

Títol del treball:

Estudi de la inhibició de la sintasa d'àcids grassos (FASN) per revertir la resistència al gefitinib en adenocarcinoma de pulmó.

Estudiant: Maria del Mar Trias Alguacil

Grau en Biologia

Correu electrònic: u1926689@campus.udg.edu

Tutor: Jessica Castro Gallegos

Cotutor*: Teresa Puig Miquel i Santiago Ruiz Martinez

Empresa / institució: Grup de Recerca en Noves Diances Terapèutiques (TargetsLab)
Departament de Ciències Mèdiques, Facultat de Medicina (UdG)

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Jessica Castro Gallegos
Nom del cotutor*: Teresa Puig Miquel i Santiago Ruiz Martinez
Empresa / institució: Grup de Recerca en Noves Diances
Terapèutiques (TargetsLab); Departament de Ciències Mèdiques,
Facultat de Medicina (UdG)

Correu(s) electrònic(s): jessica.castro@udg.edu
teresa.puig@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: Dijous, 20 de juliol de 2017

Nota d'agraïments

Gràcies és una paraula que es queda curta, sobretot en el cas d'en Santi Ruiz. Gràcies per haver-me guiat des del primer moment fins a l'últim, per aconsellar-me i per regalar-me una petita part del teu coneixement científic.

Gràcies a la Teresa Puig, per donar-me l'oportunitat d'aprendre i de satisfer la curiositat científica que compartim.

Gràcies a tots els membres de TargetsLab, especialment a la Sònia Palomeras i a en Marc Rabionet, per ajudar-me en el dia a dia al laboratori i fer-me sentir una més del vostre equip.

Gràcies a la Sílvia Barrabés i a la Jessica Castro, per tutoritzar-me al llarg d'aquests enriquidors quatre anys i per tutoritzar aquest treball, respectivament.

Gràcies a la meva família i amics, per haver-me donat ànims, ajudat a realitzar el treball i entès que no disposava de tot el temps que m'hagués agradat passar amb vosaltres.

Gràcies a en Xevi, per ser-hi cada dia.

Abreviatures i acrònims

ΔE746-A750	Deleció d'un interval comprès entre la posició 746 i la posició 750
ADN	Àcid desoxiribonucleic
AKT	Proteïna quinasa B
AMP	Monofosfat d'adenosina
AMPK	Proteïna quinasa activada per AMP
ATP	Adenosina trifosfat
BSA	Albúmina sèrica bovina
CO ₂	Diòxid de carboni
CoA	Coenzim A
CPCNP	Càncer de pulmó de cèl·lula no petita
CPCP	Càncer de pulmó de cèl·lula petita
EDTA	Àcid etilendiamintetraacètic
EGCG	(-)-3-galat d'epigallocatequina
EGFR	Receptor del factor de creixement epidèrmic
EGFR-TKI	Inhibidor del domini tirosina quinasa del receptor del factor de creixement epidèrmic
ERK1/2	Quinasa extracel·lular reguladora de senyals
FASN	Sintasa d'àcids grassos
FOXO	Factor de transcripció forkhead box de la subclasse O
FBS	Sèrum fetal boví
GDP	Guanosina difosfat
GTP	Guanosina trifosfat
HER1	Receptor 1 del factor de creixement epidèrmic
HER2	Receptor 2 del factor de creixement epidèrmic
HER3	Receptor 3 del factor de creixement epidèrmic
HER4	Receptor 4 del factor de creixement epidèrmic
HGF	Factor de creixement dels hepatòcits
IC ₅₀	Concentració inhibidora 50
L858R	Substitució aminoacídica d'una leucina a una arginina, a la posició 858
LIPPSO	Laboratori d'Innovació en Processos i Productes de Síntesi Orgànica
LKB1	Quinasa de fetge B1
MAPK	Proteïna quinasa activada per mitògens
MAPKK	Proteïna quinasa quinasa activada per mitògens
MEK	Proteïna quinasa quinasa activada per mitògens
mTOR	Proteïna de mamífers diana de la rapamicina
mTORC1	Complex 1 de la proteïna de mamífers diana de la rapamicina
MTT	Bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat

PARP	Poli ADP-ribose polimerasa
PBS	Tampó fosfat-salí
PI3K	Fosfatidil inositol 3-quinasa
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat
PIP ₃	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat
PC9-GR1	Línia cel·lular PC9 resistent a gefitinib 1
PC9-GR3	Línia cel·lular PC9 resistent a gefitinib 3
PC9-GR4	Línia cel·lular PC9 resistent a gefitinib 4
PMSF	Fluorur de fenilmetilsulfonil
RAF	Fibrosarcoma ràpidament accelerat
RAS	Rat sarcoma
RPMI	Medi Roswell Park Memorial Institute
SH2	Homologia Src 2
T790M	Substitució aminoacídica d'una treonina a una metionina, a la posició 790

Resum

El càncer de pulmó representa el tipus de càncer més freqüent arreu del món i el que provoca més morts. L'adenocarcinoma de pulmó és el tipus de càncer de cèl·lules no petites (CPCNP) més comú i el que té més incidència en persones no fumadores. El receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) pot experimentar mutacions al domini tirosina quinasa que desencadenin el creixement descontrolat mitjançant la sobre-activació de les vies de senyalització derivades d'EGFR. En aquests casos, s'administren fàrmacs, com el gefitinib, contra el domini tirosina quinasa (EGFR-TKI), que bloquegen selectivament la transducció del senyal en les cèl·lules tumorals. Malgrat tot, una mutació secundària en EGFR pot dotar a les cèl·lules de resistència als fàrmacs EGFR-TKI. Aquesta situació ha portat a cercar alternatives per frenar la progressió de les cèl·lules resistents. Una diana prometedora és la sintasa d'àcids grassos (FASN), un enzim sobre-expressat en cèl·lules tumorals que sintetitza àcids grassos *de novo*, en lloc d'adquirir-los a través de la dieta. La inhibició de FASN permet reduir l'aport energètic que contribueix en el creixement desmesurat de la cèl·lula.

Així, per tal de superar la resistència a gefitinib, aquest projecte té com a objectiu analitzar *in vitro* l'efecte del gefitinib i de G28, un inhibidor de FASN, sobre la línia cel·lular PC9 i tres línies cel·lulars derivades de PC9 i resistents a gefitinib: PC9-GR1 PC9-GR4, portadores de la mutació secundària T790M, i PC9-GR3. S'avalua l'efecte del gefitinib i de G28 sobre EGFR i FASN, les seves respectives dianes, comprovant els seus nivells d'expressió mitjançant la tècnica de Western Blot. També s'analitza l'efecte dels fàrmacs sobre la inducció de l'apoptosi (trencament de PARP) i sobre proteïnes clau de les vies de senyalització cel·lular PI3K/AKT i Ras/MAPK. Es realitzen tractaments amb la dosi IC₅₀ de cada fàrmac a 72 hores i amb deu vegades aquesta dosi, a 24 hores.

En general, els resultats obtinguts mostren que el gefitinib redueix la fosforilació d'EGFR, la seva diana i indueix l'apoptosi en totes les línies. El gefitinib bloqueja les vies de senyalització derivades d'EGFR en totes les línies cel·lulars, en el tractament amb la dosi màxima a 24 hores.

El tractament amb G28 disminueix clarament els nivells de FASN i indueix l'apoptosi en totes les línies. El tractament a 24 hores redueix l'activació d'EGFR, fet que inhibeix les vies de senyalització derivades, excepte en la línia PC9.

Resumen

El cáncer de pulmón representa el tipo de cáncer más frecuente en todo el mundo, y el que provoca más muertos. El adenocarcinoma de pulmón es el tipo de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) más común y el que tiene más incidencia en personas no fumadoras. El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) puede experimentar mutaciones al dominio tirosina quinasa que desatan el crecimiento descontrolado mediante la sobre-activación de las vías de señalización derivadas de EGFR. En estos casos, se administran fármacos, como el gefitinib, contra el dominio tirosina quinasa (EGFR-TKI), que bloquean selectivamente la transducción de la señal en células tumorales. No obstante, una mutación secundaria puede dotar a las células de resistencia a los fármacos EGFR-TKI. Esta situación ha llevado a buscar alternativas para frenar la progresión de las células resistentes. Una diana prometedora es la sintasa de ácidos grasos (FASN), una enzima sobre-expresada en células tumorales que sintetiza ácidos grasos *de novo*, en lugar de adquirirlos a través de la dieta. La inhibición de FASN permite reducir el aporte energético que contribuye en el crecimiento descontrolado de la célula.

Así, con el fin de superar la resistencia al gefitinib, este proyecto tiene como objetivo analizar *in vitro* el efecto del gefitinib y de G28, un inhibidor de FASN, sobre la línea celular PC9 y tres líneas celulares derivadas de PC9 y resistentes a gefitinib: PC9-GR1 y PC9-GR4, que llevan la mutación secundaria T790M, y PC9-GR3. Se evalúa el efecto del gefitinib y de G28 sobre EGFR y FASN, sus respectivas dianas, comprobando sus niveles de expresión mediante la técnica de Western Blot. También se analiza el efecto de los fármacos sobre la inducción de la apoptosis (rotura de PARP) y sobre las proteínas clave de las vías de señalización celular PI3K/AKT y Ras/MAPK. Se realizan tratamientos con la dosis IC_{50} de cada fármaco a 72 horas y con una dosis diez veces superior a la IC_{50} , a 24 horas.

En general, los resultados obtenidos muestran que el gefitinib reduce la fosforilación de EGFR, su diana, e induce la apoptosis en todas las líneas. El gefitinib bloquea las vías de señalización derivadas de EGFR en todas las líneas celulares, en el tratamiento con la dosis máxima a 24 horas.

El tratamiento con G28 disminuye claramente los niveles de FASN e induce la apoptosis en todas las líneas celulares. El tratamiento a 24 horas reduce la activación de EGFR, cosa que inhibe las vías de señalización derivadas, excepto en la línea PC9.

Abstract

Lung cancer is the most common cancer and the leading cause of cancer death worldwide. Lung adenocarcinoma is the most frequent type of non-small cell lung cancer (NSCLC) and the one with a higher incidence in non-smokers. The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) may harbor activating mutations on tyrosine kinase domain, which trigger loss of growth control through sustaining activation of EGFR-related signaling pathways. In these cases, epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKI), such as gefitinib are administrated. Thus, EGFR-TKI selectively blocks tumor cell signal transduction. However, a secondary mutation in EGFR can provide resistance to EGFR-TKI in tumor cells. This situation has led to search for alternatives to slow down the progression of resistant cells. A promising target to do so is fatty acid synthase (FASN), an overexpressed enzyme in tumor cells that synthesize fatty acids *de novo*, instead of acquiring them from the diet. FASN inhibition allows to reduce the energy contribution that helps to get the excessive growth of the cell.

In order to overcome resistance to gefitinib, the objective of this project is to analyze *in vitro* the effect of gefitinib and G28, a FASN inhibitor, on PC9 cell line and on three PC9-derived cell lines resistant to gefitinib: PC9-GR1 and PC9-GR4, both carrying T790M secondary mutation, and PC9-GR3. It has been studied the effect of gefitinib and G28 on the expression levels of EGFR and FASN, their respective targets, by Western Blot analysis. Also, it has been evaluated the effect of these drugs on apoptosis induction (PARP cleavage) and on key proteins of the PI3K/AKT and the Ras/MAPK signaling pathways. To do so, treatments with the IC_{50} of each drug for 72 hours and with ten times IC_{50} for 24 hours have been performed.

Generally, the results obtained show that gefitinib reduces phosphorylation of EGFR and induces apoptosis in all cell lines. Gefitinib blocks EGFR-derived signaling pathways in all cell lines, in 24-hour treatment.

The G28 treatment clearly diminishes FASN levels and induces apoptosis in all cell lines. The 24-hour treatment reduces EGFR activation, that inhibits its related signaling pathways in all PC9 resistant cell lines.

Índex

INTRODUCCIÓ.....	1
1 El càncer de pulmó.....	1
Classificació del càncer de pulmó.....	2
2 Les vies del factor de creixement epidèrmic i el seu paper en el càncer.....	3
La via de senyalització PI3K/AKT.....	3
La via de senyalització RAS/MAPK.....	4
La mutació primària a EGFR i el gefitinib.....	5
La mutació secundària a EGFR: adquisició de resistència a EGFR-TKI.....	5
3 Estudi de senyalització de la línia cel·lular PC9 i les línies derivades resistents a gefitinib.....	6
4 La sintasa d'àcids grassos (FASN).....	8
OBJECTIVES.....	10
METODOLOGIA.....	11
1 Línies cel·lulars i condicions de cultiu.....	11
2 Tractament i lisi cel·lular.....	12
3 Quantificació de proteïna total.....	13
4 Anàlisi de senyalització cel·lular per Western Blot.....	13
5 Criteris ètics i de sostenibilitat.....	15
RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	16
1 Estudi de la inhibició de FASN i de la senyalització cel·lular a les línies PC9 i PC9 resistents al gefitinib.....	16
Efecte del gefitinib a 72 hores.....	16
Efecte del gefitinib a 24 hores.....	19
Efecte de G28 a 72 hores.....	20
Efecte de G28 a 24 hores.....	22
CONCLUSIONS.....	25
BIBLIOGRAFIA.....	26

INTRODUCCIÓ

1. El càncer de pulmó

Les cèl·lules humanes es divideixen regularment per reemplaçar les cèl·lules envellides i mortes, mantenint així la integritat i el bon funcionament dels òrgans. La comunicació cel·lular és un factor essencial per a la continuïtat fisiològica de les cèl·lules i, al capdavant, per la totalitat d'un ésser viu. La identitat cel·lular, el control i la temporalitat dels processos cel·lulars garanteixen el progrés adequat de les cèl·lules. Totes aquestes característiques es perden en les cèl·lules que conformen un càncer.

El càncer és el nom general d'un grup de més d'un centenar de malalties que poden afectar qualsevol part del cos. Es tracta d'una de les primeres causes de mort al món, tal que va provocar uns 8,8 milions de morts l'any 2015 (1). I és que les previsions són encara més preocupants: s'espera que el nombre de nous casos pugi un 70% en les properes dues dècades (1). El càncer es caracteritza per una proliferació continuada de les cèl·lules que el conformen. Per desenvolupar aquest comportament, la cèl·lula tumoral rep senyal proliferatiu continuat en el temps, omet els supressors del creixement, resisteix a la mort cel·lular i reajusta el metabolisme energètic, donant lloc a una massa de cèl·lules coneguda com a tumor (2). Addicionalment, el tumor pot dur a terme la inducció de l'angiogènesi, la invasió i metàstasi i l'evasió de la destrucció immunitària (2). Quan aquest creixement és incontrolable i s'estén al cos, el tumor esdevé càncer.

Les causes de l'activitat aberrant de la cèl·lula cancerosa són la inestabilitat genòmica i la mutació. La majoria de càncers s'originen a causa de l'acció de carcinògens físics, químics o biològics en cèl·lules normals (1). A més, la susceptibilitat genètica al càncer i l'envelliment també s'han relacionat amb la predisposició a contraure la malaltia (1,3). D'entre els factors de risc del càncer, en destaquen el fum de tabac, una dieta desequilibrada, el sedentarisme i la radiació ultraviolada (1,4).

Els càncers es poden classificar segons el teixit on s'origina. El tipus de càncer més comú és el de pulmó (1). L'any 2012 es van registrar 1,8 milions de nous casos de càncer de pulmó al món, dels quals 1,2 milions eren homes. En dones, la incidència al càncer de pulmó és notablement menor, a causa de l'exposició menor al tabac històricament. Pel que fa a la mortalitat, el càncer de pulmó també lidera el rànquing mundial, amb 1,59 milions de morts l'any 2012. I és que es tracta d'un dels càncers més letals: la relació aritmètica de mortalitat respecte a la incidència és de 0,87 (5).

L'origen del càncer de pulmó es pot atribuir a la inhalació de substàncies carcinògenes. L'agent causant de càncer de pulmó per excel·lència és el fum del tabac, tant és així que se li atribueixen 8 de cada 10 càncers de pulmó. Tant fumadors ocasionals com fumadors esporàdics o passius tenen més risc a contraure càncer de pulmó que les persones que no estan en contacte amb el tabac (6). Si bé és cert que aquest risc disminueix si cessa el consum de tabac, mai serà comparable al risc que es tenia abans de ser fumador. Altres possibles causes d'un càncer de pulmó són: l'exposició al gas radó, la contaminació aèria i la susceptibilitat genètica (7,8)

Classificació del càncer de pulmó

Com tots els càncers, el de pulmó s'origina per una alteració a l'ADN, cosa que desencadena el creixement descontrolat de les cèl·lules del teixit pulmonar (9). Des d'un punt de vista terapèutic, cal saber el perfil histològic, genètic i molecular del tumor d'un pacient. D'aquesta manera, per agilitzar el diagnòstic clínic, és necessària una classificació estandarditzada de càncers de pulmó. En funció de la biologia del tumor i la resposta als tractaments, el càncer de pulmó es pot classificar en:

- **Càncer de pulmó de cèl·lula petita (CPCP):** es tracta d'un tumor agressiu, que es sol iniciar als bronquis i presenta unes cèl·lules que es divideixen ràpidament (10). Els pacients tenen una propensió alta a la disseminació primerenca del càncer. A més, la inestabilitat genòmica del CPCP és major que en la majoria de càncers (11). Aquest tipus de càncer representa entre un 10% i un 15% de càncers de pulmó (9). El tractament consisteix en una combinació de radioteràpia i quimioteràpia, que inclou la combinació de cisplatí o carboplatí i etopòsid. (11–15).
- **Càncer de pulmó de cèl·lula no petita (CPCNP).** Entre un 80% i un 85% dels càncers de pulmó s'assignen a aquesta categoria. El tractament que s'administra depèn de l'estadi en què es troba el pacient i d'altres factors. En els primers estadis, es recorre a la cirurgia per extirpar el tumor, que es pot acompanyar per quimioteràpia adjuvant. En estadis més tardans, el càncer s'ha dispersat i, si la salut del pacient ho permet, aquest es sotmet a radioteràpia i quimioteràpia, que pot constar de la combinació de cisplatí o carboplatí i algun altre fàrmac (15–17). El CPCNP es divideix en tres subcategories:
 - Carcinoma escamós: apareix al revestiment dels bronquïols més interns del pulmó, a les cèl·lules escamoses. Representen d'un 25% a un 30% dels càncers de pulmó i es solen diagnosticar en persones fumadores (8,18,19).
 - Carcinoma de cèl·lules grans: Entre un 10% i un 15% dels càncers de pulmó es classifiquen en aquest subtipus. Pot aparèixer a qualsevol zona del pulmó i sol créixer i dispersar-se ràpidament (8,18,19).
 - Adenocarcinoma: és el CPCNP més comú: representa un 40% dels càncers de pulmó. Sol originar-se al teixit epitelial de la perifèria del pulmó, en cèl·lules secretores de mucus. Aquesta variant de càncer sol aparèixer en persones fumadores, però també és el càncer de pulmó més comú en persones no fumadores, en dones i en gent jove (8,18,19).

2. Les vies del factor de creixement epidèrmic i el seu paper en el càncer.

Els receptors de factors de creixement representen una peça clau de la comunicació cel·lular: quan són estimulats (per factors de creixement, típicament) desencadenen una sèrie de cascades de senyalització cel·lular que regulen el creixement de la cèl·lula, la proliferació, la diferenciació i la supervivència (3,20). La família de receptors factors de creixement epidèrmic consta de quatre membres: EGFR (o HER1), HER2, HER3 i HER4. Tots tenen un domini extracel·lular per on s'uneix el lligand; un domini transmembrana, que permet l'ancoratge a la membrana plasmàtica; i un domini intracel·lular, amb activitat tirosina quinasa (20,21). La unió d'un lligand porta a l'homodimerització o a l'heterodimerització de receptors d'aquesta família, cosa que desencadena l'activació de la seva activitat quinasa i a la transfosforilació de receptors als seus residus de tirosina. A continuació, té lloc el *docking*, on els aminoàcids fosforilats són reconeguts per proteïnes específiques. D'aquesta manera, s'inicia la transducció del senyal que consisteix en l'estimulació de vies cel·lulars, com la via RAS/RAF/MEK/ERK i la via PI3K/AKT/TOR (21,22) (Fig.1).

Quan aquests receptors estan mutats, poden tenir un rol principal en el desenvolupament de càncers. Per exemple, la seva sobre-expressió, la hipersensibilitat a un gran ventall de lligands, l'expressió excessiva de lligand, l'estimulació autocrina i les mutacions dels receptors que els mantenen actius són algunes de les capacitats que s'han observat en EGFR de càncer (3). Així, s'han considerat els receptors de factors de creixement mutats com a noves dianes terapèutiques i el seu estudi és una de les línies d'investigació de molts càncers, com el de pulmó.

La via de senyalització PI3K/AKT

La via de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/AKT (Fig. 1) participa en el creixement cel·lular, la proliferació, la supervivència i regula l'apoptosi, per la qual cosa és de gran importància en la regulació dels processos cel·lulars. La fosforilació del receptor tirosina quinasa, com l'EGFR, fa que s'hi pugui unir PI3K pel seu domini SH2. Això comporta un increment de l'activitat enzimàtica de PI3K, que fa possible la conversió de fosfatidilinositol 4,5-bifosfat (PIP₂), que es troba ancorat a la membrana plasmàtica, a fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PIP₃). A continuació, PIP₃ pot activar AKT, també conegut com a proteïna quinasa B (PKB). A partir d'aquí, l'AKT fosforilat té dues funcions clau, entre d'altres: activar mTOR, fet que promou el creixement cel·lular, mitjançant síntesi proteica, i bloquejar FOXO, fet que fa evitar l'apoptosi. (3,23)

En les cèl·lules canceroses, moltes vegades, aquesta via es troba activada, cosa que porta a un creixement descontrolat, ja que l'activació de la proteïna quinasa AKT promou la síntesi proteica i l'absorció de glucosa prolongades, mitjançant l'activació d'mTOR. (24). A més del creixement cel·lular incrementat, l'activació aberrant d'aquesta via promou la supervivència, que a llarg termini dotarà a la cèl·lula cancerosa d'avantatge selectiu, respecte a les cèl·lules normals (25).

La via de senyalització RAS/MAPK

La via RAS/MAPK (Fig. 1) s'estimula també per l'activació del receptor del factor de creixement. Aquesta via promou el creixement cel·lular, la supervivència i la divisió cel·lular, atès que regula positivament gens de ciclines implicades en la fase G₁ d'aquest procés (24,26). El receptor tirosina quinasa fosforilat activa de manera indirecta Ras, convertint el GDP que porta a GTP. Un cop Ras està activat, aquest recluta i activa RAF, que desencadena una cascada de quinases que es fosforilen de manera seqüencial: RAF fosforila MEK (MAPKK), que fosforila ERK (MAPK). La quinasa MAPK activada es desplaça al nucli i fosforila factors de transcripció que regularan l'expressió de gens implicats en la proliferació (24).

L'activació desmesurada de la via MAPK/RAS pot dotar a la cèl·lula de característiques típiques del càncer: creixement independent de factors de creixement, possibilitat d'invasió i metàstasi, resistència a l'apoptosi i proliferació descontrolada (3,26). Cal dir que ERK1/2 són, en realitat, dues serina/treonina quinases (ERK1 i ERK2) que quasi sempre s'activen conjuntament (27,28). Però en diversos models de càncer de pulmó, s'ha registrat que els nivells d'expressió d'ERK2 són majors que els nivells d'ERK1 (27).

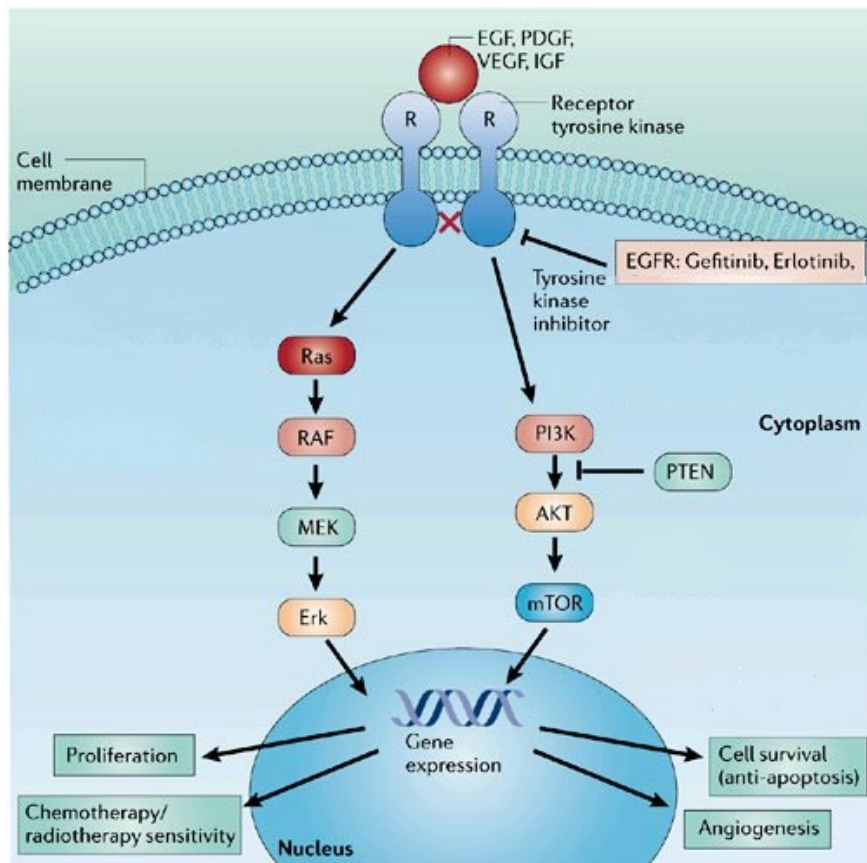


Figura 1: Vies de senyalització cel·lular desencadenades per EGFR. Es detallen les vies Ras/MAPK i PI3K/Akt. Es mostren els processos cel·lulars que en sorgeixen, després de modificar l'expressió de gens determinats. També es mostra la inhibició del receptor tirosina quinasa mutat, per part d'inhibidors de tirosina quinases (EGFR-TKI). Modificat de Nature Reviews (58).

La mutació primària a EGFR i el gefitinib

En adenocarcinomes de pulmó, s'ha observat que EGFR esdevé desregulat per la seva sobre-expressió i per mutació (29). Freqüentment, aquest tipus de càncer es sustenta gràcies a l'activitat aberrant de senyalització cel·lular conduïda per EGFR, que en permet el creixement i la supervivència. S'ha demostrat que el creixement i la metàstasi en càncer de pulmó estan relacionats amb l'activació dependent d'EGFR de la via PI3K/AKT i la via Ras/MAPK (30). La incidència d'adenocarcinomes de pulmó que presenten mutacions a EGFR és més alta en dones, asiàtics i persones no fumadores (31).

S'han estudiat les mutacions a EGFR que estan relacionades amb el càncer CPCNP i que proporcionen sensibilitat a fàrmacs contra les tirosina quinases d'EGFR (EGFR-TKI), com el gefitinib (Iressa; AstraZeneca) (Fig. 3) i l'erlotinib (Tarceva; Roche Ltd.). Les mutacions més habituals són: la deleció de 15 parells de bases a l'exó 19, que afecten els aminoàcids 746-750 de la cadena polipeptídica i representen un 45% de les mutacions a EGFR en CPCNP; la substitució aminoacídica L858R a l'exó 21, que representa un 40-45% de les mutacions; i substitucions nucleotídiques a l'exó 18, que representen un 5% de les mutacions (32,33). Les deleccions a l'exó 19 i les substitucions nucleotídiques a l'exó 18 conserven el marc de lectura (32,33).

A fi de frenar la progressió d'aquests càncers, s'han desenvolupat fàrmacs inhibidors de les tirosina quinases de la proteïna EGFR (EGFR-TKI), que interrompen la senyalització que el receptor EGFR desenvoluparia normalment (34). Els més ben estudiats són el gefitinib i l'erlotinib, que actuen de manera semblant. En aquest treball ens centrarem en el gefitinib. El gefitinib (Fig. 2) és un fàrmac de molècula petita que té una gran afinitat per unir-se al receptor EGFR mutat, respecte al receptor *wild-type* (21,30). L'estructura química d'aquest compost mimetitza l'adenosina trifosfat (ATP). Així, el seu mecanisme d'acció consisteix a unir-se al punt d'unió de l'ATP, als dominis quinasa de l'EGFR, impedir-ne la fosforilació i, de retruc, la transducció del senyal. Així, el gefitinib té un rol d'inhibidor competitiu per aquests dominis (33). S'ha demostrat que el gefitinib, com l'erlotinib, és efectiu per aturar la proliferació, induir l'apoptosi i reduir la metàstasi en cèl·lules malignes en càncer de pulmó (30). Actualment, el gefitinib està aprovat a Europa pel tractament de CPCNP que estan localment avançats o que ja han iniciat la metàstasi i que presentin EGFR mutat (31,35).

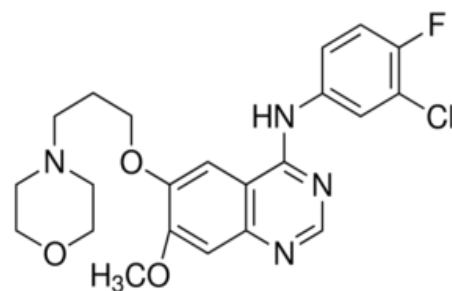
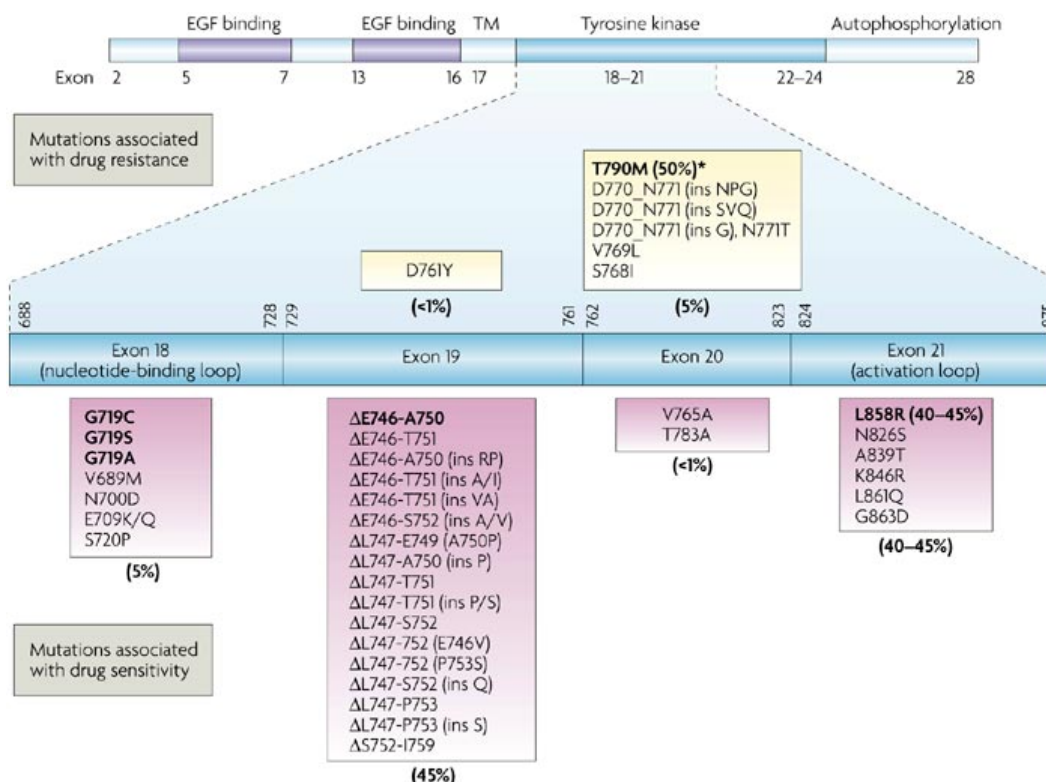


Figura 2: Estructura química del gefitinib.
Font: Sigma-Aldrich.

La mutació secundària a EGFR: adquisició de resistència a EGFR-TKI

A més, els CPCNP que porten EGFR amb les mutacions primàries esmentades anteriorment i associades al càncer poden experimentar un segon procés de mutació: la substitució aminoacídica T790M, a l'exó 20, on la treonina de la posició 790 es substitueix per una metionina (Fig. 3) (21,32,33). Aquesta mutació secundària confereix resistència als fàrmacs EGFR-TKI que frenarien el càncer i es detecta en un 50% dels casos (36). De fet, es creu que aquesta mutació fa al receptor EGFR cent vegades menys sensible als fàrmacs EGFR-TKI (33). La mutació T790M apareix en un subgrup de cèl·lules del tumor EGFR-mutant, després de l'exposició a fàrmacs EGFR-TKI, tot i que també s'ha observat que la mutació pot estar present amb anterioritat de

l'exposició als fàrmacs (33). Actualment, s'està investigant per obtenir nous fàrmacs que permetin superar aquesta resistència.



Nature Reviews | Cancer

Figura 3: Detall dels exons 18-21 del gen EGFR, que formen part del domini tirosina quinasa d'EGFR. Als requadres morats es detallen mutacions d'un exó relacionades amb la sensibilitat als fàrmacs EGFR-TKI; i als requadres grocs es detallen les mutacions d'un exó associades a la resistència a aquests fàrmacs. El percentatge associat a cada requadre indica la incidència de les mutacions detallades en malalts de càncer CPCNP amb EGFR mutat. La mutació més rellevant clínicament es troba a l'exó 20: T790M (*) i es detecta en un 50% dels casos. Font: Sharma *et al.* (2017) (32).

3. Estudi de senyalització de la línia cel·lular PC9 i les línies derivades resistents a gefitinib

Cada cop més, el percentatge de pacients d'adenocarcinoma de pulmó que experimenten una resposta antitumoral significativa, gràcies al tractament amb EGFR-TKI, és menor (37). Les cèl·lules integrants del microambient tumoral poden experimentar mutacions que els aporten un avantatge selectiu, enfront dels EGFR-TKI. Per aquest motiu, l'eficàcia dels inhibidors del domini tirosina quinasa d'EGFR es pot veure reduïda.

Conèixer en profunditat les vies de senyalització implicades en el càncer de pulmó i els mecanismes de resistència és essencial per trobar mecanismes alternatius per superar el càncer de pulmó amb resistència adquirida a EGFR-TKI. D'aquesta manera, nombrosos estudis es

centren a trobar biomarcadors que puguin ser d'utilitat pel que fa al tractament i a la diagnosi i noves dianes terapèutiques.

Així doncs, el present projecte pretén aportar informació sobre la fisiologia molecular de cèl·lules d'adenocarcinoma de pulmó sensibles i resistents a EGFR-TKI, les quals tenen la mutació més habitual que hi ha rere la resistència a aquests fàrmacs.

Es treballa amb la línia cel·lular PC9 (Fig. 4), anteriorment coneguda com a PC14. Aquesta línia prové d'un adenocarcinoma de pulmó (CPCNP) (38). Les seves característiques es detallen a les taules 1 i 2. El gen de la proteïna EGFR d'aquestes cèl·lules presenta una deleció de 15 parells de bases a l'exó 19 ($\Delta E746-A750$), que fa de la línia cel·lular PC9, sensible a EGFR-TKI i li aporta característiques de cèl·lula cancerosa.

Taula 1: Característiques de la línia cel·lular parental PC9 (anteriorment coneguda com PC14). Font: Public Health England.

Línia cel·lular	PC9
Espècie d'origen	<i>Homo sapiens</i>
Teixit d'origen	Adenocarcinoma de pulmó
Morfologia cel·lular	Mescla heterogènia de cèl·lules rodones i cèl·lules afusades
Condicions de creixement	Adherent / en suspensió

Per poder estudiar la resistència a EGFR-TKI, es compta amb tres línies cel·lulars més que deriven de la línia cel·lular PC9: les línies cel·lulars PC9-GR1, PC9-GR3 i PC9-GR4 (Fig. 4) (39). Aquestes línies cel·lulars s'han obtingut posteriorment al tractament continuat de la línia cel·lular PC9 amb gefitinib, amb la finalitat de fer-les resistents a aquest fàrmac. D'aquesta manera, les línies cel·lulars PC9-GR1 i PC9-GR4 presenten la substitució aminoacídica T790M a l'exó 20, causant de la resistència a fàrmacs contra els dominis tirosina quinasa (Fig. 2). En canvi, la línia cel·lular PC9-GR3 manté l'exó 20 *wild-type*. Malgrat això, presenta resistència al gefitinib, com la resta de línies derivades. D'altra banda, totes les línies cel·lulars derivades conserven la deleció a l'exó 19 (39). Totes aquestes característiques es recullen a la taula 2.

Taula 2: Característiques genotípiques i fenotípiques de la línia cel·lular parental PC9 i les línies derivades de PC9, pel que fa a EGFR. També es detalla la susceptibilitat de cada línia cel·lular al gefitinib. Font: Bertran et al., 2016 (39).

Línia cel·lular	Deleció a l'exó 19 ($\Delta E746-A750$)	Substitució aminoacídica a l'exó 20 (T790M)	Resistència a gefitinib
PC9	+	-	-
PC9-GR1	+	+	+
PC9-GR3	+	-	+
PC9-GR4	+	+	+

4. La sintasa d'àcids grassos (FASN)

Una de les característiques del càncer que s'ha definit més recentment és la reprogramació del metabolisme energètic (2). I és que la cèl·lula cancerosa necessita un sistema metabòlic diferent que aporti l'energia i els metabòlits necessaris per créixer com ho fa. Pel que fa a l'obtenció dels àcids grassos, en una cèl·lula normal, s'adquireixen a través de la dieta i s'emmagatzemen en forma de triacilglicèrids. En canvi, la cèl·lula cancerosa els sintetitza *de novo* i els emmagatzema en forma de fosfolípids (40).



Figura 4: Reacció que catalitza la sintasa d'àcids grassos (FASN).
Font pròpia.

La sintasa d'àcids grassos (FASN) pren aquesta funció. Es tracta d'un enzim homodimèric que està sobre-expressat en carcinomes humans, fet pel qual es designa com a oncogen metabòlic (41,42). Catalitza la reacció de síntesi *de novo* d'àcids grassos de cadena llarga, com el palmitat, a partir d'acetil-CoA, malonil-CoA i té NADPH com a donador d'electrons (Fig. 4) (41). Els àcids grassos sintetitzats per FASN formaran part dels lípids de membrana (40). En càncer de mama, s'ha observat que la sobre-expressió gènica de FASN és induïda per HER2 (40) i EGFR (43) i per les vies de senyalització dependents de quinases que en deriven: fosfatidil inositol 3-quinasa/proteïna quinasa B (PI3K/ Akt) i Ras/proteïna quinasa activada per mitògens (Ras/MAPK) (40,41).

L'expressió diferencial de FASN entre cèl·lules normals i cèl·lules tumorals i la importància de l'enzim en la continuïtat de la cèl·lula tumoral fa que s'hagi considerat FASN com a una diana terapèutica prometedora (40). Els requeriments energètics de la cèl·lula tumoral provoquen que la funcionalitat de FASN sigui tan necessària, que la seva inhibició porta a l'apoptosi selectiva de cèl·lules tumorals humanes, *in vivo* i *in vitro* (43), en part, perquè es redueix la font de fosfolípids estructurals de la cèl·lula tumoral (40). A més, s'ha vist que en models tumorals de càncer de mama i d'ovari, la inhibició de FASN redueix l'activació d'AKT, fet que indueix l'apoptosi (44).

En un model cel·lular d'adenocarcinoma de pulmó, s'ha demostrat que els següents inhibidors de FASN són capaços de provocar l'apoptosi de la cèl·lula tumoral: el compost C75, un anàleg sintètic de la cerulenina i l'epigal·locatequina-3-gallat (EGCG), una catequina polifenòlica extreta del te verd (41). Addicionalment, s'ha observat que l'EGCG té un efecte negatiu en la senyalització cel·lular derivada d'EGFR: la quantitat de pEGFR, pAKT, pMAPK i pmTOR es veu reduïda (41).

No obstant això, l'ús de C75 *in vivo* està limitat per anorèxia i pèrdua de pes corporal associat a l'estimulació de la carnitina palmitoiltransferasa-1, l'enzim responsable de la regulació de l'oxidació mitocondrial dels àcids grassos (44).

Posteriorment es va desenvolupar un compost polifenòlic anomenat G28 (Fig. 5) (45). El G28 és un derivat de l'EGCG que presenta una eficàcia elevada en la inhibició de FASN, ja que redueix l'activitat de FASN fins a un 90% (45). En càncer de mama HER2+, a banda d'inhibir FASN, el G28 incrementa l'apoptosi, i redueix la quantitat de pHER2, pAKT i pMAPK (46).

També se sap que G28 manté la seva citotoxicitat en càncer de mama HER2+ resistent a fàrmacs anti-HER2. El G28 s'ha testat *in vivo* en ratolins amb el mateix tipus de càncer i es va observar inhibició del creixement tumoral en un terç dels ratolins, sense mostrar toxicitat col·lateral, activació creuada de la β -oxidació ni pèrdua de pes (45).

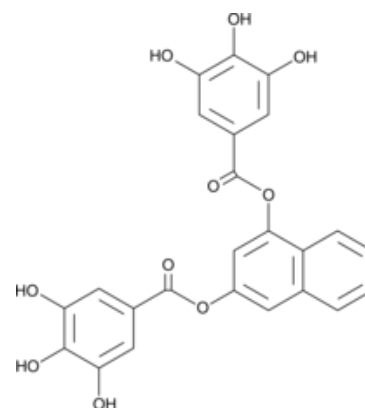


Figura 5: Estructura química del G28. Font: Tocris Bioscience.

Prèviament, al grup de recerca, s'ha determinat el valor de IC_{50} (concentració a la qual s'inhibeix la viabilitat cel·lular en un 50%) del Gefitinib i del G28 sobre les 4 línies de pulmó a través del mètode MTT (Taula 3). PC9 presenta una sensibilitat al Gefitinib de fins a 100 vegades superior respecte les variants PC9-GR1, PC9-GR3 i PC9-GR4. Per contra, cap de les 4 línies presenta una citotoxicitat significativament diferent al G28, de manera que la citotoxicitat provocada per G28 és independent de la mutació T790M, que provoca la resistència a gefitinib.

Taula 3: Mitjana i desviació estàndard del valor de IC_{50} quan es tracten les quatre línies amb Gefitinib i G28 Font: TragetsLab.

Línia cel·lular	Mitjana IC_{50} gefitinib (μ M) \pm SD	Mitjana IC_{50} G28 (μ M) \pm SD
PC9	0,03 \pm 0,01	11,60 \pm 0,94
PC9-GR1	7,92 \pm 0,53	10,23 \pm 0,61
PC9-GR3	14,85 \pm 0,81	16,36 \pm 1,29
PC9-GR4	6,83 \pm 1,23	8,56 \pm 0,03

OBJECTIVES

Regarding what has been discussed above, it is exposed the purpose of the project: **to analyze the effect of gefitinib and G28 on cell signaling and apoptosis on the lung adenocarcinoma PC9 cell line and on three lines derived from PC9, resistant to gefitinib (GR1, GR3 and GR4).**

To achieve this main objective, the following objectives have been defined:

1. To study the effect of gefitinib and G28 on FASN, EGFR and their downstream related proteins in PC9 sensitive and resistant (GR1, GR3 and GR4) cells.
2. To evaluate the effect on apoptosis (by PARP cleavage) of gefitinib and G28 in PC9 sensitive and resistant (GR1, GR3 and GR4) cells.
3. To determine the effect of gefitinib and G28 on EGFR-related signaling pathway proteins in PC9 sensitive and resistant (GR1, GR3 and GR4) cells.

METODOLOGIA

1. Línies cel·lulars i condicions de cultiu

Aquest estudi es realitza amb quatre línies cel·lulars d'adenocarcinoma de pulmó: la línia cel·lular PC9 i les línies PC9-GR1, PC9-GR3 i PC9-GR4, que deriven de la primera i són resistents a gefitinib (Fig. 6). Les línies derivades s'han aconseguit gràcies al tractament de la línia cel·lular PC9 amb unes concentracions creixents de gefitinib (39). Totes les línies cel·lulars provenen del Laboratori d'Oncologia de Pangea Biotech (Barcelona).

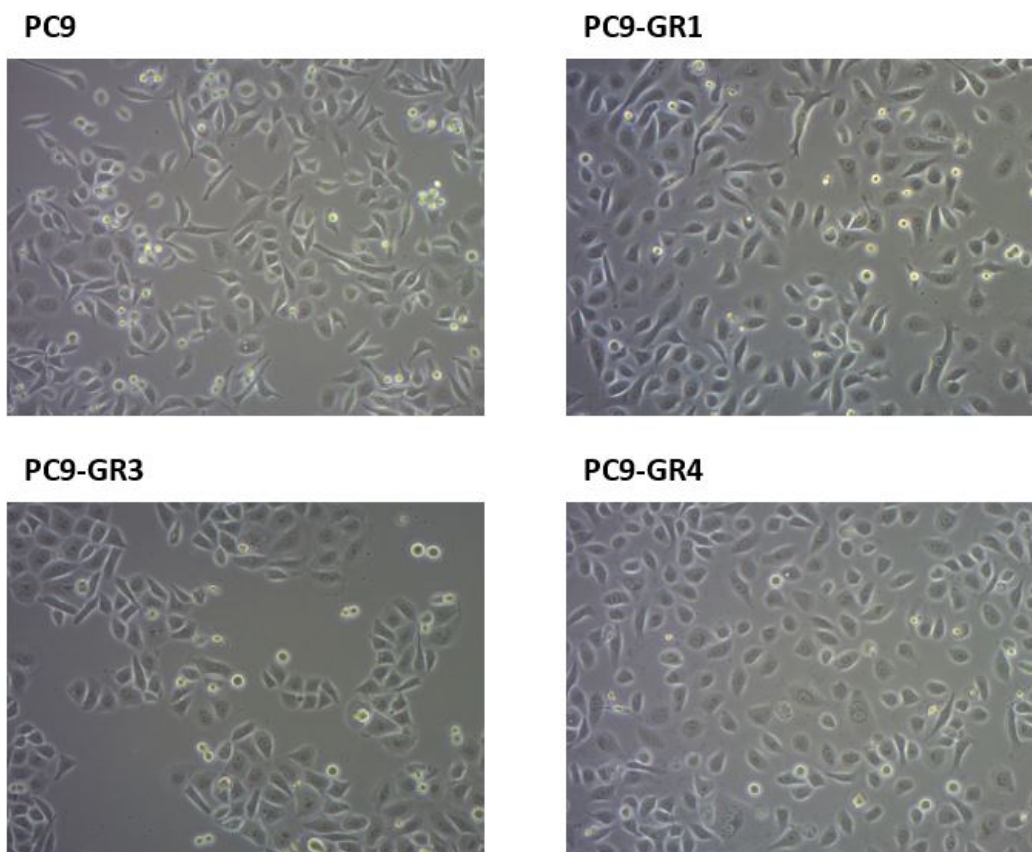


Figura 6: Microfotografies de la línia cel·lular parental PC9 i les línies cel·lulars derivades PC9-GR1, PC9-GR3 i PC9-GR4, amb un augment de 100x. Font pròpia.

Aquestes cèl·lules s'han cultivat en plaques de 100 mm i han crescut en creixement adherent. S'ha emprat el medi RPMI (Gibco), suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (FBS, HyClone Laboratories) i 100 µg/mL de penicil·lina/estreptomicina (Gibco). Les cèl·lules s'han incubat a 37°C en una atmosfera amb un 5% de CO₂. La manipulació de les cèl·lules es realitza sempre en condicions d'esterilitat i es treballa sota una cabina de flux laminar de classe II amb sistema d'il·luminació ultraviolada i sistema d'aspiració de líquids.

Per garantir la viabilitat de les cèl·lules, es controla regularment l'estat i la confluència de les cèl·lules, mitjançant l'observació en un microscopi òptic invertit, i es realitzen subcultius per assegurar el creixement exponencial de les cèl·lules, renovant el medi quan les cèl·lules assoleixen una confluència del 80-90%. El passatge de les cèl·lules és un procés rutinari que

consisteix en desadherir les cèl·lules de la superfície de la placa en què es cultiven i recuperar-ne una fracció (1/8-1/12) per ressemar-les en medi nou. Per realitzar-ho, cal aspirar el medi vell de la placa de cultiu i rentar les cèl·lules amb tampó fosfat-salí temperat (PBS, Sigma, 3 ml), que té la funció de diluir les restes de sèrum del medi, que actuarien inhibint la tripsina. A continuació, es realitza una tripsinització per desadherir les cèl·lules del fons de la placa, així que s'afegeix tripsina (0,05%) - EDTA (0,02%) (Linus, 3 ml) i s'incuba durant un temps que depèn de cada línia cel·lular (entre 5 i 15 minuts). Un cop s'assegura l'aixecament total de les cèl·lules, s'afegeix medi nou (7 ml) a fi d'interrompre la reacció que du a terme la tripsina i d'evitar que aquesta malmeti les cèl·lules. El volum total que roman a la placa es pipeteja uns quants cops i es vessa sobre el fons de la placa per acabar de recollir les cèl·lules que hagin pogut quedar agregades o adherides. Aquesta tècnica de disgregació física es coneix com a *flushing*. Seguidament, es transvasa la suspensió en un tub Falcon estèril i es centrifuga a 1000 rpm durant 5 minuts. El sobrenadant es descarta i el *pellet* es ressuspèn amb un volum determinat de medi fresc. Després d'homogeneïtzar bé, es pren una fracció de la solució, segons la dilució que es vulgui realitzar, i s'addiciona a una placa que ja conté medi fresc (10 ml). S'incuba la placa a 37°C i en una atmosfera al 5% de CO₂ i es repeteix la propagació del cultiu un cop les cèl·lules tornin a assolir la confluència del 80-90%.

2. Tractament i lisi cel·lular

Pel tractament, es sembren 200000 cèl·lules en plaques de 60 mm i s'incuben a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂, durant 24 hores. Per al tractament a 72 hores, es tracten les cèl·lules amb la concentració de fàrmac que correspon a la IC₅₀ del compost calculada a 72 hores a través de l'assaig de MTT per altres membres del grup. A fi de veure un efecte més pronunciat es realitza també un tractament a 24 amb una concentració de 10 vegades la concentració equivalent a la IC₅₀ calculada a 72 hores. En aquest cas es sembren 500000 cèl·lules en plaques de 60 mm 24 hores abans del tractament. Els compostos utilitzats són l'inhibidor de tirosina quinasa, gefitinib (AstraZeneca) i l'inhibidor de FASN derivat de l'epigalat, G28, sintetitzat al Laboratori d'Innovació en Processos i Productes de Síntesi Orgànica (LIPPSO). Es deixa una placa de cada línia cel·lular sense tractar, que serà el control. Llavors, es tornen a incubar les cèl·lules durant 24 hores o 72 hores, segons l'experiment. Un cop ha finalitzat el temps d'incubació, es renten les cèl·lules amb PBS (3 ml), es tripsinitzen (tripsina-EDTA, 3 ml) i es transfereixen a un tub de centrifuga estèril. Es centrifuga la solució durant 5 minuts, a 1000 rpm i es renta el sediment, ressuspensent-lo en PBS fred (1 ml). Es torna a centrifugar, aquest cop a 14000 rpm durant 10 minuts a 4°C i es descarta el sobrenadant.

A fi d'aconseguir un extracte proteic de les cèl·lules contingudes en el *pellet*, cal dur a terme una lisi cel·lular, procés que permet trencar les membranes cel·lulars, de manera que el contingut de la cèl·lula surti a l'exterior. Per fer això, els *pellets* cel·lulars es ressuspensen amb tampó de lisi (EDTA 1mM, NaCl 150 mM i TrisHCl 50 mM) (Cell Signaling Technology, Inc.), PMSF 2 mM (100 µg/mL) (Sigma).

Amb la finalitat de dur a terme la lisi cel·lular, es vorteja la mostra cada 5 minuts, durant 30 minuts. A continuació, es centrifuguen les suspensions a 14000 rpm i 4°C durant 10 minuts i es transfereix el sobrenadant a un tub Eppendorf, que es conserva a -80°C.

3. Quantificació de proteïna total

La quantificació de proteïna total permet conèixer la concentració de la totalitat de proteïnes d'una mostra. Aquesta informació és necessària per a poder treballar amb la mateixa quantitat de proteïna, en l'immunotransferència i així, normalitzar els resultats i fer-los equiparables.

Es quantifica pel mètode de Lowry (DC™ Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, Inc.), que es basa en llegir l'absorbància d'una mostra proteica i extrapolar-la a una recta patró, obtinguda a partir d'una solució mare d'albúmina sèrica bovina (BSA, Sigma). El banc de dilucions consta de solucions amb les següents concentracions: 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1 i 1,2 µg/µl. En una placa de 96 pous, es dispensen: 5 µl de cada mostra diluïda 10 vegades, 25 µl de la barreja dels reactius A i S, amb una relació 1:50, i 200 µl del reactiu B. Cal incubar la placa durant 15 minuts en la foscor i llegir l'absorbància a 700 nm, en un espectrofotòmetre (Spectra Max 340PC (380), Bio-Nova Científica S.L.). Es determina l'equació de la recta patró i s'extrapolen les absorbàncies obtingudes de les nostres mostres per saber la concentració de proteïnes.

4. Anàlisi de senyalització cel·lular per Western Blot

Una immunotransferència (transferència de proteïnes o western blot) és un procés pel qual es detecten específicament determinades proteïnes d'una mostra. Les mostres utilitzades contenen una mateixa quantitat de proteïna, que varia entre experiments (10-30 µg). Així, es calcula el volum necessari de lisat cel·lular, *LDS Sample Buffer*, *Sample Reducing Agent* (Invitrogen) i H₂O milliQ per obtenir mostres d'un volum total de 25 µl. Les mostres s'incuben a 90°C durant 10 minuts a fi d'ajudar a l'agent reductor a trencar els possibles enllaços disulfur. Les proteïnes es separen per la seva massa molecular mitjançant una electroforesi SDS-PAGE, amb gels de poliacrilamida al 7,5%, amb 1 mm o 1,5 mm de gruix, segons l'experiment, i amb tampó de *running* (ThermoFisher Scientific). Es deixa córrer el gel fins que la proteïna de menor pes molecular que ens interessa arriba a baix. Es transfereixen les proteïnes presents al gel d'electroforesi a una membrana de nitrocelulosa. L'electrotransferència es du a terme a 90 V durant 1 hora i 20 minuts amb tampó d'electrotransferència (ThermoFisher Scientific). Les membranes es bloquegen durant 1 hora amb tampó de bloqueig (5% llet en pols en solució PBS-Tween-20), en agitació suau. A continuació s'incuben *overnight* a 4°C amb l'anticòs primari corresponent diluït en tampó de bloqueig, també en agitació suau (Taula 4).

Taula 4: Relació dels anticossos primaris i secundaris utilitzats amb el tipus (policlonal o monoclonal), la dilució realitzada, el proveïdor, el número de referència i l'animal d'extracció.

Anticòs	Tipus	Dilució	Proveïdor	Núm. Referència	Animal d'extracció
FASN	Policlonal	1:1000	Assay Designs	# 9272	Conill
PARP	Policlonal	1:1000	Cell Signaling Technology	# 9542	Conill
EGFR	Policlonal	1:1000	Cell Signaling Technology	# 2232	Conill
Phospho EGFR ^{Tyr1068}	Policlonal	1:200	Cell Signaling Technology	# 2234	Conill
HER2/ErbB2	Monoclonal	1:1000	Cell Signaling Technology	# 2165	Conill
Phospho HER2/ErbB2 ^{Tyr1196}	Monoclonal	1:200	Cell Signaling Technology	# 6942	Conill
Akt	Policlonal	1:1000	Cell Signaling Technology	# 9272	Conill
Phospho Akt ^{Ser473}	Monoclonal	1:1000	Cell Signaling Technology	# 4058	Conill
mTOR	Policlonal	1:500	Cell Signaling Technology	# 2983	Conill
Phospho mTOR ^{Ser2448}	Monoclonal	1:500	Cell Signaling Technology	# 2971	Conill
MAPK	Policlonal	1:500	Cell Signaling Technology	# 9102	Conill
Phospho MAPK ^{Thr180/Tyr182}	Policlonal	1:500	Cell Signaling Technology	# 9211	Conill
β -actina	Monoclonal	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	# 47778	Ratolí
α -Tubulina	Monoclonal	1:5000	Cell Signaling Technology	# 3873	Ratolí
Contra conill	Policlonal	1:1000	Cell Signaling Technology	# 7074	Cabra
Contra ratolí	Policlonal	1:5000	Merck Millipore Corporation	# 401215	Cabra

L'endemà s'atempren les membranes durant 1 hora, es renten tres cops amb PBS-Tween-20, s'incuben durant 1 hora amb l'anticòs secundari i es tornen a rentar tres cops amb PBS-Tween-20. S'utilitzen anticossos secundaris conjugats amb l'enzim peroxidasa. Les membranes s'incuben amb una barreja que conté el substrat de la peroxidasa i luminol; i peròxid d'hidrogen, en una proporció 1:1. Les solucions s'obtenen dels kits comercials Immobilon Western HRP Substrate (Millipore) o Super Signal West Femto chemiluminescent substrate (Thermo Scientific Inc.). La quimoluminisència resultant de la reacció es detecta mitjançant ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad Laboratories Inc.).

En totes les electrotransferències realitzades, s'ha carregat la mateixa quantitat de proteïna per cada mostra i s'ha escollit una proteïna que té funció de control (β -actina o tubulina, segons conveniència), a fi de normalitzar els resultats i fer-los comparables. La dosi de fàrmac inoculada en els tractaments a 72 hores ha estat la IC_{50} de cada fàrmac. En els tractaments a 24 hores, s'han emprat les dosis de IC_{50} , $10 \times IC_{50}$ i $5 \times IC_{50}$, segons l'assaig.

5. Criteris ètics i de sostenibilitat

Tots els procediments experimentals s'han realitzat procurant sempre minimitzar l'impacte ambiental. En particular, en un laboratori de cultiu cel·lular, en conseqüència de garantir l'esterilitat, es generen una gran quantitat de residus: material d'un sol ús, medis, solucions i reactius. A més, a banda de la realització d'activitats experimentals, les cèl·lules requereixen una renovació del medi periòdicament, cosa que implica una utilització de material constant. Per tal de contrarestar-ho, s'ha intentat allargar la vida útil d'estrís d'un sol ús. Algunes de les mesures que es prenen són les següents: a les plaques s'hi realitzaven fins a tres subcultius; totes les pipetes (de plàstic, de vidre i de tots els volums) es miraven de fer servir més d'una vegada, sempre que no es veiés compromesa l'esterilitat del cultiu de treball i les puntes es reutilitzaven, sempre que s'usessin en el mateix líquid o que no hi hagués marge a la contaminació de productes o cultius.

Pel que fa a la realització de Western Blot, també s'ha treballat intentant minimitzar la petjada ecològica. D'aquesta manera, per exemple, els tampons de *running* i de transferència s'utilitzaven més d'un cop. A més, per economitzar, s'intentava incrementar la dilució dels anticossos en tampó de bloqueig. Pel que fa a la neteja d'estrís, s'ha estalviat en l'ús de l'aigua i el paper.

Quant a la gestió de residus, aquests s'han classificat en funció de la seva perillositat. Per una banda, els cultius per descartar i el material que havia entrat en contacte amb cèl·lules es dipositaven en contenidors per a residus biològics. Els fàrmacs, altres residus citotòxics i el material que hi havia entrat en contacte es dipositaven en contenidors per a residus citotòxics. I els residus no nocius es descartaven en contenidors urbans.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. Estudi de la inhibició de FASN i de la senyalització cel·lular a les línies PC9 i PC9 resistents al gefitinib

Amb la finalitat de conèixer l'efecte del gefitinib, un fàrmac inhibidor del domini tirosina quinasa d'EGFR, i de G28, un inhibidor sintètic de la sintasa d'àcids grassos (FASN), sobre cèl·lules d'adenocarcinoma de pulmó, s'han estudiat els nivells d'expressió de les proteïnes relacionades amb la via EGFR, mitjançant la tècnica Western Blot. Estudis previs han demostrat una relació en la inhibició de l'activitat de FASN i les vies de senyalització PI3K/PTEN/AKT i RAF/MEK/ERK en càncer de mama triple negatiu (47). Per avaluar l'efecte d'aquests fàrmacs en cèl·lules de càncer de pulmó, es realitza una aproximació a la senyalització cel·lular de la línia cel·lular PC9 sensible a gefitinib i les línies PC9 resistents a gefitinib (Taula 2).

Per comprovar si l'efecte dels dos compostos és dependent del temps d'incubació i de la dosi, les línies cel·lulars es tracten en temps diferents (24 i 72 hores) i amb concentracions diferents (IC_{50} i $10 \times IC_{50}$).

Efecte del gefitinib a 72 hores

Les anàlisis d'immunoblot realitzades mostren com el gefitinib indueix l'apoptosi en totes les línies cel·lulars estudiades. El dany cel·lular excessiu indueix l'activitat de les caspases, que medien la inactivació de PARP (una polimerasa involucrada en la reparació del DNA) mitjançant la seva escissió (48). D'aquesta manera, la presència de productes del trencament de PARP informa que s'està duent a terme la mort cel·lular programada. L'especificitat de l'anticòs contra PARP permet distingir dues bandes, una de 116 kDa (PARP íntegre) i una altra de 89 kDa (producte després de l'escissió). Tal com es mostra a la figura 7, hi ha presència de la banda de 89 kDa en totes les línies cel·lulars tractades amb gefitinib, cosa que indica que el fàrmac indueix l'apoptosi.

Per poder utilitzar FASN com un possible objectiu en el (co)tractament del càncer de pulmó, s'han validat els nivells d'expressió de FASN. La proteïna s'expressa a totes les línies d'una manera semblant, cosa que dona peu a estudiar la seva citotoxicitat en aquestes línies (Fig. 7). Curiosament, sembla ser que el gefitinib inhibeix l'enzim en la línia sensible. Aquest efecte no s'observa per cap de les línies resistents utilitzades. Això suggereix que la capacitat de mantenir nivells normals de FASN, malgrat l'exposició a gefitinib, ha sigut adquirida durant el procés d'adquisició de resistència al fàrmac. Diferents estudis han demostrat una correlació entre els nivells d'expressió de FASN i l'agressivitat i progressió del tumor (49), de manera que no seria estrany pensar que aquest enzim es pugui trobar implicat en resistència a fàrmacs. Així doncs, FASN sembla ser un objectiu prometedor per al desenvolupament de fàrmacs antitumorals.

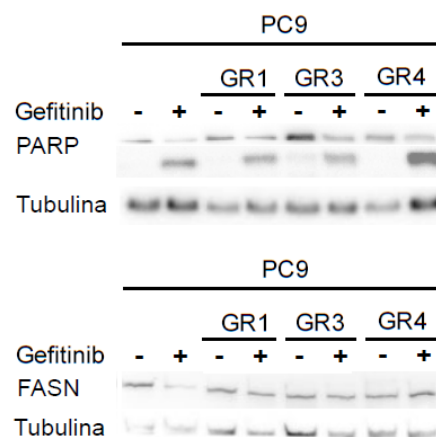


Figura 7: Expressió de FASN i PARP de les línies cel·lulars PC9 i PC9 resistents a gefitinib, després del tractament durant 72 hores amb la dosi IC_{50} de gefitinib.

Tal com s'esperava, la línia cel·lular PC9 (Fig. 9), que és sensible a gefitinib, experimenta una lleugera disminució de pEGFR quan es tracta amb gefitinib, ja que n'és la seva diana (50). La línia PC9 no presenta la via PI3K/AKT activada. En canvi, quan es tracta amb gefitinib, aquesta s'activa, ja que la quantitat de pAKT es veu incrementada respecte a la condició de control, tot i que es distingeix una quantitat semblant de pmTOR. De la mateixa manera, la via Ras/MAPK també resulta activada en el tractament amb gefitinib, ja que presenta més quantitat de pMAPK en comparació amb les cèl·lules en absència de tractament. La sobre-activació d'AKT està relacionada amb el creixement cel·lular, la proliferació i la supervivència, cosa que millora la progressió de la cèl·lula tumoral. Contràriament als nostres resultats, Ono *et al.* (50) corroboren que l'efecte de gefitinib sobre cèl·lules PC9 és d'inhibició d'aquestes vies, tal com s'esperava que fos en l'assaig realitzat. L'efecte del gefitinib però, sembla ser dependent tant de la concentració com del temps (37). Per això, més endavant s'analitza l'efecte d'aquest fàrmac a diferents concentracions durant 24 hores.

En la línia cel·lular PC9-GR1 (Fig. 9), resistent a gefitinib, la quantitat de pEGFR sembla mantenir-se igual. Malgrat això, l'activació de via PI3K/AKT, que ja de per sí es troba activada, es veu augmentada amb el tractament amb gefitinib. Tot i això, no sembla que hi hagi diferències en els nivells de pmTOR, entre les dues condicions. L'activació de la via PI3K/AKT és una característica comuna en cèl·lules CPCNP amb diversos mecanismes de resistència (51). Igualment, el tractament fa augmentar l'activació de pMAPK, cosa que indica que la via Ras/MAPK es veu potenciada.

S'observa un comportament diferent en la línia cel·lular PC9-GR4 (Fig. 9), que també és resistent a gefitinib. Sembla que hi hagi una disminució de pEGFR amb el tractament. Aquesta línia presenta les vies PI3K/AKT i Ras/MAPK mínimament activades, però l'activació d'AKT sembla disminuir i l'activació de MAPK augmentar quan es tracta amb gefitinib. Com era d'esperar amb la inhibició d'AKT, s'observa també una disminució en pmTOR.

La línia cel·lular PC9-GR3 (Fig. 9), que presenta el valor d'IC₅₀ més elevat de les línies resistents al fàrmac, presenta també una activació major de la via PI3K/AKT. El tractament amb gefitinib provoca la seva disminució, ja que la quantitat de pAKT es veu reduïda. Tot i això, sembla que augmenta l'activació d'mTOR amb el tractament. Cal remarcar que pEGFR queda completament inhibït quan es tracta amb l'inhibidor de tirosina quinasa. La via Ras/MAPK també roman activada independentment del tractament. Curiosament, tot i que MAPK, que són dues serina/treonina quinases (ERK1 i ERK2) que sembla que sempre s'activen conjuntament (27,28), en aquest cas però només sembla activar-se ERK2. En concordança amb els resultats obtinguts, en moltes línies cel·lulars de càncer de pulmó, s'ha registrat que els nivells d'expressió d'ERK2 són majors que els nivells d'ERK1. De fet, ja s'ha començat a desenvolupar fàrmacs contra aquesta proteïna clau de la via Ras/MAPK (52). Les dues isoformes presenten una seqüència aminoacídica semblant i comparteixen moltes funcions, però no es consideren funcionalment redundants del tot (28). Una de les funcions que s'ha atribuït a ERK2, i no a ERK1, és la capacitat de promoure la motilitat cel·lular induïda pel factor de creixement dels hepatòcits (HGF), en cèl·lules A549 de càncer de pulmó (52).

Cap de les línies cel·lulars comentades anteriorment presenta HER2. Per comprovar-ho, s'ha utilitzat com a control la línia cel·lular de càncer de mama SK-BR-3 que sobre-expressa HER2 (53) (Fig. 8). Se sap que la línia PC9 té una expressió pobra d'HER2, en comparació a altres línies de CPCNP i a molts tipus de càncer (50). També es va analitzar l'expressió d'HER3 i HER4 en les quatre línies però aquesta va ser inexistent (resultats no mostrats). S'ha suggerit que els nivells cel·lulars d'aquestes dues proteïnes no es troben relacionats amb la sensibilitat a gefitinib (50).



Figura 8: Expressió d'HER2 i pHER2 de les línies cel·lulars PC9 i PC9 resistents a gefitinib, després del tractament durant 72 hores amb la dosi IC_{50} de gefitinib

És conegut que aberracions al gen EGFR, com la mutació T790M, que aporten resistències a fàrmacs EGFR-TKI sobre-activen elements de les vies *downstream* d'EGFR, com la via PI3K/AKT i la via Ras/MAPK, de manera que s'estimulen processos pro-oncogènics com ara la proliferació cel·lular (27) i requereixen una dosi més alta de fàrmac per aconseguir efectes terapèutics. Les línies resistents a gefitinib PC9-GR4 i PC9-GR3 presenten una clara activació d'AKT i MAPK, a diferència de la línia sensible.

S'ha observat que en cèl·lules de càncer de pulmó resistents a gefitinib, però sense la mutació T790M, s'activa MAPK però s'inactiva la via PI3K/AKT quan es tracta amb gefitinib (54). Aquest resultat concorda amb el de la línia PC9-GR3, que presenta aquest genotip, i suggereix que pot haver-hi alguna alteració involucrada en la resistència *upstream* a la via Ras/MAPK.

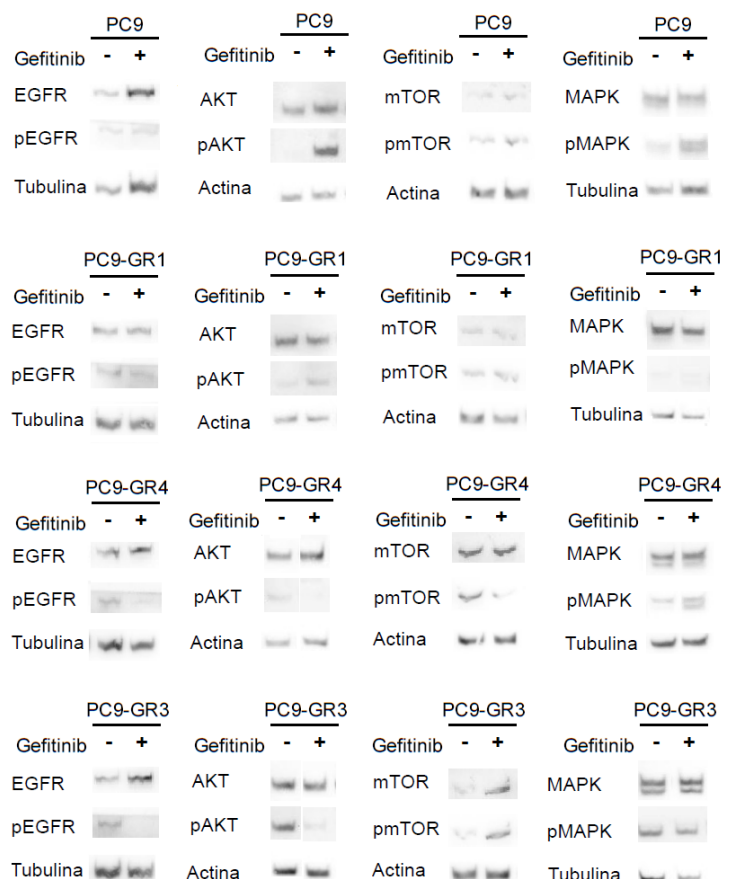


Figura 9: Proteïnes de vies de senyalització detectades per Western Blot. S'han tractat les línies cel·lulars PC9 i PC9 resistents a gefitinib durant 72 hores amb una dosi de gefitinib corresponent a la IC_{50} .

Efecte del gefitinib a 24 hores

S'han tractat les cèl·lules a 24 hores amb una dosi de fàrmac corresponent a la IC_{50} (calculada a 72 hores) i amb una dosi deu vegades superior a aquesta IC_{50} . En observar un efecte massa alt per poder estudiar l'expressió de les proteïnes en la línia PC9-GR3, es va baixar la dosi a una concentració equivalent a 5 vegades la IC_{50} .

Pel que fa a l'apoptosi, en les línies cel·lulars PC9, PC9-GR1 i PC9-GR3 el gefitinib continua induint aquest procés, cosa que es magnifica en el tractament amb $10 \times IC_{50}$, ja que s'observa una banda clara de 89 kDa, producte de l'escissió de PARP (Fig. 12). Sorprenentment, no s'evidencia aquesta banda en la línia PC9-GR4 tractada amb les dues dosis de gefitinib, a diferència de l'assaig a 72 hores. Probablement l'activació de les caspases en aquesta línia requereix més temps que a la resta i la poca intensitat de les bandes a 89 kDa, si n'hi ha, queden emmascarades per la intensitat de les altres.

El gefitinib fa disminuir clarament l'activació d'EGFR en la línia cel·lular PC9, tal com s'ha descrit en altres estudis (30,33,37) (Fig. 12). Aquesta línia presenta la via PI3K/AKT activada, però l'efecte d'una dosi alta de gefitinib ($10 \times IC_{50}$) provoca la seva inhibició, ja que la quantitat de pAKT disminueix, tot i que l'activació d'mTOR no es veu alterada amb el tractament. La via Ras/MAPK sembla activar-se quan es tracta amb IC_{50} , però quan s'incrementa la dosi de gefitinib la via queda completament inhibida, ja que no hi ha presència de pMAPK.

En general, aquests resultats concorden amb els que exposen Chaib *et al.* (37), segons els quals el gefitinib bloqueja la fosforilació d'EGFR, AKT i MAPK en la línia cel·lular PC9. A més, afegixen que aquesta tendència és dependent del temps i de la dosi. Els autors tracten les cèl·lules a 24 hores a diferents concentracions de gefitinib. S'observa que just entre la concentració de $0,02 \mu M$ i $0,05 \mu M$ (la IC_{50} utilitzada en els nostres assajos és de $0,03 \mu M$) és on hi ha l'activació i la defosforilació d'EGFR, MAPK i AKT, cosa que té un cert paral·lelisme amb el nostre assaig. Amb el tractament amb IC_{50} no hi ha efectes de defosforilació d'aquestes proteïnes, però quan s'incrementa la dosi sí que s'evidencia clarament com el gefitinib les inactiva. Per tant, en aquest cas també es pot afirmar que l'efecte del gefitinib depèn de la dosi. En canvi, segons els resultats obtinguts, l'efecte del gefitinib no depèn dels temps assajats en aquest estudi (72 i 24 hores). Per una mateixa concentració (IC_{50}), no sembla variar la quantitat de pEGFR, pAKT, pMAPK ni pmTOR, respecte als dos temps estudiats.

La línia cel·lular PC9-GR1 presenta la fosforilació d'EGFR reduïda quan es tracta amb el fàrmac (Fig. 12). La línia té la via PI3K/AKT activada, però el tractament amb la dosi $10 \times IC_{50}$ de gefitinib la inactiva, ja que no hi ha pAKT. En aquest cas, la via Ras/MAPK sí que es troba activada i el tractament amb la dosi més alta de gefitinib, com en la via PI3K/AKT, les inhibeix. Curiosament, no s'observen canvis en l'activació d'mTOR, tot i veure disminució en els nivells d'AKT activat.

La línia cel·lular PC9-GR4 també presenta les vies PI3K/AKT i Ras/MAPK activades. El tractament amb gefitinib fa disminuir l'activació de MAPK (Fig. 12). L'activació d'AKT disminueix amb el tractament amb la dosi IC_{50} , però, sorprenentment, la quantitat de pAKT torna a ser alta en el tractament amb $10 \times IC_{50}$, com en les cèl·lules sense tractar. De la mateixa manera, la quantitat de pEGFR es veu disminuïda en el tractament amb la dosi IC_{50} , però EGFR es manté activat en el tractament amb $10 \times IC_{50}$. La quantitat de pmTOR es manté igual.

La línia cel·lular PC9-GR3 presenta les vies PI3K/AKT i Ras/MAPK activades (Fig. 12). A mesura que augmenta la concentració de fàrmac tractat, disminueix la quantitat d'AKT i MAPK fosforilat. De la mateixa manera que succeeix en el tractament a 72 hores, aquí només es veu activat ERK2 i no ERK1. EGFR queda completament inactivat amb el tractament, tot i que els nivells totals d'EGFR també són menors a mesura que augmenta la dosi de gefitinib. En concordança amb la defosforilació d'AKT, el gefitinib també fa disminuir l'activació d'mTOR.

En els dos tractaments amb gefitinib, no sempre s'ha observat una correlació entre els nivells de pAKT i pmTOR en totes les línies. Existeixen mecanismes de regulació d'mTOR tant dependents com independents d'AKT (55). La proteïna mTOR també es pot veure regulada per la via Ras/MAPK, per la hipòxia i per vies que detecten els nivells energètics de la cèl·lula. Per exemple, quan l'energia cel·lular s'escgota, els nivells d'AMP són alts, cosa que fa activar la quinasa de fetge B1 (LKB1). Llavors, LKB1 fosforila la proteïna quinasa activada per AMP (AMPK), que funciona com un sensor de l'energia cel·lular i actua inhibint mTORC1 (55), un complex proteic que conté mTOR. Així, LKB1 es considera un supressor tumoral. S'ha observat que en adenocarcinoma de pulmó aquesta proteïna experimenta mutacions espontànies en un 30-50% dels casos (55). Per tant, la disfunció de LKB1 portaria a l'activació constitutiva d'mTOR, independentment de senyals *upstream* de la via PI3K/AKT.

En l'assaig a 24 hores, s'ha comptat amb el tractament amb una dosi alta de gefitinib ($10 \times IC_{50}$). En totes les línies cel·lulars estudiades, el fàrmac ha reduït la fosforilació d'EGFR, la seva diana. Aquest fet ha implicat la defosforilació d'AKT i de MAPK, cosa que indica que les vies PI3K/AKT i Ras/MAPK no es troben activades. Tot i això, l'activació d'mTOR, que pertany a la via PI3K/AKT, s'ha vist com a independent del tractament.

Efecte de G28 a 72 hores

El G28 inhibeix l'activitat de la sintasa d'àcids grassos i presenta activitat citotòxica amb cèl·lules de càncer de mama, fins i tot en cèl·lules amb resistència adquirida a fàrmacs anti-HER2 (46). Curiosament, en el cas de les cèl·lules de pulmó, s'observa com el G28 aconseguix reduir l'expressió de l'enzim en totes les línies cel·lulars estudiades. La figura 10 mostra com el tractament amb una dosi IC_{50} fa disminuir clarament la quantitat de FASN. S'ha vist que G28 inhibeix l'activitat FASN en càncer de mama HER2+, però els nivells d'expressió de l'enzim no es veuen modificats (46). En canvi, en les línies estudiades d'adenocarcinoma de pulmó, el G28 atenua els nivells d'expressió de FASN.

En les línies PC9, PC9-GR1 i PC9-GR3 s'observa la banda de PARP tallat a 89 kDa per acció de les caspases, indicant la inducció de l'apoptosi (Fig. 10). En el cas de la línia PC9-GR4, tot i que no s'observa una banda a 89 kDa, es pot observar com la banda a 116 kDa (PARP sencer) és menys intensa, indicant probablement l'activació de l'apoptosi de manera indirecta. Degut a la dificultat d'observar l'activitat de les caspases i al fet que presenta una sensibilitat pel fàrmac semblant a les altres línies, seria interessant considerar altres mecanismes de mort cel·lular com és l'autofàgia.

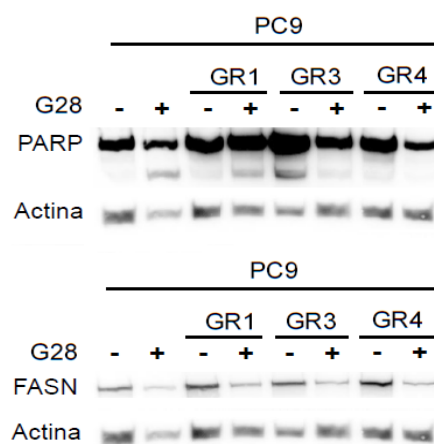


Figura 10: Expressió de FASN i PARP de les línies cel·lulars PC9 i PC9 resistents a gefitinib, després del tractament durant 72 hores amb la dosi IC_{50} de G28.

La línia cel·lular PC9 experimenta un lleuger augment de l'activació d'EGFR, gràcies al tractament amb G28 (Fig.11). La línia sensible no té la via PI3K/AKT activada, com s'ha observat en els altres assajos, però sembla activar-se lleugerament amb el tractament, ja que hi ha més quantitat de pAKT, tot i que l'activació d'mTOR es manté igual. La via Ras/MAPK es troba activada i el tractament amb G28 no hi té cap efecte.

A la línia PC9-GR1, el G28 fa augmentar la fosforilació d'EGFR (Fig.11). En concordança amb això, sembla ser que l'activació de la via PI3K/AKT augmenta una mica amb el tractament, ja que augmenta la quantitat de pAKT, encara que no hi ha canvis en la quantitat d'mTOR. En canvi, no sembla que G28 modifiqui l'activació de la via Ras/MAPK, que de per si és baixa.

A diferència de les línies cel·lulars comentades anteriorment, la línia PC9-GR4 no sembla que tingui la via PI3K/AKT activada per acció del G28, ja que el fàrmac no modifica la quantitat de pAKT (Fig.11). Curiosament, però, G28 redueix la fosforilació d' mTOR. El fàrmac tampoc fa variar l'activació de la via Ras/MAPK, però sí que provoca la inactivació d'EGFR.

L'efecte de G28 a línia PC9-GR3 provoca un increment de l'activació d'EGFR i una marcada disminució dels nivells de pAKT i d'mTOR, per la qual cosa, la via PI3K/AKT es veu inhibida (Fig.11). En canvi, el fàrmac causa una activació intensa de la via Ras/MAPK, ja que hi ha una quantitat gran de pMAPK., que sembla correspondre majoritàriament a ERK2.

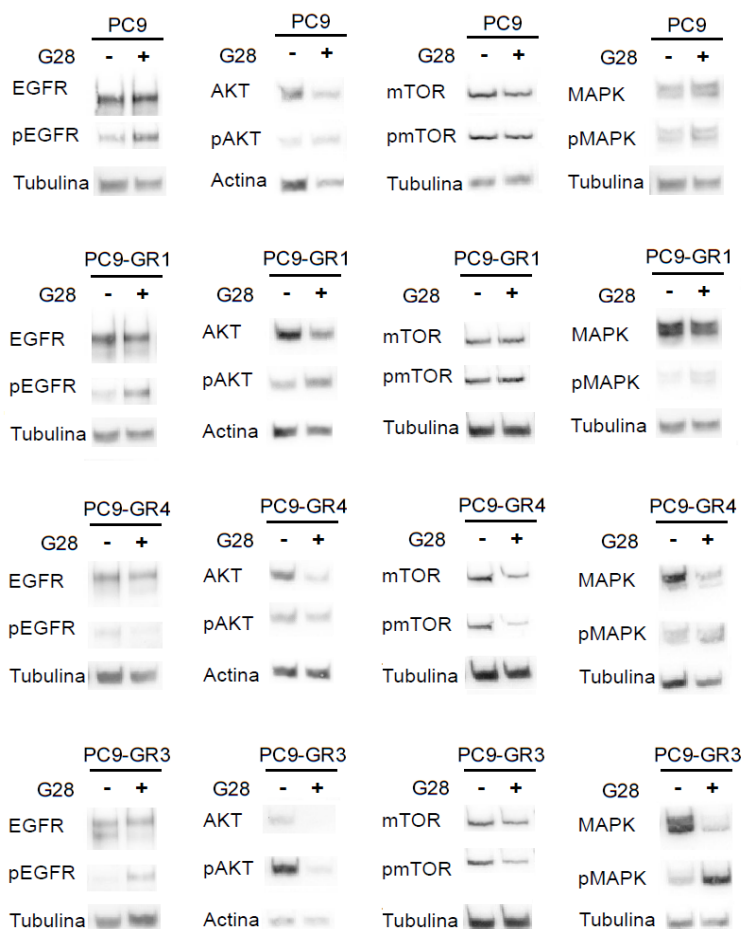


Figura 11: Proteïnes de vies de senyalització detectades per Western Blot. S'han tractat les línies cel·lulars PC9 i PC9 resistents a gefitinib durant 72 hores amb una dosi de G28 corresponent a la IC₅₀.

S'ha observat que el G28 indueix l'apoptosi i la defosforilació d'AKT, mTOR i MAPK en models xenoinjertats de càncer de mama HER2+ (46). S'ha demostrat com l'EGCG és capaç d'inhibir l'activació d'EGFR i, consegüentment, dels seus efectors *downstream*: AKT i MAPK en un model cel·lular de càncer de còlon (56).

En comparació amb aquest cas, només s'inhibeix pEGFR en la línia PC9-GR4 i en les altres línies, lluny d'atenuar-se, l'activació d'EGFR es veu reforçada. Les quinases representatives de cada via de senyalització estudiada també mostren un patró d'activació diferencial entre línies. En concordança amb els precedents en càncer de mama HER2+, el G28 inhibeix l'activació d'AKT i mTOR en les línies PC9-GR3 i PC9-GR4. En les línies PC9 i PC9-GR1 el fàrmac provoca, per contra, la defosforilació d'aquestes proteïnes. L'activació de via Ras/MAPK no es veu reduïda per l'efecte del fàrmac en cap línia, és més, en les línies PC9-GR3 i PC9-GR4 la via es troba sobre-activada.

L'activació d'EGFR per part de G28 es tradueix en l'activació de la via PI3K/AKT en les línies PC9 i PC9-GR1, però provoca la inhibició de la via en la línia PC9-GR3. Caldrà investigar els mecanismes d'acció del fàrmac en EGFR i perquè provoca efectes diferents en les línies estudiades.

Es creu que la regulació de FASN en cèl·lules tumorals està dirigida tant per la via PI3K/AKT com per la via Ras/MAPK, fet que s'ha confirmat en càncer de pròstata (40). En suport a això, s'ha vist un increment de la mort cel·lular quan es combinen inhibidors de FASN amb inhibidors de les vies relacionades amb FASN (45). A més, el G28 actua sinèrgicament amb fàrmacs anti-HER2 en models cel·lulars de càncer de mama HER2+ resistents a fàrmacs anti-HER2 (46). Aquests estudis i els resultats obtinguts en aquest treball mostren que seria interessant assajar la combinació de G28 i el gefitinib per comprovar si es produeix una acció sinèrgica, que aporti efectes anti-càncer complementaris.

Efecte de G28 a 24 hores

Amb 24 hores de tractament, totes les línies cel·lulars que han rebut la concentració més alta de G28 ($10 \times IC_{50}$) experimenten apoptosi, ja que s'evidencia la banda de 89 kDa, fruit de l'escissió de PARP (Fig. 12). En canvi, només les línies PC9 i PC9-GR1 entren en apoptosi quan es tracta amb IC_{50} durant 72 hores.

La línia cel·lular PC9 (Fig. 12) no presenta la via PI3K/AKT massa activada, però el tractament amb G28 fa augmentar-ne l'activació, ja que hi ha més quantitat de pAKT, tot i que sembla que l'activació d'mTOR es veu reduïda. La via Ras/MAPK no es troba activada en condicions de control i el fàrmac sembla activar-la lleugerament, ja que s'observa una quantitat residual de pMAPK. La línia sensible presenta activació d'EGFR però aquesta disminueix a mesura que augmenta la concentració de G28, al contrari del que succeeix al tractament a 72 hores. L'efecte de G28 en la línia sensible depèn del temps de tractament, ja que el tractament a 72 hores implica l'activació d'EGFR i vies derivades, a diferència del tractament a 24 hores. L'efecte de G28 no depèn de la dosi administrada, ja que les quantitats de les proteïnes assajades es mantenen igual.

La línia cel·lular PC9-GR1 experimenta una disminució de l'activació d'EGFR, a diferència del que passa en el tractament a 72 hores (Fig. 12). Aquesta línia presenta la via PI3K/AKT activada. El tractament amb la dosi IC_{50} de G28 fa augmentar-ne encara més l'activació, però, curiosament, aquesta disminueix consistentment quan s'aplica la dosi $10 \times IC_{50}$, a diferència del que succeeix en

el tractament a 72 hores. Malgrat que la quantitat de pAKT es veu reduïda, no s'observen canvis en la fosforilació d'mTOR. La via Ras/MAPK es troba activada i el tractament amb G28 fa disminuir-ne l'activació a mesura que augmenta la dosi.

La línia cel·lular PC9-GR4 presenta la via PI3K/AKT lleugerament activada i G28 inhibeix aquesta activació, cosa que es veu reflectida en el decrement de la quantitat de pAKT (Fig. 12). La fosforilació d'mTOR també es veu interrompuda per l'acció del G28. També s'observa la via Ras/MAPK activada, que s'inhibeix progressivament amb el tractament amb G28. Amb EGFR ocorre el mateix, el fàrmac fa disminuir-ne l'activació, al contrari del que passa en el tractament a 72 hores.

La línia PC9-GR3 també té la via PI3K/AKT activada i el G28 fa minvar-ne l'activació, ja que baixa la quantitat de pAKT i mTOR (Fig. 12). Succeeix el mateix amb la via Ras/MAPK, on s'observa una reducció en l'activació de MAPK, que com en el cas anterior només consta d'ERK2. El fàrmac també fa disminuir l'activació d'EGFR.

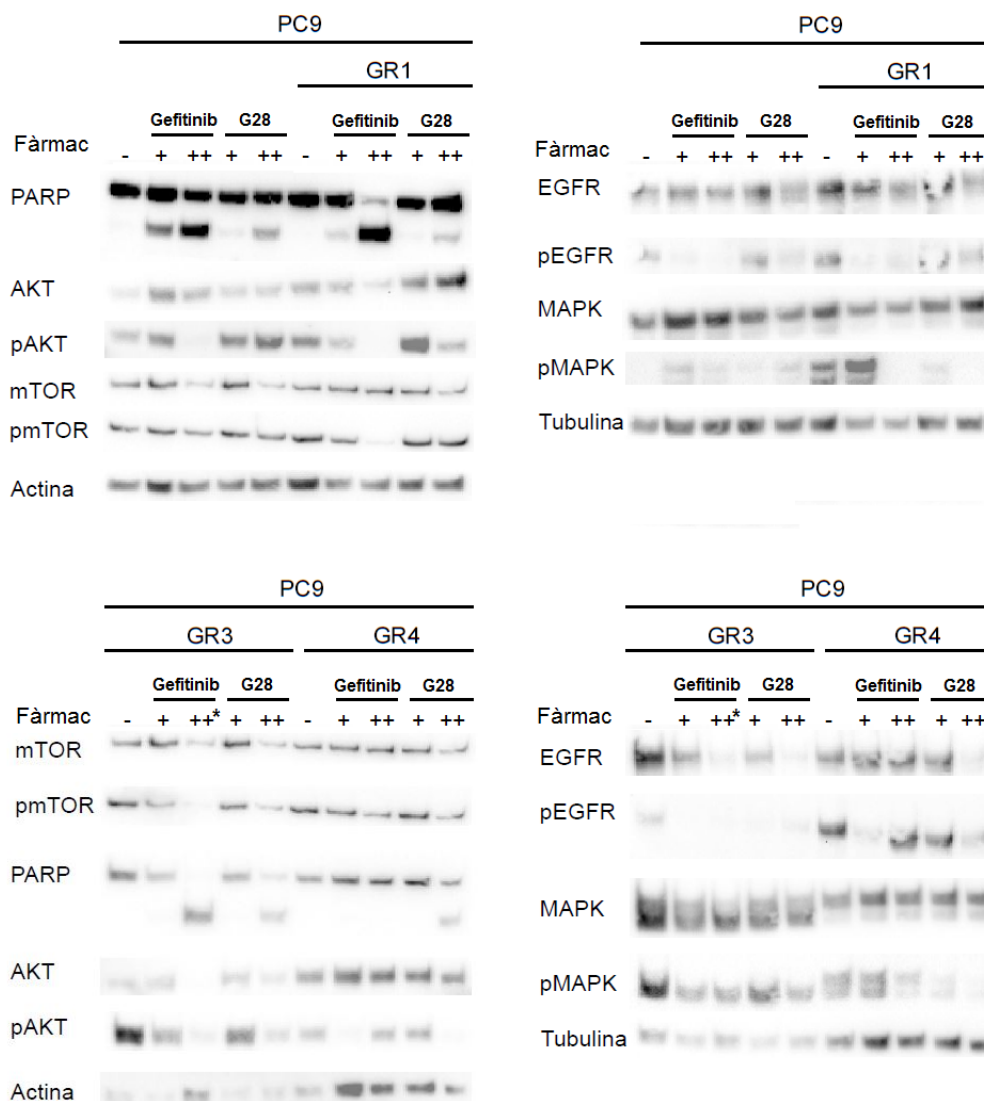


Figura 12: Proteïnes de vies de senyalització detectades per Western Blot. S'han tractat les línies cel·lulars PC9 i PC9 resistents a gefitinib durant 24 hores amb una dosi de gefitinib o de G28 corresponent a la IC_{50} (+) i a $10 \times IC_{50}$ (++) . Excepcionalment, la línia PC9-GR3 es tracta amb $5 \times IC_{50}$ (+++), en comptes de $10 \times IC_{50}$.

En cèl·lules AU565 de càncer de mama HER2+ tractades amb la IC₅₀ de G28 durant 24 hores s'ha vist la inducció de l'apoptosi i una disminució de l'activació de MAPK (46). En la línia cel·lular A549 d'adenocarcinoma de pulmó, s'ha comprovat també que el tractament a 24 hores amb la IC₅₀ de l'epigalat (EGCG), un polifenol natural a partir del qual es sintetitza el G28, també induïx l'apoptosi i evita l'activació d'AKT, MAPK, mTOR i EGFR (41). D'aquesta manera, Relat *et al.* (41) postulen que l'EGFR està involucrat en la regulació de FASN en un model cel·lular de càncer de pulmó que sobre-exprés EGFR. Els autors suggereixen que EGFR seria una altra diana de l'EGCG que, mitjançant la inhibició de quinases *downstream* de les vies de senyalització del receptor, és capaç de retenir l'expressió de FASN a nivell transcripcional i a nivell traduccional (41). En suport a això, com s'ha comentat anteriorment, s'ha vist que en un model cel·lular de càncer de còlon, l'EGCG és capaç d'inhibir EGFR i, per tant, les vies de senyalització derivades (56).

En general, podem dir que el gefitinib disminueix l'activació d'EGFR, la seva diana, en les línies PC9, PC-GR3 i PC9-GR4 i no té efecte en la línia PC9-GR1 quan es tracta amb una concentració equivalent a la IC₅₀ durant 72 hores. Considerant la quantitat de pAKT, la via PI3K/AKT es troba activada en totes les línies resistents a gefitinib. El fàrmac potencia aquesta via en les línies PC9 i PC9-GR1, però fa disminuir-ne l'activació en les línies PC9-GR3 i PC9-GR4, tot i que presenten l'EGFR activat. En canvi, malgrat pertànyer a la mateixa via de senyalització, pmTOR es manté igual en les línies PC9 i PC9-GR1 en aquestes mateixes condicions i augmenta en la línia PC9-GR3. La via Ras/MAPK es troba activada en totes les línies, excepte en la línia PC9-GR3 i es manté activada en totes les línies, després del tractament. Vist que EGFR es troba defosforilat, l'activació d'aquestes vies podria donar-se a través d'altres mecanismes independents d'EGFR. Una explicació possible seria la inactivació directa de les fosfatases específiques d'ERK, que porta a la hiperactivació de MAPK (57).

Per una altra banda, l'efecte del G28 en el tractament a 24 hores s'assembla al que defensen estudis previs sobre l'efecte del G28 en càncer de mama HER2+ (46) i en càncer de pulmó (41), tot i que en aquests estudis la dosi assajada és la IC₅₀ i en el present tractament la dosi comentada és la de 10xIC₅₀. Tot i això, els efectes de G28 observats en el tractament a 72 hores es mostren contraris sobretot en les línies PC9, PC9-GR1 i PC9-GR3.

En el tractament a 24 hores amb la dosi màxima de G28 resulta inhibir l'activació d'EGFR en totes les línies estudiades, fet que es tradueix en la inhibició de les vies cel·lulars PI3K/AKT i Ras/MAPK en les línies cel·lulars PC9 resistents a gefitinib. Curiosament, la línia sensible a gefitinib manté aquestes vies activades, malgrat la defosforilació d'EGFR, fet que podria ser degut a l'activació de les vies per mecanismes independents d'EGFR. A més, la fosforilació d'mTOR disminueix en aquesta línia. L'activació d'mTOR disminueix en les línies PC9-GR3 i PC9-GR4, en concordança amb la inhibició d'AKT, però es manté igual en la línia PC9-GR1 i puja en la línia PC9, fet que podria ser degut a mecanismes de regulació d'mTOR independents d'AKT (55).

CONCLUSIONS

- Gefitinib induces apoptosis into parental and resistant cell lines in all treatments assayed, except in the PC9-GR4 cell line (24 hours).
- Gefitinib reduces the phosphorylated form of EGFR, in parental and resistant cell lines at all treatments assayed, except in the PC9-GR1 cell line (72 hours). Thus, EGFR-related signaling pathways remain blocked in all cell lines treated with maximum dose for 24 hours. Surprisingly, the 72-hour treatment only blocked PI3K/AKT pathway in PC9-GR3 and PC9-GR4 cell lines. So, PC9 and PC9-GR1 cell lines signaling pathways may be activated by EGFR-independent mechanisms of activation.
- Absence of HER2, HER3 and HER4 proteins was noticed in all cell lines analysed.
- Gefitinib effect on PC9 cells is dose-dependent, and not time-dependent.
- G28 clearly blocks FASN expression levels and induces apoptosis in all cell lines analysed.
- G28 activates EGFR in PC9, PC9-GR1 and PC9-GR3 cell lines, but only the PI3K/AKT pathway becomes activated in PC9 and PC9-GR1 cell lines (72 hours). The maximum dose of G28 reduces phosphorylation of EGFR, thus PI3K/AKT and Ras/MAPK signaling pathways are inhibited, except in PC9 cell line (24 hours).
- G28 effect on PC9 cells is time-dependent, and not dose-dependent.
- Activation of Ras/MAPK pathway in the PC9-GR3 cell line appears to be represented by ERK2 activation, but not ERK1.
- In most cases, no correlation between pAKT and pmTOR levels has been identified, despite the fact that they both belong to PI3K/AKT signaling pathway. That may be due to AKT-independent mechanisms of mTOR regulation.

Further studies will be necessary to clarify the mechanisms of resistance to gefitinib of lung adenocarcinoma cells. Also, it will be interesting to assay the inhibition of FASN activity by G28. Moreover, the reported relation of PI3K/AKT signaling pathway on FASN regulation invites to assay the anticancer activity of gefitinib and G28 combination and check the potential synergetic effect.

BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. Cancer [Internet]. 2017. Disponible a: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
3. Macdonald F, Ford C, Casson A. *Molecular Biology of Cancer*. En: 2a ed. Nova York: Garland Science/BIOS Scientific Publishers; 2004.
4. American Cancer Society. What Causes Cancer? [Internet]. 2017. Disponible a: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-causes.html>
5. Cancer today IARC. Cancer fact sheets: lung cancer cancer [Internet]. 2012. Disponible a: <http://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers?cancer=11&type=0&sex=0>
6. UK CR. Lung cancer. Risks and causes. [Internet]. 2016. Disponible a: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/lung-cancer/risks-causes>
7. Yang IA, Holloway JW, Fong KM. Genetic susceptibility to lung cancer and co-morbidities. *Journal of Thoracic Disease*. 2013;5(SUPPL.5):S454-62.
8. American Lung Association. Lung Cancer Basics [Internet]. 2016. Disponible a: <http://www.lung.org/lung-health-and-diseases/lung-disease-lookup/lung-cancer/learn-about-lung-cancer/what-is-lung-cancer/lung-cancer-basics.html?referrer=http://www.lung.org/lung-health-and-diseases/lung-disease-lookup/lung-cancer/learn-about-lung-cancer/>
9. American Cancer Society. What Is Small Cell Lung Cancer? [Internet]. 2016. Disponible a: <https://www.cancer.org/cancer/small-cell-lung-cancer/about/what-is-small-cell-lung-cancer.html>
10. Canadian Cancer Society. Small cell lung cancer [Internet]. 2017. Disponible a: <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/lung/lung-cancer/small-cell-lung-cancer/?region=on>
11. Waqar SN, Morgensztern D. Treatment advances in small cell lung cancer (SCLC). *Pharmacology & Therapeutics*. Elsevier Inc.; 2017.
12. Tartarone A, Giordano P, Lerosé R, Rodriquenz MG, Conca R, Aieta M. Progress and challenges in the treatment of small cell lung cancer. *Medical Oncology*. 2017;34(6):110.
13. Hilal T. Current understanding and approach to well differentiated lung neuroendocrine tumors: an update on classification and management. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2017;9(3):189-99.
14. American Cancer Society. Treatment Choices by Stage of Small Cell Lung Cancer [Internet]. 2016. Disponible a: <https://www.cancer.org/cancer/small-cell-lung-cancer/treating/by-stage.html>
15. Hospital del Mar. Protocol de diagnòstic i tractament de càncer de pulmó [Internet]. Barcelona; 2013. Disponible a: http://www.parcdesalutmar.cat/mar/PROTOCOL_CANCER_PULMO_2013.pdf
16. American Cancer Society. Chemotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer [Internet]. 2016. Disponible a: <https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/treating/chemotherapy.html>
17. American Cancer Society. Treatment Choices for Non-Small Cell Lung Cancer, by Stage [Internet]. 2017. Disponible a: <https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/treating/by-stage.html//>

18. American Cancer Society. What Is Non-Small Cell Lung Cancer? [Internet]. 2016. Disponible a: <https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/about/what-is-non-small-cell-lung-cancer.html>
19. Canadian Cancer Society. Malignant tumours of the lung [Internet]. 2017. Disponible a: <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/lung/lung-cancer/non-small-cell-lung-cancer/?region=on>
20. Cell Signaling Technology. ErbB / HER Signaling Pathway [Internet]. 2016. Disponible a: <https://www.cellsignal.com/contents/science-pathway-research-tyrosine-kinase/erbb-her-signaling-pathway/pathways-erbb>
21. Arteaga CL, Engelman JA. ERBB receptors: From oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2014;6(9):2166-71.
22. Yarden Y, Shilo B-Z. SnapShot: EGFR Signaling Pathway. *Cell*. 2007;131(5):1018.e1-1018.e2.
23. Genentech USA. Explore PI3K-Akt-mTOR [Internet]. 2017. Disponible a: <https://www.bioncology.com/pathways/cancer-tumor-targets/pi3k.html>
24. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. Nova York: Garland Science; 2008. 928-930-1245 p.
25. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2014;4(April):1-11.
26. Genentech USA. Explore MAPK [Internet]. 2017. Disponible a: <https://www.bioncology.com/pathways/cancer-tumor-targets/mapk.html>
27. Wee P, Wang Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers*. 2017;9(5):52.
28. Roskoski RJ. ERK1 / 2 MAP kinases: Structure , function , and regulation. *Pharmacological Research*. 2012;66(2):105-43.
29. Shtivelman E, Hensing T, Simon GR, Dennis PA, Otterson GA, Bueno R, et al. Molecular pathways and therapeutic targets in lung cancer. *Oncotarget*. 2014;5(6):1392-433.
30. Liu T, Jin X, Wang Y, Wang K. Role of epidermal growth factor receptor in lung cancer and targeted therapies. *Am J Cancer Res*. 2017;7(2):187-202.
31. Armour AA, Watkins CL. The challenge of targeting egfr: Experience with gefitinib in nonsmall cell lung cancer. *European Respiratory Review*. 2010;19(117):186-96.
32. Pao W, Miller VA, Politi KA, Riely GJ, Somwar R, Zakowski MF, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Medicine*. 2005;2(3):0225-35.
33. Sharma S V, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(3):169-81.
34. Jänne PA, Yang JC-H, Kim D-W, Planchard D, Ohe Y, Ramalingam SS, et al. AZD9291 in EGFR Inhibitor-Resistant Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(18):1689-99.
35. National Cancer Institute. Gefitinib [Internet]. 2016. Disponible a: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/gefitinib>

36. Wang S, Cang S, Liu D. Third-generation inhibitors targeting EGFR T790M mutation in advanced non-small cell lung cancer. *Journal of Hematology & Oncology*. 2016;9(1).
37. Chaib I, Karachaliou N, Pilotto S, Codony Servat J, Cai X, Li X, et al. Co-activation of STAT3 and YES-Associated Protein 1 (YAP1) Pathway in EGFR-Mutant NSCLC. *Journal of the National Cancer Institute*. 2017;109(9):1-12.
38. England PH. ECACC General Cell Collection: PC-9 (formerly known as PC-14) [Internet]. 2017. Disponible a: https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=90071810&collection=ecacc_gc
39. Bertran-Alamillo J, Molina-Vila MA, Giménez-Capitán A, García-Román S, Aldeguer E, Rodríguez S, et al. Tumor cells with acquired resistance to EGFR inhibitors and overexpression or activation of AXL, MET and FGFR1 are insensitive to single-agent treatment targeting AXL, MET or FGFR. *En* 2016.
40. Puig T, Porta R, Colomer R. Sintasa de àcidos grasos como nueva diana antitumoral. *Medicina Clinica*. 2009;132(9):359-63.
41. Relat J, Blancafort A, Oliveras G, Cufí S, Haro D, Marrero PF, et al. Different fatty acid metabolism effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate and C75 in adenocarcinoma lung cancer. *BMC cancer*. 2012;12:280.
42. Flavin R, Peluso S, Nguyen P, Loda M. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncology*. 2010;6(4):551-62.
43. Liu H, Liu J-Y, Wu X, Zhang J-T. Biochemistry, molecular biology, and pharmacology of fatty acid synthase, an emerging therapeutic target and diagnosis/ prognosis marker. *Nano*. 2008;6(9):2166-71.
44. Puig T, Turrado C, Benhamú B, Aguilar H, Relat J, Ortega-Gutiérrez S, et al. Novel inhibitors of fatty acid synthase with anticancer activity. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(24):7608-15.
45. Oliveras G. Derivats del (-)-3-galat d'epigallocatequina com a nous inhibidors de la sintasa d'àcids grassos amb efectes antitumorals en models cel.lulars i animals de càncer de mama. *Universitat de Barcelona*; 2012.
46. Puig T, Aguilar H, Cufí S, Oliveras G, Turrado C, Ortega-Gutiérrez S, et al. A novel inhibitor of fatty acid synthase shows activity against HER2+ breast cancer xenografts and is active in anti-HER2 drug-resistant cell lines. *Breast cancer research : BCR*. 2011;13(6):R131.
47. Giró-Perafita A, Palomeras S, Lum DH, Blancafort A, Vinyas G, Oliveras G, et al. Preclinical Evaluation of Fatty Acid Synthase and EGFR Inhibition in Triple Negative Breast Cancer Abstract Purpose: Triple Negative Breast Cancer (TNBC) lacks an approved targeted. *Clinical Cancer Research*. 2016.
48. Bode J, Vidakovic M, Doetsch M, Gluch A, Poznanovic G. YY1-Binding Sites Provide Central Switch Functions in the PARP-1 Gene Expression Network. *PLOS*. 2012;7(8).
49. Visca P, Sebastiani V, Botti C, Diodoro MG, Lasagni RP, Romagnoli F, et al. Fatty Acid Synthase (FAS) is a Marker of Increased Risk of Recurrence in Lung Carcinoma. *Anticancer Research*. 2004;24:4169-73.
50. Ono M, Hirata A, Kometani T, Miyagawa M, Ueda S, Kinoshita H, et al. Sensitivity to gefitinib (Iressa, ZD1839) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with dependence on the epidermal growth factor (EGF) receptor/extracellular signal-regulated kinase 1/2 and EGF receptor/Akt pathway for proliferation. *Molecular cancer therapeutics*. 2004;3(4):465-72.

51. Sos ML, Koker M, Weir BA, Heynck S, Rabinovsky R, Zander T, et al. PTEN Loss Contributes to Erlotinib Resistance in EGFR-Mutant Lung Cancer by Activation of Akt and EGFR. *Cancer Research*. 2010;69(8):3256-61.
52. Lim DY, Shin SH, Lee M, Malakhova M. A natural small molecule, catechol, induces c-Myc degradation by directly targeting ERK2 in lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7(23).
53. American Type Culture Collection. SK-BR-3 [SKBR3] (ATCC® HTB-30™) [Internet]. 2016. Disponible a: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-30.aspx?geo_country=es#characteristics
54. Huang M, Lee J, Chang Y, Tsai H, Lin Y, Lin AM, et al. MEK inhibitors reverse resistance in epidermal growth factor receptor mutation lung cancer cells with acquired resistance to gefitinib. *Molecular oncology*. 2012;7:112-20.
55. Memmott RM, Dennis PA. Akt-dependent and independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cellular signalling*. 2009;21(5):656-64.
56. Shimizu M, Deguchi A, Lim JE, Moriwaki H, Kopelovich L, Weinstein IB. (-)-Epigallocatechin Gallate and Polyphenon E Inhibit Growth and Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor and Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 Signaling Pathways in Human Colon Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(8):2735-47.
57. Kar S, Adachi T, Carr BI. EGFR-Independent Activation of ERK1 / 2 Mediates Growth Inhibition by a PTPase Antagonizing K-Vitamin Analog. 2002;364(October 2001):356-64.
58. Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nature Reviews*. 2006;5(August):671-88.