutic drug response in cancer patients. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2009;85:217-21.
- [15] Venditti JM, Wesley RA, Plowman J. Current NCI preclinical antitumor screening in vivo: results of tumor panel screening, 1976-1982, and future directions. *Advances in pharmacology and chemotherapy* 1984;20:1-20.
- [16] Staquet MJ, Byar DP, Green SB, Rozenzweig M. Clinical predictivity of transplantable tumor systems in the selection of new drugs for solid tumors: reply to a commentary. *Cancer treatment reports* 1985;69:1339-40.
- [17] DeVita VT, Schein PS. The use of drugs in combination for the treatment of cancer: rationale and results. *The New England journal of medicine* 1973;288:998-1006.
- [18] Canellos GP, DeVita VT, Whang-Peng J, Chabner BA, Schein PS, Young RC. Chemotherapy of the blastic phase of chronic granulocytic leukemia: hypodiploidy and response to therapy. *Blood* 1976;47:1003-9.

- [19] Rozenzweig M, Von Hoff DD, Staquet MJ, Schein PS, Penta JS, Goldin A, et al. Animal toxicology for early clinical trials with anticancer agents. *Cancer clinical trials* 1981;4:21-8.
- [20] Shoemaker RH, Abbott BJ, Macdonald MM, Mayo JG, Venditti JM, Wolpert-DeFilippes MK. Use of the KB cell line for in vitro cytotoxicity assays. *Cancer treatment reports* 1983;67:97.
- [21] Shoemaker RH, Monks A, Alley MC, Scudiero DA, Fine DL, McLemore TL, et al. Development of human tumor cell line panels for use in disease-oriented drug screening. *Progress in clinical and biological research* 1988;276:265-86.
- [22] Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer research* 1988;48:589-601.
- [23] Shoemaker RH, Scudiero DA, Melillo G, Currens MJ, Monks AP, Rabow AA, et al. Application of high-throughput, molecular-targeted screening to anticancer drug discovery. *Current topics in medicinal chemistry* 2002;2:229-46.
- [24] Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, et al. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* 1990;82:1113-8.
- [25] Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, Rubinstein LV, Venditti JM, Schepartz S, et al. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *British journal of cancer* 2001;84:1424-31.
- [26] Rubio-Viqueira B, Jimeno A, Cusatis G, Zhang X, Iacobuzio-Donahue C, Karikari C, et al. An in vivo platform for translational drug development in pancreatic cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006;12:4652-61.
- [27] Fiebig HH, Neumann HA, Henss H, Koch H, Kaiser D, Arnold H. Development of three human small cell lung cancer models in nude mice. *Recent results in cancer*

research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer 1985;97:77-86.

[28] Houghton JA, Houghton PJ, Green AA. Chemotherapy of childhood rhabdomyosarcomas growing as xenografts in immune-deprived mice. *Cancer research* 1982;42:535-9.

[29] Calles A, Rubio-Viqueira B, Hidalgo M. Primary human non-small cell lung and pancreatic tumorgraft models--utility and applications in drug discovery and tumor biology. *Current protocols in pharmacology / editorial board*, SJ Enna 2013;Chapter 14:Unit 14 26.

[30] Siolas D, Hannon GJ. Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. *Cancer research* 2013;73:5315-9.

[31] Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, et al. Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nature reviews Clinical oncology* 2012;9:338-50.

[32] Kim MP, Evans DB, Wang H, Abbruzzese JL, Fleming JB, Gallick GE. Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Nature protocols* 2009;4:1670-80.

[33] Kreso A, O'Brien CA, van Galen P, Gan OI, Notta F, Brown AM, et al. Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer. *Science* 2013;339:543-8.

[34] Keysar SB, Astling DP, Anderson RT, Vogler BW, Bowles DW, Morton JJ, et al. A patient tumor transplant model of squamous cell cancer identifies PI3K inhibitors as candidate therapeutics in defined molecular bins. *Molecular oncology* 2013;7:776-90.

[35] Dong X, Guan J, English JC, Flint J, Yee J, Evans K, et al. Patient-derived first generation xenografts of non-small cell lung cancers: promising tools for predicting drug responses for personalized chemotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010;16:1442-51.

[36] Cutz JC, Guan J, Bayani J, Yoshimoto M, Xue H, Sutcliffe M, et al. Establishment in severe combined immunodeficiency mice of subrenal capsule xenografts and transplantable tumor lines from a variety of primary human lung cancers: potential models for studying tumor progression-related changes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006;12:4043-54.

[37] Wang Y, Revelo MP, Sudilovsky D, Cao M, Chen WG, Goetz L, et al. Development and characterization of efficient xenograft models for benign and malignant human prostate tissue. *The Prostate* 2005;64:149-59.

[38] Cleary AS, Leonard TL, Gestl SA, Gunther EJ. Tumour cell heterogeneity maintained by cooperating subclones in Wnt-driven mammary cancers. *Nature* 2014;508:113-7.

[39] Bashashati A, Ha G, Tone A, Ding J, Prentice LM, Roth A, et al. Distinct evolutionary trajectories of primary high-grade serous ovarian cancers revealed through spatial mutational profiling. *The Journal of pathology* 2013;231:21-34.

[40] Fleming JM, Miller TC, Meyer MJ, Ginsburg E, Vonderhaar BK. Local regulation of human breast xenograft models. *Journal of cellular physiology* 2010;224:795-806.

[41] Maley CC, Galipeau PC, Finley JC, Wongsurawat VJ, Li X, Sanchez CA, et al. Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma. *Nature genetics* 2006;38:468-73.

[42] Helman LJ, Meltzer P. Mechanisms of sarcoma development. *Nature reviews Cancer* 2003;3:685-94.

[43] Mackall CL, Meltzer PS, Helman LJ. Focus on sarcomas. *Cancer cell* 2002;2:175-8.

[44] Taylor BS, Barretina J, Maki RG, Antonescu CR, Singer S, Ladanyi M. Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. *Nature reviews Cancer* 2011;11:541-57.

[45] Singer S, Demetri GD, Baldini EH, Fletcher CD. Management of soft-tissue sarcomas: an overview and update. *The Lancet Oncology* 2000;1:75-85.

[46] Svancarova L, Blay JY, Judson IR, van Hoesel QG, van Oosterom AT, le Cesne A, et al. Gemcitabine in advanced adult soft-tissue sarcomas. A phase II study of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *European journal of cancer* 2002;38:556-9.

[47] Nielsen OS, Judson I, van Hoesel Q, le Cesne A, Keizer HJ, Blay JY, et al. Effect of high-dose ifosfamide in advanced soft tissue sarcomas. A multicentre phase II study of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *European journal of cancer* 2000;36:61-7.

[48] Izbicka E, Lawrence R, Raymond E, Eckhardt G, Faircloth G, Jimeno J, et al. In vitro antitumor activity of the novel marine agent, ecteinascidin-743 (ET-743, NSC-648766) against human tumors explanted from patients. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 1998;9:981-7.

[49] Le Cesne A, Blay JY, Judson I, Van Oosterom A, Verweij J, Radford J, et al. Phase II study of ET-743 in advanced soft tissue sarcomas: a European Organisation for the Research and Treatment of Cancer (EORTC) soft tissue and bone sarcoma group trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:576-84.

[50] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.

[51] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.

[52] Gil J, Peters G. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nature reviews Molecular cell biology* 2006;7:667-77.

[53] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle kinases in cancer. *Current opinion in genetics & development* 2007;17:60-5.

[54] Sabah M, Cummins R, Leader M, Kay E. Aberrant expression of the Rb pathway proteins in soft tissue sarcomas. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM* 2006;14:397-403.

- [55] Puyol M, Martin A, Dubus P, Mulero F, Pizcueta P, Khan G, et al. A synthetic lethal interaction between K-Ras oncogenes and Cdk4 unveils a therapeutic strategy for non-small cell lung carcinoma. *Cancer cell* 2010;18:63-73.
- [56] Drosten M, Dhawahir A, Sum EY, Urosevic J, Lechuga CG, Esteban LM, et al. Genetic analysis of Ras signalling pathways in cell proliferation, migration and survival. *The EMBO journal* 2010;29:1091-104.
- [57] Yu Q, Sicinska E, Geng Y, Ahnstrom M, Zagozdzon A, Kong Y, et al. Requirement for CDK4 kinase function in breast cancer. *Cancer cell* 2006;9:23-32.
- [58] Robles AI, Rodriguez-Puebla ML, Glick AB, Trempus C, Hansen L, Sicinski P, et al. Reduced skin tumor development in cyclin D1-deficient mice highlights the oncogenic ras pathway in vivo. *Genes & development* 1998;12:2469-74.
- [59] Tetsu O, McCormick F. Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition. *Cancer cell* 2003;3:233-45.
- [60] Miliani de Marval PL, Macias E, Rounbehler R, Sicinski P, Kiyokawa H, Johnson DG, et al. Lack of cyclin-dependent kinase 4 inhibits c-myc tumorigenic activities in epithelial tissues. *Molecular and cellular biology* 2004;24:7538-47.
- [61] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews Cancer* 2009;9:153-66.
- [62] Landis MW, Pawlyk BS, Li T, Sicinski P, Hinds PW. Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis. *Cancer cell* 2006;9:13-22.
- [63] Fry DW, Harvey PJ, Keller PR, Elliott WL, Meade M, Trachet E, et al. Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular cancer therapeutics* 2004;3:1427-38.
- [64] Rodriguez-Puebla ML, Miliani de Marval PL, LaCava M, Moons DS, Kiyokawa H, Conti CJ. Cdk4 deficiency inhibits skin tumor development but does not affect normal keratinocyte proliferation. *The American journal of pathology* 2002;161:405-11.

[65] Knudsen ES, Wang JY. Targeting the RB-pathway in cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010;16:1094-9.

[66] Kennedy AL, Vallurupalli M, Chen L, Crompton B, Cowley G, Vazquez F, et al. Functional, chemical genomic, and super-enhancer screening identify sensitivity to cyclin D1/CDK4 pathway inhibition in Ewing sarcoma. *Oncotarget* 2015;6:30178-93.

[67] Gallorini M, Cataldi A, di Giacomo V. Cyclin-dependent kinase modulators and cancer therapy. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 2012;26:377-91.

[68] Dickson MA. Molecular pathways: CDK4 inhibitors for cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014;20:3379-83.

[69] Lu J. Palbociclib: a first-in-class CDK4/CDK6 inhibitor for the treatment of hormone-receptor positive advanced breast cancer. *Journal of hematology & oncology* 2015;8:98.

[70] Saab R, Bills JL, Miceli AP, Anderson CM, Khoury JD, Fry DW, et al. Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 activity arrests proliferation in myoblasts and rhabdomyosarcoma-derived cells. *Molecular cancer therapeutics* 2006;5:1299-308.

[71] Zhang YX, Sicinska E, Czaplinski JT, Remillard SP, Moss S, Wang Y, et al. Antiproliferative effects of CDK4/6 inhibition in CDK4-amplified human liposarcoma in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics* 2014;13:2184-93.

[72] Dickson MA, Tap WD, Keohan ML, D'Angelo SP, Gounder MM, Antonescu CR, et al. Phase II trial of the CDK4 inhibitor PD0332991 in patients with advanced CDK4-amplified well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2013;31:2024-8.

[73] Logan JE, Mostofizadeh N, Desai AJ, E VONE, Conklin D, Konkankit V, et al. PD-0332991, a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinase 4/6, demonstrates

inhibition of proliferation in renal cell carcinoma at nanomolar concentrations and molecular markers predict for sensitivity. *Anticancer research* 2013;33:2997-3004.

[74] Wiedemeyer WR, Dunn IF, Quayle SN, Zhang J, Chheda MG, Dunn GP, et al. Pattern of retinoblastoma pathway inactivation dictates response to CDK4/6 inhibition in GBM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:11501-6.

[75] Eilers G, Czaplinski JT, Mayeda M, Bahri N, Tao D, Zhu M, et al. CDKN2A/p16 Loss Implicates CDK4 as a Therapeutic Target in Imatinib-Resistant Dermatofibrosarcoma Protuberans. *Molecular cancer therapeutics* 2015;14:1346-53.

[76] Malumbres M, Barbacid M. Is Cyclin D1-CDK4 kinase a bona fide cancer target? *Cancer cell* 2006;9:2-4.

[77] Rocca A, Farolfi A, Bravaccini S, Schirone A, Amadori D. Palbociclib (PD 0332991) : targeting the cell cycle machinery in breast cancer. *Expert opinion on pharmacotherapy* 2014;15:407-20.

[78] Collins I, Garrett MD. Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. *Current opinion in pharmacology* 2005;5:366-73.

[79] Kocher O, Cheresch P, Brown LF, Lee SW. Identification of a novel gene, selectively up-regulated in human carcinomas, using the differential display technique. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1995;1:1209-15.

[80] Guijarro MV, Link W, Rosado A, Leal JF, Carnero A. MAP17 inhibits Myc-induced apoptosis through PI3K/AKT pathway activation. *Carcinogenesis* 2007;28:2443-50.

[81] Pribanic S, Gisler SM, Bacic D, Madjdpour C, Hernando N, Sorribas V, et al. Interactions of MAP17 with the NaPi-IIa/PDZK1 protein complex in renal proximal tubular cells. *American journal of physiology Renal physiology* 2003;285:F784-91.

[82] Carnero A. MAP17 and the double-edged sword of ROS. *Biochimica et biophysica acta* 2012;1826:44-52.

[83] Jaeger C, Schaefer BM, Wallich R, Kramer MD. The membrane-associated protein pKe#192/MAP17 in human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* 2000;115:375-80.

[84] Lanaspá MA, Giral H, Breusegem SY, Halaihel N, Baile G, Catalan J, et al. Interaction of MAP17 with NHERF3/4 induces translocation of the renal Na/Pi IIa transporter to the trans-Golgi. *American journal of physiology Renal physiology* 2007;292:F230-42.

[85] Guijarro MV, Leal JF, Blanco-Aparicio C, Alonso S, Fominaya J, Lleónt M, et al. MAP17 enhances the malignant behavior of tumor cells through ROS increase. *Carcinogenesis* 2007;28:2096-104.

[86] Guijarro MV, Vergel M, Marín JJ, Muñoz-Galván S, Ferrer I, Ramón y Cajal S, et al. p38 α limits the contribution of MAP17 to cancer progression in breast tumors. *Oncogene* 2012;31:4447-59.

[87] Guijarro MV, Leal JF, Fominaya J, Blanco-Aparicio C, Alonso S, Lleónt M, et al. MAP17 overexpression is a common characteristic of carcinomas. *Carcinogenesis* 2007;28:1646-52.

[88] Pérez M, Praena-Fernández JM, Felipe-Abrió B, López-García MA, Lucena-Cacace A, García A, et al. MAP17 and SGLT1 protein expression levels as prognostic markers for cervical tumor patient survival. *PloS one* 2013;8:e56169.

[89] Carnero A. MAP17, a ROS-dependent oncogene. *Frontiers in oncology* 2012;2:112.

[90] de Miguel-Luken MJ, Chaves-Conde M, Carnero A. A genetic view of laryngeal cancer heterogeneity. *Cell cycle* 2016;15:1202-12.

[91] de Miguel-Luken MJ, Chaves-Conde M, de Miguel-Luken V, Muñoz-Galván S, López-Guerra JL, Mateos JC, et al. MAP17 (PDZKIP1) as a novel prognostic biomarker for laryngeal cancer. *Oncotarget* 2015;6:12625-36.

[92] Muñoz-Galván S, Gutiérrez G, Pérez M, Carnero A. MAP17 (PDZKIP1) Expression Determines Sensitivity to the Proteasomal Inhibitor Bortezomib by

Preventing Cytoprotective Autophagy and NFkappaB Activation in Breast Cancer. *Molecular cancer therapeutics* 2015;14:1454-65.

[93] Favoriti P, Carbone G, Greco M, Pirozzi F, Pirozzi RE, Corcione F. Worldwide burden of colorectal cancer: a review. *Updates in surgery* 2016;68:7-11.

[94] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer* 2015;136:E359-86.

[95] Oh HS, Chung HJ, Kim HK, Choi JS. Differences in overall survival when colorectal cancer patients are stratified into new TNM staging strategy. *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association* 2007;39:61-4.

[96] National cancer intelligence network cancer outcomes conference 2015, 8-10 june 2015, europa hotel, belfast. *European journal of cancer care* 2015;24 Suppl 1:1-82.

[97] Sveen A, Loes IM, Alagaratnam S, Nilsen G, Holand M, Lingjaerde OC, et al. Intra-patient Inter-metastatic Genetic Heterogeneity in Colorectal Cancer as a Key Determinant of Survival after Curative Liver Resection. *PLoS genetics* 2016;12:e1006225.

[98] Kanas GP, Taylor A, Primrose JN, Langeberg WJ, Kelsh MA, Mowat FS, et al. Survival after liver resection in metastatic colorectal cancer: review and meta-analysis of prognostic factors. *Clinical epidemiology* 2012;4:283-301.

[99] Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature reviews Cancer* 2007;7:573-84.

[100] Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ, Huang CS, Hamilton TC, Anderson ME. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:3070-4.

[101] Laurent A, Nicco C, Chereau C, Goulvestre C, Alexandre J, Alves A, et al. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer research* 2005;65:948-56.

- [102] Termuhlen PM, Curley SA, Talamonti MS, Saboorian MH, Gallick GE. Site-specific differences in pp60c-src activity in human colorectal metastases. *J Surg Res* 1993;54:293-8.
- [103] Talamonti MS, Roh MS, Curley SA, Gallick GE. Increase in activity and level of pp60c-src in progressive stages of human colorectal cancer. *J Clin Invest* 1993;91:53-60.
- [104] Aligayer H, Boyd DD, Heiss MM, Abdalla EK, Curley SA, Gallick GE. Activation of Src kinase in primary colorectal carcinoma: an indicator of poor clinical prognosis. *Cancer* 2002;94:344-51.
- [105] Parsons SJ, Parsons JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 2004;23:7906-9.
- [106] Russello SV, Shore SK. Src in human carcinogenesis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2003;8:s1068-73.
- [107] Frame MC. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta* 2002;1602:114-30.
- [108] Chatzizacharias NA, Kouraklis GP, Giaginis CT, Theocharis SE. Clinical significance of Src expression and activity in human neoplasia. *Histology and histopathology* 2012;27:677-92.
- [109] Roskoski R, Jr. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacological research* 2015;94:9-25.
- [110] Kumar A, Jaggi AS, Singh N. Pharmacology of Src family kinases and therapeutic implications of their modulators. *Fundamental & clinical pharmacology* 2015;29:115-30.
- [111] Puls LN, Eadens M, Messersmith W. Current status of SRC inhibitors in solid tumor malignancies. *The oncologist* 2011;16:566-78.
- [112] Le XF, Bast RC, Jr. Src family kinases and paclitaxel sensitivity. *Cancer biology & therapy* 2011;12:260-9.

[113] Gelman IH. Src-family tyrosine kinases as therapeutic targets in advanced cancer. *Frontiers in bioscience* 2011;3:801-7.

[114] Musumeci F, Schenone S, Brullo C, Botta M. An update on dual Src/Abl inhibitors. *Future medicinal chemistry* 2012;4:799-822.

[115] Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92:9363-7.

[116] Sotillo R, Dubus P, Martin J, de la Cueva E, Ortega S, Malumbres M, et al. Wide spectrum of tumors in knock-in mice carrying a Cdk4 protein insensitive to INK4 inhibitors. *The EMBO journal* 2001;20:6637-47.

[117] Martin-Broto J, Pousa AL, de Las Penas R, Garcia Del Muro X, Gutierrez A, Martinez-Trufero J, et al. Randomized Phase II Study of Trabectedin and Doxorubicin Compared With Doxorubicin Alone as First-Line Treatment in Patients With Advanced Soft Tissue Sarcomas: A Spanish Group for Research on Sarcoma Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2016;34:2294-302.

[118] Eom KY, Cho BJ, Choi EJ, Kim JH, Chie EK, Wu HG, et al. The Effect of Chemoradiotherapy with SRC Tyrosine Kinase Inhibitor, PP2 and Temozolomide on Malignant Glioma Cells In Vitro and In Vivo. *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association* 2016;48:687-97.

[119] Jensen HA, Styskal LE, Tasseff R, Bunaciu RP, Congleton J, Varner JD, et al. The Src-family kinase inhibitor PP2 rescues inducible differentiation events in emergent retinoic acid-resistant myeloblastic leukemia cells. *PLoS one* 2013;8:e58621.

[120] Kawakami H, Zaanan A, Sinicrope FA. Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer. *Current treatment options in oncology* 2015;16:30.

[121] Klingbiel D, Saridaki Z, Roth AD, Bosman FT, Delorenzi M, Tejpar S. Prognosis of stage II and III colon cancer treated with adjuvant 5-fluorouracil or FOLFIRI in

relation to microsatellite status: results of the PETACC-3 trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2015;26:126-32.

[122] Dickson MA. Systemic treatment options for radiation-associated sarcomas. *Current treatment options in oncology* 2014;15:476-81.

[123] Guha M. Cyclin-dependent kinase inhibitors move into Phase III. *Nature reviews Drug discovery* 2012;11:892-4.

[124] Sherr CJ, Beach D, Shapiro GI. Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. *Cancer discovery* 2016;6:353-67.

[125] O'Leary B, Finn RS, Turner NC. Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nature reviews Clinical oncology* 2016;13:417-30.

[126] Chen P, Lee NV, Hu W, Xu M, Ferre RA, Lam H, et al. Spectrum and Degree of CDK Drug Interactions Predicts Clinical Performance. *Molecular cancer therapeutics* 2016;15:2273-81.

[127] VanArsdale T, Boshoff C, Arndt KT, Abraham RT. Molecular Pathways: Targeting the Cyclin D-CDK4/6 Axis for Cancer Treatment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2015;21:2905-10.

[128] Serrano M, Gomez-Lahoz E, DePinho RA, Beach D, Bar-Sagi D. Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by p16INK4. *Science* 1995;267:249-52.

[129] Carnero A, Hannon GJ. The INK4 family of CDK inhibitors. *Current topics in microbiology and immunology* 1998;227:43-55.

[130] Ambrosini G, Cheema HS, Seelman S, Teed A, Sambol EB, Singer S, et al. Sorafenib inhibits growth and mitogen-activated protein kinase signaling in malignant peripheral nerve sheath cells. *Molecular cancer therapeutics* 2008;7:890-6.

[131] Khatib ZA, Matsushime H, Valentine M, Shapiro DN, Sherr CJ, Look AT. Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas. *Cancer research* 1993;53:5535-41.

[132] An HX, Beckmann MW, Reifenberger G, Bender HG, Niederacher D. Gene amplification and overexpression of CDK4 in sporadic breast carcinomas is associated with high tumor cell proliferation. *The American journal of pathology* 1999;154:113-8.

[133] Wolfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wolfel C, Klehmann-Hieb E, et al. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 1995;269:1281-4.

[134] Luke JJ, D'Adamo DR, Dickson MA, Keohan ML, Carvajal RD, Maki RG, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol potentiates doxorubicin efficacy in advanced sarcomas: preclinical investigations and results of a phase I dose-escalation clinical trial. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012;18:2638-47.

[135] Cen L, Carlson BL, Schroeder MA, Ostrem JL, Kitange GJ, Mladek AC, et al. p16-Cdk4-Rb axis controls sensitivity to a cyclin-dependent kinase inhibitor PD0332991 in glioblastoma xenograft cells. *Neuro-oncology* 2012;14:870-81.

[136] Dickson MA, Schwartz GK, Keohan ML, D'Angelo SP, Gounder MM, Chi P, et al. Progression-Free Survival Among Patients With Well-Differentiated or Dedifferentiated Liposarcoma Treated With CDK4 Inhibitor Palbociclib: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA oncology* 2016;2:937-40.

[137] Kane RC, Dagher R, Farrell A, Ko CW, Sridhara R, Justice R, et al. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2007;13:5291-4.

[138] Mujtaba T, Dou QP. Advances in the understanding of mechanisms and therapeutic use of bortezomib. *Discovery medicine* 2011;12:471-80.

[139] Liu J, Shaik S, Dai X, Wu Q, Zhou X, Wang Z, et al. Targeting the ubiquitin pathway for cancer treatment. *Biochimica et biophysica acta* 2015;1855:50-60.

[140] Deming DA, Ninan J, Bailey HH, Kolesar JM, Eickhoff J, Reid JM, et al. A Phase I study of intermittently dosed vorinostat in combination with bortezomib in patients with advanced solid tumors. *Investigational new drugs* 2014;32:323-9.

[141] Poklepovic A, Youssefian LE, Winning M, Birdsell CA, Crosby NA, Ramakrishnan V, et al. Phase I trial of bortezomib and dacarbazine in melanoma and soft tissue sarcoma. *Investigational new drugs* 2013;31:937-42.

[142] Montero JC, Seoane S, Ocana A, Pandiella A. Inhibition of SRC family kinases and receptor tyrosine kinases by dasatinib: possible combinations in solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011;17:5546-52.

[143] Demetri GD, Lo Russo P, MacPherson IR, Wang D, Morgan JA, Brunton VG, et al. Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of dasatinib in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009;15:6232-40.

[144] Sharma MR, Wroblewski K, Polite BN, Knost JA, Wallace JA, Modi S, et al. Dasatinib in previously treated metastatic colorectal cancer: a phase II trial of the University of Chicago Phase II Consortium. *Investigational new drugs* 2012;30:1211-5.

[145] Gargalionis AN, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. The molecular rationale of Src inhibition in colorectal carcinomas. *International journal of cancer* 2014;134:2019-29.

[146] Kopetz S, Lesslie DP, Dallas NA, Park SI, Johnson M, Parikh NU, et al. Synergistic activity of the SRC family kinase inhibitor dasatinib and oxaliplatin in colon carcinoma cells is mediated by oxidative stress. *Cancer research* 2009;69:3842-9.

[147] Hutchinson L. Targeted therapies: dasatinib sensitizes KRAS-mutant colorectal cancer tumors to cetuximab. *Nature reviews Clinical oncology* 2011;8:193.

[148] Dunn EF, Iida M, Myers RA, Campbell DA, Hintz KA, Armstrong EA, et al. Dasatinib sensitizes KRAS mutant colorectal tumors to cetuximab. *Oncogene* 2011;30:561-74.

[149] Fu Y, Yang G, Zhu F, Peng C, Li W, Li H, et al. Antioxidants decrease the apoptotic effect of 5-Fu in colon cancer by regulating Src-dependent caspase-7 phosphorylation. *Cell death & disease* 2014;5:e983.

Anexo: Publicaciones

1. **MAP17 (PDZKIP1) Expression Determines Sensitivity to the Proteasomal Inhibitor Bortezomib by Preventing Cytoprotective Autophagy and NFκB Activation in Breast Cancer.** Muñoz Galvan S, Gutierrez G, **Perez M**, Carnero A. **Mol Cancer Ther.** 2015 Jun;14(6):1454-65. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-1053.
2. **Efficacy of CDK4 inhibition against sarcomas depends on their levels of CDK4 mRNA and p16Ink4a.** **Perez M**, Muñoz-Galván S, Jiménez-García MP, Marín JJ, Carnero A. **Oncotarget.** 2015 Oct 20. doi: 10.18632/oncotarget.5829.
3. **Dasatinib, a Src inhibitor, sensitizes liver metastatic colorectal carcinoma to oxaliplatin in tumors with high phospho-Src.** **Marco Perez**, Antonio Lucena-Cacace, Luis Miguel Marín-Gómez, Javier Padillo-Ruiz , Maria Jose Robles, Carmen Saez , Rocio GarciaCarbonero and Amancio Carnero. **Oncotarget.** 2016 Abr 20 DOI: 10.18632/oncotarget.8880.
4. **Efficacy of bortezomib in sarcomas with high levels of MAP17 (PDZK1IP1).** **Marco Perez** , Javier Peinado-Serrano, Jose Manuel Garcia-Heredia, Irene Felipe Abrio, Cristina Tous, Irene Ferrer, Javier Martin-Broto, Carmen Saez, Amancio Carnero. **Oncotarget.** 2016 Aug 22. doi: 10.18632/oncotarget.11475.
5. **Patient-derived xenografts as models for personalized medicine research in cancer.** **Marco Perez**, Lola Navas, Amancio Carnero. **Cancer Transl Med** 2016;2(6):197–202. doi: 10.4103/2395-3977.196913

Publicaciones relacionadas no incluidas en esta tesis.

1. **MAP17 and SGLT1 protein expression levels as prognostic markers for cervical tumor patient survival.** **Perez M**, Praena-Fernandez JM, Felipe-Abrio B, Lopez-Garcia MA, Lucena-Cacace A, Garcia A, Lleonart M, Roncador G, Marin JJ, Carnero A. **PLoS One.** 2013;8(2):e56169. doi: 10.1371/journal.pone.0056169.
2. **The cargo protein MAP17 (PDZK1IP1) regulates the cancer stem cell pool activating the Notch pathway by abducting NUMB.** Jose Garcia-Heredia, Antonio Lucena-Cacace, Eva Verdugo-Sivianes, **Marco Perez**, and Amancio Carnero. **Clinical Cancer Research.** 2017 Feb 2. doi: 10.1158/1078-0432