

**Títol del treball:**

**Ligandos autocrinos en la resistència a erlotinib del  
càncer pancreàtic**

---

Estudiant: Andrés Gámez García-Cervigón

Grau en Biotecnología

Correu electrònic: [aggc96@gmail.com](mailto:aggc96@gmail.com)

Tutor: Rafael de Llorens Duran

Cotutor\*:

Empresa / institució: Departament de Biologia de la Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor\*):

Nom del tutor: Rafael de Llorens Duran

Nom del cotutor\*:

Empresa / institució: Departament de Biologia de la  
Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): [rafael.llorens@udg.edu](mailto:rafael.llorens@udg.edu)

\*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 20/07/18

## Resumen

El adenocarcinoma pancreático es uno de los tumores sólidos con peor pronóstico. Su creciente incidencia la proyecta a constituir la segunda causa de muertes relacionadas con el cáncer a partir de 2030. El autoabastecimiento de factores de crecimiento y la desregulación de las vías de señalización de receptores ErbB han demostrado jugar un papel fundamental en su etiología. Uno de los mecanismos utilizados por la célula tumoral para la activación aberrante de esta familia de receptores consiste en la secreción autocrina de ligandos de la familia EGF. En los últimos años han surgido terapias dirigidas contra receptores ErbB que, sin embargo, no se han mostrado eficaces en tumores pancreáticos. La sobreexpresión de receptores ErbB y sus ligandos ha demostrado una participación vital en la resistencia adquirida a estas terapias.

En el presente estudio nos propusimos evaluar la contribución de este fenómeno a la tumorigénesis del cáncer pancreático y a la insensibilidad a inhibidores de EGFR/ErbB1. Con este fin, utilizamos cuatro modelos celulares de cáncer pancreático (AsPc-1, BxPc-3, Capan-1 y HPAF-II) y evaluamos su sensibilidad al inhibidor de EGFR erlotinib, fármaco aprobado por la FDA para el tratamiento de adenocarcinomas pancreáticos en combinación con gemcitabina. Determinamos la expresión de receptores ErbB mostrada por cada línea y escogimos dos de ellas (BxPc-3 y HPAF-II) para analizar por RT-PCR la expresión génica de tres ligandos de la familia EGF (NRG-1, EPR y TGF- $\alpha$ ), antes y después de ser tratadas con erlotinib.

La inhibición de EGFR resultó rápidamente en un aumento en la expresión de los ligandos EPR y TGF- $\alpha$  en BxPc-3, mientras que en HPAF-II se produjo una reducción en la expresión de ambos factores de crecimiento. En conjunto, nuestros resultados demuestran que el tratamiento con erlotinib induce un cambio en la expresión génica de células de cáncer pancreático, lo que les confiere un mecanismo de resistencia adquirida previamente no reconocido que les permite escapar al efecto citostático del fármaco.

## Resum

L'adenocarcinoma pancreàtic es un dels tumors sòlids amb pitjor pronòstic. La seva creixent incidència el projecta a constituir la segona causa de mort relacionada amb el càncer a partir de 2030. L'autoavastiment de factors de creixement i la desregulació de les vies de senyalització de receptors ErbB han demostrat jugar un paper fonamental en la seva etiologia. Un dels mecanismes utilitzats per la cèl·lula tumoral per a l'activació aberrant d'aquesta família de receptors consisteix en la secreció autocrina de lligands de la família EGF. Als últims anys han sorgit teràpies dirigides contra ErbBs que, no obstant, no s'han mostrat eficaces en tumors pancreàtics. La sobreexpressió de receptors ErbB i els seus lligands ha demostrat una participació vital en la resistència adquirida a aquestes teràpies.

En el present estudi ens vam proposar avaluar la contribució d'aquest fenomen a la tumorigènesi del càncer pancreàtic i a la insensibilitat a inhibidors d'EGFR/ErbB1. Amb aquesta finalitat, vam emprar quatre models cel·lulars de càncer pancreàtic (AsPc-1, BxPc-3, Capan-1 i HPAF-II) i vàrem avaluar la seva sensibilitat a l'inhibidor d'EGFR erlotinib, fàrmac aprovat per la FDA pel tractament d'adenocarcinomes pancreàtics en combinació amb gemcitabina. Vam determinar l'expressió de receptors ErbB mostrada per cada línia i en vam escollir dues d'elles (BxPc-3 i HPAF-II) per analitzar per RT-PCR l'expressió gènica de tres lligands de la família EGF (NRG-1, EPR i TGF- $\alpha$ ), abans i després de ser tractades amb erlotinib.

La inhibició d'EGFR va resultar ràpidament en un augment de l'expressió dels lligands EPR i TGF- $\alpha$  en BxPc-3, mentre que en HPAF-II es va produir una reducció en la expressió d'ambdós factors de creixement. En conjunt, els nostres resultats demostren que el tractament amb erlotinib indueix un canvi en l'expressió gènica de cèl·lules d'adenocarcinoma pancreàtic, el que els confereix un mecanisme de resistència adquirida prèviament no reconegut, que els permet escapar a l'efecte citostàtic del fàrmac.

## Abstract

Pancreatic adenocarcinoma is one of the solid tumors with poorest prognosis. Its growing incidence projects it to be the second cause of cancer-related deaths after 2030. Self-sufficiency of growth factors and deregulation of ErbB receptors signaling pathways have been shown to play a fundamental role in its etiology. One of the mechanisms used by the tumor cell for the aberrant activation of this family of receptors is the autocrine secretion of EGF-related ligands. In the last years, therapies targeting ErbB receptors have emerged, but they have shown limited efficacy in pancreatic cancer. The overexpression of ErbB receptors and their ligands has demonstrated a critical participation in acquired resistance to these therapies.

In the present study, we aimed to evaluate the contribution of this phenomenon to the tumorigenesis of pancreatic cancer and insensitivity to EGFR inhibitors. To this end, we used four pancreatic cancer cell lines (AsPc-1, BxPc3, Capan-1 and HPAF-II) and evaluated its sensitivity to EGFR inhibitor erlotinib, an FDA-approved drug for the treatment of pancreatic adenocarcinomas in combination with gemcitabine. We determined the expression of ErbB receptors shown by each cell line and chose two of them (BxPc-3 and HPAF-II) to analyze by RT-PCR the gene expression of three EGF-related ligands (NRG-1, EPRR and TGF- $\alpha$ ), prior and after treatment with erlotinib.

EGFR inhibition rapidly produced an enhanced expression of EPR and TGF- $\alpha$  ligands in BxPc3, while HPAF-II downregulated both growth factors. Taken together, our findings demonstrate that treatment with erlotinib induces a change in gene expression of pancreatic cancer cell lines, which confers them a previously unrecognized mechanism of acquired resistance, allowing them to evade the cytostatic effects of this drug.

## Agradecimientos

A Rafael de Llorens, por haberme dado la oportunidad de crecer como científico en una medida que no podría haber imaginado, en medio de este fascinante proyecto. No te podría estar más agradecido, tus ideas condicionarán el resto de mi carrera.

A Anna Massaguer, mi más sincera gratitud por su inestimable ayuda en el diseño y desarrollo experimental y en el tratamiento e interpretación de resultados. Te estoy verdaderamente agradecido por la inmensa cantidad de tiempo dedicado y la confianza que has depositado sobre mí, así como el gran nivel de responsabilidad y autonomía que me has permitido obtener durante este proyecto. Has sido un eje fundamental en el establecimiento de las bases de un científico en potencia.

A Esther Llop, por su gran colaboración en el diseño y análisis de las RT-PCRs. Este trabajo no habría sido lo mismo de no ser por ti. Al resto del grupo de Bioquímica del cáncer les agradezco haberme aconsejado y prestado ayuda siempre que me ha sido necesario.

A Silvia Granollers y Marc Danti. A Silvia le agradezco haber sido testigo y partícipe fundamental de los años más determinantes en la evolución de un fenotipo cambiante. Las generalidades deben ser abordadas lateralmente, sin que se note, y no siempre es fácil detectar el grado de influencia que se ejerce sobre los que te rodean. Me has obligado sin compasión a desmontar tantas ideas que hoy son todo replanteamientos. A Marc, por haberme abierto los ojos. Hay todo un mundo más allá de la inquietud y la pretensión de conocimiento. A veces surgen lazos magníficos en medio de todo ese indeterminismo.

A mis padres, por haberme apoyado y sustentado incondicionalmente. Por permitirme haber tenido la oportunidad que muchas personas más valiosas que yo quizá nunca tendrán. Nada de esto habría sido posible sin vosotros.

Y, por supuesto, a Lorenzo Gámez. Por haber abocado luz sobre un ser inquieto y voluble desde que me alcanza la memoria. Puede que la música y la ciencia sean mutuamente excluyentes, pero el pragmatismo racional y el idealismo visceral deben entenderse para rozar la virtud.

Contáis todos con mi mayor aprecio, respeto y admiración.

## Contenidos

<b>I.</b>	<b>Introducción</b>	1
1.1.	Bases moleculares del adenocarcinoma pancreático	1
1.2.	Protein-quinasas en cáncer	2
1.3.	La familia del Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFR)	3
1.3.1.	Ligandos de ErbB	3
1.3.2.	Activación de receptores ErbB	4
1.3.3.	Funciones de la familia ErbB en tejidos normales	5
1.3.4.	Familia ErbB en cáncer pancreático	6
1.4.	Terapias dirigidas contra EGFR	7
1.5.	Mecanismos de resistencia	7
1.6.	Bucles autocrinos y resistencia	9
<b>II.</b>	<b>Objectives</b>	10
<b>III.</b>	<b>Materiales y métodos</b>	11
3.1.	Líneas celulares y cultivo celular	11
3.2.	Reactivos	11
3.3.	Análisis estadístico	11
3.4.	Ensayo de confluencia	11
3.4.1.	Ensayo de proliferación MTT	12
3.5.	Protocolo del ensayo de proliferación MTT	12
3.6.	Western Blot	13
3.6.1.	Obtención de lisados celulares	13
3.6.2.	Ensayo de cuantificación de proteínas totales por Bradford	14
3.6.3.	Protocolo Western Blot	14
3.6.4.	Stripping	15
3.7.	RT-PCR	16
3.7.1.1.	Extracción de RNA	17
3.7.1.2.	Factores críticos en el trabajo con RNA	17
3.7.2.	Protocolo de extracción de RNA	17
3.7.3.	Reacción de retrotranscripción	18
3.7.4.	Protocolo RT-PCR	19
3.8.	Criterios éticos y sostenibilidad	19
<b>IV.</b>	<b>Resultados</b>	20
4.1.	Sensibilidad a erlotinib	20
4.2.	Análisis comparativo del nivel de expresión de receptores ErbB en líneas celulares de PaC	21
4.3.	Patrón de expresión génica de los ligandos de la familia EGF	22
<b>V.</b>	<b>Discusión</b>	24
5.1.	Papel de la heterogeneidad tumoral en resistencia	24
5.2.	Expresión basal de NRG-1, EPR y TGF- $\alpha$ en BxPc-3 y HPAF-II	25
5.3.	Alteración del patrón de expresión de ligandos de la familia EGF como mecanismo de resistencia adquirida	26
<b>VI.</b>	<b>Future perspectives and concluding remarks</b>	27
6.1.	General conclusions	27
6.2.	Future perspectives and concluding remarks	28
<b>VII.</b>	<b>Referencias</b>	29

## I. INTRODUCCIÓN

---

Con un pronóstico extremadamente pobre y una tasa de supervivencia a 5 años inferior al 5%, el cáncer pancreático (PaC) constituye actualmente la cuarta causa de muerte asociada al cáncer en los países occidentales industrializados [1, 2]. Se estima que para 2030, el PaC supondrá la segunda causa de muertes asociadas al cáncer, lo que lo convierte en un enorme problema social y sanitario [3].

Múltiples factores contribuyen a la agresividad del tumor y a su pobre pronóstico. En primer lugar, el PaC se caracteriza por un elevado potencial metastásico y una rápida progresión y diseminación tumoral. Segundo, la ausencia de síntomas tempranos y marcadores séricos que permitan un diagnóstico temprano hacen que el tumor sea frecuentemente detectado cuando se encuentra ya en estadios localmente avanzados o metastásicos [1, 4, 5]. Finalmente, las células tumorales de PaC son insensibles a quimio, radio e inmunoterapias, lo que hace que actualmente la única posibilidad de cura sea la resección quirúrgica [3]. Por tanto, existe una urgente necesidad de desarrollar nuevas estrategias de diagnóstico temprano y terapias dirigidas que mejoren la efectividad de las actuales.

Durante las últimas décadas se ha dedicado un gran esfuerzo al entendimiento de las bases moleculares del cáncer de páncreas. En este tiempo se han venido definiendo una serie de sellos distintivos del cáncer (*Hallmarks of cancer*, originalmente propuestos por Hanahan y Weinberg), incluyendo la desregulación de la maquinaria de control del ciclo celular; insensibilidad a señales inhibitoras del crecimiento; autosuficiencia en señales proliferativas por autoabastecimiento de factores de crecimiento; evasión de la apoptosis; invasión tisular; metástasis; y angiogénesis sostenida [6]. Todos ellos son característicos del fenotipo maligno de las células de PaC y contribuyen a la progresión del tumor [7].

### I.1. Bases moleculares del adenocarcinoma pancreático

Varios factores limitan la aplicación del estudio de las bases moleculares de la tumorigénesis en el diseño de terapias dirigidas contra determinados tipos de cáncer. En primer lugar, detrás de la etiología de cualquier tumor subyace una matriz extremadamente compleja de anormalidades bioquímicas que imposibilitan la reducción del problema a unos pocos responsables moleculares [7]. En segundo lugar, la práctica totalidad de casos de cáncer se caracteriza por una considerable heterogeneidad intratumoral, genotípica y fenotípicamente hablando: a partir de una célula común surgen múltiples clones distintos, lo que dificulta su estudio y tratamiento [8]. Tercero, la célula tumoral no es en absoluto fenotípicamente estática. En cambio, se caracteriza por una exquisita capacidad de adaptación, que con frecuencia resulta en la aparición de mecanismos de resistencia frente a casi cualquier terapia que se le aplique [9]. Finalmente, los resultados obtenidos por diferentes grupos a menudo son controvertidos, poco reproducibles y carentes de homogeneidad [10].

No obstante, en las últimas décadas se han detectado múltiples alteraciones de una relevancia crítica en la patogénesis del PaC, producto de (i) mutaciones en determinados genes, (ii) modificaciones epigenéticas y/o (iii) expresión génica aberrante, incluyendo la sobreexpresión y el silenciamiento de genes concretos. La ocurrencia concomitante de estos defectos puede resultar en ganancia o pérdida de funciones, desregulación de la actividad de determinados enzimas, sobreactivación o inhibición de determinadas vías de señalización y un largo etcétera de consecuencias bioquímicas que, en última instancia, pueden derivar en el surgimiento del fenotipo maligno [6, 7].

En este contexto, los oncogenes y los genes supresores de tumor (TSGs) son responsables primarios de tales anomalías bioquímicas. Los primeros surgen como resultado de mutaciones somáticas en genes

normales (proto-oncogenes) que regulan procesos como la progresión del ciclo celular [1, 7]. En consecuencia, el producto proteico queda alterado, de tal forma que presenta un aumento en su actividad o permanece constitutivamente activado –debido a la desregulación de mecanismos supresores o de su capacidad de unión a determinados sustratos [11]. En PaC y otros tumores, el oncogén más frecuente es K-Ras [4, 12]. Codifica por un miembro de la familia Ras de proteínas de unión a GTP que, siguiendo el ciclo de las GTPasas, transduce señales intracelulares emitidas bajo activación por tirosin-quinazas de membrana plasmática que juegan un rol fundamental en la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Diferentes mutaciones provocan su activación constitutiva, lo que resulta en señalización desmedida e independiente de los receptores que lo activan [13].

En contraste, los TSGs codifican por proteínas que inhiben procesos como la proliferación, estableciendo muchos de ellos puntos de control que, de no ser superados, detienen el ciclo celular. Mutaciones, deleciones y silenciamientos epigenéticos de estos pueden afectar o eliminar su función reguladora, aumentando la capacidad metastásica del tumor [9]. Entre los más destacados en PaC se encuentran p16 y p53 [7].

Pero, además de defectos en estos dos grandes grupos de genes, en PaC ocurre, como en la mayoría de tipos de cáncer, la sobreexpresión de múltiples factores de crecimiento y sus receptores, con una contribución esencial al fenotipo maligno [12]. Tres de los ejemplos más recurrentes de este tipo de defectos metabólicos ocurren con los factores de crecimiento de la familia EGF (*Epidermal growth factor*); TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor beta*), VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) y sus respectivos receptores. Una compleja perturbación de tales factores y receptores provoca una ventaja proliferativa diferencial que en PDAC deriva en una rápida progresión tumoral [10]. En conjunto, estas y muchas otras alteraciones bioquímicas constituyen una compleja red de defectos metabólicos que contribuyen colaborativa y sinérgicamente a la progresión, mantenimiento y supervivencia del tumor, lo que limita la efectividad de terapias dirigidas contra dianas tumorales específicas.

## **1.2. Protein-quinazas en càncer**

Con más de 500 miembros, las protein-quinazas constituyen una de las mayores familias del genoma humano [15]. Se trata de enzimas que funcionan como eje vertebrador en la práctica totalidad de los mecanismos que determinan la biología molecular de la célula, catalizando la transferencia de grupos fosfato a residuos específicos de sus sustratos, en un proceso conocido como fosforilación [1].

Participan en la regulación de la apoptosis, la progresión del ciclo celular, diferenciación, reordenamientos del citoesqueleto, desarrollo, la respuesta inmune y la transcripción, entre otros. Su importancia en la transducción de señales las convierte en moléculas especialmente susceptibles de provocar patologías, como ocurre en numerosos desórdenes autoinmunes, cardiovasculares, inflamatorios y nerviosos, así como diabetes y cáncer. En consecuencia, múltiples protein-quinazas han sido propuestas y validadas como atractivas dianas farmacológicas, lo que las ha puesto en el punto de mira de la investigación biomédica durante las últimas décadas [15, 16].



### I.3. La familia del Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFR)

La familia ErbB/HER de receptores tirosín-quinasa (en adelante, RTKs) está constituida por cuatro miembros, glucoproteínas transmembrana con pesos moleculares entre 170 y 185 kDa [17] que participan en la regulación de la apoptosis, la progresión del ciclo celular, diferenciación celular y desarrollo embrionario, entre otros procesos. Asimismo, contribuyen a la etiología de un notable número de patologías comunes, entre las cuales prevalecen varios tipos de cáncer [18]. Su relevancia en tal número de procesos celulares de primera importancia ha convertido a la familia ErbB en uno de los módulos de señalización celular más estudiados en biología [19].

La familia ErbB incluye cuatro receptores: (i) EGFR/ErbB1/HER1, (ii) ErbB2/HER2/Neu, (iii) ErbB3/HER3 y (iv) ErbB4/HER4. Los cuatro se encuentran ubicuamente expresados, aunque con diferentes tasas, en células epiteliales, mesenquimales, cardíacas y neurales, así como en sus progenitores neurales [18]. Estructuralmente, los RTKs de la familia ErbB consisten en un dominio N-terminal extracelular cuya estructura está poco conservada entre los cuatro miembros de la familia; un único segmento transmembrana; y una porción citoplasmática C-terminal altamente conservada [20, 21].

El segmento extracelular o ectodominio se caracteriza por estar glucosilado y ser rico en cisteínas. Es responsable de la unión de ligandos de la familia EGF y la formación de homo- y heterodímeros con otros receptores de la familia ErbB [17, 20]. Las diferencias estructurales que presentan los cuatro receptores de la familia determinan su capacidad para unir con diferente afinidad ligandos de distinta naturaleza, lo que permite diversificar la respuesta [22]. Hasta la fecha no se han encontrado ligandos capaces de unirse a HER2, por lo que es considerado un receptor *huérfano* [23].

La porción citoplasmática de los receptores ErbB contiene un segmento yuxtamembrana, seguido por un dominio tirosín-quinasa que posee varios residuos tirosina fosforilables, y finalmente una cola carboxiterminal, que presenta también una serie de residuos tirosina susceptibles de ser fosforilados. Mientras que los residuos catalíticamente importantes de esta región están conservados entre ErbB1/2/4, cuyos dominios tirosin-quinasa son estructuralmente muy parecidos, el gen ERBB3 presenta una serie de sustituciones que reducen críticamente su actividad tirosín-quinasa [17].

#### I.3.1. Ligandos de ErbB

Múltiples agonistas solubles, agrupados bajo la familia del factor de crecimiento epidermal (EGF), han demostrado capacidad para provocar la activación de las vías de señalización que comienzan en receptores ErbB. Se trata de factores de crecimiento polipeptídicos estructural y funcionalmente muy similares entre sí [16, 17, 24]. Todos ellos se expresan como proteínas precursoras unidas a membrana

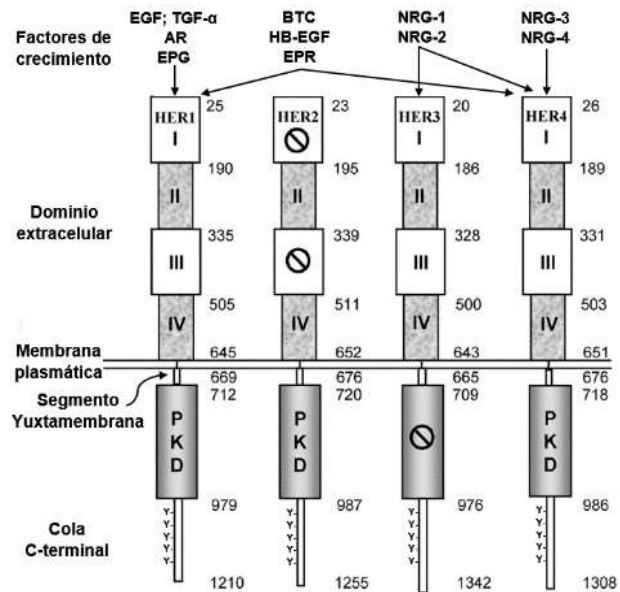


Figura 1. Estructura de los receptores ErbB humanos esquematizada. Los números indican los residuos abarcados por cada segmento. Los dominios extracelulares I y III son responsables de la unión a ligando, excepto en HER2 (indicado con el símbolo Stop). El dominio quinasa (PDK) de HER3, marcado con el símbolo Stop, es catalíticamente poco activo. La cola C-terminal presenta varios residuos tirosina (Y) que pueden ser fosforilados. Los residuos tirosina no aparecen representados a escala. Se muestran también los factores de crecimiento capaces de unirse a cada receptor. Figura adaptada de ref. [20].

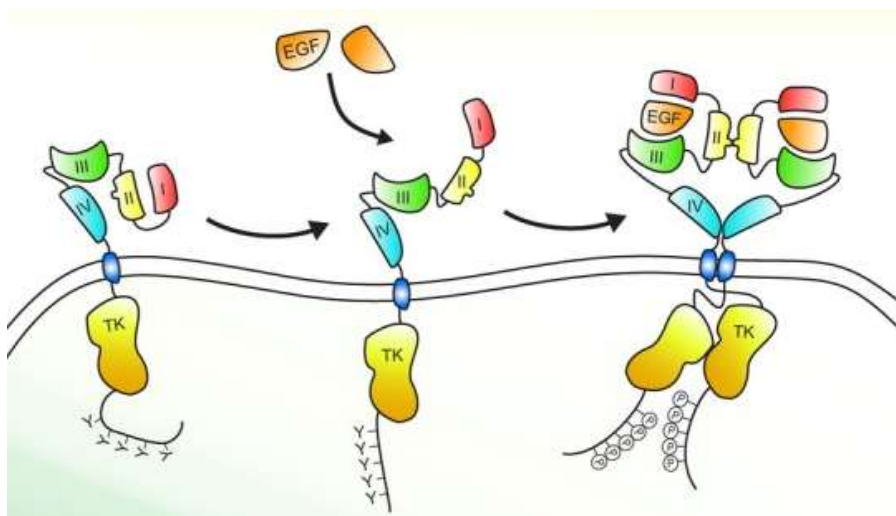
plasmática, en cuyo segmento extracelular está contenido el fragmento correspondiente al factor de crecimiento [25]. Los responsables de proteolizar a estos precursores son miembros de la familia ADAMs de metaloproteasas [26]. La necesidad de sufrir esta modificación post-traducciona constituye un mecanismo de regulación de la actividad de estos ligandos, que una vez liberados actúan típicamente de forma autocrina, paracrina o yuxtacrina sobre receptores de la familia ErbB de la propia célula secretora o de células próximas a esta [27].

Basándose en su especificidad de unión a receptores ErbB, los ligandos de la familia EGF se clasifican en 4 grupos [20]:

- (i) EGF; amfirregulina (AR); epígeno (EPG); y el factor de crecimiento transformador alfa (TGF- $\alpha$ ) se unen exclusivamente a EGFR. EGF y TGF $\alpha$  son considerados los principales ligandos de EGFR [17];
- (ii) Betacelulina (BTC); epirregulina (EPR); y factor de crecimiento del tipo EGF de unión a heparina (HB-EGF) se unen a EGFR y ErbB4;
- (iii) Las neuregulinas (NRGs) 1 y 2 se unen a ErbB3 y ErbB4;
- (iv) NRG-3 y NRG-4 se unen exclusivamente a ErbB4.

Como ocurre con el resto de RTKs, los receptores de la familia ErbB deben dimerizar con otro monómero de la familia para funcionar. Los cuatro receptores de la familia presentan mecanismos autoinhibitorios que los mantienen inactivos en condiciones no estimuladas. En tales condiciones, el equilibrio que determina la dinámica de su plegamiento estabiliza la conformación “cerrada” (*tethered state*), incapaz de dimerizar y catalíticamente quasi-inactiva. En ella, el segmento del ectodominio responsable de iniciar la dimerización (brazo de dimerización) se encuentra totalmente cubierto bajo la estructura de la proteína, lo que imposibilita su interacción con otros receptores [17, 28].

La unión de un ligando al ectodominio de su correspondiente receptor desencadena un gran cambio conformacional en el receptor que se propaga a su fracción intracelular [23]. Como resultado, el equilibrio conformacional del receptor se desplaza hacia el estado abierto (*untethered*), que queda estabilizado por esta interacción. Durante la transición al estado abierto se rompen las fuerzas intramoleculares que mantenían encerrado al brazo de dimerización del receptor, que queda ahora expuesto. Este cambio conformacional permite la interacción con el brazo de dimerización expuesto de otro receptor de la familia, unido también a ligando [17].



**Figura 2.** Mecanismo de dimerización de los receptores ErbB1/3/4. La unión de un ligando al dominio III provoca la exposición del brazo de dimerización del dominio II, permitiendo la interacción con otro receptor ErbB unido a ligando. La formación del dímero asimétrico resulta en la fosforilación (P) de residuos tirosina (Y) de la cola C-terminal. Imagen recuperada de ref. [23].

Este mecanismo es aplicable a ErbB1/3/4, mientras que el brazo de dimerización de ErbB2 está constitutivamente expuesto, lo que lo convierte en el compañero de dimerización preferido por los otros tres receptores de la familia. En cambio, la formación de homodímeros funcionales ErbB2-ErbB2 está desfavorecida y es poco probable, salvo sobreexpresión de ErbB2, lo que constituye un mecanismo adicional de regulación de la familia ErbB [20].

### 1.3.2. Activación de receptores ErbB

El mecanismo de activación de los receptores ErbB es exclusivo de su familia. Ocurre mediante la formación de un dímero asimétrico que provoca la activación alostérica del dominio tirosin-quinasa de ambos receptores del dímero [29]. Como consecuencia, se produce la *trans*-autofosforilación de residuos específicos de sus colas terminales [30]. Estos residuos, una vez fosforilados son capaces de unir determinadas proteínas adaptadoras, desencadenando de este modo diferentes cascadas de señalización [17]. Tales cascadas consisten en múltiples vías que transmiten la información desde la superficie celular hasta el núcleo, provocando la regulación positiva de genes responsables de la proliferación, supervivencia y diferenciación celular [23].

La diversidad combinatoria de receptores ErbB resulta en una versatilidad de respuesta remarcable en la que a partir de unos pocos genes se pueden obtener cientos de combinaciones potencialmente posibles, generando una compleja red de respuestas diferentes. En los últimos años, varios autores han venido proponiendo que interacciones de diferentes ligandos con el mismo receptor provocan diferentes cambios conformacionales. Por consiguiente, se obtienen respuestas de diferente intensidad [31-33]. Freed et al. [22] fueron más allá, postulando que estas interacciones diferenciales provocan la fosforilación de distintos residuos; activando vías de señalización diferentes y, en consecuencia, respuestas biológicas distintas. Por tanto, la naturaleza del ligando no solo determinaría la respuesta cuantitativamente, sino también cualitativamente.

Pero la fosforilación de dímeros ErbB estimula también el reclutamiento de la maquinaria que media la endocitosis de estos RTK. En este contexto, la fuerza de la interacción ligando-receptor dicta también en buena medida el destino de los receptores después de ser internalizados. En función de si se disocian o no en las condiciones ligeramente ácidas del endosoma, se verán favorecidos, respectivamente, el reciclaje o la degradación del receptor [29].

### 1.3.3. Funciones de la familia ErbB en tejidos normales

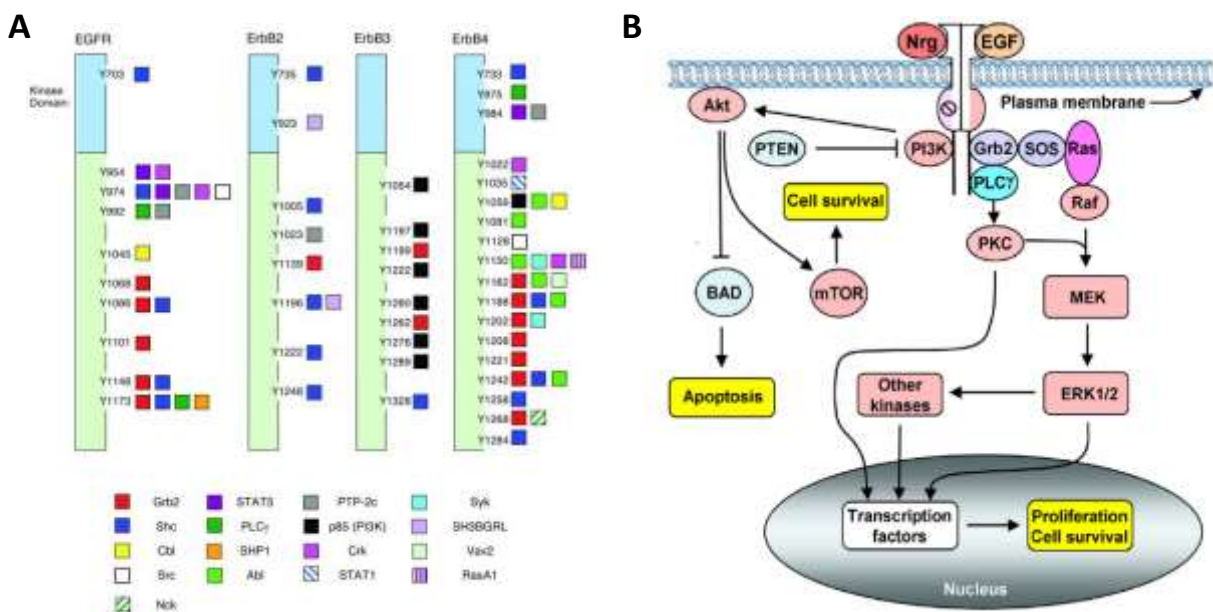
La compleja diversidad de posibles respuestas que pueden surgir de la activación de receptores ErbB resulta en la participación de estos receptores en un gran número de procesos celulares, embriogénicos y fisiológicos. A nivel sistémico, la acción de estos RTKs es crítica en el desarrollo de los dientes, los sistemas nervioso y cardiovascular y los tractos reproductor y gastrointestinal. Se les atribuye también un rol esencial en la curación de heridas y la regeneración de los epitelios que revisten la córnea, la piel y los órganos de los sistemas genitourinario, respiratorio y gastrointestinal [17].

A nivel celular, la activación de receptores ErbB desencadena múltiples vías de señalización intracelular que regulan la proliferación, migración, diferenciación, supervivencia y apoptosis celular, así como la angiogénesis [15]. Las vías de señalización de ErbB/HER constituyen una serie de módulos interconectados y solapados entre sí, destacando las vías fosfatidilinositol 3-Quinasa (PI3K)/Akt (PKB); Ras/Raf/Mek/Erk1/2; y fosfolipasa C (PLC $\gamma$ ) [20]. En función del cambio conformacional ocurrido durante la dimerización de los receptores, se podrán fosforilar diferentes grupos de residuos, afines a la unión de distintos sustratos específicos. Esto implica una magnitud más en la pleiotropía funcional de la familia

ErbB: los factores de crecimiento que activan a cada monómero y la naturaleza del dímero formado motivarán la activación de diferentes residuos tirosina que desencadenarán distintos módulos de señalización.

### 1.3.4. Familia ErbB en cáncer pancreático

Los receptores de la familia ErbB están implicados en varios tipos de cáncer humano [35]. Se han descrito varios mecanismos de desregulación de ErbBs que contribuyen al establecimiento del fenotipo maligno de determinadas células tumorales. Algunos de estos mecanismos incluyen la sobreexpresión de receptores ErbB; amplificación del gen que codifica por alguno de estos receptores; diferentes tipos de mutaciones activadoras; o alteración de la maquinaria celular responsable de la correcta degradación de receptores ErbB. Cualquiera de estas anomalías provocará una activación aberrante de las vías controladas por estos RTKs, lo que proporcionará a la célula una notable ventaja proliferativa y en cuanto a supervivencia [20]. Asimismo, la coexpresión de diferentes ligandos de la familia EGF y sus receptores provee a la célula cancerígena de un mecanismo crucial en la etiología de múltiples tipos de cáncer [35]. La sobreexpresión de estos factores de crecimiento ha sido asociada con la activación desmedida de receptores ErbB, una pobre supervivencia del paciente, mayor potencial metastásico y con resistencia a quimioterapéuticos [36-38].



**Figura 3.** Módulos de señalización de los receptores tirosin-quinasa de la familia ErbB. **(A)** Residuos tirosina fosforilables de la cola C-terminal de los cuatro receptores ErbB y los sustratos a los que pueden activar. Figura recuperada de ref. [34]. **(B)** Esquemática de las principales vías de señalización activadas por EGFR y HER3 y de las respuestas que provocan. Los receptores aparecen unidos a EGF y NRG, respectivamente. El símbolo Stop representado en el dominio tirosín-quinasa de HER3 refleja su actividad, casi nula. Figura recuperada de ref. [5].

En PaC, varios autores han señalado la sobreexpresión de ErbB3 como partícipe primordial en la progresión tumoral [39-41]. ErbB3 presenta una actividad quinasa relativamente baja, pero el heterodímero ErbB2-ErbB3 provoca una potente señalización intracelular, especialmente por activación de la vía PI3K/Akt [39]. Liles et al. detectaron elevados niveles de expresión de ErbB3 en numerosas muestras de cáncer pancreático y propusieron que la proliferación de sus células estaría directamente asociada al nivel de expresión de ErbB3 [42]. Posteriormente, los mismos autores demostraron que la interacción NRG-1/ErbB3 constituía un eje de señalización fundamental en la patogénesis del cáncer

pancreático, así como en la respuesta de estas células a la inhibición de la proliferación provocada por determinados fármacos antitumorales [43].

#### I.4. Terapias dirigidas contra EGFR

En las últimas décadas se han venido desarrollando nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de varios tipos de cáncer, conocidas como terapias dirigidas. Estas terapias se basan en fármacos diseñados para unirse de forma específica a determinadas dianas farmacológicas, provocando su inhibición al interaccionar con ellas [18]. Frente a los quimioterapéuticos citotóxicos tradicionales, los efectos secundarios de las terapias dirigidas son considerablemente más leves: mientras que los primeros causan daños macromoleculares de forma sistémica e indiscriminada, las terapias dirigidas pretenden regular vías de señalización asociadas a la tumorigénesis de un determinado tipo de cáncer [20].

Actualmente se emplean en clínica dos grandes estrategias dirigidas contra receptores ErbB, en especial contra EGFR: anticuerpos monoclonales e inhibidores de tirosín-quinasa. Los primeros fueron diseñados para unirse, de forma altamente específica, a dominios determinados de la fracción extracelular de EGFR, bloqueando el sitio de unión de ligando o impidiendo la dimerización de EGFR con otros receptores de la familia. Algunos de ellos son capaces de inducir la dimerización del receptor sin desencadenar sus vías de señalización, pero provocando su ubiquitinación y ulterior degradación [44, 45].

En cambio, los EGFR-TKIs son moléculas pequeñas, análogos de ATP que se unen específicamente al dominio tirosín quinasa de EGFR. Compiten con ATP por unirse a su sitio de unión, lo que impide la actividad catalítica del dominio tirosín quinasa, bloqueando la activación de las rutas intracelulares de EGFR [45].

Sin embargo, a pesar de los prometedores resultados obtenidos en fases preclínicas, su eficacia terapéutica ha sido limitada [44]. El único EGFR-TKI aprobado para el tratamiento de tumores pancreáticos avanzados y metastásicos es erlotinib (Tarceva), usado en combinación con gemcitabina [46, 47]. Se trata de un análogo de ATP de 1ª generación, derivado de quinazolina. Presenta un grupo heterocíclico que se une al sitio de unión del ATP del dominio tirosin-quinasa de EGFR en su conformación

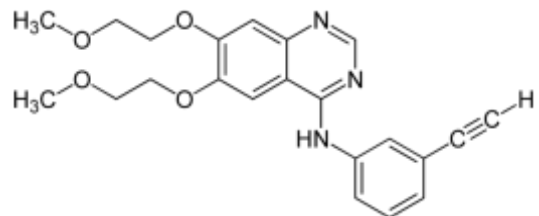


Figura 4. Estructura química de erlotinib. Figura recuperada de Igcstandards.

activa, de forma específica y reversible. Compite con ATP por la unión a tal región, impidiendo así la fosforilación (ATP-dependiente) de los sustratos de EGFR [20, 46, 47]. No obstante, su aplicación tan solo ha provocado un modesto aumento en el tiempo de supervivencia del paciente [46].

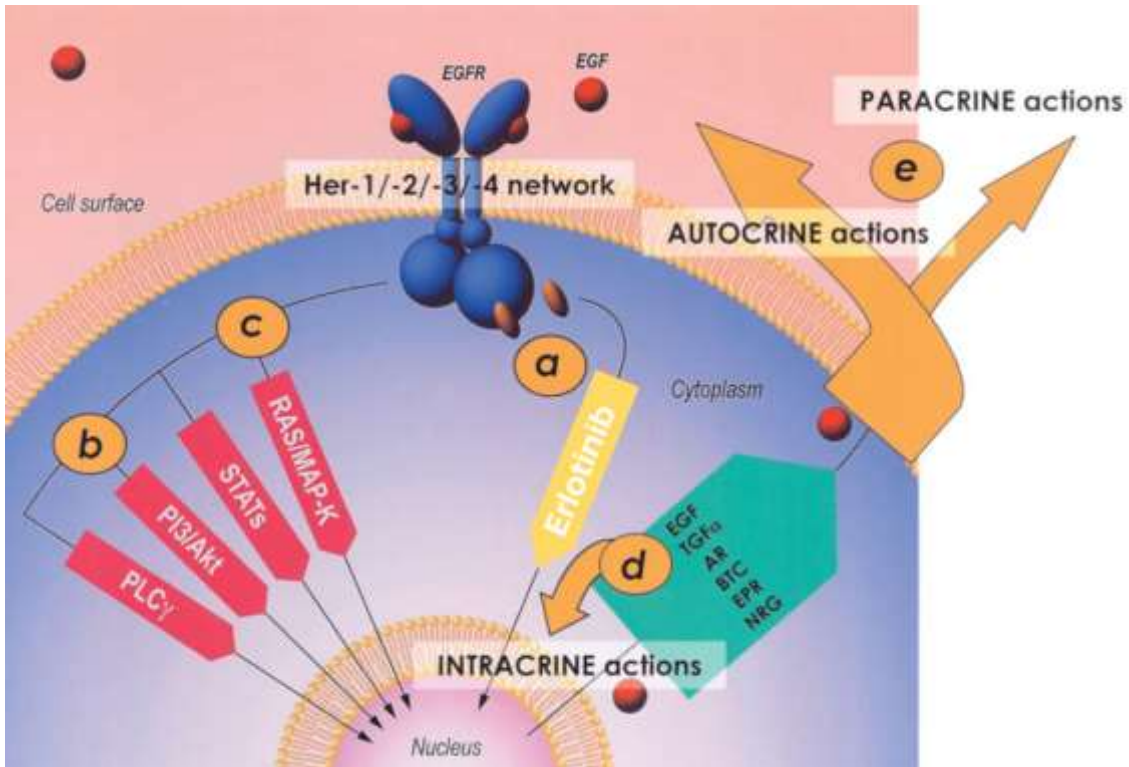
#### I.5. Mecanismos de resistencia

Es muy poco frecuente en cáncer encontrar un único responsable molecular. Lo más común en la mayor parte de tumores es, en cambio, la ocurrencia concomitante de múltiples desregulaciones –no necesariamente asociadas a ErbBs– que sostienen las ventajas fenotípicas de la célula tumoral. En un ambiente bioquímico tan complejo, la direccionalidad específica a dianas farmacológicas concretas, por muy patente que haya quedado su importancia en la patogénesis de un determinado tipo tumoral, ha supuesto en los mejores casos beneficios a corto plazo, pero limitada eficacia [20]. Este hecho es atribuible a dos grandes razones, que han llevado a definir los conceptos de resistencia intrínseca (primaria) y



adquirida (secundaria) a terapias antitumorales: primero, el fenotipo que presenta una célula previamente a la aplicación de un determinado tratamiento puede hacerla inherentemente insensible al mismo, aun cuando presente la alteración concreta contra la que se dirige aquella terapia [48].

Segundo, incluso si la célula responde inicialmente al tratamiento mostrando una elevada sensibilidad, la célula tumoral se caracteriza por una exquisita capacidad de adaptación, una versatilidad única. En el caso de los EGFR-TKIs, el bloqueo de la actividad catalítica de EGFR en células que lo sobreexpresan o lo tienen constitutivamente activado, provoca una reacción en las células del tumor, que buscarán alternativas que le permitan mantener su malignidad. La célula inicialmente responde y después, bajo un proceso de adaptación y selección cíclico y acumulativo, pasa a ser resistente [44].



**Figura 5.** Mecanismos de resistencia tumoral a Erlotinib. **(a)** Mutaciones en EGFR. **(b y c)** Activación de vías alternativas por acción de otros receptores ErbB u otras familias. **(d)** Aumento en la expresión de ligandos de la familia EGF, cuyas acciones intracrininas, autocrinas y paracrininas contribuyen a mantener la proliferación y supervivencia celular, contrarrestando la inhibición de EGFR mediada por erlotinib. Figura adaptada de ref. [48].

La resistencia primaria supone un desafío que precisa un esfuerzo en la detección de marcadores que permitan predecir la sensibilidad que presentará cada individuo a un determinado fármaco; una adecuada selección de pacientes que potencialmente responderán a una determinada terapia. La resistencia adquirida, en cambio, exige un componente extra en investigación que va más allá del cribado: el entendimiento del modo en que actúa un determinado fármaco y de los mecanismos que presenta la célula tumoral para generar resistencia al mismo. Sin apenas excepciones, lo más común con el uso de terapias dirigidas en clínica es la aparición de resistencia frente a tales tratamientos en un plazo de uno o dos años [20].

En el caso de los inhibidores de tirosín-quinasas, la resistencia adquirida surge comúnmente a partir de mutaciones en la protein-quinasa diana o bien por activación de vías alternativas a la que se intenta inhibir. En 2007, Ferrer-Soler et al. demostraron que al tratar líneas celulares de cáncer de mama con gefitinib, un EGFR-TKI, estas reaccionaban alterando sus patrones de expresión basales de ligandos y receptores de ErbB. Tal perturbación las provee de un mecanismo de resistencia adquirida que les permite compensar

la pérdida de función de EGFR [48]. Posteriormente, en 2012, Carrión-Salip et al. confirmaron que la hipótesis de Ferrer-Soler se cumplía también en cáncer de próstata andrógeno-independiente. Demostraron que la sobreexpresión de los receptores ErbB2/3/4, junto con la alteración de los niveles de expresión de múltiples ligandos de la familia EGF, proveían a las células analizadas de un mecanismo de resistencia adquirida al bloqueo de EGFR. Confirmaron un papel clave del eje de señalización NRG-1/HER3 en el mantenimiento de la proliferación tras la inhibición de EGFR [49]. Desde entonces, múltiples evidencias han señalado la existencia de una correlación entre el alto nivel de expresión de NRG-1 y un pobre pronóstico en varias patologías tumorales, incluyendo el PaC [5, 39, 42, 43, 50]. En la misma línea, se ha venido atribuyendo al eje de señalización NRG-1/HER3 una significativa implicación en la resistencia a terapias anti-ErbB, contribuyendo al mantenimiento de la proliferación en respuesta a la inhibición de receptores ErbB [5, 43].

## **I.6. Bucles autocrinos y resistencia**

En 1980, Sporn, Todaro y Roberts establecieron el concepto de secreción autocrina y formularon la hipótesis autocrina: “muchos tipos de células tumorales liberan factores de crecimiento polipeptídicos a su medio condicionado cuando crecen en cultivo celular, y las mismas células tumorales a menudo poseen receptores funcionales para el péptido liberado” [51]. De este modo, ligandos solubles como TFG- $\alpha$  y TFG- $\beta$  o PDGF activarían mecanismos de señalización que finalmente provocarían una respuesta mitogénica en misma célula que los secretó, lo que las hace menos dependientes del ambiente provisto por otras células [52, 53]. Este fenómeno más tarde se denominó bucle autocrino. Con los años, la hipótesis autocrina ha continuado siendo sustentada por crecientes evidencias, que han apuntado su trascendente contribución al fenotipo tumoral, pero también a la promoción del crecimiento de células normales [21-25, 28, 53].

Conceptos antiguos y emergentes como la translocación nuclear de ligandos de la familia EGF [54] o de receptores ErbB [55] han seguido arrojando luz sobre la hipótesis autocrina, que hoy constituye una base no solo para la etiología de la célula tumoral, sino también en el establecimiento de resistencia a quimioterapéuticos [48, 49].

El presente estudio analiza la expresión de tres ligandos de la familia EGF, el modo en que afecta el tratamiento con erlotinib a su expresión y su relación con la sensibilidad de líneas celulares de cáncer pancreático a tal fármaco. De acuerdo con la hipótesis de Sporn, Todaro y Roberts, la formación de bucles autocrinos asociados a ErbBs podría constituir un principio previamente no reconocido para la elucidar la agresividad del cáncer pancreático y su resistencia a terapias antitumorales.

## II. OBJECTIVES

---

The present work is based on the hypothesis that pancreatic adenocarcinoma cells are able to upregulate alternative ErbB receptor or EGF-related growth factors in response to treatments targeting EGFR. This ability would allow them to circumvent the cytostatic effects provoked by the EGFR inhibitor erlotinib. Such mechanism of acquired resistance has previously been observed in prostate, breast or head and neck tumors, among other epithelial cancers. In order to demonstrate this hypothesis, four objectives were defined:

1. To determine the sensitivity of four pancreatic adenocarcinoma cell lines to erlotinib treatment.
2. To characterize the level of expression of EGFR, HER2 and HER3 receptors in each cell line by Western Blot. Comparative analysis of the coexpression of ErbB receptors in each line.
3. To determine the expression levels of three EGF-related ligands: NRG-1, EPR and TGF-  $\alpha$  in BxPc-3 and HPAF-II cell lines by RT-PCR.
4. To quantify the change in the expression pattern of these ligands in response to treatment with erlotinib, relative to their basal expression.



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

---

#### 3.1. Líneas celulares y cultivo celular

Las líneas celulares de adenocarcinoma pancreático BxPc-3, Capan-1 y HPAF-II fueron obtenidas del *American Type Culture Collection* (ATCC), mientras que la línea AsPc-1 fue amablemente provista por la Dra. Pilar Navarro, del Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM). Las cuatro líneas proceden de distintos pacientes con cuadros clínicos y estados de progresión tumoral diferentes, por lo que ostentan características diferenciales en cuanto a adhesión, migración, invasión de tejidos, potencial metastásico y angiogénico, morfología y tiempo de división, entre otros. A excepción de Capan 1, las células fueron mantenidas en Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% penicilina-estreptomicina y 1% L-Glutamina (Gibco) a 37 °C en una atmósfera humedecida al 95% que contenía un 5% de CO<sub>2</sub>. Se realizaron dos subcultivos semanales de cada línea. Capan-1 fueron mantenidas en DMEM suplementado con un 20% de FBS, 1% penicilina-estreptomicina y 1% L-Glutamina, y subcultivadas una vez por semana.

#### 3.2. Reactivos

Erlotinib (Tarceva®) fue adquirido a Santa Cruz Biotechnology. Para los ensayos por Western Blot, los anticuerpos primarios monoclonales *mouse* IgG<sub>2a</sub> anti-EGFR (A-10; sc-373746) y  $\alpha$ -tubulina (B-7; sc-5286); y los anticuerpos primarios policlonales *rabbit* IgG anti-HER2 (Neu C-18; sc284) y anti-HER3 (C-17; sc-285) fueron provistos por Santa Cruz Biotechnology. Para la detección de EGFR se utilizó el anticuerpo secundario Goat Anti-Mouse IgG, H&L Chain Specific Peroxidase Conjugate (401215), obtenido de Merck Millipore. La detección de los anticuerpos primarios anti-HER2 y anti-HER3 se llevó a cabo utilizando Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (31460), suministrado por ThermoFisher. Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG + IgM (H+L) (115-035-044) fue adquirido de Jackson ImmunoResearch y utilizado como anticuerpo secundario para la detección de  $\alpha$ -tubulina. Para los ensayos por RT-PCR se utilizaron kits de la serie TaqMan Gene Expression Assays provistos por Applied Biosystems. Cada kit contenía un par de primers y una sonda TaqMan diseñados para la detección de TBP (hs99999910\_m1), EPR (hs00914313\_m1 EREG FAM), NRG-1 $\beta$  (hs00247620\_m1 NRG1 FAM) y TFG- $\alpha$  (hs00608187\_m1 TGFA FAM), respectivamente.

#### 3.3. Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se expresaron como media y desviación estándar salvo que se indique lo contrario. El análisis estadístico se realizó mediante el software GraphPad Prism 7.0 para Windows. Las diferencias entre tratamientos fueron analizadas mediante t-test múltiple, considerando significativos valores de  $P < 0.05$ .

#### 3.4. Ensayo de confluencia

Con el fin de determinar la densidad celular necesaria para mantener las células de cada línea celular en la fase exponencial de su crecimiento durante los ensayos de proliferación MTT, se evaluó la confluencia alcanzada al plaquear diferentes densidades de cada línea celular al incubarlas durante 72 horas.

Las células fueron disgregadas y separadas del frasco de cultivo durante la fase exponencial de su crecimiento. Para ello, se eliminó el medio de cultivo, se lavó las células con PBS (Gibco) y se aplicaron 4 mL de tripsina (Gibco) a cada frasco. La tripsina es un enzima proteolítico que degrada inespecíficamente las proteínas de la matriz extracelular que mantienen las células unidas entre sí y a la superficie del

recipiente de cultivo [57]. Las células se incubaron con tripsina durante 5 minutos a 37°C. Se detuvo la reacción añadiendo 6 mL del medio de cultivo a cada frasco y se acabó de separar las células mecánicamente por pipeteo. Se determinó manualmente el número de células por mililitro en un hemocitómetro de cada cultivo, utilizando el test de viabilidad celular basado en la tinción con azul de tripano. Este colorante es capaz de atravesar la membrana plasmática de células muertas, lo que permite diferenciarlas en el microscopio invertido de las células viables [58]. Las células muertas aparecen teñidas de un tono azul oscuro, mientras que las vivas quedan recubiertas de un halo y desprenden cierto brillo. A partir de las concentraciones calculadas en células por mililitro, se cada línea celular fue plaqueada en densidades de 10 000, 20 000 y 30 000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Se les permitió unirse a la placa y crecer durante 72 horas en incubación. Pasado este tiempo, se estimó la confluencia adquirida por cada línea celular, lo que permitió decidir la densidad a la que cabía plaquear cada línea de cara a la realización de los ensayos MTT.

### 3.5. Ensayo de proliferación MTT

Los ensayos de proliferación celular son frecuentemente utilizados en el cribado de compuestos para determinar si estos presentan efectos citotóxicos o citostáticos que afecten a la proliferación celular. Entre ellos, el ensayo MTT es uno de los más utilizados [59]. Consiste en un test colorimétrico basado en la reducción de la sal de tetrazolio MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) por parte de células viables que presenten actividad metabólica (parcialmente por acción de las oxidorreductasas de la cadena de transporte electrónico mitocondrial) [59, 60]. Las células muertas son incapaces de reducir el sustrato MTT, de modo que este ensayo permite detectar únicamente células viables. La reducción de la sal de tetrazolio ocasiona la formación de cristales de formazano de MTT de color púrpura, cuyo espectro de emisión difiere del que presenta la sal. La modificación en las propiedades ópticas del reactivo provocada por la reacción permite determinar la cantidad de células vivas: la intensidad de la emisión de color púrpura es proporcional a la cantidad de células viables, de modo que midiendo por espectrometría la absorbancia a 570 nm se puede evaluar el efecto de un determinado tratamiento sobre la proliferación celular [59].

#### 3.5.1. Protocolo del ensayo de proliferación MTT

Se sembró en placas de 96 pocillos la densidad de células por pocillo de cada línea determinada en el ensayo de confluencia (10 000 células por pocillo para AsPc-1 y BxPc-3; 15 000 para HPAF-II; y 30 000 en Capan-1). Se permitió a las células adherirse al frasco de cultivo y crecer durante 24 horas. Las células fueron tratadas con concentraciones de Erlotinib entre 0 y 50  $\mu\text{M}$ , diluidas en sus respectivos medios. Se incubaron las células tratadas durante 48 horas. Pasado este tiempo, se descartó el medio de cultivo que contenía el tratamiento, se lavó las células con tampón fosfato salino (PBS, *Phosphated buffer saline*) y se las incubó durante 120 minutos en 100  $\mu\text{L}$  de medio suplementado con MTT (Sigma-Aldrich) 10 a una concentración final de 0,5 mg/mL. Se eliminó el medio y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) a cada pocillo para disolver los cristales de formazán. Se determinó la absorbancia a 570 nm de cada pocillo utilizando un lector de microplacas Synergy™ 4 Multi-Detection Microplate Reader (BioTek). Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

A partir de las absorbancias obtenidas se calculó el porcentaje viabilidad celular dividiendo la absorbancia media de cada tratamiento por la absorbancia media de las células control no tratadas. Se realizaron al menos cuadruplicados de cada experimento con el fin de establecer la concentración de erlotinib necesaria para reducir un 50% de la viabilidad celular ( $\text{IC}_{50}$ ), como medida de la sensibilidad al fármaco presentada por cada línea celular. La  $\text{IC}_{50}$  fue calculada por interpolación a partir del establecimiento de una regresión logística de 4 parámetros, utilizando el software Gen5 Data Analysis (BioTek).

### 3.6. Western Blot

La técnica del Western Blot o inmunoblot constituye una herramienta extensamente utilizada en biología molecular y celular para la separación e identificación de proteínas específicas en matrices proteicas complejas obtenidas a partir de lisados celulares. Entre otras aplicaciones, el *immunoblotting* permite comparar los niveles de expresión de una determinada proteína de interés en diferentes condiciones o líneas celulares. Requiere en primer lugar la obtención de lisados celulares y la ulterior cuantificación de la cantidad total de proteínas contenida en el lisado, lo que permite cargar geles de electroforesis con cantidades conocidas de proteína total.

Mediante una electroforesis SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) es posible separar las proteínas de la muestra por peso molecular. Una vez separadas las proteínas en el gel, estas son transferidas a una matriz más estable, habitualmente una membrana de nitrocelulosa o de PVDF (teflón). La membrana debe ser entonces bloqueada para prevenir la unión inespecífica de los anticuerpos que se utilizarán para la detección de las proteínas de interés. Para ello, se utilizan típicamente albúmina sérica bovina (BSA) o la caseína de la leche, que al ser aplicadas en exceso sobre la membrana se unirán a los poros que hayan quedado libres tras la transferencia, saturando la membrana.

El reconocimiento de las proteínas de interés se realiza sumergiendo la membrana en una solución de incubación en la que se diluye un anticuerpo diseñado para reconocer específicamente una determinada región de la proteína de interés. Las soluciones de incubación suelen suplementarse con un porcentaje de la proteína utilizada para el bloqueo, proporcionando una prevención adicional de uniones inespecíficas del anticuerpo a la membrana. Los anticuerpos usados en *immunoblotting* se comercializan conjugados con un marcaje (generalmente fluorescente o enzimático) que permita su detección, o sin tal marcaje. En el segundo caso, la detección requiere la aplicación de una segunda solución de incubación, que contendrá un anticuerpo secundario diseñado para reconocer la región constante del anticuerpo primario. El uso de anticuerpos secundarios marcados en *immunoblotting* permite aumentar la sensibilidad del reconocimiento, gracias a la amplificación de señal que proporciona la unión de múltiples moléculas del anticuerpo secundario a cada anticuerpo primario. En nuestro ensayo trabajamos con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP), que en presencia de su sustrato cataliza la conversión de este a un producto que emite una señal quimioluminiscente proporcional a la cantidad de producto y, por tanto, de analito detectado.

#### 3.6.1. Obtención de los lisados celulares

A partir de los cultivos de las cuatro líneas celulares se plaquearon  $2 \cdot 10^6$  células de cada línea en placas de 100 mm. Se permitió a las células adherirse a la placa y crecer durante 48 horas. Pasado este tiempo, el medio de cultivo fue descartado y se realizaron dos lavados de cada placa con PBS, eliminando así los restos de medio. Las placas fueron inmediatamente dispuestas en hielo y se aplicaron 400  $\mu$ L de tampón RIPA completo a cada placa. Para preparar el tampón RIPA completo se añadió por cada 10 mL de tampón incompleto (25 mM Tris  $\cdot$  HCl pH 7.6; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 1% desoxicolato de sodio; 0.1% SDS) una pastilla Complete ULTRA Tablet (Protease inhibitor Cocktail tablets), así como 250  $\mu$ g/mL de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  y NaF (inhibidores de fosfatasas y proteasas, respectivamente). Se incubaron las placas en hielo con el tampón RIPA completo durante 15 minutos. Las placas fueron entonces raspadas utilizando Nunc<sup>TM</sup> Cell Scrappers (ThermoFisher) para lisar las células y desunirlas de la superficie adherente de la placa. El lisado obtenido fue transferido a un tubo eppendorf, que se mantuvo también en hielo. Los lisados fueron homogeneizados utilizando una jeringa acoplada a una aguja de 0.8 mm de diámetro. Se centrifugó el lisado homogeneizado a 2600 rpm y 4 °C durante 15 min, y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo eppendorf. Los lisados fueron alicuotados y congelados a -80 °C.

### 3.6.2. Ensayo de cuantificación de proteínas totales de Bradford

El ensayo de Bradford se basa en la unión inespecífica del colorante Coomassie Blue G-250 a todas las proteínas presentes en una muestra. La unión del colorante a los residuos básicos arginina, lisina o histidina provoca un cambio en la banda de emisión del colorante, cuyo pico máximo de absorbancia pasa de 450 nm a 610 nm, aunque se lee típicamente a 595 nm. La formación de los complejos proteína-colorante permite cuantificar por colorimetría la cantidad de proteínas totales presentes en una muestra [61].

Se preparó una recta patrón con concentraciones entre 0 y 25 µg/mL de BSA diluido en el mismo tampón RIPA que los lisados. Las muestras fueron cuantificadas a partir de diluciones 1/200 en agua mQ, por lo que el diluyente de las rectas patrón fue preparado con tampón RIPA diluido en agua mQ en una proporción 1:200. Los patrones y las muestras fueron elaborados por triplicado y se cargaron 150 µL de cada réplica en una microplaca Nunc™ MicroWell™ de 96 pocillos (ThermoFisher). Se añadieron a cada pocillo 150 µL de QuickStart™ Bradford 1X Dye Reagent (Bio-Rad) previamente temperado. La placa fue incubada a oscuras durante 10 minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas Synergy™ 4 Multi-Detection Microplate Reader (BioTek). La concentración de proteína total de las muestras fue calculada como media de los tres replicados por interpolación respecto de la recta patrón obtenida.

### 3.6.3. Protocolo Western Blot

Se prepararon los geles apiladores y separadores al 5% y 8% de poliacrilamida, respectivamente, para la realización de la electroforesis SDS-PAGE. La composición de los geles y los tampones utilizados puede comprobarse en las [tablas 1 y 2](#), respectivamente. Los geles se polimerizaron utilizando un equipo Mini-Protean III (Bio-Rad). Alícuotas de 10, 20 o 40 µg de proteína total de cada línea celular fueron preparadas en tubos eppendorf con tampón de carga 1X al 5% β-mercaptoetanol. Se incubaron a 95 °C durante 5 minutos en un termoblock y se centrifugó las muestras durante unos segundos para dejar caer el contenido de la preparación al fondo del tubo eppendorf. Las muestras fueron cargadas en diferentes carriles y se permitió al gel correr durante 90 min a 120V, quedando las proteínas separadas por peso molecular.

La membrana fue activada con 5 mL de metanol durante 20 segundos y lavada en H<sub>2</sub>O mQ durante 2 minutos y otros 20 minutos en tampón de transferencia Tris-Glicina (TT) frío. Las esponjas y papeles Watmann se humedecieron durante 20 minutos en TT frío. Se desmontó la electroforesis, los geles fueron separados de sus vidrios y se los lavó durante 20 minutos en TT frío. Todos los lavados fueron realizados en agitación constante a temperatura ambiente. Se montó la transferencia en un *cassette* de transferencia suministrado con el equipo Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad), siguiendo el siguiente orden: esponja – 2 papeles Watmann – gel – membrana PDVF – papel Watmann – esponja. Se eliminaron las burbujas para asegurar una correcta transferencia y se introdujo el montaje en una cubeta electroforética con 600 mL de TT frío y un bloque de hielo. La transferencia se llevó a cabo a 30V overnight a 4 °C en agitación constante.

**Tabla 1.** Composición de los geles de poliacrilamida utilizados en la electroforesis SDS-PAGE.

	Gel separador 8% (µL)	Gel apilador 5% (µL)
Acrilamida/Bisacrilamida 40%	1600	375
Agua mQ	4400	1875
Tampón gel electroforesis	2000	750
TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diamina)	6	2,25
Persulfato amónico 15%	40	15

**Tabla 2.** Composición de los tampones utilizados en Western Blot.

Tampón		Composición
Tampón gel apilador 4X		Tris · HCl 0.5M pH 6.8; SDS 0,4%
Tampón gel separador 4X		Tris · HCl 1.5M pH 8.8; SDS 0,4%
Tampón de carga 4X		Tris · HCl 60 mM pH 6.8; SDS 4%, glicerol 10%, azul de bromofenol (BPB) 0.01%
Tampón de elución 10X		Glicina 1,92M; Tris 0,25M; SDS 1%. pH ajustado a 8.5
Tampón de transferencia Tris-Glicina		25 mM Tris, mM glicina, 20% (v/v) metanol (pH 8.3). pH ajustado a 7.6 con HCl
TBS (Tris-buffered saline)		Tris 10 mM; NaCl 100 mM. pH ajustado a 7.6 usando HCl.
TBST (TBS-Tween)		TBS 1X; 0.1% Tween-20. pH ajustado a 7.6 usando HCl

Se desmontó la transferencia y se realizó un pre-bloqueo de las membranas sumergiéndolas 3 veces en TBST, renovando el tampón cada 5 minutos. Se incubó cada membrana durante dos horas en la solución de bloqueo y se realizaron 5 lavados de 5 segundos con H<sub>2</sub>O mQ y un sexto lavado de 5 minutos en TBST. Se añadió entonces a cada membrana una primera solución de incubación que contenía un anticuerpo primario diluido en TBST y se incubó durante 90 minutos. Se realizaron 5 lavados de 5 segundos en H<sub>2</sub>O mQ seguidos de 3 lavados de 5 minutos en TBST. Finalmente, se incubó la membrana durante una hora en la solución de incubación con el anticuerpo secundario diluido en TBST. Se efectuaron 5 lavados de 5 segundos en H<sub>2</sub>O mQ seguidos de 5 lavados de 5 minutos en TBST y se procedió a revelar la membrana. Todos los lavados e incubaciones fueron llevados a cabo a temperatura ambiente en agitación constante. En la tabla 3 se muestran los anticuerpos y soluciones utilizados para cada membrana.

**Tabla 3.** Relación de anticuerpos utilizados en el revelado de las membranas de Western Blot.

		ErbB1	ErbB2	ErbB3	Tubulina
Solución de bloqueo		20 mL TBST 3% Leche			20 mL TBST 5% BSA
Anticuerpo primario	Anticuerpo	EGFR A-10 (sc-373746)	Neu C-18 (sc-284)	ErbB3 C-17 (sc-285)	Tubulina B-7 (sc-5286)
	Dilución	1/1000	1/2000	1/200	1/1000
Solución de incubación		5 mL TBST 3% Leche			5 mL TBST 3% BSA
Anticuerpo secundario	Anticuerpo	Goat Anti-Mouse IgG, H&L Chain Specific Peroxidase Conjugate	Goat anti-Rabbit IgG (H+L), HRP		Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG + IgM
	Dilución	1/10 000	1/20 000		1/4000
Solución de incubación		10 mL TBST 1% Leche			20 mL TBST 0,5% BSA

La membrana fue incubada a temperatura ambiente y protegida de la luz durante 5 minutos en 1.5 mL del revelador Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (EMD Millipore), previamente temperado. Se eliminó por capilaridad el exceso de revelador y se adquirieron imágenes del revelado con el luminómetro AlphaInnotech FluorChem<sup>TM</sup>SP utilizando un filtro de quimioluminiscencia. La cuantificación relativa de las muestras fue determinada midiendo la intensidad media de cada banda del revelado mediante el software ImageJ (Fiji). Las expresiones relativas de cada receptor fueron calculadas como porcentaje, normalizando la intensidad media de señal de cada receptor por la intensidad media de señal de la tubulina revelada en su respectivo carril del gel.

### 3.6.4. Stripping

Cuando se utilizan sistemas de detección por quimioluminiscencia en Western Blot, existe la posibilidad de provocar la ruptura de los enlaces que mantienen unidas a las proteínas detectadas con los anticuerpos empleados para el reconocimiento [62]. De este modo, es posible devolver la membrana al estado en que se encontraba antes de la incubación con los anticuerpos, manteniendo intactas las proteínas que se habían inmovilizado en la membrana [63]. Alternativamente, si se quieren revelar múltiples proteínas diferentes a partir de una misma membrana también es posible cortarla para realizar en paralelo los correspondientes revelados.

Se lavó la membrana durante 5 segundos en H<sub>2</sub>O mQ por tres veces y dos veces en TBS durante 5 minutos. Tras el último lavado se descartó el tampón y se añadieron a la membrana 20 mL de la solución Restore Western Blot Stripping Buffer (ThermoFisher), previamente temperada a oscuras. La membrana fue incubada con la solución de *stripping* durante 10 minutos a temperatura ambiente en agitación y 10 minutos adicionales en un baño a 37 °C. Se realizaron dos lavados de 10 minutos en TBS y otros dos lavados de 5 minutos en TBST, quedando la membrana lista para un segundo bloqueo e incubación con anticuerpo.

### 3.7. RT-PCR

Utilizando una DNA polimerasa termoestable —como la Taq polimerasa—, los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) y dos cebadores (o *primers*) específicos que se hibridan a dianas concretas, la PCR permite amplificar exponencialmente moléculas de DNA de hasta 6 kb de largo. Presenta una sensibilidad tan elevada que, idealmente, es capaz de detectar hasta una única copia del DNA diana en una muestra [64]. Sin embargo, cuando se trabaja con matrices complejas —como muestras de RNA eucariota purificado- y se desea amplificar dianas presentes en bajas cantidades es más conveniente realizar una PCR en tiempo real (RT-PCR). Esta permite (i) obtener sensibilidades notablemente más elevadas en muestras de composición compleja y (ii) cuantificar (qRT-PCR) o semicuantificar la cantidad del DNA de interés presente originalmente en la muestra. La RT-PCR se basa en la misma reacción de amplificación que la PCR, pero a diferencia de esta incluye un sistema de detección que permite medir la señal emitida por el producto de amplificación en cada ciclo de PCR. Actualmente se comercializan diferentes sistemas que permiten la detección de productos de PCR en tiempo real, incluyendo SYBR Green I y sondas de reconocimiento específico como las balizas moleculares u oligobalizas (*molecular beacons*), las sondas FRET o las sondas TaqMan [65].

En el presente estudio empleamos sondas TaqMan: oligonucleótidos que presentan unidos covalentemente a sus extremos un fluoróforo en 5' y un *quencher* en 3', permitiendo obtener una elevada especificidad en la detección y cuantificación del producto de la RT-PCR. El *quencher* es responsable de atenuar la fluorescencia emitida por el fluoróforo en respuesta a la excitación provocada por la fuente de luz del termociclador, de forma similar al fenómeno del FRET. La secuencia del oligonucleótido está diseñada para hibridarse específicamente a su secuencia complementaria en la molécula de DNA diana. Durante la RT-PCR, después de producirse la hibridación de los *primers* y la sonda al DNA diana previamente desnaturalizado, la Taq polimerasa comienza a sintetizar la cadena complementaria al molde de cadena única a partir de los cebadores. Aprovechando la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa, cuando la cadena que está sintetizando alcanza la sonda, el enzima comienza a degradarla, quedando el fluoróforo libre. De este modo, por cada producto de PCR generado se degrada una sonda TaqMan, cuyo fluoróforo deja de estar próximo al quencher y puede ahora emitir fluorescencia, cuya intensidad será proporcional a la cantidad de DNA amplificado [66]. El termociclador determina la intensidad de fluorescencia en cada ciclo del ensayo, devolviendo una curva sigmoidea para cada reacción, lo que nos permitirá cuantificar la cantidad inicial del DNA amplificado.

Para cuantificar los niveles de expresión de un determinado gen a nivel de mRNA bajo unas condiciones dadas, lo más habitual es obtener librerías de cDNA a partir de muestras de RNA previamente purificado. Es el caso de nuestro ensayo, en el que realizamos una cuantificación relativa de la expresión de una serie de genes de interés. La cuantificación relativa de la expresión génica implica el uso de un gen de referencia constitutivamente expresado, respecto del que normalizar los resultados obtenidos para los genes de interés. Dada la tasa de expresión relativamente baja de nuestras dianas, escogimos TBP (*Tata box-binding protein*) como gen de referencia, cuya expresión es también baja [65]

### 3.7.1. Extracción de RNA

#### 3.7.1.1. Factores críticos en el trabajo con RNA

Las ribonucleasas (RNAsas) son enzimas altamente estables y activos que habitualmente no requieren cofactores para funcionar. Son difíciles de inactivar e incluso en cantidades marginales son capaces de degradar el RNA con el que se trabaja. Es por ello durante la purificación y el tratamiento de muestras de RNA deben tomarse una serie de precauciones. Es fundamental trabajar en condiciones asépticas. Para eliminar la contaminación por RNAsas del banco de trabajo, los tubos y el equipo de laboratorio, se pueden preparar soluciones utilizando reactivos comunes de laboratorio, como detergentes, etanol o NaOH-EDTA. Alternativamente, se comercializan productos como RNaseZAP™ (ThermoFisher) que aseguran una correcta eliminación de este tipo de contaminaciones [67].

Los tubos en los que se contengan las muestras deben mantenerse cerrados siempre que sea posible para prevenir la introducción inadvertida de RNAsas a la muestra. Si se trabaja con muestras de RNA purificado, estas deben ser mantenidas en hielo para asegurar su integridad de cara a aplicaciones posteriores. Todo el instrumental de plástico y cristal utilizado debe haber sido previamente autoclavado y, preferiblemente, ser tratado con detergentes que aseguren la ausencia de RNAsas [67].

Por último, tanto el agua como cualquier solución que vaya a estar en contacto con el RNA y que sea potencialmente susceptible de contaminación por RNAsas deberá haber sido tratada con dietilpircarbonato (DEPC), un agente alquilante que inhibe las RNAsas de forma muy eficaz. El DEPC 0.1% inactiva las RNAsas por modificación covalente de las mismas, lo que asegura la aptitud de las soluciones tratadas con este para el trabajo con RNA [67, 68].

#### 3.7.1.2. Protocolo de extracción de RNA

Se plaquearon  $1,5 \cdot 10^6$  células de las líneas celulares BxPc-3 y HPAF-II en placas de 10 mm y se les permitió adherirse a la placa y crecer durante 72 horas. Las células fueron entonces tratadas con concentraciones de erlotinib análogas a sus  $IC_{50}$  (14,12 y 10,34  $\mu$ M, respectivamente) o únicamente con el medio de cultivo como control, e incubadas durante 24 horas. Pasado este tiempo, se descartó el medio de cultivo y las células fueron lavadas con PBS e inmediatamente tripsinizadas. Se realizó un recuento de la densidad de células por mililitro en un hemocitómetro mediante el test de exclusión con azul de tripano. Las células fueron entonces centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el pellet celular restante fue resuspendido en PBS y alicuotado en tubos eppendorf independientes con  $5 \cdot 10^6$  células por tubo. Los tubos eppendorf fueron entonces centrifugados a 2600 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se eliminó el PBS y los pellets obtenidos se congelaron a -80 °C.

La extracción de RNA total se realizó a partir de los pellets celulares previamente obtenidos, utilizando una columna de purificación RNeasy spin column (ThermoFisher) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta columna presenta una membrana que retiene selectivamente el RNA, dejando pasar el resto de los componentes de la muestra a lo largo del protocolo. El RNA queda adsorbido a la membrana hasta que, una vez eliminados los contaminantes de la muestra se provoca su desorción, obteniendo una muestra de RNA purificado.

Se descongeló una alícuota de cada pellet, y las células fueron lisadas utilizando 350  $\mu$ L del buffer RLT suministrado en el kit RNeasy. Se centrifugaron durante 5 minutos a 300 x g y a continuación se homogeneizó el lisado utilizando una jeringa acoplada a una aguja de 0.8 mm de diámetro. Se añadieron 350  $\mu$ L de etanol 70% RNasa-free diluido en agua DEPC a cada tubo eppendorf y se transfirió la totalidad del volumen de cada tubo a una columna RNeasy, colocada sobre un tubo colector con el que descartar los contaminantes eluidos después de cada centrifugación. Se centrifugaron las columnas a 10 000 rpm durante 15 segundos y el eluido fue descartado.



Con el fin de eliminar de las muestras la contaminación por DNA genómico se preparó una solución de DNasa I, diluyendo una alícuota de la solución stock en tampón RDD hasta el 20% (v/v) de DNasa I. Se realizó un lavado añadiendo 350  $\mu\text{L}$  de tampón RW1 a cada columna. Se centrifugaron las columnas a 10 000 rpm durante 15 segundos y el eluido fue descartado. Se añadieron 80  $\mu\text{L}$  de la solución de DNasa I preparada previamente. Las columnas fueron cuidadosamente homogeneizadas por inversión y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadieron entonces 350  $\mu\text{L}$  del tampón RW1 a cada columna y estas fueron nuevamente centrifugadas durante 15 segundos a 10 000 rpm, eliminando de este modo los restos del DNA degradado. A continuación, se realizaron dos lavados con 500  $\mu\text{L}$  de tampón RPE, centrifugando a 10 000 rpm durante 15 segundos y 2 minutos, respectivamente. La centrifugación larga pretende secar la columna asegurando que se eliminan los restos de etanol que puedan quedar en la membrana, que podrían interferir en las subsecuentes reacciones de ser eluidos con el RNA purificado. Para eliminar los últimos restos del buffer RPE se colocó la columna en un nuevo tubo colector y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto. Finalmente, para eluir el RNA purificado se colocó la columna en un tubo eppendorf, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de agua RNasa free y se centrifugó durante un minuto a 10 000 rpm.

La concentración y calidad del RNA total extraído fueron evaluadas midiendo la absorbancia de una alícuota de 1  $\mu\text{L}$  de cada muestra mediante un espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) a 260 nm. Además de la concentración de RNA en  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , el NanoDrop devuelve un espectro de emisión de la muestra y calcula los ratios de absorbancia 260/280 y 260/230, indicativos de la contaminación por etanol, cloroformo, fenol u otras especies orgánicas, el primero; y por proteínas y otras especies que emiten en el espectro UV, el segundo ratio.

### 3.7.2. Reacción de retrotranscripción

Cuando se pretende evaluar por RT-PCR el nivel de expresión de un determinado transcrito de mRNA, lo más habitual es realizar previamente una reacción de retrotranscripción (RT) en la que, utilizando primers degenerados o aleatorios y una transcriptasa inversa, se genera una librería de DNA complementario de doble cadena (cDNA) con el RNA de la muestra como molde, obteniendo una copia exacta de la composición de RNA de la muestra original, en forma de cDNA. La finalidad de provocar esta reacción reside en el hecho de que el RNA es una molécula altamente inestable, lo que hace que se degrade con facilidad. El DNA, en cambio, es mucho menos lábil, lo que contribuye a asegurar la integridad de las muestras utilizadas en los ulteriores ensayos de RT-PCR.

Con este fin, se retrotranscribió 1  $\mu\text{g}$  de cada muestra de RNA a cDNA utilizando el kit de transcripción inversa High Capacity cDNA (Applied Biosystems). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se preparó una RT master mix 2X cuya composición se presenta en la [tabla 4](#). Partiendo de las concentraciones de RNA previamente obtenidas, 1  $\mu\text{g}$  de cada muestra fue diluido en agua DEPC en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . La reacción se llevó a cabo en tubos eppendorf de 200  $\mu\text{L}$  que contenían alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  de RT master mix 2X, sobre los que se depositaron 10  $\mu\text{L}$  de las diluciones de RNA preparadas. Los tubos eppendorf fueron centrifugados durante unos segundos y colocados en un sistema MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad) configurado en cuatro etapas: (i) 10 minutos a 25 °C; (ii) 120 minutos a 37 °C; (iii) 5 minutos a 85 °C; e indefinidamente a 4 °C. Las muestras de cDNA obtenidas fueron conservadas a -20 °C.

**Tabla 4.** Composición de la Master Mix 2X. Volúmenes calculados para 5 muestras, considerando un exceso equivalente a una muestra.

Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
10X RT buffer	10
25X dNTP Mix (100 mM)	4
10X RT Random Primers	10
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	5
RNase inhibitor	5
H <sub>2</sub> O DEPC	16
Volumen final	50



### 3.7.3. Protocolo RT-PCR

Previamente a la ejecución del ensayo se determinaron las eficiencias de las sondas utilizadas. Para ello, se realizó un banco de diluciones entre 1/25 y 1/5000 utilizando el cDNA obtenido a partir de las células BxPc-3 control. Cada dilución utilizada para las diferentes sondas fue preparada por triplicado. Comprobamos que las cuatro sondas utilizadas presentaban eficiencias entorno al 100% (no se muestran los datos). A partir de los valores de Ct obtenidos para cada sonda y dilución, se resolvió que en los futuros ensayos se utilizarían diluciones 1/100 de cada muestra. Para la evaluación de las eficiencias y la realización de los subsecuentes ensayos de cuantificación relativa de ligandos de la familia EGF, se utilizaron sondas TaqMan (Applied Biosystems) prediseñadas y específicas para NRG-1, EPR, TGF- $\alpha$  y TBP, respectivamente. Se prepararon diluciones 1/100 de las muestras de cDNA; el reactivo TaqMan™ Universal PCR Master Mix, no AmpErase™ UNG (Applied Biosystems) fue mezclado con las sondas a utilizar, en una proporción de 1  $\mu$ L de sonda por 10  $\mu$ L de master mix. Los ensayos por RT-PCR se realizaron en placas MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems) utilizando el sistema 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) para llevar a cabo la reacción.

En cada pocillo de la placa se llevó a cabo una reacción de RT-PCR conteniendo 11  $\mu$ L de la master mix preparada para una determinada sonda y 9  $\mu$ L de muestra. Cada muestra fue preparada por triplicado. La placa fue sellada, centrifugada durante 1 minuto a 2000 rpm y finalmente introducida en un ciclador 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), configurado con las siguientes condiciones: 95 °C durante 10 minutos; seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y finalmente 60 °C a 1 minuto. Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado. La cuantificación relativa de los niveles de expresión de ligandos de la familia EGF fue calculada siguiendo las metodologías  $2^{-\Delta Ct}$  y  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y los niveles de mRNA fueron normalizados respecto del mRNA del gen constitutivo TBP.

### 3.8. Criterios éticos y sostenibilidad

A lo largo del procedimiento experimental del presente trabajo se intentó optimizar en todo momento el uso de los recursos utilizados, procurando minimizar la generación de residuos y el impacto económico y ambiental de nuestra labor en la medida de lo posible. Se ejerció una correcta clasificación de residuos y se procuró aplicar buenas prácticas de laboratorio desde el comienzo del proyecto.

El cultivo de células animales, sin embargo, supone una inevitable constante en cuanto a impacto ambiental. La necesidad de trabajar en condiciones enteramente estériles resulta en un consumo muy elevado de material de un solo uso. No obstante, los cultivos celulares han supuesto una reducción en la necesidad de experimentar con animales, cuya utilización con fines de investigación pretende hoy minimizar el volumen de animales que se utilizan y el sufrimiento que se causa a los mismos.

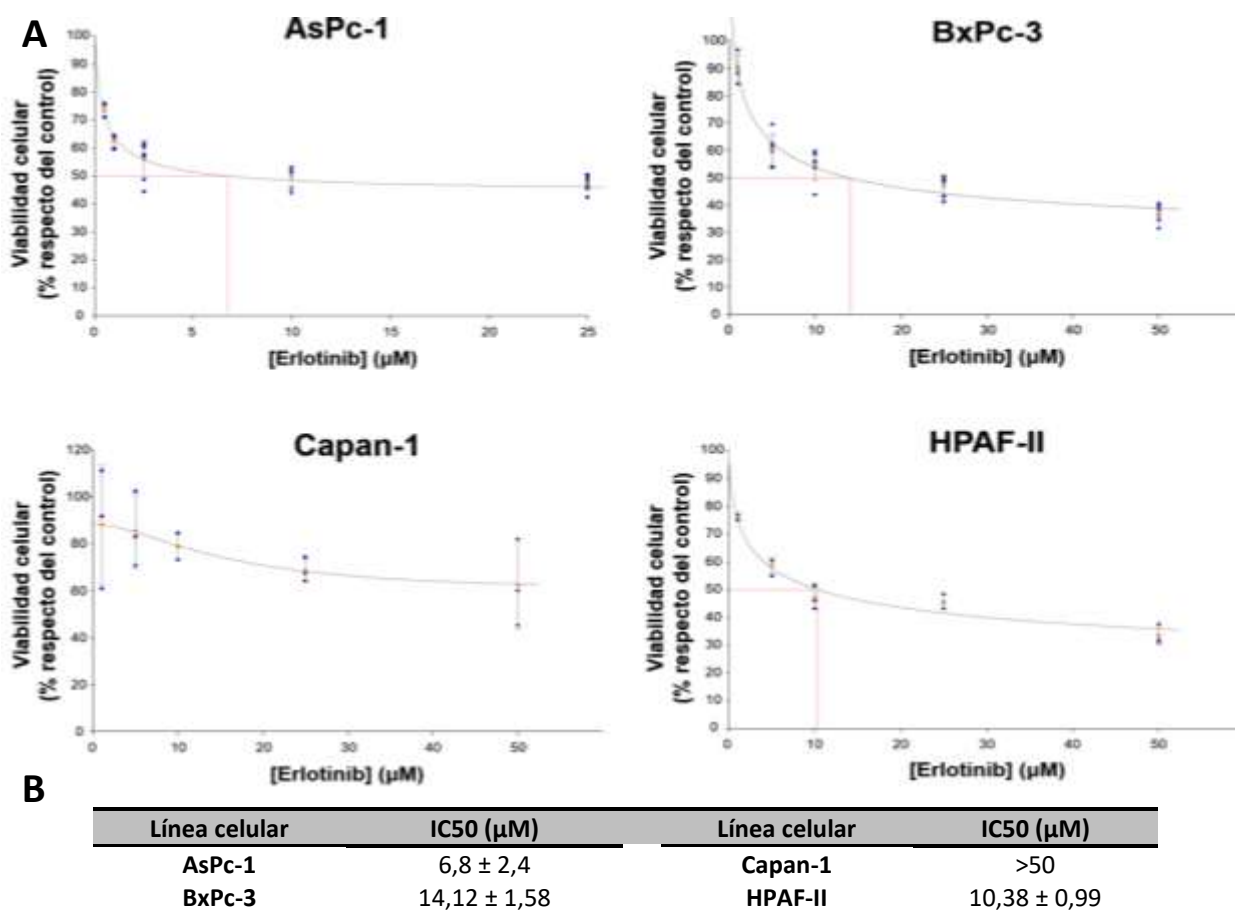
Con tal de garantizar la reproducibilidad de nuestros resultados, se realizaron tantos experimentos independientes de cada ensayo como fueron necesarios, de forma que pudiéramos afirmar rigurosamente la validez de los resultados que se exponen. Los datos fueron tratados desde el neutralismo, contrastando diferentes opiniones para eliminar cualquier posible subjetividad confirmatoria.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Sensibilidad a erlotinib

En primer lugar, comprobamos el efecto provocado por erlotinib sobre la proliferación de las líneas celulares de PaC AsPc-1, BxPc-3, Capan-1 y HPAF-II. Las cuatro líneas mostraron diferencias considerables en sus curvas de respuesta al tratamiento, y en cuanto a su sensibilidad frente a este. Ninguna de las líneas celulares utilizadas presentó un descenso crítico en su tasa de proliferación en respuesta a la aplicación de concentraciones crecientes del inhibidor, pero todas ellas mostraron un cierto grado de sensibilidad dosis-dependiente [Figura 6A].

La sensibilidad celular a un determinado fármaco se establece a partir de la concentración necesaria para provocar una inhibición del 50% de la proliferación respecto del control sin tratar ( $IC_{50}$ ). Nuestros resultados evidencian una elevada sensibilidad a erlotinib por parte de la línea AsPc-1 ( $IC_{50} = 6,8 \mu M$ ), en la que bajas concentraciones del fármaco fueron suficientes para provocar un marcado efecto citostático mediado por la inhibición de EGFR [Figuras 6A y 6B]. Este efecto antiproliferativo se mostró dosis-dependiente hasta alcanzar una concentración en torno a  $10 \mu M$  de erlotinib, por encima de la cual el aumento de la dosis del inhibidor apenas provocó un ligero descenso en la proliferación de AsPc-1.

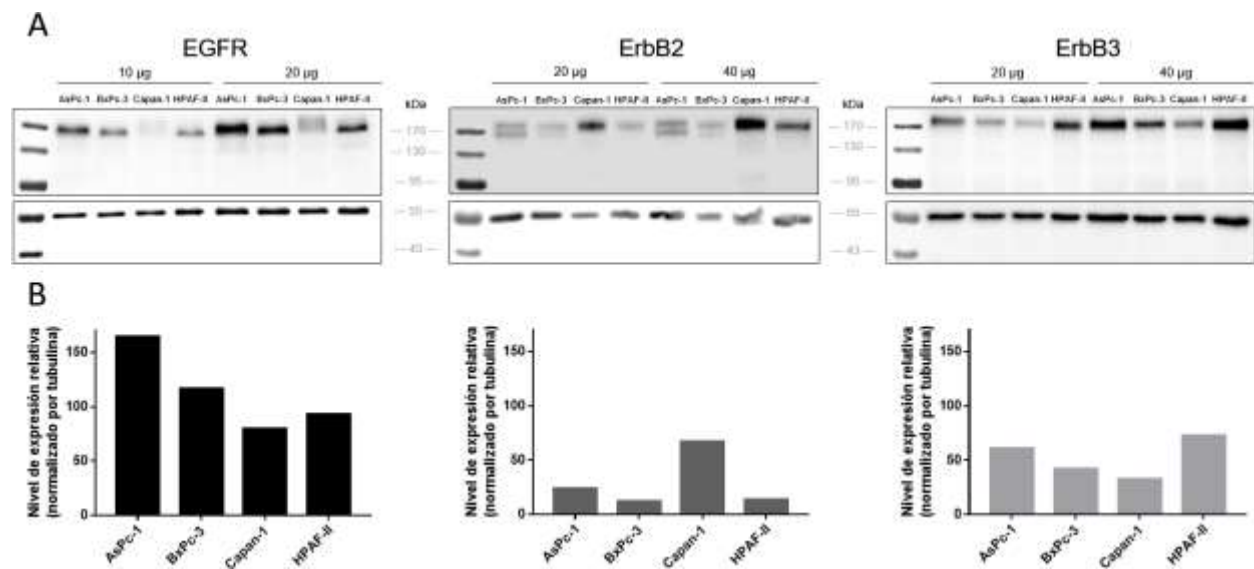


**Figura 6. (A)** Viabilidad celular en respuesta a concentraciones crecientes de erlotinib. La proliferación obtenida para cada concentración del fármaco fue normalizada respecto del control sin tratar (100% de proliferación). Cada punto corresponde al promedio de los triplicados de cada experimento. La curva de sensibilidad fue calculada como regresión logística no lineal de cuatro parámetros mediante el software Gen5, a partir de un mínimo de tres experimentos independientes para cada línea. **(B)** Concentración de erlotinib necesaria para inhibir el 50% de la proliferación en cuatro líneas celulares de PaC ( $IC_{50} \pm SEM$ ). Las  $IC_{50}$  fueron calculadas por interpolación a partir de la curva de sensibilidad establecida.

BxPc-3 ( $IC_{50} = 14,12 \mu M$ ) y HPAF-II ( $IC_{50} = 10,38 \mu M$ ) se mostraron moderadamente sensibles al EGFR-TKI. En su caso, el efecto inhibitor de erlotinib aumentó a medida que su concentración lo hacía, en todo el rango de concentraciones aplicado. Mientras que en AsPc-1 el efecto de erlotinib se saturó a partir de concentraciones moderadas, BxPc3 y HPAF-II se vieron más afectadas por la aplicación de altas concentraciones del inhibidor. En cambio, Capan-1 ( $IC_{50} > 50 \mu M$ ) demostró ser intrínsecamente resistente a erlotinib, lo que nos impidió calcular un valor de  $IC_{50}$  para esta línea. El impacto provocado por el fármaco sobre la proliferación de Capan-1 fue limitado, precisando grandes concentraciones de este para provocar un leve efecto citostático. Mientras que el resto de líneas analizadas mostraron valores de viabilidad poco variables, el efecto observado sobre Capan-1 fue en la mayoría de los casos muy poco repetitivo entre réplicas. No obstante, nuestros resultados permiten atribuir a Capan-1 un pobre grado de sensibilidad al EGFR-TKI.

#### 4.2. Análisis comparativo del nivel de expresión de receptores ErbB en líneas celulares de PaC.

Para continuar caracterizando las líneas celulares utilizadas en nuestro estudio, determinamos por *immunoblotting* sus niveles de expresión proteica para los receptores ErbB1/2/3 [Figuras 7A y 7B]. En primer lugar, se estableció la cantidad de proteína total –obtenida a partir de los lisados celulares de cada línea- que se debía cargar en el gel para poder detectar los tres receptores. Inicialmente se cargaron 10 y 20  $\mu g$ , pero se determinó que 10  $\mu g$  eran insuficientes para detectar HER2 y HER3. Esto nos llevó a cargar 20 y 40  $\mu g$  de proteína total de cada línea celular en los geles para estos receptores, con el fin de aportar validez a nuestros resultados. Ambas cantidades mostraron ser adecuadas para la detección de estos receptores, sin llegar a saturar la intensidad de sus bandas. Esta saturación sí que se observó en el revelado de tubulina de los carriles cargados con 40  $\mu g$  de proteína total.



Las cuatro líneas demostraron coexpresar los tres receptores analizados. AsPc-1 mostró una pronunciada sobreexpresión del receptor EGFR, marcadamente superior a la cantidad expresada por el resto de líneas. Apenas pudimos detectar una tenue banda de EGFR en Capan-1, lo que, sumado a su insensibilidad a erlotinib sugiere un bajo nivel de dependencia hacia la vía EGFR en esta línea. Mientras que el resto de las líneas mostraron expresar fundamentalmente EGFR y HER3, en Capan-1 observamos una prominente presencia de ErbB2, compañero de dimerización preferido por el resto de receptores de la familia. Esta elevada expresión de ErbB2 podría estar contribuyendo a la resistencia intrínseca a erlotinib mostrada por Capan-1.

BxPc-3 y HPAF-II mostraron similitud en cuanto a sus niveles de expresión de los receptores ErbB1/2, en consistencia con sus semejantes  $IC_{50}$  para erlotinib. Ambas manifestaron una considerable presencia de ErbB1, mientras que expresan bajos niveles basales de ErbB2. Comparativamente, AsPc-1 mostró una significativa expresión del receptor ErbB2.

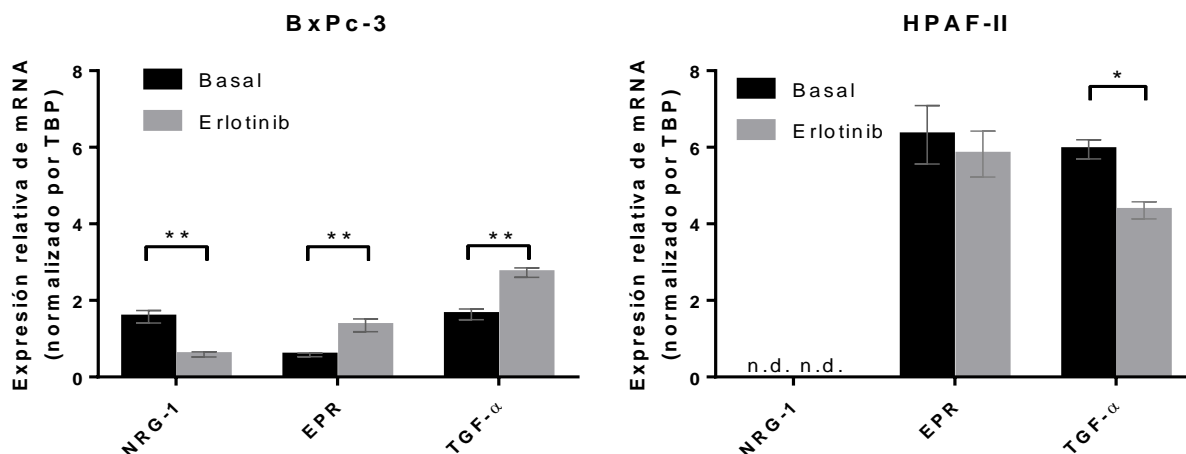
Por último, las cuatro líneas demostraron expresar ErbB3 moderadamente. De los tres receptores analizados, HER3 mostró ser el menos expresado por Capan-1, mientras que el resto de las líneas exhibieron mayor presencia de HER3 que de HER2. La expresión de ErbB3 de HPAF-II fue remarcablemente elevada, equiparable a la mostrada para EGFR. Del mismo modo, AsPc-1 demostró también una considerable expresión de HER3. Aun con su escaso nivel de expresión de HER2, la marcada sobreexpresión de EGFR y sus altos niveles de HER3 sugieren una pronunciada dependencia fenotípica en AsPc-1 hacia las vías ErbB.

Nuestros resultados también parecen indicar la coexistencia de receptores ErbB2 con diferente nivel de glucosilación en las líneas AsPc-1 y BxPc-3 [Figura 7A]. Tal observación se deduce del hecho de que en este gel aparezca una doble banda en los carriles correspondientes a estas líneas. La banda superior correspondería a ErbB2 en un estado fuertemente glucosilado, lo que aumentaría su peso molecular haciendo que corra en menor medida durante la electroforesis SDS-PAGE. Sin embargo, sería necesario realizar experimentos adicionales para comprobar este indicio. Una forma de comprobarlo sería tratar las células con un enzima con actividad glucosidasa antes de realizar los lisados y comprobar si desaparece la doble banda.

### **4.3. Patrón de expresión génica de ligandos de la familia EGF**

Finalmente, nos propusimos determinar el papel de tres ligandos de la familia EGF en la resistencia intrínseca y adquirida al tratamiento con erlotinib. Para ello, realizamos una cuantificación relativa por RT-PCR del patrón de expresión basal y bajo tratamiento de los ligandos NRG-1 $\beta$  (que se une a HER3 y HER4), EPR (capaz de unirse a EGFR y HER4) y TGF- $\alpha$  (de unión exclusiva a EGFR y considerado, junto con EGF, su principal ligando).

La línea BxPc3 ( $IC_{50} = 14,12 \mu M$ ) mostró expresar en una medida similar los ligandos NRG-1 y TGF- $\alpha$  en condiciones basales, mientras que su expresión para EPR fue sensiblemente más baja [Figura 8]. La coexpresión de estos tres factores de crecimiento, junto con sus distintas especificidades de unión a receptor, conferirían a BxPc-3 la capacidad para activar a ErbB1/3/4, los tres receptores de la familia para los que se conocen ligandos. En consecuencia, la expresión de ligandos que demuestra nuestro estudio para BxPc-3, junto con la elevada presencia de EGFR y HER3, permitirían un cierto grado de activación de las vías ErbB en condiciones basales. Así mismo, BxPc3 había demostrado una moderada presencia de ErbB2, compañero preferido de dimerización del resto de receptores de la familia, para el que no se conocen ligandos que lo activen. En caso de que BxPc-3 exprese también ErbB4, su expresión de los tres ligandos analizados le permitiría activar todos los receptores de la familia en condiciones basales.



**Figura 8.** Patrón de expresión de mRNA de tres ligandos de la familia EGF en células BxPc3 y HPAF-II. Los niveles de mRNA de cada ligando (NRG-1, neuregulina-1; EPR, epirregulina; y TGF- $\alpha$ , *Transforming growth factor- $\alpha$* ) se evaluaron por *real time-PCR* en condiciones basales y bajo tratamiento durante 24h con concentraciones de erlotinib análogas a sus IC50. Los valores se normalizaron por el nivel de expresión determinado para TBP. Cada barra representa el promedio  $\pm$  SD de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante t-test múltiple. Los asteriscos indican: \*\* ( $p < 0.001$ ), \* ( $p < 0.005$ ).

En respuesta al tratamiento con erlotinib, BxPc-3 alteró el patrón de expresión de los tres factores de crecimiento analizados. Resulta sorprendente cómo la inhibición de EGFR provocó un aumento estadísticamente significativo en la expresión de TGF- $\alpha$  y EPR. El primero se une de forma exclusiva a EGFR, mientras que EPR es capaz de unirse también a HER4, lo que podría proporcionar a BxPc3 una vía de escape al efecto citostático provocado por la inhibición de EGFR. Sin embargo, la transcripción del gen NRG1 se vio negativamente afectada, aunque no totalmente abolida, por el tratamiento.

HPAF-II ( $IC_{50} = 10.4 \mu M$ ), en cambio, mostró unos niveles basales de expresión de EPR y TGF- $\alpha$  considerablemente más elevados que los observados en BxPc-3. Su nivel de mRNA de NRG-1 resultó ser indetectable antes y después del tratamiento con erlotinib, lo que resulta sorprendente asumiendo que HPAF-II había mostrado el nivel de expresión de HER3 más elevado de las cuatro líneas analizadas. En respuesta al tratamiento con erlotinib, HPAF-II presentó una regulación negativa estadísticamente significativa de TGF- $\alpha$ , mientras que los niveles de EPR no variaron significativamente ( $p = 0.264$ ).

### 5.1. Papel de la heterogeneidad tumoral en resistencia

Las diferencias fenotípicas intra- e intertumoraes constituyen uno de los principales factores que limitan la efectividad de las terapias dirigidas como erlotinib [8]. Las líneas celulares utilizadas en presente estudio muestran procedencias muy diferentes, lo que resulta en la presencia de diferentes alteraciones genéticas y metabólicas que condicionan la efectividad del tratamiento [10]. Los valores de  $IC_{50}$  obtenidos por nuestro grupo para las cuatro líneas celulares analizadas ejemplifican este condicionamiento: mientras que AsPc-1, BxPc-3 y HPAF-II se mostraron relativamente sensibles al tratamiento con erlotinib, Capan-1 demostraron ser extremadamente resistentes al mismo.

Diferentes autores han evaluado la sensibilidad a erlotinib de líneas celulares de PaC –incluyendo las que utilizamos en este estudio–, a menudo con resultados controvertidos. Las líneas AsPc-1, BxPc-3 y HPAF-II muestran en general valores de  $IC_{50}$  entre 1 y 15  $\mu$ M de erlotinib, lo cual es consistente con nuestros resultados [47, 70, 71]. Sin embargo, no necesariamente se mantiene el orden de sensibilidad determinado en nuestros ensayos de proliferación (AsPc-1 > HPAF-II > BxPc-3 >> Capan-1). Pero el caso de Capan-1 es especialmente llamativo: mientras que nosotros no pudimos establecer un valor de  $IC_{50}$  dentro del rango de concentraciones aplicado, Furugaki et al. [72] reportaron una  $IC_{50}$  de 3  $\mu$ M para Capan-1. En cambio, Lange et al. [70] detectaron también un pobre grado de sensibilidad en Capan-1.

Varios factores pueden ser causantes de estas diferencias. En primer lugar, el diseño experimental utilizado por diferentes grupos es muy variable. Furugaki et al. incubaron las líneas HPAC y Capan-1 durante 4 y 6 días, respectivamente, en presencia del fármaco [72]. En cambio, Lange et al. redujeron la incubación con erlotinib a 24h, obteniendo menor sensibilidad. Nuestro estudio permitió al tratamiento actuar durante 48 horas para todas las líneas. Los tiempos de incubación utilizados por Furugaki et al. son insuficientes para desencadenar grandes adaptaciones, por lo que resulta lícito pensar que estos contribuyan al marcado efecto citostático que obtuvieron. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que 24 horas de tratamiento con la  $IC_{50}$  del fármaco son suficientes para provocar un primer cambio en la expresión de ligandos de la familia EGF, contribuyendo al desarrollo de resistencias. Segundo, el estado de las líneas celulares es un condicionante constante en el trabajo con cultivos celulares. A medida que aumenta el número de subcultivos de una determinada línea celular, sus células dejan progresivamente de parecerse a las que se cultivaron inicialmente. De este modo, una misma línea celular cultivada en diferentes laboratorios puede acabar presentando fenotipos muy desiguales como consecuencia de la aparición de mutaciones, alteraciones epigenéticas, etc. Estas diferencias afectarán a los resultados de sensibilidad de aquella línea obtenidos por distintos grupos, perjudicando la reproducibilidad de tales resultados.

Las alteraciones oncogénicas que exhibe una célula determinan la conveniencia de una terapia concreta frente a aquel fenotipo, especialmente en el caso de las terapias dirigidas. Incluso si la célula presenta la anomalía contra la que se dirige una determinada terapia –en el caso de erlotinib, la sobreexpresión de EGFR–, aquella célula puede ser intrínsecamente resistente al tratamiento. [8] A pesar de que nuestro estudio detectó elevados niveles de expresión de EGFR en las líneas BxPc-3 y HPAF-II, estas tan solo mostraron una sensibilidad moderada al fármaco. La composición de receptores ErbB las cuatro líneas de PaC analizadas mostró una cierta relación con la sensibilidad a erlotinib, aunque no pudimos detectar una correlación clara basada en este criterio. La expresión de receptores de otras familias, el establecimiento de bucles autocrinos, mutaciones oncogénicas, etc. hacen que los niveles de expresión de RTKs ErbB sean insuficientes como marcadores de sensibilidad a erlotinib. Las considerables diferencias de sensibilidad

determinadas por nuestros ensayos de proliferación evidencian la necesidad de encontrar marcadores tumorales que permitan predecir la respuesta que presentará un paciente frente a la terapia con erlotinib.

Hasta la actualidad, la eficacia de la mayoría de terapias dirigidas ha sido limitada. La inhibición específica de moléculas que han mostrado un fuerte potencial oncogénico ha mostrado ser insuficiente para provocar un efecto terapéutico duradero. Los mecanismos de resistencia intrínseca y la adquisición de nuevos mecanismos de resistencia han supuesto factores limitantes de la efectividad de terapias dirigidas. Cuando el tumor pancreático se enfrenta por primera vez a la aplicación de erlotinib y gemcitabina, puede producirse al principio una sinergia que resulte en regresión tumoral. Pero incluso si un paciente responde inicialmente a la terapia, ciertas células del tumor podrían mostrarse intrínsecamente resistentes a la misma. Estas acabarán encontrando vías de escape más o menos efectivas que les permitirán evadir los efectos del tratamiento. Por tanto, la consecución de terapias dirigidas realmente beneficiosas para el paciente requerirá un mejor entendimiento de los mecanismos de resistencia a las mismas.

## **5.2. Expresión basal de NRG-1, EPR y TGF- $\alpha$ en BxPc-3 y HPAF-II**

Dada la acción auto-, para- y yuxtacrina de estos ligandos y la naturaleza secretora de su síntesis, consideramos que sería más preciso realizar un análisis de la expresión de estos ligandos a nivel de mRNA. De haber analizado por *immunoblotting* la cantidad de proteína expresada, nuestros resultados se habrían visto negativamente afectados por la secreción de los ligandos al medio extracelular y por los factores de crecimiento contenidos por el suero fetal con que se suplementa el medio de cultivo.

Existen numerosos puntos de control en la síntesis de ligandos de la familia EGF, como la proteólisis de sus precursores proteicos por parte de metaloproteasas de la familia ADAMs [26]. En consecuencia, los niveles de mRNA de estos ligandos no son necesariamente representativos de los niveles de sus respectivos factores de crecimiento que serán finalmente secretados. Sin embargo, los niveles de expresión de los genes TGFA y EPR que detectamos en la línea HPAF-II en condiciones basales fueron realmente destacables. En este sentido, nuestros resultados sugieren fuertes bucles autocrinos basados en estos factores de crecimiento, que proveerían a la célula una ventaja proliferativa. La actividad paracrina, yuxtacrina e intracrina de estos ligandos contribuiría también al mantenimiento del fenotipo tumoral de HPAF-II.

No obstante, la elevada expresión de TGF- $\alpha$  y EPR en HPAF-II, junto con la destacable presencia de EGFR en su membrana plasmática, sugieren también un cierto grado de dependencia hacia la vía EGFR, lo que podría contribuir a la sensibilidad mostrada por HPAF a erlotinib. Por otro lado, nuestros ensayos no pudieron detectar expresión de NRG-1 en HPAF-II. Llama la atención que, siendo esta la línea que más HER3 expresa de las cuatro analizadas, y expresándolo en una medida similar que EGFR, sus niveles basales de mRNA de NRG-1 fueran indetectables. Nuestros resultados contrastan con la tendencia que varios autores [39-43] han venido señalando hacia la importancia del receptor HER3 y del eje de señalización NRG-1/HER3 en la proliferación y supervivencia de células de PaC.

El hecho de que nuestro estudio considere tan solo la isoforma NRG-1 $\beta$  nos impide asegurar la falta de actividad de las vías iniciadas por HER3 en la línea HPAF-II. Varios factores impiden alcanzar esta conclusión: en primer lugar, a HER3 se une también NRG-2, ligando que nuestros ensayos no contemplaron. Segundo, se conocen más de 20 variantes de splicing alternativo de los ligandos NRG-1 y NRG-2 [73] Finalmente, Liles et al. indicaron que buena parte de las neuregulinas que utiliza el cáncer pancreático para progresar son aportadas por el estroma tumoral [43]. El adenocarcinoma pancreático es precisamente uno de los tumores sólidos más ricos en estroma conocidos, lo que provee a las células del interior del tumor de un microambiente idóneo para promover su proliferación, supervivencia e invasión



[74]. En este sentido, el papel crucial jugado por el estroma en PaC sugiere que nuestros modelos celulares serían insuficientes para asegurar una falta de relevancia del eje de señalización NRG-1/HER3 en la etiología del cáncer pancreático.

La coexpresión que mostró BxPc-3 en condiciones basales de los receptores ErbB y los tres ligandos de la familia EGF analizados en nuestro estudio reduciría el efecto citostático de erlotinib al permitir la activación de vías alternativas a EGFR sin necesidad de provocar un cambio en el patrón de expresión. Esta diversidad contribuiría al mantenimiento de la proliferación y la supervivencia de sus células, mediante un mecanismo de resistencia intrínseca. A pesar de presentar una expresión de EPR y TGF- $\alpha$  menos marcada que HPAF-II, su expresión de NRG-1 podría tener un papel en su menor sensibilidad al fármaco, al proveer a las células de un mecanismo de resistencia intrínseca.

### **5.3. Alteración del patrón de expresión de ligandos de la familia EGF como mecanismo de resistencia adquirida**

Además de la moderada expresión basal de NRG-1 que demuestra nuestro trabajo en BxPc-3, esta se vio negativamente regulada en respuesta a erlotinib. Esta disminución en la expresión de NRG-1 contrasta con los resultados obtenidos por Liles et al., quienes habían propuesto que la interacción NRG-1/HER3 contribuía no solo a la proliferación de células de PaC, sino también a su adquisición de resistencia a terapias antitumorales [42]. Sin embargo, los RTKs habitualmente son capaces de provocar su máxima intensidad de respuesta bajo activación por ligando de un pequeño porcentaje de receptores [69]. Por tanto, el nivel de expresión que mostró BxPc-3 en respuesta a erlotinib podría ser suficiente para mantener la activación de HER3, cuya señalización intracelular podría proveer a la célula un mecanismo de resistencia adquirida que sustentara su proliferación y supervivencia frente a la inhibición de EGFR.

Liles et al. habían indicado posteriormente que la aportación exógena de NRG-1 estimulaba la proliferación de las líneas celulares Capan-1, HPAF-II y AsPc-1, pero no de BxPc-3, después de tratarlas con erlotinib [43]. Sus resultados concuerdan también con la expresión de HER3 determinada por nuestro grupo mediante inmunoblotting. Nuestro trabajo demuestra que BxPc-3 presenta una moderada expresión basal de NRG-1, lo que concuerda con el hecho de que un aporte extra de tal ligando no tenga un efecto sobre su proliferación. La falta de expresión de NRG-1 en HPAF-II, junto con su elevado nivel de expresión de HER3, es también congruente con el aumento en la viabilidad celular observado por Liles et al. tras suministrarles NRG-1.

El hecho de que BxPc-3 aumentara su expresión de EPR y TGF- $\alpha$ , mientras continuaba expresando NRG-1, estaría también implicado en el mantenimiento de la proliferación, constituyendo un mecanismo de resistencia adquirida. En caso de que la célula exprese HER4, la regulación positiva de EPR permitiría una mayor activación de este receptor. De este modo, BxPc-3 estaría reduciendo el efecto citostático de erlotinib por activación de receptores ErbB alternativos –presumiblemente, HER2, HER3 y HER4-, gracias a su coexpresión de los tres ligandos analizados y al aumento de expresión de EPR y TGF- $\alpha$ . HPAF-II apenas varió su expresión de EPR frente a la inhibición de EGFR mediada por erlotinib.

En caso de que HPAF-II exprese HER4, EPR podría continuar activándolo, por lo que es posible que el mantenimiento de la expresión de EPR tenga una significación en este sentido. La expresión de TGF- $\alpha$  –de unión exclusiva a EGFR- se vio, en cambio, mermada en respuesta a la inhibición del receptor. No obstante, el nivel de expresión de ambos ligandos continuó siendo sensiblemente más elevado que el observado en BxPc-3, por lo que debería ser suficiente para sostener la proliferación celular en respuesta a erlotinib. Aun así, el hecho de que HPAF-II se mostraran ligeramente más sensibles al EGFR-TKI que BxPc-3 podría presentar una relación con sus respectivos cambios de patrones de expresión y con la ausencia de expresión de NRG-1 en HPAF-II.



### 6.1. General conclusions

The conclusions of the study are:

1. AsPc-1, BxPc-3 and HPAF-II cell lines proved to be moderately sensitive to treatment with erlotinib, whereas Capan-1 was insensitive to it.
2. The four analyzed PaC cell lines shown to coexpress EGFR, HER2 and HER3 receptors to a different extent.
3. The expression levels of EGFR did not show to be a good marker of sensitivity to erlotinib. The coexpression of the three receptors analyzed showed to be a better, but not absolute, marker of sensitivity.
4. BxPc-3 coexpressed moderate basal mRNA levels of NRG-1, EPR and TGF- $\alpha$ , whereas expression of NRG-1 was undetectable in HPAF-II. This line showed a strong expression of EPR and TGF- $\alpha$ , whose levels were much higher than those observed in BxPc-3.
5. The expression of these ligands would contribute to reduce sensitivity to erlotinib in both lines through an intrinsic resistance mechanism.
6. Treatment with erlotinib provoked a change in the expression pattern of the three ligands analyzed in BxPc-3, which upregulated EPR and TGF- $\alpha$  and downregulated the expression of NRG-1.
7. Changes in the expression pattern of ligands of the EGF family within 24 hours contributed to evade EGFR inhibition by an acquired resistance mechanism, but they could be related to the higher sensitivity to erlotinib showed by HPAF-II, in comparison to BxPc-3.
8. The phenotypic differences observed in terms of (i) coexpression of ErbB receptors, (ii) coexpression of EGF ligands and (iii) alteration of the expression pattern of the analyzed ligands, proved to be a more accurate criterion for predicting sensitivity to erlotinib that not only the coexpression of ErbB receptors.

## 6.2. Future perspectives and final remarks

Over the last decades, there has been a dramatic increase in knowledge of the biochemistry of the ErbB family. The way in which its activity is regulated under physiological conditions and the way in which it fails in the tumor cell is being deepened. [29] We have an ever deeper knowledge about internalization, recycling and degradation of ErbBs; their cytoplasmic functions; their translocation to the nucleus and the functions that they can exert within it (phosphorylation of transcription factors, action of the receptor itself as a transcription factor, activation of his own expression...), among others [23, 75]. However, the molecular mechanism by which the cell detects the erlotinib-mediated reduction in EGFR activity is not completely known. Knowledge of how this detection occurs and how the cell responds to it could provide a basis for overcoming this mechanism of acquired resistance.

In cancer, the acquisition of resistance to chemotherapies occurs through a cyclic and cumulative process of adaptation and natural selection. [44] In PaC patients, the acquired resistance to erlotinib appears within few weeks, while other tumor types can take up to months to become refractory to treatment [20]. Our study shows that 24 hours of treatment with the  $IC_{50}$  of EGFR-TKI erlotinib were enough to provoke a first resistance mechanism, but it would be interesting to evaluate the way in which the same cells respond after continuous exposure to erlotinib. Under these conditions, weeks or months of exposure to this drug would cause an intense selection phenomenon, in which it is expected that those cells that prevail in that environment respond much more appropriately, optimizing the way they circumvent erlotinib-mediated inhibition and, therefore, becoming totally insensitive to it.

According to the autocrine hypothesis of Sporn, Todaro and Roberts, [50] our results demonstrated that the alteration in the expression pattern of EGF-related ligands contributes to evade the inhibition of EGFR. The formation of autocrine loops has shown once again a role in tumor etiology, as well as in resistance to chemotherapeutics. But the change in the expression pattern of EGF-related ligands had previously been demonstrated as a mechanism of resistance in a number of epithelial adenocarcinomas, including prostate, breast, head and neck or colorectal tumors. Our group adds pancreatic adenocarcinoma to this list, suggesting a phenomenon of critical significance. The list is now long enough to think that this mechanism of acquired resistance may be universal: tumorigenesis and evasion of chemotherapeutics through the establishment of ErbB autocrine loops could constitute a common thesis to all adenocarcinomas of epithelial origin.

## VII. REFERENCIAS

- Preis, M., & Korc, M. (2010). Kinase signaling pathways as targets for intervention in pancreatic cancer. *Cancer Biology and Therapy*, 9(10), 754–763. <https://doi.org/10.4161/cbt.9.10.11534>
- Hamacher, R., Schmid, R. M., Saur, D., & Schneider, G. (2008). Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular Cancer*, 7, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-7-64>
- Llop, E., Guerrero, P. E., Duran, A., Barrabés, S., Massaguer, A., Ferri, M. J., ... Peracaula, R. (2018). Glycoprotein biomarkers for the detection of pancreatic ductal adenocarcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 24(24), 2537–2554. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i24.2537>
- Yang, J., Li, J., Zhu, R., Zhang, H., Zheng, Y., Dai, W., Guo, C. (2014). K-ras mutational status in cytohistological tissue as a molecular marker for the diagnosis of pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis. *Disease Markers*, 2014, 573783. <https://doi.org/10.1155/2014/573783>
- Ogier, C., Colombo, P. E., Bousquet, C., Canterel-Thouennon, L., Sicard, P., Garambois, V., Larbouret, C. (2018). Targeting the NRG1/HER3 pathway in tumor cells and cancer-associated fibroblasts with an anti-neuregulin 1 antibody inhibits tumor growth in pre-clinical models of pancreatic cancer. *Cancer Letters*, 432(June), 227–236. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.06.023>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Abramson, M. A., Jazag, A., van der Zee, J. A., & Whang, E. E. (2007). The molecular biology of pancreatic cancer. *Gastrointestinal Cancer Research: GCR*, 1(4 Suppl 2), S7–S12. Recuperado de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2666839&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Gerashchenko, T. S., Denisov, E. V., Litviakov, N. V., Zavyalova, M. V., Vtorushin, S. V., Tsyganov, M. M., ... Cherdynytseva, N. V. (2013). Intratumor Heterogeneity : Nature and Biological Significance, 78(11).
- Winer, E., Gralow, J., Diller, L., Karlan, B., Loehrer, P., Pierce, L., ... Sweet, D. (2009). Clinical cancer advances 2008: Major research advances in cancer treatment, prevention, and screening—a report from the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology*, 27(5), 812–826. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.21.2134>
- Deer, E. L., González-Hernández, J., Coursen, J. D., Shea, J. E., Ngatia, J., Scaife, C. L., ... Mulvihill, S. J. (2010). Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas*, 39(4), 425–35. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3181c15963>
- Lee, E. Y. H. P., & Muller, W. J. (n.d.). Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003236>
- Ryan, D. P., Hong, T. S., & Bardeesy, N. (2014). Pancreatic Adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine*, 371(11), 1039–1049. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1404198>
- Min Lim, S., Westover, K., Ficarro, S., Pacold, M., & Carrasco, M. (20014). Therapeutic Targeting of Oncogenic K-Ras by a Covalent Catalytic Site Inhibitor. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(1), 199–204. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x>. Endothelial
- Krempley, B. D., & Yu, K. H. (2017). Preclinical models of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Chinese Clinical Oncology*, 6(3). <https://doi.org/10.21037/CCO.V6i3.15430>
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298(5600), 1912–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., ... Mustelin, T. (2004). Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome. *Cell*, 117(6), 699–711. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.018>
- Panosa Roqueta, C. (2015). *Antitumoral properties of epidermal growth factor derivatives*. Universitat de Girona.
- Roskoski, R. (2014). ErbB/HER protein-tyrosine kinases: Structures and small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*, 87, 42–59. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.06.001>
- Kelley, R. K., & Ko, A. H. (2008). Erlotinib in the treatment of advanced pancreatic cancer. *Biologics: Targets & Therapy*, 2(1), 83–95. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19707431>
- Roskoski, R. (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological Research*, 79, 34–74. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.11.002>
- Stein, R. A., & Staros, J. V. (2000). Evolutionary analysis of the ErbB receptor and ligand families. *Journal of Molecular Evolution*, 50(5), 397–412. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10824084>
- Freed, D. M., Bessman, N. J., Kiyatkin, A., Salazar-Cavazos, E., Byrne, P. O., Moore, J. O., ... Lemmon, M. A. (2017). EGFR Ligands Differentially Stabilize Receptor Dimers to Specify Signaling Kinetics. *Cell*, 171(3), 683–695.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.017>
- Sigismund, S., Avanzato, D., & Lanzetti, L. (2018). Emerging functions of the EGFR in cancer. *Molecular Oncology*, 12(1), 3–20. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12155>
- Dreux AC, Lamb DJ, Modjtahedi H, Ferns GA (May 2006). "The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis". *Atherosclerosis*. 186 (1): 38–53. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.06.038. PMID 16076471.
- Gullick, W. J. (2001). The Type 1 growth factor receptors and their ligands considered as a complex system. *Endocrine-Related Cancer*, 8(2), 75–82. <https://doi.org/10.1677/ERC.0.0080075>
- Blobel, C. P. (2005). ADAMS : key components in EGFR signaling and development, 6(January), 32–43. <https://doi.org/10.1038/nrm1548>
- Singh, A. B., & Harris, R. C. (2005). Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cellular Signalling*, 17(10), 1183–1193. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.03.026>
- Gan, H. K., Walker, F., Burgess, A. W., Rigopoulos, A., Scott, A. M., & Johns, T. G. (2007). The epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor AG1478 increases the formation of inactive untethered EGFR dimers. Implications for combination therapy with monoclonal antibody 806. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(5), 2840–50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605136200>
- Endres, N. F., Barros, T., Cantor, A. J., & Kuriyan, J. (2014). Emerging concepts in the regulation of the EGF receptor and other receptor tyrosine kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(10), 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.08.001>
- Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A., & Kuriyan, J. (2006). An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor. *Cell*, 125(6), 1137–1149. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.013>
- Alvarado, D., Klein, D. E., & Lemmon, M. A. (2010). Structural Basis for Negative Cooperativity in Growth Factor Binding to an EGF Receptor. *Cell*, 142(4), 568–579. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.015>
- Krall, J. A., Beyer, E. M., & MacBeath, G. (2011). High- and Low-Affinity Epidermal Growth Factor Receptor-Ligand Interactions Activate Distinct Signaling Pathways. *PLoS ONE*, 6(1), e15945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015945>
- Macdonald, J. L., & Pike, L. J. (2008). Heterogeneity in EGF-binding affinities arises from negative cooperativity in an aggregating system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(1), 112–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707080105>
- Wilson, K. J., Gilmore, J. L., Foley, J., Lemmon, M. A., Riese, D. J., & II. (2009). Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 122(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.11.008>
- Lindzen, M., Lavi, S., Leitner, O., & Yarden, Y. (2010). Tailored cancer immunotherapy using combinations of chemotherapy and a mixture of antibodies against EGF-receptor ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(28), 12559–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006218107>
- Eckstein, N., Servan, K., Girard, L., Cai, D., von Jonquieres, G., Jaehde, U., ... Royer, H.-D. (2008). Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Analysis Identifies Amphiregulin as a Key Factor for Cisplatin Resistance of Human Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(2), 739–750. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706287200>
- Barozzi, C., Ravioli, M., D'Errico, A., Grazi, G. L., Poggioli, G., Cavrini, G., ... Grigioni, W. F. (2002). Relevance of biologic markers in colorectal carcinoma. *Cancer*, 94(3), 647–657. <https://doi.org/10.1002/cncr.10278>

38. Bech Thøgersen, V., Sandahl Sørensen, B., Seier Poulsen, S., Falck Ørntoft, T., Wolf, H., & Nexø, E. (2001). A Subclass of HER1 Ligands Are Prognostic Markers for Survival in Bladder Cancer Patients 1. *CANCER RESEARCH*, *61*, 6227–6233. Recuperado de: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/61/16/6227.full.pdf>
39. Hirakawa, T., Nakata, B., Amano, R., Kimura, K., Shimizu, S., Ohira, G., Hirakawa, K. (2011). HER3 overexpression as an independent indicator of poor prognosis for patients with curatively resected pancreatic cancer. *Oncology*, *81*(3–4), 192–198. <https://doi.org/10.1159/000333825>
40. Ocana, A., Vera-Badillo, F., Seruga, B., Templeton, A., Pandiella, A., & Amir, E. (2013). HER3 overexpression and survival in solid tumors: A meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, *105*(4), 266–273. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs501>
41. Friess, H., Yamanaka, Y., Kobrin, M. S., Do, D. A., Büchler, M. W., & Korc, M. (1995). Enhanced erbB-3 expression in human pancreatic cancer correlates with tumor progression. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *1*(11), 1413–20. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815939>
42. Liles, J. S., Arnoletti, J. P., Tzeng, C.-W. D., Howard, J. H., Kossenkov, A. V., Kulesza, P., Frolov, A. (2010). ErbB3 expression promotes tumorigenesis in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Biology & Therapy*, *10*(6), 555–63. <https://doi.org/10.4161/CBT.10.6.12532>
43. Liles, J. S., Arnoletti, J. P., Kossenkov, A. V., Mikhaylina, A., Frost, A. R., Kulesza, P., ... Frolov, A. (2011). Targeting ErbB3-mediated stromal-epithelial interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma. *British Journal of Cancer*, *105*(4), 523–33. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.263>
44. Yamaoka, T., Ohba, M., & Ohmori, T. (2017). Molecular-Targeted Therapies for Epidermal Growth Factor Receptor and Its Resistance Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(11). <https://doi.org/10.3390/ijms18112420>
45. Ciardiello, F. (2000). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as anticancer agents. *Drugs*, *60 Suppl 1*, 25–32–2. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11129169>
46. Kelley, R. K., & Ko, A. H. (2008). Erlotinib in the treatment of advanced pancreatic cancer. *Biologics: Targets & Therapy*, *2*(1), 83–95. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19707431>
47. Lange, F., Rateitschak, K., Kossow, C., Wolkenhauer, O., Jaster, R., Su, Q., & Nagahara, H. (2012). Insights into erlotinib action in pancreatic cancer cells using a combined experimental and mathematical approach. *World J Gastroenterol November World J Gastroenterol*, *21*(1843), 6226–6234. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i43.6226>
48. Ferrer-Soler, L., Vazquez-Martin, A., Brunet, J., Menendez, J. A., De Llorens, R., & Colomer, R. (2007). An update of the mechanisms of resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in breast cancer: Gefitinib (Iressa™)-induced changes in the expression and nucleo-cytoplasmic trafficking of HER-ligands (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, *20*(1), 3–10.
49. Carrión-Salip, D., Panosa, C., Menendez, J. A., Puig, T., Oliveras, G., et al. (2012). Androgen-independent prostate cancer cells circumvent EGFR inhibition by overexpression of alternative HER receptors and ligands. *International Journal of Oncology*, *41*(3), 1128–1138. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1509>
50. Kolb, A., Kleeff, J., Arnold, N., Giese, N. A., Giese, T., Korc, M., & Friess, H. (2007). Expression and differential signaling of heregulins in pancreatic cancer cells. *International Journal of Cancer*, *120*(3), 514–523. <https://doi.org/10.1002/ijc.22360>
51. Sporn, M. B., & Todaro, G. J. (1980). Autocrine Secretion and Malignant Transformation of Cells. *New England Journal of Medicine*, *303*(15), 878–880. <https://doi.org/10.1056/NEJM198010093031511>
52. Sporn, M. B., & Roberts, A. B. (1985). Autocrine growth factors and cancer. *Nature*, *313*(6005), 745–747. <https://doi.org/10.1038/313745a0>
53. Cross, M., & Dexter, T. M. (1991). Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell*, *64*(2), 271–280. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90638-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90638-F)
54. Sporn, M. B., & Roberts, A. B. (1988). Peptide growth factors are multifunctional. *Nature*, *332*(6161), 217–219. <https://doi.org/10.1038/332217a0>
55. Schlessinger, J., & Lemmon, M. A. (2006). Nuclear Signaling by Receptor Tyrosine Kinases: The First Robin of Spring. *Cell*, *127*(1), 45–48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.013>
56. Li, C., Iida, M., Dunn, E. F., Ghia, A. J., & Wheeler, D. L. (2010). Nuclear EGFR Contributes to Acquired Resistance to Cetuximab. *Medicine*, *28*(43), 3801–3813. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.234>
57. ATCC. (2014). Animal cell culture guide. Tips and techniques for continuous cell lines. Recuperado de [www.atcc.org](http://www.atcc.org).
58. Strober, W. (2001). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. In *Current Protocols in Immunology* (Vol. Appendix 3, p. Appendix 3B). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>
59. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. 2013 May 1. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
60. Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H., & Schubert, D. (2002). Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *Journal of Neurochemistry*, *69*(2), 581–593. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x>
61. He, F. (2011). Bradford Protein Assay. *Bio-Protocol*, *1*(6). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.45>
62. Kaufmann, S. H., Ewing, C. M., & Shaper, J. H. (1987). The erasable Western blot. *Analytical Biochemistry*, *161*(1), 89–95. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90656-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90656-7)
63. Alegria-Schaffer A, Lodge A, Vattem K. (2009) Chapter 33: Performing and Optimizing Western Blots with an Emphasis on Chemiluminescent Detection. *Methods in Enzymology* 463:573–599.
64. Voet, D., Voet, J., Pratt, C. (2007). En Nucleótidos, ácidos nucleicos e información genética. *Fundamentos De Bioquímica*. Sección 3-5 (p. 68-69). Médica Panamericana.
65. Technologies, A. (2011). Critical Factors for Successful Real-Time PCR. *Nature Methods*, *64*. <https://doi.org/10.1177/107906320701900206>
66. Bustin, S. A. (2000). Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, *25*(2), 169–193. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>
67. Qiagen. (2012). RNeasy Mini Handbook. *Sample & Assay Technologies*, (June), 50–54. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-77674-3>
68. Hernández, A., Vasallo, P. M., Salido, A. T. E. (1995). Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. *Nefrología*, *XV*, 67–84.
69. Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, *141*(7), 1117–34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>
70. Wang, L., Zhu, Z. X., Zhang, W. Y., & Zhang, W. M. (2011). Schedule-dependent cytotoxic synergism of pemetrexed and erlotinib in BXPC-3 and PANC-1 human pancreatic cancer cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *2*(5), 969–975. <https://doi.org/10.3892/etm.2011.293>
71. Walsh, N., Kennedy, S., Larkin, A., Corkery, B., O'driscoll, L., Clynes, M., ... O'donovan, N. (2013). EGFR and HER2 inhibition in pancreatic cancer. *Invest New Drugs*, *13*, 558–566. <https://doi.org/DOI.10.1007/s10637-012-9891-x>
72. Furugaki, K., Tshiki, I., Kondoh, K., Moriya, Y., & Mori, K. (2010). Antitumor activity of erlotinib in combination with gemcitabine in vitro and in vivo models of KRAS-mutated pancreatic cancers. *Oncol Letters*, *1*, 231–235. [https://doi.org/10.3892/ol\\_00000041](https://doi.org/10.3892/ol_00000041)
73. Breuleux, M. (2007). Role of heregulin in human cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *64*(18), 2358–2377. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7120-0>
74. Waghray, M., Yalamanchili, M., di Magliano, M. P., & Simeone, D. M. (2013). Deciphering the role of stroma in pancreatic cancer. *Current Opinion in Gastroenterology*, *29*(5), 537–43. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e328363affe>
75. Huo, L., Hsu, J. L., & Hung, M.-C. (2014). Receptor Tyrosine Kinases in the Nucleus: Nuclear Functions and Therapeutic Implications in Cancers. In *Nuclear Signaling Pathways and Targeting Transcription in Cancer* (pp. 189–229). [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8039-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8039-6_8)