



Estratègies terapèutiques dirigides a evitar resistències en adenocarcinoma ductal pancreàtic

Nerea Urtasun Plans

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Programa de Doctorat de Biomedicina
Universitat de Barcelona

**Estratègies terapèutiques dirigides a evitar resistències
en adenocarcinoma ductal pancreàtic.**

Memòria presentada per
Nerea Urtasun Plans

Per optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi doctoral dirigida per la Dra. Adela Mazo Sánchez
al Grup de Teràpies Experimentals en Càncer
del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular
de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona

La directora

L'autora

Adela Mazo Sánchez

Nerea Urtasun Plans

Barcelona, Setembre 2013

A la meva família

Al Txuso

Abreviatures	I
Introducció	1
1. El pàncrees	3
1.1. Pàncrees exocrí	4
1.2. Pàncrees endocrí	5
2. El càncer de pàncrees	6
2.1. Epidemiologia del càncer de pàncrees	7
2.2. Biologia del càncer de pàncrees	8
2.3. Diagnosi i tractament del càncer de pàncrees	19
3. <i>Cancer stem cells</i> en càncer de pàncrees	24
3.1. Característiques de les <i>cancer stem cells</i>	24
3.2. <i>Cancer stem cells</i> en càncer de pàncrees	26
3.3. Estratègies terapèutiques basades en l'eliminació de les <i>cancer stem cells</i>	33
4. Noves estratègies terapèutiques per al tractament del càncer de pàncrees	35
4.1. Inhibició de receptors de factors de creixement	36
4.2. Activació de la via de TRAIL	38
4.3. Viroteràpia gènica	40
5. Models preclínic de càncer de pàncrees	44
5.1. Models animals de carcinogènesi química	44
5.2. Models animals modificats genèticament	45
5.3. Models animals establerts a partir de cèl·lules o teixit humà	46
Objectius	49
Materials i Mètodes	53
1. Cultius cel·lulars	55
1.1. Línies cel·lulars	55
1.2. Condicions de cultiu	56
1.3. Congelació i descongelació de línies cel·lulars	57
1.4. Cultiu de tumorsferes	58
1.5. Obtenció de cultius primaris	58
1.6. Control de micoplasma	59

2. Tractament de cèl·lules amb agents antitumorals i factors de creixement	61
2.1. Agents antitumorals	61
2.2. Recompte cel·lular	63
2.3. Anàlisi de la citotoxicitat: corbes dosi-resposta	63
2.4. Factors de creixement	65
3. Tècniques de citometria de flux	66
3.1. Immunofluorescència de cèl·lules en suspensió	67
3.2. Separació de subpoblacions cel·lulars	69
3.3. Anàlisi del perfil de cicle cel·lular	70
4. Tècniques relacionades amb la manipulació d'adenovirus	71
4.1. Obtenció dels adenovirus	71
4.2. Amplificació dels adenovirus	73
4.3. Purificació dels estocs virals	73
4.4. Titulació dels estocs virals	74
4.5. Transducció de cèl·lules amb adenovirus	76
5. Tècniques d'anàlisi de l'expressió de proteïnes	77
5.1. Extracció de proteïnes a partir de cultius cel·lulars	77
5.2. Extracció de proteïnes a partir de teixit	78
5.3. Determinació de la concentració proteica total	78
5.4. Anàlisi de proteïnes mitjançant western blot	79
5.5. Detecció de proteïnes mitjançant <i>arrays</i> d'anticossos	83
5.6. Immunocitoquímica de cèl·lules adherents	84
5.7. Tinció de l'heterocromatina centromèrica	86
6. Tècniques emprades en els estudis <i>in vivo</i>	87
6.1. Animals d'experimentació i condicions d'estabulació	87
6.2. Implantació de fragments tumorals humans al pàncrees de ratolins atímics	87
6.3. Injecció de suspensions cel·lulars al pàncrees de ratolins atímics	88
6.4. Seguiment del creixement tumoral	88
6.5. Tractament dels animals	89
6.6. Avaluació de la biodistribució dels adenovirus	90
6.7. Obtenció de tumors intrapancreàtics	92

7. Tècniques histològiques	94
7.1. Inclusió en blocs de parafina	94
7.2. Obtenció de talls histològics amb micròtom	94
7.3. Tinció hematoxilina-eosina de mostres parafinades	95
7.4. Tinció tricròmica de Masson de mostres parafinades	95
7.5. Detecció de l'heterocromatina centromèrica de mostres parafinades	96
7.6. Tinció immunohistoquímica de mostres parafinades	96
Resultats i Discussió	99
1. Cancer stem cells en models de càncer de pàncrees humà	101
1.1. Aïllament i caracterització de subpoblacions cel·lulars amb propietats de <i>cancer stem cells</i> i detecció d'aquestes en models ortotòpics de càncer de pàncrees humà	102
1.2. Sensibilitat de les tumorsferes a tractaments antitumorals	115
2. Efecte antitumoral de la inhibició d'IGF-IR i l'activació de DR5	129
2.1. Efecte de la inhibició d'IGF-IR i l'activació de DR5 en un model <i>in vivo</i> d'adenocarcinoma ductal pancreàtic	130
2.2. Efecte de la inhibició d'IGF-IR i l'activació de DR5 en línies cel·lulars tumorals pancreàtiques	143
3. Estratègies terapèutiques basades en el tractament amb virus oncolítics en models <i>in vivo</i> d'adenocarcinoma ductal pancreàtic	159
3.1. Efecte antitumoral del virus ICOVIR-17K	160
3.2. Comparació de l'efecte dels virus ICOVIR-15, ICOVIR15-TK/GCV i AduPARE1A sobre el tumor i la subpoblació de <i>cancer stem cells</i>	170
Conclusions	175
Bibliografia	179
Apèndix	215

5-FU	5-fluorouracil
ALDH	Aldèhid deshidrogenasa
BSA	Albúmina sèrica bovina
CSC	De l'anglès, <i>cancer stem cells</i>
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DMEM	<i>Dulbecco's modified of eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfòxid
DR5	De l'anglès, <i>death receptor 5</i>
ECM	De l'anglès, <i>extracellular matrix</i>
EDTA	Àcid etilendiaminotetracètic
EGF	De l'anglès, <i>epidermal growth factor</i>
EGFR	De l'anglès, <i>EGF receptor</i>
ELISA	De l'anglès, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	De l'anglès, <i>epithelial-mesenchymal transition</i>
EpCAM	De l'anglès, <i>epithelial cell adhesion molecule</i>
Erk	De l'anglès, <i>extracellular regulated kinase</i>
ESA	De l'anglès, <i>epithelial specific antigen</i>
FACS	De l'anglès, <i>flow activated cell sorting</i>
FBS	Sèrum fetal boví
FGF	De l'anglès, <i>fibroblast growth factor</i>
GCV	Ganciclovir
HA	De l'anglès, <i>hyaluronic acid</i>
Her-2	De l'anglès, <i>human epidermal growth factor receptor-2</i>
IGF-I	De l'anglès, <i>insuline-like factor I</i>
IGF-IR	De l'anglès, <i>IGF-I receptor</i>
IPMN	De l'anglès, <i>intraductal papillary mucinous neoplasm</i>
ITPN	De l'anglès, <i>intraductal tubulo-papillary neoplasm</i>
MCN	De l'anglès, <i>mucinous cystic neoplasm</i>
MOI	De l'anglès, <i>multiplicity of infection</i>
MTT	Bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli
PanIn	De l'anglès, <i>pancreatic intraepithelial neoplasia</i>
PDAC	De l'anglès, <i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>

Abreviatures

PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
RNA	Àcid ribonucleic
rpm	Revolucions per minut
SDS	Dodecilsulfat sòdic
TBS	Tampó tris salí
TRAIL	De l'anglès, <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometà
uPAR	De l'anglès, <i>urokinase receptor</i>
WST-8	Sal monosòdica de 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazoli

INTRODUCCIÓ

1. EL PÀNCREES

El pàncrees humà és un òrgan multilobulat situat a la cavitat retroperitoneal de l'abdomen, darrera l'estómac i adherit a l'intestí prim i a la melsa. Té un pes humit aproximat d'entre 85 i 100 g i mesura entre 14 i 18 cm de longitud, de 2 a 9 cm d'amplada i de 2 a 3 cm de gruix. Aquest es divideix en 4 regions diferencials: el cap (porció interior, a la corba del duodè), el coll (o istme), el cos (corresponent amb la regió central) i la cua (part extrema, propera a l'hílum esplènic).

Es tracta d'un òrgan d'origen endodèrmic i és el responsable de la regulació de la digestió de proteïnes i glúcids i de l'homeòstasi de la glucosa. Aquest està format per diferents tipus cel·lulars que li confereixen una doble funció, com a glàndula exocrina i endocrina. Així, el pàncrees exocrí representa un 80% de la massa tissular de l'òrgan i s'encarrega de la producció de suc pancreàtic ric en enzims digestius, mentre l'endocrí és el responsable de la síntesi de les hormones més importants relacionades amb la glucèmia. Aquesta divisió funcional és clarament visible a nivell histològic, ja que el teixit pancreàtic està format per una banda d'epiteli exocrí i un sistema d'excreció format per cèl·lules acinars, centroacinars i ductals, i per l'altra pels illots de Langerhans, que són unes estructures que contenen un mínim de quatre tipus cel·lulars diferents, especialitzats en la síntesi de diverses hormones (Figura 1).

El pàncrees és, per tant, un òrgan complex on es manifesten un gran ventall de malalties, algunes fatals i d'altres cròniques. La seva ubicació anatòmica a la cavitat duodenal, a la part superior del retroperitoneu, des d'on s'estén fins a la melsa, fa que les exploracions per palpació siguin difícils, conferint-li un caràcter d'òrgan silent.

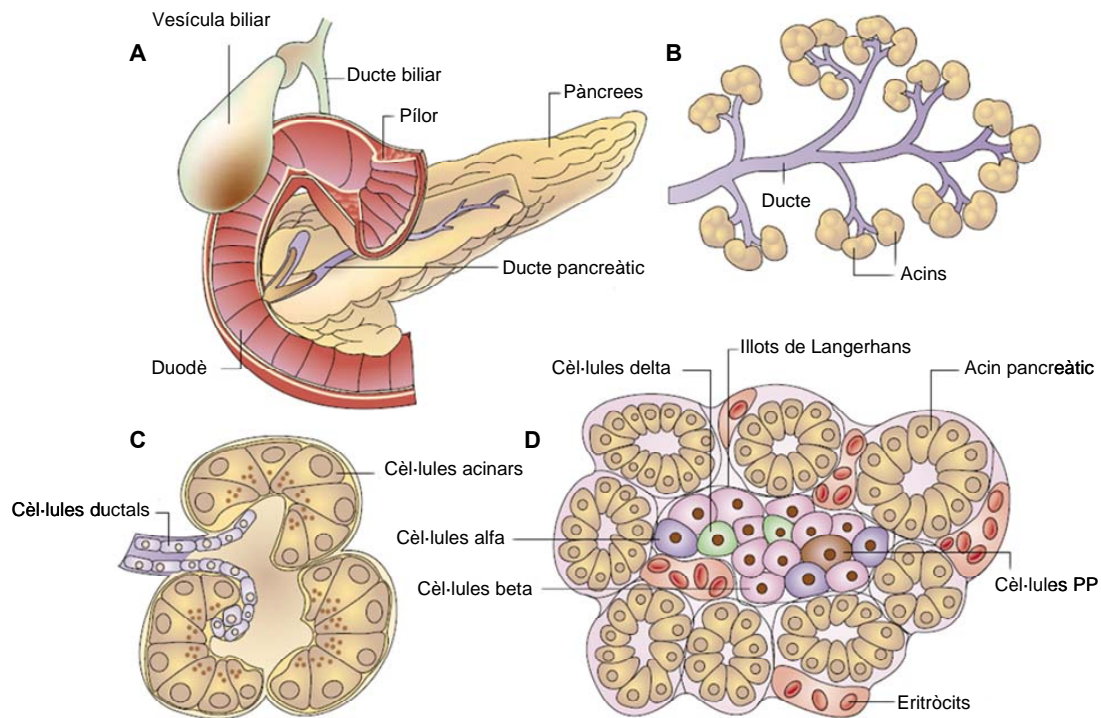


Figura 1. Anatomia del pàncrees. (A) Anatomia del pàncrees. (B) Pàncrees exocrí. (C) Acin aïllat. (D) Illot de Langerhans integrat al teixit endocrí. Adaptat de Bardeesy et al., 2002.

1.1. Pàncrees exocrí

El pàncrees exocrí està format per lòbuls macroscòpics resultants de la septació per part del teixit conjuntiu. A nivell microscòpic, aquests lòbuls estan formats per una gran proporció de cèl·lules que sintetitzen i emmagatzemen enzims digestius en forma de grànuls de zimogen, les cèl·lules acinars, i per una proporció inferior de cèl·lules que formen el sistema ductal, el qual permet l'excreció d'aquests enzims. La unitat funcional del pàncrees exocrí són els acins, que són estructures ovalades de 80 a 100 μm formades bàsicament per cèl·lules acinars de forma piramidal i amb un alt contingut en grànuls de zimogen. Aquestes cèl·lules es troben altament polaritzades, de manera que tenen el reticle endoplasmàtic rugós a la cara basal i el complex de Golgi i les vesícules derivades a la cara apical.

El sistema ductal del pàncrees exocrí s'estructura en tres parts: els ductes intralobulars, el sistema interlobular i el sistema ductal principal. Els ductes interlobulars estan formats per les cèl·lules centroacinars i les intercalades, que participen en el transport de fluids i ions des de les cèl·lules acinars veïnes i en la correcta barreja d'aquest fluid amb les proteïnes del suc pancreàtic. El sistema interlobular transcorre pel teixit connectiu interlobular i està format per cèl·lules epitelials productores de mucines. El sistema ductal principal està format per dos canals primaris: el ducte principal o de Wirsung, que transcorre des de la cua del pàncrees i drena la totalitat de l'òrgan, recollint el contingut de tots els canals secundaris, i el ducte accessori, o de Santorini, que no sempre és actiu. En arribar al cap del pàncrees, el ducte principal fa un gir que li permet unir-se al canal biliar comú, formant així l'ampul·la de Vater, una prominència situada a entre 8 i 10 cm del pílor.

1.2. Pàncrees endocrí

El teixit endocrí està ubicat enmig dels lòbuls exocrins i, a nivell morfològic, contrasta amb la superfície acinar exocrina. Aquest representa només l'1% de la massa del pàncrees i es localitza en els anomenats illots de Langerhans, on s'agrupen les cinc subpoblacions de cèl·lules que el constitueixen (Figura 1). Es coneixen almenys cinc tipus cel·lulars ben caracteritzats, les cèl·lules α , β , δ , PP i ϵ . Aquests produeixen glucagó, insulina, somatostatina, el polipèptid pancreàtic i grelina, respectivament. En humans, les cèl·lules α es situen a la perifèria de l'illot, les β a l'interior i entre ambdós tipus de cèl·lules es disposen les cèl·lules δ , PP i ϵ .

2. EL CÀNCER DE PÀNCREES

El càncer de pàncrees és un dels cinc tipus de càncer que causen més morts al món i representa la malaltia comú més letal, amb unes taxes d'incidència i mortalitat pràcticament iguals, tot i no ser una de les més prevalents. De fet, la taxa de supervivència a aquest tipus de càncer no ha millorat en els darrers vint-i-cinc anys. Això és degut a l'absència de símptomes específics que permetin una detecció precoç, la seva agressivitat i l'elevada resistència als tractaments que presenta aquest tipus de tumor (Bardeesy and DePinho, 2002; Ferlay et al., 2010; Siegel et al., 2012).

L'adenocarcinoma ductal pancreàtic o PDAC (de l'anglès, *Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma*), representa un 85% dels tumors pancreàtics i és, per tant, la neoplàsia pancreàtica més freqüent. Per aquest motiu, moltes vegades "càncer de pàncrees" n'esdevé un sinònim. El seu nom fa referència a la seva similitud histològica amb les cèl·lules ductals. De totes maneres, la gran diversitat fisiològica i cel·lular que presenta el pàncrees es troba representada en un ampli ventall de lesions malignes amb característiques fisiològiques i histològiques pròpies de les cèl·lules que el constitueixen. A la taula 1 estan resumits els diferents tipus de tumors i les seves característiques (Hezel et al., 2006; Reid et al., 2013).

Neoplàsia pancreàtica	Característiques histològiques	Alteracions genètiques freqüents
Adenocarcinoma ductal	Morfologia ductal; desmoplasia	K-Ras, p16INK4a, TP53, Smad4
Variants de l'adenocarcinoma		
a. Carcinoma medul·lar	Tumor poc diferenciat; limfòcits intratumorals	hMLH1, hMSH2
b. Carcinoma col·loïdal	Grups de mucines	Sobreexpressió de MUC2
Carcinoma de cèl·lules acinars	Presència de grànuls de zimogen	APC/ β -catenina
Pancreatoblastoma	Tumor compost amb diferenciació acinar i endocrina	APC/ β -catenina
Neoplàsia pseudopapil·lar sòlida	Àrees sòlides i cístiques	APC/ β -catenina, expressió de CD10
Cistadenoma serós	Cists multioculars; epiteli ric en glicogen	VHL
Tumors endocrins	Producció d'hormones	MEN1

Taula 1. Tipus de tumors pancreàtics i alteracions genètiques associades. Adaptat de Hubran et al., 2006.

2.1. Epidemiologia del càncer de pàncrees

L'adenocarcinoma ductal pancreàtic s'associa a factors de risc tant demogràfics com ambientals, així com a algunes mutacions genètiques autosòmiques dominants (Hezel et al., 2006; Raimondi et al., 2009). Aproximadament dos tercers parts dels casos es relacionen amb factors ambientals i, en aquest sentit, múltiples estudis han establert factors de risc clars com l'edat avançada, el tabaquisme i la pancreatitis crònica. Així, l'edat mitja de diagnosi es troba al voltant dels 72 anys i només entre un 5 i un 10% dels casos es dona en pacients menors de 50 anys (Raimondi et al., 2007). A més, es calcula que el tabaquisme n'és la causa en un 25-50% dels casos (Iodice et al., 2008). Finalment, la pancreatitis crònica, ja sigui de tipus hereditari o provocada per alcoholisme, incrementa 14 vegades el risc de patir aquesta malaltia, tot i no tractar-se d'una de les seves principals causes, ja que la pancreatitis crònica té una baixa prevalència (Lowenfels et al., 1993). A més, també s'han descrit factors que n'augmenten el risc, com la diabetis, l'obesitat o el grup sanguini (Berrington de Gonzalez et al., 2003; Giovannucci and Michaud, 2007; Wolpin et al., 2009).

D'altra banda, s'estima que entre un 5 i un 10% dels casos de PDAC s'associen a una predisposició genètica hereditària (Shi et al., 2009). De fet, s'han relacionat els casos de PDAC familiar amb mutacions germinals en gens supressors tumorals (*INK4A*, *BRCA2* i *LKB1*), el gen *MLH1*, relacionat amb la reparació d'aparellaments erronis del DNA, i el gen *PRSS1* del tripsinogen catiónic (Jaffee et al., 2002; Whitcomb et al., 1996). Degut a la baixa penetrància d'aquest càncer a l'edat típica d'aparició de les mutacions germinals, sembla que aquestes mutacions intervenen en la progressió de lesions precursors, més que en el seu inici. De totes maneres, aquestes mutacions es troben en menys del 20% dels casos de PDAC d'herència familiar, fet que posa de manifest l'existència d'altres gens que predisposen a patir aquesta malaltia, com les mutacions al gen de la fibrosi quística (*CFTR*) (McWilliams et al., 2005).

L'acumulació de mutacions somàtiques en gens com *K-RAS*, *CDKN2A*, *TP53* o *SMAD4* causen alteracions que porten a la desregulació del cicle cel·lular, la supervivència de les cèl·lules, la invasió i la metastasi,

processos essencials per al desenvolupament del PDAC (Raimondi et al., 2009).

Actualment encara ens manca informació per entendre com aquestes lesions genètiques individuals acaben donant lloc a l'aparició de PDAC i, per tant, l'observació clínica d'insuficiència exocrina i pancreatitis constitueixen trets patofisiològics comuns del procés, indispensables per a la seva detecció i diagnòstic (Hezel et al., 2006).

2.2. Biologia del càncer de pàncrees

2.2.1. Histopatologia

Lesions precursors

L'adenocarcinoma ductal pancreàtic és precedit per una sèrie de lesions precursors, les quals són de caràcter no-invasiu i tenen, per tant, un millor pronòstic. Aquestes són de quatre tipus (Figura 2): les neoplàsies pancreàtiques intraepitelials o PanIN (*Pancreatic Intraepithelial Neoplasm*), les neoplàsies mucinoses cístiques o MCN (*Mucinous Cystic Neoplasm*), les neoplàsies intraductals papil·lars mucinoses o IPMN (*Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm*) i les neoplàsies intraductals tubulopapil·lars o ITPN (*Intraductal Tubulo-Papillary Neoplasm*) (Hruban et al., 2007; Macgregor-Das and Iacobuzio-Donahue, 2013; Reid et al., 2013).

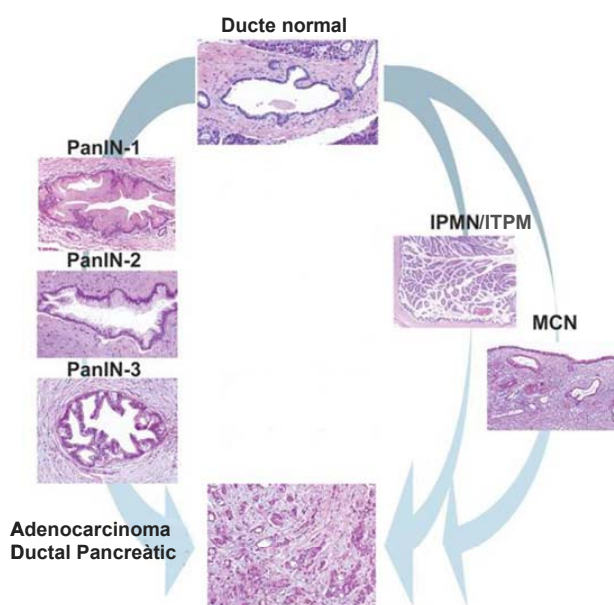


Figura 2. Lesions precursors del càncer de pàncrees i alteracions histològiques relacionades amb la seva progressió: PanIN, MCN, IPMN i ITPN. Adaptat de Hezel et al., 2006.

Les neoplàsies pancreàtiques intraepitelials (PanIN) són el precursor més comú. Es tracta de lesions microscòpiques localitzades als ductes de menor diàmetre i caracteritzades per la presència d'un epiteli columnar, que contrasta amb la morfologia cuboïdal de les cèl·lules ductals pancreàtiques. Aquestes es poden classificar histològicament en tres estadis segons el grau d'atípia cel·lular i nuclear (Figura 3). El PanIN-1A es caracteritza ser per una lesió epitelial plana formada per cèl·lules amb morfologia columnar amb els nuclis situats a la part basal i abundant producció de mucina. El grau PanIN-1B s'assoleix quan apareixen lesions papil·lars o micropapil·lars a l'epiteli. El PanIN-2 presenta anomalies nuclears com atípia nuclear i pèrdua de polaritat, a més de superpoblació, pseudoestratificació i hiperchromatisme. Aquestes lesions acaben donant lloc al PanIN-3 o carcinoma *in situ*, en el qual els nuclis cel·lulars s'engrandeixen, apareixen mitosis anormals i es produeix un engrossiment major del ducte. Finalment, aquestes lesions de grau més avançat es transformen en PDAC amb evidents àrees d'invasió a través de la membrana basal (Hruban et al., 2001; Hruban et al., 2004).

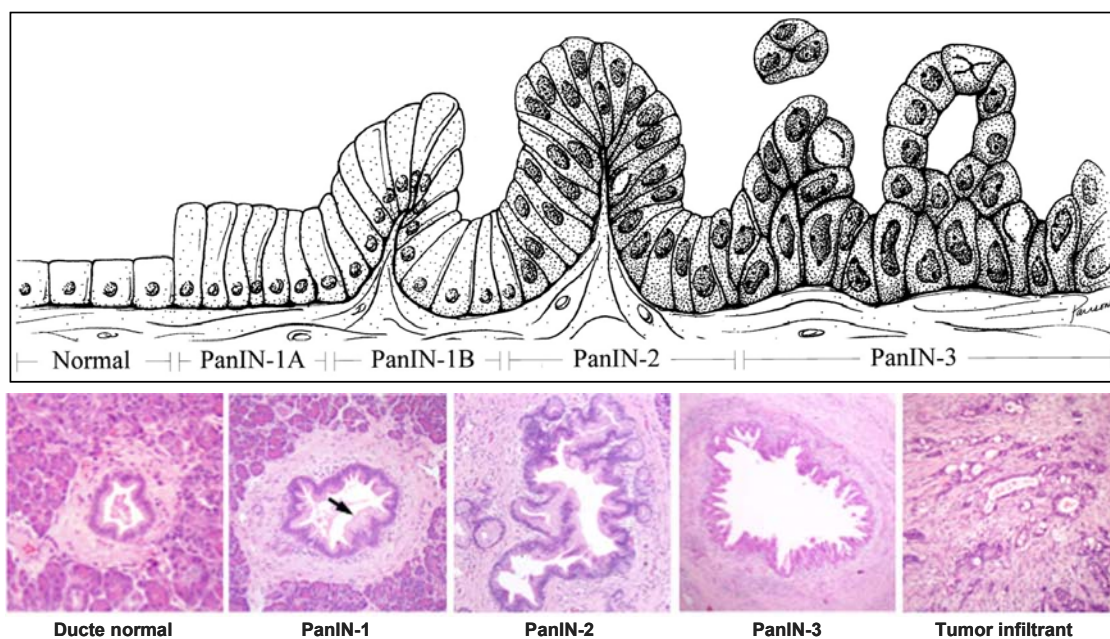


Figura 3. Lesions neoplàsiques intraepitelials (PanIN) precursors de PDAC. Adaptat de Wilentz et al., 2000 i MacGregor-Das and Iacobuzio-Donahue, 2013.

D'altra banda, les neoplàsies mucinoses cístiques (MCN) i les neoplàsies intraductals papil·lars mucinoses (IPMN) i tubulopapil·lars (ITPN) són

neoplasmes cístics visibles a nivell macroscòpic. Les MCN es localitzen dins del parènquima, sense comunicar amb el sistema ductal pancreàtic, i a nivell histològic es caracteritzen per formar un revestiment epitelial mucinós associat a un estroma de tipus ovàric productori de receptors d'èstrogen i progesterona (Zamboni et al., 1999). En canvi, les neoplàsies intraductals s'originen al ducte pancreàtic principal o en una de les seves branques, on produeixen una distensió del sistema ductal, ja que el neoplasma creix a la zona intraductal. Les IPMN es caracteritzen per una producció abundant de mucina luminal i un creixement papil·lar, el qual les diferencia de les ITPN, molt menys freqüents, que no secreten mucina i tenen una estructura predominantment tubular (Yamaguchi et al., 2009). Tant les IPMN com les MCN es poden classificar segons el grau de displàsia (Matthaei et al., 2011) i s'ha descrit que poden donar lloc a PDAC, tot i que en menor freqüència que els PanIN (Gaujoux et al., 2011).

Adenocarcinoma pancreàtic en fase avançada

El PDAC és el tipus de tumor pancreàtic més comú i letal. Aquest habitualment s'origina al cap del pàncrees i es tracta d'un tumor típicament asimptomàtic i que no forma una massa compacta, de manera que abans d'arribar als 6-7 cm normalment ja es troba extensament disseminat a l'abdomen o ha format metàstasis al fetge.

A nivell histològic el PDAC té una aparença ben diferenciada amb presència de glàndules, formades per cèl·lules cuboïdals o columnars amb graus variables de atípia cel·lular i mucina intracel·lular, envoltades per un estroma dens format per fibroblasts i cèl·lules inflamatòries, el qual es coneix com a desmoplàsia. A més, cal destacar la seva hipovascularització. Sovint en un mateix tumor es poden trobar diferències regionals en la seva histologia, la classificació del tumor o el nivell de diferenciació (Hezel et al., 2006; Reid et al., 2013) (Figura 3).

El PDAC presenta tinció positiva per glicoproteïnes mucinoses i oncoproteïnes com MUC1, CA19-9, antigen carcinoembriònic (CEA), B72.1, MUC5AC i DUPAN2. La presència d'aquests marcadors juntament amb citoqueratina 7 i nivells variables de citoqueratina 20 pot ajudar a diferenciar el PDAC d'altres carcinomes, tot i que no s'ha definit cap marcador específic per aquesta patologia (Reid et al., 2013).

Microambient tumoral pancreàtic

En PDAC, l'estroma ocupa una part majoritària de la massa tumoral. Aquest és molt heterogeni i dinàmic, i està format per components cel·lulars i acel·lulars, com cèl·lules tumorals invasores, fibroblasts associats a càncer (CAF), miofibroblasts, cèl·lules estrellades pancreàtiques (PSCs), cèl·lules inflammatòries infiltrants, vasos sanguinis, matriu extracel·lular (ECM) i proteïnes solubles com citoquines i factors de creixement. Tot i que inicialment es pensava que l'estroma actua com una barrera protectora que impedeix la invasió de les cèl·lules tumorals, més recentment s'ha demostrat que aquest pot exercir un rol pro o antitumoral en funció del context. De fet, l'estroma està implicat en la regulació de la proliferació i supervivència de les cèl·lules tumorals, en invasió i metàstasi i en resistència als tractaments en formar una barrera física, a més de permetre l'evasió del sistema immunitari (Feig et al., 2012; Kumar-Sinha et al., 2012; Mihaljevic et al., 2010) (Figura 4).

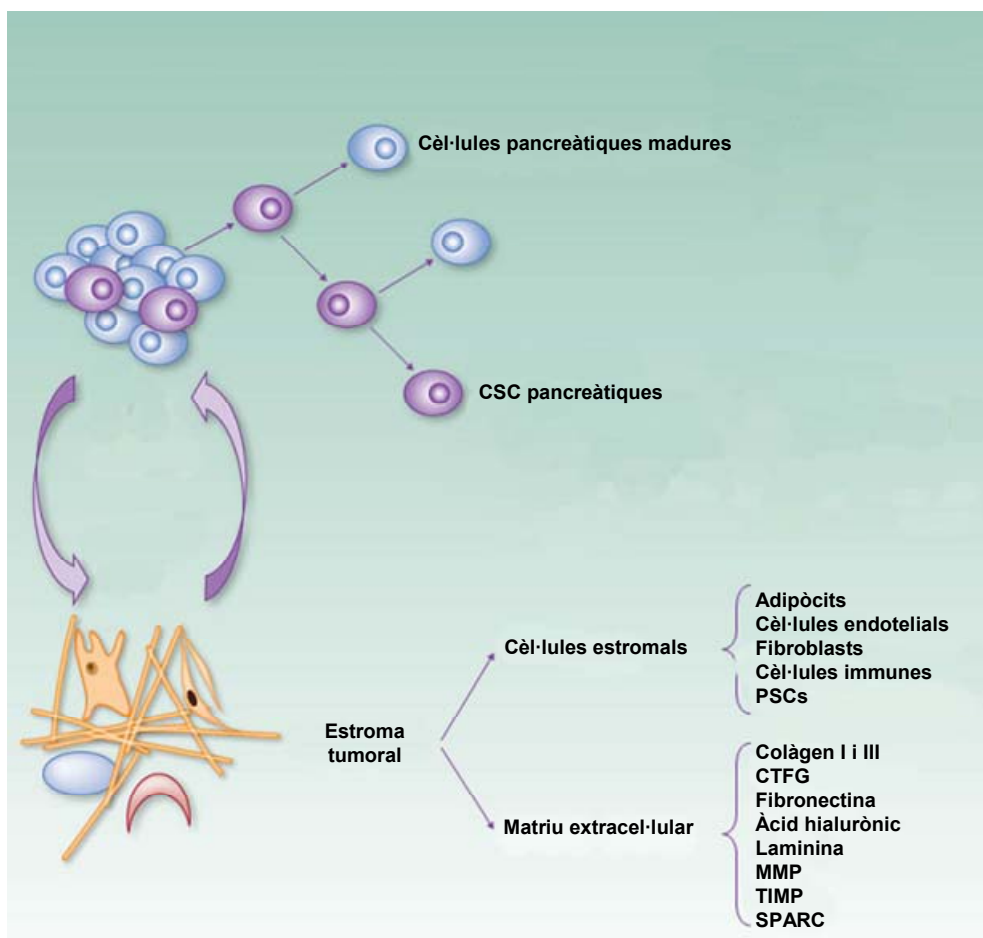


Figura 4. Components del PDAC. Adaptat de Hidalgo and Von Hoff 2012.

La ECM és abundant en PDAC i està formada per fibres de col·lagen, fibronectina, proteoglicans i àcid hialurònic, així com enzims catalítics i proteïnases. La seva acumulació distorsiona l'estructura tissular del pàncrees, afectant als vasos sanguinis i limfàtics. Aquest fenomen és responsable de la resistència a molts tractaments, ja que disminueix la perfusió del tumor i impedeix l'arribada dels fàrmacs a les cèl·lules tumorals.

Les cèl·lules tumorals i les PSCs interaccionen bidireccionalment. Així, les PSCs alliberen factors de creixement i citoquines que tenen un efecte potenciador de la proliferació i la capacitat metastàtica de les cèl·lules tumorals (Erkan et al., 2012). A més, tenen un paper crític en la formació i recanvi de l'estroma, ja que són responsables de la secreció de col·lagen i altres components de la ECM, així com de la producció de metal·loproteïnases de matriu (MMP) al front invasiu del tumor. D'altra banda, també semblen responsables de la pobre vascularització d'aquest tipus de tumor (Hidalgo, 2010).

El paper de l'angiogènesi en PDAC és controvertit, ja que tot i que el creixement tumoral depèn de la formació de vasos, els assaigs clínics amb inhibidors de l'angiogènesi han fracassat. D'altra banda, sembla que els tractaments que actuen degradant l'estroma i afavorint la vascularització del tumor podrien afavorir l'arribada dels fàrmacs a les cèl·lules tumorals i per tant millorar la seva eficàcia (Olive et al., 2009).

A més, s'ha identificat una subpoblació de cèl·lules tumorals amb propietats de *stem cells* tumorals (en anglès *cancer stem cells*, CSC). Aquestes cèl·lules representen entre un 1 i un 5% del tumor i presenten una divisió asimètrica, que dona lloc a la seva autorenovació i a la generació de cèl·lules més diferenciades. Les CSC pancreàtiques són resistents als tractaments de químic i radioteràpia, el què podria explicar l'aparició de recurrències, i poden constituir, per tant, una bona diana terapèutica (Hermann et al., 2007; Li et al., 2007).

2.2.2. Patogènesi molecular

Les cèl·lules de PDAC acumulen una sèrie de mutacions a diferents vies de senyalització que les porten a tenir un creixement independent de

factors de creixement i insensible a senyals inhibidors, a evadir l'apoptosi, tenir un potencial replicatiu il·limitat i a activar l'angiogènesi i els processos d'invasió i metàstasi. A més, en PDAC hi ha una gran heterogeneïtat genètica, amb alteracions que poden variar entre diferents tumors (Mihaljevic et al., 2010). En aquest sentit, s'ha descrit un conjunt d'alteracions que es poden dividir en 12 categories, segons les vies de senyalització i els processos afectats (Figura 5) (Jones et al., 2008). Així, la majoria de pacients amb PDAC presenten alteracions genètiques en cada una d'aquestes categories, tot i que el gen alterat en concret pot variar entre pacients. En moltes d'aquestes categories es troben gens prèviament descrits i implicats en la formació i progressió tumoral del PDAC, com *K-Ras*, *CDKN2A*, *TP53* o *SMAD4*.

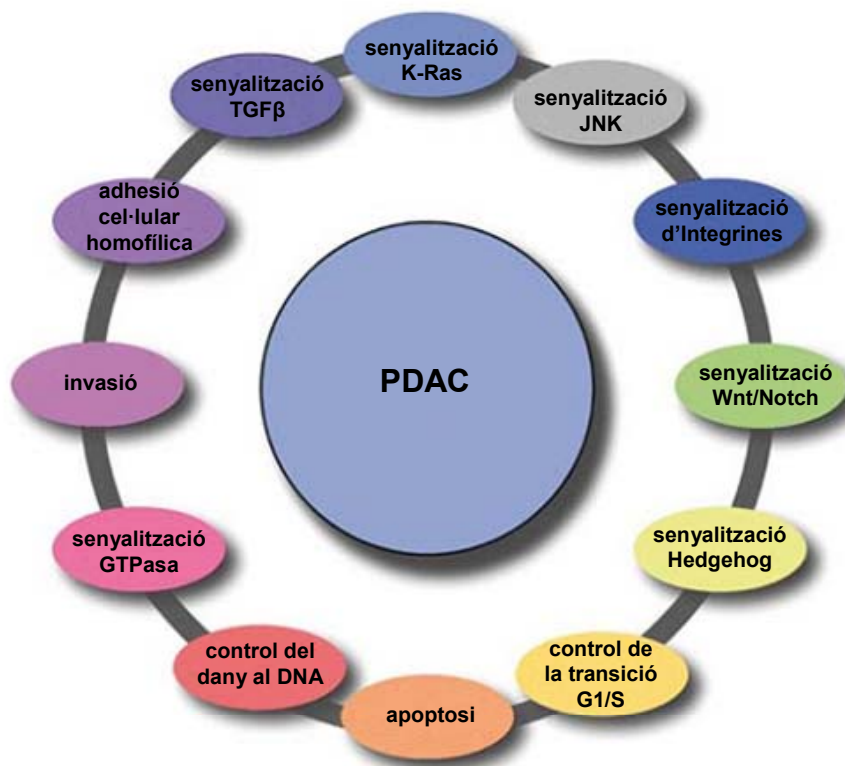


Figura 5. Vies de senyalització i processos genèticament alterats en tumors pancreàtics. Adaptat de Jones et al., 2008.

Inestabilitat cromosòmica

El PDAC es caracteritza per una gran inestabilitat cromosòmica. Aquesta és deguda a anomalies als telòmers, la pèrdua de *TP53*, les mutacions a *K-Ras* i a defectes durant la mitosi. Les anomalies telomèriques es donen en dos sentits. Així, en fases primerenques es produeix un escurçament dels telòmers (van Heek et al., 2002), mentre en fases tardanes es reactiva l'activitat telomerasa, que dona lloc a la immortalització de cèl·lules amb greus alteracions cromosòmiques (Gisselsson et al., 2001). A més, un 85% dels PDAC presenten defectes al centrosoma (Sato et al., 2001; Sato et al., 1999) i són comuns també les amplificacions i delecions cromosòmiques (Jones et al., 2008).

K-Ras

L'activació del l'oncogen *K-Ras* està present a gairebé un 100% dels PDAC. Aquest gen codifica per una proteïna d'unió a GTP implicada en la regulació de la supervivència, proliferació i motilitat cel·lular. Les mutacions activadores de *K-Ras* porten a una pèrdua de l'activitat GTPasa de la proteïna Ras, de manera que es produeix una activació constitutiva independent de senyals extracel·lulars de diferents vies de senyalització, com la via de Raf/Erk o la via de la PI3K/Akt (Caldas and Kern, 1995; Schubbert et al., 2007).

Regulació de la transició G1/S i *CDKN2A*

El gen supressor tumoral *CDKN2A* està inactiu en més del 90% dels PDACs (Caldas et al., 1994a; Schutte et al., 1997). Aquest gen es troba al locus 9q21 i codifica per *splicing* alternatiu dues proteïnes supressores tumorals: p14^{ARF}, que segresta MDM2 permetent la estabilització de p53, i p16^{INK4A}, que inhibeix la formació de complexos entre ciclines i quinases dependents de ciclines (CDKs) i regula la progressió del cicle cel·lular (Kim and Sharpless, 2006; Larsson, 2011; Rozenblum et al., 1997).

Control del dany al DNA i *TP53*

La inactivació del gen *TP53* es dona en més del 50% dels casos de PDAC (Mihaljevic et al., 2010). La proteïna que codifica, p53, és un regulador implicat en apoptosi, progressió del cicle cel·lular i reparació del DNA. Així,

en resposta al dany al DNA p53 promou la transcripció de *p21*, un inhibidor de CDKs que s'uneix als complexos ciclina-CDK induint un arrest del cicle cel·lular a la fase G1. La proteïna p53 també regula la transcripció de gens pro i antiapoptòtics. Per tant, la pèrdua de *TP53* resulta en un increment de la inestabilitat genòmica, ja que les cèl·lules segueixen proliferant en cas de dany al DNA (Vogelstein and Kinzler, 2004).

Via de senyalització de TGF- β i *SMAD4*

SMAD4 està inactivat en aproximadament un 55% dels casos de PDAC (Macgregor-Das and Iacobuzio-Donahue, 2013). La proteïna que codifica, Smad4, intervé en la propagació de la senyalització produïda per TGF- β , que regula la proliferació i diferenciació cel·lular. Així, TGF- β s'uneix a receptors de membrana de tipus serina/treonina quinasa de tipus I i II, que dimeritzen, permetent la fosforilació de les proteïnes Smad2 i Smad3. Smad4 forma un complex amb les proteïnes Smad2/3 fosforilades, que transloca a nucli, on s'associa a cofactors transcripcionals i regula gens involucrats amb una gran varietat de processos, com el control del cicle cel·lular, la diferenciació cel·lular i el creixement (Siegel and Massague, 2003). La inactivació de *SMAD4* porta a una pèrdua del control del creixement i correlaciona amb mal pronòstic i aparició de metàstasis (Iacobuzio-Donahue et al., 2009; Tascilar et al., 2001).

Vies de senyalització de desenvolupament embrionari

Les proteïnes de la família Hedgehog estan implicades en la regulació del creixement i la diferenciació durant l'embriogènesi (Ingham and McMahon, 2001) i s'ha relacionat la seva activació amb la iniciació i el manteniment del PDAC. Així, Shh, una de les proteïnes que pertanyen a aquesta família i que es troba absent al pàncrees normal, s'expressa en PDAC, augmentant en fases avançades de la malaltia (Berman et al., 2003; Thayer et al., 2003). A més, aquesta via de senyalització sembla ser essencial per a la viabilitat de les CSC (Jimeno et al., 2009), així com per a la formació de l'estroma (Olive et al., 2009).

La via de senyalització de Notch és important en la determinació del destí i la proliferació cel·lular durant el desenvolupament embrionari i, de la mateixa manera que la via de Hedgehog, la seva expressió és pràcticament

nul·la al pàncrees adult però es reactiva en PDAC (Miyamoto et al., 2003). A més, hi ha evidències de la interacció de Notch amb K-Ras per a la iniciació i manteniment dels PDACs (Sundaram, 2005).

Apoptosi

El 100% dels tumors pancreàtics presenten mutacions a gens relacionats amb l'apoptosi (Jones et al., 2008), tant de la via d'activació extrínseca com intrínseca, de manera que perden sensibilitat als estímuls proapoptòtics. En aquest sentit, a la via extrínseca s'ha descrit un augment d'expressió de les proteïnes inhibidores de l'apoptosi cIAP2, Survivina (Esposito et al., 2007a), FAP-1 o cFLIP (Elnemr et al., 2001), la reducció de l'expressió de FADD (Trauzold et al., 2003) o l'expressió de DcR3, que competeix en la unió a FasL (Elnemr et al., 2001). D'altra banda, a la via intrínseca s'ha descrit un augment de l'expressió de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-x_L i MCL-1 (Boucher et al., 2000; Campani et al., 2001; Hinz et al., 2000; Miyamoto et al., 1999) i una disminució de la proteïna proapoptòtica Bax (Evans et al., 2001; Magistrelli et al., 2006).

Alteracions de baixa freqüència

A més de les alteracions prèviament descrites, en PDAC es pot trobar una gran quantitat d'alteracions genètiques de menor freqüència. Així, el síndrome de Peutz-Jeghers (PJS), associat a mutacions a *LKB1/STK11*, es relaciona amb un augment de la incidència de PDAC (Giardiello et al., 2000; Hemminki et al., 1998; Jenne et al., 1998), mentre les mutacions de *LKB1* només es detecten en entre un 4 i 6% dels casos de PDAC esporàdic (Sahin et al., 2003). Aquest gen codifica per una serina/treonina quinasa que regula diversos processos com la polaritat cel·lular o el metabolisme i s'ha relacionat amb la via de senyalització de mTOR (Baas et al., 2004; Bardeesy et al., 2002; Corradetti et al., 2004; Hardie, 2005; Lizcano et al., 2004; Ossipova et al., 2003; Shaw et al., 2004; Shaw et al., 2005), tot i que encara no es coneix la forma en què la seva pèrdua promou la tumorigènesi.

En un 17% dels casos de PDAC de tipus familiar es poden trobar mutacions a *BRCA2* (Murphy et al., 2002), el qual està implicat en la regulació de processos de reparació del DNA basats en la recombinació

homòloga i és, per tant, clau per al manteniment de l'estabilitat genòmica (Venkitaraman, 2002).

A més, en PDAC es dona un augment de l'activació de les vies de senyalització que depenen de factors de creixement. Així, hi ha una sobreexpressió dels receptors d'EGF, EGFR i ErbB3, i els seus lligands, TGF- α i EGF, el què genera un loop autocrí (Barton et al., 1991; Friess et al., 1995; Korc et al., 1992; Lemoine et al., 1992). A més, també es dona una sobreexpressió d'IGF-I en cèl·lules tumorals i de l'estroma i una activació aberrant del seu receptor, IGF-IR, la qual es relaciona amb supervivència, invasió i angiogènesi (Bergmann et al., 1995; Ouban et al., 2003; Stoeltzing et al., 2003). També es dona un augment de l'expressió del receptor de HGF, Met, que regula la motilitat, la invasió i la proliferació (Corso et al., 2005), de la senyalització via FGF, que intervé en la mitogènesi i l'angiogènesi i contribueix a l'aparició de desmoplàsia (Cross and Claesson-Welsh, 2001; Kuniyasu et al., 2001), i VEGF, que promou la proliferació i supervivència de les cèl·lules endotelials (Ferrara et al., 2003).

2.2.3. Model de progressió tumoral

A partir d'observacions patològiques, clíniques i moleculars s'ha establert un model de progressió tumoral per al PDAC similar al descrit en altres tipus de càncer, on l'epiteli ductal normal evoluciona a partir de lesions ductals precursors fins esdevenir un adenocarcinoma ductal invasiu. En aquest sentit, gairebé totes les alteracions genètiques identificades en PDAC també han estat identificades a les lesions precursors i, a més, la seva prevalença incrementa en paral·lel a l'augment del grau d'atípia cel·lular i estructural (Figura 6) (Hruban et al., 2000).

Així, en lesions precursors inicials amb una grau mínim d'atípia cel·lular i estructural s'ha demostrat la presència de mutacions puntuals a l'oncogèn *K-Ras*, així com la sobreexpressió de la proteïna Her-2/Neu/ErbB-2 (Caldas et al., 1994b; Day et al., 1996; Luttges et al., 1999; Moskaluk et al., 1997; Tada et al., 1996; Terhune et al., 1998; Yanagisawa et al., 1993). Una mica més tard, en lesions intermèdies, es produeix la inactivació del gen supressor tumoral *p16*, majoritàriament en lesions ductals d'alt grau (Moskaluk et al., 1997; Wilentz et al., 1998; Yamano et al., 2000). La

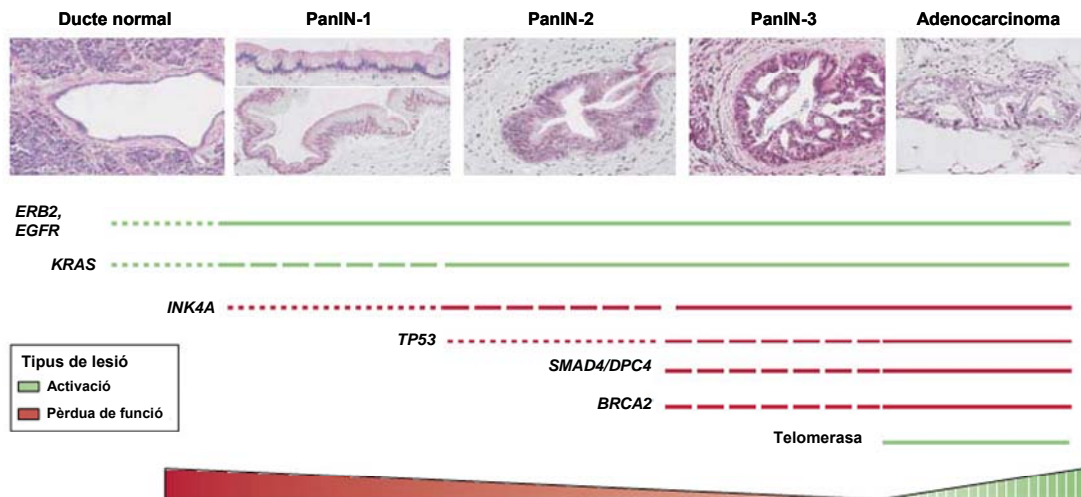


Figura 6. Model de progressió del PDAC a partir de lesions neoplàsiques intraepiteliales (PanIN) i alteracions genètiques associades. Adaptat de Bardeesy and DePinho 2002.

pèrdua dels gens supressors tumorals *TP53*, *DPC4* i *BRCA2* sembla donar-se només en fases tardanes del desenvolupament del PDAC, en lesions ductals amb un grau d'atípia significatiu o carcinoma *in situ* (DiGiuseppe et al., 1994; Goggins et al., 2000; Hameed et al., 1994; Wilentz et al., 2000; Yamano et al., 2000). El moment d'aparició dels processos de metilació del DNA, activació de la telomerasa i alteracions genètiques de baixa freqüència, com la inactivació de *MKK4*, *STK11*, *ALK5* o *TGFBR2* encara no està definit (Goggins et al., 1998; Su et al., 1998; Su et al., 1999; Ueki et al., 2000).

Per tant, sembla que l'origen d'aquest procés no és un esdeveniment molecular puntual, sinó que es dona per acumulació d'un seguit d'alteracions genètiques i epigenètiques (Real, 2003) i, de fet, la seva progressió no té per què ser lineal (Hezel et al., 2006; Real et al., 2008).

D'altra banda, aquest model no implica que totes les lesions precursors donin lloc a carcinomes infiltrants i és freqüent la presència de PanINs en pacients que no desenvolupen PDAC (Hruban et al., 2000).

2.2.4. Origen cel·lular del càncer de pàncrees

Tradicionalment l'origen cel·lular del PDAC ha estat atribuït a les cèl·lules ductals pancreàtiques, ja que presenten una gran semblança a

nivell histològic, amb una morfologia cuboïdal, expressen antígens ductals i creixen formant estructures tubulars (Solcia et al., 1995). A més, el model de progressió tumoral dóna suport a un origen ductal del PDAC, tot i que no estableix si es tracta d'un tipus específic de cèl·lules progenitores que resideixen al ducte pancreàtic. En aquest sentit, aquest possible origen ductal ha generat una gran controvèrsia (Kong et al., 2009; Rooman and Real, 2012) i s'han desenvolupat teories que impliquen altres tipus cel·lulars en l'origen d'aquest tumor, com les cèl·lules acinars (De La et al., 2008; Guerra et al., 2007; Habbe et al., 2008; Parsa et al., 1985), les cèl·lules centroacinars (Esposito et al., 2007b; Stanger et al., 2005), les cèl·lules endocrines (Yoshida and Hanahan, 1994) o les *stem cells* (Hermann et al., 2007; Li et al., 2007). Les dificultats en l'establiment de l'origen cel·lular del PDAC es deu a l'estreta relació entre els diferents tipus cel·lulars pancreàtics durant el desenvolupament del pàncrees i la propensió que tenen les cèl·lules endodèrmiques per transdiferenciar *in vitro* i *in vivo* (Tosh and Slack, 2002).

D'altra banda, també és possible que l'origen del PDAC no es trobi en un únic tipus cel·lular, com ja ha estat descrit en altres models tumorals (Bachoo et al., 2002), o que estigui determinat per un conjunt d'alteracions genètiques que generen un fenotip maligne, independentment del tipus cel·lular afectat (Hezel et al., 2006).

2.3. Diagnosi i tractament del càncer de pàncrees

2.3.1. Diagnosi del càncer de pàncrees

Una de les principals causes de l'elevada taxa de mortalitat del PDAC és que en el moment del diagnòstic de la malaltia més de la meitat dels pacients presenten metàstasis i només un 8% d'aquests tumors són localitzats. Això és degut, en part, a l'absència de símptomes durant les fases primerenques de la malaltia. De fet, els principals símptomes que presenten els pacients són causats per la presència física de la massa tumoral, més que per una alteració de la funció exocrina o endocrina del pàncrees, i les característiques clíniques depenen de la mida i localització del tumor, així com les metàstasis (Freelove and Walling, 2006).

Els símptomes clàssics que presenten els malalts amb PDAC són la icterícia, causada per l'obstrucció del conducte biliar, el dolor epigàstric, abdominal o d'esquena i la pèrdua de pes. Aquests símptomes primerencs són molt inespecífics i sovint no són reconeguts, de manera que la majoria de tumors pancreàtics és diagnosticada quan es troben en fases avançades (Dimagno, 1992).

L'historial clínic i examen físic del pacient, juntament amb els nivells sèrics de bilirubina i fosfatasa alcalina poden indicar la presència d'un càncer de pàncrees, tot i que no són diagnòstics. A més, existeixen diversos marcadors tumorals sèrics, com el CA 19-9 (De l'anglès, *Cancer Antigen 19-9*) (Malesci et al., 1992), la subunitat beta de la gonadotropina coriònica humana (β -hCG) o el CA 72-4 (Louhimo et al., 2004). A més, exàmens regulars per ultrasonografia endoscòpica poden ser adequats en pacients amb un historial familiar de càncer de pàncrees (Rulyak et al., 2003).

Tot i que la tomografia computeritzada (CT, *computed tomography*) i la ultrasonografia transabdominal són tècniques apropiades per a un diagnòstic inicial, l'escaneig per CT helicoidal de fase dual és el més útil, ja que es tracta del test més sensible i serveix per identificar de forma no invasiva el 98% dels càncers de pàncrees i les metàstasis a distància (Adamek et al., 2000; Chang et al., 1997; Diehl et al., 1998; Fuhrman et al., 1994; Maringhini et al., 1993; Nakamoto et al., 2000).

D'altra banda, és important un correcte estadiatge de la malaltia en funció de la presència de tumor, nodes i metàstasis per tal d'identificar els pacients candidats a una intervenció quirúrgica i descartar els no operables. De totes maneres, habitualment els PDAC es classifiquen en reseccables, localment avançats o metastàtics (Greene, 2002; Jemal et al., 2004).

2.3.2. Tractament del càncer del pàncrees

Actualment, pels pacients amb PDAC la resecció quirúrgica és l'única opció terapèutica potencialment eficaç, tot i que només és aplicable en els pocs casos en què el tumor es troba localitzat i no envaeix estructures vasculares adjacents. En tot cas, i independentment de la fase de progressió de la malaltia, cal valorar el benefici potencial de la teràpia escollida enfront

dels possibles efectes secundaris i la qualitat de vida del pacient (Freelove and Walling, 2006).

Tractament de tumors localitzats

Entre un 15 i un 29% dels pacients amb PDAC presenten un tumor resecable en el moment del diagnòstic (Li et al., 2004), el qual és eliminat mitjançant una pancreatoduodenectomia o cirurgia de Whipple (Figura 7). Aquesta tècnica consisteix en l'extracció del cap del pàncrees juntament amb el duodè, part del jejú, la vesícula biliar i el conducte secretor (Brooks and Culebras, 1976). La taxa de supervivència cinc anys després de la intervenció és del 10-30% (Klinkenbijn et al., 1999; Lim et al., 2003; Neoptolemos et al., 2001; Neoptolemos et al., 2004; Yeo et al., 1997), ja que prop del 80% dels pacients experimenten una recidiva local o a distància en els dos anys següents a la intervenció.

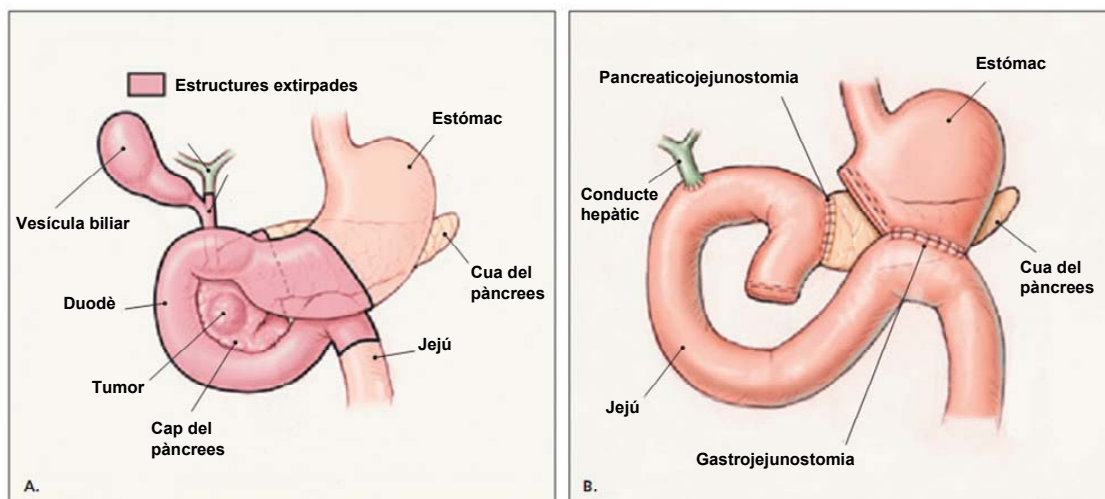


Figura 7. Cirurgia de Whipple abans (A) i després (B) del procediment. Adaptat de Freelove and Walling, 2006.

La teràpia adjuvant amb quimioteràpia i radioteràpia ha estat estudiada en nombrosos assaigs que han demostrat millores en la taxa de supervivència total i lliure de malaltia. En base a aquests estudis, la teràpia post-operatòria s'aplica habitualment en pacients amb tumors localitzats (Crane et al., 2004; Kalsner and Ellenberg, 1985; Klinkenbijn et al., 1999; Neoptolemos et al., 2004; Neuhaus, 2008; Oettle et al., 2007; Regine et al., 2008). De totes maneres, no existeix consens respecte al tipus de

teràpia adjuvant que cal administrar i la quimioteràpia amb gemcitabina o 5-fluorouracil (5-FU) sense radiació és el tractament habitual fora de Nord-Amèrica, mentre la radiació juntament amb quimioteràpia és molt emprada als Estats Units.

Tractament de tumors localment avançats

Els pacients amb PDAC localment avançat no resecable representen gairebé un 30% dels casos i tenen una supervivència mitjana de 8-12 mesos. En aquests casos, la progressió local es pot disminuir amb radioteràpia, tot i que no millora la supervivència ni evita l'aparició de metàstasis (Roldan et al., 1988) i es considera, per tant, un tractament pal·liatiu. La combinació de radioteràpia i quimioteràpia presenta una millora significativa de la supervivència en comparació amb la radioteràpia sola i s'administra de forma rutinària, excepte en pacients que entren en assaigs clínics (Gastrointestinal Tumor Study Group, 1998; Li et al., 2004; Moertel et al., 1981; Roldan et al., 1988).

Tractament de tumors metastàtics

Els pacients que presenten PDAC amb lesions metastàtiques són aproximadament un 50% dels casos i tenen una supervivència mitja de 2-3 mesos si no son tractats o 6 mesos després del tractament. Per aquests pacients, la gemcitabina constitueix el fàrmac d'elecció, ja que allarga la supervivència del pacient, mitiga o estabilitza el dolor i millora l'estat general i el pes del pacient, en comparació amb el tractament amb 5-FU (Burris et al., 1997).

D'altra banda, s'han realitzat nombrosos assaigs clínics basats en tractaments quimioterapèutics on es combina la gemcitabina amb un segon agent citotòxic o fàrmacs dirigits contra dianes específiques, però pocs estudis han demostrat una millora en la supervivència del pacient o beneficis clínics (Taula 2) (Stathis and Moore, 2010). En aquest sentit, únicament s'ha aconseguit augmentar el temps de supervivència en 2 setmanes en combinar la gemcitabina amb erlotinib, un inhibidor d'EGFR (Moore et al., 2007). Recentment també s'ha assajat el tractament amb FOLFIRINOX (combinació dels agents citotòxics 5-FU, irinotecan i oxaliplatí), el qual augmenta significativament el temps de supervivència total i sense

malaltia en comparació amb la gemcitabina. De totes maneres, l'elevada toxicitat d'aquest tractament només permet administrar-lo en pacients amb un bon estat general (Conroy et al., 2011).

A

Tractament	Referència bibliogràfica
GE + cisplatí	Heinemann et al., 2006
GE + cisplatí	Colucci et al., 2002
GE + oxaliplatí	Louvet et al., 2005
GE+ oxaliplatí	Poplin et al., 2009
GE + 5-FU	Berlin et al., 2002
GE + capecitabina	Herrmann et al., 2007
GE + irinotecan	Rocha Lima et al., 2004
GE + irinotecan	Stathopoulos et al., 2006
GE + exatecan	Abou-Alfa et al., 2006
GE + pemetrexed	Oettle et al., 2005

B

Tractament	Mecanisme	Referència bibliogràfica
Marimastat	Inhibidor de MMP d'ampli espectre	Bramhall et al., 2001
GE + merimastat	Inhibidor de MMP d'ampli espectre	Bramhall et al., 2002
BAY 12-9566	Inhibidor de MMP-2, MMP-3, MMP-9 i MMP-13	Moore et al., 2003
GE + tipifarnib	Inhibidor de farnesiltransferasa	Van Cutsem et al., 2004
GE + erlotinib	Inhibidor tirosina-quinasa de EGFR	Moore et al., 2007
GE + bevacizumab	Anticòs monoclonal anti-VEGF	Kindler et al., 2007
GE + cetuximab	Anticòs monoclonal anti-EGFR	Philip et al., 2007
GE + erlotinib	Inhibidor tirosina-quinasa de EGFR/	Vervenne et al., 2008
+bevacizumab	Anticòs monoclonal anti-VEGF	

Taula 2. Assaigs clínics realitzats en pacients amb PDAC avançat.

Assaigs clínics realitzats en pacients amb PDAC avançat amb tractaments quimioterapèutics (A) i fàrmacs dirigits (B). GE: gemcitabina. Adaptat de Stathis and Moore, 2010.

3. CANCER STEM CELLS EN CÀNCER DE PÀNCREES

3.1. Característiques de les *cancer stem cells*

Molts tumors estan formats per poblacions cel·lulars heterogènies des del punt de vista fenotípic i funcional. Clàssicament aquesta heterogeneïtat s'explicava amb el model estocàstic o d'evolució clonal, segons el qual totes les cèl·lules tumorals poden donar lloc a un tumor en patir canvis genètics i/o epigenètics (Nowell, 1976). Estudis més recents suggereixen un nou model segons el qual els tumors presenten una organització jeràrquica, similar a la dels teixits sans, amb una subpoblació cel·lular amb un major potencial tumorigènic situada al cap de la jerarquia, les anomenades *cancer stem cells* (CSC), cèl·lules progenitores i cèl·lules diferenciades (Figura 8) (Dick, 2008). Una CSC, per tant, es defineix com una cèl·lula tumoral amb capacitat per autorenovar-se i per generar els heterogenis llinatges cel·lulars que formen un tumor, mitjançant la divisió asimètrica. A nivell experimental, les CSC només poden ser definides per la seva capacitat per recapitular la generació del tumor (Clarke et al., 2006).

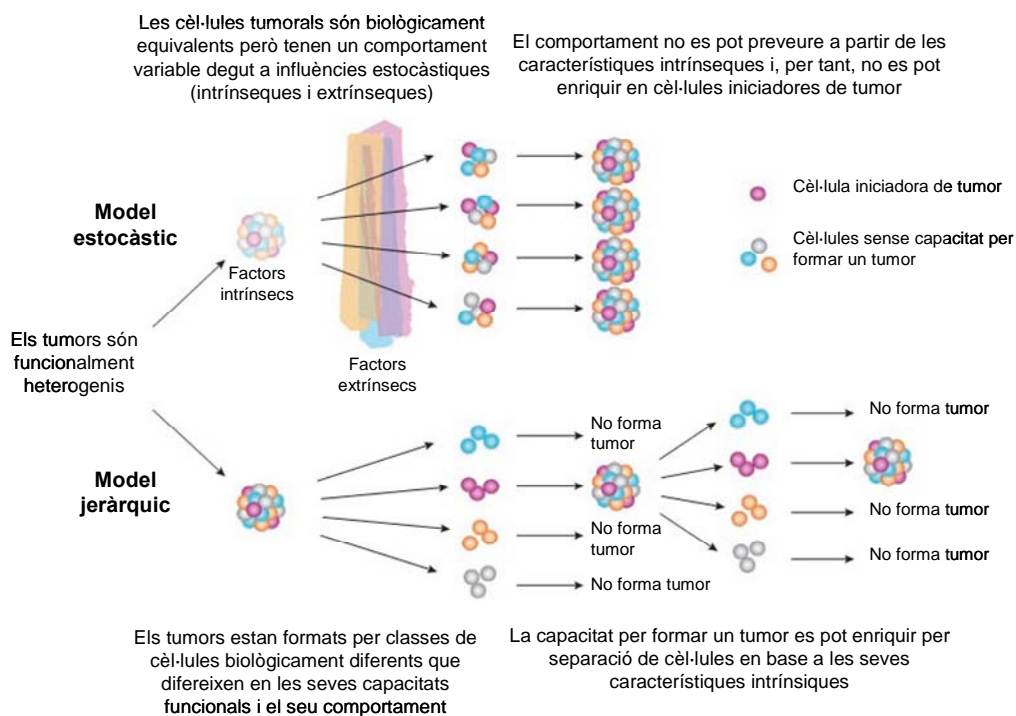


Figura 8. Models d'heterogeneïtat tumoral. Els dos models proposats per explicar l'heterogeneïtat tumoral: model estocàstic i model jeràrquic. Adaptat de Dick, 2008.

Tot i que les primeres CSC van ser descrites en limfomes i altres càncers sanguinis (Bonnet and Dick, 1997; Bruce and Van Der Gaag, 1963; Griffin and Lowenberg, 1986; Park et al., 1971; Sabbath et al., 1985), posteriorment també s'han identificat CSC a nombrosos tipus de tumors sòlids, com els de mama (Al-Hajj et al., 2003), cervell (Singh et al., 2003), pròstata (Hurt et al., 2008; Patrawala et al., 2006), còlon (Ricci-Vitiani et al., 2007) o pàncrees (Hermann et al., 2007; Li et al., 2007).

Cal destacar que la teoria de les CSC no estableix el tipus cel·lular que origina el tumor, ja sigui una *stem cell*, una cèl·lula progenitora o una cèl·lula diferenciada (Clarke et al., 2006; Huntly et al., 2004; Jamieson et al., 2004; Krivtsov et al., 2006; Sun et al., 2005) (Figura 9). A més, hi ha certa controvèrsia entorn a les CSC i hi ha diversos estudis on s'evidencia que el fenotip *stem* podria ser reversible (Chaffer et al., 2011; Guo et al., 2012; Gupta et al., 2011; Quintana et al., 2010).

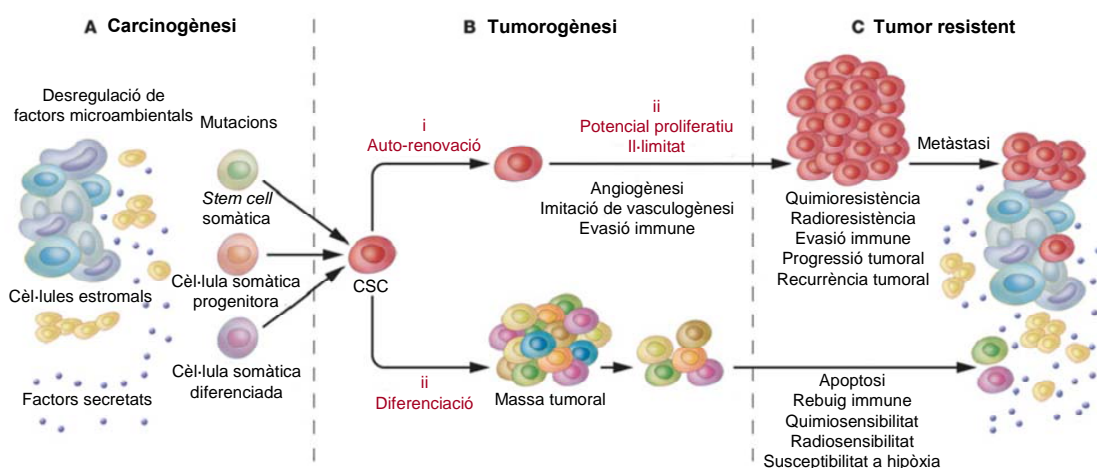


Figura 9. Origen de les CSC i paper en la tumorigènesi i resistència als tractaments. Adaptat de Frank et al., 2010.

Gran part de l'interès que ha generat la teoria de les CSC es deu a que aquesta sub població es caracteritza per una major resistència a la quimio i radioteràpia i, per tant, podria ser la causa de la fallida de molts tractaments convencionals, on no s'aconsegueix eliminar la sub població cel·lular que inicia i manté la tumorigènesi, donant lloc a recidives (Clarke et al., 2006). Els mecanismes que confereixen resistència a les CSC són diversos, com la quiescència, l'expressió de bombes d'eflux de fàrmacs del

tipus ABC, l'elevada expressió de proteïnes antiapoptòtiques o la resistència al dany al DNA (Zhou et al., 2009). A més, sembla que la interacció de les CSC amb l'entorn també podria contribuir a la seva capacitat de resistència als tractaments convencionals (Gillies et al., 2012; Konopleva and Jordan, 2011; Magee et al., 2012; Singh and Settleman, 2010; Visvader and Lindeman, 2012).

D'altra banda, també es creu que les CSC podrien contenir una subpoblació amb capacitat per migrar i, per tant, responsable de l'aparició de metàstasis (Dalerba et al., 2007; Hermann et al., 2007). Aquesta subpoblació tindria característiques de CSC i, a més, hauria adquirit temporalment un estat de transició epiteli-mesènquima (EMT) (Brabletz et al., 2005).

Per tant, el paper de les CSC en el manteniment del tumor i la formació de metàstasis fa que aquestes siguin considerades potencialment com una bona diana terapèutica en el tractament del càncer.

3.2. *Cancer stem cells* en càncer de pàncrees

En PDAC també ha estat descrita una subpoblació de CSC que contribueix a la progressió, el creixement tumoral i la disseminació metastàtica i és responsable, almenys en part, de la resistència d'aquests tumors als tractaments convencionals amb quimio- i radioteràpia i, en conseqüència, a l'aparició de recurrències (Bednar and Simeone, 2011).

Les primeres observacions de CSC en tumors pancreàtics van ser publicades gairebé en paral·lel l'any 2007. Així, el grup de la Dra. Simeone va descriure una subpoblació de CSC definida per la coexpressió dels marcadors de membrana CD44, CD24 i ESA (Li et al., 2007), mentre el grup del Dr. Heeschen va definir l'expressió del marcador CD133 a les CSC pancreàtiques (Hermann et al., 2007), amb un solapament d'un 10-40% entre ambdues subpoblacions (Hermann et al., 2007). Posteriorment s'han descrit altres marcadors de CSC en PDAC, com l'activitat ALDH (Kim et al., 2011; Rasheed et al., 2010), c-Met (Li et al., 2011) o CxCR4, el darrer en una subpoblació de CSC amb major capacitat metastàtica (Hermann et al., 2007) (Figura 10).

Així doncs, un millor coneixement de la biologia d'aquestes CSC és de gran interès per al desenvolupament de noves estratègies terapèutiques que aconseguixin eliminar aquesta subpoblació resistent als tractaments convencionals.

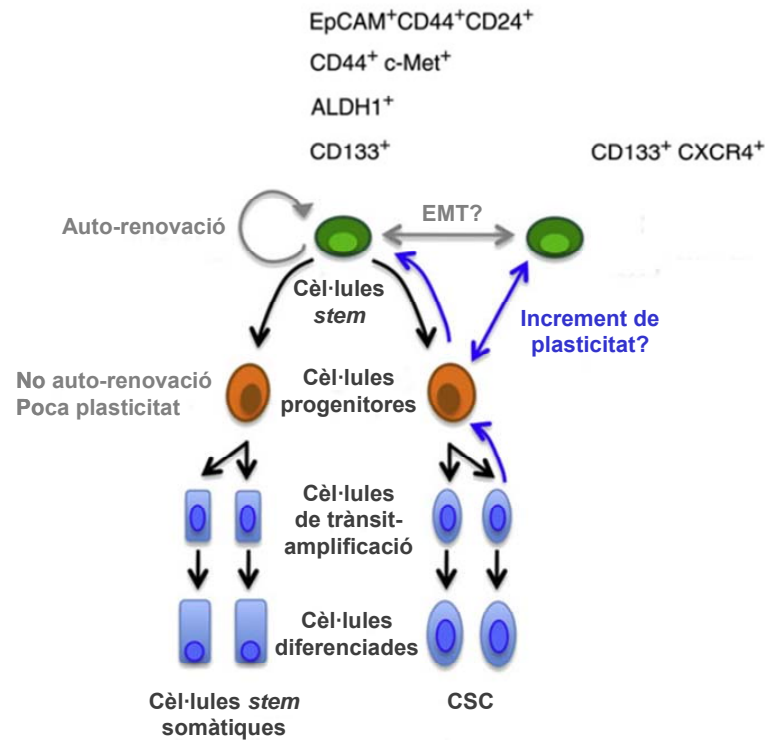


Figura 10. Diferents poblacions de CSC descrites en PDAC. Adaptat de Balic et al., 2012.

3.2.1. Marcadors de superfície

En càncer de pàncrees s'han descrit diferents marcadors de superfície per seleccionar i caracteritzar les CSC (Figura 10), tot i que el significat funcional de l'expressió d'aquests marcadors encara no és del tot clar.

CD44, CD24 i ESA

La primera subpoblació de CSC descrita en PDAC va ser la caracteritzada per la coexpressió dels marcadors CD44, CD24 i ESA (EpCAM) (Li et al., 2007). Aquesta combinació de marcadors va ser escollida prenent com a referència la subpoblació de CSC descrita prèviament en càncer de mama

CD44⁺CD24^{low}ESA⁺ (Al-Hajj et al., 2003). Així, Li et al. van descriure una subpoblació CD44⁺CD24⁺ESA⁺ que representa un 0,2-0,8% de les cèl·lules del tumor, amb una elevada capacitat tumorigènica *in vivo*. A més, els tumors formats a partir de la injecció d'aquestes cèl·lules conserven les característiques histològiques del tumor original. Finalment, aquesta subpoblació de CSC presenta una major expressió de Shh (Li et al., 2007).

D'altra banda, també s'ha descrit una subpoblació CD44⁺CD24⁺, que representa un 2,1-3,5% del tumor, amb una major capacitat tumorigènica *in vivo* i una menor proliferació *in vitro* (Huang et al., 2008).

CD133 i CxCR4

Poc després de la identificació les CSC pancreàtiques per part de Li et al., Hermann et al. van demostrar la presència d'una subpoblació que expressava CD133 amb característiques de CSC a PDAC (Hermann et al., 2007). Aquest marcador havia estat descrit prèviament per CSC de còlon i cervell (O'Brien et al., 2007; Ricci-Vitiani et al., 2007; Singh et al., 2004) i s'expressa en cèl·lules *stem* i progenitores (Shmelkov et al., 2005) i CSC de diferents teixits (Frank et al., 2005; Miki et al., 2007; Singh et al., 2003). La subpoblació CD133⁺ té una major capacitat tumorigènica i augmenta després del tractament amb gemcitabina, el què indica que és resistent a aquest tractament (Hermann et al., 2007). La resistència a la quimioradioteràpia ha estat relacionada posteriorment amb inhibició de l'apoptosi per sobreexpressió de survivina (Du et al., 2011).

D'altra banda, la subpoblació tumoral CD133⁺ pot ser dividida segons l'expressió de CxCR4, marcador de migració en cèl·lules *stem* (Miller et al., 2008). Així, les cèl·lules CD133⁺CxCR4⁺ presenten un major potencial metastàtic i es troben al front invasiu dels tumors (Hermann et al., 2007).

c-Met

c-Met també ha estat proposat com a marcador de CSC de pàncrees (Li et al., 2011), en base a estudis previs on es descrivia aquest marcador en cèl·lules pancreàtiques progenitores de ratolí (Oshima et al., 2007; Suzuki et al., 2004). Així, la subpoblació c-Met^{high} té una elevada capacitat tumorigènica, similar a la descrita anteriorment per les cèl·lules

CD44⁺CD24⁺ESA⁺ i major que la subpoblació CD133⁺, i té capacitat d'autorenovació, ja que creix formant tumorsferes. A més, les cèl·lules CD44⁺c-Met⁺ tenen encara major potencial tumorigènic, pel què sembla que els dos receptors podrien interactuar, a més de tenir la capacitat de tornar a formar *in vivo* tumors amb les característiques del tumor inicial (Li et al., 2011). D'altra banda, també s'ha relacionat un increment de la fosforilació de c-Met amb quimioresistència i EMT (Shah et al., 2007).

3.2.2. Altres marcadors

Tot i que els marcadors de membrana han estat més freqüentment utilitzats, ja que poden ser emprats per separar les CSC per citometria de flux, també han estat descrits altres marcadors que tenen en compte l'expressió de marcadors interns o propietats funcionals característiques d'aquestes cèl·lules.

Activitat ALDH

Nivells elevats d'activitat aldehyd deshidrogenasa 1 (ALDH1) s'han associat amb les CSC. En PDAC, aquest marcador ha estat associat amb cèl·lules amb una elevada capacitat tumorigènica, independent de l'expressió de CD133 (Kim et al., 2011). A més, també s'ha associat una elevada expressió de ALDH1 amb resistència a la quimioteràpia (Duong et al., 2012). Així, en tumors tractats amb gemcitabina s'observa un enriquiment en cèl·lules ALDH⁺ (Jimeno et al., 2009).

Aquest enzim té funcions crítiques en l'eliminació d'aldehids citotòxics (Marchitti et al., 2008), però també participa en altres funcions, com unió a proteïnes, producció de NADPH, absorció de la llum UV, neutralització de radicals hidroxil o, algunes isoformes, producció d'àcid retinoic (Marcato et al., 2011). Aquesta darrera funció és la que més s'ha relacionat amb la biologia de les CSC (Ginestier et al., 2009). A més, també es creu que l'ALDH podria estar induint la resistència als tractaments en intervenir en el metabolisme d'alguns fàrmacs (Magni et al., 1996).

Proteasoma 26S

Recentment s'ha descrit que les CSC pancreàtiques presenten baixa activitat del proteasoma 26S (Adikrisna et al., 2012). Aquest marcador es va descriure inicialment en càncer de mama i glioma (Vlashi et al., 2009), on es va expressar la proteïna de fusió Gdeg. Aquesta proteïna de fusió fluorescent s'acumula a les cèl·lules on el proteasoma 26S és absent i permet el seu seguiment *in vivo*. Així, les CSC pancreàtiques Gdeg^{high} poden diferenciar-se i donar lloc a cèl·lules Gdeg^{high} i Gdeg^{low}, formar tumorsferes en cultiu i formar tumors *in vivo* i són molt resistents al tractament amb gemcitabina. A més, les cèl·lules Gdeg^{high} tenen nivells elevats de β -catenina nuclear i un augment de proteïnes relacionades amb *stemness* com ESA, CD90 o CxCR4 (Adikrisna et al., 2012).

Side-population

En PDAC s'ha descrit una subpoblació de CSC anomenada *side-population*, amb capacitat per eliminar el colorant Hoechst 33342, que representa un 3,3% de la població total. Aquesta es caracteritza per una elevada expressió dels transportadors de membrana ABCB1/MDR1 i ABCG2 i una gran resistència al tractament amb gemcitabina (Zhou et al., 2008b). En aquest sentit, en PDAC també s'ha descrit una subpoblació de CSC caracteritzada per l'expressió de ABCG2 i CD133 (Olempska et al., 2007). A més, també s'ha relacionat la *side-population* amb un augment de l'expressió de gens relacionats amb resistència als tractaments, regulació de l'apoptosi i EMT i una major capacitat per formar tumorsferes (Van den Broeck et al., 2012), així com un major potencial invasiu i metastàtic (Kabashima et al., 2009).

Slow-cycling cells

Un altre marcador que s'ha descrit per CSC pancreàtiques és la seva capacitat per retenir el colorant Vybrant Dil (Dil), la qual està directament relacionada amb la quiescència, un dels trets característics d'aquestes cèl·lules. La subpoblació Dil⁺ o *slow-cycling cells* (Dil⁺/SCC) representa un 3% de les cèl·lules tumorals i presenta una morfologia fibroblastoide i un increment de marcadors de EMT. A més, té una major capacitat per formar tumorsferes, un major potencial invasiu i una major capacitat

tumorigènica. D'altra banda, aquesta subpoblació està enriquida en els marcadors CD44/CD24, CD133 i ALDH i és resistent als tractaments amb quimioteràpia (Dembinski and Krauss, 2009).

Formació de tumorsferes

Les CSC pancreàtiques tenen capacitat per créixer en cultiu en absència d'ancoratge formant uns agregats esfèrics compactes anomenats tumorsferes (Gaviraghi et al., 2011; Gou et al., 2007), tal com passa amb altres tipus de tumors, com glioma (Bar et al., 2010), càncer de mama (Rappa and Lorico, 2010) o còlon (Kanwar et al., 2010). Les tumorsferes conserven les característiques típiques de les CSC, com la capacitat d'autorenovació i diferenciació, però a més s'han relacionat un increment en l'expressió de marcadors CD24/CD44/ESA i CD133 i un major potencial invasiu *in vitro*, així com una major capacitat proliferativa, invasiva i metastàtica *in vivo* (Gaviraghi et al., 2011).

3.2.3. Característiques moleculars

En els darrers anys s'han descrit múltiples vies de senyalització cel·lular implicades en la formació de les CSC, com les vies de Hedgehog, Wnt o Notch (Takebe et al., 2011). D'altra banda, noves evidències suggereixen que els microRNAs (miRNAs) podrien tenir un paper fonamental en la formació i manteniment de les CSC (Liu and Tang, 2011; Wang et al., 2010; Zhou and Mo, 2012). Algunes d'aquestes vies estan representades a la figura 11.

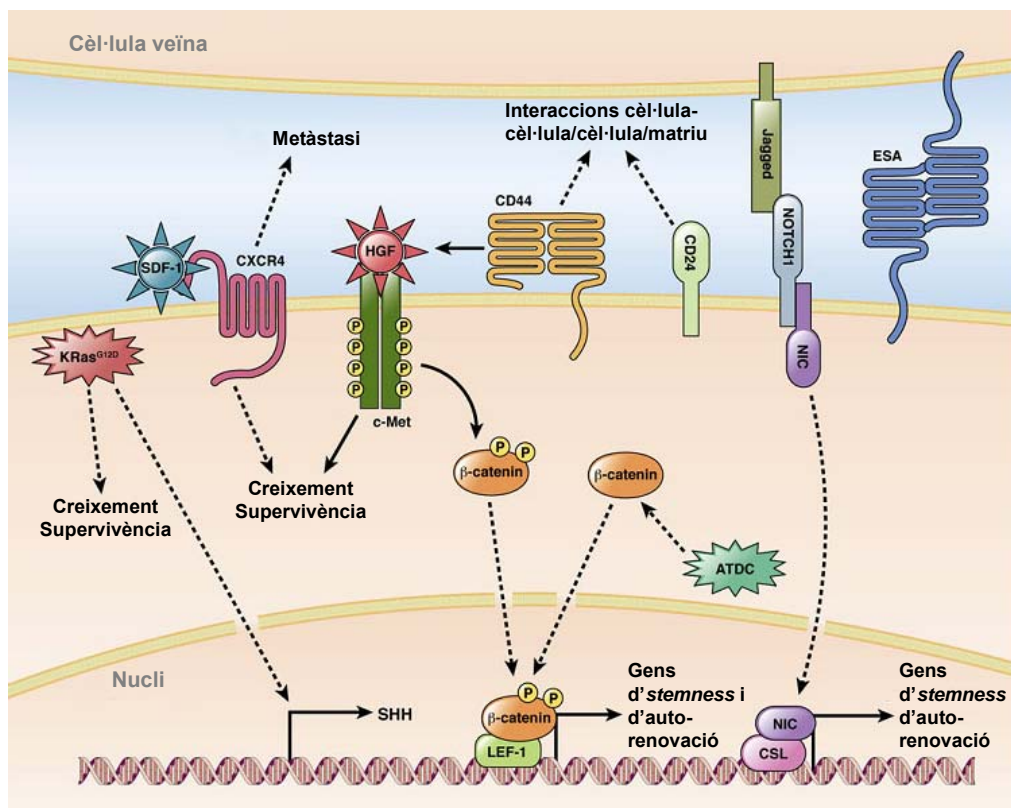


Figura 11. Vies de senyalització descrites en CSC de pàncrees.
Adaptat de Abel and Simeone, 2013.

Les vies de senyalització implicades en la formació de les CSC, així com les seves característiques principals es troben detallades a la taula 3.

Via de senyalització	Referència bibliogràfica
Via de Hedgehog	
Sobreexpressió de la via a CSC	Li et al., 2007; Dembinski and Kraus, 2009
Via de Notch	
Sobreexpressió de Notch-1 i Notch-2 a CSC	Ji et al., 2009
Notch-1 incrementa la formació tumorsferes i l'expressió de CD44 i ESA	Bao et al., 2011b
Via de Wnt	
Important en CSC	Malanchi et al, 2008; Zeng and Nusse, 2010
Relació amb la via de Hedgehog	He et al., 2006
Nodal/Activin	
Sobreexpressió de Nodal i Activin en CSC	Lonardo et al., 2011
Control de l'expressió de Nanog i Oct4	Wang and Tsang, 2007; Xu et al., 2011
FoxM1	
Inducció de EMT (activació de ZEB1, ZEB2, E-cadherina i Vimentina i disminució de let-7 i la família miR-200)	Bao et al., 2011a
Inducció del fenotip stem (formació tumorsferes, expressió CD44 i ESA)	Bao et al., 2011a
miRNAs	
miR-34 regula Notch i Bcl-2	Ji et al., 2009
La família miR-200 controla la EMT	Wellner et al., 2009
Expressió diferencial a CSC de miR-99a, miR-100, miR-125b, miR-192 i miR-429	Jung et al., 2011

Taula 3. Principals característiques de les vies de senyalització descrites en CSC de pàncrees.

3.3. Estratègies terapèutiques basades en l'eliminació de les cancer stem cells

La majoria de teràpies anticancerígenes només aconsegueixen eliminar les cèl·lules tumorals més diferenciades en divisió, sense afectar les CSC. Aquestes constitueixen una subpoblació de cèl·lules tumorals resistent als tractaments convencionals amb quimioteràpia i radioteràpia i són les responsables de l'aparició de metàstasis i recidives. Per tant, és molt important el desenvolupament d'estratègies terapèutiques que aconsegueixin eliminar les CSC (Figura 12a) (Sergeant et al., 2009).

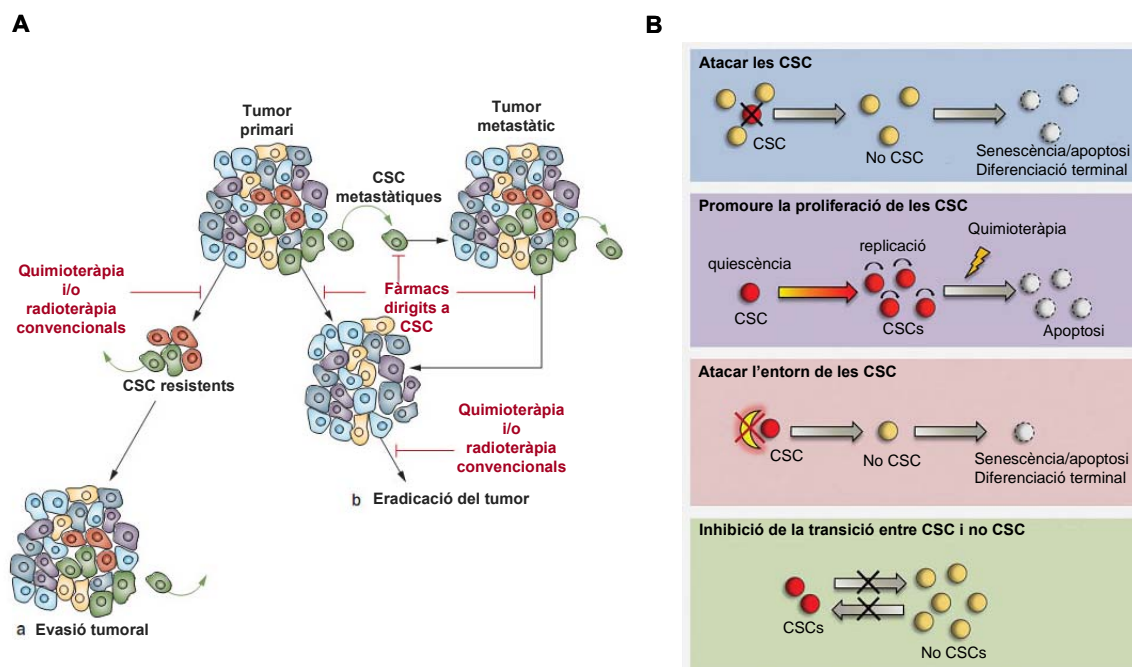


Figura 12. Teràpies antitumorals i eliminació de les CSC. (A) Efecte de la teràpia convencional i de la teràpia dirigida contra les CSC. Adaptat de Sergeant et al., 2009. (B) Estratègies terapèutiques per eliminar les CSC. Adaptat de Sugihara and Saya, 2013.

Les diferents aproximacions per a l'eliminació de les CSC es poden dividir segons l'estratègia emprada en quatre categories (Figura 12b). La primera consisteix en atacar directament aquesta subpoblació, i no les *stem cells* normals, ja sigui eliminant-la o promovent la seva diferenciació i posterior apoptosi, senescència o diferenciació terminal. La segona estratègia per eliminar les CSC consisteix en forçar la sortida de les CSC de

la fase de quiescència i promoure la seva divisió, sensibilitzant-les als tractaments convencionals. Una tercera estratègia es basa en actuar sobre l'entorn tumoral, el qual és en part responsable del manteniment de les CSC. La quarta i darrera estratègia consisteix en inhibir la transició entre CSC i cèl·lules tumorals no CSC, que sembla que estaria regulada per canvis epigenètics (Sugihara and Saya, 2013).

Fins ara no s'han realitzat assaigs clínics en pacients amb PDAC dirigits a eliminar les CSC, tot i que sí que s'ha demostrat l'eficàcia de diversos fàrmacs contra les CSC en estudis preclínics. En aquest sentit, diversos fàrmacs que inhibeixen les vies de senyalització relacionades amb les CSC han estat estudiats (Cano and Hebrok, 2008; Takebe et al., 2011). A la taula 4 es detallen alguns dels fàrmacs assajats en PDAC per eliminar les CSC (Abel and Simeone, 2013; Xia et al., 2012).

Fàrmac	Mecanisme	Referència bibliogràfica
XL184	Inhibidor de c-Met	Li et al., 2011
SB431542	Inhibidor de Alk4/7	Lonardo et al., 2011
anti-DLL4	anticòs inhibidor de DLL4	Yen et al., 2012
MRK-003	Inhibidor de la γ -secretasa	Mizuma et al., 2012
CUR199691	Inhibidor de Smo	Mueller et al., 2009
Quercetina	desconegut	Adikrisna et al., 2012
Ciclopamina	Inhibidor de Hedgehog	Feldmann et al., 2007
IPI-269609	Inhibidor de Hedgehog	Feldmann et al., 2008
GDC-0449 (vismodegib)	Inhibidor de Hedgehog	Singh et al., 2011
Rapamicina	Inhibidor de mTOR	Zhou et al., 2008
Metformina	Modulació expressió miRNAs	Malanchi et al., 2008
SAHA	Activació expressió miR-34a	Nalls et al., 2011
AMD3100	Inhibició CxCR4	Hermann et al., 2007

Taula 4. Agents terapèutics emprats per eliminar CSC pancreàtiques. Adaptat de Abel and Simeone, 2013 i Xia et al., 2012.

4. NOVES ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES PER AL TRACTAMENT DEL CÀNCER DE PÀNCREES

El PDAC es caracteritza per una gran heterogeneïtat i resistència als tractaments convencionals, deguda a l'acumulació d'un gran nombre d'alteracions moleculars relacionades amb la regulació de l'apoptosi, el control del dany al DNA, la regulació del cicle cel·lular, la invasió i les vies de senyalització relacionades amb el desenvolupament, entre d'altres. Les més comuns han estat identificades i caracteritzades i components d'aquestes vies alterades que podrien estar involucrades en la tumorigènesi del PDAC s'han proposat com a possibles dianes terapèutiques (Maitra and Hruban, 2008). Algunes d'aquestes possibles dianes terapèutiques estan detallades a la taula 5.

Paràmetre	Diana terapèutica
Cèl·lula tumoral	K-Ras
	Raf
	MEK
	PI3-K
	EGFR
	IGF-IR
	VEGF/VEGFR
	HIF-1alpha
	TGF-beta
	c-Met
	<i>Cancer stem cell</i>
CxCR4	
Bmi-1	
Notch	
Microambient	cèl·lules estrellades
	VEGF/VEGFR i altres dianes tumorals
	CTLA-4
	OX-40
	PD-1 i VEGF
	B7-H1/B7-H4
	Tregs
	MDSC
	Cox-2
	STATs

Taula 5. Possibles dianes terapèutiques en PDAC. Adaptat de Philip et al., 2009.

Fins ara s'han desenvolupat diverses estratègies terapèutiques basades tant en l'ús de tractaments quimioterapèutics convencionals com en l'assaig de fàrmacs dirigits contra components específics o vies relacionades amb el desenvolupament del tumor, però aquestes han fracassat. La complexa biologia dels tumors pancreàtics fa necessari l'ús de combinacions de fàrmacs per tal d'inhibir de forma simultània diverses d'aquestes vies alterades i millorar els resultats obtinguts fins ara (Stathis and Moore, 2010).

A continuació es troben detallades algunes de les estratègies terapèutiques assajades en aquest treball.

4.1. Inhibició de receptors de factors de creixement

El paper de les vies de senyalització de factors de creixement en la patogènesi del càncer va ser establert fa més de dues dècades, quan es va elaborar la teoria de la secreció autocrina. Aquesta teoria postula que les cèl·lules tumorals generalment tenen una menor dependència de factors de creixement exògens per al manteniment de la seva elevada taxa de proliferació, en part gràcies a la seva capacitat per produir nivells elevats de factors de creixement (Sporn and Roberts, 1985).

Aquesta teoria ha estat confirmada posteriorment en nombroses publicacions i s'han descrit diferents famílies de factors de creixement i de receptors de factors de creixement involucrats en el creixement autònom de les cèl·lules tumorals. En aquest sentit, s'ha demostrat que EGFR i la família de factors de creixement d'EGF tenen un paper crític en la patogènesi i la progressió de diferents tipus de carcinomes (Normanno et al., 2001; Salomon et al., 1995). La família d'EGFR (també anomenada Her o ErbB) és una de les millor caracteritzades i està formada per quatre membres: EGFR (Her-1), ErbB2 (Her-2), ErbB3 (Her-3) i ErbB4 (Her-4) (Uberall et al., 2008; Yarden and Sliwkowski, 2001). La unió del lligand activa aquests receptors de membrana de tipus tirosina-quinasa, que activen diverses vies de senyalització intracel·lular, com les vies Ras-Raf-MAPK, PI3K/Akt, PLC-PKC o STAT. La desregulació d'aquestes vies de senyalització porta a un augment de la proliferació cel·lular i la motilitat, a l'evasió de l'apoptosi i a

l'activació de l'angiogènesi (Hynes and MacDonald, 2009; Yarden and Sliwkowski, 2001).

En el cas del PDAC, EGFR es troba freqüentment sobreexpressat i s'ha relacionat aquest fet amb mal pronòstic, pel què es pot considerar una bona diana terapèutica (Papageorgio and Perry, 2007; Ueda et al., 2004). De fet, en estudis preclínics en models murins de PDAC s'ha demostrat que el bloqueig de la via d'EGFR inhibeix el creixement tumoral i les metàstasis (Bruns et al., 2000). A més, s'ha demostrat a nivell clínic que la combinació de la gemcitabina amb l'inhibidor d'EGFR erlotinib millora significativament la supervivència dels pacients, respecte al tractament amb gemcitabina (Moore et al., 2007). De totes maneres, aquesta millora és molt reduïda, només dos mesos de mitjana, i s'està avaluant el seu efecte com a teràpia adjuvant o en combinació amb altres fàrmacs dirigits, com inhibidors de la via d'IGF-IR. A la taula 6 estan detallats alguns dels fàrmacs inhibidors d'EGFR emprats en assaigs clínics en pacients amb PDAC (Wong and Lemoine, 2009).

Fàrmac	Mecanisme	Referència bibliogràfica
Cetuximab	Anticòs monoclonal anti-EGFR	Philip et al., 2007
Erlotinib	TKI reversible de EGFR	Moore et al., 2007
Gefitinib	TKI reversible de EGFR	Fountzilias et al., 2008
Lapatinib	TKI reversible de EGFR i Her-2	Safran et al. 2008

Taula 6. Fàrmacs inhibidors de EGFR emprats en assaigs clínics en pacients amb PDAC. TKI: Inhibidor tirosina-quinasa. Wong and Lemoine, 2009.

El receptor IGF-IR i la seva via de senyalització també han estat ben caracteritzats i s'ha descrit que tenen un paper important en l'oncogènesi, la progressió tumoral i l'aparició de metàstasis, així com en la resistència a la quimioteràpia en diversos tipus de tumors (Furstenberger and Senn, 2002). Breument, la unió del lligand (IGF-I o IGF-II) al receptor de membrana IGF-IR indueix l'autofosforil·lació del domini tirosina-quinasa intracel·lular del receptor. La fosforil·lació del receptor activa dues vies de senyalització, PI3K/Akt i Ras/Raf/MEK/Erk, que porten a una inhibició de l'apoptosi i a un augment de la proliferació, la invasió i la supervivència cel·lular (King and Wong, 2012).

En PDAC, s'ha descrit que la via d'IGF-IR està activada anormalment per via paracrina i autocrina (Bergmann et al., 1995) i és considerada, per tant, una bona diana terapèutica. En aquest sentit, s'han desenvolupat diversos anticossos monoclonals que bloquegen la seva activació, així com petites molècules inhibidores del domini tirosina-quinasa (Hewish et al., 2009). A la taula 7 estan detallats alguns dels fàrmacs inhibidors d'IGF-IR emprats en assaigs clínics en pacients amb PDAC (King and Wong, 2012; Kotowski and Ma, 2011).

Fàrmac	Mecanisme	Referència bibliogràfica
BIIB-022	mAb anti-IGF-IR	vonMehren et al., 2010
Cixutumumab (IMC-A12)	mAb anti-IGF-IR	Rowinsky et al., 2007
Dalotuzumab (MK-0646)	mAb anti-IGF-IR	Javle et al., 2010
Ganitumab (AMG479)	mAb anti-IGF-IR	Kindler et al., 2010
OSI-906	TKI de IGF-IR i IR	Macaulay et al., 2010

Taula 7. Fàrmacs inhibidors de IGF-IR emprats en assaigs clínics en pacients amb PDAC. mAb: Anticòs monoclonal; TKI: Inhibidor tirosina-quinasa. Kotowski and Ma, 2011; King and Wong, 2012.

D'altra banda, diversos estudis han demostrat que IGF-IR està implicat en la resistència als tractaments dirigits contra els receptors de la família EGFR, ja que en inhibir un d'aquests receptors es produeix una activació compensatòria de l'altre. Per tant, la inhibició simultània de les dues vies de senyalització podria millorar els resultats obtinguts fins ara (Adams et al., 2004; Guix et al., 2008; Morgillo et al., 2007). En aquest sentit, recentment s'han realitzat diversos assaigs clínics per avaluar l'ús de la teràpia combinada d'inhibidors d'IGF-IR amb gemcitabina, erlotinib o l'agonista de DR5 conatumumab (AMG655), tot i que fins ara no s'han obtingut els resultats desitjats (Kindler et al., 2012; King and Wong, 2012; Kotowski and Ma, 2011).

4.2. Activació de la via de TRAIL

L'apoptosi és la mort cel·lular programada on intervenen les caspases (Ashkenazi and Herbst, 2008) i es tracta d'un procés crític durant el desenvolupament embrionari i per a l'homeòstasi dels teixits adults (Ashkenazi, 2008). L'apoptosi es dona principalment mitjançant dues vies

de senyalització interconnectades: la via extrínseca, activada per receptors de senyals proapoptòtics situats a la superfície cel·lular, i la via intrínseca, activada a nivell mitocondrial en resposta a estímuls intracel·lulars. Les dues vies convergeixen a nivell de caspases efectores, que modulen el programa apoptòtic (Ashkenazi and Herbst, 2008).

La desregulació de l'apoptosi és important en la patogènesi tumoral i, de fet, es considera un dels trets més característics de la majoria de càncers (Hanahan and Weinberg, 2000), com és el cas del PDAC (Jones et al., 2008). En aquest sentit, la inducció de l'apoptosi és un component important de l'activitat antitumoral dels tractaments antitumorals convencionals, com la quimioteràpia o la radioteràpia (Kaufmann and Vaux, 2003; Mollinedo and Gajate, 2003). Aquests tractaments estimulen principalment la via intrínseca i sembla que mutacions dels seus components, com *TP53*, podrien contribuir a la resistència de les cèl·lules tumorals a aquest tipus de teràpia (Kaufmann and Vaux, 2003; Mollinedo and Gajate, 2003; Pommier et al., 2004). Per aquest motiu, la inducció de la via extrínseca de l'apoptosi, la qual actua independentment de p53, és una estratègia terapèutica amb interès creixent (Ashkenazi et al., 1999) i s'han desenvolupat diferents fàrmacs agonistes de receptors proapoptòtics (PARA, de l'anglès *proapoptotic receptor agonists*), els quals indueixen l'apoptosi a les cèl·lules tumorals sense afectar a les cèl·lules sanes (French and Tschopp, 1999). Així, inicialment es va assajar l'ús del lligand TRAIL, que activa els receptors DR4 i DR5, però més recentment també s'han desenvolupat anticossos monoclonals que activen específicament DR4 o DR5 (Fesik, 2005). A la taula 8 estan detallats alguns dels PARAs emprats en PDAC (Ashkenazi and Herbst, 2008). Finalment, la combinació d'aquests fàrmacs amb quimioteràpia o fàrmacs dirigits que antagonitzin el creixement i la supervivència cel·lular sembla millorar el seu efecte antitumoral, tal com han demostrat diversos estudis preclínics (Wiezorek et al., 2010).

Fàrmac	Mecanisme
Dulanermin (rhApo2L/TRAIL, PRO1762, AMG-951)	Lligand recombinant agonista de DR4 i DR5
Mapatumumab (HSG-ETR1)	mAb humà anti-DR4
Lexatumumab (HGS-ETR2)	mAb humà anti-DR5
Apomab	mAb humà anti-DR5
AMG-655	mAb humà anti-DR5
LBY135	mAb quimèric anti-DR5
TRA-8/CS-108	mAb murí anti-DR5/versió humanitzada de TRA-8
Ad5-TRAIL	Adenovirus recombinant armat amb TRAIL humà

Taula 8. Fàrmacs agonistes de receptors proapoptòtics emprats en assaigs clínics en pacients amb PDAC. mAb: Anticòs monoclonal. Ashkenazi and Herbst, 2008.

4.3. Viroteràpia gènica

La millora en el coneixement dels mecanismes moleculars implicats en el procés tumoral, així com el desenvolupament de les tècniques de genètica molecular, ha permès la identificació de noves dianes terapèutiques i el desenvolupament de noves estratègies per al tractament del càncer, com la viroteràpia gènica, que combina la viroteràpia i la teràpia gènica.

La viroteràpia consisteix en l'ús de virus amb finalitats terapèutiques. En el cas del càncer s'han desenvolupat virus oncolítics, que repliquen selectivament a les cèl·lules tumorals, produint la seva lisi (Parato et al., 2005). Aquesta selectivitat es pot aconseguir eliminant funcions virals vitals per a la replicació en cèl·lules normals, principalment relacionades amb la regulació del cicle cel·lular i l'apoptosi, que poden ser complementades a les cèl·lules tumorals (Bischoff et al., 1996; Heise et al., 2000; Sherr and McCormick, 2002; White, 2006). Una altra estratègia és la substitució dels promotors virals per promotors tumor-específics, així com la inhibició de la replicació a teixits normals mitjançant la inserció de miRNAs dirigits (Cawood et al., 2009; Small et al., 2006). A més, la replicació selectiva a les cèl·lules tumorals redueix la seva toxicitat (Parato et al., 2005). Alguns dels principals avantatges dels virus oncolítics són l'amplificació de la dosi amb la replicació viral, a més d'estimular respostes immunològiques antitumorals i de millorar l'efecte antitumoral d'agents citotòxics. D'altra

banda, sembla que els virus oncolítics podrien eliminar les CSC en evitar els seus mecanismes de resistència (Friedman et al., 2012; Jiang et al., 2007).

Tot i que fins ara s'han realitzats assaigs clínics amb diferents tipus de virus (taula 9) (Patel and Kratzke, 2013), els adenovirus presenten algunes característiques ideals per al seu ús en viroteràpia oncolítica, a més del seu tropisme natural cap a les cèl·lules epitelials i els adenocarcinomes (Hallden and Portella, 2012). Així, els adenovirus tenen un cicle replicatiu lític, una producció eficient de partícules víriques estables, una transferència gènica eficient i la infecció es dona tant en cèl·lules en divisió com en quiescents. A més, el seu genoma és episomal, pel què el risc de mutagènesi insercional és molt baix (Pesonen et al., 2011). Una de les principals limitacions de l'ús dels adenovirus en viroteràpia és que l'administració intravenosa, que permetria tractar també les metàstasis, redueix la seva eficàcia, ja que els adenovirus són retinguts per factors sanguinis i eliminats al fetge (Baker et al., 2007; Carlisle et al., 2009; Kueberuwa et al., 2010; Waddington et al., 2008). En aquest sentit, alguns dels principals reptes de la teràpia vírica és l'optimització de l'administració sistèmica, la millora de la disseminació intratumoral i la inducció de la resposta immunitària antitumoral (Russell et al., 2012).

D'altra banda, la teràpia gènica consisteix en la introducció de material genètic en una cèl·lula per tal de curar una malaltia. El transgèn emprat pot substituir un gen defectuós o codificar per un RNA o una proteïna amb funció terapèutica (Pesonen et al., 2011). Un dels principals avantatges de la teràpia gènica és que presenta pocs efectes secundaris, en comparació amb els tractaments quimioterapèutics convencionals, tal com han demostrat diferents assaigs clínics (Peng, 2005; Reid et al., 2002; Russell et al., 2012).

Un 64% dels assaigs clínics amb teràpia gènica estan dirigits al tractament del càncer. A més, els vectors virals són els més emprats en teràpia gènica, principalment els adenovirals, en un 24% dels assaigs clínics (Ginn et al., 2013). El fet d'armar un virus amb un transgèn terapèutic pot incrementar la seva potencia oncolítica, tal com s'ha demostrat en diversos assaigs preclínics i clínics. Algunes de les estratègies desenvolupades en viroteràpia gènica es basen en la introducció de gens que modulen

Vírus	Modificació	Referència bibliogràfica
Adenovirus		
ONYX-015 H1010	deleció de E1B-55K	Vasey et al., 2002
CGTG-401	promotor hTERT expressió de CD40L	Somia et al., 2000
Ad5/3-D24-GMCSF	Fibra Ad3 deleció de E1A (selectiu per Rb) GMCSF	Douglas et al., 1996
Ad5-D24-GMCSF	deleció de E1A GMCSF	Rodriguez et al., 1997
Ad3-hTERT-E1A	deleció de E1A promotor hTERT	Pesonen et al., 2012
ICOVIR-7	Fibra Ad3 deleció E1A modificació RGD-4C promotor E2F	Cerullo et al., 2010
H103	expressió de HSP70	Hemminki et al., 2012
Herpesvirus		
Oncovex-GMCSF	deleció de ICP6 deleció de γ -34.5 expressió de GMCSF	Markert et al., 2000
NV1020	deleció de ICP0 i ICP4 deleció de γ -34.5 LAT	Aghi et al., 2008
G207	inserció de TK deleció de ICP6 deleció de γ -34.5	Smith et al., 2006
Vaccinia virus		
GL-ONC1	expressió de GFP	No publicat
JX-594	deleció de TK expressió de GMCSF	Senzer et al., 2009
Reovirus tipus 3	N/A	Park et al., 2008
Virus del xarampió		
MV-CEA	expressió de CEA	McDonald et al., 2006
MV-NIS	expressió del cotransportador de Na ⁺ /I ⁻	No publicat

Taula 9. Virus oncolítics emprats en assaigs clínics. Adaptat de Patel and Kratze, 2013.

l'entorn tumoral, mitjançant la inhibició de l'angiogènesi (Guse et al., 2009; Kuo et al., 2001; Thorne et al., 2006; Zhang et al., 2005) o contribuint a la degradació de l'estroma tumoral (Guedan et al., 2010; Kim et al., 2006), en l'expressió de gens que estimulen la resposta immunològica antitumoral, com citoquines i quimioquines (Chang et al., 2009), a més de la introducció de gens suïcides, els quals codifiquen per enzims que converteixen

prodrogues administrades sistèmicament en metabolits tòxics dins de la cèl·lula diana tumoral (Dias et al., 2010; Rogulski et al., 2000).

Per tant, la viroteràpia gènica constitueix una estratègia terapèutica en constant evolució i amb moltes possibilitats de ser incorporada a curt termini als protocols de tractament ja existents, gràcies a la seva potència i relativa baixa toxicitat.

5. MODELS PRECLÍNICS DE CÀNCER DE PÀNCREES

Tot i que durant els darrers anys hi ha hagut avenços importants en el coneixement dels mecanismes moleculars implicats en el desenvolupament del PDAC (Jones et al., 2008), encara cal millorar molt la prevenció, el diagnòstic precoç i el tractament d'aquesta malaltia (Hidalgo, 2010). El desenvolupament de noves aproximacions rellevants a nivell clínic per al tractament del PDAC depèn de la disponibilitat de models preclínics que permetin recapitular les principals característiques morfològiques i moleculars d'aquesta malaltia i que alhora tinguin un bon valor predictiu a nivell de diagnòstic i de resposta a tractaments terapèutics (Mazur and Siveke, 2012). En aquest sentit, els models animals permeten reproduir amb més fidelitat que els models *in vitro* les interaccions entre les cèl·lules tumorals i el microambient, les quals són molt importants tant per al procés de progressió tumoral com per entendre l'aparició de resistència a alguns tractaments (Van Laethem et al., 2012).

Fins ara s'han establert diferents tipus de models animals de PDAC que poden ser dividits en tres grups, en funció del mètode emprat per obtenir-los: la inducció de carcinomes pancreàtics mitjançant agents químics, la modificació genètica dels animals per tal que desenvolupin tumors al pàncrees i la inoculació de material tumoral pancreàtic humà en animals d'experimentació immunodeprimits.

5.1. Models animals de carcinogènesi química

Els models animals de carcinogènesi induïda es van desenvolupar fa més de dues dècades i es basen en l'administració de substàncies químiques que provoquen canvis cel·lulars que porten ràpidament a la formació d'un tumor. El model més emprat i estudiat és l'administració intraperitoneal de N-nitrosobis(2-oxopropil)amina (BOP) en hámsters (Gingell et al., 1976; Pour et al., 1976; Pour et al., 1975). També s'ha assajat, entre d'altres, l'ús d'azaserina en rates (Longnecker and Curphey, 1975; Roebuck et al., 1984;

Roebuck and Longnecker, 1977) i 7,12-dimetilbenzantracè (DMBA) en ratolins (Osvaldt et al., 2006).

Aquests models permeten reproduir els diferents estadis del PDAC, tot i que no són definits a nivell genètic i no són adequats, per tant, per a la validació de lesions genètiques específiques ni d'interaccions entre vies de senyalització (Bardeesy et al., 2001). A més, poden veure's afectats alhora altres òrgans, disminuint el seu valor preclínic (Ding et al., 2010).

5.2. Models animals modificats genèticament

Els models animals modificats genèticament s'obtenen en introduir modificacions al DNA genòmic de l'animal, mitjançant mutacions condicionals o induïbles, que porten al desenvolupament espontani de PDAC (Ding et al., 2010). Aquests representen diferents estadis del PDAC i són útils tant en recerca bàsica, per establir el paper de factors genètics o ambientals relacionats amb el desenvolupament de la malaltia, com en recerca translacional, per estudiar la resposta antitumoral i antimetastàtica de diferents tractaments (Grippo and Tuveson, 2010).

Fins ara s'han generat una gran varietat d'aquests models de PDAC a partir de la modificació de diferents gens (Herrerros-Villanueva et al., 2012), en base a les alteracions moleculars que caracteritzen aquests tumors i que permeten recapitular la seva morfologia (Van Laethem et al., 2012). Així, donada l'elevada freqüència de les mutacions a *K-Ras* en PDAC (Almoguera et al., 1988), la majoria de ratolins modificats genèticament es basen en mutacions en aquest gen (Herrerros-Villanueva et al., 2012). De totes maneres, la mutació de *K-Ras* no és suficient per induir la progressió a estadis invasius i s'han generat models on es combina aquesta mutació amb deleccions o mutacions en altres gens, com *Ink4* (Aguirre et al., 2003), *TP53* (Hingorani et al., 2005), *Mist* (Tuveson et al., 2006), *Smad4* (Kojima et al., 2007) o *TGF- β* (Ijichi et al., 2006).

Una de les principals limitacions d'aquests models és que no reflexen l'heterogeneïtat genètica típica dels tumors humans (Van Laethem et al., 2012). D'altra banda, el seu principal avantatge és que permeten obtenir tumors al pàncrees d'animals amb el sistema immunitari intacte (Hruban et al., 2006).

5.3. Models animals establerts a partir de cèl·lules o teixit humà

Per establir models animals a partir de cèl·lules o teixit humà, també anomenats xenoempelts, s'empren ratolins immunodeprimits, com els atímics *nude* o els NOD/SCID, per tal d'evitar el rebuig de l'empelt (Morton and Houghton, 2007). Aquests models permeten reproduir les diferents alteracions genètiques i epigenètiques que presenten els tumors, poden ser emprats en el desenvolupament d'aproximacions terapèutiques individualitzades i conserven millor les característiques de l'entorn tumoral (Herrerros-Villanueva et al., 2012). Un dels seus principals inconvenients és que el fet d'emprar animals immunodeprimits no permet avaluar el paper de la resposta immunitària de l'hoste en el creixement tumoral (Ding et al., 2010). Aquests models es poden classificar atenent al material d'origen o a la localització de l'inòcul.

El material emprat per a establir el xenoempelt pot ser una línia cel·lular tumoral o un fragment de tumor. La majoria de models establerts fins ara empren cèl·lules mantingudes en cultiu *in vitro*, el què també s'anomena xenoempelt indirecte, ja que es tracta d'un material fàcil d'obtenir. Un dels principals inconvenients d'aquest tipus de models és la seva poca capacitat de predir l'eficàcia terapèutica dels tractaments (Voskoglou-Nomikos et al., 2003), en part deguda a la selecció que es dona en mantenir les cèl·lules en cultiu durant llargs períodes i perquè formen uns tumors pobres en estroma peritumoral (Kim et al., 2009). Per aquest motiu, hi ha un creixent interès en els models establerts a partir de mostres de tumor primari humà, també anomenats xenoempelts directes (*tumorgrafts*, en anglès) (Garber, 2009). Aquests formen un estroma considerable i recapitulen l'aparença histològica del tumor del pacient d'origen durant varis passatges en ratolins (Rubio-Viqueira and Hidalgo, 2009; Rubio-Viqueira et al., 2006). En aquest cas, la mostra implantada pot ser una suspensió cel·lular obtinguda després de digerir el tumor o un fragment del mateix (Kim et al., 2009).

Segons la localització de l'inòcul es poden distingir els models heterotòpics dels ortotòpics. Als models tumorals heterotòpics la mostra s'implanta al teixit subcutani, típicament en un costat. Aquesta tècnica està

molt estesa, ja que és ràpida, barata i reproducible, a més de permetre fer un seguiment del creixement del tumor fàcilment durant l'experiment. Alguns dels seus principals desavantatges són que el microambient tumoral no és representatiu i que aquests tumors difícilment poden generar metàstasis. Als models ortotòpics, en canvi, la mostra s'implanta a l'òrgan d'origen, el pàncrees en el cas del PDAC. Aquesta tècnica requereix més temps i una major preparació tècnica i és més cara. A més, els ratolins necessiten un major temps de recuperació després de l'operació i el seguiment del creixement del tumor és més complicat. D'altra banda, els models ortotòpics reproduïen millor les interaccions del tumor amb l'entorn i la disseminació metastàtica. Per aquest motiu, aquests els models semblen més adequats per a la realització d'assaigs preclínic (Herrerós-Villanueva et al., 2012; Pérez-Torras et al., 2011).

Per tant, s'han desenvolupat diferents models *in vivo* de PDAC que poden ser emprats tant en recerca bàsica com translacional i la finalitat de l'estudi és la que defineix el model més adient en cada cas.

OBJECTIUS

L'adenocarcinoma ductal pancreàtic (PDAC) és una de les principals causes de mort per càncer degut a l'absència de símptomes específics que permetin una detecció precoç, l'agressivitat i l'elevada resistència als tractaments que presenta aquest tipus de tumor. A més, a nivell clínic pràcticament no s'ha aconseguit cap millora des de l'establiment de la gemcitabina com a fàrmac d'elecció. En aquest sentit, s'han desenvolupat diferents estratègies terapèutiques per intentar millorar els resultats dels assajos clínics, en part a través d'un millor coneixement dels mecanismes moleculars responsables del fracàs dels tractaments. Darrerament, els esforços s'han centrat en tractaments dirigits basats en el control de la senyalització cel·lular, l'eliminació de les *cancer stem cells* (CSC) o el control del microambient tumoral. De totes maneres, les bases moleculars del càncer de pàncrees són extremadament complexes i heterogènies, fet que limita l'ús de teràpies dirigides contra dianes específiques que siguin realment eficients. Per aquest motiu, és necessari continuar desenvolupant i avaluant en models apropiats diferents estratègies terapèutiques que aconseguixin evitar els mecanismes de resistència que presenten les cèl·lules tumorals pancreàtiques i siguin més efectives a nivell clínic.

En base a aquests antecedents, l'objectiu principal d'aquesta tesi va ser:

Assajar diferents estratègies terapèutiques en models cel·lulars i tumorals d'adenocarcinoma ductal pancreàtic dirigides a evitar l'aparició de resistències.

Per assolir aquest objectiu general, es van plantejar els següents objectius específics:

1. Caracteritzar la subpoblació de CSC en línies cel·lulars i tumors de PDAC i analitzar la seva sensibilitat a diferents tractaments.
2. Analitzar l'efecte de la inhibició de IGF-IR i l'activació de DR5 *in vivo* i *in vitro*.
3. Avaluar l'activitat antitumoral de diferents adenovirus oncolítics en tumors ortotòpics humans de PDAC.

MATERIALS I MÈTODES

1. CULTIUS CEL·LULARS

1.1. Línies cel·lulars

Les línies cel·lulars Panc-1 i BxPC3 deriven de carcinomes ductals de pàncrees humans i van ser obtingudes de la col·lecció de l'ATCC (nº: CRL-1469 i CRL-1687 respectivament, *American Type Culture Collection*, USA).

Les línies cel·lulars NP-9 i NP-29 són derivades d'adenocarcinomes pancreàtics humans implantats al pàncrees de ratolins atímics i perpetuats com a xenografts (Reyes et al., 1996; Villanueva et al., 1998). Aquestes van ser establertes al Servei de Digestiu de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona i van ser gentilment cedides pel laboratori d'Investigació Gastrointestinal de l'esmentat hospital.

Les línies cel·lulars CP3, CP15T i CP15A són derivades d'adenocarcinomes pancreàtics humans implantats al pàncrees de ratolins atímics i perpetuats com a xenografts i van ser establertes en el nostre grup de recerca en el marc d'un projecte de col·laboració amb l'Hospital Clínic de Barcelona (Perez-Torras et al., 2011). La línia cel·lular CP15T deriva directament del model tumoral xenoimplantat CP15, mentre la CP15A va ser aïllada del contingut del líquid ascític extret de la cavitat peritoneal del mateix ratolí.

Totes aquestes línies estan àmpliament caracteritzades per les seves característiques de creixement i adhesió, així com respecte als nivells d'expressió i estat dels gens més rellevants en la tumorigènesi del càncer de pàncrees exocrí humà, entre ells els supressors tumorals p53, p16 i també l'oncogèn K-ras.

La línia cel·lular HEK-293 és derivada de ronyó embrionari humà i va ser obtinguda de l'ATCC (nº: CRL-1573). Aquesta línia ha estat emprada en la titulació dels adenovirus.

La línia cel·lular A549 és derivada de carcinoma pulmonar humà i va ser obtinguda de l'ATCC (nº CCL-185). Aquesta línia ha estat emprada per a la amplificació dels adenovirus.

La línia cel·lular Saos-2 és derivada d'osteosarcoma humà i va ser obtinguda de l'ATCC (nº HTB-85). Aquesta línia s'ha emprat com a control

p53 *null* en els experiments d'infecció amb els virus ICOVIR5 i ICOVIR5-p53.

1.2. Condicions de cultiu

Totes les línies cel·lulars tumorals pancreàtiques emprades en aquest treball creixen formant una monocapa cel·lular amb morfologia epitelial adherida al suport sòlid on es cultiven. Quan la monocapa ocupa un 80-90% de la superfície, es fa necessari el replaqueig de les cèl·lules mitjançant tripsinització, per tal d'assegurar-ne la correcta viabilitat.

El replaqueig s'inicia amb un rentat de les cèl·lules amb PBS estèril (Sigma), per tal d'eliminar del cultiu qualsevol resta de sèrum, el qual podria interferir amb l'activitat de la tripsina. A continuació s'inicia la tripsinització de les cèl·lules amb una incubació a 37°C en una solució de tripsina 0,05% amb EDTA (Gibco) d'entre 5 i 10 minuts, depenent de la línia cel·lular. Quan totes les cèl·lules s'han desadherit del suport, es resuspenen amb medi de cultiu, inhibint així qualsevol acció enzimàtica posterior, i es procedeix a la disgregació mecànica de les cèl·lules. Cada línia cel·lular es replaqueja a una densitat adient per què assoleixi un 80-90% de confluència al cap de 3-4 dies. El medi es renova cada dos dies per aspiració del medi vell i addició de medi fresc. Les cèl·lules es mantenen en un incubador a 37°C en presència d'un 5% de CO₂ i un 90% d'humitat relativa.

Les línies cel·lulars Panc-1, BxPC3, HEK-293, A549 i Saos-2 es cultiven en medi DMEM (*Dulbecco's Modified of Eagle's Medium*, BioWhittaker) i les línies cel·lulars NP-9, NP-29, CP3, CP15T i CP15A es mantenen amb una mescla 1:1 de medi DMEM i medi Ham F12 (BioWhittaker). El medi de cultiu es suplementa amb un 5% de sèrum fetal boví (FBS, Gibco) inactivat (30 minuts a 56°C), excepte per la línia CP3, que requereix un 10% de FBS inactivat, i una mescla dels antibiòtics penicil·lina i estreptomicina (100 U/ml i 100 µg/ml, respectivament, Lonza).

1.3. Congelació i descongelació de línies cel·lulars

Per tal de poder disposar de les línies cel·lulars en condicions òptimes sempre que es desitgi, és necessari mantenir un estoc de cèl·lules dels passatges inicials congelades en nitrogen líquid. Per tal de mantenir la viabilitat de les cèl·lules durant el procés de congelació, és necessari utilitzar un crioprotector com el dimetilsulfòxid (DMSO, Sigma). No obstant, malgrat ser imprescindibles en el procés de congelació, els agents crioprotectors són altament tòxics per les cèl·lules a temperatura ambient i a concentracions superiors a l'1%. Per aquest motiu, és aconsellable reduir al màxim el temps de contacte de les cèl·lules amb el DMSO durant els processos de congelació i descongelació. En funció de la sensibilitat de les línies a aquests processos i tenint en compte que en augmentar la proporció de sèrum la viabilitat cel·lular és major, la composició del medi de congelació admet lleugeres variacions. El medi de congelació emprat en aquest treball consisteix en un 50% de medi definit, un 40% de sèrum fetal boví i un 10% de DMSO.

El procés de congelació s'inicia amb la tripsinització de les cèl·lules i la seva posterior centrifugació durant 5 minuts a 1.500 rpm. El sobrenedant s'aspira i les cèl·lules es resuspenen en el medi de congelació esmentat. La suspensió cel·lular s'aliquota en criotubs que es col·loquen en un dipòsit de congelació gradual d'isopropanol a -80°C. Passat un mínim de 4 hores, les cèl·lules ja es poden traslladar a un tanc de nitrogen líquid per a la seva conservació a llarg termini.

Així com el procés de congelació ha de ser lent i gradual per no danyar les cèl·lules, el procés de descongelació ha de ser ràpid per no perdre viabilitat cel·lular. Per tal de descongelar una alíquota de cèl·lules, es procedeix al traspàs del criotub d'interès del nitrogen a un bany termostatitzat a 37°C. D'aquesta forma es garanteix el mínim temps de contacte possible de les cèl·lules amb el DMSO. Un cop descongelat, el contingut del criotub es traspassa a un tub de 15 ml i es centrifuga 5 minuts a 1.500 rpm. Les cèl·lules es resuspenen amb medi fresc suplementat amb un 20% de FBS inactivat i es sembren en una placa de cultiu.

1.4. Cultiu de tumorsferes

Les tumorsferes s'obtenen en mantenir les cèl·lules en cultiu en absència d'ancoratge i amb un medi específic per *stem cells*. Concretament, es cultiven les cèl·lules en plaques de 6 pous tractades per evitar l'adherència de les cèl·lules (Ultra-low attachment plates, Corning) i en medi *stem*, compost d'una mescla 1:1 de medi DMEM i medi Ham F12 (BioWhittaker) suplementat amb B-27, N2, una mescla d'antibiòtic-antimicòtic (Invitrogen), 20 ng/ml d'EGF humà i 20 ng/ml d'FGF bàsic humà (Peprotech), en un incubador a 37°C en presència d'un 5% de CO₂ i un 90% d'humitat relativa.

Els cultius de tumorsferes es mantenen durant passatges successius i els experiments es realitzen entre els passes 4 i 8, on mantenen les característiques *stem*. Un cop per setmana es disgreguen les tumorsferes en una solució de tripsina 0,05% amb EDTA (Gibco) durant 2-3 minuts, després de descartar el medi per centrifugació 5 minuts a 800 rpm. La tripsina s'elimina per centrifugació, 5 minuts a 1.500 rpm, i les cèl·lules individualitzades es resuspenen en medi *stem* després d'un rentat amb medi de cultiu sense sèrum. La sembra inicial des de monocapa es fa afegint 50.000 cèl·lules per pou i als següents passatges s'afegeixen 15.000 cèl·lules per pou.

1.5. Obtenció de cultius primaris

Durant la realització d'aquest treball s'han obtingut cultius primaris a partir de models tumorals pancreàtics. Breument, s'extreu el tumor del ratolí i es digereixen enzimàticament, amb col·lagenasa, les zones no necròtiques (El procés es detalla en apartats posteriors). La suspensió cel·lular obtinguda es dilueix en una mescla 1:1 de medi DMEM i medi Ham F12 (BioWhittaker) suplementat amb un 15% de FBS inactivat i antibiòtics (penicil·lina/estreptomicina) i es plaquejen en un flascó. A partir d'aquest punt les cèl·lules es controlen periòdicament al microscopi i es realitza un canvi de medi un cop per setmana, centrifugant el medi que encara pot contenir cèl·lules en suspensió 5 minuts a 1.500 rpm i replaquejant el

sediment amb medi fresc. D'aquesta manera s'evita la pèrdua de petits fragments i cèl·lules viables que encara no s'han adherit. Al cap d'un període de temps variable, s'observen cèl·lules adherides.

Quan es considera que el número de cèl·lules adherides ha superat el llindar crític per a la seva perpetuació, es retira el medi, que conté les cèl·lules que encara no s'han adherit, i es procedeix al canvi de medi per aspiració dos cops per setmana. Quan les cèl·lules arriben a un 70% de confluència es realitza la primera tripsinització i les cèl·lules es replaquejen en un flascó nou. D'altra banda, si les cèl·lules no es divideixen o ho fan molt lentament, es sotmeten a una tripsinització suau i es tornen a replaquejar, a fi d'estimular-ne el creixement. Quan ja s'han assolit un parell de tripsinitzacions, es pot emprar el cultiu primari obtingut per als experiments, però només durant un número limitat de passatges.

1.6. Control de micoplasma

Els micoplasmes (gènere *Mycoplasma*) són uns bacteris caracteritzats per l'absència de paret cel·lular, pel què no es veuen afectats per molts antibiòtics, com la penicil·lina. A més, la contaminació per micoplasma passa visualment desapercibuda en els cultius cel·lulars i pot afectar als resultats experimentals, ja que altera la síntesi de DNA, RNA i proteïna, introdueix alteracions cromosòmiques i provoca alteracions als antígens de la membrana plasmàtica. Per aquest motiu, es realitza de forma rutinària el test per detectar-ne la presència a les diferents línies cel·lulars.

El test de micoplasma es basa en la detecció d'aquest microorganisme per PCR amb els encebadors MICO-1 i MICO-2 (taula 10). Per a la realització de la PCR, es parteix del medi de cèl·lules que han estat 3 dies en cultiu sense canviar-ne el medi.

Seqüència aminoacídica	
MICO-1	5'-GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG-3'
MICO-2	5'-CGG ATA ACG CTT GCG ACT ATG-3'

Taula 10. Seqüència d'encebadors utilitzats per la detecció de micoplasma.

Si per PCR es detecta la presència de micoplasma, cal descongelar un nou estoc de cèl·lules lliures de micoplasma o, si no és possible, es procedeix a eliminar el micoplasma. Per la desmicoplasmatització es tracten les cèl·lules amb plasmosina (Plasmocin TM, Invivogen) durant dues setmanes a una concentració final de 25 µg/ml. Després del tractament es realitza un nou test per confirmar-ne l'eliminació.

2. TRACTAMENT DE CÈL·LULES AMB AGENTS ANTITUMORALS I FACTORS DE CREIXEMENT

Les cèl·lules es sembren en el suport adequat al tipus d'estudi que es vulgui fer: corba dosi-resposta, extracció de proteïna, etc. Cal ajustar el nombre de cèl·lules que es plaquegen al tipus de línia cel·lular emprat i a la durada de l'experiment. Els cultius s'incuben amb les concentracions de fàrmac escollides dissoltes en el medi de cultiu, durant un temps determinat.

2.1. Agents antitumorals

La majoria de fàrmacs utilitzats es subministren en forma sòlida/pols, pel què resulta necessari reconstituir-los abans de la seva utilització experimental. És important treballar en condicions d'esterilitat i amb solvents prèviament filtrats amb filtres amb porus de 0,2 µm. A més, és recomanable no sotmetre les solucions mare a repetits cicles de congelació/descongelació, pel què s'aconsella preparar petites alíquotes en reconstituir el fàrmac.

En aquest treball s'han emprat tres tipus de fàrmacs: anàlegs de nucleòsids, anticossos monoclonals i inhibidors tirosina quinasa. A la taula 11 es recullen els fàrmacs emprats *in vitro*, així com una breu descripció de cadascun d'ells.

Fàrmac	Casa comercial	Tipus d'agent terapèutic	Diana	Preparació stoc	Conservació
Gemcitabina	Lilly	Anàleg de nucleòsid	Síntesi DNA	10nM en PBS	RT
AMG479	AMGEN	Anticòs monoclonal	IGF-IR	200µM en PBS	-80°C
AMG655	AMGEN	Anticòs monoclonal	DR5	200µM en PBS	(24h)
rhTRAIL	R&D Systems	Lligand recombinant	DR4/DR5	20µg/ml en PBS+0,1%BSA	-20°C
NVP-AEW541	Novartis	Inhibidor TK	IGF-IR	10mM en DMSO	-20°C
Lapatinib	GlaxoSmithKline	Inhibidor TK dual	EGFR/Her-2	10mM en DMSO	-20°C

Taula 11. Descripció dels agents terapèutics emprats per als experiments *in vitro* en aquest treball.
TK: tirosina-quinasa

2.2. Recompte cel·lular

Per tal de determinar el nombre de cèl·lules d'un cultiu, pas imprescindible quan es vol sembrar una quantitat determinada de cèl·lules, per exemple, les cèl·lules es sotmeten a una tripsinització amb una incubació a 37°C en una solució de tripsina 0,05% amb EDTA (Gibco) i es resuspenen en el medi adequat. De la suspensió cel·lular s'agafa una alíquota, que es dilueix amb colorant blau de tripà, de manera que es puguin comptar entre 10 i 100 cèl·lules per quadrant d'una cambra de Neubauer, la qual té una capacitat de 0,1 mm³. El blau de tripà penetra a l'interior de la cèl·lula únicament quan la membrana cel·lular està deteriorada, tenyint les cèl·lules mortes de color blau. Es compten les cèl·lules viables presents als 8 quadrants d'una cambra de Neubauer i es calcula la mitjana. Per al càlcul de cèl·lules per mil·lilitre s'empra la següent fórmula:

$$\text{n}^\circ \text{ cèl·lules/ml} = \text{mitjana de cèl·lules viables per quadrant} \times \text{dilució} \times 10^4$$

Aquest mètode permet determinar la concentració i el percentatge de viabilitat del cultiu cel·lular. Finalment, les cèl·lules es resuspenen amb el medi de cultiu necessari per obtenir la concentració d'interès.

2.3. Anàlisi de la citotoxicitat: corbes dosi-resposta

L'anàlisi de la citotoxicitat d'un determinat tractament es basa en la mesura de la viabilitat cel·lular després de l'exposició al tractament. Així, les cèl·lules s'exposen a diferents concentracions de fàrmac o virus i es determinen les variacions en la viabilitat cel·lular mitjançant el mètode escollit.

Les corbes dosi-resposta permeten representar la viabilitat relativa, prenent com a 100% el nombre de cèl·lules del cultiu control sense tractar. Utilitzant el software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.), cada conjunt de dades experimentals s'ajusta per regressió no-lineal a la funció matemàtica corresponent a una forma adaptada de l'equació de Hill. D'aquesta forma s'obté la IC50, que correspon a la dosi que redueix la viabilitat en un 50%.

En aquest treball s'han utilitzat dos mètodes per a la mesura de la viabilitat cel·lular basats en la reducció de sals de tetrazoli, assajos de MTT i WST-8, adequats per a cèl·lules adherides en monocapa o en suspensió respectivament.

2.3.1. Assaig de MTT

L'assaig de MTT (bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli) es basa en la formació de cristalls de formazan, que són de color blau i insolubles en aigua, després de la ruptura de la sal de tetrazoli. Els cristalls només es produeixen en cèl·lules viables, mitjançant l'enzim mitocondrial succinat deshidrogenasa.

En aquest tipus d'assaig, les cèl·lules es sembren en plaques de 96 pous a una densitat variable en funció de la línia cel·lular i la durada de l'experiment. Per a cada assaig s'utilitzen un mínim de quatre pous per condició. Un cop finalitzat l'experiment es retira el medi i s'afegeix medi fresc amb 0,75 mg/ml de MTT (Sigma) i la placa s'incuba 1 hora a 37 °C per permetre la formació dels cristalls. Els cristalls es solubilitzen amb un solvent orgànic com el DMSO i la densitat òptica dels cristalls dissolts es mesura espectrofotomètricament a 550 nm en un lector d'ELISA (Infinite M200 NanoQuant, TECAN).

El valor d'absorbància obtingut correlaciona de manera directa amb el nombre de cèl·lules metabòlicament actives presents al cultiu cel·lular, dins d'un rang de número de cèl·lules prèviament establert.

2.3.2. Assaig de WST-8

L'assaig de WST-8 (sal monosòdica de 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazoli) es basa en la formació de cristalls de formazan, igual que l'assaig de MTT. En aquest cas, la sal és reduïda a l'exterior de les cèl·lules en combinació amb el portador d'electrons PMS, donant lloc a la formació de cristalls de color groc solubles al medi de cultiu.

De la mateixa manera que a l'assaig de MTT, les cèl·lules es sembren en plaques de 96 pous a una densitat variable en funció de la línia cel·lular i la

durada de l'experiment. Per a cada assaig s'utilitzen un mínim de quatre pous per condició. Un cop finalitzat l'experiment s'afegeixen al medi 10-15 µl/pou de WST-8 (Sigma) i la placa s'incuba 3 hores a 37 °C per permetre la formació dels cristalls, després d'una breu agitació. La densitat òptica dels cristalls dissolts es mesura espectrofotomètricament a 450 nm en un lector d'ELISA (Infinite M200 NanoQuant, TECAN). En aquest cas, el valor d'absorbància obtingut també correlaciona directament amb el nombre de cèl·lules metabòlicament actives presents al cultiu cel·lular.

Aquest assaig és avantatjós respecte al de MTT perquè es pot llegir directament, sense haver de solubilitzar els cristalls. A més, és un mètode més sensible i disminueix la citotoxicitat, ja que és impermeable i no permet la seva acumulació a l'interior de les cèl·lules.

2.4. Factors de creixement

En determinats experiments *in vitro*, per tal de poder valorar l'acció dels agents quimioterapèutics sobre les cèl·lules, es fa necessari l'ús de factors de creixement exògens. Aquests han de ser específics de la via de senyalització que es vol analitzar. S'utilitzen en forma d'estímuls puntuals un cop acabat el tractament amb el fàrmac d'elecció i abans de procedir al tractament subsegüent de les cèl·lules, que varia en funció de l'estudi.

En aquest treball s'han realitzat estímuls de 20 minuts a 37°C amb IGF-I (Factor de creixement semblant a la insulina de tipus 1). S'ha emprat el factor de creixement IGF-I humà recombinant distribuït comercialment en forma liofilitzada i estèril (Peprotech). La solució mare es prepara a una concentració de 100 µg/ml en tampó PBS suplementat amb albúmina (0,1%). L'albúmina actua com a proteïna portadora i garanteix l'estabilitat i activitat del factor. Aquesta solució es conserva a -20°C fins a la seva utilització, aliquidada en petits volums per tal de minimitzar els processos de congelació/descongelació. Els experiments s'han realitzat a una concentració de 50 ng/ml.

3. TÈCNiques DE CITOMETRIA DE FLUX

El citòmetre de flux o FACS (*Flow Assessed Cell Sorter*) és un aparell que es basa en un sistema de flux que injecta cèl·lules que són interceptades amb la llum d'un o més làsers, permetent l'anàlisi de la fluorescència emesa i de la llum dispersada per les partícules. Aquesta tècnica es caracteritza per una elevada velocitat d'anàlisi i la detecció individualitzada de les partícules, fet que permet un estudi estadístic multiparamètric. Alguns citòmetres, a més, permeten també la separació física de les poblacions d'interès, amb una alta puresa i en funció d'un dels diferents paràmetres quantificables.

En el moment de realitzar les mesures al citòmetre de flux, les cèl·lules poden estar vives o fixades, però obligatòriament han d'estar en suspensió i en forma de cèl·lula aïllada. Les cèl·lules són obligades a passar alineades una a una davant d'un feix de làser mitjançant un flux continu. Cada cèl·lula a la vegada dispersa la llum i emet llum fluorescent com a conseqüència de l'excitació del làser a la que és sotmesa.

Els paràmetres que típicament es mesuren de forma simultània per a cada cèl·lula són la dispersió frontal de la llum (FSC, *forward scatter*), que és proporcional a la mida cel·lular, la dispersió de la llum ortogonal (SSC, *side scatter*), proporcional a la quantitat d'estructures granulars o complexitat de la cèl·lula, i les intensitats de fluorescència a diferents longituds d'ona. Les dades obtingudes es poden representar de diferents maneres per a la seva interpretació, normalment com a histogrames de freqüència o diagrames de dues dimensions.

Una de les seves aplicacions més comuns, en base a la seva rapidesa i exactitud, és l'anàlisi del contingut de DNA d'un cultiu cel·lular, que permet assignar la freqüència de la distribució de les poblacions en cada fase del cicle cel·lular. També la detecció d'antígens, tant de membrana com intracel·lulars, a partir d'anticossos específics o altres sistemes d'afinitat conjugats a fluorocroms (tipus fluoresceïna o similars), esdevé un protocol molt útil per estimar el percentatge de cèl·lules que estan expressant una determinada proteïna o disposen d'un fenotip concret dins d'un cultiu.

En aquest treball la citometria de flux s'ha utilitzat per a la quantificació de diferents proteïnes de membrana i intracel·lulars, per a la separació segons l'expressió de marcadors de membrana i per a l'anàlisi del cicle cel·lular.

3.1. Immunofluorescència de cèl·lules en suspensió

La immunofluorescència de cèl·lules en suspensió o FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) és una tècnica que consisteix en la utilització d'anticossos específics conjugats a fluorocroms per tal de detectar antígens presents a les cèl·lules mitjançant citometria de flux. És un mètode útil per caracteritzar i estimar el percentatge de cèl·lules que expressen una determinada proteïna o disposen d'un fenotip concret en una població cel·lular heterogènia.

El protocol pot ser de dos tipus, depenent de la localització de l'antigen que es vol detectar. Així, el protocol no permeabilitzant només permet detectar aquells antígens situats a la cara externa de la membrana plasmàtica de les cèl·lules, mentre el protocol permeabilitzant, mitjançant el tractament de les cèl·lules amb un agent permeabilitzant, permet detectar antígens tant a nivell de membrana com a nivell intracel·lular.

En aquest treball s'han analitzat per FACS permeabilitzant o no permeabilitzant mostres provinents de cultius cel·lulars i de suspensions cel·lulars obtingudes per digestió enzimàtica de tumors. A la taula 12 es recullen els anticossos emprats per citometria de flux.

La lectura s'ha realitzat als citòmetres BD FACSAria (BD Biosciences) i el Gallios (Beckman Coulter Inc.) dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona i al citòmetre Cell Lab Quanta (Beckman Coulter Inc.) del departament de Bioquímica i Biologia molecular de la Universitat de Barcelona i per al posterior anàlisi s'ha emprat el software Summit v4.3 (Dako Colorado Inc.).

Anticossos primaris	Proveïdor	Clon	Font	Dilució
CD24	BD Pharmingen	ML5	Mouse	1/50
CD44	Abcam	EPR1013Y	Rabbit	1/15
CD44	Cell signaling	156-3C11	Mouse	1/100
CD133/1	Miltenyi	AC133	Mouse	1/400
IGF-IR β	Santa Cruz Biotechnology	C-20	Rabbit	1/50
Anticossos secundaris	Proveïdor	Clon	Font	Dilució
Mouse IgG Cy5®	Abcam		Goat	1/400
Mouse IgG Alexa Fluor 488®	Invitrogen		Goat	1/200
Rabbit IgG Alexa Fluor 488®	Invitrogen		Goat	1/200
Anticossos conjugats	Proveïdor	Clon	Font	Dilució
CD24 FITC	BD Pharmingen	ML5	Mouse	1/100
CD44 APC	Abcam	MEM-263	Mouse	1/100
CD133 APC	Miltenyi	AC133	Mouse	1/400
Controls d'isotip	Proveïdor	Clon	Font	Dilució
IgG1	Abcam	1F8	Mouse	1/100
IgG2a, κ	BD Pharmingen	G155-178	Mouse	1/100
IgG2b	Miltenyi	IS6-11E5.11	Mouse	1/400

Taula 12. Detall dels anticossos emprats per citometria de flux en aquest treball.

3.1.1. Immunofluorescència permeabilitzant

Breument, es sotmeten a dos rentats les cèl·lules encara adherides a la placa amb PBS suplementat amb 1% FBS (tampó de rentat), mantenint les cèl·lules en fred amb gel, i després es fixen les cèl·lules durant 5 minuts amb PBS suplementat amb 1% FBS i 0,5% formaldehid. Després de rentar les cèl·lules, es tripsinitzen i es reparteixen les cèl·lules a raó de $1-2,5 \cdot 10^5$ cèl·lules/ml per rèplica i condició. Es realitza una centrifugació de 5 minuts a 2.000 rpm a 4°C i es descarta el sobrenedant. A continuació es realitza un bloqueig amb PBS suplementat amb 3% albúmina sèrica bovina (BSA), 1% FBS i 0,05% saponina (tampó de bloqueig) durant 30 minuts a 4°C i es renten les cèl·lules. Després s'incuben amb l'anticòs a una concentració de 10 $\mu\text{g/ml}$ en tampó de bloqueig durant 1 hora a 37°C, en una estufa i protegides de la llum. Després de fer tres rentats, es resuspèn el sobrenedant en tampó de rentat (el volum varia segons el citòmetre emprat) i es manté a 4°C fins al moment de la lectura amb el citòmetre de flux. Quan l'anticòs no està conjugat a un fluorocrom, es realitza una

segona incubació de 1 hora amb un anticòs secundari, que reconeix l'anticòs primari i té unit un fluorocrom, a 37°C a l'estufa i protegida de la llum.

3.1.2. Immunofluorescència no permeabilitzant

Breument, la suspensió de cèl·lules es sotmet a dos rentats amb PBS suplementat amb 1% BSA i 0,1% azida sòdica (PBS-BSA-Az) i es reparteixen les cèl·lules a raó de $1-5 \cdot 10^5$ cèl·lules/ml per rèplica i condició. Es realitza una centrifugació de 5 minuts a 1.500 rpm a 4°C i es descarta el sobrenedant. Les cèl·lules s'incuben amb l'anticòs a una concentració de 10 µg/ml durant 20-30 minuts a 4°C, en una bany de gel i protegides de la llum. Després de fer dos rentats amb PBS-BSA-Az, es resuspèn el sobrenedant en PBS-BSA-Az (el volum varia segons el citòmetre emprat) i es manté a 4°C fins al moment de la lectura amb el citòmetre de flux. Quan l'anticòs no està conjugat a un fluorocrom, es realitza una segona incubació de 20 minuts amb un anticòs secundari, que reconeix l'anticòs primari i té unit un fluorocrom, a 4°C en una bany de gel i protegida de la llum. Abans de la lectura, cal afegir a cada tub 50 µg/ml de iodur de propidi, per tal de poder identificar i descartar les cèl·lules mortes.

3.2. Separació de subpoblacions cel·lulars

En aquest treball s'han separat de subpoblacions cel·lulars segons l'expressió de marcadors de membrana per citometria de flux. Aquesta tècnica és una extensió de la immunofluorescència per FACS i, tal com s'ha detallat a l'apartat anterior, per a la separació de subpoblacions es treballa amb suspensions cel·lulars. Les mostres són marcades amb l'anticòs d'interès seguint el protocol d'immunofluorescència no permeabilitzant i recollides per un separador cel·lular (*cell sorter*), que és un citòmetre de flux capaç separar les cèl·lules segons la presència d'un o més marcadors, per a posteriors anàlisis. Concretament, els experiments de separació per citometria de flux s'han realitzant amb el citòmetre BD FACSAria (BD Biosciences) dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.

3.3. Anàlisi del perfil de cicle cel·lular

La citometria de flux permet caracteritzar el cicle cel·lular mitjançant la determinació de la quantitat de DNA de les cèl·lules. La distribució típica del DNA d'una població cel·lular en creixement està formada per dos pics que corresponen a la fase G₀/G₁ i a la fase G₂/M i una vall corresponent a la fase S. A la fase G₂/M la cèl·lula té el doble de quantitat de DNA que a la fase G₀/G₁. La fase S correspon a la síntesi de DNA, pel què les cèl·lules presenten quantitats variables de DNA, que es troben entre les fases G₀/G₁ i G₂/M.

El mètode més habitual de monitoratge del percentatge de cèl·lules a les fases del cicle cel·lular és la tinció amb iodur de propidi, un fluorocrom que s'intercala estequiomètricament a la doble cadena de les molècules d'àcids nucleics. Aquest s'excita a 538 nm, emetent una fluorescència en un rang ampli al voltant de 617 nm.

Per a l'anàlisi del cicle cel·lular és necessari tenir les cèl·lules en suspensió i disgregades. Aquestes es renten amb PBS i es resuspenen ($5 \cdot 10^5$ cèl·lules) en 200 µl de PBS. A continuació s'afegeixen gota a gota 800 µl d'etanol absolut fred (-20°C) mentre la suspensió s'agita de forma contínua i suau en un agitador de tipus vòrtex, ja que és molt important una addició lenta i homogènia de l'etanol. L'etanol actua com a fixador i permeabilitzador, condicions necessàries per a la intercalació del iodur de propidi al DNA. Les mostres es conserven a -20°C, on són estables durant un màxim de 15 dies. En el moment de l'anàlisi, les cèl·lules es centrifuguen per tal d'eliminar l'etanol i es resuspenen en 500 µl de PBS amb 50 µg/ml de iodur de propidi (Sigma) i 10 µg/ml de RNasa (Roche), per evitar la unió del iodur de propidi a l'RNA.

Les mostres s'han analitzat en un citòmetre de flux Cell Lab Quanta (Beckman Coulter Inc.) del departament de Bioquímica i Biologia molecular de la Universitat.

4. TÈCNIQUES RELACIONADES AMB LA MANIPULACIÓ D'ADENOVIRUS

4.1. Obtenció dels adenovirus

En aquesta tesi s'ha treballat amb diferents virus derivats d'un adenovirus humà de serotip 5 (Ad5) amb modificacions dirigides a millorar la seva distribució i arribada a les cèl·lules tumorals i a augmentar el seu efecte antitumoral, mitjançant la inserció de transgens. Aquests virus han estat generats en el nostre laboratori, en treballs anteriors, o amablement cedits pel Dr. Ramon Alemany (ICO-IDIBELL) i la Dra. Cristina Fillat (IDIBAPS).

Tots els virus emprats en aquest treball són replicatius condicionals, o virus oncolítics, que són capaços de replicar selectivament a les cèl·lules tumorals, mitjançant un promotor activat només en aquestes. A la taula 13 estan detallats els virus emprats en aquest treball, així com les principals característiques que presenten.

Virus	Origen	Referència bibliogràfica	Característiques
ICOVIR5	Laboratori Dr. Ramon Alemany	Cascalló et al., 2007	Replicació selectiva a cèl·lules amb la via de pRb mutada
ICOVIR5-p53	Treballs anteriors del grup	Sandra Pérez (no publicat)	Introducció del supressor tumoral p53 a ICOVIR5
ICOVIR15	Laboratori Dr. Ramon Alemany	Rojas et al, 2010	Replicació selectiva a cèl·lules amb la via de pRb mutada, reducció genoma respecte ICOVIR5
ICOVIR15-TK	Laboratori Dra. Cristina Fillat	José et al, 2013	Introducció del gen suïcida timidina kinasa (TK) a ICOVIR15
ICOVIR15-Luc	Laboratori Dr. Ramon Alemany	Luís Rojas (no publicat)	Introducció del gen reporter Luc (luciferasa) a ICOVIR15
ICOVIR15K	Laboratori Dr. Ramon Alemany	Rojas et al, 2012	Millora relació tumor/fetge per modificació del domini RGD d'entrada de ICOVIR15
ICOVIR17K	Laboratori Dr. Ramon Alemany	Guedan et al., 2010	Introducció de hialuronidasa PH20 a ICOVIR15K
AdUPARE1A	Laboratori Dra. Cristina Fillat	Huch et al., 2009	Replicació selectiva a cèl·lules que sobreexpressen UPAR

Taula 13. Virus emprats en aquest treball.

4.2. Amplificació dels adenovirus

En condicions normals de propagació, un sobrenedant pot infectar 5 plaques de la mateixa mida del qual prové i el lisat cel·lular en pot infectar 20.

Per cada amplificació s'utilitzen entre 20 i 40 plaques de 15 cm de diàmetre de la línia A549. Quan les cèl·lules arriben a una confluència del 80%, s'infecten i després de 48 hores l'efecte citopàtic es fa evident en el 95-100% de les cèl·lules, de les quals un 20% es troben desadherides. En aquest moment es recull el sobrenedant i les cèl·lules de totes les plaques i es centrifuguen en tubs de 50 ml durant 5 minuts a 1.500 rpm. El sobrenedant es guarda a -80°C per a posteriors infeccions. Els sediments es poden guardar congelats fins al moment de la purificació. Els virus que no es purifiquen es resuspenen amb PBS⁺⁺⁺ (PBS amb 0,68 mM CaCl₂·2H₂O i 0,5 mM MgCl₂·6H₂O) seguint la relació 1 ml per cada 10 plaques, després de sotmetre la mostra a 3 cicles de congelació/descongelació alternant un bany a 37°C i un bany de gel sec/etanol per tal d'alliberar els virus de l'interior cel·lular i centrifugar 5 minuts a 1.500 rpm per descartar les restes cel·lulars. L'estoc obtingut s'aliquota i es guarda a -80°C fins al moment del seu ús, prèvia quantificació per partícules infectives.

4.3. Purificació dels estocs virals

El mètode emprat en aquest treball per a la purificació de virus es basa en la ultracentrifugació en un gradient de densitat fet amb diferents concentracions de clorur de cesi. Aquest mètode permet separar les partícules virals de la resta d'elements presents en el lisat cel·lular (càpsides virals buides, restes cel·lulars, etc).

En primer lloc, es prepara una solució de CsCl de densitat 1,5 g/ml, a partir de la qual es preparen les altres dues solucions necessàries de 1,35 g/ml i de 1,25 g/ml i s'esterilitzen per filtració. El gradient de densitat es prepara afegint una primera fase de 0,5 ml de solució de 1,5 g/ml i a continuació, amb molta cura per no malmetre les fases anteriors, s'afegeixen 3 ml de la de 1,35 g/ml i 3 ml de la de 1,25 g/ml, fent lliscar

gota a gota les solucions per la paret del tub. A continuació, sobre la tercera fase s'afegeix la suspensió viral.

Els tubs es centrifuguen a 35.000 rpm durant 1 hora a 10°C (rotor basculant SW40 Ti, Beckman). En aquestes condicions, les partícules virals es separen de les restes cel·lulars i es concentren en el punt del gradient de densitat corresponent a la densitat de la partícula viral, 1,32 g/ml, formant-se una banda blanquinosa d'aspecte tèrbol. La banda formada per les partícules virals es recull punxant amb una xeringa i es sotmet a una segona ultracentrifugació amb un gradient continu de 1,35 g/ml de clorur de cesi i es diposita a un nou tub, que es sotmet a una ultracentrifugació a 35.000 rpm durant 18 hores a 10°C. Al final de la segona centrifuga s'obté una banda blanquinosa que es correspon a l'adenovirus, el qual s'ha de mantenir sempre en gel. Aquesta es recull igual que l'anterior i s'introdueix en una membrana de diàlisi. Es dialitza enfront de 500 ml de tampó PBS⁺⁺⁺ a 4°C en agitació durant 2 hores. Es renova el tampó de diàlisi i es deixa dues hores més en les mateixes condicions, i el tercer i darrer canvi es fa enfront al mateix tampó complementat amb un 10% de glicerol, per conservar el virus. Finalment s'aliquoten diferents volums del virus, que es conserven a -80°C.

4.4. Titulació dels estocs virals

4.4.1. Determinació de les partícules físiques per espectrometria (vp/ml)

Aquest protocol es basa en la determinació de l'absorbència del DNA viral a una longitud d'ona de 260 nm i permet determinar el nombre de partícules virals (vp) totals d'un estoc viral purificat, sense discriminar entre partícules infectives i defectives.

Es barregen amb un agitador tipus vòrtex 5 µl de la suspensió viral dialitzada i 95 µl de tampó de lisi (Tris 10 mM, EDTA 1 mM i 0,1% SDS a pH 8,0) i s'incuben durant 5 minuts a 56°C, per tal de lisar les càpsides virals. A continuació es mesura la densitat òptica en un espectrofotòmetre (NanoDrop, Thermo Scientific) a longituds d'ona de 260 i 280 nm. La concentració final es pot calcular tenint en compte que el coeficient

d'extinció del virus és de $1,1 \cdot 10^{12}$ per cada unitat de DO. D'aquesta manera:

$$\text{vp/ml} = \text{DO}_{260} \times \text{dilució mostra} \times 1,1 \cdot 10^{12}$$

La relació $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ serveix per monitoritzar la integritat de la mostra purificada i òptimament ha d'estar al voltant de 1,4.

4.4.2. Determinació de les partícules virals infectives (TU/ml)

Aquest protocol es basa en el comptatge del número de cèl·lules positives per a una immunotinció de la proteïna viral de l'hexó en una monocapa de cèl·lules infectades amb dilucions seriadades del virus i permet determinar el número de partícules funcionals, o unitats de transducció (TU), d'estocs virals purificats i d'extractes cel·lulars.

En primer lloc, es prepara un banc de dilucions del virus utilitzant medi de cultiu DMEM amb un 5% de FBS inactivat per triplicat en una placa de 96 pous, amb un volum final de 100 μl . A continuació s'afegeix una suspensió de cèl·lules HEK-293 a raó de 50.000 cèl·lules en 100 μl de medi. Després de 24-36 hores d'incubació a 37°C s'aspira el medi, es deixen assecar les cèl·lules 5 minuts a temperatura ambient i es fixen amb 50 μl de metanol fred durant 10 minuts a -20°C. Tot seguit, es fan 3 rentats amb PBS⁺⁺⁺ suplementat amb 1% BSA (Roche) i s'incuba amb 50 μl de l'anticòs primari (α -hexó, cedit pel laboratori del Dr. Ramon Alemany) durant 1-2 hores a 37°C (dilució 1:5 en PBS⁺⁺⁺ + 1% BSA). A continuació es fan dos rentats amb PBS⁺⁺⁺ + 1% BSA i s'incuba 1 hora a 37°C protegit de la llum amb l'anticòs secundari conjugat amb AlexaFluor488 (dilució 1:300 en PBS⁺⁺⁺ + 1% BSA). Finalment, es fan 3 rentats amb PBS⁺⁺⁺ + 1% BSA i es procedeix al comptatge de les cèl·lules positives per pouet en un microscopi de fluorescència.

El títol viral, nombre d'unitats de transducció per mil·lilitre (TU/ml), es calcula amb la següent fórmula:

$$\text{TU/ml} = (\bar{x} \times \text{FD} \times 1000 \mu\text{l}) / \text{vol}$$

\bar{x} = mitjana dels comptatges de cèl·lules

FD = factor de dilució

1000 μl = per referir-les a 1 ml

vol = volum de virus per pou (100 μl)

4.5. Transducció de cèl·lules amb adenovirus

La transducció amb adenovirus consisteix en la introducció del material genètic d'un virus modificat a l'interior d'una cèl·lula diana. Aquest procés es produeix posant en contacte el medi que conté els virus amb les cèl·lules que es volen transduir.

En aquest treball s'han realitzat transduccions de cèl·lules que creixen en monocapa i en forma de tumorsferes utilitzant virus purificats, pel què el protocol d'infecció habitual ha estat modificat. Així, per tal de transduir les cèl·lules, es descongela el virus en gel i es prepara el banc de dilucions necessari per aconseguir tenir les dosis desitjades per infectar les cèl·lules, en una placa de 96 pous o de 6 cm de diàmetre, segons la finalitat de l'experiment. Tot seguit s'afegeixen les cèl·lules disgregades en el medi amb el virus. Després de 4 hores d'incubació a 37°C, es dilueix el virus amb medi fresc.

5. TÈCNiques D'ANÀlisi DE L'EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES

En aquest treball s'han obtingut extractes proteics totals tant de cèl·lules en cultiu com de teixit tumoral, seguint un protocol que permet preservar l'estat de fosforilació de les proteïnes, per al seu posterior anàlisi per *western blot*.

5.1. Extracció de proteïnes a partir de cultius cel·lulars

A l'hora de realitzar extractes proteics de cultius cel·lulars que han estat tractats prèviament, és important incloure les cèl·lules presents al sobrenedant del cultiu, ja que les cèl·lules apoptòtiques es desadhereixen del cultiu i la seva omisió en el moment de la lisi cel·lular podria deformar la informació del patró proteic dels cultius.

Per tal de garantir la preservació de la fosforilació de les proteïnes durant l'extracció proteica, és molt important treballar a 4°C. Així, les plaques es col·loquen sobre gel i es procedeix a aspirar-ne el medi de cultiu. Es fan dos rentats amb PBS fred, eliminant bé les restes de PBS per evitar diluir les mostres. La lisi es realitza afegint tampó de lisi (Tris 20 mM pH=8, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM, ortovanadat sòdic 2 mM, NaF 100 mM, β-glicerolfosfat 1 mM, Igepal CA-630 1%) prèviament suplementat amb inhibidors de proteases (1 pastilla per cada 10 ml de tampó, Complete Mini, Roche) i fosfatases (dilució 1/100, PhosSTOP, Roche). Les cèl·lules es desenganxen mecànicament, rasant la placa amb l'ajut d'un *scraper*, i la solució resultant es recull en un tub eppendorf. Per als cultius de tumorsferes, aquestes es disgreguen amb tripsina, es renten i es resuspenen en el mateix tampó de lisi suplementat. La solució obtinguda es passa 10 vegades per una xeringa de 30 G a fi de disgregar bé totes les cèl·lules i es centrifuguen 30 minuts a 13.200 rpm en una minífuga a 4°C, per tal de precipitar les restes de material no disgregat. Els sobrenedants es conserven a -20°C o s'utilitzen directament en un assaig tipus *western blot*, prèvia quantificació de la proteïna.

5.2. Extracció de proteïnes a partir de teixit

S'han obtingut extractes proteics a partir de tumors pancreàtics humans implantats i crescuts en ratolins atòmics. El teixit s'extreu un cop sacrificat l'animal i es submergeix immediatament en nitrogen líquid. Un cop congelat, i fins al moment de ser utilitzat, el teixit es conserva a -80°C .

Durant tot el procés de manipulació del teixit tumoral, és molt important evitar que el teixit es descongeli i per això cal mantenir-lo en nitrogen líquid. Amb l'ajut d'un morter, el tumor es fragmenta a fi d'obtenir peces més petites. Són necessaris entre 20 i 50 mg de teixit per tal d'obtenir un extracte proteic suficient. Un cop seleccionat un fragment de pes adequat, el teixit, sempre en presència de nitrogen líquid, es tritura fins a obtenir una pols ben fina, que es col·loca en un tub eppendorf de base el més plana possible. S'afegeix també de lisi (mencionat a l'apartat anterior) a raó de 1 ml/100 mg de teixit i, amb l'ajut d'un aparell de tipus de politró i mantenint sempre la mostra en gel, es procedeix a disgregar el teixit. És molt important insistir en aquest procés fins obtenir un homogenat sense cap rastre de fragments de teixit. Les mostres s'agiten durant 30 minuts a 4°C en un agitador orbital. Tot seguit, es realitza una centrifugació a 13.200 rpm durant 15 minuts en una minífuga a 4°C . El sobrenedant resultant constitueix l'extracte proteic que es quantifica o conserva a -20°C fins al moment del seu ús.

5.3. Determinació de la concentració proteica total

La quantitat de proteïna total present a cada extracte es determina seguint el mètode de Bradford (Bradford, 1976), fent servir el reactiu de Bio-rad (Bio-Rad protein assay). Aquest protocol es basa en el canvi de màxim d'absorbància d'una solució àcida de blau de Coomassie brillant G-250 des de 465 nm fins a 595 nm en unir-se a proteïna. D'aquesta forma, i per aplicació de la llei de Lambert-Beer, es pot determinar la concentració proteica d'un extracte a partir de la interpolació del valor d' A_{595} d'una mescla de l'extracte amb reactiu de Bradford en una recta patró construïda a partir de l'absorbància determinada per diferents solucions patró

d'albumina sèrica bovina (BSA). Aquest mètode ha estat escollit en base a la mínima quantitat d'extracte necessari per fer la valoració (5 µl), la seva rapidesa i l'absència d'interferències del mètode amb els components de diferents tampons emprats.

Breument, es prepara la dilució seriada de l'estàndard de BSA de concentració coneguda (100 a 500 µg/ml) i es carreguen, en una placa de lector d'ELISA de 96 pous, 10 µl de cadascuna de les dilucions per triplicat. Es preparen dues dilucions de cada mostra, que es carreguen per duplicat a raó de 10 µl per pouet. El reactiu comercial "Bio-Rad protein assay" es dilueix 1/5 en aigua i es dispensa a raó de 200 µl per pou. Es mesura l'absorbància a $\lambda=595$ en un lector de plaques d'ELISA (Infinite M200 NanoQuant, TECAN). La concentració de proteïna de les mostres es calcula després d'extrapolar-ne la D.O. a la recta patró.

5.4. Anàlisi de proteïnes mitjançant western blot

La tècnica de western blot (Towbin et al., 1979) permet la detecció de proteïnes d'una mescla fent ús d'anticossos específics per la proteïna d'interès, després d'una electroforesi desnaturalitzant en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE). El protocol es pot dividir en tres etapes: la separació electroforètica de les diferents proteïnes de la mostra, la transferència d'aquestes a una membrana de nitrocel·lulosa i la visualització mitjançant anticossos específics.

5.4.1. Electroforesi en SDS-PAGE

El sistema més clàssic per a la detecció de barreges de proteïnes en funció de la seva mida és l'electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS (Laemmli, 1970). El dodecil sulfat sòdic o SDS és un detergent iònic que s'uneix fàcilment a les proteïnes i els hi confereix una càrrega negativa, mantenint però la relació càrrega/massa constant. La barreja proteica resultant d'aquesta unió es fa córrer per l'acció d'un camp elèctric en una xarxa polimèrica constituïda per una combinació d'acrilamida/bis-acrilamida, de tal manera que la mobilitat electroforètica de cada component depèn de la seva grandària (pes molecular).

En aquest tipus d'electroforesi les proteïnes corren seqüencialment a través de dos tipus de gels de diferent concentració d'acrilamida: el gel concentrador (3,3% acrilamida, 0,088% bis-acrilamida, 0,1% persulfat amònic, 6,6 mM TEMED en Tris-HCl 125 mM pH 6,8), que permet l'agrupament de les proteïnes presents a la mostra immediatament abans de la seva entrada al gel separador, i el gel separador (8-12% poli-acrilamida, segons el pes molecular de la proteïna que es vulgui separar, 0,1% SDS, 0,043% de persulfat amònic, 2,2 mM TEMED en Tris-HCl 375 mM pH 8,8), que degut a la grandària de porus inferior actua de veritable separador de les proteïnes.

És important que la valoració de proteïna de les mostres sigui precisa per poder garantir una càrrega homogènia i poder realitzar un anàlisi de caràcter quantitatiu. Les mostres a analitzar poden diferir tant pel seu origen com pel processat previ, i addicionalment existeixen variacions en la sensibilitat als diferents anticossos primaris utilitzats. Per això, la quantitat necessària de proteïna ha de ser determinada experimentalment en cada cas. Generalment es carreguen de 20 a 50 µg de proteïna.

Les mostres a analitzar es dilueixen 1/5 en un tampó de càrrega que les desnaturalitza i aporta les condicions reductores necessàries (50% glicerol, 5% SDS, 0,5% blau de bromofenol, 5% β-mercaptoetanol en Tris 630 mM pH 6,8). Prèviament a la càrrega en el gel, les proteïnes es bullen 6 minuts a 100°C per completar la desnaturalització. Tots els gels inclouen una mostra formada per proteïnes pre-tenyides de pes molecular conegut, que actuen de marcadors de pes molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad).

Els gels es corren durant 1,5-2 hores a 40 mA/gel de 1,5 mm de gruix en presència d'un tampó 191 mM glicina i 0,1% SDS en Tris 25 mM pH 8,2.

5.4.2. Electrotransferència de proteïnes

Un cop finalitzada l'electroforesi en SDS-PAGE, es procedeix a la transferència de les proteïnes ja separades a un suport de nitrocel·lulosa emprant el sistema Mini-Protean III (Bio-Rad).

Així, el gel que conté les proteïnes s'equilibra durant 15-20 minuts en el tampó de transferència (191 mM glicina i 20% de metanol en Tris 25 mM).

Paral·lelament es prepara un full de nitrocel·lulosa (Schleider & Schuell) de les mateixes dimensions que el gel i amb un diàmetre de porus adient (s'empren els de 0,2 µm per a proteïnes de baix pes molecular i els de 0,45 µm per a les d'alt pes), que s'equilibra en el mateix tampó. La transferència s'efectua en humit a 180 mA durant 70 minuts o a 100 V durant 120 minuts i a 4°C (en funció del pes molecular de la proteïna que es vol detectar), mantenint la refrigeració amb un bloc d'aigua congelada a l'interior.

L'èxit de la transferència es pot monitoritzar gràcies a un revelat reversible i general de proteïnes damunt de la membrana amb el colorant vermell de Ponceau S (0,2% de tint en solució al 3% d'àcid acètic) durant 1-2 minuts. La decoloració es fa amb aigua destil·lada. Complementàriament, també es poden tenyir el gel amb el colorant blau de Coomassie per detectar la presència de proteïnes que no s'hagin transferit.

5.4.3. Immunodetecció

El primer pas necessari per a la detecció de la proteïna desitjada en una membrana és el bloqueig de la mateixa, com a mínim 1 hora a temperatura ambient, amb una solució al 5% de llet descremada en el tampó TBS-I (150 mM NaCl i 0,05% Tween-20 en Tris 50 mM pH 7,4). Aquest pas evita la unió inespecífica dels anticossos a la membrana, disminuint així el soroll de fons durant la detecció.

Posteriorment, es procedeix a la incubació amb un anticòs generat específicament contra la proteïna a detectar (anticòs primari). Aquest es dilueix en tampó de dilució d'anticòs (5% de llet descremada en TBS-I i 0,1% azida sòdica, per tal d'evitar que la solució es contamiï), fins obtenir una concentració final de 0,5-1 µg/ml.

La incubació de l'anticòs primari es realitza durant 1-2 hores a temperatura ambient o alternativament tota la nit a 4°C, sempre en agitació constant per tal d'evitar la dessecació de la membrana i assegurar un marcatge uniforme. Finalitzada aquesta, es fan 3 rentats amb tampó TBS-I.

Donat que l'anticòs primari no conté cap marcatge que permeti la seva visualització, és necessari incubar la membrana amb un segon anticòs capaç de reconèixer el primari i que simultàniament incorpori un sistema de

detecció (anticòs secundari). Tots els anticossos secundaris emprats per aquesta tècnica es troben conjugats amb l'enzim peroxidasa de rave (HRP), que disposa d'un ampli ventall de substrats, els productes dels quals són detectables per diferents mètodes.

L'anticòs secundari està dissenyat per reconèixer les immunoglobulines (IgG) de l'espècie on s'ha generat l'anticòs primari. Els anticossos emprats en aquesta tesi, tant primaris com secundaris, es detallen a la taula 14.

La solució d'anticòs secundari es prepara per dilució d'aquest en el tampó de dilució d'anticòs, tot i que, en aquest cas, la solució no conté azida sòdica (NaN_3), ja que aquesta actua com a inhibidora de l'activitat peroxidasa. La incubació s'efectua a temperatura ambient durant un mínim d'una hora i en agitació i, per finalitzar, es fan 3 rentats amb TBS-I.

La darrera etapa del procés és la detecció de l'activitat peroxidasa, que es correspon amb la localització de la proteïna d'interès. En el sistema de revelat escollit, el producte resultant és quimioluminiscent, el què aporta una elevada sensibilitat (sistema ECL, Biological Industries). Si fós necessari, les imatges es poden quantificar amb el programa Multi Gauge v3.0 (Fujifilm Life Science).

El procés implica la incubació de la membrana amb dues solucions (A i B) que contenen respectivament H_2O_2 , luminol, el substrat de l'HRP, i un agent amplificador del senyal. El senyal es detecta mitjançant una càmera fotogràfica de sensibilitat elevada que genera una imatge digital (Las-3000, Fujifilm).

Les membranes emprades en l'assaig poden ser reutilitzades per a la detecció d'altres proteïnes a partir d'altres anticossos primaris. Tot i que existeixen mètodes destinats a eliminar de la superfície de la membrana tots els anticossos presents i deixar la membrana lliure de qualsevol marcatge previ (mètodes d'*stripping-off*), en molts casos aquest pas no és necessari, ja que els pesos moleculars són prou diferents i la presència d'un senyal anterior no interfereix a les determinacions subsegüents. Així, per reiniciar el procés de revelat amb un nou anticòs, únicament és necessari rentar la membrana un mínim de 3 cops amb TBS-I per tal d'eliminar les restes de reactiu d'ECL i reincubar novament amb el tampó de bloqueig.

Anticossos primaris	Proveïdor	Clon	Font	Dilució	Pes molecular
Actina	Sigma-Aldrich	A2066	Rabbit	1/2000	42 kDa
Adenovirus	Abcam	A2066	Rabbit	1/2000	Proteïnes de la càpside Ad5
Akt1	Santa Cruz Biotechnology	C-20	Goat	1/2000	60 kDa
Phospho-Akt (S473)	Cell Signalling Technology		Rabbit	1/1000	60 kDa
DR5	Cell Signalling Technology		Rabbit	1/1000	40, 48 kDa
EGFR	Santa Cruz Biotechnology	1005	Rabbit	1/1000	170 kDa
Erk (p42/p44 MAP Kinase)	Cell Signalling Technology	137F5	Rabbit	1/1000	42, 44 kDa
Phospho-Erk (T202/Y204)	Cell Signalling Technology		Rabbit	1/1000	42, 44 kDa
Her-2	Santa Cruz Biotechnology	C-18	Rabbit	1/1000	185 kDa
IGF-IR β	Santa Cruz Biotechnology	C-20	Rabbit	1/1000	97 kDa
phospho-IRS-1(Y612)	Invitrogen		Rabbit	1/500	165 kDa
phospho-IRS-1(Y896)	Invitrogen		Rabbit	1/500	165 kDa
MMP7	Santa Cruz Biotechnology	MM0022-4C21	Mouse	1/1000	20, 30 kDa
p53	Novocastra	DO7	Mouse	1/1000	53 kDa
PARP	BD Pharmingen	7D3-6	Mouse	1/1000	85, 116 kDa
XIAP	Cell Signalling Technology		Rabbit	1/500	53 kDa

Anticossos secundaris	Proveïdor	Font	Dilució
Goat HRP	Dako	Rabbit	1/10000
Mouse HRP	Dako	Rabbit	1/1000
Rabbit HRP	Amersham	Donkey	1/5000

Taula 14. Detall dels anticossos i diucions emprats per western blot.

5.5. Detecció de proteïnes mitjançant *arrays* d'anticossos

En aquest treball s'han emprat dos tipus d'*arrays* de la gama Proteome Profiler™ (R&D Systems). Així s'han utilitzat el *Human Apoptosis Array Kit*, que consta d'anticossos dirigits contra 35 proteïnes relacionades amb l'apoptosi (Taula 15a), i el *Human Phospho-Kinase Array Kit*, que permet detectar els nivells de fosforil·lació de 46 proteïnes amb activitat quinasa (Taula 15b). Els *arrays* d'anticossos consisteixen en membranes de nitrocel·lulosa on s'han immobilitzat anticossos en determinades posicions, tot mantenint la seva capacitat de reconèixer i capturar antígens. Les proteïnes capturades a l'*array* poden ser identificades per immunodetecció un cop s'ha dut a terme la incubació de les membranes amb la mostra a analitzar.

A									
	1	2	3	4	5	6			
A	Control +								
B	Bad	Bax	Bd-2	Bd-x	Pro-Caspase-3	Cleaved Caspase-3			
C	TRAIL R1/DR4	TRAIL R2/DR5	FADD	Fas/TNFRSF6	HIF-1 α	HO-1/HMOX1/HSP32			
D	PON2	p21/CIP1/CDK1A	p27/Kip1	Phospho-p53 (S15)	Phospho-p53 (S46)	Phospho-p53 (S392)			
E	Control +								
A									
	7	8	9	10	11	12			
A						Control +			
B	Catalase	cIAP-1	cIAP-2	Claspín	Clusterin	Cytochrome c			
C	HO-2/HMOX2	HSP27	HSP60	HSP70	HTRA2/Omi	Livín			
D	Phospho-Rad17 (S635)	SMAC/Diablo	Survivin	TNF RI/TNFRSF1A	XIAP	Control -			
E									
B									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	Control +	p38 α	ERK1/2	JNK pan	GSSK-3 α/β		p53		Control +
B		MEK1/2	MSK1/2	AMPa1	Akt	Akt	p53		
C	TOR	CREB	HSP27	AMPa2	β -Catenin	p70 S6 Kinase	p53	p27	Paxilín
D	Src	Lyn	LCK	STAT2	STAT5a	p70 S6 Kinase	RSK1/2/3	p27	PLCy-1
E	Fyn	Yes	Fgr	STAT3	STAT5b	p70 S6 Kinase	RSK1/2	c-Jun	Pyk2
F	Hck	Chk-2	FAK	STAT6	STAT5a/b	STAT1	STAT4	eNOS	Control -
G	Control +		Control -						

Taula 15. Esquema dels anticossos dels *arrays* utilitzats en aquest treball. (A) *Human Apoptosis Array Kit*. (B) *Human Phospho-Kinase Array Kit*.

Per tal de realitzar els estudis, s'obtenen els extractes proteics tal com s'ha detallat anteriorment, i es procedeix a incubar les mostres amb les membranes de nitrocel·lulosa seguint el protocol i emprant els tampons proporcionats pel fabricant. Breument, es bloquegen les membranes 1 hora a temperatura ambient (RT) i s'incuben amb 250-400 μ g de proteïna tota la nit a 4 $^{\circ}$ C. Després de 3 rentats de 10 minuts, s'incuben les membranes 1 o 2 hores (al *Human Apoptosis Array Kit* o al *Human Phospho-Kinase Array Kit*, respectivament) a RT amb una barreja d'anticossos biotinilats, es renten 3 vegades 10 minuts i s'incuben amb streptavidina-HRP durant 30 minuts a RT. A continuació es realitzen 3 rentats de 10 minuts i es procedeix a revelar les membranes amb reactiu ECL i una càmera LAS-3000. La densitat obtinguda per cadascun dels duplicats es determina amb el programa Multi Gauge v3.0. (Fujifilm Life Science).

5.6. Immunocitoquímica de cèl·lules adherents

La immunocitoquímica és una tècnica basada en l'ús d'anticossos per al reconeixement específic de proteïnes i antígens presents a la cèl·lula, permetent la seva visualització i localització. En general, les cèl·lules es fixen i es permeabilitzen per permetre l'accés de l'anticòs a l'antigen,

excepte en el cas d'antígens que es troben exposats a l'exterior de la membrana plasmàtica. La unió específica d'un anticòs (anticòs primari) al seu antigen es detecta mitjançant un anticòs secundari conjugat a un sistema de detecció, com anticossos secundaris o altres sistemes d'afinitat conjugats a fluorocroms.

En tots els casos es sembren les cèl·lules en plaques de 24 pous a la densitat òptima per tal d'aconseguir un 80% de confluència al final de l'experiment, i es realitza el tractament d'interès. Prèviament als pous de la placa es col·loquen cobreobjectes de vidre de 10 mm i s'esterilitzen per irradiació amb llum ultraviolada durant un mínim de dues hores. A partir d'aquí, el protocol s'adapta segons la proteïna que es vol detectar. Els anticossos emprats en aquesta tesi i les condicions de treball es detallen a la taula 16.

Anticossos primaris	Proveïdor	Clon	Font	Dilució
CD44	Abcam	EPR1013Y	Rabbit	1/20
IGF-IR β	Santa Cruz Biotechnology	C-20	Rabbit	1/50
Anticossos secundaris	Proveïdor	Clon	Font	Dilució
Mouse IgG Cy5®	Abcam		Goat	1/250
Rabbit IgG Alexa Fluor 488®	Invitrogen		Goat	1/250

Taula 16. Detall dels anticossos i diuacions emprats per immunocitoquímica.

5.6.1. Immunodetecció de CD44

Les cèl·lules es fixen amb paraformaldèhid al 4% durant 30 minuts a temperatura ambient. A continuació es permeabilitzen amb una solució de PBS amb un 0,5% de Tritó X-100 durant 10 minuts. Les mostres es bloquegen amb un 2% de BSA en PBS durant 30 minuts i a continuació s'incuben els cobreobjectes durant una hora a temperatura ambient amb l'anticòs primari diluït a la concentració adequada en tampó de dilució d'anticòs (1% BSA, 0,05% Tween-20 en PBS). L'anticòs secundari s'incuba durant una hora a temperatura ambient protegit de la llum. Finalment, les mostres es munten sobre un portaobjectes utilitzant un medi de muntatge que preserva la fluorescència i conté el colorant DAPI per tenyir els nuclis de les cèl·lules (Vectashield mounting medium for fluorescence with DAPI,

Vector). Les mostres es mantenen a 4°C fins al seu anàlisi en un microscopi de fluorescència Leica acoblat a una càmera digital.

5.6.2. Immunodetecció d'IGF-IR

Les cèl·lules es renten tres vegades amb PBS durant 5 minuts i es fixen amb paraformaldèhid fred al 4% durant 20 minuts a temperatura ambient i en agitació suau. Després de tres rentats amb PBS suplementat amb 0,05% Tritó x-100 en agitació forta, es permeabilitzen les cèl·lules amb una solució de PBS amb un 0,15% de Tritó X-100 durant 15 minuts en agitació suau i es renten tres vegades amb PBS suplementat amb 0,05% Tritó x-100 en agitació forta. Les mostres es bloquegen amb PBS amb un 10% de FBS durant 1 hora i a continuació s'incuben els cobreobjectes durant tota la nit a 4°C en una cambra humida, amb l'anticòs primari diluït a la concentració adequada en PBS amb un 10% de FBS. Després de tres rentats amb PBS amb 0,05% de Tritó x-100, s'incuba l'anticòs secundari durant una hora a temperatura ambient protegit de la llum. A continuació, es fan dos rentats amb PBS i dos amb H₂O, de 10 minuts i en agitació suau. Finalment, les mostres es munten sobre un portaobjectes utilitzant un medi de muntatge que preserva la fluorescència i conté el colorant DAPI per tenyir els nuclis de les cèl·lules (Vectashield mounting medium for fluorescence with DAPI, Vector). Les mostres es mantenen a 4°C fins al seu anàlisi en un microscopi de fluorescència Leica acoblat a una càmera digital.

5.7. Tinció de l'heterocromatina centromèrica

La tinció de l'heterocromatina centromèrica s'ha emprat per a diferenciar les cèl·lules humanes de les murines presents en un cultiu cel·lular primari (Gilbert et al., 2005). Breument, es fan dos rentats amb PBS i es fixen les mostres amb paraformaldèhid al 4% durant 30 minuts a RT. Finalment, es realitzen dos rentats amb PBS i es procedeix al muntatge de les mostres amb Vectashield amb DAPI (Vector), que es conserven a 4°C fins al seu anàlisi en un microscopi de fluorescència Leica acoblat a una càmera digital.

6. TÈCNiques EMPRADES EN ELS ESTUDIS *IN VIVO*

6.1. Animals d'experimentació i condicions d'establució

Per a la realització d'aquesta tesi s'han utilitzat ratolins atímics BALB/c nu/nu femelles (Harlan) de 4-6 setmanes d'edat i amb un pes mig de 20-22 grams en el moment de l'inici de l'experiment. Degut a la seva immunodeficiència, els animals es mantenen en un ambient estèril i es manipulen sota campana de flux laminar de bioseguretat de tipus 2. Les gàbies i l'aigua s'esterilitzen per autoclavats i els encenalls i el menjar s'esterilitzen mitjançant irradiació amb raigs gamma. Els animals són sotmesos a una dieta ordinària de laboratori amb lliure accés a aigua i menjar, i es mantenen a una temperatura controlada de 22-24°C amb un cicle diari de llum/fosc de 12 hores.

Tot els procediments als quals estan sotmesos els animals s'han realitzat d'acord amb les recomanacions per al correcte tractament i ús dels animals de laboratori i han estat aprovats pel Comitè Ètic d'Experimentació Animal del Parc Científic de Barcelona.

6.2. Implantació de fragments tumorals humans al pàncrees de ratolins atímics

La generació de tumors intrapancreàtics es realitza a partir de la implantació directa d'un fragment tumoral humà al pàncrees del ratolí. Primer s'anestesia l'animal amb una injecció intraperitoneal d'una barreja de ketamina/xilacina 3:1 diluïda a la meitat amb salí fisiològic, a raó de 3 µl per gram de ratolí. Aquesta anestesia també té efectes analgèsics, motiu pel qual no s'administra un analgèsic addicional. Quan el ratolí no presenta reflexes plantars, s'inicia l'operació. Aquesta consisteix en una laparotomia subcostal esquerra a través de la qual s'exposen la melsa i el pàncrees del ratolí. Un fragment tumoral de 10 mg s'implanta ràpidament al pàncrees del ratolí mitjançant un punt de sutura Prolene 5-0. A continuació es reintrodueixen la melsa i el pàncrees amb el fragment de tumor a la cavitat

abdominal, on s'injecten 500 µl de salí fisiològic per rehidratar i facilitar la recol·locació dels òrgans. Per acabar, es tanca la ferida mitjançant dos punts de sutura a la paret muscular i una grapa quirúrgica a la pell de l'animal. Els animals es col·loquen sobre una placa que els manté la temperatura corporal fins que es recuperen de l'anestèsia.

6.3. Injecció de suspensions cel·lulars al pàncrees de ratolins atímics

Alternativament a la generació de tumors per implantació directa d'un fragment tumoral al pàncrees del ratolí, en aquest treball també s'han generat tumors intrapancreàtics mitjançant la injecció de suspensions cel·lulars, obtingudes per disgregació de cultius cel·lulars o fragments tumorals. Així, s'anestesia l'animal, tal com s'ha descrit a l'apartat anterior, i quan el ratolí no presenta reflexes plantars, s'inicia l'operació. Aquesta consisteix en una laparotomia subcostal esquerra a través de la qual s'exposen la melsa i el pàncrees del ratolí. La suspensió cel·lular resuspesa en PBS, amb 10^4 - $5 \cdot 10^5$ cèl·lules, s'injecta al pàncrees del ratolí amb una agulla de 25 G en un volum de 50-100 µl, on es forma una bombolla, i es segella la zona d'entrada amb un adhesiu tissular (Histoacryl, BBraun) per evitar la sortida de les cèl·lules. A continuació es reintrodueixen la melsa i el pàncrees a la cavitat abdominal, on s'injecten 500 µl de salí fisiològic per rehidratar i facilitar la recol·locació dels òrgans. Per acabar, es tanca la ferida amb dos punts de sutura a la paret muscular i una grapa quirúrgica a la pell de l'animal. Els animals es col·loquen sobre una placa que els manté la temperatura corporal fins que es recuperen de l'anestèsia.

6.4. Seguiment del creixement tumoral

Després de la implantació dels tumors, els ratolins són pesats cada setmana. Transcorregudes unes dues setmanes, temps necessari per a la desaparició de la inflamació produïda per l'operació, la mida del tumor es mesura setmanalment per palpació abdominal del ratolí.

6.4.1. Obtenció d'imatges per PET-TAC

El PET-TAC (Tomografia d'emissió de positrons/ tomografia axial computeritzada) és un mètode no invasiu que permet detectar i quantificar l'activitat metabòlica d'un tumor *in vivo*. Aquesta tècnica s'ha realitzat al Centro Técnico de Isótopos Radiactivos (CETIR Esplugues).

Breument, s'anestesien els animals i s'administra l'anàleg marcat per via intravenosa, a la vena jugular. Els animals són immobilitzats i s'introdueixen a l'aparell de PET/TAC per a l'adquisició de les imatges, en un ambient amb temperatura controlada. En aquest treball s'han emprat els anàlegs ^{18}F -fluorodesoxiglucosa (FDG) i ^{18}F -fluorotimidina (FLT). En el cas de la FDG, els animals es sotmeten a 12 hores de dejuni abans de l'anàlisi per PET/TAC.

6.5. Tractament dels animals

6.5.1. Administració de fàrmacs

En aquest treball s'han utilitzat quatre fàrmacs diferents pels tractaments *in vivo*: la gemcitabina, l'AMG479, l'AMG655 i el ganciclovir.

La gemcitabina (2',2'-difluorodesoxicitidina, Gemzar®) és una donació de Lilly S.A. Aquesta es distribueix en pols i cal tenir en compte que la quantitat del principi actiu és de 48,3 g per cada 100 g de gemcitabina. Es prepara just abans de la seva administració als animals, es dilueix en salí fisiològic i es filtra. La injecció es realitza amb una agulla de 30 G i la concentració de l'estoc injectat s'ajusta de manera que la dosi a administrar estigui continguda en un volum final de 200 μl . Les dosis de gemcitabina i les pautes de tractament han variat en funció de l'assaig.

El AMG479 (Ganitumab, AMGEN) és un solució de 30 mg/ml que es guarda en alíquotes a -80°C . En el moment de la seva administració, es dilueix en salí fisiològic i es filtra. El fàrmac s'administra per injecció intraperitoneal amb una agulla de 30 G a raó de 300 μg /ratolí, dos cops per setmana.

El AMG655 (Conatumumab, AMGEN) és una solució de 30 mg/ml que es guarda en alíquotes a -80°C . En el moment de la seva administració, es

dilueix en salí fisiològic i es filtra. La injecció es realitza amb una agulla de 30 G a raó de 300 µg/ratolí per via intraperitoneal, dos cops per setmana.

El Ganciclovir (Cymevene, Roche) es distribueix en pols i es prepara a raó de 10 mg/ml en salí fisiològic per a la seva conservació. En el moment de la seva administració, es dilueix en salí fisiològic i es filtra. El fàrmac s'administra per injecció intraperitoneal amb una agulla de 30 G a raó de 10 mg/Kg, en tres dosis consecutives a partir del dia després de la injecció del virus ICOVIR15-TK.

6.5.2. Administració sistèmica d'adenovirus

Les solucions virals injectades als ratolins atímics es corresponen sempre a estocs d'adenovirus purificats diluïts amb PBS estèril. Aquestes s'injecten amb una agulla de 29 G per via intravenosa, a les venes laterals de la cua de l'animal, prèvia dilatació mitjançant fregues amb alcohol i calor. S'injecta una dosi única de virus en un volum de 200 µl.

Els virus administrats durant la realització d'aquets treball han estat descrits anteriorment i detallats a la taula 13.

6.6. Avaluació de la biodistribució dels adenovirus

L'arribada dels adenovirus als diferents òrgans s'ha analitzat durant la realització dels experiments, mitjançant un mètode no invasiu sobre els animals vius, i al final d'aquests, a mostres de tumor criopreservades.

6.6.1. Mesura de la bioluminiscència

S'ha realitzat un seguiment de la distribució dels adenovirus durant la realització de l'experiment mitjançant un sistema de bioluminiscència (IVIS-200, Xenogen) no invasiu que permet detectar i quantificar la luciferasa expressada pel virus en animals vius.

Breument, s'administra el substrat, la D-luciferina (Xenogen), per via intraperitoneal a raó de 32 mg/kg i després de 10 minuts els animals s'anestésien amb una barreja d'isofluorà i oxígen. Els animals s'introdueixen a l'IVIS-200, acoblat a un sistema d'anestèsia, i s'adquireixen les imatges.

Per a l'anàlisi *ex vivo* de l'expressió de luciferasa, s'extreuen els òrgans d'interès de l'animal recent analitzat al sistema IVIS i es col·loquen en plaques de cultiu, les quals s'introdueixen a l'aparell per adquirir la imatge.

L'activitat luciferasa es quantifica emprant imatges adquirides sense arribar al punt de saturació mitjançant el software Living Image 2.20.1 Igor Pro4.06A.

6.6.2. Quantificació dels genomes virals

Per a la determinació de la càrrega viral en cadascun dels òrgans analitzats es purifica el DNA dels teixits criopreservats, mitjançant el kit *DNAeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen). Aquest kit permet purificar conjuntament els genomes virals i el DNA cel·lular. La concentració del DNA es determina per espectrofotometria i es porten les cèl·lules a una concentració de 25 ng/ml. La quantificació dels genomes virals es determina mitjançant una PCR en temps real, la qual permet determinar, durant la fase exponencial de la reacció, els productes de PCR amplificats i marcats amb un fluorocrom.

En aquest treball s'ha realitzat una quantificació absoluta d'un fragment de la regió viral L3 (proteïna de l'hexó) per PCR en temps real, mitjançant una sonda taqman específica per l'hexó. Breument, es prepara una mix que conté 4 µl de mostra (100 ng), 0,3 µl d'encebador Ad18852F 10 µM, 0,3 µl d'encebador Ad18912R 10 µM, 0,1 µl de sonda, 5 µl de 2x *Premier Extaq* (Takara) i 0,3 µl d'H₂O bidestil·lada. La seqüència dels encebadors i de la sonda emprats havien estat descrits prèviament (Smith et al., 2002) i es detallen a la taula 17. Les condicions d'amplificació emprades són: 10 minuts a 95°C i 40 cicles de 15 segons a 95°C i 1 minut a 60°C.

Seqüència aminoacídica	
Ad18852F	5'-CTT CGA TGA TGC CGC AGT G-3'
Ad18912R	5'-GGG CTC AGG TAC TCC GAG G-3'
Sonda TaqMan	FAM-TTA CAT GCA CAT CTC GGG CCA GGA C-TAMRA

Taula 17. Seqüència d'encebadors utilitzats per a la quantificació de genomes virals mitjançant PCR en temps real.

6.7. Obtenció de tumors intrapancreàtics

Un cop finalitzat el tractament dels ratolins o bé quan els tumors assoleixen una mida crítica i s'han d'extreure, els animals es sacrifiquen en una cambra de CO₂. Aleshores es realitza una dissecció per tal d'accedir al pàncrees dels ratolins. Els tumors s'extreuen i separen del pàncrees de l'animal utilitzant material quirúrgic. Un cop extrets el tumors, es pesen i es processen en funció de l'estudi que es vulgui realitzar amb la mostra. El tipus de processat sempre depèn de la mida del tumor, però es procura que sigui el més ampli i representatiu possible.

6.7.1. Mesura del pes i volum tumorals

Els tumors es renten amb PBS i es pesen en una balança de precisió. Per a la determinació del volum tumoral, s'empra un peu de rei electrònic i es calcula seguint la fórmula d'Attia i Weiss (Attia and Weiss, 1966): Volum = $0,4 \times (a \times b^2)$, on a i b són els diàmetres major i menor, respectivament.

6.7.2. Fixació de tumors en paraformaldèhid

En primer lloc es renten els tumors en salí fisiològic, es col·loquen dins d'un motlle (Histosettell, Simport plastics) retolat amb llapis i es submergeixen en paraformaldèhid (PFA) al 4% a temperatura ambient entre 12 i 24 hores, en funció de la mida de la mostra. La relació entre el fixador i la mostra ha de ser aproximadament 40:1 (v:v). Transcorregut aquest temps les mostres ja estan fixades es mantenen en PBS a 4°C fins al moment de la seva inclusió en blocs de parafina i posterior obtenció de talls per microtomia.

6.7.3. Congelació en nitrogen líquid

Després de rentar-los amb solució salina, els tumors s'empaqueten amb paper d'alumini i es submergeixen ràpidament en nitrogen líquid. Les mostres es guarden a -80°C fins a la seva utilització.

6.7.4. Obtenció de digerits tumorals

La disgregació dels tumors es duu a terme amb una combinació de fragmentació mecànica i digestió enzimàtica (Kim et al., 2009). Els tumors, o fragments d'aquests, es renten dues vegades amb PBS i es trituren amb l'ajuda d'un bisturí fins obtenir una pasta amb fragments de 1 mm³, que s'incuba amb 200 U/ml de col·lagenasa tipus IV (Worthington) en medi de cultiu a raó de 40 mg/ml. La digestió es porta a terme durant 2 hores a 37°C en agitació, la qual es complementa amb una disgregació amb l'ajuda d'una pipeta de 5 ml i una xeringa amb una agulla de 20 G cada hora. En acabar la incubació es fa un rentat afegint medi de cultiu i centrifugant la mostra 5 minuts a 1.200 g. El pellet es resuspèn en medi de cultiu i es passa per un tamís (cell strainer, BD Falcon) de 70 µm. La mescla obtinguda es renta amb medi de cultiu i el pellet s'incuba 10 minuts en gel amb un tampó de lisi d'eritròcits (RBC lysis buffer, Labclinics) a raó de 1:10 pellet/buffer (v/v). Després d'un últim rentat en medi de cultiu la mostra diluïda en medi de cultiu es filtra amb un tamís de 40 µm i la solució que s'obté ja es pot utilitzar per als experiments posteriors.

7. TÈCNiques HISTOLÒGIQUES

7.1. Inclusió en blocs de parafina

Per a la inclusió en parafina dels tumors prèviament fixats en PFA, es submergeixen aquests en etanol 70% durant 3 hores i posteriorment es passen a etanol 96% durant tota la nit. Al dia següent, es passen a un primer pas d'etanol 100% durant 2 hores seguit d'un segon pas amb etanol 100% durant 1 hora. A continuació es deixen en xilol entre 30 i 60 minuts, fins que tinguin la duresa adequada (depèn del tipus de teixit i de la seva mida). En aquest punt, amb les mostres totalment deshidratades, ja es pot començar la seva inclusió en parafina: primer es submergeixen en parafina tota la nit a 65°C i l'endemà es passa a parafina nova on es deixa un mínim de 2 hores (es poden deixar total la nit). Per fer els blocs s'utilitza l'aparell Leica EG 1120, que manté la parafina líquida a 60°C i té un dosificador que permet omplir els motlles, junt amb una placa Leica EG 1140 que està a una temperatura de 4°C i que permet la solidificació homogènia dels blocs.

7.2. Obtenció de talls histològics amb micròtom

A partir dels blocs de parafina s'obtenen talls de 5 µm de gruix amb un micròtom de rotació. Un cop tallades, les seccions es submergeixen en un bany d'aigua destil·lada temperada a 42°C per aconseguir la seva màxima extensió. Un cop llises es dipositen en portaobjectes prèviament tractats amb poly-L-lisina (Sigma), per tal d'augmentar l'adherència de les mostres. Aquest tractament consisteix en submergir els portaobjectes 5 minuts a temperatura ambient en una solució de poly-L-lisina al 10% en aigua destil·lada. Les mostres es guarden a temperatura ambient fins al moment de ser processades.

7.3. Tinció hematoxilina-eosina de mostres parafinades

Aquesta tinció permet evaluar l'estructura dels teixits, ja que permet tenyir les cèl·lules de color rosa i els nuclis de color lila. La tinció es realitza sobre talls histològics de 5 µm de gruix obtinguts amb el micròtom, seguint un protocol estàndard: en primer lloc es desparafinen les mostres submergeixent-les en una bateria de 4 xilols (5 minuts cada una). Després, per tal de rehidratar-les, es submergeixen en solucions amb una concentració decreixent d'etanol: 100%, 96% i 70%, 5 minuts cadascuna, i finalment en aigua destil·lada. En aquest punt les mostres es tenyeixen amb una dilució 1:5 en aigua bidestil·lada de l'hematoxilina de Mayer (Merck) durant 90 segons i posteriorment s'elimina l'excés de colorant amb aigua corrent sota l'aixeta. Tot seguit es realitza la tinció amb eosina A (Merck) a l'1% (p/v) en etanol 80% i un 5% d'àcid acètic (v/v) durant 5-10 segons. Posteriorment, es procedeix a la rehidratació dels teixits submergeixent-los en solucions creixents d'etanol (70, 96 i 100%, pocs segons per a cadascuna és suficient) i finalment xilol. Per acabar, es munten les mostres amb un medi de muntatge hidrofòbic DPX (Sigma).

7.4. Tinció tricròmica de Masson de mostres parafinades

Aquesta tinció posa de manifest la presència de teixit connectiu i fibres elàstiques en una mostra, en tenyir les fibres de col·lagen de color blau, el citoplasma de les cèl·lules de rosa i el citoplasma de lila. Tal com es detalla per la tinció d'hematoxilina-eosina, les mostres es desparafinen amb xilol, es rehidraten amb etanol i s'equilibren en aigua bidestil·lada. A continuació, s'incuben al microones en solució de Bouin durant 1 minut, es renten amb aigua i es submergeixen en hematoxilina de Weiger (Sigma) durant 10 minuts. Tot seguit es tornen a rentar amb aigua, s'incuben 5 minuts amb el reactiu de Biebrich-Fucsina (Sigma) i es tornen a rentar amb aigua. Després es submergeixen amb àcid fosfotúngstic durant 15 minuts, se n'elimina l'excés i s'incuben 10 minuts amb blau d'anilina o alternativament amb verd llum. Per acabar, es tornen a rentar amb compte, ja que la coloració marxa amb facilitat, es deshidraten amb una bateria de 3 alcohols i 4 xilols, i es procedeix al seu muntatge amb DPX (Sigma).

7.5. Detecció de l'heterocromatina centromèrica de mostres parafinades

La tinció de l'heterocromatina centromèrica s'ha emprat per a diferenciar les cèl·lules humanes de les murines presents en un teixit (Gilbert et al., 2005). Breument, es desparafinen les mostres amb dos rentats de 5 minuts amb xilol 100% i a continuació es rehidraten submergint-les en concentracions decreixents d'etanol (100%, 95%, 75%, 5 minuts cadascuna) i, finalment, en aigua bidestil·lada. A continuació es permeabilitzen amb PBS suplementat amb Tritó x-100 al 0,5% durant 10 minuts i es renten amb PBS durant 5 minuts. Finalment, es procedeix al muntatge de les mostres amb Vectashield amb DAPI (Vector labs Inc.), les quals es conserven a 4°C.

7.6. Tinció immunohistoquímica de mostres parafinades

Les tincions immunohistoquímiques (IHQ) permeten detectar l'expressió de proteïnes d'interès en mostres de teixit mitjançant anticossos dissenyats per unir-s'hi específicament. En aquest treball s'ha realitzat una detecció d'àcid hialurònic en mostres de tumor parafinades.

7.6.1. Detecció d'àcid hialurònic

La detecció de l'àcid hialurònic s'ha realitzat en mostres de tumors parafinades, emprant una proteïna d'unió a l'àcid hialurònic marcada amb biotina (B-HABP, Seidagaku America). Breument, es desparafinen les mostres amb una incubació durant tota la nit a 37°C o durant 2 hores a 65°C i la seva submersió durant 5 minuts en una bateria de quatre xilols i durant 5 minuts en una bateria de dos etanols. A continuació s'inhibeixen les peroxidases amb peròxid d'hidrogen al 0,3% en metanol durant 30 minuts, es rehidraten durant 5 minuts amb concentracions decreixents d'etanol (etanol 96% i etanol 70%) i es renten amb PBS durant 10 minuts. Per tal d'obtenir un control negatiu de la prova, es cobreix una de les rèliques de la mostra amb una solució de PBS amb 200 U/ml hialuronidasa

de testicle boví (Sigma), que degrada l'àcid hialurònic present a la mostra, durant 1 hora a 37°C. En paral·lel, la mostra s'incuba amb PBS. Després es renten els talls 3 vegades amb PBS durant 5 minuts i es bloquejen amb PBS suplementat amb un 10% de sèrum de cabra o de cavall durant 1 hora a RT. Per tal de procedir a la immunodetecció, es retira la solució de bloqueig i es cobreixen les mostres amb 5 µg/ml HABP-B (Seidagaku America) en PBS suplementat amb 0,1% BSA, durant tota la nit a 4°C. Després d'atemperar les mostres durant 30 minuts, es renten tres vegades amb PBS durant 5 minuts i es cobreixen amb el complex ABC (Avidina-Biotina-Peroxidasa, ABC Kit de Vectastain), seguint les instruccions del fabricant. Després, les mostres es renten les mostres 3 vegades durant 5 minuts amb PBS i es submergeixen 5 minuts més en TBS (tampó salí Tris 0,05 M, pH 7,4). A continuació, les seccions es cobreixen amb el substrat cromogènic DAB+ (Dako Cytomation) durant 15 segons, fins que apareix un precipitat marró. Aleshores la reacció es para submergint les mostres en TBS i es renten durant 10 minuts amb aigua de l'aixeta. Després les mostres es contratenyeixen amb hematoxilina durant 1-2 minuts. Les mostres es renten 10 minuts amb aigua de l'aixeta i es deshidraten en una bateria d'etanols de graduacions creixents (etanol 70%, etanol 96% i etanol 100%, tres vegades durant 2 minuts) i quatre vegades durant 5 minuts en xilol. Finalment, es realitza el muntatge en medi de muntatge DPX (VWR International Ltd.). En tot cas els casos, les incubacions es realitzen en cambres humides, sense permetre mai que els teixits s'assequin, i totes les solucions es preparen al moment del seu ús.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. **CANCER STEM CELLS EN MODELS DE CÀNCER DE PÀNCREES HUMÀ**

El càncer de pàncrees és una de les principals causes de mort per càncer, degut a la manca de símptomes específics que permetin una detecció precoç de la malaltia, la seva elevada agressivitat i la resistència que presenta als tractaments convencionals (Bardeesy and DePinho, 2002). De fet, tot i els grans avenços que hi ha hagut els darrers anys en el coneixement de les bases moleculars d'aquesta malaltia (Jones et al., 2008; Maitra and Hruban, 2008), a nivell clínic pràcticament no s'ha aconseguit cap millora des de l'establiment de la gemcitabina com a tractament d'elecció (Burris et al., 1997).

En aquest sentit, s'ha descrit una subpoblació tumoral de *cancer stem cells* (CSC) que contribueix tant a la progressió i el creixement tumoral com a la disseminació metastàtica i que és responsable, almenys parcialment, de l'aparició de resistència als tractaments químic i radioterapèutics convencionals (Clarke et al., 2006). Els primers treballs on es van descriure les CSC en PDAC van ser publicats gairebé en paral·lel i definien aquesta subpoblació per l'expressió dels marcadors de membrana CD44, CD24 i ESA (Li et al., 2007) o CD133 (Hermann et al., 2007), tot i que posteriorment s'han emprat altres marcadors per caracteritzar aquesta subpoblació (Abel and Simeone, 2013).

El paper de les CSC en el manteniment del tumor i la formació de metàstasis, així com la seva elevada resistència als tractaments, fa que aquestes siguin considerades una bona diana terapèutica per al tractament del PDAC. Per aquest motiu, en aquest treball s'ha aïllat i caracteritzat la subpoblació de CSC en models *in vitro* i *in vivo* de PDAC, per tal d'assajar l'efecte que tenen diferents tractaments sobre aquesta subpoblació, ja que la seva eliminació podria evitar l'aparició de resistències i posteriors recidives.

1.1. Aïllament i caracterització de subpoblacions cel·lulars amb propietats de *cancer stem cells* i detecció d'aquestes en models ortotòpics de càncer de pàncrees humà

1.1.1. Separació mitjançant marcadors de superfície

Per tal de caracteritzar la subpoblació de CSC, es van analitzar per citometria de flux els nivells d'expressió dels marcadors de membrana CD44, CD24 i CD133, prèviament descrits en PDAC (Hermann et al., 2007; Li et al., 2007), en un panell de línies cel·lulars tumorals pancreàtiques (Panc-1, BxPC3, NP-29, CP3, CP15T i CP15A). Les línies cel·lulars Panc-1 i BxPC3 són comercials, mentre les línies NP-29, CP3, CP15T i CP15A van ser establertes a partir de fragments d'adenocarcinomes pancreàtics humans implantats en ratolins atímics i perpetuats com a xenoempelts, les tres darreres generades recentment en projectes anteriors del grup de recerca (Tesi Sandra Pérez).

A les línies cel·lulars analitzades (Figura 13), al voltant d'un 75% de les cèl·lules expressen CD44, excepte la línia CP3 que presenta menys d'un 1% de cèl·lules positives per aquest marcador. En canvi, menys d'un 5% de les cèl·lules expressen CD24, excepte la línia Panc-1, que té un 31% de cèl·lules CD24⁺. En conseqüència, menys d'un 5% de les cèl·lules coexpressen els marcadors CD44 i CD24, excepte a la línia Panc-1. D'altra banda, segons l'expressió de CD133 es poden dividir les línies cel·lulars en dos grups, un amb una proporció elevada de cèl·lules CD133⁺, superior al 50%, format per NP-29, CP15T i CP15A, i un altre amb menys d'un 1% de cèl·lules CD133⁺, on s'inclouen les línies Panc-1, BxPC3 i CP3.

Sorprenentment, la proporció de cèl·lules que expressen els diferents marcadors de CSC de membrana, especialment CD44 i CD133, és força superior a la descrita anteriorment, valorada en menys d'un 5% de la població tumoral total (Clarke et al., 2006; Hermann et al., 2007; Li et al., 2007). De totes maneres, més recentment s'ha publicat un model matemàtic que proposa que la proporció de CSC en un tumor podria ser qualsevol i que aquesta estaria estretament relacionada amb la seva capacitat tumorigènica (Johnston et al., 2010).

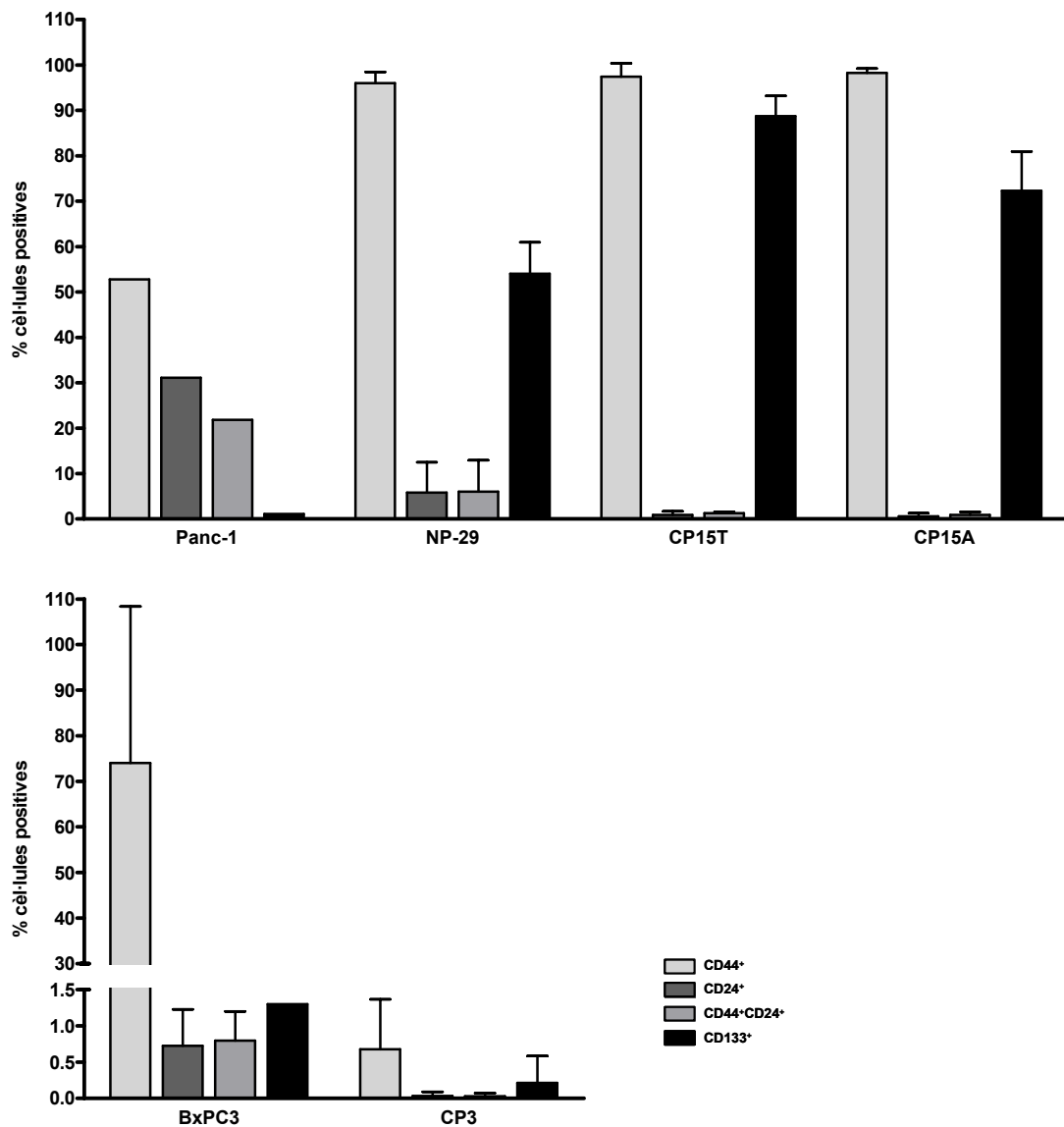


Figura 13. Nivells d'expressió dels marcadors de membrana de CSC en un panell de línies cel·lulars tumorals pancreàtiques. Determinació mitjançant citometria de flux del percentatge d'expressió dels marcadors CD44, CD24 i CD133, representat com a mitjana ($n=3$) \pm desviació estàndard.

D'altra banda, no sembla que les línies cel·lulars CP3, CP15T i CP15A, que han estat establertes recentment, conservin una major expressió de marcadors de CSC de superfície. En aquest sentit, s'ha descrit que el percentatge de CSC pot variar de forma significativa entre pacients amb un mateix tipus de tumor (Tirino et al., 2013).

Per tal de validar l'ús d'aquests marcadors de membrana com a marcadors de CSC a les nostres línies cel·lulars, es va analitzar a la línia

CP15T la sensibilitat de les diferents subpoblacions al tractament amb gemcitabina, tractament d'elecció en PDAC al què s'ha descrit que són resistents les CSC (Abel and Simeone, 2013). Així, es van separar les cèl·lules mitjançant citometria de flux segons l'expressió dels marcadors CD44, CD24 o CD133. Les diferents subpoblacions es van tractar amb gemcitabina durant 72h i es va mesurar l'efecte del fàrmac sobre la viabilitat cel·lular. La IC50 (dosi que disminueix la viabilitat cel·lular al 50%) de les diferents subpoblacions és similar a la del control, la població total sense seleccionar (Taula 18). La única subpoblació amb un lleuger augment de la IC50 és la CD44⁺. Per tant, en les condicions assajades, sembla que l'expressió de cap d'aquests marcadors per separat es pot relacionar amb una major resistència al tractament amb gemcitabina en aquestes línies.

	IC50 (nM)
Control	26,49 ± 1,08
CD44 ⁺ ⁽¹⁾	35,37 ± 5,82
CD24 ⁻	25,27 ± 3,90
CD24 ⁺	24,38 ± 2,67
CD133 ⁻	24,57 ± 1,55
CD133 ⁺	21,35 ± 1,63

Taula 18. Sensibilitat al tractament amb gemcitabina de les subpoblacions de CSC. Les diferents subpoblacions de la línia cel·lular CP15T, obtingudes mitjançant un citòmetre de flux separador, es van sembrar i 24 hores després es van tractar amb dosis creixents de gemcitabina. 72 hores després es va determinar la viabilitat cel·lular mitjançant un assaig MTT i es va calcular la IC50 (nM). Els resultats són la mitjana (n=3) ± error estàndard. ⁽¹⁾La subpoblació CD44⁻ no va poder ser analitzada degut al baix percentatge de la població total.

En paral·lel als assajos *in vitro*, es va analitzar l'efecte sobre les CSC del tractament amb gemcitabina en models *in vivo* de PDAC. Es van emprar tres models, CP12, CP13 i CP15, d'una plataforma de tumors ortotòpics generats al grup de recerca a partir de fragments quirúrgics de pacients amb PDAC (Perez-Torras et al., 2011). Aquests models es mantenen en successives generacions de ratolins atímics mitjançant la implantació ortotòpica de fragments de tumor. Aquest experiment, però, es va realitzar alhora en tumors ortotòpics generats per implantació de fragments de tumor i en tumors formats a partir de la injecció de suspensions cel·lulars obtingudes de la digestió dels tumors, per tal de posar a punt futurs

experiments que requereixin la injecció de suspensions cel·lulars de subpoblacions separades prèviament per citometria de flux. Així, quan es va confirmar per palpació abdominal la presència de tumor a tots els ratolins, es va iniciar un tractament de 4-5 setmanes amb gemcitabina administrada per via intraperitoneal a raó de 160mg/Kg un cop per setmana. Al final del tractament es va analitzar per citometria de flux l'expressió dels marcadors de membrana CD44, CD24 i CD133 (Figura 14). Els tumors control, tractats amb salí, presenten una baixa proporció, inferior al 5%, de cèl·lules positives per als diferents marcadors, excepte al model CP15, on hi ha un major percentatge de cèl·lules CD44⁺ (un 43% i un 46% en els fragments establerts a partir de fragments o digerits tumorals, respectivament) i CD133⁺ (un 34% i un 67% en els fragments establerts a partir de fragments o digerits tumorals, respectivament).

Si es comparen les dades obtingudes al model CP15 amb les de les línies CP15T i CP15A, derivades d'aquest model, s'observa que en tots dos casos es manté un percentatge elevat d'expressió dels marcadors CD44 i CD133, tot i que la proporció d'aquestes subpoblacions és menor al model ortotòpic. En aquest sentit, diverses publicacions alerten de les possibles variacions que es poden trobar en l'expressió d'aquests marcadors segons el tipus de mostra amb què es treballa (mostres de tumor, cultius primaris, línies cel·lulars), del mètode de disgregació emprat (enzimàtica o mecànica), ja que la degradació proteolítica de les proteïnes de membrana pot alterar el procés de selecció, o fins i tot del protocol emprat per al marcatge de les cèl·lules o els ajustos aplicats al citòmetre de flux per al seu anàlisi (Clarke et al., 2006; Rosen and Jordan, 2009; Tirino et al., 2013).

En el model CP12 (Figura 14a) no s'observen diferències significatives en el percentatge de cèl·lules que expressen els diferents marcadors de CSC després del tractament, només una tendència de CD24 a disminuir i de CD44 i CD133 a augmentar. En aquest cas només es van analitzar tumors establerts a partir de fragments tumorals, ja que els digerits del tumor CP12 injectats al pàncrees no van donar lloc a tumors. En el model CP13 establert a partir de fragments tumorals (Figura 14b) hi ha un increment significatiu de cèl·lules CD44⁺ després de tractar els ratolins amb gemcitabina, que passa d'un 1,22% a un 3,29%, mentre la resta de marcadors tenen tendència a disminuir, de forma significativa el CD133. En

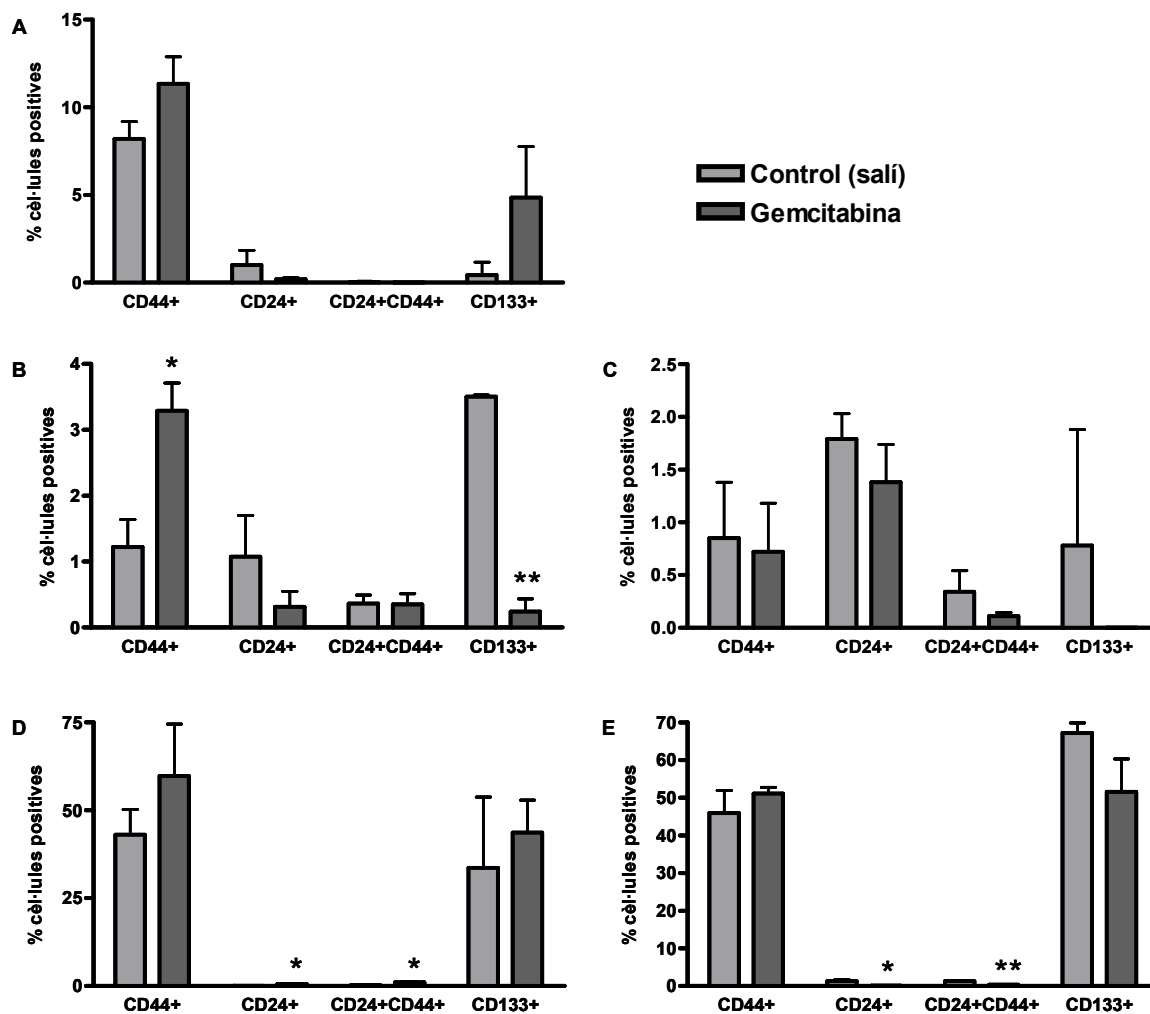


Figura 14. Efecte del tractament de models tumorals pancreàtics amb gemcitabina sobre l'expressió de marcadors de membrana de CSC. En gris clar el grup control tractat amb salí, en gris fosc el grup tractat amb gemcitabina (160mg/Kg durant 4-5 setmanes). Determinació mitjançant citometria de flux del percentatge d'expressió dels marcadors CD44, CD24 i CD133, representat com a mitjana (n=2-3) ± desviació estàndard, a CP12 fragment (A), CP13 fragment (B), CP13 digerit (C), CP15 fragment (D) i CP15 digerit (D). Estadística respecte el grup control, essent * p<0,05 i ** p<0,01.

canvi els tumors establerts a partir de digerits de CP13 (Figura 14c) mostren una tendència a disminuir el percentatge de cèl·lules que expressen els diferents marcadors després del tractament. Finalment, als models CP15 (Figura 14 d i e) hi ha diferències significatives en el percentatge de cèl·lules CD24⁺ i CD44⁺CD24⁺. Als tumors establerts a partir de fragments l'expressió d'aquests marcadors augmenta (de forma significativa per CD24⁺ i CD44⁺CD24⁺), mentre als establerts a partir de digerits tumorals aquesta disminueix (p<0,05 per CD24⁺ i p<0,01 per

CD44⁺CD24⁺). En els dos casos CD44 té tendència a augmentar i CD133 té un comportament diferent a cada model.

Per tant, la subpoblació tumoral CD44⁺ sembla l'única que té tendència a incrementar de forma gairebé generalitzada després del tractament amb gemcitabina, el què indicaria que és resistent a aquest tractament.

D'altra banda, es va voler comprovar si l'expressió d'aquests marcadors és estable en cultiu després de la separació mitjançant citometria de flux, ja que podria explicar la falta de diferències de sensibilitat a la gemcitabina de les diferents subpoblacions *in vitro*. Així, es van aïllar amb un citòmetre de flux separador diferents subpoblacions cel·lulars segons l'expressió dels marcadors CD44, CD24 i CD133. De la mateixa manera que per l'assaig de la sensibilitat a la gemcitabina de les diferents subpoblacions, les cèl·lules seleccionades es van mantenir en cultiu durant 48 hores en plaques i medi de cultiu estàndard abans d'analitzar per citometria de flux l'expressió dels marcadors (Figura 15). Després de la selecció, l'expressió dels marcadors CD24 i CD133 tendeix a mantenir-se, mentre s'observa una clara reversió de les cèl·lules CD44⁻, que després de 48 hores de cultiu expressen el marcador CD44 en més d'un 90% de les cèl·lules, nivells similars als de la població original.

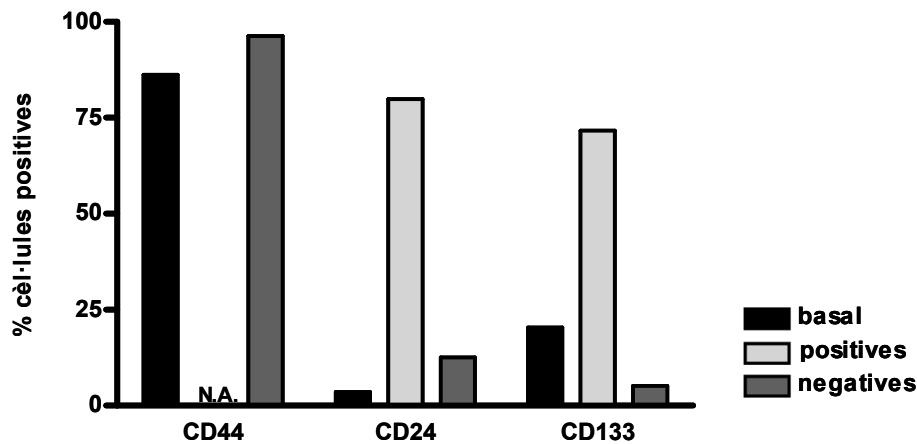


Figura 15. Anàlisi de l'expressió dels marcadors de superfície de CSC en subpoblacions mantingudes en cultiu. Les diferents subpoblacions de la línia cel·lular CP15T, obtingudes mitjançant un citòmetre de flux separador, es van mantenir en cultiu durant 48 hores i després es va determinar mitjançant citometria de flux el percentatge d'expressió dels marcadors CD44, CD24 i CD133. N.A.: no avaluable.

Els canvis en l'expressió de CD44 a membrana detectats en aquest experiment podrien ser deguts a un intercanvi de marcador entre la membrana cel·lular i el citoplasma, ja que s'ha descrit en altres models tumorals que CD44 no es localitza exclusivament a membrana (Minardi et al., 2012). Per aquest motiu, es va realitzar una tinció immunocitoquímica per tal de determinar la localització cel·lular d'aquest marcador (Figura 16). Les imatges de microscòpia confocal obtingudes mostren que la proteïna CD44 es troba tant a la membrana cel·lular com al citoplasma, fet que podria explicar la reversió del marcador després de la selecció.

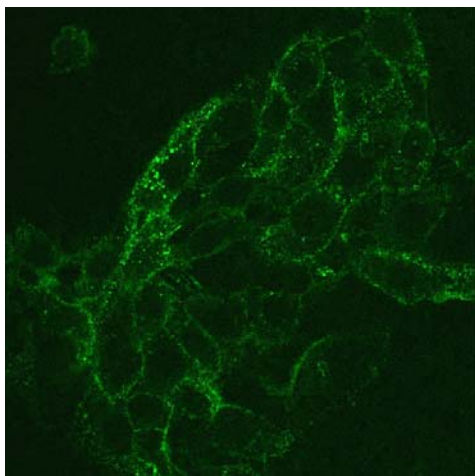


Figura 16.
Immunolocalització del marcador de CSC CD44.
La tinció de CD44 (de color verd) es va realitzar a la línia cel·lular CP15T. Imatge de microscòpia de fluorescència (600x).

D'altra banda, diferents estudis apunten a l'existència d'un fenotip *stem* transitòri a les cèl·lules tumorals (en anglès *stemness*) i, per tant, a una certa plasticitat entre cèl·lules CSC i no-CSC. Aquesta plasticitat fenotípica podria dependre de canvis epigenètics regulats per components del microambient, com cèl·lules estromals, vasos sanguinis, matriu extracel·lular, factors de creixement, citoquines o condicions d'hipòxia. En aquest sentit, s'ha relacionat l'adquisició del fenotip *stem* amb el procés de EMT (Dembinski and Krauss, 2009; Rosen and Jordan, 2009; Sugihara and Saya, 2013).

Per tant, el conjunt de resultats obtinguts no van permetre establir un marcador de superfície adient per aïllar i caracteritzar la subpoblació de CSC en aquests models. De fet, tot i que l'ús de marcadors de CSC de superfície està àmpliament acceptat per a malalties hematològiques, en tumors sòlids la situació és totalment diferent i és tema de debat la idoneïtat de l'ús dels marcadors de superfície per a la caracterització de les CSC (Tirino et al.,

2013), en part perquè aquests marcadors no s'han definit en base a un coneixement en profunditat del paper d'aquestes molècules en la biologia de les CSC de cada tumor (Clevers, 2011). Per tot això, es va substituir l'ús de marcadors de superfície per l'enriquiment de cultius en CSC mitjançant el cultiu de tumorsferes.

1.1.2. Enriquiment de cultius cel·lulars per generació de tumorsferes

Un mètode alternatiu a l'ús de marcadors de superfície per a l'aïllament i caracterització de les CSC freqüentment emprat per a l'estudi de l'efecte de fàrmacs sobre aquesta subpoblació és l'enriquiment de cultius cel·lulars mitjançant la generació de tumorsferes. Aquest mètode es basa en la capacitat de les CSC per créixer en cultiu en absència d'ancoratge formant uns agregats compactes anomenats tumorsferes, que s'ha descrit que conserven les principals característiques de les CSC (Gaviraghi et al., 2011; Gou et al., 2007).

Prèviament es van realitzar proves amb diferents tècniques de cultiu de tumorsferes, com el cultiu tridimensional en una matriu d'agarosa o sobre plaques de cultiu recobertes amb metacrilat de poli-2-hidroxietil (poly-hema) per evitar l'adhesió cel·lular (Yeates and Powis, 1997). De totes maneres, aquests mètodes es van descartar, ja que l'agarosa ha de ser retirada per a assajos posteriors, com l'anàlisi amb tècniques de citometria de flux, i el recobriment amb poly-hema és difícil de reproduir.

Així, per tal de caracteritzar les CSC presents en un panell de línies cel·lulars pancreàtiques i estudiar l'efecte de diferents tractaments sobre aquesta subpoblació, es van generar tumorsferes *in vitro* emprant per al seu manteniment plaques de cultiu tractades per evitar l'adherència de les cèl·lules i un medi de cultiu que no conté sèrum suplementat amb factors que afavoreixen el creixement de les *stem cells* (Cao et al., 2011; Su et al., 2011). El protocol es troba detallat a l'apartat de materials i mètodes. La densitat cel·lular és un paràmetre important a tenir en compte per a l'obtenció de les tumorsferes. Aquesta ha de ser prou baixa per impedir la formació d'agregats, però alhora l'eficiència de formació de tumorsferes es veu reduïda dràsticament a densitats molt baixes, on no poden actuar

factors autocrins i paracrins alliberats per les cèl·lules (Pastrana et al., 2011). Per aquest motiu, el manteniment de les tumorsferes i els diferents assajos posteriors es van realitzar a baixa densitat cel·lular (5.000 cèl·lules/ml).

En primer lloc es va analitzar la capacitat d'aquestes línies cel·lulars per formar tumorsferes. Tal com mostra la figura 17, d'entre les línies cel·lulars emprades, totes excepte NP-9 i Panc-1 tenen capacitat per formar tumorsferes que poden ser mantingudes en cultiu durant passatges successius. En les condicions de cultiu descrites, la línia cel·lular BxPC3 forma un baix número de tumorsferes però de gran mida (d'un diàmetre de $28,27 \pm 7,94 \mu\text{m}$) i compactes i les línies cel·lulars CP15T i CP15A formen un número elevat de tumorsferes però de menor diàmetre ($11,17 \pm 4,78 \mu\text{m}$ i $15,67 \pm 8,20 \mu\text{m}$, respectivament). En canvi, NP-29 forma unes tumorsferes molt menys compactes i petites ($5,66 \pm 1,69 \mu\text{m}$). D'altra banda, NP-9 i Panc-1 formen uns agregats cel·lulars poc compactes on les cèl·lules pràcticament no es divideixen i, el cas de NP9, acaben morint. Aquests resultats contrasten amb diverses publicacions on es descriu la formació de tumorsferes a partir de la línia Panc-1 (Gaviraghi et al., 2011; Gou et al., 2007). De totes maneres, les diferències podrien ser degudes a canvis en les condicions de cultiu. En tot cas, no sembla que es pugui establir una relació directa entre els nivells d'expressió dels diferents marcadors de CSC de membrana i la capacitat per formar tumorsferes. Aquesta falta de relació ja ha estat descrita anteriorment en PDAC (Gaviraghi et al., 2011) i reforça l'ús de tumorsferes vers al de marcadors de superfície per a l'estudi de la sensibilitat de les CSC a fàrmacs antitumorals.

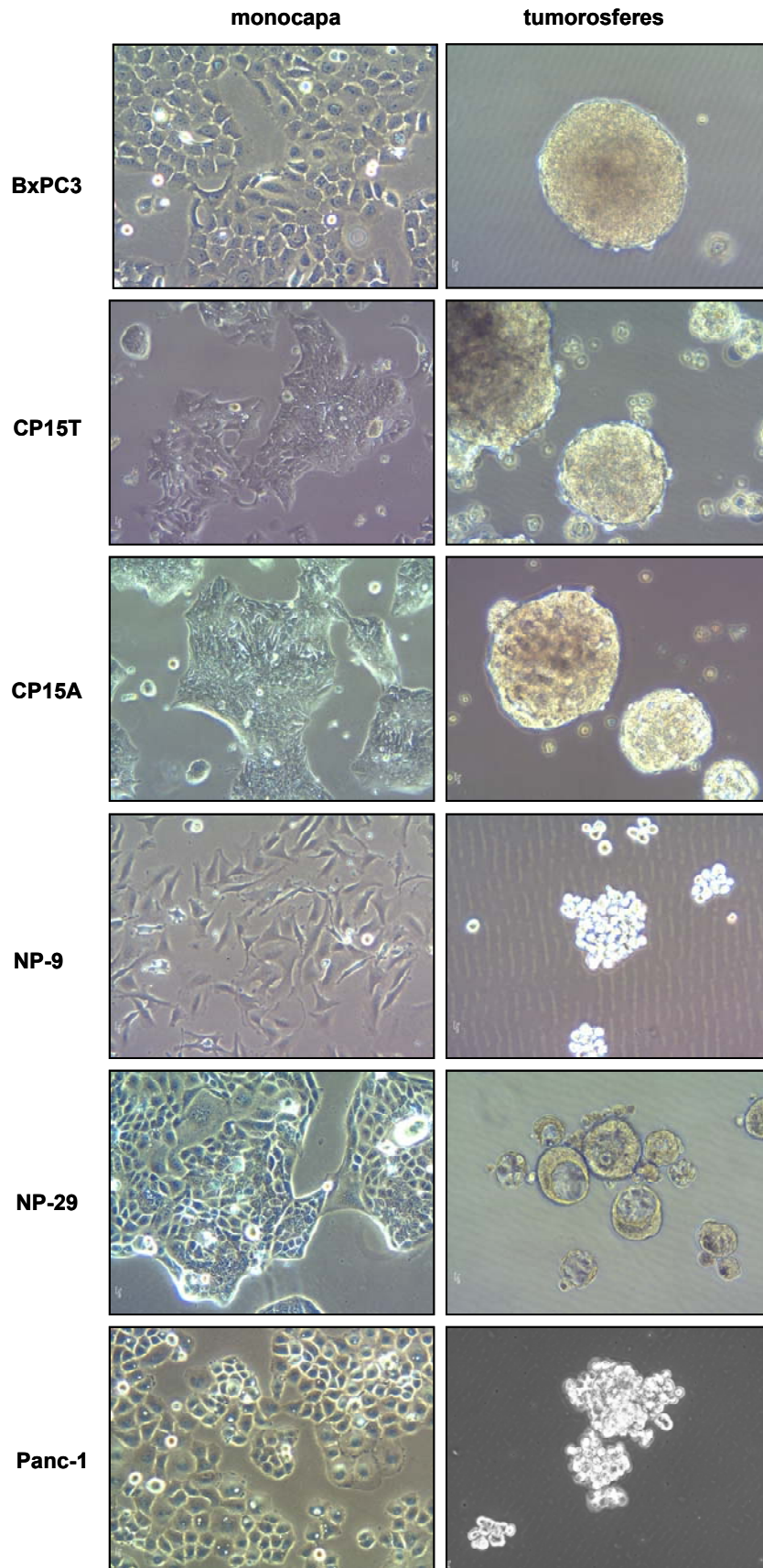


Figura 17. Obtenció de tumorsferes a partir de línies cel·lulars tumorals pancreàtiques. Imatges de microscopia de contrast de fase (barra d'escala 5 μ m) de cèl·lules sembrades en condicions de cultiu estàndard (monocapa) o com a tumorsferes. Les imatges corresponen a tumorsferes mantingudes entre els passos 3 i 6.

A continuació es va analitzar si els cultius de tumorsferes complien amb algunes de les principals característiques que defineixen les CSC. Tenint en compte els resultats anteriors, es van seleccionar les línies cel·lulars BxPC3, CP15T i NP-29 per a la caracterització de les tumorsferes.

Una de les característiques que defineix les CSC és la divisió asimètrica, que dóna lloc a una CSC i a una altra cèl·lula més diferenciada (Clarke et al., 2006). Per tal de confirmar aquesta propietat, es va analitzar la capacitat de les tumorsferes per diferenciar-se en condicions de cultiu estàndard (Figura 18). Així, quan les tumorsferes de les tres línies cel·lulars analitzades són mantingudes en plaques de cultiu que permeten la seva adhesió i amb un medi de cultiu estàndard, les cèl·lules creixen adherides al substrat i recuperen la seva morfologia epitelial característica.

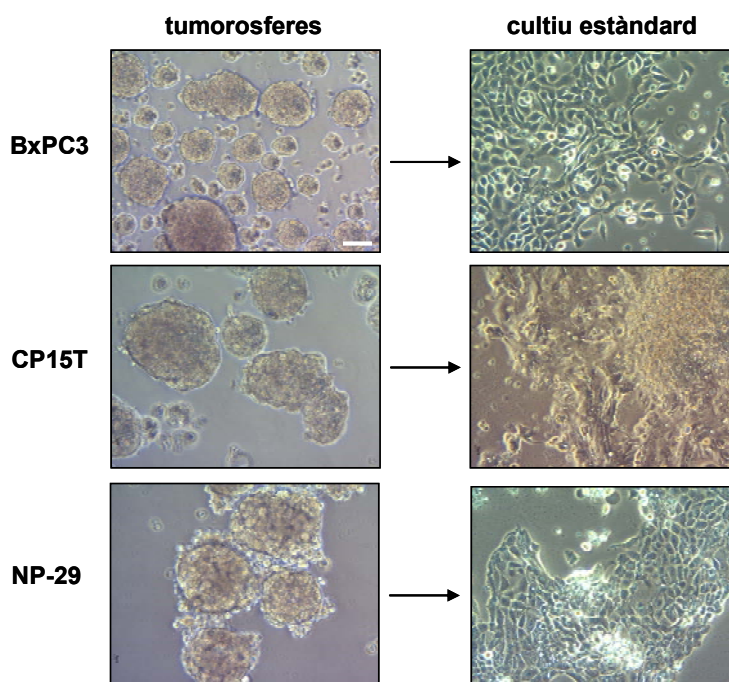


Figura 18. Diferenciació de tumorsferes en medi de cultiu estàndard. Imatges de microscopia de contrast de fase (barra d'escala 5µm) de tumorsferes de 7 dies (passe 1) i les mateixes tumorsferes mantingudes en condicions de cultiu estàndard durant 2 dies.

D'altra banda, les CSC també poden ser definides per la seva capacitat per recapitular la generació del tumor (Clarke 2006). Per tal de comprovar el potencial tumorigènic de les tumorsferes, es va comparar el temps d'aparició i la morfologia dels tumors formats a partir de tumorsferes amb la dels generats a partir de monocapes. Cultius de monocapa i tumorsferes de la línia cel·lular CP15A es van disgregar amb tripsina i es van injectar 10^4

cèl·lules al pàncrees de ratolins atímics. A la figura 19a es mostra el temps d'aparició dels tumors obtinguts. Així, els tumors formats a partir de tumorosferes apareixen abans que els generats a partir de monocapes, el què confirma el major potencial tumorigènic de les CSC. D'altra banda, la morfologia dels tumors al final de l'experiment, després de 67 dies, és similar entre monocapa i tumorosferes, amb una estructura glandular força indiferenciada i poca presència d'estroma (Figura 19b).

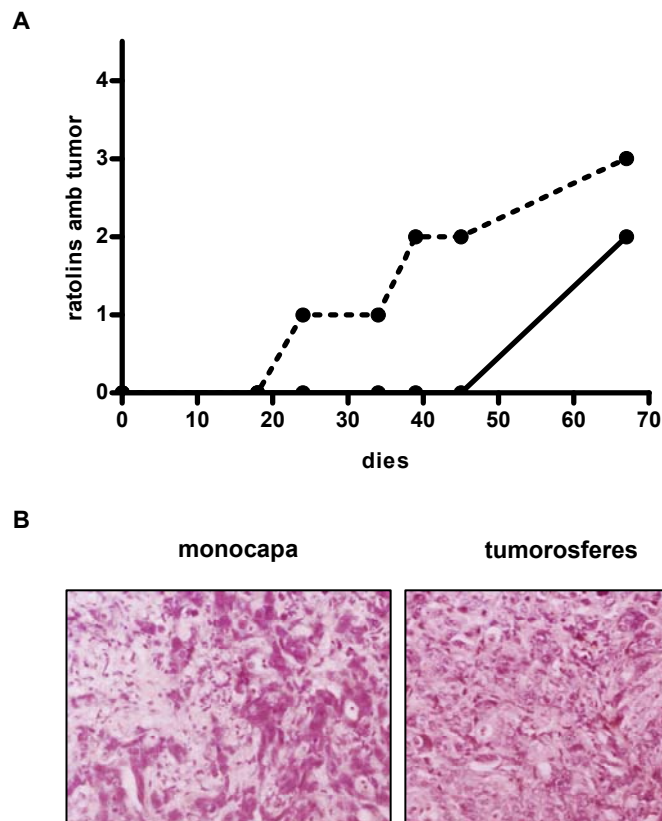


Figura 19. Obtenció de tumors a partir de tumorosferes. Es van injectar al pàncrees de ratolins atímics 10^4 cèl·lules obtingudes per disgregació de cultius en monocapa o tumorosferes de la línia cel·lular CP15A ($n=5$) i es determinar el temps d'aparició dels tumors. La línia contínua representa els tumors generats a partir de monocapa i la discontinua a partir de tumorosferes (A). Al final de l'experiment, 67 dies després, es van sacrificar els animals i els tumors es van incloure en parafina per a la posterior tinció amb hematoxilina-eosina. Microfotografies (200x) (B).

A més, les CSC es caracteritzen per trobar-se en un estat de quiescència, que podria explicar la resistència a molts dels tractaments convencionals (Borst, 2012; Dembinski and Krauss, 2009). A fi de demostrar un arrest del cicle cel·lular a les tumorsferes, es va comparar el seu perfil de cicle cel·lular amb el del cultiu estàndard en monocapa. A la figura 20 es poden veure els resultats obtinguts. Les tumorsferes de BxPC3 i CP15T presenten un clar augment de la fase G0/G1. En canvi, a NP-29 només hi ha un lleuger augment de G0/G1. Cal destacar que el cultiu de NP-29 en monocapa té una elevada proporció de cèl·lules a la fase G0/G1.

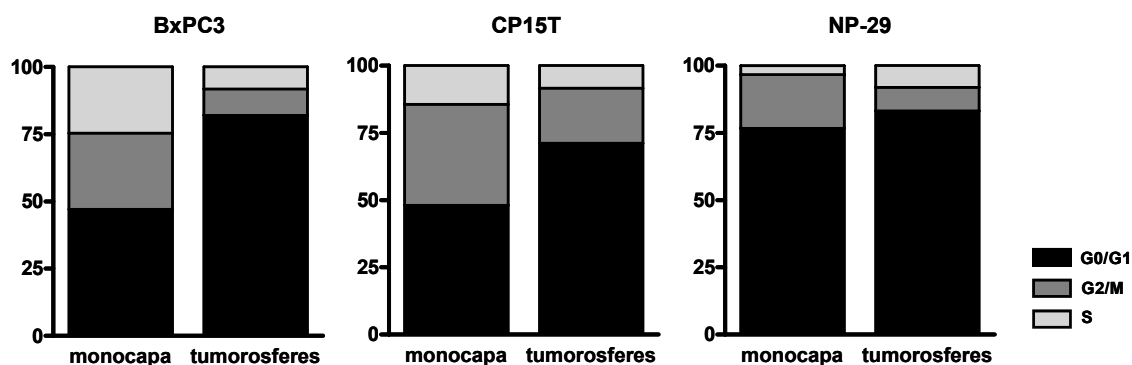


Figura 20. Perfil de cicle cel·lular. Comparació del perfil de cicle cel·lular de monocapa i tumorsferes tenyides amb iodur de propidi i analitzades amb un citòmetre de flux.

Finalment, s'ha descrit que les CSC són resistents al tractament amb gemcitabina, fàrmac d'elecció en els pacients amb PDAC (Abel and Simeone, 2013). Així, es va comparar la sensibilitat de les tumorsferes al tractament amb gemcitabina, respecte a la monocapa. Per al càlcul de la viabilitat cel·lular es va realitzar un assaig WST-8, que mesura l'activitat mitocondrial de cèl·lules en suspensió. Tal com mostra la figura 21, a línies cel·lulars BxPC3 i CP15T s'observa una clara resistència al tractament per part de les tumorsferes, a diferència de la monocapa, que és sensible al tractament amb aquest fàrmac. En totes dues línies cel·lulars, la gemcitabina no aconsegueix eliminar totes les tumorsferes i hi ha un augment de la IC50 estadísticament significatiu ($p < 0,001$ a BxPC3 i $p < 0,01$ a CP15T). En el cas de la línia cel·lular NP-29, els assajos dosi-resposta presenten una gran variabilitat, amb valors de IC50 a les tumorsferes que es troben entre 1,5 i 20nM, que no permeten treure conclusions.

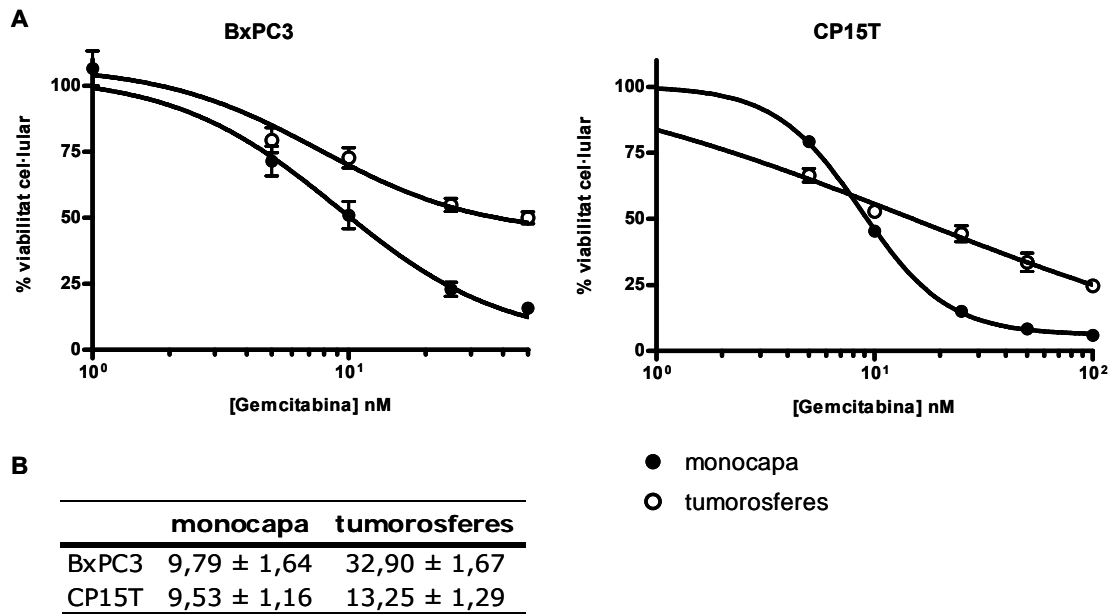


Figura 21. Sensibilitat de monocapa i tumorosferes al tractament amb gemcitabina. Monocapa i tumorosferes de les línies cel·lulars BxPC3 i CP15T es van sembrar amb dosis creixents de gemcitabina i després de 72 hores es va mesurar la viabilitat cel·lular mitjançant un assaig WST-8. Comparació de les corbes dosi-resposta (A) i la IC50 (nM) (B) obtingudes, representades com la mitjana (n=3) ± desviació estàndard.

Per tant, els resultats dels assajos realitzats ens van permetre confirmar que les tumorosferes de BxPC3 i CP15T compleixen amb les principals característiques descrites per la subpoblació de CSC. En canvi, els resultats obtinguts amb la línia NP-29, que forma unes tumorosferes petites i poc compactes, força diferents a les generades per les línies BxPC3 i CP15T, posen en dubte el fenotip CSC de les seves tumorosferes. Per aquest motiu, els posteriors experiments d'anàlisi de la sensibilitat a diferents tractaments es van realitzar comparant la resposta de cultius en monocapa i tumorosferes de les línies BxPC3 i CP15T.

1.2. Sensibilitat de les tumorosferes a tractaments antitumorals

La majoria d'estratègies per al tractament del PDAC estan dirigides a reduir la massa tumoral, formada majoritàriament per cèl·lules tumorals diferenciades, i no aconsegueixen eliminar les CSC, responsables de l'aparició de metàstasis i recurrències. Per tant, el desenvolupament de

teràpies que aconseguixin eliminar també aquesta subpoblació tumoral sembla que podria millorar els resultats obtinguts fins ara en el tractament dels pacients amb PDAC (Abel and Simeone, 2013).

1.2.1. Tractament de tumorosferes amb fàrmacs dirigits contra receptors de factors de creixement

Les vies de senyalització dependents de receptors de factors de creixement es troben freqüentment alterades en PDAC. Aquestes estan involucrades en el creixement autònom de les cèl·lules tumorals, mitjançant un *loop* autocrí que afavoreix la seva proliferació (Bardeesy and DePinho, 2002). En aquest sentit, el receptor IGF-IR es troba freqüentment sobreexpressat en PDAC i s'ha relacionat amb resistència a la quimioteràpia, ja que indueix supervivència cel·lular i progressió del cicle cel·lular (Beltran et al., 2009; King and Wong, 2012). A més, s'ha descrit que EGFR i la seva via de senyalització també es troben freqüentment sobreexpressats en PDAC i s'ha relacionat aquest fet amb un mal pronòstic (Papageorgio and Perry, 2007; Ueda et al., 2004).

D'altra banda, publicacions recents han relacionat aquests receptors amb la regulació de les CSC. Concretament, s'ha descrit en diferents tipus de tumors un *crossstalk* entre el receptor IGF-IR i les vies de senyalització relacionades amb el desenvolupament expressades a CSC, com Wnt, Notch, Nanog o Sox2, que afavoreix la formació de les tumorosferes (Chang et al., 2013; Singh et al., 2012). A més, EGFR coopera amb la via de hedgehog durant la formació i progressió del tumor cap a estadis invasius i metastàtics (Mimeault and Batra, 2010), així com en la capacitat per formar tumorosferes *in vitro* (Feng et al., 2012). Per tant, sembla que els receptors IGF-IR i EGFR poden ser considerats una bona diana terapèutica en PDAC, ja que la seva inhibició podria eliminar també la subpoblació de CSC resistent als tractaments convencionals.

Per aquest motiu, es va estudiar l'efecte de la inhibició de la via de senyalització d'IGF-IR sobre la subpoblació de CSC emprant el fàrmac NVP-AEW541, que és un inhibidor tirosina-quinasa d'aquest receptor que s'està emprant a nivell preclínic en el tractament del PDAC, així com altres tipus de tumors (Hewish et al., 2009; Moser et al., 2008). Així, es va comparar

l'efecte del tractament amb l'inhibidor NVP-AEW541 sobre cèl·lules mantingudes en monocapa o en forma de tumorsferes.

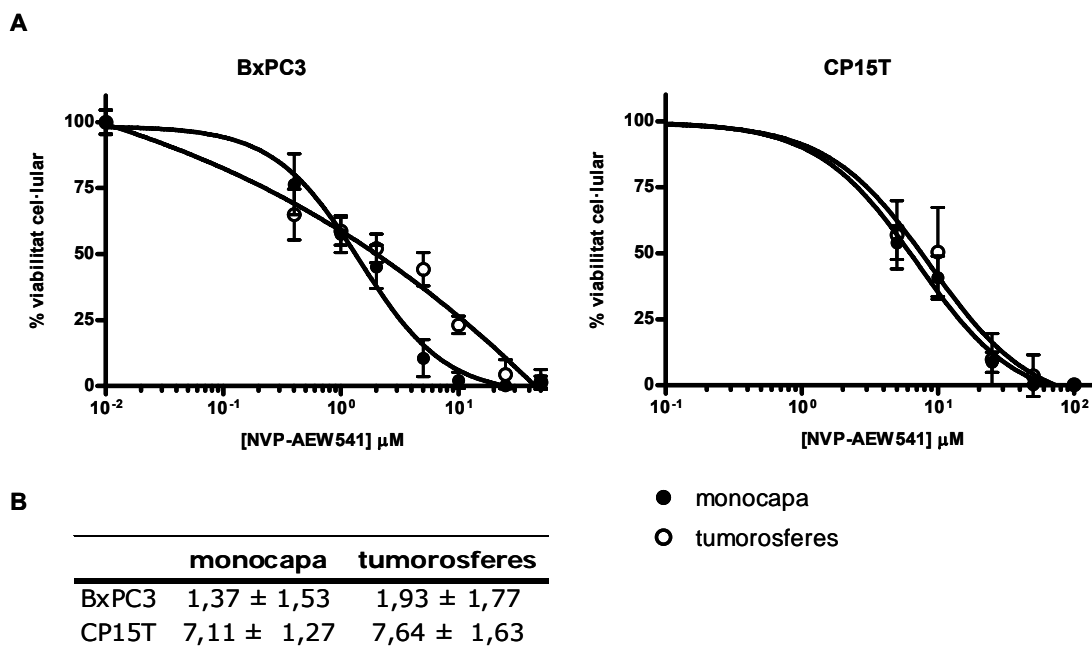


Figura 22. Sensibilitat de monocapa i tumorsferes al tractament amb NVP-AEW541. Monocapa i tumorsferes de les línies cel·lulars BxPC3 i CP15T es van sembrar amb dosis creixents de NVP-AEW541 i després de 72 hores es va mesurar la viabilitat cel·lular mitjançant un assaig WST-8. Comparació de les corbes dosi-resposta (A) i la IC50 (nM) (B) obtingudes, representades com la mitjana (n=3) ± desviació estàndard.

Tal com es mostra a la figura 22, tant la monocapa com les tumorsferes de les línies cel·lulars BxPC3 i CP15T són sensibles al tractament amb NVP-AEW541 de forma dosi-depenent, amb uns valors de IC50 similars entre monocapa i tumorsferes en totes dues línies. La línia cel·lular BxPC3 presenta una major sensibilitat al tractament que la línia CP15T, però en tots dos casos el fàrmac aconsegueix eliminar totes les cèl·lules.

A continuació es va analitzar l'efecte de la inhibició de la via de senyalització d'EGFR sobre les CSC, comparant l'efecte sobre monocapa i tumorsferes del tractament amb lapatinib. El lapatinib és un inhibidor tirosina-quinasa dual reversible dirigit contra els receptors EGFR i Her-2, aprovat per al seu ús en càncer de mama Her-2 positiu l'any 2007 i comercialitzat amb el nom de Tykerb®.

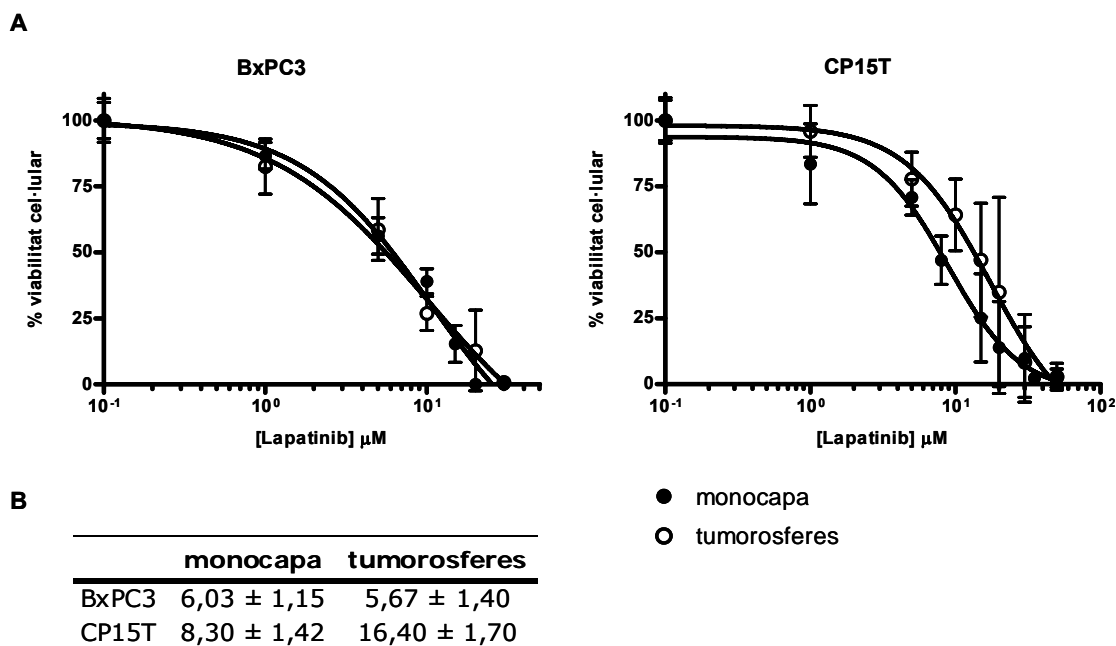


Figura 23. Sensibilitat de monocapa i tumorosferes al tractament amb lapatinib. Monocapa i tumorosferes de les línies cel·lulars BxPC3 i CP15T es van sembrar amb dosis creixents de lapatinib i després de 72 hores es va mesurar la viabilitat cel·lular mitjançant un assaig WST-8. Comparació de les corbes dosi-resposta (A) i la IC50 (nM) (B) obtingudes, representades com la mitjana (n=3-5) ± desviació estàndard.

Les corbes dosi-resposta obtingudes (Figura 23) mostren que, a les dues línies cel·lulars analitzades, monocapa i tumorosferes són sensibles al tractament amb lapatinib, el qual aconsegueix eliminar totes les cèl·lules. En aquest cas, la línia BxPC3 també és més sensible al tractament, sense diferències significatives en la IC50 de monocapa i tumorosferes, mentre a la línia CP15T les tumorosferes presenten una major IC50 ($p < 0,001$) que la monocapa. De totes maneres, el fàrmac aconsegueix eliminar totes les cèl·lules en els dos tipus de cultius, a una dosi propera a 50 μM.

Els resultats obtinguts posen de manifest el paper de les vies de senyalització d'IGF-IR i EGFR en el manteniment de les CSC i reforcen així la seva importància com a dianes terapèutiques en el tractament del PDAC. De fet, la sensibilitat de la subpoblació de CSC a la inhibició d'aquests receptors ha estat demostrada prèviament a nivell preclínic en altres tipus de tumors (Chang et al., 2013; Farnie et al., 2007; Feng et al., 2012; Li et al., 2008; Majumdar et al., 2010).

Finalment, es va voler analitzar si la sensibilitat al tractament amb aquests fàrmacs està directament relacionada amb el nivell d'expressió dels receptors diana. Per aquest motiu, es van comparar per western blot

l'expressió basal dels receptors IGF-IR, EGFR i Her-2 a monocapa i tumorosferes de BxPC3 i CP15T (Figura 24).

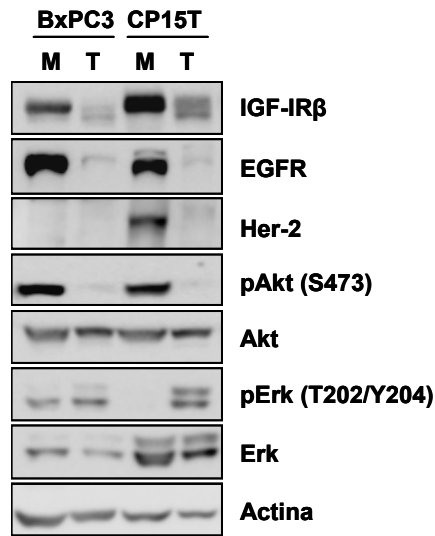


Figura 24. Nivells d'expressió de les proteïnes de les vies de senyalització de IGF-IR, EGFR i Her-2 a monocapa i tumorosferes. Determinació mitjançant western blot.

En totes dues línies s'observen uns menors nivells d'expressió dels receptors de membrana IGF-IR i EGFR, i de Her-2 per CP15T, a les tumorosferes. En el cas de BxPC3 l'expressió de Her-2 no es detecta per western blot. A més, també hi ha una disminució de la fosforilació d'Akt a les tumorosferes de totes dues línies. En canvi, respecte a la fosforilació d'Erk, a la línia BxPC3 hi ha un lleuger increment entre monocapa i tumorosferes, mentre a CP15T s'observa un clar augment. Per tant, els nivells d'expressió dels receptors diana del tractament amb NVP-AEW541 i lapatinib no semblen estar directament relacionats amb la sensibilitat a aquests fàrmacs. Aquest fet podria ser degut a què amb aquesta tècnica es detecta la proteïna total que conté la cèl·lula, sense diferenciar la que està situada a membrana, que és sobre la què estarien actuant aquests fàrmacs. De totes maneres, no s'ha establert una clara correlació entre els nivells d'expressió dels receptors i la sensibilitat als seus inhibidors, com demostren diverses publicacions (Cunningham et al., 2008; Ioannou et al., 2013; Mukohara et al., 2009). Finalment, cal tenir en compte que hi pot haver altres factors que condicionin la sensibilitat a aquest tipus de fàrmacs, com la quantitat de lligand present, alteracions en altres elements de la via

de senyalització situats *downstream* o fenòmens de *cross-talk* amb altres receptors (Ioannou et al., 2012; Jin and Esteva, 2008).

Diversos estudis han demostrat un fenomen de compensació entre les vies de senyalització d'IGF-IR i EGFR, el qual s'ha relacionat amb l'aparició de resistència als tractaments dirigits a bloquejar aquestes vies. Així, en inhibir un d'aquests receptors es dona una activació compensatòria de l'altra via, mecanisme responsable del fracàs de molts tractaments assajats. Per tant, la inhibició simultània de les dues vies de senyalització sembla una bona estratègia terapèutica (Adams et al., 2004; Guix et al., 2008).

En aquest sentit, en treballs anteriors del nostre grup de recerca (Tesi Anna Vidal) s'ha demostrat que la combinació de fàrmacs inhibidors dels receptors IGF-IR i EGFR té un efecte sinèrgic sobre la viabilitat cel·lular en línies cel·lulars tumorals pancreàtiques. Per aquest motiu, es va decidir comparar l'efecte de la combinació dels fàrmacs NVP-AEW541 i lapatinib a monocapa i tumorsferes.

En primer lloc es va analitzar l'efecte del tractament de les línies cel·lulars BxPC3 i CP15T mantingudes en un cultiu estàndard, en forma de monocapa, amb una dosi constant de NVP-AEW541 proper a la IC20 (concentració de fàrmac que redueix la viabilitat cel·lular en un 20%) i dosis creixents de lapatinib. Per tal de determinar la naturalesa de la interacció entre els dos fàrmacs es va calcular el coeficient d'interacció entre fàrmacs o CDI (*coefficient of drug interaction*), que permet classificar les interaccions en sinèrgiques, additives o antagoniques. El CDI es calcula aplicant la següent fórmula: $CDI = AB / (A * B)$. D'acord amb l'absorbància obtinguda per a cada grup de tractament, AB és l'absorbància de la combinació de fàrmacs en proporció al grup control i A i B són les absorbàncies dels tractaments individuals en proporció al grup control. D'aquesta manera, un $CDI > 1$ indica antagonisme, un $CDI = 1$ indica additivitat i $CDI < 1$ indica sinèrgia. Aquesta sinèrgia només pot ser considerada significativa si $CDI < 0,7$. Les corbes dosi-resposta obtingudes a la monocapa de BxPC3 i CP15T (Figura 25a) mostren un efecte sinèrgic significatiu del tractament combinat, tal com mostren els valors obtinguts de CDI menors a 0,7 (Figura 25c).

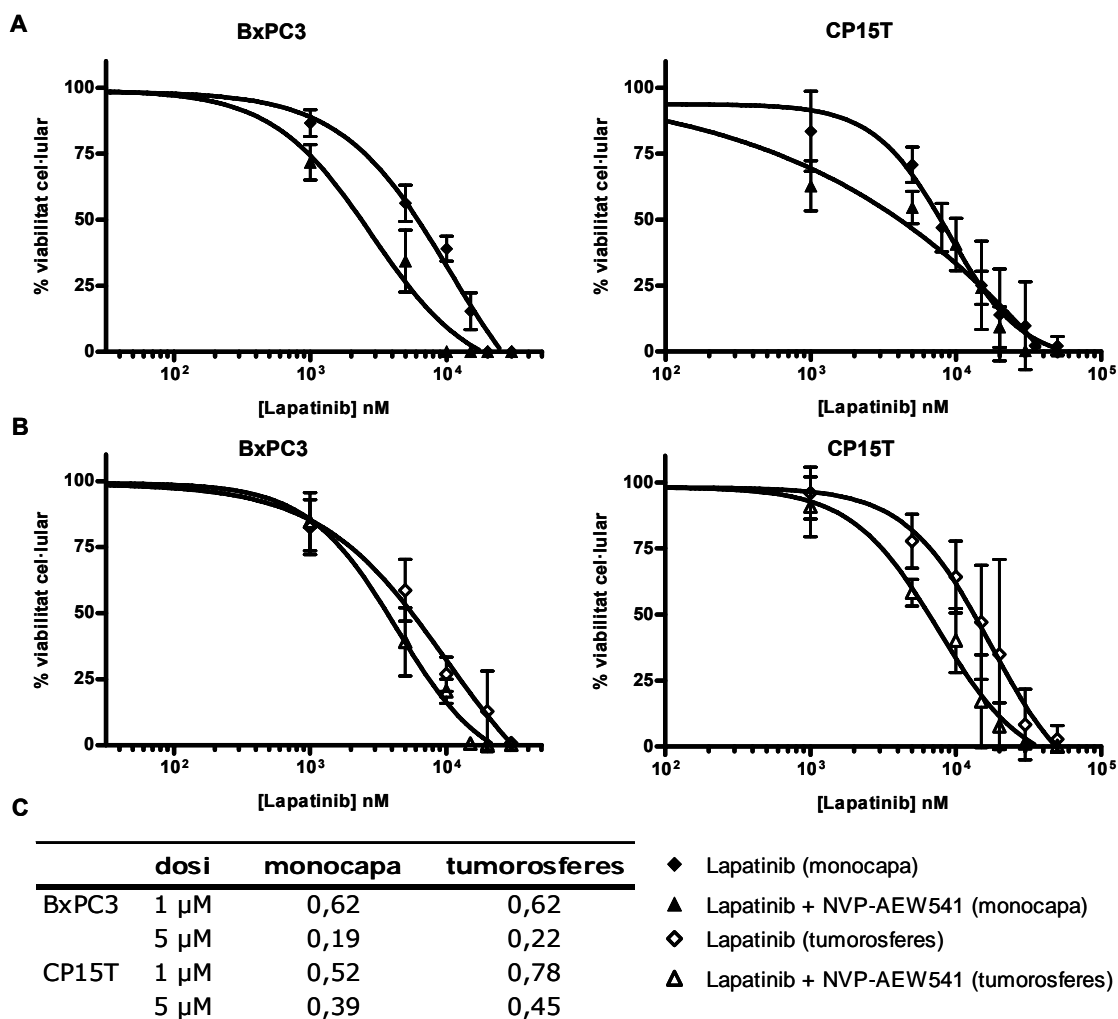


Figura 25. Sensibilitat de monocapa i tumorosferes al tractament combinat amb NVP-AEW541 i lapatinib. Monocapa i tumorosferes de les línies cel·lulars BxPC3 i CP15T es van sembrar amb una dosi fixa d’NVP-AEW541 propera a la IC20 i dosis creixents de lapatinib i després de 72 hores es va mesurar la viabilitat cel·lular mitjançant un assaig WST-8. Comparació de les corbes dosi-resposta de monocapa (A) i tumorosferes (B) i valors de CDI obtinguts (C), representats com la mitjana ($n=3-5$) \pm desviació estàndard.

Després es va analitzar l’efecte de la combinació d’aquests dos fàrmacs sobre les tumorosferes (Figura 25b) i es va observar que es manté la sinergia observada per a la monocapa, tot i tenir un menor efecte sobre les tumorosferes (Figura 25c).

Prèviament ja havia estat descrit un efecte sinèrgic reductor de la viabilitat cel·lular del tractament combinat amb inhibidors de les vies de senyalització d’IGF-IR i els receptor EGFR i Her-2 en PDAC (Ioannou et al., 2013) i en altres models, com càncer de mama i còlon (Browne et al., 2011; Esparis-Ogando et al., 2008; Kaulfuss et al., 2009), però fins ara no s’havia estudiat la seva acció sobre la subpoblació de CSC en PDAC. En

aquest sentit, els resultats obtinguts posen de manifest una potent sinèrgia del tractament combinat amb els fàrmacs NVP-AEW541 i lapatinib tant a la població total com a la subpoblació de CSC (article en preparació). Per tant, sembla que la inhibició simultània de les vies de senyalització d'IGF-IR, EGFR i Her-2 podria constituir una bona estratègia terapèutica per al tractament del PDAC, amb uns resultats prometedors *in vitro* que indiquen que la subpoblació de CSC és sensible a aquest tractament.

1.2.2. Sensibilitat a virus oncolítics de cultius de tumorsferes

La viroteràpia gènica consisteix en la combinació de la lisi de la cèl·lula tumoral mitjançant la replicació viral (viroteràpia) (Cross and Burmester, 2006) i la transferència de material genètic (teràpia gènica) mitjançant la introducció de gens terapèutics al genoma d'aquests virus (virus armats), per tal de potenciar la seva acció (Bhattacharyya and Lemoine, 2006). Aquesta sembla una bona estratègia per a l'eliminació de la subpoblació de CSC, ja que s'ha descrit que els adenovirus poden evadir alguns dels mecanismes de resistència que presenten les CSC. En aquest sentit, els adenovirus poden infectar les cèl·lules independentment de si la cèl·lula hoste està replicant o no, evitant així el principal mecanisme de resistència de les CSC, que és la quiescència. A més, la oncòlisi es dona també en cèl·lules resistents a l'apoptosi i els virus no es veuen afectats per les bombes d'èflux, que es troben sobreexpressades en CSC per tal d'eliminar els fàrmacs convencionals. Finalment, els adenovirus permeten l'addició de transgens terapèutics que potenciïn la seva acció sobre les CSC (Ribacka et al., 2008; Short and Curiel, 2009).

La proteïna p53 és un supressor tumoral que s'acumula a les cèl·lules en resposta a hipòxia, dany al DNA o estrès oncogènic i indueix arrest del cicle cel·lular, senescència o apoptosi, per tal de prevenir l'acúmulo de mutacions genètiques a les cèl·lules (Prabhu et al., 2012). La inactivació de p53 és gairebé universal en cèl·lules tumorals i, per aquest motiu, s'han desenvolupat diferents estratègies terapèutiques per a restablir la seva funció (Lane et al., 2010). Recentment, s'han publicat diferents estudis que relacionen p53 i la subpoblació tumoral de CSC, el què ha incrementat l'interès de p53 com a diana terapèutica. Així, p53 estaria implicada en el

manteniment d'un número constant de CSC mitjançant la divisió asimètrica i la pèrdua d'aquesta proteïna afavoriria l'autorenovació de les CSC (Allen et al., 2009; Cicalese et al., 2009; Meletis et al., 2006). En aquest sentit, s'ha descrit una regulació inversa i recíproca entre p53 i el marcador CD44 (Godar et al., 2008). A més, p53 està implicat en la repressió de més de 20 gens diana implicats en el manteniment de les CSC, com Nanog o els gens de resistència a fàrmacs *ABCB1* i *MDR1* (Riley et al., 2008). Per tant, la reintroducció de p53 mitjançant la infecció amb adenovirus oncolítics sembla una bona estratègia terapèutica antitumoral, que aconseguiria també reduir la subpoblació de CSC resistent als tractaments convencionals.

En aquest treball es va comparar l'efecte sobre monocapa i tumorsferes dels adenovirus ICOVIR5 i ICOVIR5-p53. El virus ICOVIR5 és un adenovirus oncolític, modificat per a garantir una replicació selectiva a les cèl·lules amb la via E2F-RB alterada, característica de les cèl·lules tumorals (Cascallo et al., 2007). ICOVIR5-p53, generat prèviament al nostre grup de recerca, és una modificació de l'ICOVIR5, armat amb el gen supressor *p53* sota el control del promotor MLP. Aquest fet permet l'expressió de p53 en la fase tardana del cicle adenoviral, evitant l'expressió a les fases inicials de la replicació viral, on podria interferir en la síntesi i posterior encapsidació dels virions, inhibint així l'efecte oncolític de l'adenovirus. L'estructura dels virus ICOVIR5 i ICOVIR5-p53 està detallada a la figura 26.

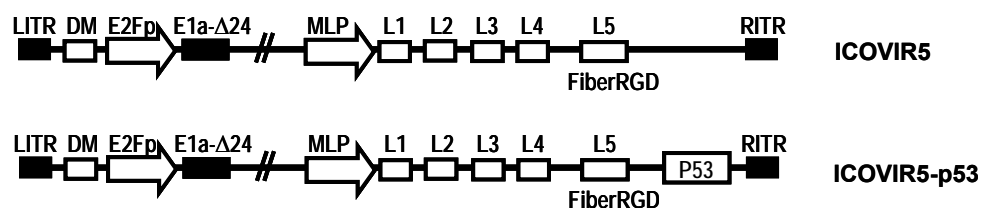


Figura 26. Esquema del genoma dels adenovirus ICOVIR5 i ICOVIR5-p53. La replicació de l'ICOVIR5 depèn del promotor E2F i la mutació $\Delta 24$ a E1A garanteix una replicació selectiva a les cèl·lules tumorals amb la via E2F-RB alterada. Al virus ICOVIR5-p53 s'ha introduït el transgèn *p53* sota el control del promotor MLP.

En primer lloc es va analitzar l'efecte citotòxic dels adenovirus ICOVIR5 i ICOVIR5-p53 sobre les línies cel·lulars BxPC3 i CP15T a les 96 hores post-infecció. Tal com es mostra a la figura 27a, les dues línies són sensibles a l'acció d'aquests virus, essent BxPC3 la línia més sensible (amb una IC50 de

3,5 MOI respecte a 15,3 MOI per CP15T per ICOVIR5). Les diferències en la sensibilitat a la infecció amb ICOVIR5 entre les dues línies podrien ser explicades en part per les diferències respecte a la proteïna p53 endògena, ja que la línia cel·lular BxPC3 expressa la proteïna p53 mutada (659A>G), mentre CP15T expressa la proteïna salvatge. Així, la presència de p53 endògena funcional a la cèl·lula impediria la fosforilació de RB, disminuint els nivells d'E2F lliures a la cèl·lules necessaris per a l'inici de la replicació viral (Schafer, 1998). D'altra banda, en tots dos casos la introducció de p53 augmenta l'efecte citotòxic del virus, fent disminuir la IC50 obtinguda, de forma significativa a la línia CP15T ($p < 0,05$) (Figura 27b). La menor potenciació a la línia BxPC3 podria ser deguda a la presència de proteïna p53 mutada i, per tant, a un efecte de dominant negatiu, ja que p53 és funcional en forma de tetràmer (Aramayo et al., 2011). En aquest sentit, la relació de l'estat de la proteïna p53 endògena amb l'efecte citotòxic de la reintroducció de p53 salvatge mitjançant adenovirus és un tema que genera gran controvèrsia (Cascallo et al., 1999; Liu et al., 1995; van Beusechem et al., 2002; Zhang et al., 1994). En tot cas, la introducció del supressor tumoral p53 potenciarà l'acció de l'adenovirus oncolític ICOVIR5 a les línies cel·lulars assajades. Aquests resultats confirmen la potenciació descrita prèviament amb diversos adenovirus oncolítics en altres tipus de tumors (Mitlianga et al., 2006; van Beusechem et al., 2002; Wang et al., 2008).

En paral·lel es va corroborar per western blot l'expressió de les proteïnes de la càpside viral i p53 a cèl·lules infectades amb 25 MOI d'ICOVIR5 i ICOVIR5-p53 (Figura 27c). En aquest cas es va incloure a l'experiment la línia cel·lular Saos-2, que no expressa p53 endògena, el què facilita la interpretació dels resultats. En els tres casos es detecta expressió de les proteïnes virals, visible a partir de les 24 hores a BxPC3 i CP15T i de les 48 hores a Saos-2, el què evidencia la replicació del virus dins de les cèl·lules infectades. A més, després de la infecció de Saos-2 amb l'adenovirus ICOVIR5-p53 es veu clarament expressió del transgèn p53 amb un patró temporal d'expressió de fase tardana. A BxPC3 i CP15T també s'observa l'expressió del transgèn p53 després de la infecció amb aquest virus, molt més abundant a la línia cel·lular CP15T. La major expressió de p53 a CP15T podria explicar una major potenciació de l'efecte citotòxic de ICOVIR5 en introduir el transgèn en aquesta línia. D'altra banda, la infecció

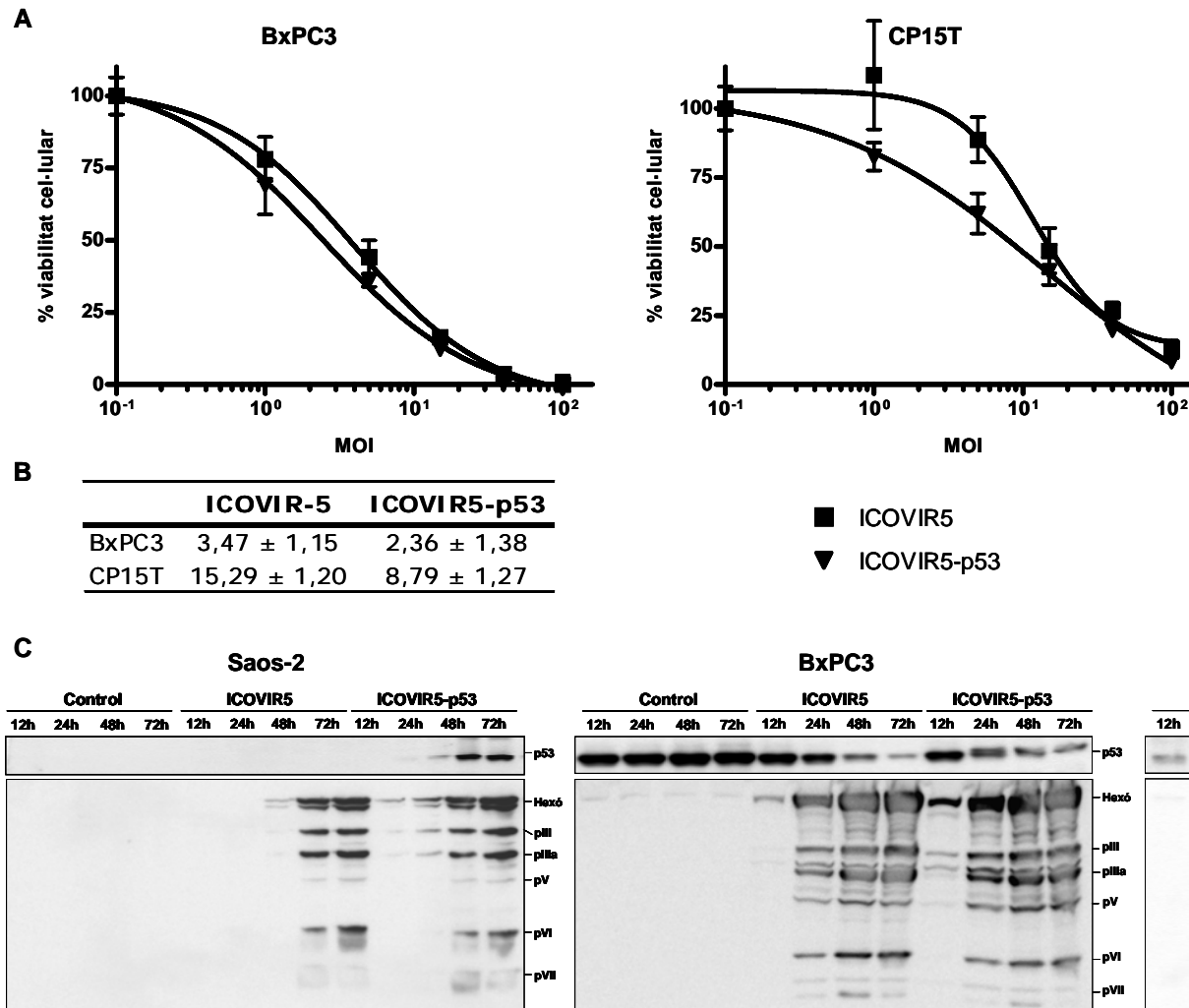


Figura 27. Efecte de la infecció amb ICOVIR5 i ICOVIR5-p53 a cultius en monocapa. Les línies BxPC3 i CP15T es van sembrar amb MOIs creixents dels virus ICOVIR5 i ICOVIR5-p53 i després de 96 hores es va mesurar la viabilitat cel·lular mitjançant un assaig WST-8. Els resultats, corba dosi-resposta (A) i IC50 (MOI) (B), estan representats com la mitjana (n=3) ± desviació estàndard. Es van sembrar les línies Saos-2, BxPC3 i CP15T i 24 hores després es van infectar amb 25 MOI dels virus ICOVIR5 i ICOVIR5-p53. Es van realitzar extractes a les 12, 24, 48 i 72 hores post-infecció i es va analitzar per western blot l'expressió del transgèn *p53* i les proteïnes virals (C).

amb ICOVIR5 produeix una disminució de la proteïna p53 endògena. En aquest sentit, s'ha descrit que el producte viral E1B actuaria inhibint la transcripció de p53, contribuint així a la transformació en impedir la inducció de la mort cel·lular programada per part de p53 (Moran, 1993). Aquest fenomen és interessant, ja que, en el cas de BxPC3, permetria eliminar la proteïna endògena mutada alhora que s'introdueix la proteïna funcional.

Després, es va comparar l'efecte de la infecció amb aquests dos virus oncolítics a les tumorsferes derivades de les línies cel·lulars BxPC3 i CP15T (Figura 28). En aquest cas els resultats obtinguts són diferents a les dues línies cel·lulars. Així, les tumorsferes de CP15T són sensibles a la infecció dels dos virus, els quals tenen un major efecte citotòxic a les tumorsferes que a la monocapa. En canvi, les tumorsferes de BxPC3, a les condicions assajades, són molt menys sensibles a l'acció d'aquests virus, amb un efecte màxim sobre la viabilitat cel·lular del 43,31% i 74,85% dels virus ICOVIR5 i ICOVIR5-p53, respectivament. Caldria comprovar si en variar la dosi de virus o el temps d'infecció hi ha un augment de la sensibilitat de les tumorsferes de BxPC3. D'altra banda, en tots els casos la introducció de p53 millora la potència oncolítica del virus ICOVIR5, de forma significativa a la línia CP15T. Per tant, sembla que aquests virus tenen capacitat per infectar les tumorsferes de BxPC3 i replicar, com indica el major efecte citotòxic de ICOVIR5-p53 respecte al virus no armat, malgrat sembla que no prou eficientment. Tot i que prèviament no s'ha estudiat l'efecte de la reintroducció de p53 salvatge en CSC, sí que s'ha descrit la relació entre p53 i la regulació del fenotip *stem* (Allen et al., 2009; Cicalese et al., 2009; Meletis et al., 2006). Per tant, la introducció de p53 mitjançant ICOVIR5 podria estar induint la diferenciació i posterior eliminació de les tumorsferes.

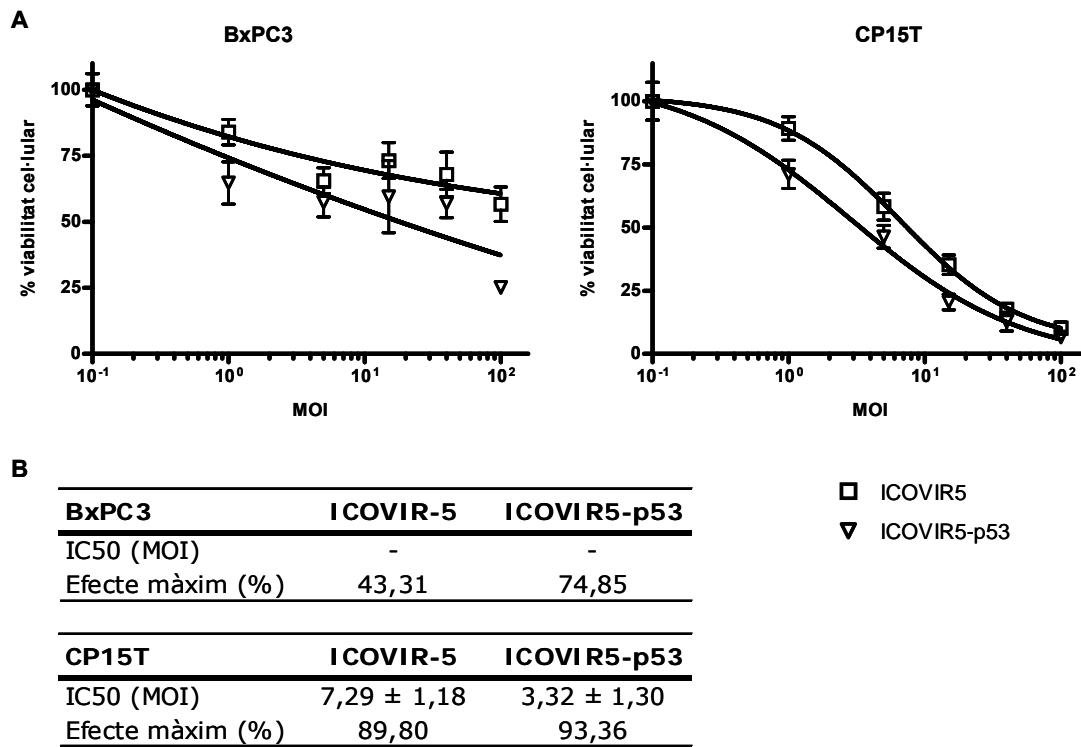


Figura 28. Efecte de la infecció amb ICOVIR5 i ICOVIR5-p53 a cultius de tumorsferes. Tumorsferes de les línies BxPC3 i CP15T es van sembrar amb MOIs creixents dels virus ICOVIR5 i ICOVIR5-p53 i després de 96 hores es va mesurar la viabilitat cel·lular mitjançant un assaig WST-8. Comparació de les corbes dosi-resposta (A), la IC50 (MOI) i l'efecte màxim (% respecte al control) (B) obtinguts, representats com la mitjana ($n=3$) \pm desviació estàndard.

Aquests experiment són preliminars, de manera que, per tal d'entendre les diferències de sensibilitat a la infecció observades entre les tumorsferes de les dues línies cel·lulars, caldria esbrinar si aquestes són degudes a diferències en la capacitat d'infecció, de replicació o d'alliberament del virus al medi.

En conclusió, sembla que els adenovirus oncolítics tenen la capacitat d'infectar tant les cèl·lules tumorals com la suboblació de CSC *in vitro*. A més, la reintroducció del supressor tumoral p53 potencia l'efecte d'aquests virus sobre les cèl·lules tumorals i les CSC. Per tant, el seu ús podria constituir una bona eina per evitar l'aparició de resistències al tractament en PDAC.

2. EFECTE ANTITUMORAL DE LA INHIBICIÓ D'IGF-IR I L'ACTIVACIÓ DE DR5

En els darrers anys s'han realitzat grans avenços en el coneixement de les alteracions moleculars que caracteritzen el PDAC i s'han desenvolupat fàrmacs dirigits a compensar les principals alteracions implicades en el creixement tumoral, la invasió i la metàstasi, així com l'angiogènesi i la resistència a l'apoptosi. De totes maneres, fins ara l'únic tractament que ha millorat els resultats obtinguts amb la gemcitabina, fàrmac d'elecció en PDAC, ha estat la combinació d'aquesta amb l'inhibidor de l'EGFR erlotinib, tot i que molt modestament (Wong and Lemoine, 2009). Per aquest motiu, és necessari un millor coneixement de les bases moleculars implicades en l'aparició de resistències, per tal de desenvolupar noves estratègies terapèutiques que millorin els resultats clínics obtinguts fins ara i evitin l'aparició de resistències.

En aquest sentit, la via de senyalització del receptor d'IGF-I (IGF-IR) és considerada una bona diana terapèutica en PDAC, ja que aquest receptor està implicat en l'oncogènesi, la progressió de la malaltia i en l'aparició de metàstasis. IGF-IR està freqüentment sobreexpressat en PDAC, així com en la majoria de càncers, i la desregulació de la seva via de senyalització és habitual. A més, s'ha descrit que pot ser responsable, en part, de l'aparició de quimioresistència (Beltran et al., 2009; King and Wong, 2012).

D'altra banda, s'han descrit diverses alteracions moleculars implicades en la desregulació de l'apoptosi en pacients amb PDAC (Jones et al., 2008), les quals protegeixen les cèl·lules tumorals de l'acció dels tractaments convencionals. En aquesta línia, s'han assajat diferents estratègies terapèutiques basades en l'activació de l'apoptosi, com l'ús de TRAIL, un membre de la família del TNF que és un potent inductor de l'apoptosi en cèl·lules tumorals (Roder et al., 2011). A més, la combinació de fàrmacs inductors de l'apoptosi amb quimioteràpia o fàrmacs dirigits que antagonitzin el creixement i la supervivència cel·lular sembla millorar el seu efecte antitumoral, tal com han demostrat diversos estudis preclínics (Wiezorek et al., 2010).

Així, en un model tumoral subcutani de PDAC, s'ha demostrat que l'anticòs monoclonal inhibidor del receptor IGF-IR AMG479 potencia l'efecte antitumoral de la gemcitabina (Beltran et al., 2009). A més, s'ha descrit que la inhibició de la via d'IGF-IR amb el fàrmac NVP-AEW541 potencia l'efecte citotòxic d'un agonista de DR5 mitjançant l'activació de la via de la PI3K (Pennarun et al., 2010). En base a aquests coneixements prèvis, en aquest treball s'ha assajat en un model ortotòpic (Perez-Torras et al., 2011) i en un panell de línies cel·lulars de càncer de pàncrees l'efecte del tractament amb l'inhibidor d'IGF-IR AMG479 (ganitumab) i l'anticòs monoclonal agonista de DR5 AMG655 (conatumab) (Kaplan-Lefko et al., 2010).

2.1. Efecte de la inhibició d'IGF-IR i l'activació de DR5 en un model *in vivo* d'adenocarcinoma ductal pancreàtic

2.1.1. Efecte antitumoral del tractament combinat amb gemcitabina, AMG479 i AMG655

D'una plataforma de tumors generada al grup de recerca a partir de fragments quirúrgics, es va determinar el model tumoral més adequat per a l'assaig de l'efecte antitumoral de la combinació de la gemcitabina, fàrmac d'elecció en pacients amb PDAC, amb els anticòsos monoclonals AMG479 i AMG655. Aquest es va escollir en base a una caracterització prèvia de l'expressió d'IGF-IR i altres receptors tirosina-quinasa, així com les vies de senyalització relacionades, tal com mostra la figura 29 (Perez-Torras et al., 2011). L'anàlisi mitjançant western blot del nivell d'expressió del receptor IGF-IR, diana del fàrmac AMG479, i les principals proteïnes de la seva via de senyalització evidencia una gran variabilitat en la seva l'expressió, amb models amb una elevada expressió del receptor i la seva via de senyalització i altres on aquesta pràcticament no s'expressa. En base a aquestes dades es va decidir emprar el model CP13 per a l'assaig, el qual es caracteritza per una elevada expressió del receptor total i l'activació de les proteïnes de la seva via de senyalització, com IRS-1.

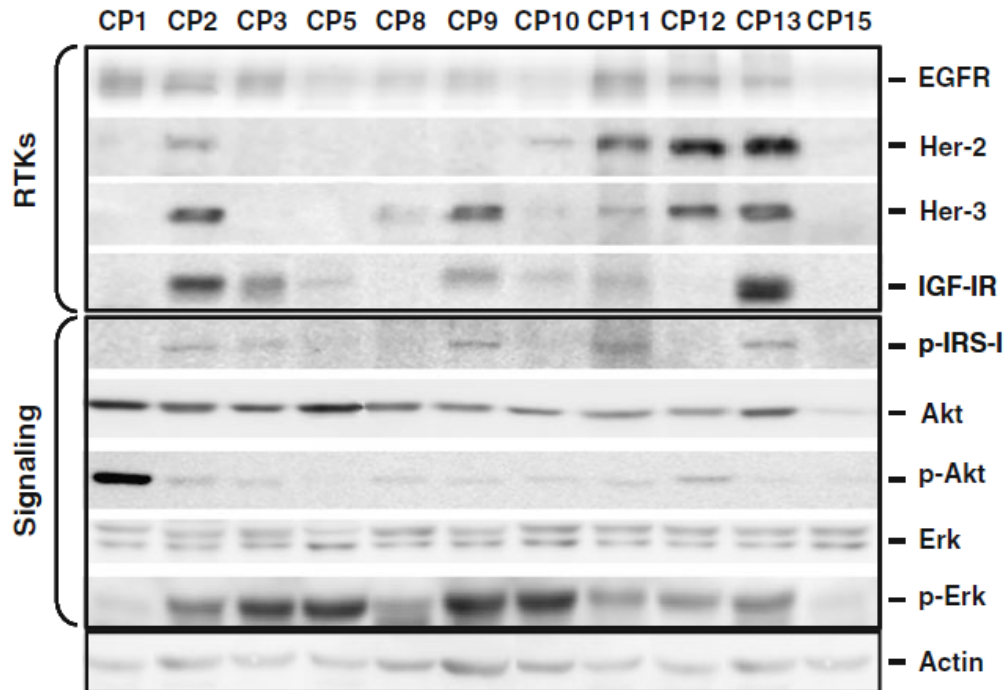


Figura 29. Caracterització de la via de senyalització d'IGF-IR de la plataforma de models tumorals ortotòpics de PDAC. Caracterització per western blot dels nivells d'expressió dels receptors de factors de creixement i les vies de senyalització. Adaptat de Pérez-Torras et al., 2011.

A continuació es va analitzar l'efecte antitumoral de la combinació de la gemcitabina amb els anticossos monoclonals AMG479 i AMG655. Així, es van implantar fragments de 10 mg del tumor CP13 al pàncrees de 55 ratolins atímics i 8 setmanes després es van dividir els ratolins en cinc grups de tractament: control (salí), gemcitabina, gemcitabina+AMG479, gemcitabina+AMG655 i gemcitabina+AMG479+AMG655. Els animals es van tractar durant 8 setmanes, dos cops per setmana, amb 80 mg/Kg de gemcitabina i 300 µg per ratolí dels anticossos monoclonals AMG479 i AMG655 administrats per via intraperitoneal.

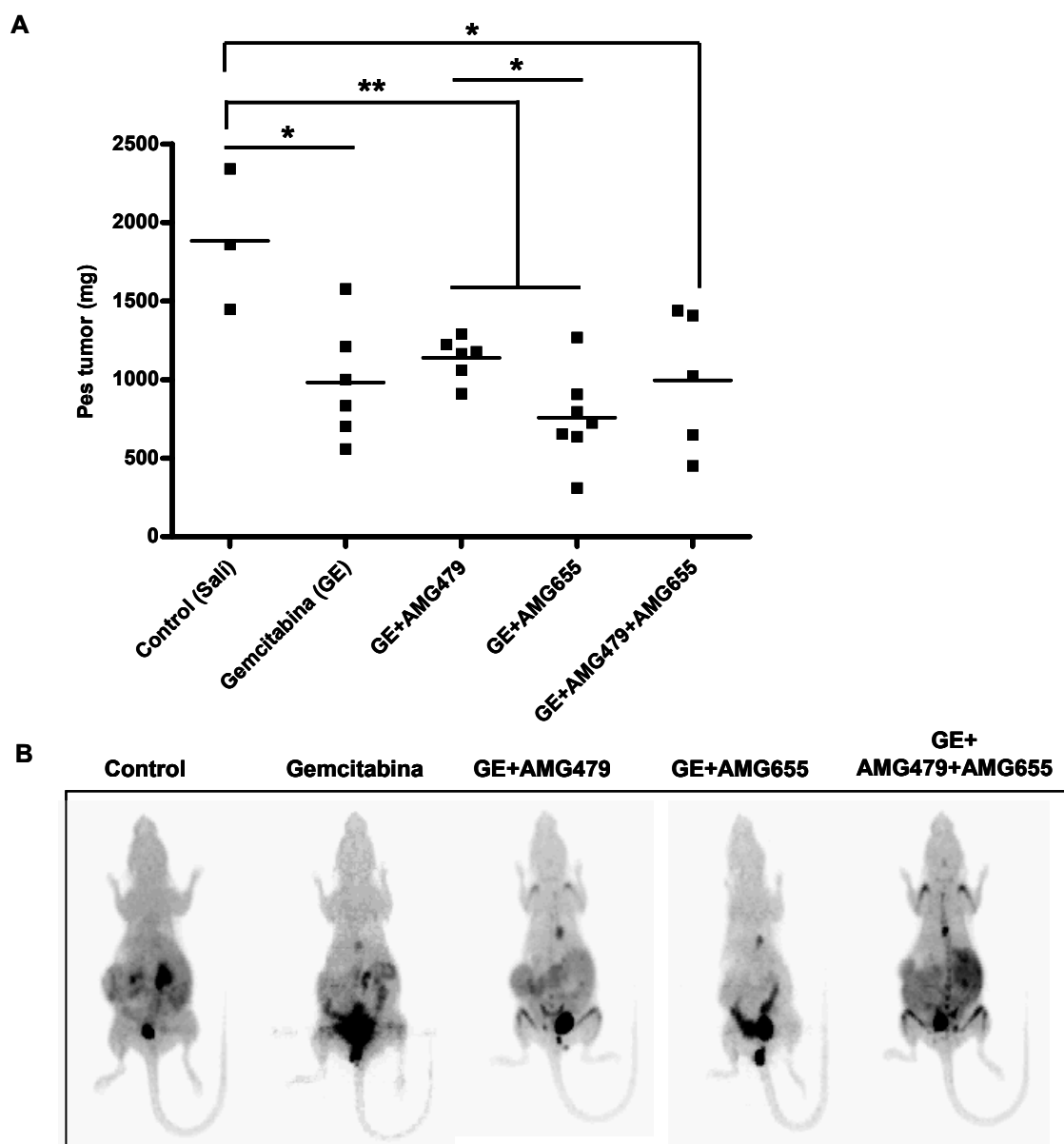


Figura 30. Efecte del tractament combinat amb gemcitabina, AMG479 i AMG655 al model CP13. (A) Efecte del tractament sobre el pes dels tumors al final del tractament (mg). Resultats expressats com a mitjana ($n=3-7$) \pm desviació estàndard. (B) Anàlisi del creixement tumoral per PET-TAC al final de l'experiment. Imatge representativa.

Al final de l'experiment es van pesar els tumors, tal com mostra la figura 30a. Els resultats obtinguts mostren una reducció estadísticament significativa del pes dels tumors respecte al grup control en els ratolins tractats amb gemcitabina i les diferents combinacions amb aquest fàrmac. De totes maneres, no s'observen diferències significatives entre el grup

tractat amb gemcitabina i la resta de combinacions, només una lleugera disminució del pes dels tumors tractats amb la combinació de gemcitabina i AMG655. Aquests resultats contrasten amb la potenciació de l'efecte antitumoral de la gemcitabina en combinar-la amb l'AMG479 descrita en models subcutanis (Beltran et al., 2009). De totes maneres, en aquest treball s'ha emprat un model ortotòpic generat a partir de fragments quirúrgics, el qual és més similar al pacient i presenta una major heterogeneïtat cel·lular. A més, una publicació més recent ha demostrat que la combinació de la gemcitabina amb AMG479 o AMG655 en pacients amb PDAC no millora de forma significativa la taxa de supervivència respecte al grup control tractat amb gemcitabina i placebo (Kindler et al., 2012) i, de fet, un assaig clínic de fase 3 on es combinava l'AMG479 amb la gemcitabina ha estat aturat (Cancer discovery, 2012). D'altra banda, la combinació dels dos anticossos no potencia l'efecte antitumoral de l'AMG655, tot i que s'ha descrit que la inhibició de l'agonista de DR5 sensibilitzaria les cèl·lules a la inducció de l'apoptosi (Pennarun et al., 2010; Wang and Sun, 2002).

Una part dels ratolins es va portar al Centro Técnico de Isótopos Radiactivos (CETIR Esplugues), on es va analitzar mitjançant PET-TAC l'efecte dels fàrmacs sobre el creixement dels tumors. Aquesta tècnica consisteix en la injecció d'un l'anàleg radioactiu als ratolins, el qual s'acumula a les cèl·lules durant la divisió cel·lular i permet fer un seguiment no invasiu del creixement del tumor durant la realització de l'assaig. Prèviament, per tal d'escollir l'anàleg radioactiu, es van comparar les imatges adquirides emprant la ^{18}F -fluorodesoxiglucosa (FDG) o la ^{18}F -fluorotimidina (FLT). Els resultats obtinguts van mostrar una millor captació de la FLT, tal com s'havia descrit en estudis anteriors (von Forstner et al., 2008). Per aquest motiu, es va decidir emprar aquest compost per al seguiment del creixement dels tumors durant l'*in vivo*. A la figura 30b es poden veure les imatges obtingudes al final del tractament, on s'observa una gran presència de marcatge inespecífic a l'intestí, on també hi ha cèl·lules en divisió, així com a la vesícula biliar i la bufeta, per on s'elimina l'anàleg. El marcatge inespecífic es solapa amb el de les cèl·lules tumorals situades al pàncrees, així com les possibles metàstasis, fet que dificulta la valoració i no permet veure les possibles diferències entre tractaments.

Finalment, es va analitzar l'efecte dels tractaments sobre l'estructura del tumor, mitjançant una tinció hematoxilina-eosina. La tinció de les mostres, així com la seva posterior valoració, es va realitzar al Serveri d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic de Barcelona. La tinció hematoxilina-eosina (Figura 31) posa de manifest que el tumor CP13 té una estructura glandular ben definida amb zones de secreció mucosa. Cal destacar que al grup control es poden trobar zones de necrosi, però que aquestes podrien estar causades pel ràpid creixement dels tumors d'aquest grup. A més, el tractament amb aquests fàrmacs provoca una disminució del component cel·lular dels tumors, el qual es pot relacionar amb un increment de les zones de secreció mucosa i necrosi. De totes maneres, no s'observen diferències entre els diferents tractaments.

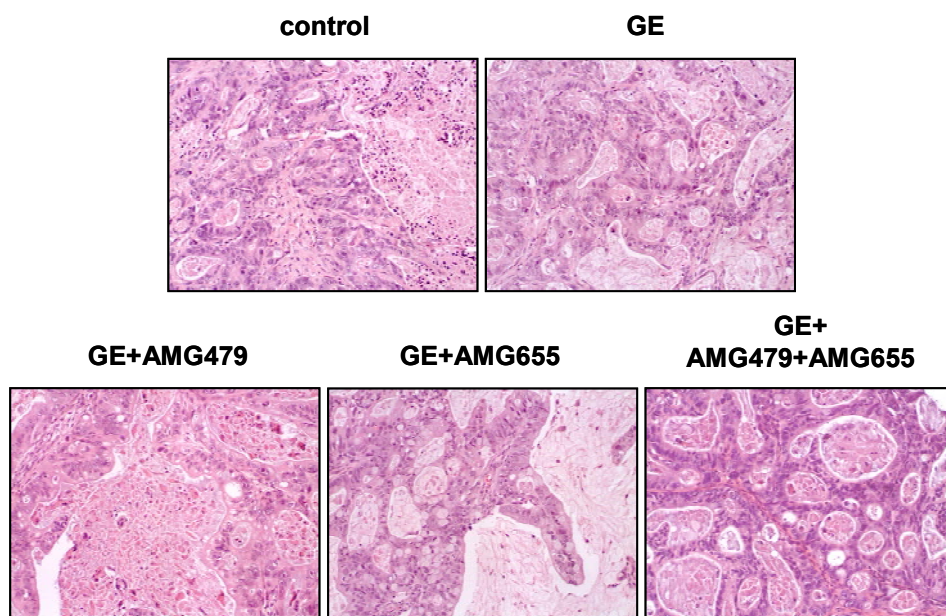


Figura 31. Efecte del tractament amb gemcitabina, AMG479 i AMG655 sobre l'estructura del tumor. Tinció hematoxilina-eosina dels tumors al final del tractament. Microfotografies (100x).

Donada la falta de millora en la resposta antitumoral del tractament combinat amb gemcitabina, AMG479 i AMG655 respecte al tractament amb gemcitabina sola, es va decidir analitzar l'efecte d'aquests fàrmacs a nivell molecular, per tal d'intentar identificar-ne les causes.

2.1.2. Efecte molecular del tractament combinat amb gemcitabina, AMG479 i AMG655

L'efecte a nivell molecular dels diferents tractaments es va avaluar en mostres dels tumors obtingudes a meitat de l'experiment, a les 4 setmanes de tractament, i al final de l'assaig, a les 8 setmanes de tractament. D'altra banda, les mostres de 4 setmanes es van obtenir 48 hores després de la darrera administració dels fàrmacs, mentre les de 8 setmanes es van obtenir 24 i 48 hores després del darrer tractament.

En primer lloc es va realitzar un *array* d'anticossos dissenyat per quantificar el nivell de fosforilació de 46 proteïnes quinases (Human Phospho-Kinase Array Kit, R&D systems). Tal com mostra la figura 32, el tractament amb gemcitabina, AMG479 i AMG655 produeix canvis significatius a proteïnes involucrades en la via de senyalització d'IGF-IR (diana de l'AMG479), com Lyn, Akt, GSK-3 α/β i P70S6K. A més, també es veuen afectades proteïnes relacionades amb la via de senyalització d'EGFR, que sovint s'ha relacionat amb resistència als inhibidors de la via d'IGF-IR (Adams et al., 2004; Guix et al., 2008), com MEK1/2, ERK1/2, CREB, STAT5a, STAT3 i STAT1.

En tractar les cèl·lules amb gemcitabina sola o en combinació amb l'AMG479, no s'observa una disminució significativa de l'activació de la via d'IGF-IR. En canvi, als tumors tractats amb la combinació amb AMG479 hi ha un augment d'alguns dels components de la via d'EGFR. D'altra banda, en afegir l'AMG655 a la combinació, es produeix una clara disminució de les vies de senyalització d'IGF-IR i EGFR. Per tant, la falta de resposta antitumoral de la triple combinació no sembla estar causada per una resistència a la inhibició d'aquestes vies. En aquest sentit, la falta de millora en l'efecte antitumoral de la triple combinació podria estar indicant que l'efecte sobre aquestes vies de senyalització observat 24 hores després del darrer tractament no es manté en el temps.

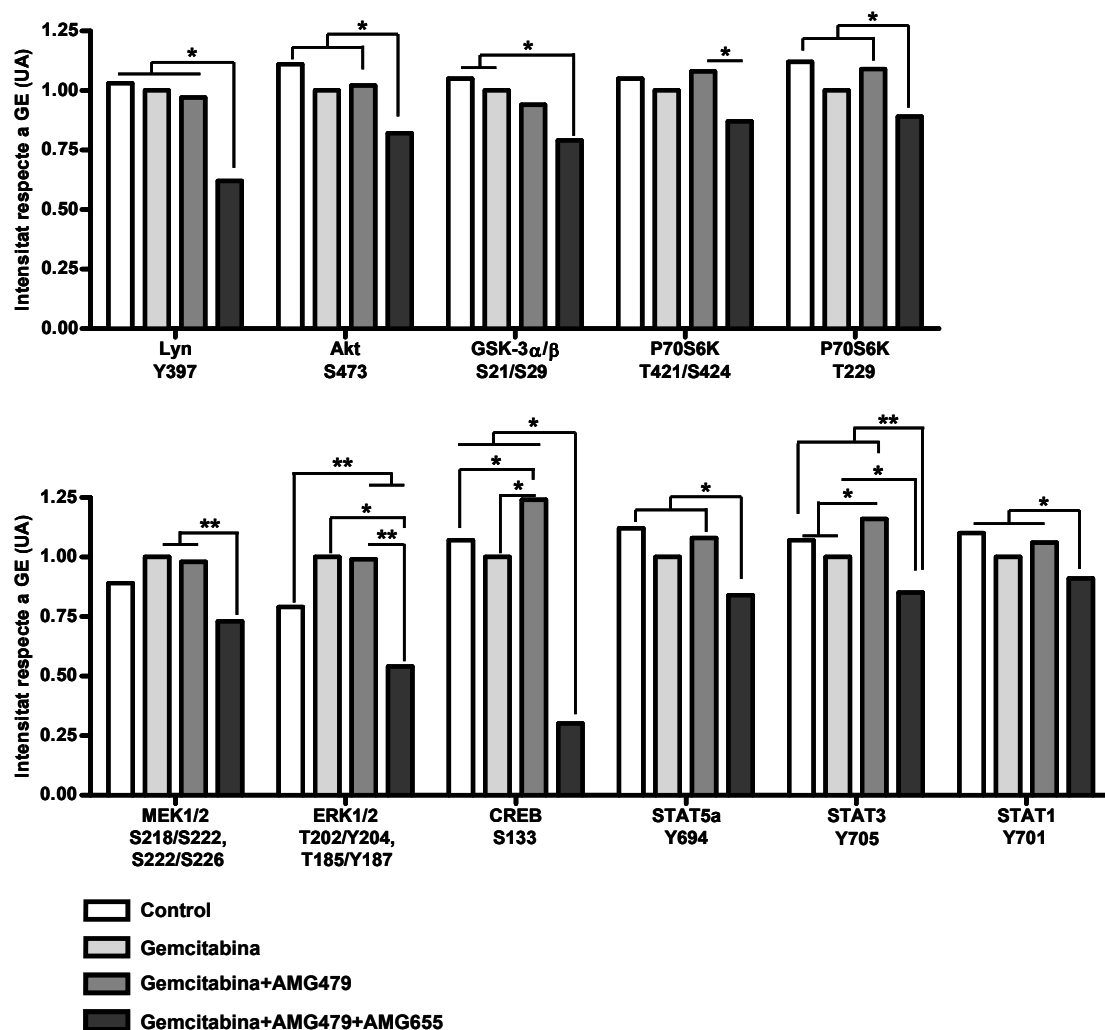


Figura 32. Caracterització de l'efecte del tractament del model CP13 amb gemcitabina, AMG655 i AMG479 sobre el nivell d'activació de diverses proteïnes, quinases i factors de transcripció. Proteïnes que han patit una variació dels nivells de fosforilació estadísticament significatius, essent * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$.

A continuació es va intentar caracteritzar l'efecte del tractament amb aquests fàrmacs sobre la inducció de l'apoptosi mitjançant un *array* d'anticossos. Es va emprar un *array* dissenyat per quantificar l'expressió de 35 proteïnes relacionades amb les vies de senyalització implicades en l'apoptosi (Human Apoptosis Array Kit, R&D systems) en mostres obtingudes al final de l'experiment, 24 hores després de la darrera administració dels fàrmacs. Tal com es mostra a la figura 33, el tractament amb gemcitabina o la seva combinació amb l'AMG655 indueix una disminució de proteïnes anti-apoptòtiques, com Bcl-x o XIAP, alhora que provoca una disminució de proapoptòtiques, com el citocrom c o HTRA2/Omi. Cal tenir en compte que, tot i que l'activitat proapoptòtica del citocrom c i

HTRA2/Omi depèn de la seva sortida del mitocondri al citoplasma, també s'ha relacionat la regulació de la seva expressió amb l'apoptosi (Chandra et al., 2002; Lee et al., 2003; Sanchez-Alcazar et al., 2001; Xu et al., 2012). Globalment, s'observa una resposta de resistència al tractament que impedeix l'activació de l'apoptosi, com indica la falta d'increment de caspasa-3 clivada.

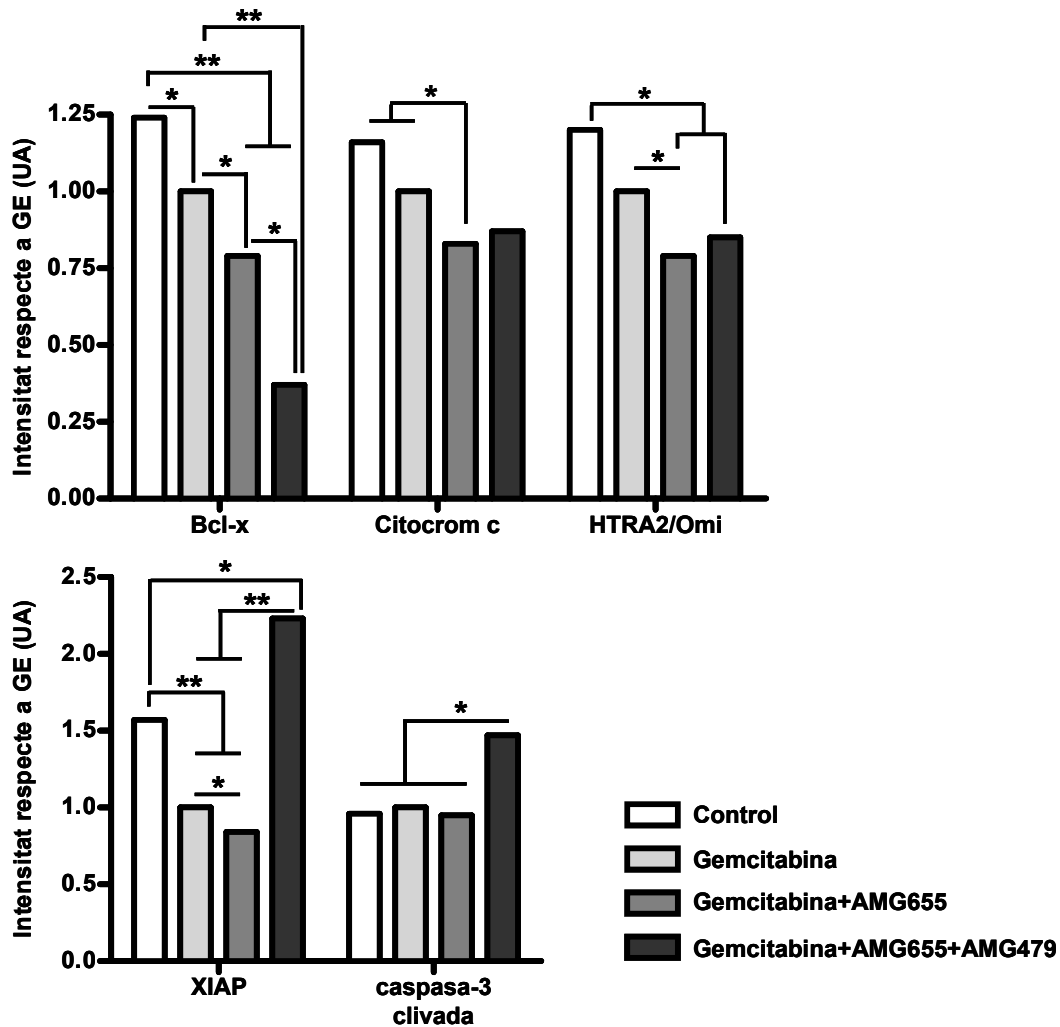


Figura 33. Caracterització de l'efecte del tractament del model CP13 amb gemcitabina, AMG655 i AMG479 sobre l'expressió de diverses proteïnes relacionades amb l'apoptosi. Proteïnes que han patit una variació de la seva expressió estadísticament significativa, essent * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$.

D'altra banda, amb la triple combinació de fàrmacs incrementa l'activació de la caspasa-3, tot i que aquesta és compensada per un gran augment de l'expressió de XIAP. Per tant, sembla que la combinació amb l'AMG479 no potencia l'activació de l'apoptosi en incrementar l'expressió de la proteïna anti-apoptòtica XIAP, el què explicaria la lleugera disminució de

l'efecte antitumoral en els grups tractats amb aquest fàrmac. Aquests resultats contrasten amb la potenciació de l'apoptosi observada en combinar l'inhibidor d'IGF-IR tirosina-quinasa NVP-AEW541 amb inductors de DR5 (Pennarun et al., 2010). A més, són inesperats, ja que s'ha descrit que l'activació de la via de PI3K-Akt, via de senyalització inhibida per l'AMG479, indueix un augment de XIAP (Dan et al., 2004; Kooijman, 2006).

A continuació, es va construir un *tissue microarray* (TMA) per tal de corroborar els resultats dels *arrays*. La tinció de les mostres, així com la seva posterior valoració, es va realitzar al Serveri d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic de Barcelona. Així, es va analitzar l'efecte sobre l'activació de l'apoptosi mitjançant una valoració immunohistoquímica de la caspasa-3 clivada. Tal com es mostra a la figura 34, a les mostres obtingudes al final del tractament només hi ha un augment significatiu de la forma activa de la caspasa-3 al grup tractat amb la triple combinació de fàrmacs. D'aquesta manera, es confirma l'augment de caspasa-3 clivada observat a l'*array*.

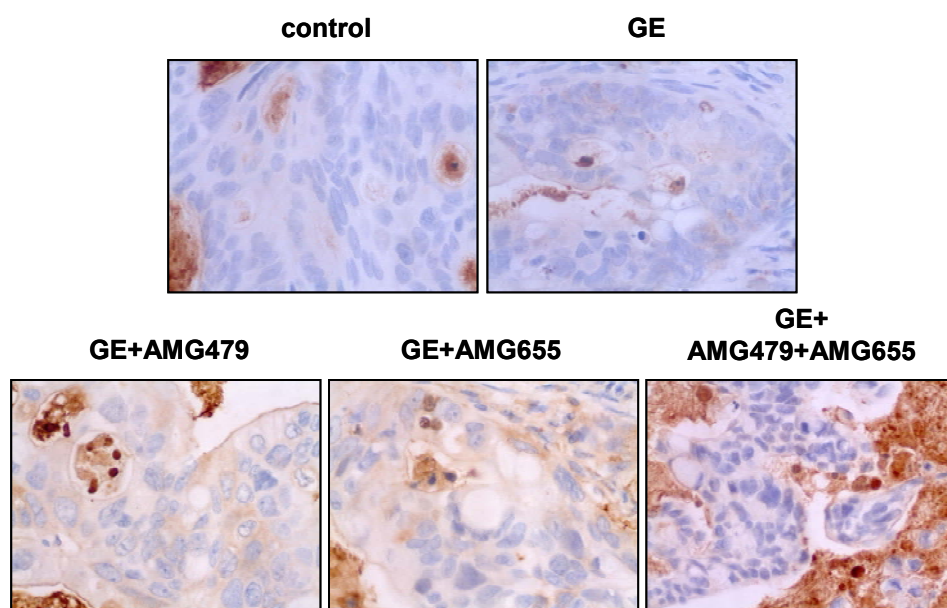


Figura 34. Efecte del tractament amb gemcitabina, AMG479 i AMG655 sobre l'activació de la caspasa-3. Immunodetecció de la caspasa-3 clivada. Microfotografies (400x).

A més, també es van corroborar els resultats obtinguts amb els *arrays* mitjançant un anàlisi per western blot de l'expressió de les principals proteïnes de les vies de senyalització diana dels tractaments. La determinació es va realitzar en mostres obtingudes a meitat del tractament, 4 setmanes després del seu inici, i al final del tractament, després de 8

setmanes. A més, a les mostres del final de l'experiment es va comparar l'efecte 24 i 48 hores després de la darrera administració dels fàrmacs. Es van analitzar d'una banda proteïnes relacionades amb la via de l'apoptosi extrínseca, induïda per l'activació de DR5, diana del fàrmac AMG655, com DR5, XIAP o PARP. A més, es va analitzar l'expressió de les proteïnes relacionades amb la via d'IGF-IR, diana del tractament amb AMG479, com IGF-IR, IRS-1 (fosforilació de la tirosina 612) o Akt, i proteïnes relacionades amb la via d'EGFR, com EGFR, IRS-1 (fosforilació de la tirosina 896) o Erk.

Tal com mostra la figura 35, a meitat del tractament la gemcitabina, així com la seva combinació amb AMG479 o AMG655, no indueix cap canvi significatiu en els nivells d'expressió de les proteïnes de la via de senyalització de DR5. En canvi, el tractament amb la triple combinació de fàrmacs indueix un augment de l'expressió de DR5 i XIAP. A més, amb el tractament triple també es dona un augment de l'expressió de MMP-7. D'altra banda, l'expressió de les proteïnes relacionades amb la via de senyalització dels receptors IGF-IR i EGFR no es troba modificada en cap dels grups de tractament. Per tant, sembla que a meitat del tractament només la triple combinació de fàrmacs té un efecte sobre aquestes vies, ja que indueix un augment de la proteïna diana del tractament amb AMG655, el receptor DR5, així com un augment de les proteïnes XIAP i MMP7, que estarien indicant l'aparició de resistència al tractament. En aquest sentit, a PDAC s'ha relacionat la inducció de TRAIL amb un increment del fenotip invasiu mitjançant la inducció de l'expressió de MMP7 (Zhou et al., 2008a). D'altra banda, també s'ha descrit que MMP-7 activa la via d'IGF-IR mitjançant la proteòlisi de la IGF-BP3, que deixaria de competir amb el lligand IGF-I (Miyamoto et al., 2004). Finalment, l'activació de mecanismes inhibidors de l'apoptosi al grup tractat amb la triple combinació de fàrmacs correlaciona amb la menor reducció dels tumors en els ratolins d'aquest grup respecte als tractats amb gemcitabina i AMG655.

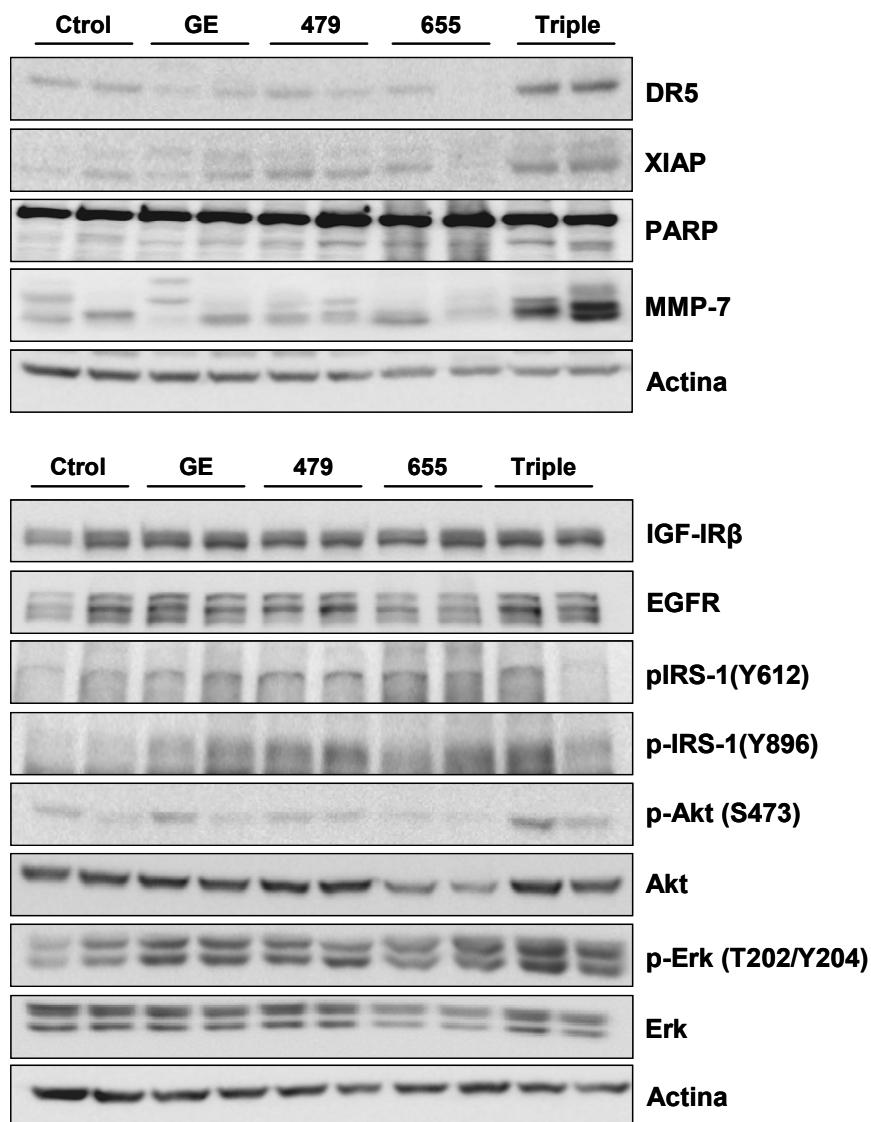


Figura 35. Efecte del tractament durant 4 setmanes amb gemcitabina, AMG479 i AMG655 sobre l'expressió de les vies de senyalització diana del tractament. Anàlisi per western blot de l'expressió de proteïnes de les vies de senyalització de DR5, IGF-IR i EGFR als tumors després de 4 setmanes de tractament. Anàlisi de dos tumors independents.

Ctrol: control; GE: gemcitabina; 479: gemcitabina+AMG479; 655: gemcitabina+AMG655; Triple: gemcitabina+AMG479+AMG655.

A les mostres obtingudes al final de l'experiment es va observar una gran variabilitat entre els diferents tumors d'un mateix grup de tractament. Per aquest motiu, per tal de facilitar la interpretació dels resultats, es va seleccionar una mostra representativa de cada grup de tractament, tenint en compte que el pes i l'expressió proteica fos representativa. En aquest cas es van analitzar mostres obtingudes 24 i 48 hores després del darrer

tractament i es van trobar clares diferències en els nivells d'expressió proteica. Així, l'anàlisi de les proteïnes relacionades amb la via de DR5 (Figura 36) indica que els nivells d'expressió de la banda clivada de PARP als tumors tractats amb gemcitabina o les diferents combinacions no es poden correlacionar amb el seu efecte sobre el pes dels tumors. En canvi, als grups tractats amb AMG479 a les 24 hores hi ha un augment de DR5 i XIAP que podria explicar la falta d'efecte antitumoral. Aquest augment de l'expressió de XIAP després del tractament amb l'AMG479 confirmaria l'augment d'aquesta proteïna observat a l'*array* d'apoptosi. Per tant, els resultats indiquen que XIAP podria estar implicat en la resistència al tractament combinat amb gemcitabina, AMG479 i AMG655. De fet, XIAP és considerat un factor clau en l'aparició de resistència als tractaments quimioterapèutics en PDAC (Fulda, 2011).

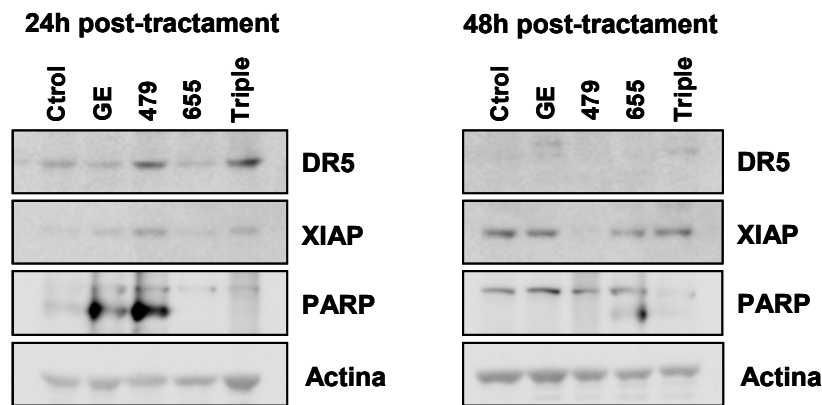


Figura 36. Efecte del tractament durant 8 setmanes amb gemcitabina, AMG479 i AMG655 sobre la via de DR5. Anàlisi per western blot de l'expressió de proteïnes de la via de senyalització de DR5 als tumors, al final de l'experiment. Anàlisi d'un tumor seleccionat per grup de tractament.

Ctrol: control; GE: gemcitabina; 479: gemcitabina+AMG479; 655: gemcitabina+AMG655; Triple:gemcitabina+AMG479+AMG655.

D'altra banda, es va analitzar l'expressió de proteïnes de les vies de senyalització d'IGF-IR i EGFR (Figura 37). Els resultats del western blot confirmen la inhibició d'aquestes vies a les 24 hores observada a l'*array* al grup tractat amb la triple combinació. En canvi, a les mostres obtingudes a les 48 hores, s'observa una reactivació d'aquestes vies als grups tractats amb AMG655. Per tant, semblaria que la falta de resposta antitumoral als tumors tractats amb la combinació dels tres fàrmacs podria estar causada

per un increment de l'expressió de XIAP inicial, que inhibiria l'apoptosi, a més d'una reactivació posterior de les vies d'IGF-IR i EGFR.

Cal destacar que els resultats obtinguts semblen indicar que l'efecte d'aquests fàrmacs no es manté en el temps, com demostren les diferències observades entre les mostres obtingudes 24 i 48 hores després del darrer tractament. En aquest sentit, caldria valorar el paper de la pauta d'administració dels fàrmacs en la falta de potenciació de l'efecte antitumoral.

Finalment, el conjunt dels resultats obtinguts indiquen que la falta de resposta al tractament podria ser deguda a que aquest no aconsegueix induir l'apoptosi, degut a l'activació de mecanismes anti-apoptòtics. A més, el tractament amb l'AMG655 produeix una activació de les vies d'IGF-IR i EGFR, implicades en la proliferació i la supervivència de la cèl·lula tumoral.

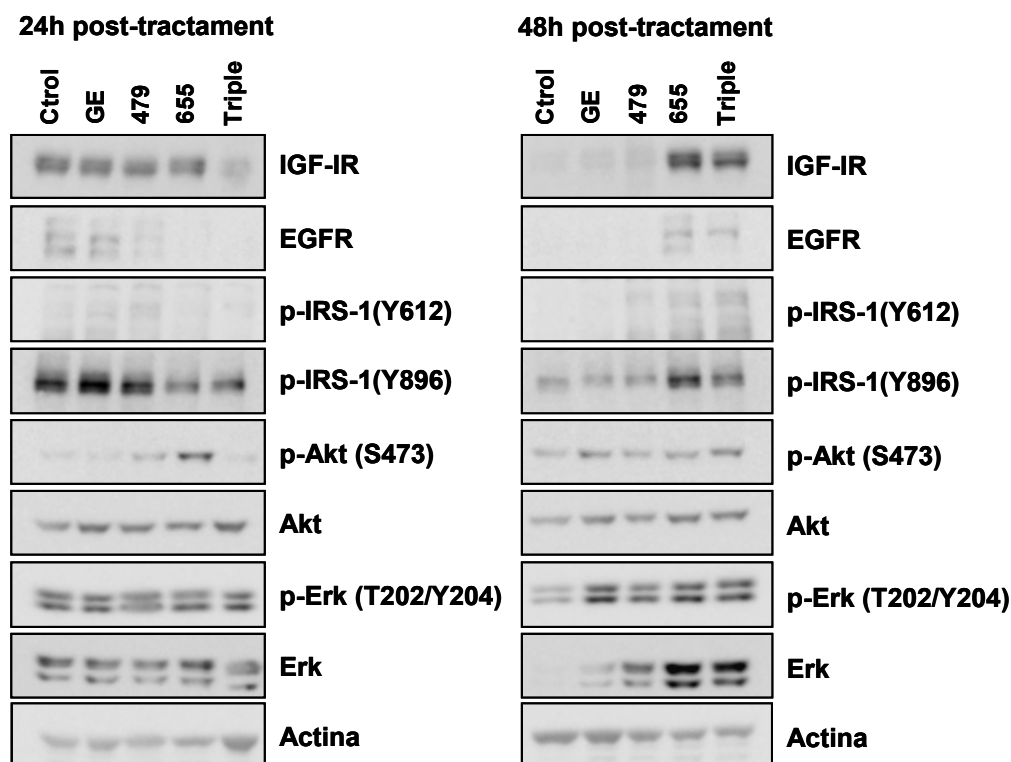


Figura 37. Efecte del tractament durant 8 setmanes amb gemcitabina, AMG479 i AMG655 sobre les vies d'IGF-IR i EGFR. Anàlisi per western blot de l'expressió de proteïnes de les vies de senyalització d'IGF-IR i EGFR als tumors després de 8 setmanes de tractament, al final de l'experiment. Anàlisi d'un tumor seleccionat per grup de tractament.

Ctrl: control; GE: gemcitabina; 479: gemcitabina+AMG479; 655: gemcitabina+AMG655; Triple:gemcitabina+AMG479+AMG655.

2.2. Efecte de la inhibició d'IGF-IR i l'activació de DR5 en línies cel·lulars tumorals pancreàtiques

En paral·lel a l'anàlisi de l'efecte a nivell molecular del tractament combinat amb gemcitabina, AMG479 i AMG655 al model tumoral CP13, es va estudiar en un panell de línies cel·lulars tumorals pancreàtiques l'efecte del tractament amb els mateixos fàrmacs.

En primer lloc es va determinar mitjançant un anàlisi per western blot el nivell basal d'expressió de les proteïnes diana d'aquests fàrmacs, el receptor IGF-IR per l'AMG479 i DR5 per l'AMG655, a les línies cel·lulars BxPC3, Panc-1, CP15T i CP15A. Les línies BxPC3 i Panc-1 van ser adquirides a l'ATCC i han estat àmpliament emprades en diversos treballs, mentre les línies CP15T i CP15A van ser establertes al grup de recerca (Tesi Sandra Pérez). La figura 38a mostra com les quatre línies cel·lulars analitzades expressen el receptor IGF-IR i com la línia Panc-1 és la que presenta nivells superiors. D'altra banda, a la figura 38b s'observa que l'expressió del receptor DR5 pràcticament no és detectable, només lleugerament a la línia BxPC3.

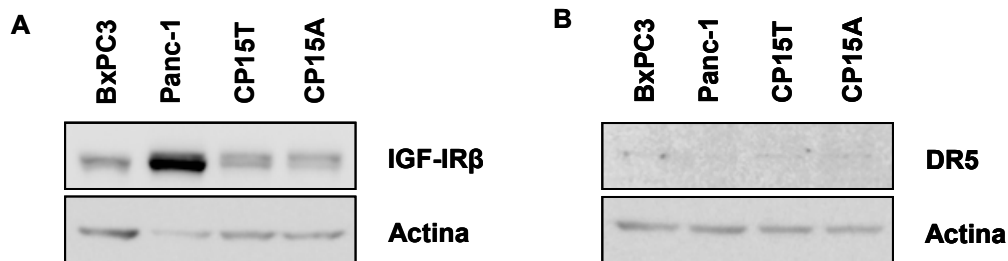


Figura 38. Determinació dels nivells basals d'expressió dels receptors IGF-IR i DR5. Determinació dels nivells basals d'expressió dels receptors IGF-IR (A) i DR5 (B) mitjançant western blot a les línies cel·lulars BxPC3, Panc-1, CP15T i CP15A.

A continuació es va analitzar l'efecte del tractament amb els anticossos monoclonals AMG479 i AMG655 sobre la viabilitat cel·lular a les mateixes línies cel·lulars. Tal com mostra la figura 39, les línies cel·lulars analitzades són resistents al tractament amb AMG479, amb un baix percentatge d'inhibició de la viabilitat cel·lular respecte al control. Concretament, aquesta només es redueix al voltant d'un 10% a les línies cel·lulars BxPC3 i Panc-1 i prop del 30% a les línies més sensibles, CP15T i CP15A.

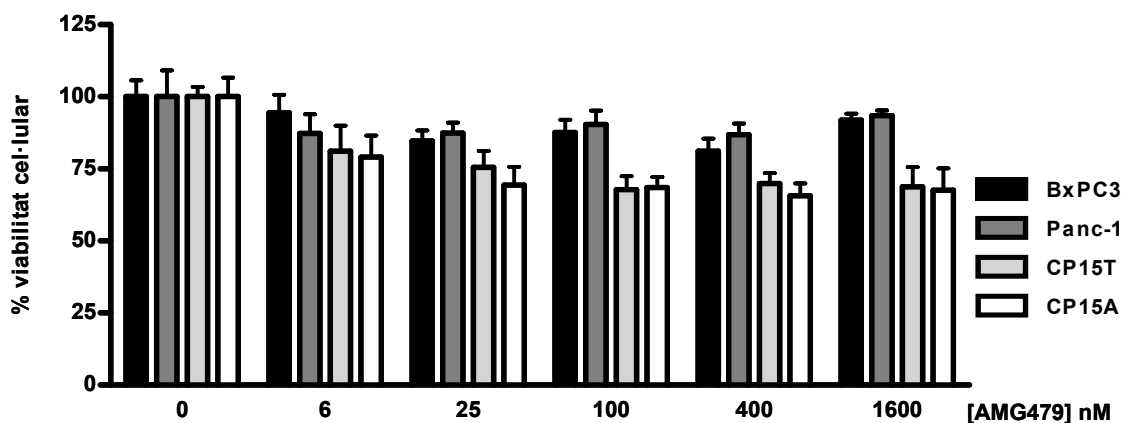


Figura 39. Efecte del tractament amb AMG479 en un panell de línies cel·lulars tumorals pancreàtiques. Efecte sobre la viabilitat cel·lular del tractament amb AMG479. Les cèl·lules es van sembrar, 24 després es van tractar amb dosis creixents del fàrmac i després de 72 hores es va mesurar la viabilitat cel·lular mitjançant un assaig MTT. Experiment representatiu, representat com la mitjana ($n=6$) \pm desviació estàndard.

Per tant, els nivells d'expressió d'IGF-IR no correlacionen amb l'efecte citotòxic del fàrmac. Cal tenir en compte, però, que es va realitzar una immunodetecció de la proteïna total present a la cèl·lula, no només de la localitzada a membrana i, per tant, disponible per a la unió de l'anticòs. En tot cas, diversos estudis han descrit que no hi ha una clara correlació entre els nivells d'expressió d'IGF-IR i la sensibilitat als inhibidors d'aquest receptor (Cunningham et al., 2008; Ioannou et al., 2013; Mukohara et al., 2009). En aquest sentit, hi pot haver altres factors que determinin la resposta a la inhibició del receptor IGF-IR, com els nivells de lligand, l'expressió o l'estat d'altres components de la via de senyalització d'IGF-IR o fenòmens de *cross-talk* amb altres receptors tirosina-quinasa (Ioannou et al., 2012; Jin and Esteva, 2008).

D'altra banda, la resistència observada als assajos *in vitro* pot ser deguda a que els anticossos monoclonals estan dissenyats per exercir el seu efecte antitumoral no només per l'acció directa sobre l'antigen diana del tractament. Així, els anticossos monoclonals emprats en teràpia antitumoral també basen la seva eficàcia en altres mecanismes d'acció com l'activació del sistema immunitari i la inducció d'efectes sobre la vasculatura i l'estroma tumorals (Scott et al., 2012). Aquests darrers mecanismes d'acció no poden ser estudiats *in vitro*, fet que podria explicar la falta de sensibilitat dels cultius cel·lulars al tractament amb l'anticòs monoclonal AMG479.

Després, es va determinar l'efecte del tractament amb l'anticòs monoclonal AMG655. Per a l'assaig del seu efecte citotòxic es va coadministrar aquest fàrmac amb la proteïna G, la qual és necessària per a la correcta oligomerització del receptor DR5 *in vitro* (Kaplan-Lefko et al., 2010). A la figura 40 es mostra com, atenent al grau de sensibilitat al tractament amb l'AMG655 es poden dividir les línies cel·lulars estudiades en dos grups. Així, les línies cel·lulars BxPC3 i Panc-1 són sensibles al tractament amb aquest fàrmac, mentre les línies CP15T i CP15A són resistents. La diferent resposta a aquest tractament, per tant, no sembla deguda a diferències en l'expressió de DR5, diana del tractament amb l'AMG655. De totes maneres, s'ha descrit que la sensibilitat al tractament amb AMG655 i altres inductors de l'apoptosi també podria estar relacionada amb l'estat dels components intracel·lulars de la via de senyalització de DR5, així com d'altres proteïnes amb funcions anti-apoptòtiques (Kaplan-Lefko et al., 2010).

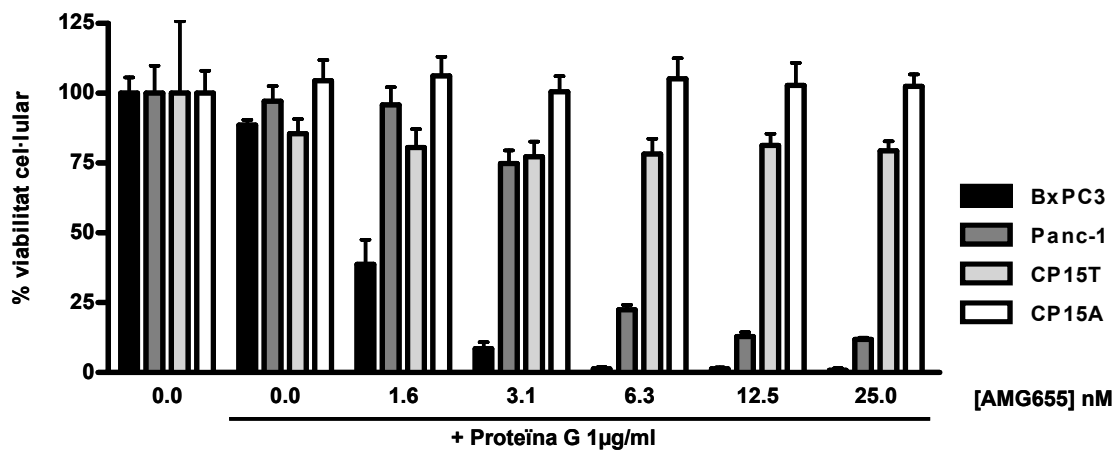


Figura 40. Efecte del tractament amb AMG655 en un panell de línies cel·lulars tumorals pancreàtiques. Efecte sobre la viabilitat cel·lular del tractament amb AMG655. Les cèl·lules es van sembrar, 24 després es van tractar amb dosis creixents del fàrmac i després de 72 hores es va mesurar la viabilitat cel·lular mitjançant un assaig MTT. Experiment representatiu, representat com la mitjana ($n=6$) \pm desviació estàndard.

Per tal d'intentar esbrinar els factors que determinen la sensibilitat al tractament amb l'AMG655, es va decidir comparar el seu efecte a nivell molecular sobre les línies cel·lulars CP15T i BxPC3, resistent i sensible a aquest fàrmac, respectivament. En primer lloc es va analitzar l'efecte de

l'AMG655 sobre la inducció de l'apoptosi a diferents temps (figura 41). L'anàlisi mitjançant western blot de l'expressió de PARP posa de manifest que després del tractament amb l'AMG655 només hi ha escissió de PARP, i per tant una inducció de l'apoptosi, a la línia sensible al tractament, BxPC3. A més, l'efecte màxim es dona després de 6 hores de tractament.

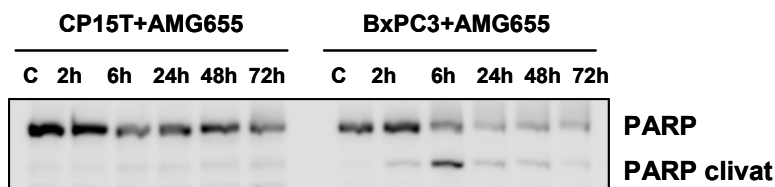


Figura 41. Comparació de l'efecte del tractament amb AMG655 a les línies cel·lulars CP15T i BxPC3. Anàlisi mitjançant western blot de l'expressió de la proteïna PARP després del tractament, 24 hores després de la sembra, de les línies CP15T i BxPC3 amb 10 nM o 0,5 nM AMG655, respectivament, i 2 µg/ml de proteïna G.

Tenint en compte aquestes dades prèvies, es va decidir determinar el patró d'expressió de proteïnes relacionades amb les vies de senyalització que regulen l'apoptosi mitjançant un *array* d'anticossos (Apoptosis Array Kit, R&D systems). Aquest va servir per comparar l'expressió de 35 proteïnes relacionades amb l'apoptosi a les línies cel·lulars CP15T i BxPC3 abans i després d'un tractament de 6 hores amb AMG655. Els resultats obtinguts evidencien clares diferències entre les dues línies cel·lulars (Figura 42). En aquest sentit, cal destacar que els nivells basals del receptor DR5, diana de l'AMG655, són clarament superiors a la línia BxPC3, sensible al tractament. A més, a la línia sensible els nivells basals de la proteïna anti-apoptòtica XIAP són significativament inferiors.

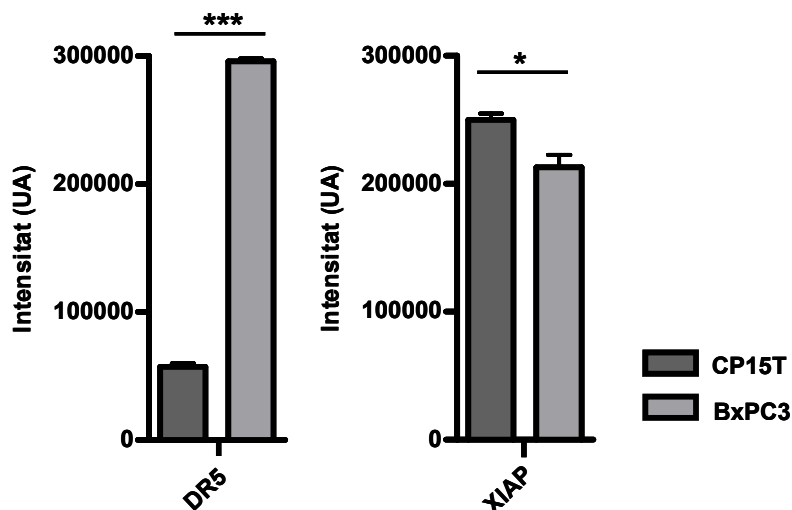


Figura 42. Caracterització dels nivells basals d'expressió de les proteïnes DR5 i XIAP a les línies cel·lulars CP15T i BxPC3. Comparació dels nivells basals d'expressió de les proteïnes DR5 i XIAP a les línies cel·lulars CP15T i BxPC3 mitjançant un array d'anticossos, essent $*p < 0,05$ i $***p < 0,001$.

D'altra banda, el tractament amb l'AMG655 només produeix una disminució significativa de proteïnes anti-apoptòtiques, com Bcl-x, i un augment de proteïnes pro-apoptòtiques, com el citocrom c i HTRA2/Omi (Figura 43), a la línia sensible. A més, a BxPC3 hi ha una clara inducció de l'apoptosi, com indica l'increment de la forma clivada de la caspasa-3, tot i l'increment de l'expressió de XIAP després del tractament. En aquest sentit, tot i augmentar XIAP a la línia BxPC3, la relació caspasa-3 clivada/XIAP d'aquesta línia és major a la de CP15T.

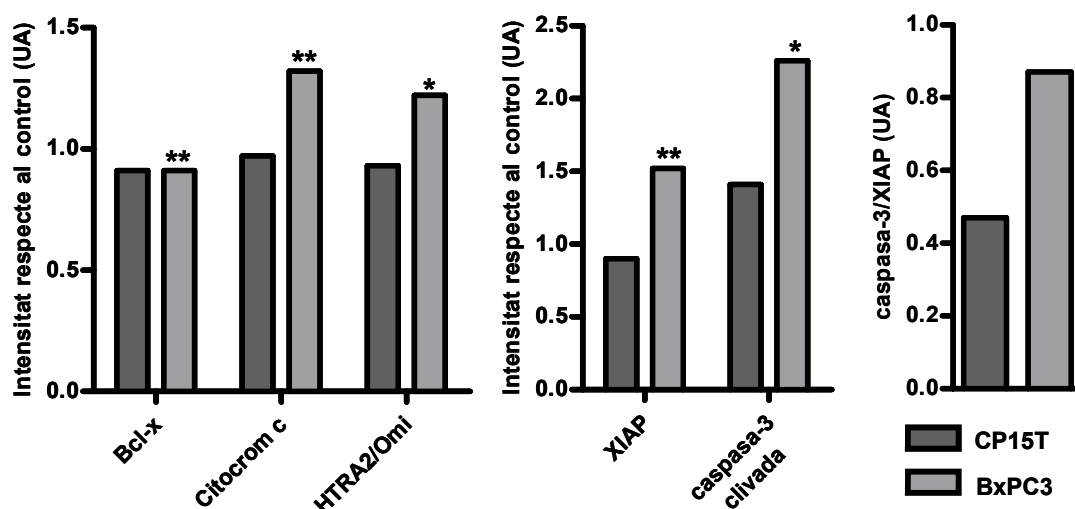
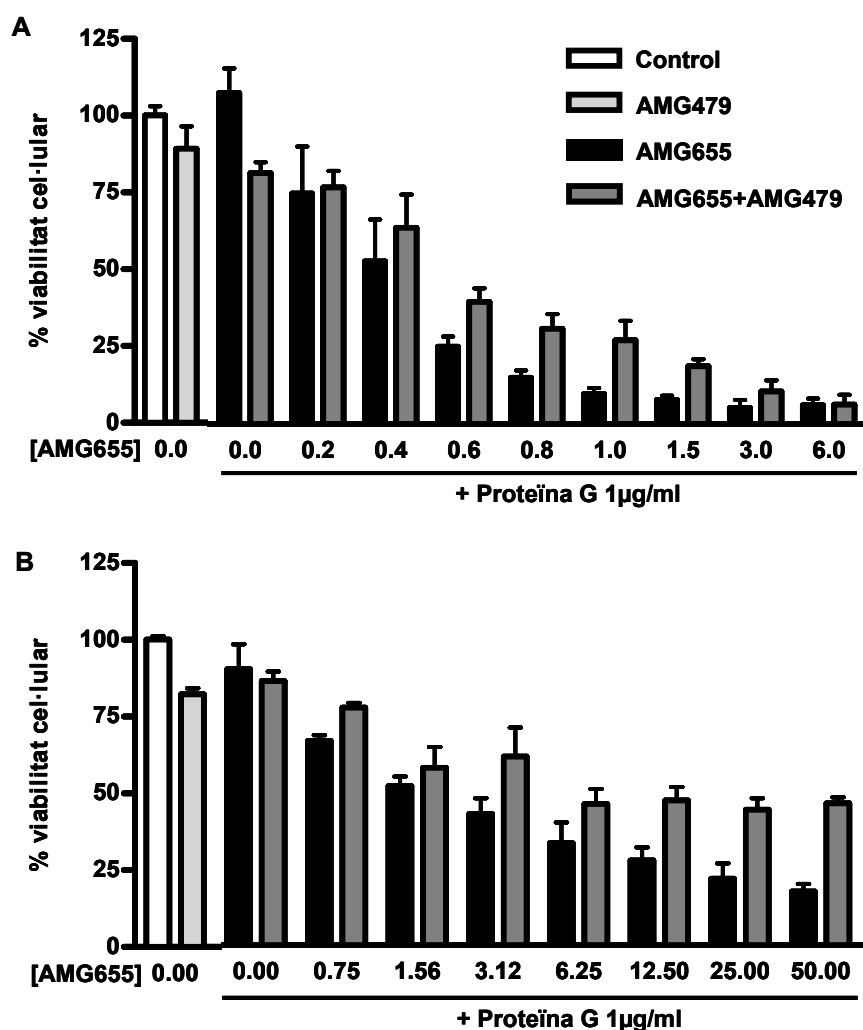


Figura 43. Caracterització de l'efecte del tractament amb AMG655 sobre l'expressió de diverses proteïnes relacionades amb l'apoptosi a les línies BxPC3 i CP15T. Efecte del tractament de les línies CP15T i BxPC3 durant 6 hores amb 10 nM o 0,5 nM AMG655, respectivament, i 2 µg/ml de proteïna G sobre els nivells d'expressió de proteïnes relacionades amb l'apoptosi. Representació d'algunes de les proteïnes que han patit una variació significativa respecte al seu control, essent $*p < 0,05$ i $**p < 0,01$.

Aquests resultats confirmen la importància de XIAP en la regulació de l'apoptosi, i concretament la seva relació amb els nivells d'escissió de la caspasa-3. En aquest sentit, la sobreexpressió de XIAP s'ha relacionat sovint amb mal pronòstic i amb resistència als tractaments quimioterapèutics (Fulda, 2011; Schimmer et al., 2006).

Després d'analitzar l'efecte del tractament amb AMG479 i AMG655 per separat, es va voler estudiar l'efecte sobre la viabilitat cel·lular de la seva combinació, ja que com s'ha comentat abans la inhibició d'IGF-IR pot disminuir l'activació de la via d'Akt, potenciant així els efectes de la inducció de DR5. La figura 44 mostra com el tractament amb una dosi fixa d'AMG479 propera a l'IC20 i dosis creixents d'AMG655 té un efecte antagònic, de manera que la combinació dels dos fàrmacs produeix una menor reducció de la viabilitat cel·lular que el tractament amb AMG655 sol.



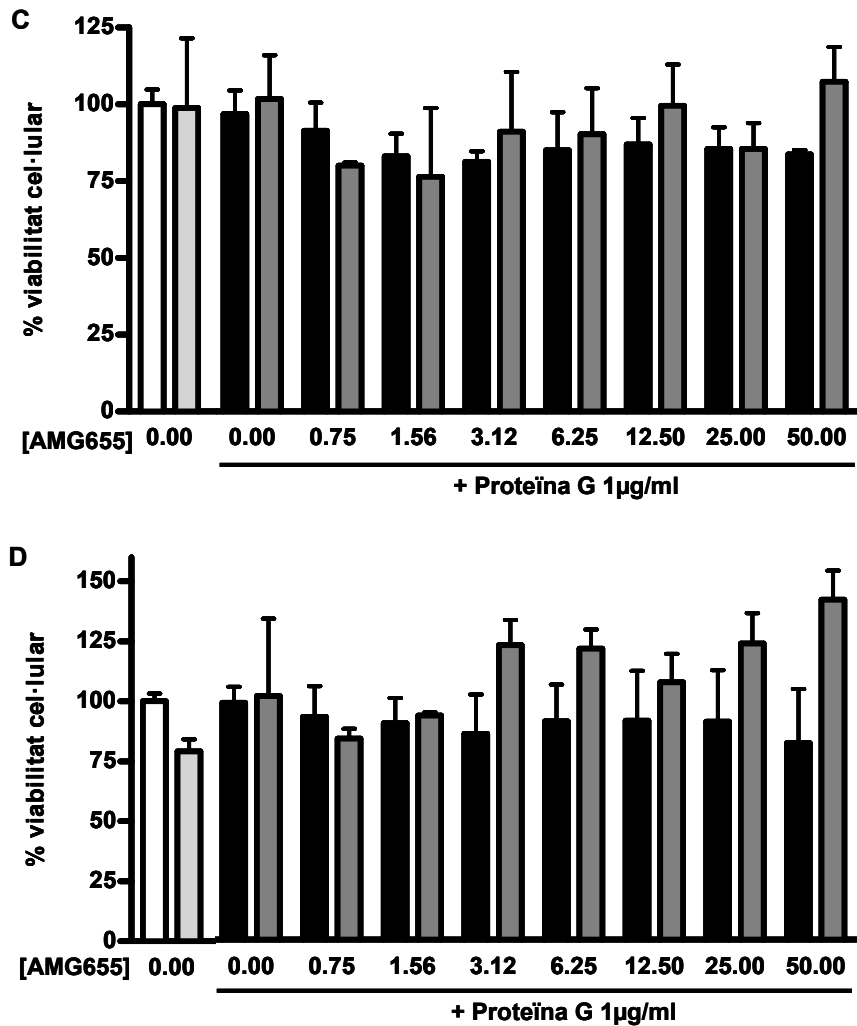


Figura 44. Sensibilitat de les línies BxPC3, Panc-1, CP15T i CP15A al tractament combinat amb AMG479 i AMG655. Les cèl·lules es van sembrar, 24 hores després es van tractar amb AMG479 25 nM i dosis creixents de AMG655 (nM) i després de 72 hores es va mesurar la viabilitat mitjançant un assaig MTT. Comparació de l'efecte sobre la viabilitat cel·lular a les línies BxPC3 (A), Panc-1 (B), CP15T (C) i CP15A (D). Experiments representatius, representats com la mitjana (n=4) \pm desviació estàndard.

Finalment, es va decidir comparar l'efecte sobre la viabilitat cel·lular dels anticossos monoclonals AMG479 i AMG655, amb el dels fàrmacs NVP-AEW541 i rhTRAIL. El NVP-AEW541, com s'ha esmentat abans, és un inhibidor tirosina-quinasa que evita la fosforilació d'IGF-IR avaluat en diversos estudis preclínic (Garcia-Echeverria et al., 2004). A més, s'ha descrit que aquest pot potenciar l'efecte d'un inductor de DR5 mitjançant la inhibició de la via de PI3K-Akt (Pennarun et al., 2010). D'altra banda, el rhTRAIL és una proteïna soluble basada en el lligand natural dels receptors

DR4 i DR5 amb la què s'han realitzat diversos estudis clínics (Ashkenazi, 2008). Així, el rhTRAIL activa els receptors DR4 i DR5, a diferència de l'AMG655, que s'uneix de forma específica a DR5 (Kaplan-Lefko et al., 2010).

En primer lloc es van tractar les línies cel·lulars BxPC3, Panc-1, CP15T i CP15A amb el NVP-AEW541. La figura 45 mostra com, a diferència dels resultats obtinguts després del tractament amb l'anticòs monoclonal AMG479, totes les línies cel·lulars assajades són sensibles al tractament amb aquest fàrmac, el qual aconsegueix eliminar totes les cèl·lules.

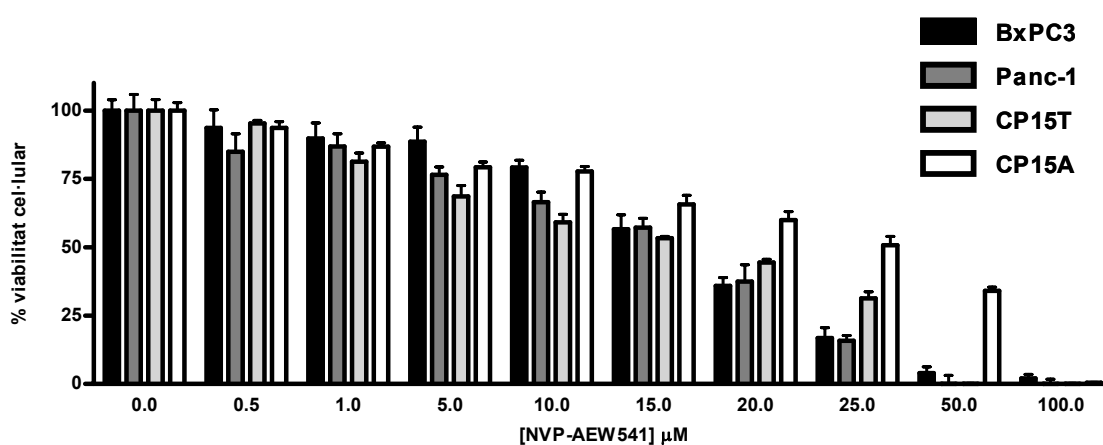


Figura 45. Sensibilitat de les línies cel·lulars BxPC3, Panc-1, CP15T i CP15A al tractament amb NVP-AEW541. Comparació de l'efecte sobre la viabilitat cel·lular del tractament amb NVP-AEW541. Les cèl·lules es van sembrar, 24 després es van tractar amb dosis creixents de NVP-AEW541 i després de 72 hores es va mesurar la viabilitat cel·lular mitjançant un assaig MTT. Experiment representatiu, representat com la mitjana (n=6) ± desviació estàndard.

Després es va comparar l'efecte a nivell molecular del tractament amb els fàrmacs NVP-AEW541 i AMG479 a la línia CP15T, que presenta una lleugera sensibilitat al tractament amb AMG479. Així, es va analitzar l'efecte del tractament amb aquests dos fàrmacs a diferents temps sobre la via de senyalització d'IGF-IR. Tal com mostra la figura 46, el tractament amb NVP-AEW541 inhibeix la via de senyalització d'IGF-IR, com indica la disminució de la fosforilació de les proteïnes diana del receptor IRS-1 i Akt. En canvi, després del tractament amb l'anticòs monoclonal AMG479 només hi ha una disminució transitòria de l'activació de la via d'IGF-IR al voltant de les 6 hores de tractament, que després es torna a activar. Per tant, sembla que

l'AMG479 no aconseguiria mantenir la inhibició de la via d'IGF-IR, a diferència del tractament amb el NVP-AEW541.

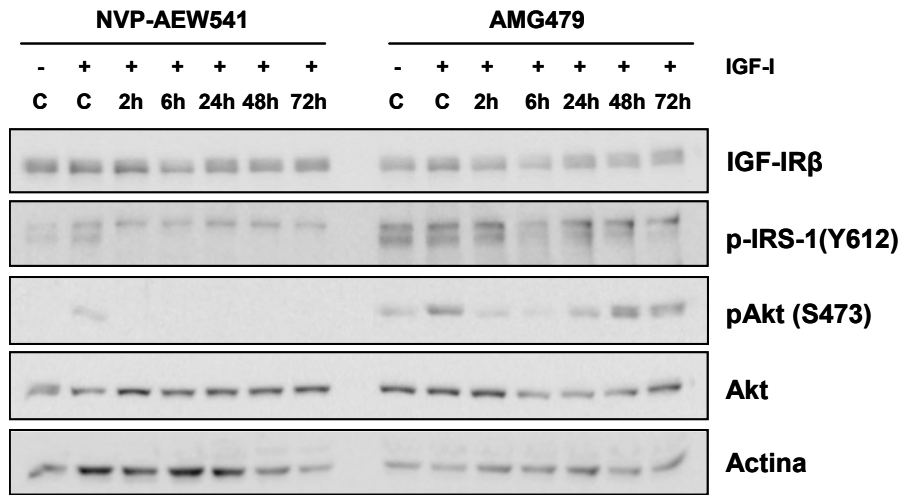


Figura 46. Comparació de l'efecte del tractament amb NVP-AEW541 o AMG479 sobre la via de senyalització d'IGF-IR. Anàlisi mitjançant western blot de l'expressió de proteïnes de la via de senyalització d'IGF-IR. La línia cel·lular CP15T es va tractar amb 15 μ M NVP-AEW541 o 50nM AMG479 24 hores després de la sembra i es va estimular amb 50 ng/ml IGF-I durant 20 minuts a 37°C abans de realitzar l'extracte proteic.

En aquest sentit, s'ha descrit que el receptor IGF-IR activat també es pot trobar a nivell intracel·lular, ja que és transportat al nucli per actuar com a factor de transcripció (Aleksic et al., 2010; Sarfstein et al., 2012). Per tant, la major potència citotòxica del NVP-AEW541, així com la major inhibició de la via d'IGF-IR provocada per aquest fàrmac, podria ser deguda a què es tracta d'una molècula relativament petita que pot entrar a l'interior cel·lular i, per tant, potencialment pot inhibir tant el receptor situat a la membrana com el localitzat a l'interior cel·lular, a diferència dels anticossos monoclonals com l'AMG479, que són de grans dimensions. Per aquest motiu, es va intentar esbrinar si la localització cel·lular del receptor IGF-IR podria estar influent en la resposta al tractament amb l'anticòs monoclonal AMG479. En primer lloc es va realitzar un anàlisi mitjançant citometria de flux de l'expressió d'IGF-IR. Tal com mostra la figura 47a, es va comparar el marcatge emprant un protocol no permeabilitzant, que permet tenyir el receptor present a la membrana plasmàtica, amb un protocol permeabilitzant, que facilita l'entrada de l'anticòs dins de la cèl·lula i en

conseqüència la tinció del receptor present a la membrana i a l'interior cel·lular. L'anàlisi mitjançant citometria de flux posa de manifest que el receptor és expressat a totes les cèl·lules, però que només una baixa proporció del receptor (menys d'un 10%) es troba a la membrana plasmàtica. En paral·lel es va realitzar una tinció immunocitoquímica del receptor IGF-IR (Figura 47b). Aquesta tècnica va permetre corroborar que aquest receptor es localitza majoritàriament a l'interior cel·lular. Concretament, IGF-IR té una presència predominant al nucli, on es pot observar una tinció puntejada. L'expressió d'aquest receptor gairebé exclusivament a nivell nuclear ha estat descrita anteriorment en PDAC i el patró d'expressió puntejat s'ha relacionat amb el paper d'aquesta proteïna en la regulació transcripcional (Aleksic et al., 2010), concretament estimulant la seva pròpia expressió (Sarfstein et al., 2012).

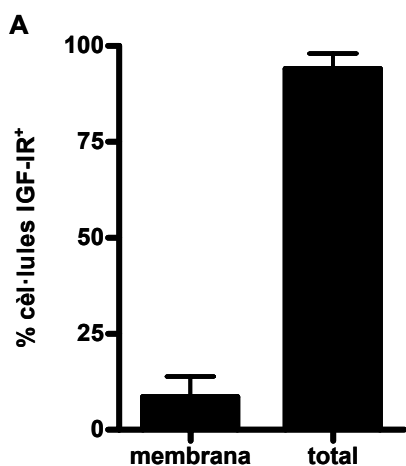
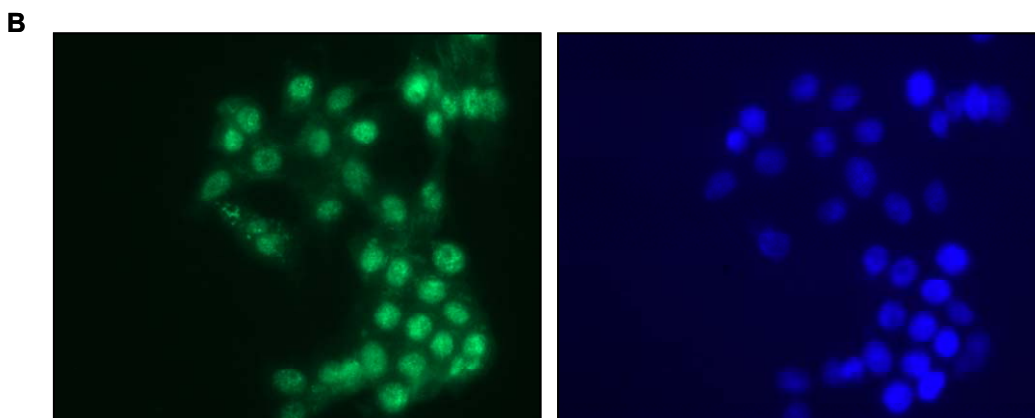


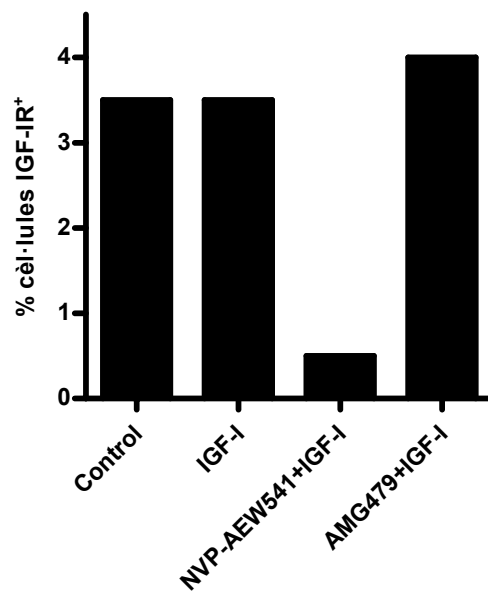
Figura 47. Anàlisi de la localització d'IGF-IR. Es va analitzar la localització del receptor IGF-IR a la línia cel·lular CP15T mitjançant citometria de flux (A) i una tinció immunocitoquímica. Imatges de microscopia de fluorescència (63x), representats en verd el receptor IGF-IR i en blau la tinció dels nuclis amb DAPI (B).



Finalment, es va comparar l'efecte del tractament amb el NVP-AEW541 o l'AMG479 sobre l'expressió d'IGF-IR a membrana mitjançant citometria de flux (figura 48). Els resultats obtinguts indiquen que l'estímul amb el lligand

IGF-I no produeix cap canvi en el percentatge de cèl·lules que expressen el receptor IGF-IR a membrana. A més, el tractament amb NVP-AEW541 redueix aquest percentatge, a diferència de l'AMG479. Aquest fet podria condicionar la resposta al fàrmac, ja que la presència de receptor a la membrana permetria la unió del lligand i consegüent estimulació de la via de senyalització, tal com mostra l'anàlisi mitjançant western blot. En aquest sentit, tot i que habitualment els anticossos monoclonals estan dissenyats per unir-se al receptor diana i induir la seva internalització i posterior degradació (Chu, 2011; King and Wong, 2012), s'ha descrit que aquest fenomen no es produeix amb l'AMG479 (Beltran et al., 2009).

Figura 48. Efecte del tractament amb NVP-AEW541 o AMG479 sobre l'expressió d'IGF-IR a membrana. Es van sembrar cèl·lules CP15T, 24 hores després es van tractar amb 15µM NVP-AEW541 o 50nM AMG479 i al cap de 6 hores es van estimular durant 20 minuts amb 50 ng/ml IGF-I. Anàlisi mitjançant citometria de flux del percentatge de cèl·lules que expressen IGF-IR a membrana.



A més, un altre fenomen que podria estar influent en la diferent resposta al tractament amb NVP-AEW541 o AMG479 és que en general els anticossos monoclonals tenen una major especificitat per a la unió al seu receptor diana que els inhibidors tirosina-quinasa. Aquest fet s'ha relacionat amb l'aparició de resistències, com a conseqüència del *cross-talk* amb altres receptors tirosina-quinasa. En canvi, els inhibidors tirosina-quinasa, que són més inespecífics, aconseguirien inhibir altres receptors relacionats (King and Wong, 2012). De fet, s'ha descrit que el lligand IGF-I també pot unir-se al receptor de la insulina (InR), generant resistència als tractaments basats en la inhibició de l'IGF-IR (Beltran et al., 2009).

D'altra banda, el tractament amb rhTRAIL va posar de manifest que hi ha línies cel·lulars sensibles al tractament (BxPC3 i Panc-1) i línies resistents (CP15T i CP15A), amb menys d'un 30% d'efecte sobre la viabilitat cel·lular (figura 49). Aquests resultats són similars als obtinguts després de tractar les cèl·lules amb l'anticòs monoclonal AMG655, de manera que es confirma que les línies cel·lulars CP15T i CP15A són resistents a la inducció de la via de TRAIL. A més, el fet que també siguin resistents al tractament amb rhTRAIL, que s'uneix també al receptor DR4, indicaria que aquestes cèl·lules presenten alguna alteració a la via de senyalització, per sota del receptor.

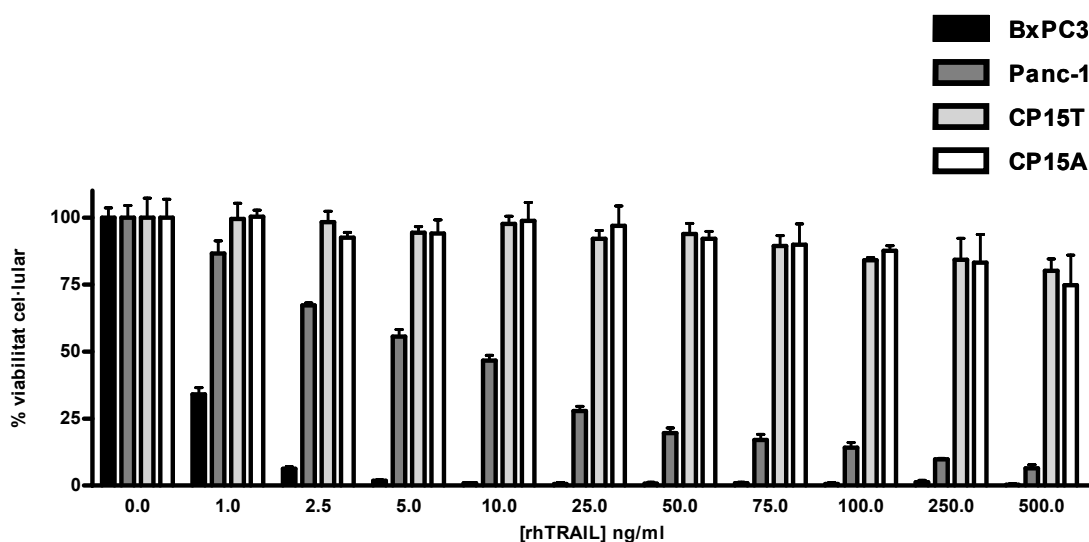


Figura 49. Sensibilitat de les línies cel·lulars BxPC3, Panc-1, CP15T i CP15A al tractament amb rhTRAIL. Comparació de l'efecte sobre la viabilitat cel·lular del tractament amb rhTRAIL. Les cèl·lules es van sembrar, 24 després es van tractar amb dosis creixents de rhTRAIL i després de 72 hores es va mesurar la viabilitat cel·lular mitjançant un assaig MTT. Experiment representatiu, representat com la mitjana (n=6) ± desviació estàndard.

Finalment es va analitzar l'efecte citotòxic de les combinacions del NVP-AEW541 i el rhTRAIL amb l'AMG479 i l'AMG655 a la línia BxPC3, sensible al tractament amb AMG655 i rhTRAIL. En primer lloc es van combinar els fàrmacs AMG479 i rhTRAIL. Tal com mostra la figura 50a, la combinació dels dos fàrmacs no millora l'efecte citotòxic del tractament amb els fàrmacs per separat. L'efecte antagònic produït per la combinació d'aquests fàrmacs és similar a l'obtingut en combinar AMG479 i AMG655 en aquesta línia cel·lular. Així, s'ha descrit que a les cèl·lules tumorals pancreàtiques es

dóna un fenomen d'activació recíproca entre Akt i XIAP, el qual permet coordinar la inducció de la proliferació i la inhibició de l'apoptosi (Jiang et al., 2012). D'aquesta manera, l'efecte antagònic observat en combinar l'AMG479 amb l'AMG655 o el rhTRAIL podria ser degut a la falta de manteniment de la inhibició d'Akt després del tractament amb l'AMG479 observat a l'anàlisi per western blot. La recuperació dels nivells basals d'activació d'Akt portarien a un increment de XIAP, el qual actuaria impedit la inducció de l'apoptosi per part de l'AMG655 i el hrTRAIL.

Després es van combinar el NVP-AEW541 i l'AMG655 (Figura 50b). Aquesta combinació millora l'efecte citotòxic observat en el tractament amb l'AMG655 sol, a diferència dels resultats obtinguts en combinar l'AMG479 i l'AMG655. Aquests resultats confirmen la potenciació de l'apoptosi induïda per DR5 per part del NVP-AEW541 descrita prèviament en línies cel·lulars de càncer de còlon (Pennarun et al., 2010). D'altra banda, les diferències observades respecte a la combinació de l'AMG655 amb l'AMG479 podrien ser degudes a què el NVP-AEW541 produeix una inhibició sostinguda d'Akt, el què impediria l'augment de XIAP. Aquest fet podria ser degut a què es tracta d'un inhibidor tirosina-quinasa. En aquest sentit, els inhibidors tirosina quinasa tenen una menor especificitat de substrat que els anticossos monoclonals, el què impediria l'activació de vies compensatòries (King and Wong, 2012). A més, el NVP-AEW541 és un molècula petita que pot entrar a l'interior cel·lular, de manera que potencialment podria inhibir tant el receptor situat a membrana com a nivell intracel·lular.

Finalment es va estudiar l'efecte de la combinació del NVP-AEW541 i el rhTRAIL (Figura 50c). En aquest cas no s'observa un efecte antagònic dels dos fàrmacs sobre la viabilitat cel·lular. A més, l'efecte citotòxic obtingut en combinar aquests dos fàrmacs és superior a l'obtingut en combinar el NVP-AEW541 amb l'AMG655. Aquest fet podria ser degut a què el rhTRAIL actua induint els receptors DR4 i DR5, a diferència de l'AMG655.

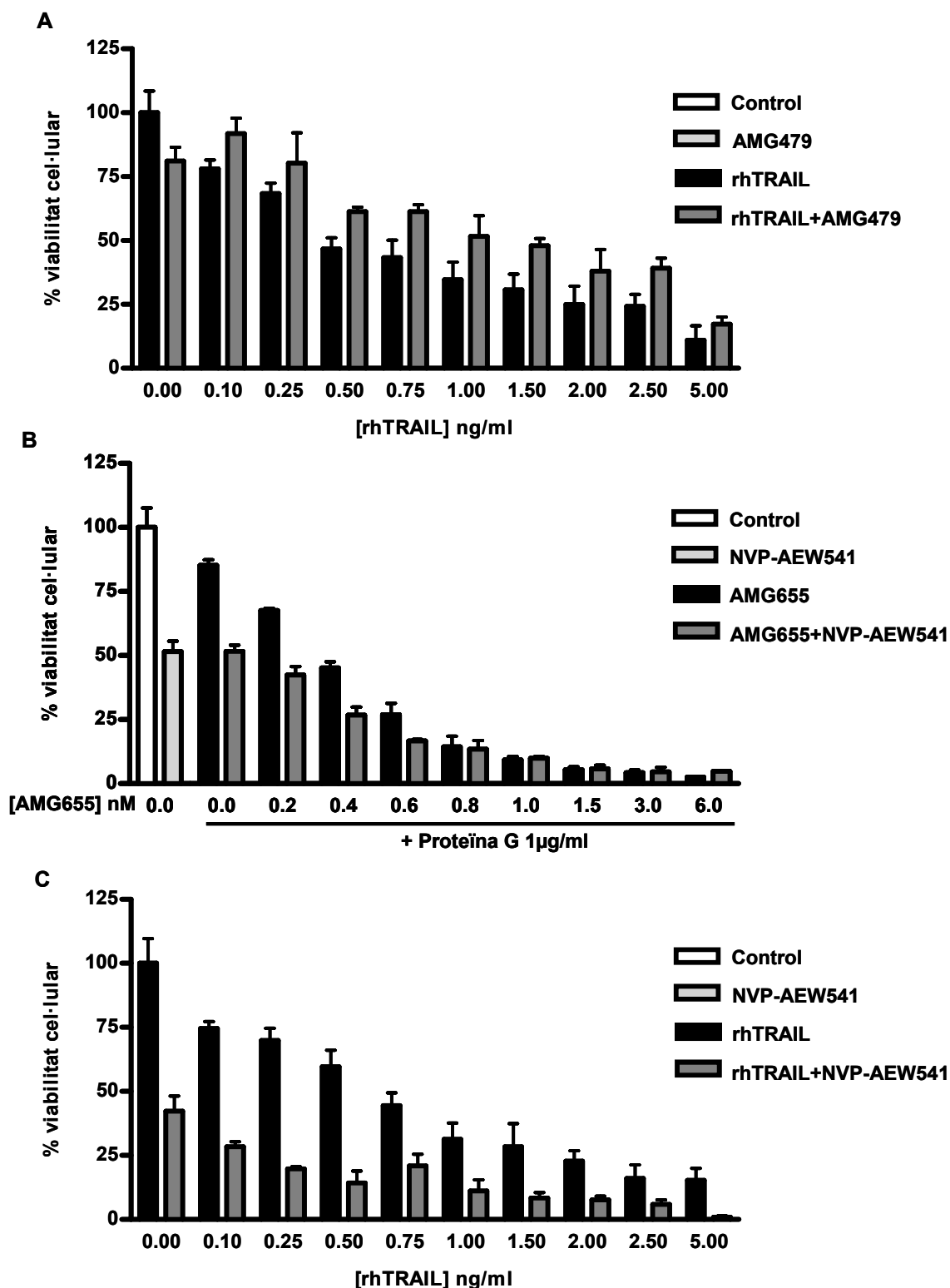


Figura 50. Sensibilitat de la línia BxPC3 al tractament combinat amb AMG479/NVP-AEW541 i AMG655/rhTRAIL. Les cèl·lules es van sembrar, 24 hores després es van tractar amb una dosi única d'un dels fàrmacs i dosis creixents de l'altre i després de 72 hores es va mesurar la viabilitat mitjançant un assaig MTT. Efecte sobre la viabilitat cel·lular de la combinació de AMG479 i rhTRAIL (A), NVP-AEW541 i AMG655 (B) o NVP-AEW541 i rhTRAIL (C). Experiments representatius, representats com la mitjana (n=4) ± desviació estàndard.

Per tant, el conjunt de resultats indiquen que la combinació d'un fàrmac inhibidor de la via de senyalització d'IGF-IR amb un inductor de l'apoptosi podria ser una bona estratègia terapèutica en PDAC. De totes maneres, cal escollir bé els fàrmacs que s'utilitzen, ja que malgrat estar dirigits a la mateixa diana, no tots són capaços d'induir els mateixos efectes. En aquest sentit, sembla que la combinació de fàrmacs més eficaç és la de l'inhibidor tirosina-quinasa NVP-AEW541 amb l'inductor de DR4/DR5 rhTRAIL.

3. ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES BASADES EN EL TRACTAMENT AMB VIRUS ONCOLÍTICS EN MODELS *IN VIVO* D'ADENOCARCINOMA DUCTAL PANCREÀTIC

La gran resistència als agents quimioterapèutics convencionals que presenta el càncer de pàncrees fa necessària la cerca de noves teràpies. La viroteràpia oncolítica, basada en l'ús de virus que infecten i lisen les cèl·lules tumorals, constitueix una alternativa als tractaments assajats fins ara, tot i que també pot ser emprada en combinació amb aquests. Un dels principals avantatges de l'ús en clínica dels virus oncolítics és la seva selectivitat i potència, ja que estan dissenyats per replicar específicament a les cèl·lules tumorals i poden ser manipulats genèticament per incrementar el seu potencial terapèutic i la seva especificitat, disminuint la possible toxicitat associada al seu ús.

De la mateixa manera que per a la resta de tractaments antitumorals, prèviament a l'ús dels virus oncolítics a nivell clínic és necessari analitzar la seva eficàcia en models preclínics. Als assajos preclínics amb virus oncolítics s'empren diferents tipus de models animals, segons la finalitat de l'estudi. Els models tumorals generats a partir de la implantació de teixit humà al pàncrees de ratolins immunodeprimits permeten avaluar l'eficàcia antitumoral dels virus oncolítics en cèl·lules de PDAC humanes en un entorn similar al microambient tumoral, el qual té un paper clau en l'aparició de resistència als tractaments, i, per tant, sembla que constitueixen una bona eina per als assajos preclínics (Wennier et al., 2011).

En aquest treball s'ha analitzat l'efecte antitumoral i sobre la subpoblació de CSC de diferents virus oncolítics en models d'una plataforma de tumors generada prèviament al grup de recerca a partir de fragments quirúrgics de pacients amb PDAC perpetuats al pàncrees de ratolins atímics (Perez-Torras et al., 2011).

3.1. Efecte antitumoral del virus ICOVIR-17K

L'ús de virus oncolítics en el tractament del càncer sembla prometedor i, de fet, els primers assajos clínics amb virus oncolítics han demostrat la seva seguretat, fins i tot després de ser administrats per via sistèmica. De totes maneres, a nivell clínic la primera generació de virus oncolítics només ha obtingut efectes antitumorals moderats (Kirn, 2001; Nemunaitis et al., 2007; Reid et al., 2002).

Una de les principals limitacions que contribueix a aquests pobres resultats és la dificultat dels virus oncolítics per disseminar dins dels tumors sòlids, en part deguda a la seva gran mida (90 nm), superior a la dels fàrmacs quimioterapèutics convencionals. A més, els tumors sòlids presenten una gran quantitat de matriu extracel·lular (ECM), així com una elevada pressió al líquid intersticial, el què forma una barrera física que impedeix l'entrada del virus al tumor (Guedan et al., 2010). En aquest sentit, el PDAC es caracteritza per la presència d'un dens estroma que actua induint la proliferació de les cèl·lules tumorals alhora que les protegeix de l'acció dels fàrmacs en formar una barrera física (Hidalgo and Von Hoff, 2012).

Una de les estratègies emprades per millorar la disseminació intratumoral dels virus és la degradació de la ECM mitjançant enzims proteolítics (Ganesh et al., 2007; Kuriyama et al., 2001). Un element important de la ECM és l'àcid hialurònic (HA), el qual es troba en concentracions elevades en diferents tipus de tumors, les quals s'han relacionat amb invasió i metàstasi (Toole, 2004). Per tant, sembla que la degradació de l'HA podria constituir una bona estratègia terapèutica. En aquest sentit, s'ha demostrat que la degradació de l'HA per acció de la hialuronidasa potencia l'acció dels fàrmacs quimioterapèutics i dels virus oncolítics en facilitar la seva arribada a les cèl·lules tumorals (Baumgartner et al., 1998; Desoize and Jardillier, 2000; Guedan et al., 2010). A més, s'ha descrit que la hialuronidasa presenta activitat antitumoral intrínseca (Shuster et al., 2002).

En un assaig realitzat en col·laboració amb el laboratori de Recerca Translacional de l'ICO-IDIBELL es va comparar l'efecte antitumoral de l'administració sistèmica dels virus oncolítics ICOVIR15K i ICOVIR17K en un

model tumoral ortotòpic. L'ICOVIR15K és un adenovirus modificat per augmentar la seva potència i selectivitat per replicar a les cèl·lules tumorals amb la via E2F-RB mutada (Rojas et al., 2012), mentre el virus ICOVIR17K és una modificació del virus ICOVIR15K armat amb el gen de la hialuronidasa soluble d'esperma humà PH20. L'estructura dels virus emprats en aquest experiment es troba detallada a la figura 51.

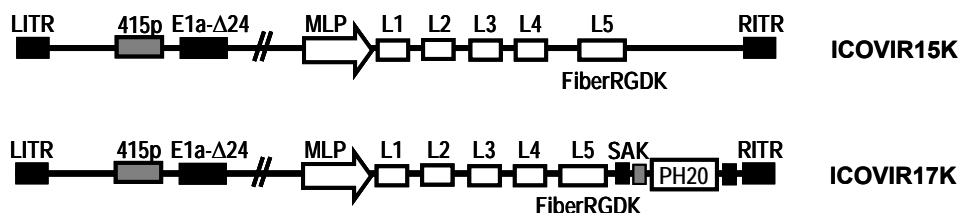


Figura 51. Esquema del genoma dels adenovirus ICOVIR15K i ICOVIR17K. L'ICOVIR15K té modificat E1A (deleció $\Delta 24$) per millorar la selectivitat i la potència oncolítica, així com el motiu RGD substituint el motiu d'unió HSG, que millora la relació tumor/fetge. Al virus ICOVIR17K s'ha introduït el transgèn *PH20* sota el control del promotor MLP.

En primer lloc es va analitzar l'expressió d'HA als models tumorals ortotòpics CP13 i CP15 mitjançant una tinció immunohistoquímica. La figura 52 mostra que en tots dos models hi ha presència d'HA a la ECM i com aquest és més abundant al model CP13. Per aquest motiu, es va escollir el model CP13 per a l'assaig *in vivo* de l'efecte antitumoral del virus ICOVIR17K.

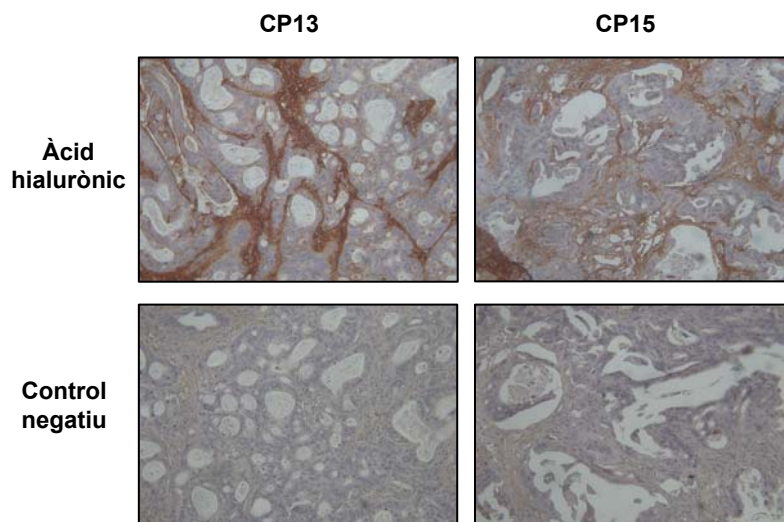


Figura 52. Tinció immunohistoquímica d'àcid hialurònic (HA). La tinció de l'HA es va realitzar als models tumorals CP13 i CP15. El control negatiu va ser tractat amb hialuronidasa per eliminar l'HA present. Microfotografia (20x).

A continuació es va analitzar la biodistribució del virus ICOVIR17K administrat per via sistèmica al model CP13. Així, es van implantar fragments tumorals al pàncrees de 4 ratolins atímics i quan els tumors van ser detectats per palpació es van injectar a la vena de la cua $4 \cdot 10^{10}$ vp del virus ICOVIR17K. Els ratolins es van sacrificar 3 dies després de l'administració del virus i es van obtenir mostres dels diferents òrgans per tal de determinar la càrrega viral mitjançant una PCR en temps real, tal com mostra la figura 53. Els resultats obtinguts indiquen que el virus arriba correctament al tumor, tot i ser retingut majoritàriament a nivell hepàtic, amb uns valors similars als descrits prèviament (Tesi Marta Giménez-Alejandre).

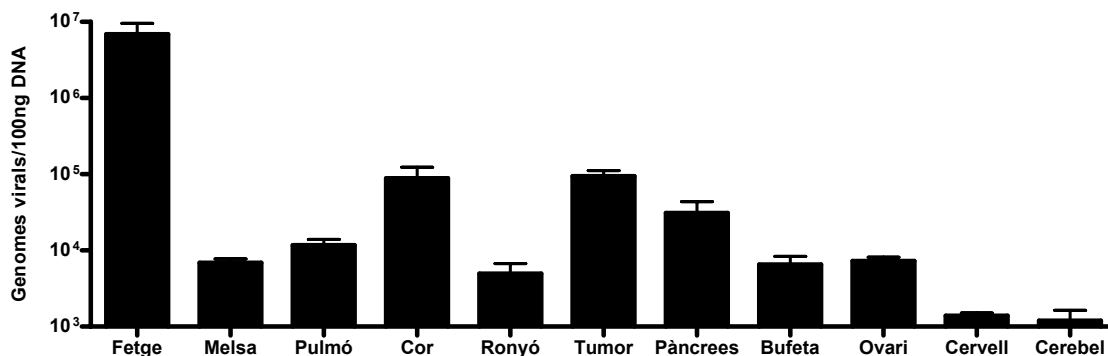


Figura 53. Biodistribució del virus ICOVIR17K. Quantificació mitjançant una PCR a temps real dels genomes virals presents a diferents òrgans 3 dies després de la injecció de $4 \cdot 10^{10}$ vp del virus ICOVIR17K per via sistèmica, representada com a mitjana ($n=4$) \pm error estàndard.

Finalment es va comparar l'efecte antitumoral dels virus ICOVIR15K i ICOVIR17K. En aquest cas es van implantar fragments del model CP13 al pàncrees de 30 ratolins atímics i quan es va detectar per palpació la presència de tumor a tots els animals es van distribuir aquests en tres grups de tractament: control (PBS), ICOVIR15K i ICOVIR17K. El tractament es va realitzar per via sistèmica, amb una dosi de $4 \cdot 10^{10}$ vp de virus per ratolí. Passats 30 dies després de la injecció dels virus, els animals es van sacrificar i es van pesar els tumors. A la figura 54 es pot veure com no hi ha diferències significatives en el pes dels tumors després del tractament. Per tant, tot i que inicialment el virus arriba correctament al tumor, tal com mostra l'assaig de biodistribució, aquest no mostra l'efecte antitumoral esperat.

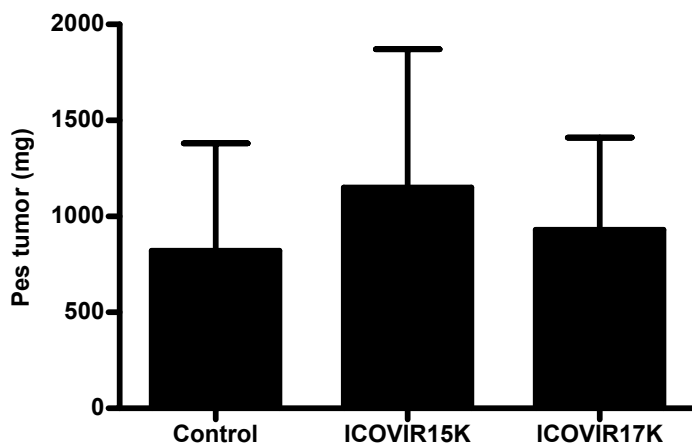


Figura 54. Efecte antitumoral dels virus ICOVIR15K i ICOVIR17K. Pes dels tumors (mg) després de 30 dies de la injecció sistèmica de $4 \cdot 10^{10}$ vp dels virus ICOVIR15K i ICOVIR17K. Els resultats són la mitjana ($n=10$) \pm desviació estàndard.

Aquests resultats contrasten amb publicacions anteriors on es descriu un potent efecte antitumoral del virus ICOVIR15K (Rojas et al., 2012) i del tractament amb hialuronidasa, ja sigui en coadministrar-la amb adenovirus replicatius (Ganesh et al., 2008) o mitjançant la infecció amb adenovirus armats amb el gen de la hialuronidasa (Guedan et al., 2010). De totes maneres, cal destacar que en aquestes publicacions els experiments d'eficàcia antitumoral estan realitzats en models tumorals obtinguts a partir de la injecció de línies cel·lulars al teixit subcutani de ratolins immunodeprimits, fet que podria explicar en part les diferències observades. Els models subcutanis són molt emprats per assajar la sensibilitat a tractaments antitumorals, gràcies a què són fàcils d'obtenir. No obstant, aquests no aconsegueixen reproduir l'heterogeneïtat molecular i cel·lular característiques del PDAC. En aquest sentit, els models ortotòpics generats a partir de fragments quirúrgics semblen millors models per als estudis preclínic, ja que preserven millor aquesta heterogeneïtat, així com les interaccions amb l'entorn tumoral (Perez-Torras et al., 2011). Per aquest motiu, es va decidir analitzar les diferències existents entre tumors ortotòpics generats per implantació de fragments de tumors i els obtinguts a partir de la injecció de digerits tumorals o una línia cel·lular.

Comparació de la taxa de replicació viral en tumors generats per implantació de fragments de tumors i tumors obtinguts a partir de la injecció de digerits tumorals

Per tal d'esbrinar si hi ha diferències en la taxa de replicació viral de tumors ortotòpics generats a partir de fragments o digerits tumorals, es va emprar l'adenovirus ICOVIR15-Luc (generat al laboratori del Dr. Alemany per Luís Rojas) (Figura 55a), el qual expressa el gen reporter de la luciferasa dependent de replicació viral, i permet fer un seguiment no invasiu del virus. Es van generar tumors ortotòpics del model CP13 en ratolins atímics, a partir de fragments de 10 mg de tumor o per injecció de $5 \cdot 10^5$ cèl·lules d'una suspensió cel·lular obtinguda en digerir amb col·lagenasa un fragment del mateix tumor. Quan es va detectar presència de tumor a tots els ratolins, es va procedir a injectar PBS (grup control) o $4 \cdot 10^{10}$ vp del virus ICOVIR15-Luc per via sistèmica, a la vena de la cua.

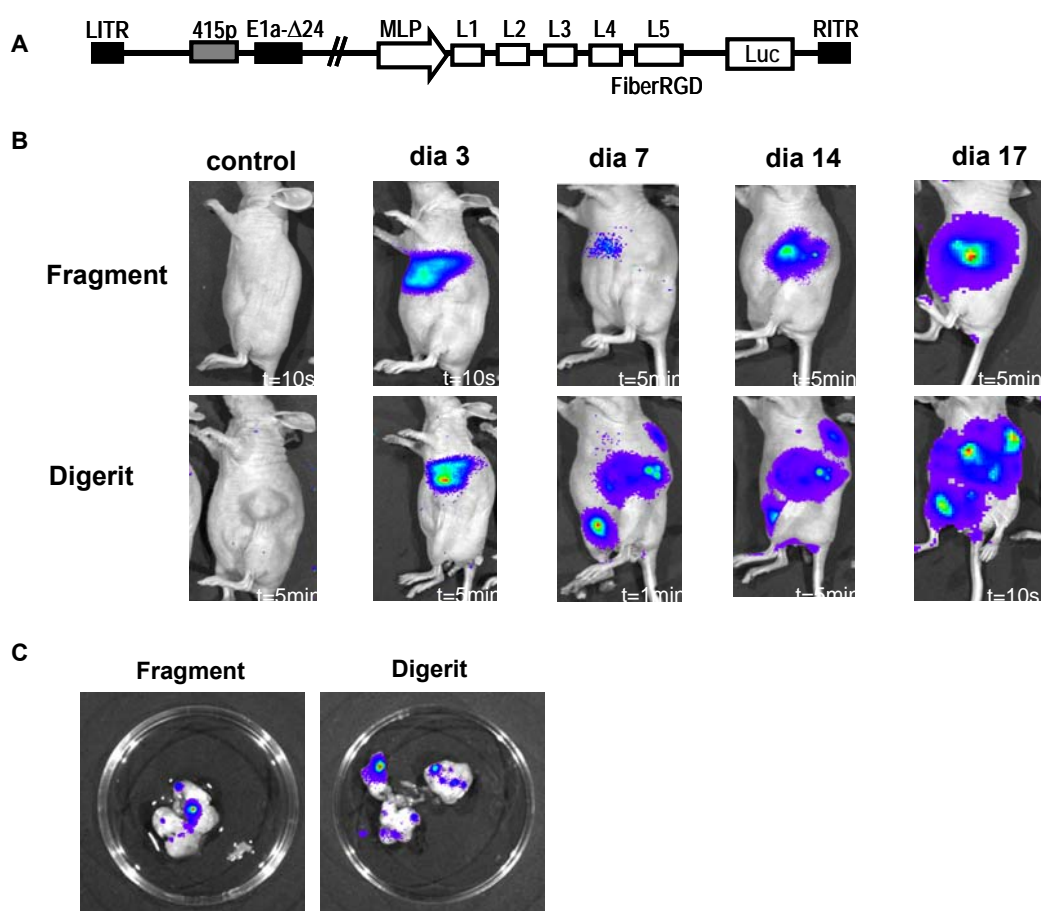


Figura 55. Efecte de la infecció amb el virus ICOVIR15-Luc. Esquema del genoma de l'adenovirus ICOVIR15-Luc (A). Detecció *in vivo* de la replicació viral durant la realització de l'experiment (B) i als tumors al final de l'experiment (C).

Es va realitzar un seguiment de la replicació *in vivo* durant la realització de l'assaig, mitjançant la detecció del senyal bioluminiscent generat per l'expressió de la luciferasa després d'injectar luciferina (Figura 55b). En els dos tipus de tumors, inicialment el virus s'acumula majoritàriament al fetge, on és eliminat, però més tard, a mesura que el què ha arribat al tumor replica, es produeix un augment de virus al tumor, major als generats a partir de digerits tumorals. A més, al final de l'experiment, 17 dies després de la injecció del virus, es van extreure i analitzar els tumors. Cal destacar que el virus no es localitza de manera uniforme al tumor, sinó que es detecta en focus de replicació aïllats (Figura 55c). A més, es va determinar la quantitat de virus present. D'una banda es va quantificar la replicació viral mitjançant la mesura del senyal bioluminiscent generat per la luciferasa expressada al tumor (Figura 56a), que va mostrar que hi ha una major expressió d'aquest enzim als tumors generats a partir de digerits, tot i que no estadísticament significativa. A més, es va confirmar, mitjançant una PCR en temps real, una major presència de genomes virals als tumors generats a partir de digerits, però no significativa (Figura 56b). Per tant, sembla que el virus ICOVIR15-Luc té una tendència a replicar millor als tumors generats a partir de digerits que als obtinguts a partir de fragments tumorals.

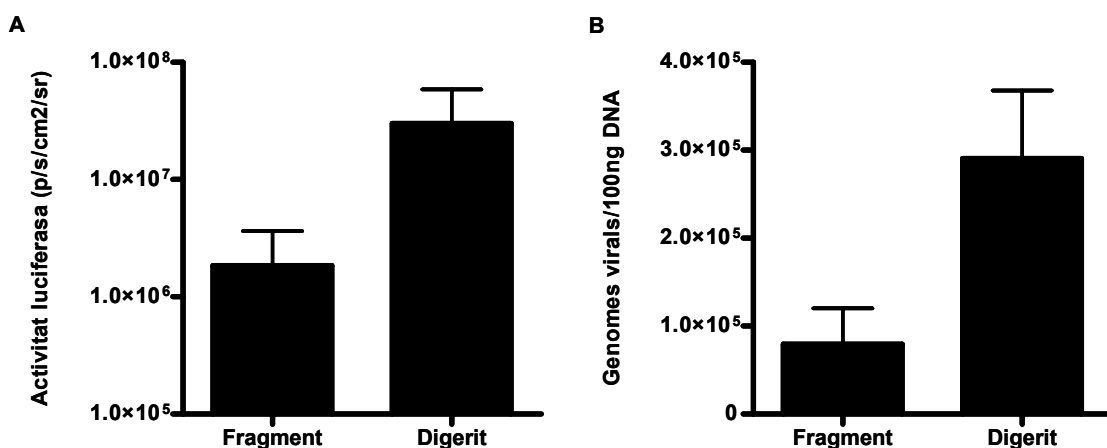


Figura 56. Quantificació de la replicació del virus ICOVIR15-Luc. Al final de l'experiment, 17 dies després de la injecció de $4 \cdot 10^{10}$ vp del virus ICOVIR15-Luc per via sistèmica, es va determinar la replicació viral mitjançant la quantificació del senyal bioluminiscent generat per l'expressió de luciferasa (A) o la quantificació mitjançant una PCR en temps real dels genomes virals presents als tumors (B). Els resultats són la mitjana ($n=4$) \pm error estàndard.

A continuació, per tal d'intentar esbrinar la causa d'aquestes diferències, es va comparar l'estructura histològica dels dos tipus de tumors. Així, es va realitzar una tinció hematoxilina-eosina i la tinció tricròmica de Masson, que tenyeix les fibres presents a l'estroma. Als tumors CP13 (Figura 57a) formats a partir de fragments s'observa una estructura glandular ben diferenciada envoltada per una fibrosi abundant i focus de mucosecreció, i als tumors CP13 formats a partir de digerits l'estructura glandular està força conservada, tot i que hi ha una reducció de l'estroma.

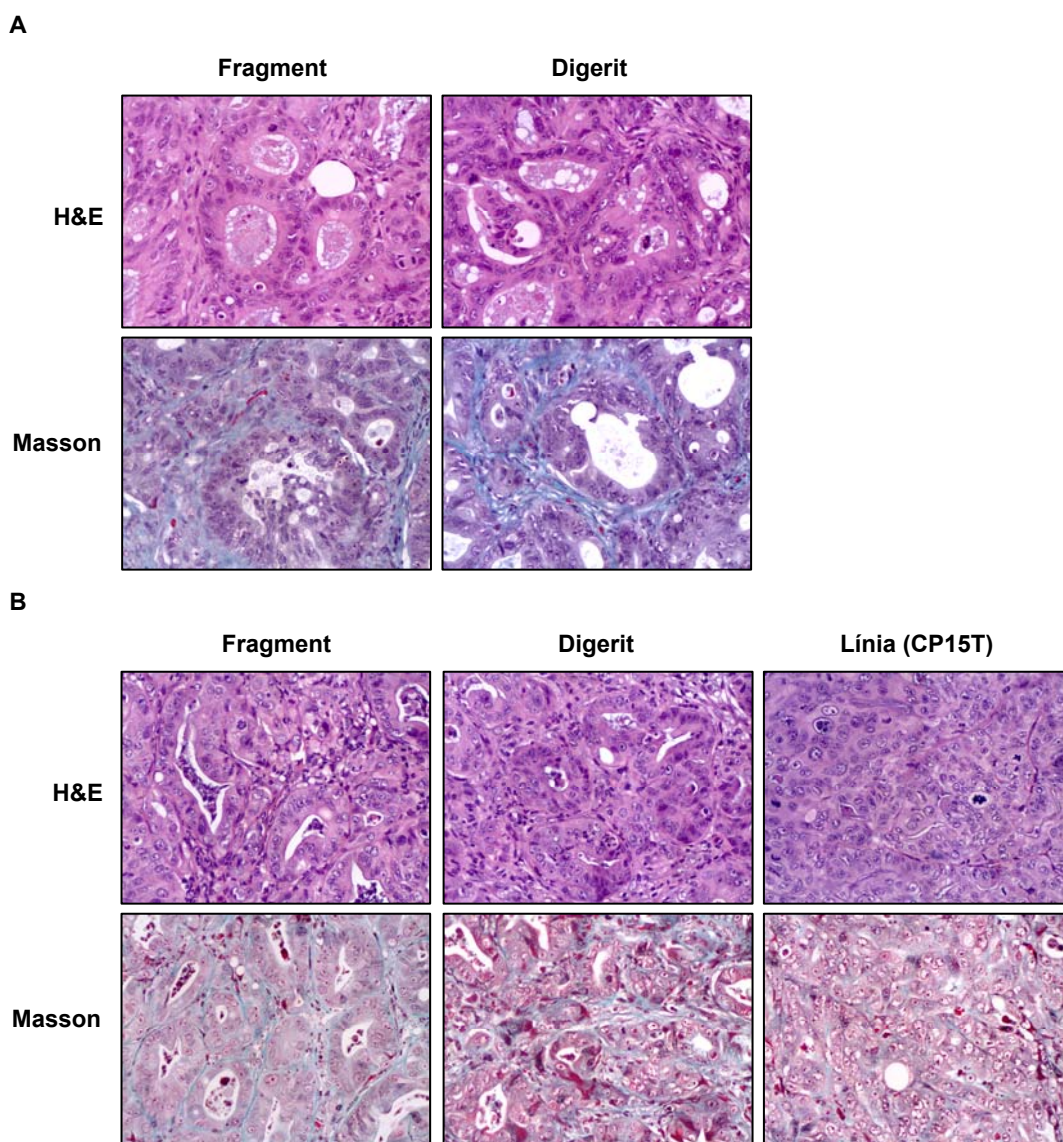


Figura 57. Comparació de l'estructura histològica de tumors generats a partir de fragments o a partir de la injecció de digerits tumorals o línia cel·lular. Tinció hematoxilina-eosina (H&E) i tinció tricròmica de Masson dels models CP13 (A) i CP15 (B). Microfotografies (20x).

Per tant, els resultats de l'anàlisi histològic posen de manifest que al model CP13 hi ha una gran quantitat de fibres estromals. Aquestes podrien estar impeding l'arribada dels virus oncolítics ICOVIR15K i ICOVIR17K a les cèl·lules tumorals, ja que els adenovirus oncolítics poden infectar les cèl·lules de l'entorn tumoral però estan dissenyats per replicar de forma eficient només a les cèl·lules tumorals, amb la via de E2F-RB alterada. La presència d'aquesta barrera fibròtica podria explicar la manca d'efecte antitumoral d'aquests virus en aquest model. A més, els tumors formats a partir de digerits tenen una menor quantitat d'estroma, el què podria explicar la major taxa de replicació viral observada en aquests tumors.

També es va analitzar l'estructura dels dos tipus de tumors al model CP15. A més, en aquest model també es va comparar l'estructura dels tumors obtinguts a partir de la injecció d'una línia cel·lular derivada del model, la línia CP15T. Els tumors del model CP15 (Figura 57b) són més cel·lulars, amb una menor quantitat d'estroma. En aquest cas, els tumors formats a partir de fragments i els formats a partir de digerits presenten una estructura glandular irregular, mentre els tumors formats a partir de la línia CP15T tenen una estructura més indiferenciada. Finalment, els tumors formats a partir de la línia cel·lular pràcticament han perdut l'estructura glandular. Els resultats obtinguts concorden amb estudis previs on s'ha demostrat que els models generats a partir de línies cel·lulars normalment presenten una histologia més homogènia i indiferenciada, degut a la pressió selectiva exercida sobre les cèl·lules mantingudes *in vitro* durant llargs períodes temps (Rubio-Viqueira and Hidalgo, 2009). Per tant, l'ús de mostres tumorals sembla més adequada per a l'assaig de teràpies *in vivo*, ja que reproduïx amb més fidelitat l'heterogeneïtat característica del PDAC.

D'altra banda, un altre factor que podria limitar la replicació viral seria la presència de cèl·lules murines al tumor, ja que els adenovirus només tenen capacitat per infectar cèl·lules humanes. Per aquest motiu, i donat que en aquest treball s'ha emprat teixit tumoral humà perpetuat en un model murí, es va decidir analitzar l'origen de les cèl·lules presents a l'estroma tumoral. Amb aquesta finalitat es va realitzar una tinció amb colorant DAPI de talls dels tumors CP13 i CP15 generats a partir de fragments. El DAPI s'uneix al DNA i permet diferenciar les cèl·lules humanes de les murines segons la tinció de l'heterocromatina centromèrica, que és clarament visible a les

cèl·lules murines (Gilbert et al., 2005). Les imatges obtingudes (Figura 58) mostren als dos models la presència de cèl·lules tumorals humanes i diversos tipus de cèl·lules murines, com cèl·lules endotelials o fibroblasts. Per tant, es confirmaria la presència de cèl·lules murines a l'estroma que envolta les cèl·lules tumorals, que formarien una barrera on els virus quedarien retinguts.

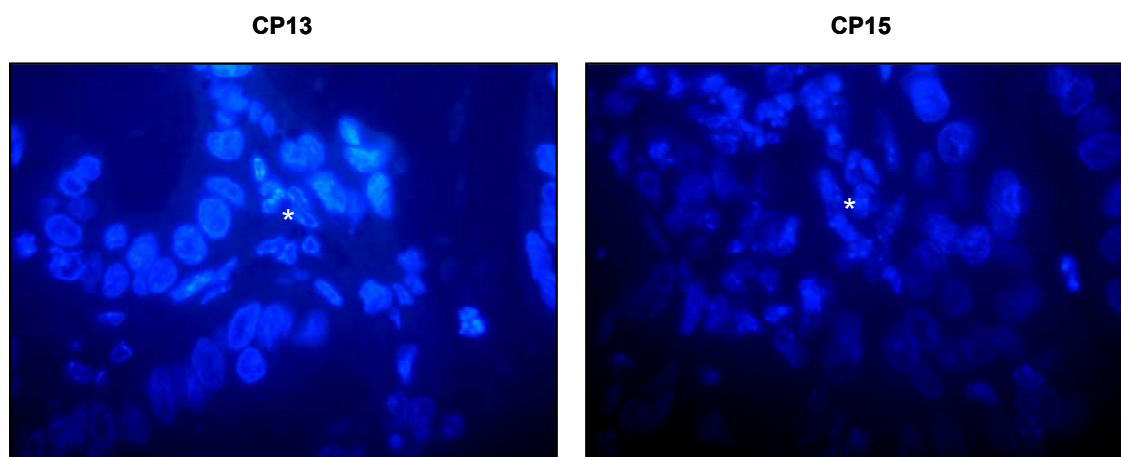


Figura 58. Tinció de l'heterocromatina centromèrica dels models CP13 i CP15. Tinció de l'heterocromatina centromèrica amb el colorant DAPI (de color blau) dels tumors CP13 i CP15 generats a partir de fragments. S'indica amb un asterisc (*) la presència de cèl·lules murines. Imatge de microscopia de fluorescència (100x).

Finalment, per corroborar aquesta hipòtesi, es va realitzar una tinció amb DAPI de cultius cel·lulars primaris dels models CP13 i CP15. Al cultiu primari generat a partir de la digestió amb col·lagenasa del model CP13 es van obtenir cèl·lules amb morfologia fibroblàstica amb una clara tinció de l'heterocromatina centromèrica (Figura 59a). L'absència de cèl·lules amb morfologia epitelial (tumorals) al cultiu primari és deguda a què durant l'establiment del cultiu, que va durar varies setmanes, la subpoblació amb morfologia fibroblàstica es va acabar seleccionant. Aquest fet és degut a la seva major proporció inicial, a més d'una taxa de replicació més elevada. En canvi, a partir del model CP15 es va obtenir un cultiu primari amb unes cèl·lules amb morfologia fibroblàstica amb l'heterocromatina centromèrica visible i un segon tipus cel·lular de morfologia epitelial on no és evident la presència d'heterocromatina centromèrica (Figura 59b). Per tant, aquest segon experiment va confirmar la presència de fibroblasts d'origen murí als models ortotòpics CP13 i CP15. D'altra banda, d'aquest experiment també

es desprèn que als tumors generats a partir de digerits tumorals l'estroma també és d'origen murí.

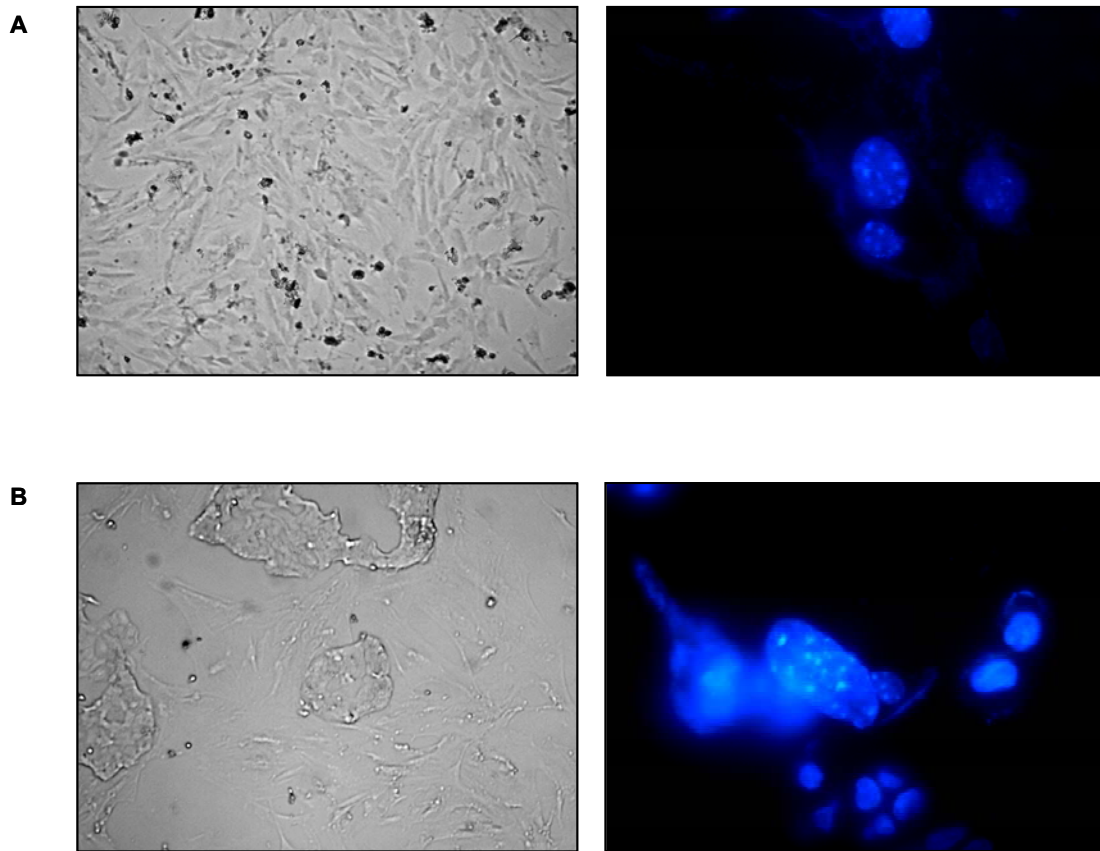


Figura 59. Detecció de l'heterocromatina centromèrica en cultius primaris. Establiment de cultius primaris (esquerra) i tinció de l'heterocromatina centromèrica amb el colorant DAPI (de color blau, a la dreta) dels models tumorals CP13 (A) i CP15 (B). Imatges de microscopia de contrast de fase (5x, a l'esquerra) i microscopia de fluorescència (100x, a la dreta).

El conjunt de resultats obtinguts posen de manifest la complexitat dels models tumorals ortotòpics humans i la limitació dels tumors generats a partir de fragments per a l'assaig de virus oncolítics, els quals requereixen d'un entorn tumoral humà per a exercir la seva acció terapèutica. Per aquest motiu, per a la resta d'experiments amb adenovirus oncolítics es van generar tumors ortotòpics a partir de digerits tumorals, que conserven l'estructura original del tumor però tenen una menor presència d'estroma murí, el qual pot interferir en la replicació viral.

3.2. Comparació de l'efecte dels virus ICOVIR-15, ICOVIR15-TK/GCV i AduPARE1A sobre el tumor i la subpoblació de cancer stem cells

Tal com s'ha esmentat prèviament, recentment ha guanyat importància la teoria de les cancer stem cells (CSC) per explicar l'aparició de recidives en diferents tipus de tumor, com el PDAC, segons la qual les CSC constitueixen una petita subpoblació de cèl·lules tumorals amb una major capacitat tumorigènica i responsable en part de l'aparició de resistències als tractaments convencionals. Per aquest motiu, les CSC són considerades una bona diana terapèutica en el tractament del PDAC (Hermann et al., 2007; Li et al., 2007).

L'ús d'adenovirus oncolítics per al tractament del càncer ha incrementat en els darrers anys. A més, sembla que aquests podrien constituir una bona eina per eliminar les CSC, ja que poden evadir alguns dels mecanismes de resistència que presenta aquesta subpoblació cap als tractaments de quimioteràpia i radioteràpia convencionals (Cripe et al., 2009). En aquest sentit, s'han publicat diversos estudis que demostren la capacitat dels virus oncolítics per eliminar les CSC en diferents tipus de tumors (Eriksson et al., 2007; Jiang et al., 2007).

En col·laboració amb el laboratori de Teràpia Genètica de l'IDIBAPS, es va assajar l'efecte antitumoral i concretament sobre les CSC de la injecció sistèmica dels adenovirus oncolítics ICOVIR15, ICOVIR15-TK/GCV i AduPARE1A (Figura 60). L'ICOVIR15 és un adenovirus modificat per replicar selectivament a les cèl·lules tumorals, amb la via E2F-RB alterada, (Rojas et al., 2010). A l'ICOVIR15 el motiu RGD es troba al *HI-loop* del *knob* de la fibra, mentre a l'ICOVIR15K, emprat a l'experiment anterior, el motiu RGD es troba al *shaft*, substituint el motiu KKTK d'unió a HSG. Aquesta modificació redueix la transducció del ICOVIR15K al fetge, millorant l'eficàcia antitumoral del virus (Rojas et al., 2012). D'altra banda, el virus ICOVIR15-TK és una modificació del ICOVIR15 on s'ha introduït el gen de la timidina quinasa (TK), que actua com a gen suïcida en ser administrat amb ganciclovir (GCV) (Jose et al., 2013). Finalment, AduPARE1A és un virus

amb replicació condicional controlada pel promotor uPAR, que es troba sobreexpressat en cèl·lules tumorals i metastàtiques (Huch et al., 2009).

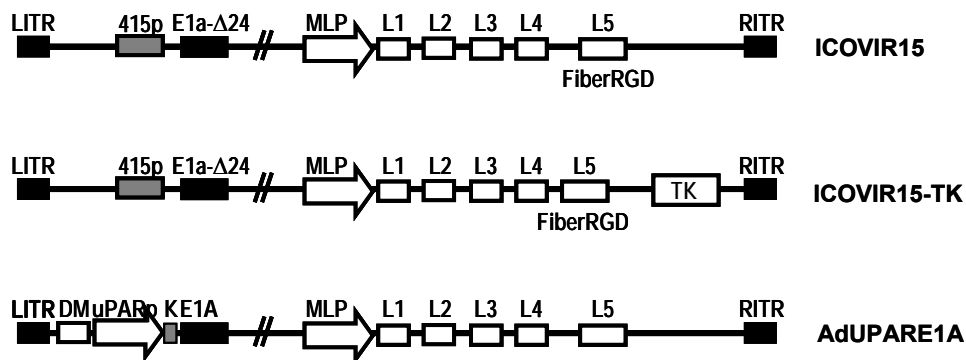


Figura 60. Esquema del genoma dels adenovirus **ICOVIR15** i **ICOVIR15-TK** i **AdUPARE1A**. L'ICOVIR15 té modificat E1A (deleció delecio $\Delta 24$) per millorar la selectivitat i la potència oncolítica. Al virus ICOVIR15-TK s'ha introduït el trasngèn TK sota el control del promotor MLP. A l'adenovirus AdUPARE1A la replicació viral està controlada pel promotor uPARp.

Es van injectar $3 \cdot 10^5$ cèl·lules d'una suspensió cel·lular obtinguda en digerir amb col·lagenasa un tumor del model CP15 al pàncrees de 47 ratolins atímics. Quan els tumors van arribar a un volum de 50 mm^3 , es van distribuir els ratolins en quatre grups de tractament (control (salí), ICOVIR15, ICOVIR15-TK/GCV i AduPARE1A) i es van injectar per la vena de la cua $5 \cdot 10^{10}$ vp del virus per ratolí. A més, als ratolins del grup tractat amb l'adenovirus ICOVIR15-TK es va administrar per via intraperitoneal 10mg/Kg de GCV durant 3 dies consecutius després de la injecció del virus. Al final de l'experiment, 30 dies després de la injecció dels virus, es va avaluar l'eficàcia antitumoral mesurant el volum dels tumors. Tal com es mostra a la figura 61 a i b, el tractament amb els tres adenovirus oncolítics aconseguix reduir el volum tumoral, tot i que només lleugerament en el cas del virus ICOVIR15. En canvi, el tractament amb ICOVIR15-TK/GCV i AduPARE1A produeix una reducció significativa del volum tumoral. A continuació es va mesurar l'efecte del tractament amb aquests virus sobre la capacitat d'un digerit tumoral per formar tumorosferes. A la figura 61c es pot veure com cap dels virus incrementa significativament el número de tumorosferes generades a partir de la digestió de les mostres de tumor obtingudes al final de l'experiment. A més, el virus ICOVIR15-TK/GCV té

una lleugera tendència a disminuir-lo i el AduPARE1A el disminueix de forma significativa.

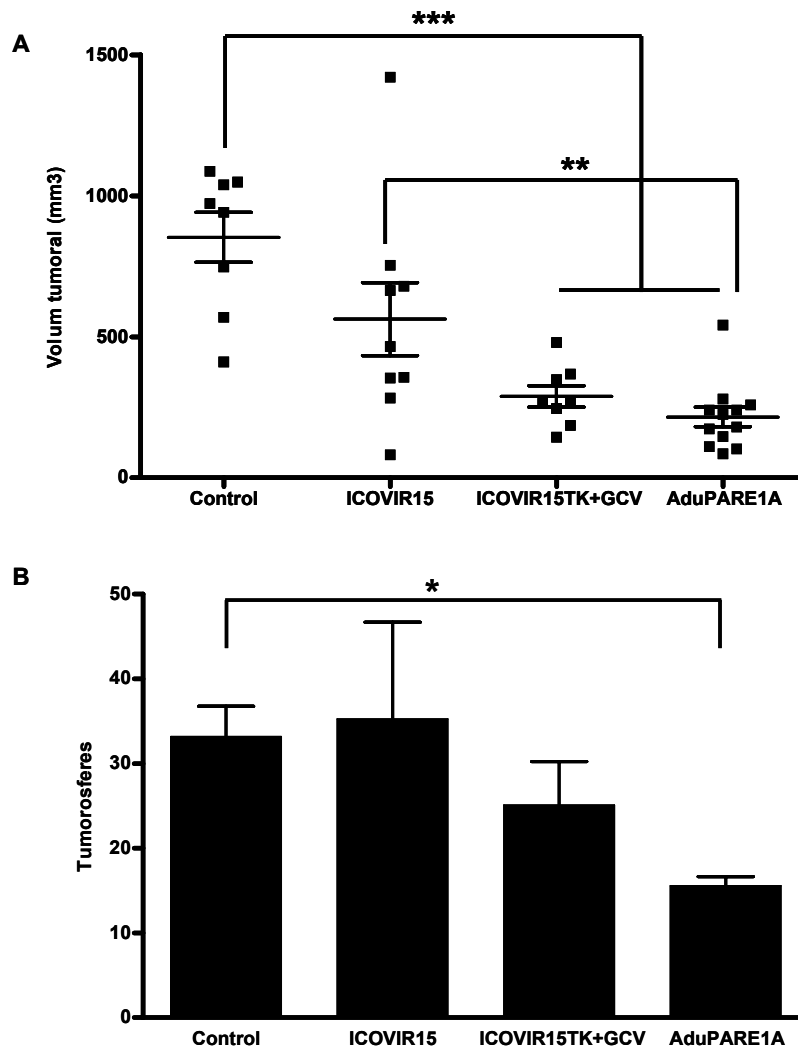


Figura 61. Efecte del tractament amb els virus oncolítics ICOVIR15, ICOVIR15-TK+GCV i AduPARE1A al model CP15. 31 dies després de la injecció de $5 \cdot 10^{10}$ vp dels virus per via sistèmica es va mesurar el volum (A) dels tumors, així com la seva capacitat per formar tumorosferes (B) al model CP15. Els resultats són la mitjana ($n=8-12$) \pm error estàndard. Estadística respecte el grup control, essent * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$. Nota: les tumorosferes obtingudes al final de l'experiment van ser processades per l'Ana Mato, del laboratori de Teràpia Gènica de l'IDIBAPS.

El lleuger efecte antitumoral produït pel virus ICOVIR15 contrasta amb la falta d'eficàcia observada pel virus ICOVIR15K (Figura 54) i podria ser explicat per diferències en l'estroma dels dos models emprats, ja que els tumors generats a partir de digerits de CP15 tenen una menor presència d'estroma que els obtinguts a partir de fragments de CP13 (Figura 57).

D'altra banda, l'ús del sistema TK/GCV potencia l'efecte antitumoral del virus ICOVIR15 (Figura 61 a i b). Aquest fet que ja havia estat descrit anteriorment (Jose et al., 2013), però en models ortotòpics generats a partir de línies cel·lulars i sense analitzar el seu efecte sobre les CSC. La potenciació de l'efecte antitumoral del sistema TK/GCV és deguda a que aquest actua amplificant l'efecte del virus, ja que el metabòlit tòxic del GCV, generat a l'interior de les cèl·lules infectades, actua a les cèl·lules veïnes mitjançant el que es coneix com a efecte adjacent (Fillat et al., 2003; Trepel et al., 2009). Aquest fenomen es dona de manera independent de la replicació viral, de manera que podria facilitar l'eliminació de les cèl·lules estromals murines que el virus no pot infectar. En conseqüència, sembla que l'ús del sistema ICOVIR15-TK/GCV en pacients podria ser potencialment més efectiu.

D'altra banda, el potent efecte antitumoral del tractament amb el virus AduPARE1A (Figura 61 a i b) ja havia estat descrit anteriorment en un model subcutani generat a partir de la injecció de la línia cel·lular tumoral pancreàtica BxPC3 (Huch et al., 2009). Aquest model és diferent a l'emprat en aquest treball. Així, als models ortotòpics hi ha una major presència d'estroma, el qual limitaria la replicació viral degut al seu origen murí. En aquest sentit, cal destacar que uPAR es troba sobreexpressat a l'estroma tumoral (Giannopoulou et al., 2007), fet que podria potenciar l'efecte antitumoral observat *in vivo* en ser administrat en pacients. Finalment, la disminució de la formació de tumorsferes als tumors tractats amb el virus AduPARE1A estaria indicant que les CSC presents al tumor són sensibles a l'acció d'aquest virus, fet que correlacionaria amb la major expressió de uPAR a la subpoblació de CSC descrita anteriorment en altres tipus de tumors (Gutova et al., 2007; Jo et al., 2010; Qiu et al., 2012). A més, els resultats d'aquest experiment contrasten amb els descrits després d'administrar en pacients amb PDAC gemcitabina, el fàrmac d'elecció en per aquest tipus de tumor, on s'observa un augment significatiu de la subpoblació de CSC després del tractament (Abel and Simeone, 2013). Per tant, el tractament amb aquests virus podria evitar l'aparició de recurrències en pacients amb PDAC.

Donats els bons resultats obtinguts amb el virus AduPARE1A, també es va assajar l'efecte antitumoral i sobre les CSC d'aquest virus sobre un

segon model, CP13. En aquest model, tal com s'ha demostrat abans, l'estroma és més abundant. De la mateixa manera que per al model CP15, es van injectar $4 \cdot 10^5$ cèl·lules de digerit tumoral al pàncrees de 16 ratolins atímics. Quan els tumors van arribar a un volum de 50 mm^3 , es van distribuir els ratolins en dos grups de tractament (control (salí) i AduPARE1A) i es van injectar per la vena de la cua $5 \cdot 10^{10}$ vp per ratolí. La figura 62 a i b mostra com el tractament amb el virus oncolític AduPARE1A aconsegueix reduir significativament el volum tumoral al final de l'experiment. A més, aquest virus disminueix significativament la formació de tumorosferes (figura 62c). Per tant, en aquest model, tot i caracteritzar-se per una major presència d'estroma, es torna a confirmar l'efecte antitumoral de l'adenovirus AduPARE1A, a més de la seva capacitat per eliminar les CSC del tumor.

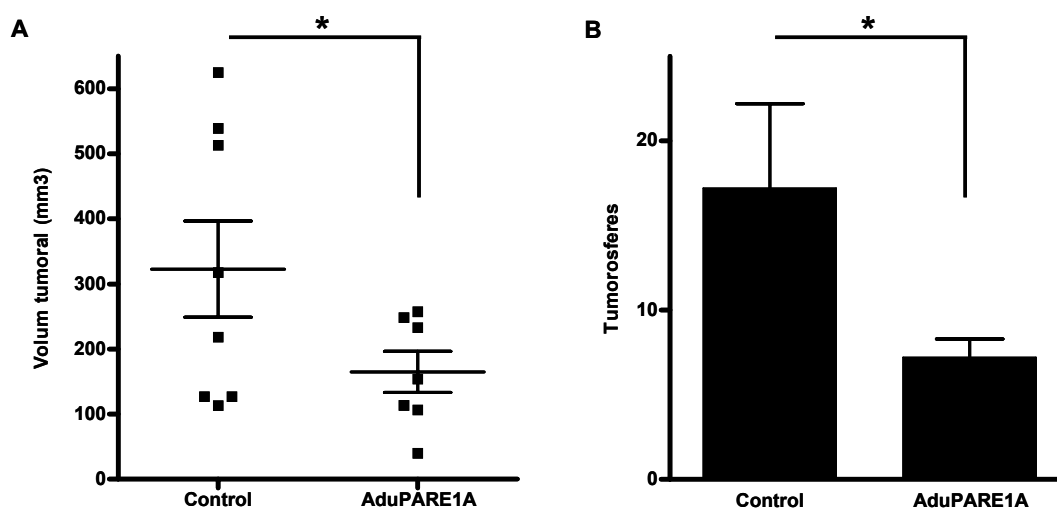


Figura 62. Efecte del tractament amb el virus oncolític AduPARE1A al model CP13. 31 dies després de la injecció de $5 \cdot 10^{10}$ vp del virus per via sistèmica es va mesurar el volum (A) dels tumors, així com la seva capacitat per formar tumorosferes (B) al model CP13. Els resultats són la mitjana ($n=8$) \pm error estàndard. Estadística respecte el grup control, essent * $p < 0,05$. Nota: les tumorosferes obtingudes al final de l'experiment van ser processades per l'Ana Mato, del laboratori de Teràpia Gènica de l'IDIBAPS.

Els resultats obtinguts posen de manifest la idoneïtat de l'ús dels adenovirus oncolítics per al tractament del PDAC, ja que mostren un potent efecte antitumoral i aconsegueixen reduir la subpoblació de CSC, el què podria evitar la formació de metàstasis i l'aparició de recidives (Sobrevals et al., *under revision*).

CONCLUSIONS

1. No s'ha pogut relacionar l'expressió dels marcadors de CSC CD44, CD24 i CD133 amb una major resistència al tractament amb gemcitabina a les línies cel·lulars analitzades. A més, tot i que CD44 augmenta a les cèl·lules aïllades de tumors tractats amb gemcitabina, el seu ús com a marcador de superfície no sembla adequat, ja que la seva expressió *in vitro* és reversible i s'expressa tant a membrana com a citoplasma.
2. Les tumorosferes generades a partir de línies cel·lulars tumorals pancreàtiques presenten característiques de CSC, com la seva capacitat per tornar a diferenciar-se, un elevat potencial tumorigènic, un arrest del cicle a la fase G0/G1 i resistència al tractament amb gemcitabina.
3. Les tumorosferes són sensibles al tractament amb l'inhibidor tirosina-quinasa d'IGF-IR NVP-AEW541 i l'inhibidor tirosina-quinasa dual d'EGFR i Her-2 lapatinib. A més, la combinació d'aquests dos fàrmacs té un efecte sinèrgic en aquesta subpoblació.
4. L'adenovirus oncolític ICOVIR5 té capacitat d'infectar tant els cultius en monocapa com les tumorosferes i la introducció del supressor tumoral p53 potencia l'efecte citotòxic d'aquest adenovirus.
5. El tractament combinat de gemcitabina amb els anticossos monoclonals AMG479, inhibidor d'IGF-IR, i AMG655, agonista de DR5, provoca una disminució del creixement tumoral en el model ortotòpic emprat, tot i que no s'observa una millora significativa respecte l'efecte de la gemcitabina. La falta de potenciació de la combinació es pot relacionar amb l'activació de mecanismes antiapoptòtics, així com amb l'activació de les vies d'IGF-IR i EGFR per part de l'AMG655.
6. La resistència al tractament amb AMG479 *in vitro* es pot relacionar amb una falta de manteniment del seu efecte a nivell molecular, a diferència del de l'NVP-AEW541, al qual són sensibles les línies cel·lulars emprades. En canvi, per a l'AMG655 i el lligand de DR4/DR5 rhTRAIL es distingeixen línies

sensibles i resistents al tractament, el què es pot relacionar amb diferències en els nivells basals de DR5 i en la capacitat per activar l'apoptosi.

7. La combinació dels fàrmacs dirigits a les vies d'IGF-IR i TRAIL pot ser d'utilitat terapèutica en càncer de pàncrees, tot i que cal tenir en compte el tipus de fàrmac que es combina, ja que la combinació dels anticossos monoclonals AMG479 i AMG655 té un clar efecte antagònic, mentre que la inhibició d'IGF-IR amb NVP-AEW541 i la inducció de DR4/DR5 amb el rhTRAIL té un potent efecte citotòxic.

8. L'administració sistèmica del virus oncolític ICOVIR17K, que expressa el gen de la hialuronidasa, no redueix els tumors generats per implantació d'un fragment tumoral, tot i presentar la biodistribució esperada. La manca de resposta al tractament es relaciona amb la presència de cèl·lules murines a l'estroma tumoral, la qual es redueix en els models obtinguts a partir de tumors digerits.

9. La injecció sistèmica dels virus ICOVIR15-TK/GCV i AduPARE1A en models ortotòpics generats a partir d'un digerit tumoral té un efecte inhibidor sobre el creixement tumoral estadísticament significatiu. Aquesta inhibició inclou una acció sobre les CSC, ja que no augmenta la capacitat per formar tumorosferes dels tumors tractats amb l'ICOVIR15-TK/GCV i es redueix significativament als tractats amb l'AduPARE1A.

BIBLIOGRAFIA

A

- Abel, E.V., and Simeone, D.M. (2013). Biology and clinical applications of pancreatic cancer stem cells. *Gastroenterology* *144*, 1241-1248.
- Adamek, H.E., Albert, J., Breer, H., Weitz, M., Schilling, D., and Riemann, J.F. (2000). Pancreatic cancer detection with magnetic resonance cholangiopancreatography and endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a prospective controlled study. *Lancet* *356*, 190-193.
- Adams, T.E., McKern, N.M., and Ward, C.W. (2004). Signalling by the type 1 insulin-like growth factor receptor: interplay with the epidermal growth factor receptor. *Growth Factors* *22*, 89-95.
- Adikrisna, R., Tanaka, S., Muramatsu, S., Aihara, A., Ban, D., Ochiai, T., Irie, T., Kudo, A., Nakamura, N., Yamaoka, S., *et al.* (2012). Identification of pancreatic cancer stem cells and selective toxicity of chemotherapeutic agents. *Gastroenterology* *143*, 234-245 e237.
- Aghi, M., Visted, T., Depinho, R.A., and Chiocca, E.A. (2008). Oncolytic herpes virus with defective ICP6 specifically replicates in quiescent cells with homozygous genetic mutations in p16. *Oncogene* *27*, 4249-4254.
- Aguirre, A.J., Bardeesy, N., Sinha, M., Lopez, L., Tuveson, D.A., Horner, J., Redston, M.S., and DePinho, R.A. (2003). Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* *17*, 3112-3126.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 3983-3988.
- Aleksic, T., Chitnis, M.M., Perestenko, O.V., Gao, S., Thomas, P.H., Turner, G.D., Protheroe, A.S., Howarth, M., and Macaulay, V.M. (2010). Type 1 insulin-like growth factor receptor translocates to the nucleus of human tumor cells. *Cancer Res* *70*, 6412-6419.
- Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., and Perucho, M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* *53*, 549-554.
- Allen, J.E., Hart, L.S., Dicker, D.T., Wang, W., and El-Deiry, W.S. (2009). Visualization and enrichment of live putative cancer stem cell populations following p53 inactivation or Bax deletion using non-toxic fluorescent dyes. *Cancer Biol Ther* *8*, 2194-2205.
- Aramayo, R., Sherman, M.B., Brownless, K., Lurz, R., Okorokov, A.L., and Orlova, E.V. (2011). Quaternary structure of the specific p53-DNA complex reveals the mechanism of p53 mutant dominance. *Nucleic Acids Res* *39*, 8960-8971.
- Ashkenazi, A. (2008). Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* *19*, 325-331.
- Ashkenazi, A., and Herbst, R.S. (2008). To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *J Clin Invest* *118*, 1979-1990.
- Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A., *et al.* (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* *104*, 155-162.

Attia, M.A., and Weiss, D.W. (1966). Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice. V. Acquired tumor resistance and enhancement in strain A mice infected with mammary tumor virus. *Cancer Res* 26, 1787-1800.

B

Baas, A.F., Kuipers, J., van der Wel, N.N., Batlle, E., Koerten, H.K., Peters, P.J., and Clevers, H.C. (2004). Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD. *Cell* 116, 457-466.

Bachoo, R.M., Maher, E.A., Ligon, K.L., Sharpless, N.E., Chan, S.S., You, M.J., Tang, Y., DeFrances, J., Stover, E., Weissleder, R., *et al.* (2002). Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell* 1, 269-277.

Baker, A.H., McVey, J.H., Waddington, S.N., Di Paolo, N.C., and Shayakhmetov, D.M. (2007). The influence of blood on in vivo adenovirus bio-distribution and transduction. *Mol Ther* 15, 1410-1416.

Balic, A., Dorado, J., Alonso-Gomez, M., and Heeschen, C. (2012). Stem cells as the root of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Exp Cell Res* 318, 691-704.

Bao, B., Wang, Z., Ali, S., Kong, D., Banerjee, S., Ahmad, A., Li, Y., Azmi, A.S., Miele, L., and Sarkar, F.H. (2011a). Over-expression of FoxM1 leads to epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells. *J Cell Biochem* 112, 2296-2306.

Bao, B., Wang, Z., Ali, S., Kong, D., Li, Y., Ahmad, A., Banerjee, S., Azmi, A.S., Miele, L., and Sarkar, F.H. (2011b). Notch-1 induces epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells. *Cancer Lett* 307, 26-36.

Bar, E.E., Lin, A., Mahairaki, V., Matsui, W., and Eberhart, C.G. (2010). Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *Am J Pathol* 177, 1491-1502.

Bardeesy, N., and DePinho, R.A. (2002). Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2, 897-909.

Bardeesy, N., Sharpless, N.E., DePinho, R.A., and Merlino, G. (2001). The genetics of pancreatic adenocarcinoma: a roadmap for a mouse model. *Semin Cancer Biol* 11, 201-218.

Bardeesy, N., Sinha, M., Hezel, A.F., Signoretti, S., Hathaway, N.A., Sharpless, N.E., Loda, M., Carrasco, D.R., and DePinho, R.A. (2002). Loss of the Lkb1 tumour suppressor provokes intestinal polyposis but resistance to transformation. *Nature* 419, 162-167.

Barton, C.M., Hall, P.A., Hughes, C.M., Gullick, W.J., and Lemoine, N.R. (1991). Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human pancreatic cancer. *J Pathol* 163, 111-116.

Baumgartner, G., Gomar-Hoss, C., Sakr, L., Ulsperger, E., and Wogritsch, C. (1998). The impact of extracellular matrix on the chemoresistance of solid tumors--experimental and clinical results of hyaluronidase as additive to cytostatic chemotherapy. *Cancer Lett* 131, 85-99.

- Bednar, F., and Simeone, D.M. (2011). Pancreatic cancer stem cell biology and its therapeutic implications. *J Gastroenterol* 46, 1345-1352.
- Beltran, P.J., Mitchell, P., Chung, Y.A., Cajulis, E., Lu, J., Belmontes, B., Ho, J., Tsai, M.M., Zhu, M., Vonderfecht, S., *et al.* (2009). AMG 479, a fully human anti-insulin-like growth factor receptor type I monoclonal antibody, inhibits the growth and survival of pancreatic carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 8, 1095-1105.
- Bergmann, U., Funatomi, H., Yokoyama, M., Beger, H.G., and Korc, M. (1995). Insulin-like growth factor I overexpression in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine roles. *Cancer Res* 55, 2007-2011.
- Berman, D.M., Karhadkar, S.S., Maitra, A., Montes De Oca, R., Gerstenblith, M.R., Briggs, K., Parker, A.R., Shimada, Y., Eshleman, J.R., Watkins, D.N., *et al.* (2003). Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature* 425, 846-851.
- Berrington de Gonzalez, A., Sweetland, S., and Spencer, E. (2003). A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *Br J Cancer* 89, 519-523.
- Bhattacharyya, M., and Lemoine, N.R. (2006). Gene therapy developments for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 20, 285-298.
- Birkmeyer, J.D., Siewers, A.E., Finlayson, E.V., Stukel, T.A., Lucas, F.L., Batista, I., Welch, H.G., and Wennberg, D.E. (2002). Hospital volume and surgical mortality in the United States. *N Engl J Med* 346, 1128-1137.
- Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A., *et al.* (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 274, 373-376.
- Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3, 730-737.
- Borst, P. (2012). Cancer drug pan-resistance: pumps, cancer stem cells, quiescence, epithelial to mesenchymal transition, blocked cell death pathways, persists or what? *Open Biol* 2, 120066.
- Boucher, M.J., Morisset, J., Vachon, P.H., Reed, J.C., Laine, J., and Rivard, N. (2000). MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells. *J Cell Biochem* 79, 355-369.
- Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F., and Kirchner, T. (2005). Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer* 5, 744-749.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brooks, J.R., and Culebras, J.M. (1976). Cancer of the pancreas. Palliative operation, Whipple procedure, or total pancreatectomy? *Am J Surg* 131, 516-520.
- Browne, B.C., Crown, J., Venkatesan, N., Duffy, M.J., Clynes, M., Slamon, D., and O'Donovan, N. (2011). Inhibition of IGF1R activity enhances response to trastuzumab in HER-2-positive breast cancer cells. *Ann Oncol* 22, 68-73.

- Bruce, W.R., and Van Der Gaag, H. (1963). A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo. *Nature* *199*, 79-80.
- Bruns, C.J., Solorzano, C.C., Harbison, M.T., Ozawa, S., Tsan, R., Fan, D., Abbruzzese, J., Traxler, P., Buchdunger, E., Radinsky, R., *et al.* (2000). Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling by a novel tyrosine kinase inhibitor leads to apoptosis of endothelial cells and therapy of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res* *60*, 2926-2935.
- Burris, H.A., 3rd, Moore, M.J., Andersen, J., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Modiano, M.R., Cripps, M.C., Portenoy, R.K., Storniolo, A.M., Tarassoff, P., *et al.* (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* *15*, 2403-2413.

C

- Caldas, C., Hahn, S.A., da Costa, L.T., Redston, M.S., Schutte, M., Seymour, A.B., Weinstein, C.L., Hruban, R.H., Yeo, C.J., and Kern, S.E. (1994a). Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* *8*, 27-32.
- Caldas, C., Hahn, S.A., Hruban, R.H., Redston, M.S., Yeo, C.J., and Kern, S.E. (1994b). Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res* *54*, 3568-3573.
- Caldas, C., and Kern, S.E. (1995). K-ras mutation and pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol* *18*, 1-6.
- Campani, D., Esposito, I., Boggi, U., Cecchetti, D., Menicagli, M., De Negri, F., Colizzi, L., Del Chiaro, M., Mosca, F., Fornaciari, G., *et al.* (2001). Bcl-2 expression in pancreas development and pancreatic cancer progression. *J Pathol* *194*, 444-450.
- Cancer discover (2012). Trial Is Halted for Ganitumab in Pancreatic Cancer. *Cancer Discov* *6*.
- Cano, D.A., and Hebrok, M. (2008). Hedgehog spikes pancreas regeneration. *Gastroenterology* *135*, 347-351.
- Cao, L., Zhou, Y., Zhai, B., Liao, J., Xu, W., Zhang, R., Li, J., Zhang, Y., Chen, L., Qian, H., *et al.* (2011). Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *BMC Gastroenterol* *11*, 71.
- Carlisle, R.C., Di, Y., Cerny, A.M., Sonnen, A.F., Sim, R.B., Green, N.K., Subr, V., Ulbrich, K., Gilbert, R.J., Fisher, K.D., *et al.* (2009). Human erythrocytes bind and inactivate type 5 adenovirus by presenting Coxsackie virus-adenovirus receptor and complement receptor 1. *Blood* *113*, 1909-1918.
- Cascallo, M., Alonso, M.M., Rojas, J.J., Perez-Gimenez, A., Fueyo, J., and Alemany, R. (2007). Systemic toxicity-efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway. *Mol Ther* *15*, 1607-1615.
- Cascallo, M., Mercade, E., Capella, G., Lluís, F., Fillat, C., Gomez-Foix, A.M., and Mazo, A. (1999). Genetic background determines the response to adenovirus-mediated wild-type p53 expression in pancreatic tumor cells. *Cancer Gene Ther* *6*, 428-436.

- Cawood, R., Chen, H.H., Carroll, F., Bazan-Peregrino, M., van Rooijen, N., and Seymour, L.W. (2009). Use of tissue-specific microRNA to control pathology of wild-type adenovirus without attenuation of its ability to kill cancer cells. *PLoS Pathog* 5, e1000440.
- Cerullo, V., Pesonen, S., Diaconu, I., Escutenaire, S., Arstila, P.T., Ugolini, M., Nokisalmi, P., Raki, M., Laasonen, L., Sarkioja, M., *et al.* (2010). Oncolytic adenovirus coding for granulocyte macrophage colony-stimulating factor induces antitumoral immunity in cancer patients. *Cancer Res* 70, 4297-4309.
- Cicalese, A., Bonizzi, G., Pasi, C.E., Faretta, M., Ronzoni, S., Giulini, B., Brisken, C., Minucci, S., Di Fiore, P.P., and Pelicci, P.G. (2009). The tumor suppressor p53 regulates polarity of self-renewing divisions in mammary stem cells. *Cell* 138, 1083-1095.
- Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66, 9339-9344.
- Clevers, H. (2011). The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med* 17, 313-319.
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouche, O., Guimbaud, R., Becouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardiere, C., *et al.* (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* 364, 1817-1825.
- Corradetti, M.N., Inoki, K., Bardeesy, N., DePinho, R.A., and Guan, K.L. (2004). Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev* 18, 1533-1538.
- Corso, S., Comoglio, P.M., and Giordano, S. (2005). Cancer therapy: can the challenge be MET? *Trends Mol Med* 11, 284-292.
- Crane, C.H., Ben-Josef, E., and Small, W., Jr. (2004). Chemotherapy for pancreatic cancer. *N Engl J Med* 350, 2713-2715; author reply 2713-2715.
- Cripe, T.P., Wang, P.Y., Marcato, P., Mahller, Y.Y., and Lee, P.W. (2009). Targeting cancer-initiating cells with oncolytic viruses. *Mol Ther* 17, 1677-1682.
- Cross, D., and Burmester, J.K. (2006). Gene therapy for cancer treatment: past, present and future. *Clin Med Res* 4, 218-227.
- Cross, M.J., and Claesson-Welsh, L. (2001). FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 22, 201-207.
- Cunningham, M.P., Thomas, H., Marks, C., Green, M., Fan, Z., and Modjtahedi, H. (2008). Co-targeting the EGFR and IGF-IR with anti-EGFR monoclonal antibody ICR62 and the IGF-IR tyrosine kinase inhibitor NVP-AEW541 in colorectal cancer cells. *Int J Oncol* 33, 1107-1113.
- Chaffer, C.L., Brueckmann, I., Scheel, C., Kaestli, A.J., Wiggins, P.A., Rodrigues, L.O., Brooks, M., Reinhardt, F., Su, Y., Polyak, K., *et al.* (2011). Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 7950-7955.
- Chandra, D., Liu, J.W., and Tang, D.G. (2002). Early mitochondrial activation and cytochrome c up-regulation during apoptosis. *J Biol Chem* 277, 50842-50854.

- Chang, J., Zhao, X., Wu, X., Guo, Y., Guo, H., Cao, J., Lou, D., Yu, D., and Li, J. (2009). A Phase I study of KH901, a conditionally replicating granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: armed oncolytic adenovirus for the treatment of head and neck cancers. *Cancer Biol Ther* 8, 676-682.
- Chang, K.J., Nguyen, P., Erickson, R.A., Durbin, T.E., and Katz, K.D. (1997). The clinical utility of endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration in the diagnosis and staging of pancreatic carcinoma. *Gastrointest Endosc* 45, 387-393.
- Chang, W.W., Lin, R.J., Yu, J., Chang, W.Y., Fu, C.H., Lai, A.C., Yu, J.C., and Yu, A.L. (2013). The expression and significance of insulin-like growth factor-1 receptor and its pathway on breast cancer stem/progenitors. *Breast Cancer Res* 15, R39.
- Chu, E. (2011). The IGF-1R pathway as a therapeutic target. *Oncology (Williston Park)* 25, 538-539, 543.

D

- Dalerba, P., Cho, R.W., and Clarke, M.F. (2007). Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 58, 267-284.
- Dan, H.C., Sun, M., Kaneko, S., Feldman, R.I., Nicosia, S.V., Wang, H.G., Tsang, B.K., and Cheng, J.Q. (2004). Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem* 279, 5405-5412.
- Day, J.D., DiGiuseppe, J.A., Yeo, C., Lai-Goldman, M., Anderson, S.M., Goodman, S.N., Kern, S.E., and Hruban, R.H. (1996). Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Hum Pathol* 27, 119-124.
- De La, O.J., Emerson, L.L., Goodman, J.L., Froebe, S.C., Illum, B.E., Curtis, A.B., and Murtaugh, L.C. (2008). Notch and Kras reprogram pancreatic acinar cells to ductal intraepithelial neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18907-18912.
- Dembinski, J.L., and Krauss, S. (2009). Characterization and functional analysis of a slow cycling stem cell-like subpopulation in pancreas adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis* 26, 611-623.
- Desoize, B., and Jardillier, J. (2000). Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol* 36, 193-207.
- Dias, J.D., Liikanen, I., Guse, K., Foloppe, J., Sloniecka, M., Diaconu, I., Rantanen, V., Eriksson, M., Hakkarainen, T., Lusky, M., *et al.* (2010). Targeted chemotherapy for head and neck cancer with a chimeric oncolytic adenovirus coding for bifunctional suicide protein FCU1. *Clin Cancer Res* 16, 2540-2549.
- Dick, J.E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793-4807.
- Diehl, S.J., Lehmann, K.J., Sadick, M., Lachmann, R., and Georgi, M. (1998). Pancreatic cancer: value of dual-phase helical CT in assessing resectability. *Radiology* 206, 373-378.
- DiGiuseppe, J.A., Hruban, R.H., Goodman, S.N., Polak, M., van den Berg, F.M., Allison, D.C., Cameron, J.L., and Offerhaus, G.J. (1994).

- Overexpression of p53 protein in adenocarcinoma of the pancreas. *Am J Clin Pathol* *101*, 684-688.
- Dimagno, E.P. (1992). *Cancer of the pancreas and biliary tract*, Winawer SJ edn (New York, Gower Medical Publishing).
- Ding, Y., Cravero, J.D., Adrian, K., and Grippo, P. (2010). Modeling pancreatic cancer in vivo: from xenograft and carcinogen-induced systems to genetically engineered mice. *Pancreas* *39*, 283-292.
- Douglas, J.T., Rogers, B.E., Rosenfeld, M.E., Michael, S.I., Feng, M., and Curiel, D.T. (1996). Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. *Nat Biotechnol* *14*, 1574-1578.
- Du, Z., Qin, R., Wei, C., Wang, M., Shi, C., Tian, R., and Peng, C. (2011). Pancreatic cancer cells resistant to chemoradiotherapy rich in "stem-cell-like" tumor cells. *Dig Dis Sci* *56*, 741-750.
- Duong, H.Q., Hwang, J.S., Kim, H.J., Kang, H.J., Seong, Y.S., and Bae, I. (2012). Aldehyde dehydrogenase 1A1 confers intrinsic and acquired resistance to gemcitabine in human pancreatic adenocarcinoma MIA PaCa-2 cells. *Int J Oncol* *41*, 855-861.

E

- Elnemr, A., Ohta, T., Yachie, A., Kayahara, M., Kitagawa, H., Fujimura, T., Ninomiya, I., Fushida, S., Nishimura, G.I., Shimizu, K., *et al.* (2001). Human pancreatic cancer cells disable function of Fas receptors at several levels in Fas signal transduction pathway. *Int J Oncol* *18*, 311-316.
- Eriksson, M., Guse, K., Bauerschmitz, G., Virkkunen, P., Tarkkanen, M., Tanner, M., Hakkarainen, T., Kanerva, A., Desmond, R.A., Pesonen, S., *et al.* (2007). Oncolytic adenoviruses kill breast cancer initiating CD44+CD24-/low cells. *Mol Ther* *15*, 2088-2093.
- Erkan, M., Adler, G., Apte, M.V., Bachem, M.G., Buchholz, M., Detlefsen, S., Esposito, I., Friess, H., Gress, T.M., Habisch, H.J., *et al.* (2012). StellaTUM: current consensus and discussion on pancreatic stellate cell research. *Gut* *61*, 172-178.
- Esparis-Ogando, A., Ocana, A., Rodriguez-Barrueco, R., Ferreira, L., Borges, J., and Pandiella, A. (2008). Synergic antitumoral effect of an IGF-IR inhibitor and trastuzumab on HER2-overexpressing breast cancer cells. *Ann Oncol* *19*, 1860-1869.
- Esposito, I., Kleeff, J., Abiatari, I., Shi, X., Giese, N., Bergmann, F., Roth, W., Friess, H., and Schirmacher, P. (2007a). Overexpression of cellular inhibitor of apoptosis protein 2 is an early event in the progression of pancreatic cancer. *J Clin Pathol* *60*, 885-895.
- Esposito, I., Seiler, C., Bergmann, F., Kleeff, J., Friess, H., and Schirmacher, P. (2007b). Hypothetical progression model of pancreatic cancer with origin in the centroacinar-acinar compartment. *Pancreas* *35*, 212-217.
- Evans, J.D., Cornford, P.A., Dodson, A., Greenhalf, W., Foster, C.S., and Neoptolemos, J.P. (2001). Detailed tissue expression of bcl-2, bax, bak and bcl-x in the normal human pancreas and in chronic pancreatitis, ampullary and pancreatic ductal adenocarcinomas. *Pancreatology* *1*, 254-262.

F

- Farnie, G., Clarke, R.B., Spence, K., Pinnock, N., Brennan, K., Anderson, N.G., and Bundred, N.J. (2007). Novel cell culture technique for primary ductal carcinoma in situ: role of Notch and epidermal growth factor receptor signaling pathways. *J Natl Cancer Inst* 99, 616-627.
- Feig, C., Gopinathan, A., Neesse, A., Chan, D.S., Cook, N., and Tuveson, D.A. (2012). The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res* 18, 4266-4276.
- Feldmann, G., Dhara, S., Fendrich, V., Bedja, D., Beaty, R., Mullendore, M., Karikari, C., Alvarez, H., Iacobuzio-Donahue, C., Jimeno, A., *et al.* (2007). Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res* 67, 2187-2196.
- Feldmann, G., Fendrich, V., McGovern, K., Bedja, D., Bisht, S., Alvarez, H., Koorstra, J.B., Habbe, N., Karikari, C., Mullendore, M., *et al.* (2008). An orally bioavailable small-molecule inhibitor of Hedgehog signaling inhibits tumor initiation and metastasis in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 7, 2725-2735.
- Feng, Y., Dai, X., Li, X., Wang, H., Liu, J., Zhang, J., Du, Y., and Xia, L. (2012). EGF signalling pathway regulates colon cancer stem cell proliferation and apoptosis. *Cell Prolif* 45, 413-419.
- Ferlay, J., Parkin, D.M., and Steliarova-Foucher, E. (2010). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 46, 765-781.
- Ferrara, N., Gerber, H.P., and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9, 669-676.
- Fesik, S.W. (2005). Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 5, 876-885.
- Fillat, C., Carrio, M., Cascante, A., and Sangro, B. (2003). Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: fifteen years of application. *Curr Gene Ther* 3, 13-26.
- Fountzilas, G., Bobos, M., Kalogera-Fountzila, A., Xiros, N., Murray, S., Linardou, H., Karayannopoulou, G., Koutras, A.K., Bafaloukos, D., Samantas, E., *et al.* (2008). Gemcitabine combined with gefitinib in patients with inoperable or metastatic pancreatic cancer: a phase II Study of the Hellenic Cooperative Oncology Group with biomarker evaluation. *Cancer Invest* 26, 784-793.
- Frank, N.Y., Margaryan, A., Huang, Y., Schatton, T., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Sayegh, M.H., Sadee, W., and Frank, M.H. (2005). ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res* 65, 4320-4333.
- Frank, N.Y., Schatton, T., and Frank, M.H. (2010). The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest* 120, 41-50.
- Freelove, R., and Walling, A.D. (2006). Pancreatic cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician* 73, 485-492.
- French, L.E., and Tschopp, J. (1999). The TRAIL to selective tumor death. *Nat Med* 5, 146-147.
- Friedman, G.K., Cassady, K.A., Beierle, E.A., Markert, J.M., and Gillespie, G.Y. (2012). Targeting pediatric cancer stem cells with oncolytic virotherapy. *Pediatr Res* 71, 500-510.

- Friess, H., Yamanaka, Y., Kobrin, M.S., Do, D.A., Buchler, M.W., and Korc, M. (1995). Enhanced erbB-3 expression in human pancreatic cancer correlates with tumor progression. *Clin Cancer Res* 1, 1413-1420.
- Fuhrman, G.M., Charnsangavej, C., Abbruzzese, J.L., Cleary, K.R., Martin, R.G., Fenoglio, C.J., and Evans, D.B. (1994). Thin-section contrast-enhanced computed tomography accurately predicts the resectability of malignant pancreatic neoplasms. *Am J Surg* 167, 104-111; discussion 111-103.
- Fulda, S. (2011). Targeting Apoptosis Signaling in Pancreatic Cancer. *Cancers* 3, 241-251.
- Furstenberger, G., and Senn, H.J. (2002). Insulin-like growth factors and cancer. *Lancet Oncol* 3, 298-302.

G

- Ganesh, S., Gonzalez-Edick, M., Gibbons, D., Van Roey, M., and Jooss, K. (2008). Intratumoral coadministration of hyaluronidase enzyme and oncolytic adenoviruses enhances virus potency in metastatic tumor models. *Clin Cancer Res* 14, 3933-3941.
- Ganesh, S., Gonzalez Edick, M., Idamakanti, N., Abramova, M., Vanroey, M., Robinson, M., Yun, C.O., and Jooss, K. (2007). Relaxin-expressing, fiber chimeric oncolytic adenovirus prolongs survival of tumor-bearing mice. *Cancer Res* 67, 4399-4407.
- Garber, K. (2009). From human to mouse and back: 'tumorgraft' models surge in popularity. *J Natl Cancer Inst* 101, 6-8.
- Garcia-Echeverria, C., Pearson, M.A., Marti, A., Meyer, T., Mestan, J., Zimmermann, J., Gao, J., Brueggen, J., Capraro, H.G., Cozens, R., *et al.* (2004). In vivo antitumor activity of NVP-AEW541-A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer Cell* 5, 231-239.
- Gastrointestinal Tumor Study Group (1988). Treatment of locally unresectable carcinoma of the pancreas: comparison of combined-modality therapy (chemotherapy plus radiotherapy) to chemotherapy alone. Gastrointestinal Tumor Study Group. *J Natl Cancer Inst* 80, 751-755.
- Gaujoux, S., Brennan, M.F., Gonen, M., D'Angelica, M.I., DeMatteo, R., Fong, Y., Schattner, M., DiMaio, C., Janakos, M., Jarnagin, W.R., *et al.* (2011). Cystic lesions of the pancreas: changes in the presentation and management of 1,424 patients at a single institution over a 15-year time period. *J Am Coll Surg* 212, 590-600; discussion 600-593.
- Gaviraghi, M., Tunici, P., Valensin, S., Rossi, M., Giordano, C., Magnoni, L., Dandrea, M., Montagna, L., Ritelli, R., Scarpa, A., *et al.* (2011). Pancreatic cancer spheres are more than just aggregates of stem marker-positive cells. *Biosci Rep* 31, 45-55.
- Giannopoulou, I., Mylona, E., Kapranou, A., Mavrommatis, J., Markaki, S., Zoumbouli, C., Keramopoulos, A., and Nakopoulou, L. (2007). The prognostic value of the topographic distribution of uPAR expression in invasive breast carcinomas. *Cancer Lett* 246, 262-267.
- Giardiello, F.M., Brensinger, J.D., Tersmette, A.C., Goodman, S.N., Petersen, G.M., Booker, S.V., Cruz-Correa, M., and Offerhaus, J.A. (2000). Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 119, 1447-1453.

- Gilbert, N., Gilchrist, S., and Bickmore, W.A. (2005). Chromatin organization in the mammalian nucleus. *Int Rev Cytol* 242, 283-336.
- Gillies, R.J., Verduzco, D., and Gatenby, R.A. (2012). Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work. *Nat Rev Cancer* 12, 487-493.
- Ginestier, C., Wicinski, J., Cervera, N., Monville, F., Finetti, P., Bertucci, F., Wicha, M.S., Birnbaum, D., and Charafe-Jauffret, E. (2009). Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation. *Cell Cycle* 8, 3297-3302.
- Gingell, R., Wallcave, L., Nagel, D., Kupper, R., and Pour, P. (1976). Metabolism of the pancreatic carcinogens N-nitroso-bis(2-oxopropyl)amine and N-nitroso-bis(2-hydroxypropyl)amine in the Syrian hamster. *J Natl Cancer Inst* 57, 1175-1178.
- Ginn, S.L., Alexander, I.E., Edelstein, M.L., Abedi, M.R., and Wixon, J. (2013). Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *J Gene Med* 15, 65-77.
- Giovannucci, E., and Michaud, D. (2007). The role of obesity and related metabolic disturbances in cancers of the colon, prostate, and pancreas. *Gastroenterology* 132, 2208-2225.
- Gisselsson, D., Jonson, T., Petersen, A., Strombeck, B., Dal Cin, P., Hoglund, M., Mitelman, F., Mertens, F., and Mandahl, N. (2001). Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12683-12688.
- Godar, S., Ince, T.A., Bell, G.W., Feldser, D., Donaher, J.L., Bergh, J., Liu, A., Miu, K., Watnick, R.S., Reinhardt, F., *et al.* (2008). Growth-inhibitory and tumor-suppressive functions of p53 depend on its repression of CD44 expression. *Cell* 134, 62-73.
- Goggins, M., Hruban, R.H., and Kern, S.E. (2000). BRCA2 is inactivated late in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence and implications. *Am J Pathol* 156, 1767-1771.
- Goggins, M., Shekher, M., Turnacioglu, K., Yeo, C.J., Hruban, R.H., and Kern, S.E. (1998). Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res* 58, 5329-5332.
- Gou, S., Liu, T., Wang, C., Yin, T., Li, K., Yang, M., and Zhou, J. (2007). Establishment of clonal colony-forming assay for propagation of pancreatic cancer cells with stem cell properties. *Pancreas* 34, 429-435.
- Greene, F.L. (2002). American Joint Committee on Cancer, American Cancer Society. *AJCC cancer staging manual*, 6th edn (New York, Springer).
- Griffin, J.D., and Lowenberg, B. (1986). Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood* 68, 1185-1195.
- Grippo, P.J., and Tuveson, D.A. (2010). Deploying mouse models of pancreatic cancer for chemoprevention studies. *Cancer Prev Res (Phila)* 3, 1382-1387.
- Guedan, S., Rojas, J.J., Gros, A., Mercade, E., Cascallo, M., and Alemany, R. (2010). Hyaluronidase expression by an oncolytic adenovirus enhances its intratumoral spread and suppresses tumor growth. *Mol Ther* 18, 1275-1283.

- Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Canamero, M., Grippo, P.J., Verdaguer, L., Perez-Gallego, L., Dubus, P., Sandgren, E.P., and Barbacid, M. (2007). Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* *11*, 291-302.
- Guix, M., Faber, A.C., Wang, S.E., Olivares, M.G., Song, Y., Qu, S., Rinehart, C., Seidel, B., Yee, D., Arteaga, C.L., *et al.* (2008). Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins. *J Clin Invest* *118*, 2609-2619.
- Guo, W., Keckesova, Z., Donaher, J.L., Shibue, T., Tischler, V., Reinhardt, F., Itzkovitz, S., Noske, A., Zurrer-Hardi, U., Bell, G., *et al.* (2012). Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell* *148*, 1015-1028.
- Gupta, P.B., Fillmore, C.M., Jiang, G., Shapira, S.D., Tao, K., Kuperwasser, C., and Lander, E.S. (2011). Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* *146*, 633-644.
- Guse, K., Diaconu, I., Rajewski, M., Sloniecka, M., Hakkarainen, T., Ristimaki, A., Kanerva, A., Pesonen, S., and Hemminki, A. (2009). Ad5/3-9HIF-Delta24-VEGFR-1-Ig, an infectivity enhanced, dual-targeted and antiangiogenic oncolytic adenovirus for kidney cancer treatment. *Gene Ther* *16*, 1009-1020.
- Gutova, M., Najbauer, J., Gevorgyan, A., Metz, M.Z., Weng, Y., Shih, C.C., and Aboody, K.S. (2007). Identification of uPAR-positive chemoresistant cells in small cell lung cancer. *PLoS One* *2*, e243.

H

- Habbe, N., Shi, G., Meguid, R.A., Fendrich, V., Esni, F., Chen, H., Feldmann, G., Stoffers, D.A., Konieczny, S.F., Leach, S.D., *et al.* (2008). Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 18913-18918.
- Hallden, G., and Portella, G. (2012). Oncolytic virotherapy with modified adenoviruses and novel therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* *16*, 945-958.
- Hameed, M., Marrero, A.M., Conlon, K.C., Brennan, M.F., and Klimstra, D.S. (1994). Expression of P53 nucleophosphoprotein in in-situ pancreatic ductal adenocarcinoma - An immunohistochemical analysis of 100 cases. *Laboratory investigation* *70*.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Hardie, D.G. (2005). New roles for the LKB1-->AMPK pathway. *Curr Opin Cell Biol* *17*, 167-173.
- He, J., Sheng, T., Stelter, A.A., Li, C., Zhang, X., Sinha, M., Luxon, B.A., and Xie, J. (2006). Suppressing Wnt signaling by the hedgehog pathway through sFRP-1. *J Biol Chem* *281*, 35598-35602.
- Heise, C., Hermiston, T., Johnson, L., Brooks, G., Sampson-Johannes, A., Williams, A., Hawkins, L., and Kirn, D. (2000). An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med* *6*, 1134-1139.

- Hemminki, A., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A., Aaltonen, L.A., Jarvinen, H., and de la Chapelle, A. (1998). [A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome]. *Duodecim* *114*, 667-668.
- Hemminki, O., Diaconu, I., Cerullo, V., Pesonen, S.K., Kanerva, A., Joensuu, T., Kairemo, K., Laasonen, L., Partanen, K., Kangasniemi, L., *et al.* (2012). Ad3-hTERT-E1A, a fully serotype 3 oncolytic adenovirus, in patients with chemotherapy refractory cancer. *Mol Ther* *20*, 1821-1830.
- Hermann, P.C., Huber, S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J., and Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* *1*, 313-323.
- Herreros-Villanueva, M., Hijona, E., Cosme, A., and Bujanda, L. (2012). Mouse models of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* *18*, 1286-1294.
- Hewish, M., Chau, I., and Cunningham, D. (2009). Insulin-like growth factor 1 receptor targeted therapeutics: novel compounds and novel treatment strategies for cancer medicine. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* *4*, 54-72.
- Hezel, A.F., Kimmelman, A.C., Stanger, B.Z., Bardeesy, N., and Depinho, R.A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* *20*, 1218-1249.
- Hidalgo, M. (2010). Pancreatic cancer. *N Engl J Med* *362*, 1605-1617.
- Hidalgo, M., and Von Hoff, D.D. (2012). Translational therapeutic opportunities in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res* *18*, 4249-4256.
- Hingorani, S.R., Wang, L., Multani, A.S., Combs, C., Deramaudt, T.B., Hruban, R.H., Rustgi, A.K., Chang, S., and Tuveson, D.A. (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* *7*, 469-483.
- Hinz, S., Trauzold, A., Boenicke, L., Sandberg, C., Beckmann, S., Bayer, E., Walczak, H., Kalthoff, H., and Ungefroren, H. (2000). Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene* *19*, 5477-5486.
- Hruban, R.H., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Anver, M.R., Biankin, A.V., Boivin, G.P., Furth, E.E., Furukawa, T., Klein, A., Klimstra, D.S., *et al.* (2006). Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer Res* *66*, 95-106.
- Hruban, R.H., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E.S., Goodman, S.N., Kern, S.E., Klimstra, D.S., Kloppel, G., Longnecker, D.S., *et al.* (2001). Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* *25*, 579-586.
- Hruban, R.H., Goggins, M., Parsons, J., and Kern, S.E. (2000). Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* *6*, 2969-2972.
- Hruban, R.H., Maitra, A., Kern, S.E., and Goggins, M. (2007). Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am* *36*, 831-849, vi.
- Hruban, R.H., Takaori, K., Klimstra, D.S., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A.V., Biankin, S.A., Compton, C., Fukushima, N., Furukawa, T., *et al.* (2004). An illustrated consensus on the

- classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol* **28**, 977-987.
- Huang, P., Wang, C.Y., Gou, S.M., Wu, H.S., Liu, T., and Xiong, J.X. (2008). Isolation and biological analysis of tumor stem cells from pancreatic adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* **14**, 3903-3907.
- Huch, M., Gros, A., Jose, A., Gonzalez, J.R., Alemany, R., and Fillat, C. (2009). Urokinase-type plasminogen activator receptor transcriptionally controlled adenoviruses eradicate pancreatic tumors and liver metastasis in mouse models. *Neoplasia* **11**, 518-528, 514 p following 528.
- Huntly, B.J., Shigematsu, H., Deguchi, K., Lee, B.H., Mizuno, S., Duclos, N., Rowan, R., Amaral, S., Curley, D., Williams, I.R., *et al.* (2004). MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer Cell* **6**, 587-596.
- Hurt, E.M., Kawasaki, B.T., Klarmann, G.J., Thomas, S.B., and Farrar, W.L. (2008). CD44+ CD24(-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *Br J Cancer* **98**, 756-765.
- Hynes, N.E., and MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 177-184.

I

- Iacobuzio-Donahue, C.A., Fu, B., Yachida, S., Luo, M., Abe, H., Henderson, C.M., Vilardell, F., Wang, Z., Keller, J.W., Banerjee, P., *et al.* (2009). DPC4 gene status of the primary carcinoma correlates with patterns of failure in patients with pancreatic cancer. *J Clin Oncol* **27**, 1806-1813.
- Ijichi, H., Chytil, A., Gorska, A.E., Aakre, M.E., Fujitani, Y., Fujitani, S., Wright, C.V., and Moses, H.L. (2006). Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor-beta signaling in cooperation with active Kras expression. *Genes Dev* **20**, 3147-3160.
- Ingham, P.W., and McMahon, A.P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* **15**, 3059-3087.
- Ioannou, N., Seddon, A.M., Dalgleish, A., Mackintosh, D., and Modjtahedi, H. (2012). Expression pattern and targeting of HER family members and IGF-IR in pancreatic cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)* **17**, 2698-2724.
- Ioannou, N., Seddon, A.M., Dalgleish, A., Mackintosh, D., and Modjtahedi, H. (2013). Treatment with a combination of the ErbB (HER) family blocker afatinib and the IGF-IR inhibitor, NVP-AEW541 induces synergistic growth inhibition of human pancreatic cancer cells. *BMC Cancer* **13**, 41.
- Iodice, S., Gandini, S., Maisonneuve, P., and Lowenfels, A.B. (2008). Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg* **393**, 535-545.

J

- Jaffee, E.M., Hruban, R.H., Canto, M., and Kern, S.E. (2002). Focus on pancreas cancer. *Cancer Cell* 2, 25-28.
- Jamieson, C.H., Ailles, L.E., Dylla, S.J., Muijtjens, M., Jones, C., Zehnder, J.L., Gotlib, J., Li, K., Manz, M.G., Keating, A., *et al.* (2004). Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 351, 657-667.
- Javle, M.M.V., Shrof, G.R., Bhosale, R.T., Overman, P., Weatherly, M.J., and Wolf, J. (2010). Phase I/II study of MK-0646, a humanized monoclonal IGF-1R antibody in combination with gemcitabine or gemcitabine plus erlotinib (E) for advanced pancreatic cancer [abstract]. *J Clin Oncol* s28, 4039.
- Jemal, A., Clegg, L.X., Ward, E., Ries, L.A., Wu, X., Jamison, P.M., Wingo, P.A., Howe, H.L., Anderson, R.N., and Edwards, B.K. (2004). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer* 101, 3-27.
- Jenne, D.E., Reimann, H., Nezu, J., Friedel, W., Loff, S., Jeschke, R., Muller, O., Back, W., and Zimmer, M. (1998). Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet* 18, 38-43.
- Ji, Q., Hao, X., Zhang, M., Tang, W., Yang, M., Li, L., Xiang, D., Desano, J.T., Bommer, G.T., Fan, D., *et al.* (2009). MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS One* 4, e6816.
- Jiang, C., Yi, X.P., Shen, H., and Li, Y.X. (2012). Targeting X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibits pancreatic cancer cell growth through p-Akt depletion. *World J Gastroenterol* 18, 2956-2965.
- Jiang, H., Gomez-Manzano, C., Aoki, H., Alonso, M.M., Kondo, S., McCormick, F., Xu, J., Kondo, Y., Bekele, B.N., Colman, H., *et al.* (2007). Examination of the therapeutic potential of Delta-24-RGD in brain tumor stem cells: role of autophagic cell death. *J Natl Cancer Inst* 99, 1410-1414.
- Jimeno, A., Feldmann, G., Suarez-Gauthier, A., Rasheed, Z., Solomon, A., Zou, G.M., Rubio-Viqueira, B., Garcia-Garcia, E., Lopez-Rios, F., Matsui, W., *et al.* (2009). A direct pancreatic cancer xenograft model as a platform for cancer stem cell therapeutic development. *Mol Cancer Ther* 8, 310-314.
- Jin, Q., and Esteva, F.J. (2008). Cross-talk between the ErbB/HER family and the type I insulin-like growth factor receptor signaling pathway in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13, 485-498.
- Jo, M., Eastman, B.M., Webb, D.L., Stoletov, K., Klemke, R., and Gonias, S.L. (2010). Cell signaling by urokinase-type plasminogen activator receptor induces stem cell-like properties in breast cancer cells. *Cancer Res* 70, 8948-8958.
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., *et al.* (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 321, 1801-1806.
- Jose, A., Sobrevals, L., Miguel Camacho-Sanchez, J., Huch, M., Andreu, N., Ayuso, E., Navarro, P., Alemany, R., and Fillat, C. (2013). Intraductal delivery of adenoviruses targets pancreatic tumors in transgenic Elamyc mice and orthotopic xenografts. *Oncotarget* 4, 94-105.

Jung, D.E., Wen, J., Oh, T., and Song, S.Y. (2011). Differentially expressed microRNAs in pancreatic cancer stem cells. *Pancreas* 40, 1180-1187.

K

Kabashima, A., Higuchi, H., Takaishi, H., Matsuzaki, Y., Suzuki, S., Izumiya, M., Iizuka, H., Sakai, G., Hozawa, S., Azuma, T., *et al.* (2009). Side population of pancreatic cancer cells predominates in TGF-beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and invasion. *Int J Cancer* 124, 2771-2779.

Kaiser, M.H., and Ellenberg, S.S. (1985). Pancreatic cancer. Adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection. *Arch Surg* 120, 899-903.

Kanwar, S.S., Yu, Y., Nautiyal, J., Patel, B.B., and Majumdar, A.P. (2010). The Wnt/beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Mol Cancer* 9, 212.

Kaplan-Lefko, P.J., Graves, J.D., Zoog, S.J., Pan, Y., Wall, J., Branstetter, D.G., Moriguchi, J., Coxon, A., Huard, J.N., Xu, R., *et al.* (2010). Conatumumab, a fully human agonist antibody to death receptor 5, induces apoptosis via caspase activation in multiple tumor types. *Cancer Biol Ther* 9, 618-631.

Kaufmann, S.H., and Vaux, D.L. (2003). Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene* 22, 7414-7430.

Kaufuss, S., Burfeind, P., Gaedcke, J., and Scharf, J.G. (2009). Dual silencing of insulin-like growth factor-I receptor and epidermal growth factor receptor in colorectal cancer cells is associated with decreased proliferation and enhanced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 8, 821-833.

Kim, J.H., Lee, Y.S., Kim, H., Huang, J.H., Yoon, A.R., and Yun, C.O. (2006). Relaxin expression from tumor-targeting adenoviruses and its intratumoral spread, apoptosis induction, and efficacy. *J Natl Cancer Inst* 98, 1482-1493.

Kim, M.P., Evans, D.B., Wang, H., Abbruzzese, J.L., Fleming, J.B., and Gallick, G.E. (2009). Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc* 4, 1670-1680.

Kim, M.P., Fleming, J.B., Wang, H., Abbruzzese, J.L., Choi, W., Kopetz, S., McConkey, D.J., Evans, D.B., and Gallick, G.E. (2011). ALDH activity selectively defines an enhanced tumor-initiating cell population relative to CD133 expression in human pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One* 6, e20636.

Kim, W.Y., and Sharpless, N.E. (2006). The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 127, 265-275.

Kindler, H.L., Niedzwiecki, D., Hollis, D., Oraefo, E., Schrag, D., Hurwitz, H., McLeod, H.L., Mulcahy, M.F., Schilsky, R.L., and Goldberg, R.M. (2007). A double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of gemcitabine (G) plus bevacizumab (B) versus gemcitabine plus placebo (P) in patients (pts) with advanced pancreatic cancer (PC): A preliminary analysis of Cancer and Leukemia Group B (CALGB) [abstract]. *J Clin Oncol* 25, a4508.

- Kindler, H.L., Richards, D.A., Garbo, L.E., Garon, E.B., Stephenson, J.J., Jr., Rocha-Lima, C.M., Safran, H., Chan, D., Kocs, D.M., Galimi, F., *et al.* (2012). A randomized, placebo-controlled phase 2 study of ganitumab (AMG 479) or conatumumab (AMG 655) in combination with gemcitabine in patients with metastatic pancreatic cancer. *Ann Oncol* **23**, 2834-2842.
- Kindler, H.L., Richards, D.A., Stephenson, J., Garbo, L.E., Rocha Lima, C.M., Safran, H., Wiezorek, J.S., Feigal, E.G., Bray, S., and Fuchs, C. (2010). A placebo-control led, randomized phase II study of conatumumab (C) or AMG 479 (A) or placebo (P) plus gemcitabine (G) in patients (pts) with metastatic pancreatic cancer (mPC) [abstract]. *J Clin Oncol* **s28**, 4035.
- King, E.R., and Wong, K.K. (2012). Insulin-like growth factor: current concepts and new developments in cancer therapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **7**, 14-30.
- Kirn, D. (2001). Clinical research results with dl1520 (Onyx-015), a replication-selective adenovirus for the treatment of cancer: what have we learned? *Gene Ther* **8**, 89-98.
- Klinkenbijn, J.H., Jeekel, J., Sahmoud, T., van Pel, R., Couvreur, M.L., Veenhof, C.H., Arnaud, J.P., Gonzalez, D.G., de Wit, L.T., Hennipman, A., *et al.* (1999). Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group. *Ann Surg* **230**, 776-782; discussion 782-774.
- Kojima, K., Vickers, S.M., Adsay, N.V., Jhala, N.C., Kim, H.G., Schoeb, T.R., Grizzle, W.E., and Klug, C.A. (2007). Inactivation of Smad4 accelerates Kras(G12D)-mediated pancreatic neoplasia. *Cancer Res* **67**, 8121-8130.
- Kong, B., Michalski, C.W., and Kleeff, J. (2009). Tumor initiating cells in pancreatic cancer: A critical view. *World J Stem Cells* **1**, 8-10.
- Konopleva, M.Y., and Jordan, C.T. (2011). Leukemia stem cells and microenvironment: biology and therapeutic targeting. *J Clin Oncol* **29**, 591-599.
- Kooijman, R. (2006). Regulation of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF)-I. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**, 305-323.
- Korc, M., Chandrasekar, B., Yamanaka, Y., Friess, H., Buchler, M., and Beger, H.G. (1992). Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J Clin Invest* **90**, 1352-1360.
- Kotowski, A., and Ma, W.W. (2011). Emerging therapies in pancreas cancer. *J Gastrointest Oncol* **2**, 93-103.
- Krivtsov, A.V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M.C., Wang, Y., Faber, J., Levine, J.E., Wang, J., Hahn, W.C., Gilliland, D.G., *et al.* (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* **442**, 818-822.
- Kueberuwa, G., Cawood, R., and Seymour, L.W. (2010). Blood compatibility of enveloped viruses. *Curr Opin Mol Ther* **12**, 412-420.
- Kumar-Sinha, C., Wei, I., and Simeone, D.M. (2012). Emerging frontiers in pancreatic cancer research: elaboration of key genes, cells and the extracellular milieu. *Curr Opin Gastroenterol* **28**, 516-522.

- Kuniyasu, H., Abbruzzese, J.L., Cleary, K.R., and Fidler, I.J. (2001). Induction of ductal and stromal hyperplasia by basic fibroblast growth factor produced by human pancreatic carcinoma. *Int J Oncol* *19*, 681-685.
- Kuo, C.J., Farnebo, F., Yu, E.Y., Christofferson, R., Swearingen, R.A., Carter, R., von Recum, H.A., Yuan, J., Kamihara, J., Flynn, E., *et al.* (2001). Comparative evaluation of the antitumor activity of antiangiogenic proteins delivered by gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 4605-4610.
- Kuriyama, N., Kuriyama, H., Julin, C.M., Lamborn, K.R., and Israel, M.A. (2001). Protease pretreatment increases the efficacy of adenovirus-mediated gene therapy for the treatment of an experimental glioblastoma model. *Cancer Res* *61*, 1805-1809.

L

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Lane, D.P., Cheok, C.F., and Lain, S. (2010). p53-based cancer therapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a001222.
- Larsson, L.G. (2011). Oncogene- and tumor suppressor gene-mediated suppression of cellular senescence. *Semin Cancer Biol* *21*, 367-376.
- Lee, S.H., Lee, J.W., Kim, H.S., Kim, S.Y., Park, W.S., Kim, S.H., Lee, J.Y., and Yoo, N.J. (2003). Immunohistochemical analysis of Omi/HtrA2 expression in stomach cancer. *APMIS* *111*, 586-590.
- Lemoine, N.R., Jain, S., Hughes, C.M., Staddon, S.L., Maillet, B., Hall, P.A., and Kloppel, G. (1992). Ki-ras oncogene activation in preinvasive pancreatic cancer. *Gastroenterology* *102*, 230-236.
- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* *67*, 1030-1037.
- Li, C., Wu, J.J., Hynes, M., Dosch, J., Sarkar, B., Welling, T.H., Pasca di Magliano, M., and Simeone, D.M. (2011). c-Met is a marker of pancreatic cancer stem cells and therapeutic target. *Gastroenterology* *141*, 2218-2227 e2215.
- Li, D., Xie, K., Wolff, R., and Abbruzzese, J.L. (2004). Pancreatic cancer. *Lancet* *363*, 1049-1057.
- Li, X., Lewis, M.T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C.K., Wu, M.F., Hilsenbeck, S.G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G.C., *et al.* (2008). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* *100*, 672-679.
- Lim, J.E., Chien, M.W., and Earle, C.C. (2003). Prognostic factors following curative resection for pancreatic adenocarcinoma: a population-based, linked database analysis of 396 patients. *Ann Surg* *237*, 74-85.
- Liu, C., and Tang, D.G. (2011). MicroRNA regulation of cancer stem cells. *Cancer Res* *71*, 5950-5954.
- Liu, T.J., el-Naggar, A.K., McDonnell, T.J., Steck, K.D., Wang, M., Taylor, D.L., and Clayman, G.L. (1995). Apoptosis induction mediated by wild-type p53 adenoviral gene transfer in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* *55*, 3117-3122.

- Lizcano, J.M., Goransson, O., Toth, R., Deak, M., Morrice, N.A., Boudeau, J., Hawley, S.A., Udd, L., Makela, T.P., Hardie, D.G., *et al.* (2004). LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. *EMBO J* 23, 833-843.
- Lonardo, E., Hermann, P.C., Mueller, M.T., Huber, S., Balic, A., Miranda-Lorenzo, I., Zagorac, S., Alcalá, S., Rodriguez-Arabaolaza, I., Ramirez, J.C., *et al.* (2011). Nodal/Activin signaling drives self-renewal and tumorigenicity of pancreatic cancer stem cells and provides a target for combined drug therapy. *Cell Stem Cell* 9, 433-446.
- Longnecker, D.S., and Curphey, T.J. (1975). Adenocarcinoma of the pancreas in azaserine-treated rats. *Cancer Res* 35, 2249-2258.
- Louhimo, J., Alfthan, H., Stenman, U.H., and Haglund, C. (2004). Serum HCG beta and CA 72-4 are stronger prognostic factors than CEA, CA 19-9 and CA 242 in pancreatic cancer. *Oncology* 66, 126-131.
- Lowenfels, A.B., Maisonneuve, P., Cavallini, G., Ammann, R.W., Lankisch, P.G., Andersen, J.R., Dimagno, E.P., Andren-Sandberg, A., and Domellof, L. (1993). Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med* 328, 1433-1437.
- Luttges, J., Schlehe, B., Menke, M.A., Vogel, I., Henne-Bruns, D., and Kloppel, G. (1999). The K-ras mutation pattern in pancreatic ductal adenocarcinoma usually is identical to that in associated normal, hyperplastic, and metaplastic ductal epithelium. *Cancer* 85, 1703-1710.

M

- Macaulay, V.M., Middleton, M.R., Eckhardt, S.G., Juergens, R.A., Stephens, A.W., Poondru, S., McCarthy, S.P., and Gadgeel, S.M. (2010). Phase I study of OSI-906, dual tyrosine kinase inhibitor of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) and insulin receptor (IR) in combination with erlotinib (E) in patients with advanced solid tumors [abstract]. *J Clin Oncol* s28, 3016.
- Macgregor-Das, A.M., and Iacobuzio-Donahue, C.A. (2013). Molecular pathways in pancreatic carcinogenesis. *J Surg Oncol* 107, 8-14.
- Magee, J.A., Piskounova, E., and Morrison, S.J. (2012). Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 21, 283-296.
- Magistrelli, P., Coppola, R., Tonini, G., Vincenzi, B., Santini, D., Borzomati, D., Vecchio, F., Valeri, S., Castri, F., Antinori, A., *et al.* (2006). Apoptotic index or a combination of Bax/Bcl-2 expression correlate with survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. *J Cell Biochem* 97, 98-108.
- Magni, M., Shammah, S., Schiro, R., Mellado, W., Dalla-Favera, R., and Gianni, A.M. (1996). Induction of cyclophosphamide-resistance by aldehyde-dehydrogenase gene transfer. *Blood* 87, 1097-1103.
- Maitra, A., and Hruban, R.H. (2008). Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol* 3, 157-188.
- Majumdar, A.P., Yu, Y.Y., Du, J., and Patel, B.B. (2010). IGF-1R Regulation of Colon Cancer Stem Cells. *FASEB J*.
- Malanchi, I., Peinado, H., Kassen, D., Hussenet, T., Metzger, D., Chambon, P., Huber, M., Hohl, D., Cano, A., Birchmeier, W., *et al.* (2008).

- Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature* *452*, 650-653.
- Malesci, A., Montorsi, M., Mariani, A., Santambrogio, R., Bonato, C., Bissi, O., Tacconi, M., Wizemann, G., and Spina, G. (1992). Clinical utility of the serum CA 19-9 test for diagnosing pancreatic carcinoma in symptomatic patients: a prospective study. *Pancreas* *7*, 497-502.
- Marcato, P., Dean, C.A., Giacomantonio, C.A., and Lee, P.W. (2011). Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle* *10*, 1378-1384.
- Marchitti, S.A., Brocker, C., Stagos, D., and Vasiliou, V. (2008). Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* *4*, 697-720.
- Maringhini, A., Ciambra, M., Raimondo, M., Baccelliere, P., Grasso, R., Dardanoni, G., Lanzarone, F., Cottone, M., Sciarrino, E., and Pagliaro, L. (1993). Clinical presentation and ultrasonography in the diagnosis of pancreatic cancer. *Pancreas* *8*, 146-150.
- Markert, J.M., Medlock, M.D., Rabkin, S.D., Gillespie, G.Y., Todo, T., Hunter, W.D., Palmer, C.A., Feigenbaum, F., Tornatore, C., Tufaro, F., *et al.* (2000). Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther* *7*, 867-874.
- Matthaei, H., Schulick, R.D., Hruban, R.H., and Maitra, A. (2011). Cystic precursors to invasive pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *8*, 141-150.
- Mazur, P.K., and Siveke, J.T. (2012). Genetically engineered mouse models of pancreatic cancer: unravelling tumour biology and progressing translational oncology. *Gut* *61*, 1488-1500.
- McDonald, C.J., Erlichman, C., Ingle, J.N., Rosales, G.A., Allen, C., Greiner, S.M., Harvey, M.E., Zollman, P.J., Russell, S.J., and Galanis, E. (2006). A measles virus vaccine strain derivative as a novel oncolytic agent against breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* *99*, 177-184.
- McWilliams, R., Highsmith, W.E., Rabe, K.G., de Andrade, M., Tordsen, L.A., Holtegaard, L.M., and Petersen, G.M. (2005). Cystic fibrosis transmembrane regulator gene carrier status is a risk factor for young onset pancreatic adenocarcinoma. *Gut* *54*, 1661-1662.
- Meletis, K., Wirta, V., Hede, S.M., Nister, M., Lundeberg, J., and Frisen, J. (2006). p53 suppresses the self-renewal of adult neural stem cells. *Development* *133*, 363-369.
- Mihaljevic, A.L., Michalski, C.W., Friess, H., and Kleeff, J. (2010). Molecular mechanism of pancreatic cancer--understanding proliferation, invasion, and metastasis. *Langenbecks Arch Surg* *395*, 295-308.
- Miki, J., Furusato, B., Li, H., Gu, Y., Takahashi, H., Egawa, S., Sesterhenn, I.A., McLeod, D.G., Srivastava, S., and Rhim, J.S. (2007). Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Res* *67*, 3153-3161.
- Miller, R.J., Banisadr, G., and Bhattacharyya, B.J. (2008). CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development. *J Neuroimmunol* *198*, 31-38.

- Mimeault, M., and Batra, S.K. (2010). Frequent deregulations in the hedgehog signaling network and cross-talks with the epidermal growth factor receptor pathway involved in cancer progression and targeted therapies. *Pharmacol Rev* 62, 497-524.
- Minardi, D., Lucarini, G., Filosa, A., Zizzi, A., Simonetti, O., Offidani, A.M., d'Anzeo, G., Di Primio, R., Montironi, R., and Muzzonigro, G. (2012). Prognostic value of CD44 expression in penile squamous cell carcinoma: a pilot study. *Cell Oncol (Dordr)* 35, 377-384.
- Mitlianga, P.G., Sioka, C., Vartholomatos, G., Goussia, A., Polyzoidis, K., Rao, J.S., and Kyritsis, A.P. (2006). p53 enhances the Delta-24 conditionally replicative adenovirus anti-glioma effect. *Oncol Rep* 15, 149-153.
- Miyamoto, S., Yano, K., Sugimoto, S., Ishii, G., Hasebe, T., Endoh, Y., Kodama, K., Goya, M., Chiba, T., and Ochiai, A. (2004). Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3. *Cancer Res* 64, 665-671.
- Miyamoto, Y., Hosotani, R., Wada, M., Lee, J.U., Koshiba, T., Fujimoto, K., Tsuji, S., Nakajima, S., Doi, R., Kato, M., *et al.* (1999). Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bax, Bcl-X, and Mcl-1 expression in pancreatic cancers. *Oncology* 56, 73-82.
- Miyamoto, Y., Maitra, A., Ghosh, B., Zechner, U., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C.A., Sriuranpong, V., Iso, T., Meszoely, I.M., Wolfe, M.S., *et al.* (2003). Notch mediates TGF alpha-induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* 3, 565-576.
- Mizuma, M., Rasheed, Z.A., Yabuuchi, S., Omura, N., Campbell, N.R., de Wilde, R.F., De Oliveira, E., Zhang, Q., Puig, O., Matsui, W., *et al.* (2012). The gamma secretase inhibitor MRK-003 attenuates pancreatic cancer growth in preclinical models. *Mol Cancer Ther* 11, 1999-2009.
- Moertel, C.G., Frytak, S., Hahn, R.G., O'Connell, M.J., Reitemeier, R.J., Rubin, J., Schutt, A.J., Weiland, L.H., Childs, D.S., Holbrook, M.A., *et al.* (1981). Therapy of locally unresectable pancreatic carcinoma: a randomized comparison of high dose (6000 rads) radiation alone, moderate dose radiation (4000 rads + 5-fluorouracil), and high dose radiation + 5-fluorouracil: The Gastrointestinal Tumor Study Group. *Cancer* 48, 1705-1710.
- Mollinedo, F., and Gajate, C. (2003). Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* 8, 413-450.
- Moore, M.J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J.R., Gallinger, S., Au, H.J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R.A., *et al.* (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 25, 1960-1966.
- Moran, E. (1993). Interaction of adenoviral proteins with pRB and p53. *FASEB J* 7, 880-885.
- Morgillo, F., Kim, W.Y., Kim, E.S., Ciardiello, F., Hong, W.K., and Lee, H.Y. (2007). Implication of the insulin-like growth factor-IR pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with gefitinib. *Clin Cancer Res* 13, 2795-2803.
- Morton, C.L., and Houghton, P.J. (2007). Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc* 2, 247-250.

- Moser, C., Schachtschneider, P., Lang, S.A., Gaumann, A., Mori, A., Zimmermann, J., Schlitt, H.J., Geissler, E.K., and Stoeltzing, O. (2008). Inhibition of insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) using NVP-AEW541, a small molecule kinase inhibitor, reduces orthotopic pancreatic cancer growth and angiogenesis. *Eur J Cancer* 44, 1577-1586.
- Moskaluk, C.A., Hruban, R.H., and Kern, S.E. (1997). p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 57, 2140-2143.
- Mueller, M.T., Hermann, P.C., Witthauer, J., Rubio-Viqueira, B., Leicht, S.F., Huber, S., Ellwart, J.W., Mustafa, M., Bartenstein, P., D'Haese, J.G., *et al.* (2009). Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer. *Gastroenterology* 137, 1102-1113.
- Mukohara, T., Shimada, H., Ogasawara, N., Wanikawa, R., Shimomura, M., Nakatsura, T., Ishii, G., Park, J.O., Janne, P.A., Saijo, N., *et al.* (2009). Sensitivity of breast cancer cell lines to the novel insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) inhibitor NVP-AEW541 is dependent on the level of IRS-1 expression. *Cancer Lett* 282, 14-24.
- Murphy, K.M., Brune, K.A., Griffin, C., Sollenberger, J.E., Petersen, G.M., Bansal, R., Hruban, R.H., and Kern, S.E. (2002). Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer Res* 62, 3789-3793.

N

- Nakamoto, Y., Higashi, T., Sakahara, H., Tamaki, N., Kogire, M., Doi, R., Hosotani, R., Imamura, M., and Konishi, J. (2000). Delayed (18)F-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography scan for differentiation between malignant and benign lesions in the pancreas. *Cancer* 89, 2547-2554.
- Nalls, D., Tang, S.N., Rodova, M., Srivastava, R.K., and Shankar, S. (2011). Targeting epigenetic regulation of miR-34a for treatment of pancreatic cancer by inhibition of pancreatic cancer stem cells. *PLoS One* 6, e24099.
- Nemunaitis, J., Senzer, N., Sarmiento, S., Zhang, Y.A., Arzaga, R., Sands, B., Maples, P., and Tong, A.W. (2007). A phase I trial of intravenous infusion of ONYX-015 and enbrel in solid tumor patients. *Cancer Gene Ther* 14, 885-893.
- Neoptolemos, J.P., Dunn, J.A., Stocken, D.D., Almond, J., Link, K., Beger, H., Bassi, C., Falconi, M., Pederzoli, P., Dervenis, C., *et al.* (2001). Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 358, 1576-1585.
- Neoptolemos, J.P., Stocken, D.D., Friess, H., Bassi, C., Dunn, J.A., Hickey, H., Beger, H., Fernandez-Cruz, L., Dervenis, C., Lacaine, F., *et al.* (2004). A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 350, 1200-1210.

- Neuhaus, P. (2008). CONKO-001: final results of the randomized, prospective, multicentre phase III trial of adjuvant chemotherapy with gemcitabine versus observation in patients with resected pancreatic cancer [abstract]. *J Clin Oncol* 26 (Suppl. 18), a4504.
- Normanno, N., Bianco, C., De Luca, A., and Salomon, D.S. (2001). The role of EGF-related peptides in tumor growth. *Front Biosci* 6, D685-707.
- Nowell, P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.

O

- O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J.E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 106-110.
- Oettle, H., Post, S., Neuhaus, P., Gellert, K., Langrehr, J., Ridwelski, K., Schramm, H., Fahlke, J., Zuelke, C., Burkart, C., *et al.* (2007). Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 297, 267-277.
- Olempska, M., Eisenach, P.A., Ammerpohl, O., Ungefroren, H., Fandrich, F., and Kalthoff, H. (2007). Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 6, 92-97.
- Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M.A., Caldwell, M.E., Allard, D., *et al.* (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 324, 1457-1461.
- Oshima, Y., Suzuki, A., Kawashimo, K., Ishikawa, M., Ohkohchi, N., and Taniguchi, H. (2007). Isolation of mouse pancreatic ductal progenitor cells expressing CD133 and c-Met by flow cytometric cell sorting. *Gastroenterology* 132, 720-732.
- Ossipova, O., Bardeesy, N., DePinho, R.A., and Green, J.B. (2003). LKB1 (XEEK1) regulates Wnt signalling in vertebrate development. *Nat Cell Biol* 5, 889-894.
- Osvoldt, A.B., Wendt, L.R., Bersch, V.P., Backes, A.N., de Cassia, A.S.R., Edelweiss, M.I., and Rohde, L. (2006). Pancreatic intraepithelial neoplasia and ductal adenocarcinoma induced by DMBA in mice. *Surgery* 140, 803-809.
- Ouban, A., Muraca, P., Yeatman, T., and Coppola, D. (2003). Expression and distribution of insulin-like growth factor-1 receptor in human carcinomas. *Hum Pathol* 34, 803-808.

P

- Papageorgio, C., and Perry, M.C. (2007). Epidermal growth factor receptor-targeted therapy for pancreatic cancer. *Cancer Invest* 25, 647-657.
- Parato, K.A., Senger, D., Forsyth, P.A., and Bell, J.C. (2005). Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer* 5, 965-976.

- Park, B.H., Hwang, T., Liu, T.C., Sze, D.Y., Kim, J.S., Kwon, H.C., Oh, S.Y., Han, S.Y., Yoon, J.H., Hong, S.H., *et al.* (2008). Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. *Lancet Oncol* 9, 533-542.
- Park, C.H., Bergsagel, D.E., and McCulloch, E.A. (1971). Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. *J Natl Cancer Inst* 46, 411-422.
- Parsa, I., Longnecker, D.S., Scarpelli, D.G., Pour, P., Reddy, J.K., and Lefkowitz, M. (1985). Ductal metaplasia of human exocrine pancreas and its association with carcinoma. *Cancer Res* 45, 1285-1290.
- Pastrana, E., Silva-Vargas, V., and Doetsch, F. (2011). Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 486-498.
- Patel, M.R., and Kratzke, R.A. (2013). Oncolytic virus therapy for cancer: the first wave of translational clinical trials. *Transl Res* 161, 355-364.
- Patrawala, L., Calhoun, T., Schneider-Broussard, R., Li, H., Bhatia, B., Tang, S., Reilly, J.G., Chandra, D., Zhou, J., Claypool, K., *et al.* (2006). Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene* 25, 1696-1708.
- Peng, Z. (2005). Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther* 16, 1016-1027.
- Pennarun, B., Kleibeuker, J.H., Oenema, T., Stegehuis, J.H., de Vries, E.G., and de Jong, S. (2010). Inhibition of IGF-1R-dependent PI3K activation sensitizes colon cancer cells specifically to DR5-mediated apoptosis but not to rhTRAIL. *Anal Cell Pathol (Amst)* 33, 229-244.
- Perez-Torras, S., Vidal-Pla, A., Miquel, R., Almendro, V., Fernandez-Cruz, L., Navarro, S., Maurel, J., Carbo, N., Gascon, P., and Mazo, A. (2011). Characterization of human pancreatic orthotopic tumor xenografts suitable for drug screening. *Cell Oncol (Dordr)* 34, 511-521.
- Pesonen, S., Diaconu, I., Kangasniemi, L., Ranki, T., Kanerva, A., Pesonen, S.K., Gerdemann, U., Leen, A.M., Kairemo, K., Oksanen, M., *et al.* (2012). Oncolytic immunotherapy of advanced solid tumors with a CD40L-expressing replicating adenovirus: assessment of safety and immunologic responses in patients. *Cancer Res* 72, 1621-1631.
- Pesonen, S., Kangasniemi, L., and Hemminki, A. (2011). Oncolytic adenoviruses for the treatment of human cancer: focus on translational and clinical data. *Mol Pharm* 8, 12-28.
- Philip, P.A., Benedetti, J., Fenoglio-Preiser, C., Zalupski, M., Lenz, H., O'Reilly, E., Wong, R., Atkins, J., Abruzzese, J., and Blanke, C. (2007). Phase III study of gemcitabine [G] plus cetuximab [C] versus gemcitabine in patients [pts] with locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma [PC]: SWOG S0205 study. *J Clin Oncol* 25, a4509.
- Philip, P.A., Mooney, M., Jaffe, D., Eckhardt, G., Moore, M., Meropol, N., Emens, L., O'Reilly, E., Korc, M., Ellis, L., *et al.* (2009). Consensus report of the national cancer institute clinical trials planning meeting on pancreas cancer treatment. *J Clin Oncol* 27, 5660-5669.
- Pommier, Y., Sordet, O., Antony, S., Hayward, R.L., and Kohn, K.W. (2004). Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene* 23, 2934-2949.

- Pour, P., Althoff, J., Gingell, R., and Kupper, R. (1976). A further pancreatic carcinogen in Syrian golden hamsters: N-nitroso-bis(2-acetoxypropyl)amine. *Cancer Lett* *1*, 197-202.
- Pour, P., Mohr, U., Cardesa, A., Althoff, J., and Kruger, F.W. (1975). Pancreatic neoplasms in an animal model: morphological, biological, and comparative studies. *Cancer* *36*, 379-389.
- Prabhu, V.V., Allen, J.E., Hong, B., Zhang, S., Cheng, H., and El-Deiry, W.S. (2012). Therapeutic targeting of the p53 pathway in cancer stem cells. *Expert Opin Ther Targets* *16*, 1161-1174.

Q

- Qiu, X., Wang, Z., Li, Y., Miao, Y., Ren, Y., and Luan, Y. (2012). Characterization of sphere-forming cells with stem-like properties from the small cell lung cancer cell line H446. *Cancer Lett* *323*, 161-170.
- Quintana, E., Shackleton, M., Foster, H.R., Fullen, D.R., Sabel, M.S., Johnson, T.M., and Morrison, S.J. (2010). Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell* *18*, 510-523.

R

- Raimondi, S., Maisonneuve, P., Lohr, J.M., and Lowenfels, A.B. (2007). Early onset pancreatic cancer: evidence of a major role for smoking and genetic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* *16*, 1894-1897.
- Raimondi, S., Maisonneuve, P., and Lowenfels, A.B. (2009). Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* *6*, 699-708.
- Rappa, G., and Lorico, A. (2010). Phenotypic characterization of mammosphere-forming cells from the human MA-11 breast carcinoma cell line. *Exp Cell Res* *316*, 1576-1586.
- Rasheed, Z.A., Yang, J., Wang, Q., Kowalski, J., Freed, I., Murter, C., Hong, S.M., Koorstra, J.B., Rajeshkumar, N.V., He, X., *et al.* (2010). Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* *102*, 340-351.
- Real, F.X. (2003). A "catastrophic hypothesis" for pancreas cancer progression. *Gastroenterology* *124*, 1958-1964.
- Real, F.X., Cibrian-Uhalte, E., and Martinelli, P. (2008). Pancreatic cancer development and progression: remodeling the model. *Gastroenterology* *135*, 724-728.
- Regine, W.F., Winter, K.A., Abrams, R.A., Safran, H., Hoffman, J.P., Konski, A., Benson, A.B., Macdonald, J.S., Kudrimoti, M.R., Fromm, M.L., *et al.* (2008). Fluorouracil vs gemcitabine chemotherapy before and after fluorouracil-based chemoradiation following resection of pancreatic adenocarcinoma: a randomized controlled trial. *JAMA* *299*, 1019-1026.
- Reid, M.D., Bagci, P., and Adsay, N.V. (2013). Histopathologic assessment of pancreatic cancer: does one size fit all? *J Surg Oncol* *107*, 67-77.
- Reid, T., Warren, R., and Kirn, D. (2002). Intravascular adenoviral agents in cancer patients: lessons from clinical trials. *Cancer Gene Ther* *9*, 979-986.

- Reyes, G., Villanueva, A., Garcia, C., Sancho, F.J., Piulats, J., Lluís, F., and Capella, G. (1996). Orthotopic xenografts of human pancreatic carcinomas acquire genetic aberrations during dissemination in nude mice. *Cancer Res* *56*, 5713-5719.
- Ribacka, C., Pesonen, S., and Hemminki, A. (2008). Cancer, stem cells, and oncolytic viruses. *Ann Med* *40*, 496-505.
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* *445*, 111-115.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., and Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 402-412.
- Roder, C., Trauzold, A., and Kalthoff, H. (2011). Impact of death receptor signaling on the malignancy of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur J Cell Biol* *90*, 450-455.
- Rodriguez, R., Schuur, E.R., Lim, H.Y., Henderson, G.A., Simons, J.W., and Henderson, D.R. (1997). Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res* *57*, 2559-2563.
- Roebuck, B.D., Baumgartner, K.J., and Thron, C.D. (1984). Characterization of two populations of pancreatic atypical acinar cell foci induced by azaserine in the rat. *Lab Invest* *50*, 141-146.
- Roebuck, B.D., and Longnecker, D.S. (1977). Species and rat strain variation in pancreatic nodule induction by azaserine. *J Natl Cancer Inst* *59*, 1273-1277.
- Rogulski, K.R., Wing, M.S., Paielli, D.L., Gilbert, J.D., Kim, J.H., and Freytag, S.O. (2000). Double suicide gene therapy augments the antitumor activity of a replication-competent lytic adenovirus through enhanced cytotoxicity and radiosensitization. *Hum Gene Ther* *11*, 67-76.
- Rojas, J.J., Gimenez-Alejandre, M., Gil-Hoyos, R., Cascallo, M., and Alemany, R. (2012). Improved systemic antitumor therapy with oncolytic adenoviruses by replacing the fiber shaft HSG-binding domain with RGD. *Gene Ther* *19*, 453-457.
- Rojas, J.J., Guedan, S., Searle, P.F., Martinez-Quintanilla, J., Gil-Hoyos, R., Alcayaga-Miranda, F., Cascallo, M., and Alemany, R. (2010). Minimal RB-responsive E1A promoter modification to attain potency, selectivity, and transgene-arming capacity in oncolytic adenoviruses. *Mol Ther* *18*, 1960-1971.
- Roldan, G.E., Gunderson, L.L., Nagorney, D.M., Martin, J.K., Ilstrup, D.M., Holbrook, M.A., Kvols, L.K., and McIlrath, D.C. (1988). External beam versus intraoperative and external beam irradiation for locally advanced pancreatic cancer. *Cancer* *61*, 1110-1116.
- Rooman, I., and Real, F.X. (2012). Pancreatic ductal adenocarcinoma and acinar cells: a matter of differentiation and development? *Gut* *61*, 449-458.
- Rosen, J.M., and Jordan, C.T. (2009). The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* *324*, 1670-1673.
- Rowinsky, E.K., Youssoufian, H., Tonra, J.R., Solomon, P., Burtrum, D., and Ludwig, D.L. (2007). IMC-A12, a human IgG1 monoclonal antibody to the insulin-like growth factor I receptor. *Clin Cancer Res* *13*, 5549s-5555s.

- Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S.A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S.N., Sohn, T.A., Hruban, R.H., Yeo, C.J., *et al.* (1997). Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* *57*, 1731-1734.
- Rubio-Viqueira, B., and Hidalgo, M. (2009). Direct in vivo xenograft tumor model for predicting chemotherapeutic drug response in cancer patients. *Clin Pharmacol Ther* *85*, 217-221.
- Rubio-Viqueira, B., Jimeno, A., Cusatis, G., Zhang, X., Iacobuzio-Donahue, C., Karikari, C., Shi, C., Danenberg, K., Danenberg, P.V., Kuramochi, H., *et al.* (2006). An in vivo platform for translational drug development in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* *12*, 4652-4661.
- Rulyak, S.J., Kimmey, M.B., Veenstra, D.L., and Brentnall, T.A. (2003). Cost-effectiveness of pancreatic cancer screening in familial pancreatic cancer kindreds. *Gastrointest Endosc* *57*, 23-29.
- Russell, S.J., Peng, K.W., and Bell, J.C. (2012). Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* *30*, 658-670.

S

- Sabbath, K.D., Ball, E.D., Larcom, P., Davis, R.B., and Griffin, J.D. (1985). Heterogeneity of clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *J Clin Invest* *75*, 746-753.
- Safran, H., Miner, T., Resnick, M., Dipetrillo, T., McNulty, B., Evans, D., Joseph, P., Plette, A., Millis, R., Sears, D., *et al.* (2008). Lapatinib/gemcitabine and lapatinib/gemcitabine/oxaliplatin: a phase I study for advanced pancreaticobiliary cancer. *Am J Clin Oncol* *31*, 140-144.
- Sahin, F., Maitra, A., Argani, P., Sato, N., Maehara, N., Montgomery, E., Goggins, M., Hruban, R.H., and Su, G.H. (2003). Loss of Stk11/Lkb1 expression in pancreatic and biliary neoplasms. *Mod Pathol* *16*, 686-691.
- Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* *19*, 183-232.
- Sanchez-Alcazar, J.A., Khodjakov, A., and Schneider, E. (2001). Anticancer drugs induce increased mitochondrial cytochrome c expression that precedes cell death. *Cancer Res* *61*, 1038-1044.
- Sarfstein, R., Pasmanik-Chor, M., Yeheskel, A., Edry, L., Shomron, N., Warman, N., Wertheimer, E., Maor, S., Shochat, L., and Werner, H. (2012). Insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) translocates to nucleus and autoregulates IGF-IR gene expression in breast cancer cells. *J Biol Chem* *287*, 2766-2776.
- Sato, N., Mizumoto, K., Nakamura, M., Maehara, N., Minamishima, Y.A., Nishio, S., Nagai, E., and Tanaka, M. (2001). Correlation between centrosome abnormalities and chromosomal instability in human pancreatic cancer cells. *Cancer Genet Cytogenet* *126*, 13-19.
- Sato, N., Mizumoto, K., Nakamura, M., Nakamura, K., Kusumoto, M., Niiyama, H., Ogawa, T., and Tanaka, M. (1999). Centrosome abnormalities in pancreatic ductal carcinoma. *Clin Cancer Res* *5*, 963-970.

- Scott, A.M., Wolchok, J.D., and Old, L.J. (2012). Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 278-287.
- Schafer, K.A. (1998). The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 35, 461-478.
- Schimmer, A.D., Dalili, S., Batey, R.A., and Riedl, S.J. (2006). Targeting XIAP for the treatment of malignancy. *Cell Death Differ* 13, 179-188.
- Schubbert, S., Shannon, K., and Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 295-308.
- Schutte, M., Hruban, R.H., Geradts, J., Maynard, R., Hilgers, W., Rabindran, S.K., Moskaluk, C.A., Hahn, S.A., Schwarte-Waldhoff, I., Schmiegel, W., *et al.* (1997). Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 57, 3126-3130.
- Senzer, N.N., Kaufman, H.L., Amatruda, T., Nemunaitis, M., Reid, T., Daniels, G., Gonzalez, R., Glaspy, J., Whitman, E., Harrington, K., *et al.* (2009). Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 27, 5763-5771.
- Sergeant, G., Vankelecom, H., Gremeaux, L., and Topal, B. (2009). Role of cancer stem cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Clin Oncol* 6, 580-586.
- Shah, A.N., Summy, J.M., Zhang, J., Park, S.I., Parikh, N.U., and Gallick, G.E. (2007). Development and characterization of gemcitabine-resistant pancreatic tumor cells. *Ann Surg Oncol* 14, 3629-3637.
- Shaw, R.J., Bardeesy, N., Manning, B.D., Lopez, L., Kosmatka, M., DePinho, R.A., and Cantley, L.C. (2004). The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* 6, 91-99.
- Shaw, R.J., Lamia, K.A., Vasquez, D., Koo, S.H., Bardeesy, N., Depinho, R.A., Montminy, M., and Cantley, L.C. (2005). The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 310, 1642-1646.
- Sherr, C.J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103-112.
- Shi, C., Hruban, R.H., and Klein, A.P. (2009). Familial pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med* 133, 365-374.
- Shmelkov, S.V., St Clair, R., Lyden, D., and Rafii, S. (2005). AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 715-719.
- Short, J.J., and Curiel, D.T. (2009). Oncolytic adenoviruses targeted to cancer stem cells. *Mol Cancer Ther* 8, 2096-2102.
- Shuster, S., Frost, G.I., Csoka, A.B., Formby, B., and Stern, R. (2002). Hyaluronidase reduces human breast cancer xenografts in SCID mice. *Int J Cancer* 102, 192-197.
- Siegel, P.M., and Massague, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 807-821.
- Siegel, R., Naishadham, D., and Jemal, A. (2012). Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62, 10-29.
- Singh, A., and Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29, 4741-4751.
- Singh, B.N., Fu, J., Srivastava, R.K., and Shankar, S. (2011). Hedgehog signaling antagonist GDC-0449 (Vismodegib) inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics: molecular mechanisms. *PLoS One* 6, e27306.

- Singh, S., Trevino, J., Bora-Singhal, N., Coppola, D., Haura, E., Altiok, S., and Chellappan, S.P. (2012). EGFR/Src/Akt signaling modulates Sox2 expression and self-renewal of stem-like side-population cells in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* 11, 73.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63, 5821-5828.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401.
- Small, E.J., Carducci, M.A., Burke, J.M., Rodriguez, R., Fong, L., van Ummersen, L., Yu, D.C., Aimi, J., Ando, D., Working, P., *et al.* (2006). A phase I trial of intravenous CG7870, a replication-selective, prostate-specific antigen-targeted oncolytic adenovirus, for the treatment of hormone-refractory, metastatic prostate cancer. *Mol Ther* 14, 107-117.
- Smith, K.D., Mezhir, J.J., Bickenbach, K., Veerapong, J., Charron, J., Posner, M.C., Roizman, B., and Weichselbaum, R.R. (2006). Activated MEK suppresses activation of PKR and enables efficient replication and in vivo oncolysis by Deltagamma(1)34.5 mutants of herpes simplex virus 1. *J Virol* 80, 1110-1120.
- Smith, T., Idamakanti, N., Kylefjord, H., Rollence, M., King, L., Kaloss, M., Kaleko, M., and Stevenson, S.C. (2002). In vivo hepatic adenoviral gene delivery occurs independently of the coxsackievirus-adenovirus receptor. *Mol Ther* 5, 770-779.
- Solcia, E., Capella, C., and Kloppel, G. (1995). Tumors of the pancreas. Atlas of tumor pathology. (Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology).
- Somia, N., and Verma, I.M. (2000). Gene therapy: trials and tribulations. *Nat Rev Genet* 1, 91-99.
- Sporn, M.B., and Roberts, A.B. (1985). Autocrine growth factors and cancer. *Nature* 313, 745-747.
- Stanger, B.Z., Stiles, B., Lauwers, G.Y., Bardeesy, N., Mendoza, M., Wang, Y., Greenwood, A., Cheng, K.H., McLaughlin, M., Brown, D., *et al.* (2005). Pten constrains centroacinar cell expansion and malignant transformation in the pancreas. *Cancer Cell* 8, 185-195.
- Stathis, A., and Moore, M.J. (2010). Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol* 7, 163-172.
- Stoeltzing, O., Liu, W., Reinmuth, N., Fan, F., Parikh, A.A., Bucana, C.D., Evans, D.B., Semenza, G.L., and Ellis, L.M. (2003). Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by an insulin-like growth factor-I receptor autocrine loop in human pancreatic cancer. *Am J Pathol* 163, 1001-1011.
- Su, G.H., Hilgers, W., Shekher, M.C., Tang, D.J., Yeo, C.J., Hruban, R.H., and Kern, S.E. (1998). Alterations in pancreatic, biliary, and breast carcinomas support MKK4 as a genetically targeted tumor suppressor gene. *Cancer Res* 58, 2339-2342.
- Su, G.H., Hruban, R.H., Bansal, R.K., Bova, G.S., Tang, D.J., Shekher, M.C., Westerman, A.M., Entius, M.M., Goggins, M., Yeo, C.J., *et al.* (1999). Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers. *Am J Pathol* 154, 1835-1840.

- Su, Y.J., Lai, H.M., Chang, Y.W., Chen, G.Y., and Lee, J.L. (2011). Direct reprogramming of stem cell properties in colon cancer cells by CD44. *EMBO J* 30, 3186-3199.
- Sugihara, E., and Saya, H. (2013). Complexity of cancer stem cells. *Int J Cancer* 132, 1249-1259.
- Sun, B., Chen, M., Hawks, C.L., Pereira-Smith, O.M., and Hornsby, P.J. (2005). The minimal set of genetic alterations required for conversion of primary human fibroblasts to cancer cells in the subrenal capsule assay. *Neoplasia* 7, 585-593.
- Sundaram, M.V. (2005). The love-hate relationship between Ras and Notch. *Genes Dev* 19, 1825-1839.
- Suzuki, A., Nakauchi, H., and Taniguchi, H. (2004). Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes* 53, 2143-2152.

T

- Tada, M., Ohashi, M., Shiratori, Y., Okudaira, T., Komatsu, Y., Kawabe, T., Yoshida, H., Machinami, R., Kishi, K., and Omata, M. (1996). Analysis of K-ras gene mutation in hyperplastic duct cells of the pancreas without pancreatic disease. *Gastroenterology* 110, 227-231.
- Takebe, N., Harris, P.J., Warren, R.Q., and Ivy, S.P. (2011). Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 97-106.
- Tascilar, M., Skinner, H.G., Rosty, C., Sohn, T., Wilentz, R.E., Offerhaus, G.J., Adsay, V., Abrams, R.A., Cameron, J.L., Kern, S.E., *et al.* (2001). The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 7, 4115-4121.
- Terhune, P.G., Phifer, D.M., Tosteson, T.D., and Longnecker, D.S. (1998). K-ras mutation in focal proliferative lesions of human pancreas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7, 515-521.
- Thayer, S.P., di Magliano, M.P., Heiser, P.W., Nielsen, C.M., Roberts, D.J., Lauwers, G.Y., Qi, Y.P., Gysin, S., Fernandez-del Castillo, C., Yajnik, V., *et al.* (2003). Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 425, 851-856.
- Thorne, S.H., Tam, B.Y., Kirn, D.H., Contag, C.H., and Kuo, C.J. (2006). Selective intratumoral amplification of an antiangiogenic vector by an oncolytic virus produces enhanced antivascular and anti-tumor efficacy. *Mol Ther* 13, 938-946.
- Tirino, V., Desiderio, V., Paino, F., De Rosa, A., Papaccio, F., La Noce, M., Laino, L., De Francesco, F., and Papaccio, G. (2013). Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J* 27, 13-24.
- Toole, B.P. (2004). Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* 4, 528-539.
- Tosh, D., and Slack, J.M. (2002). How cells change their phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 187-194.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.

- Trauzold, A., Schmiedel, S., Roder, C., Tams, C., Christgen, M., Oestern, S., Arlt, A., Westphal, S., Kapischke, M., Ungefroren, H., *et al.* (2003). Multiple and synergistic deregulations of apoptosis-controlling genes in pancreatic carcinoma cells. *Br J Cancer* *89*, 1714-1721.
- Trepel, M., Stoneham, C.A., Eleftherohorinou, H., Mazarakis, N.D., Pasqualini, R., Arap, W., and Hajitou, A. (2009). A heterotypic bystander effect for tumor cell killing after adeno-associated virus/phage-mediated, vascular-targeted suicide gene transfer. *Mol Cancer Ther* *8*, 2383-2391.
- Tuveson, D.A., Zhu, L., Gopinathan, A., Willis, N.A., Kachatrian, L., Grochow, R., Pin, C.L., Mitin, N.Y., Taparowsky, E.J., Gimotty, P.A., *et al.* (2006). Mist1-KrasG12D knock-in mice develop mixed differentiation metastatic exocrine pancreatic carcinoma and hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* *66*, 242-247.

U

- Uberall, I., Kolar, Z., Trojanec, R., Berkovcova, J., and Hajduch, M. (2008). The status and role of ErbB receptors in human cancer. *Exp Mol Pathol* *84*, 79-89.
- Ueda, S., Ogata, S., Tsuda, H., Kawarabayashi, N., Kimura, M., Sugiura, Y., Tamai, S., Matsubara, O., Hatsuse, K., and Mochizuki, H. (2004). The correlation between cytoplasmic overexpression of epidermal growth factor receptor and tumor aggressiveness: poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* *29*, e1-8.
- Ueki, T., Toyota, M., Sohn, T., Yeo, C.J., Issa, J.P., Hruban, R.H., and Goggins, M. (2000). Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* *60*, 1835-1839.

V

- van Beusechem, V.W., van den Doel, P.B., Grill, J., Pinedo, H.M., and Gerritsen, W.R. (2002). Conditionally replicative adenovirus expressing p53 exhibits enhanced oncolytic potency. *Cancer Res* *62*, 6165-6171.
- Van den Broeck, A., Gremeaux, L., Topal, B., and Vankelecom, H. (2012). Human pancreatic adenocarcinoma contains a side population resistant to gemcitabine. *BMC Cancer* *12*, 354.
- van Heek, N.T., Meeker, A.K., Kern, S.E., Yeo, C.J., Lillemoe, K.D., Cameron, J.L., Offerhaus, G.J., Hicks, J.L., Wilentz, R.E., Goggins, M.G., *et al.* (2002). Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol* *161*, 1541-1547.
- Van Laethem, J.L., Verslype, C., Iovanna, J.L., Michl, P., Conroy, T., Louvet, C., Hammel, P., Mitry, E., Ducreux, M., Maraculla, T., *et al.* (2012). New strategies and designs in pancreatic cancer research: consensus guidelines report from a European expert panel. *Ann Oncol* *23*, 570-576.
- Vasey, P.A., Shulman, L.N., Campos, S., Davis, J., Gore, M., Johnston, S., Kirn, D.H., O'Neill, V., Siddiqui, N., Seiden, M.V., *et al.* (2002). Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3

- weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 20, 1562-1569.
- Venkitaraman, A.R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108, 171-182.
- Vervenne, W., Bennouna, J., Humblet, Y., Gill, S., Moore, M.J., Van Laethem, J., Shang, A., Cosaert, J., Verslype, C., and Van Cutsem, E. (2008). A randomized, double-blind, placebo (P) controlled, multicenter phase III trial to evaluate the efficacy and safety of adding bevacizumab (B) to erlotinib (E) and gemcitabine (G) in patients (pts) with metastatic pancreatic cancer [abstract]. *J Clin Oncol* 26, a4507.
- Villanueva, A., Garcia, C., Paules, A.B., Vicente, M., Megias, M., Reyes, G., de Villalonga, P., Agell, N., Lluís, F., Bachs, O., *et al.* (1998). Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene* 17, 1969-1978.
- Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2012). Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* 10, 717-728.
- Vlashi, E., Kim, K., Lagadec, C., Donna, L.D., McDonald, J.T., Eghbali, M., Sayre, J.W., Stefani, E., McBride, W., and Pajonk, F. (2009). In vivo imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells. *J Natl Cancer Inst* 101, 350-359.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10, 789-799.
- von Forstner, C., Egberts, J.H., Ammerpohl, O., Niedzielska, D., Buchert, R., Mikecz, P., Schumacher, U., Peldschus, K., Adam, G., Pilarsky, C., *et al.* (2008). Gene expression patterns and tumor uptake of 18F-FDG, 18F-FLT, and 18F-FEC in PET/MRI of an orthotopic mouse xenotransplantation model of pancreatic cancer. *J Nucl Med* 49, 1362-1370.
- Von Mehren, M., Britten, C., Lear, K., Camidge, D., and Wainberg, Z. (2010). Phase I, dose-escalation study of BIIB022 (anti-IGF-1R antibody) in advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 28, 2612.
- Voskoglou-Nomikos, T., Pater, J.L., and Seymour, L. (2003). Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clin Cancer Res* 9, 4227-4239.

W

- Waddington, S.N., McVey, J.H., Bhella, D., Parker, A.L., Barker, K., Atoda, H., Pink, R., Buckley, S.M., Greig, J.A., Denby, L., *et al.* (2008). Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell* 132, 397-409.
- Wang, H., and Tsang, B.K. (2007). Nodal signalling and apoptosis. *Reproduction* 133, 847-853.
- Wang, X., Su, C., Cao, H., Li, K., Chen, J., Jiang, L., Zhang, Q., Wu, X., Jia, X., Liu, Y., *et al.* (2008). A novel triple-regulated oncolytic adenovirus carrying p53 gene exerts potent antitumor efficacy on common human solid cancers. *Mol Cancer Ther* 7, 1598-1603.
- Wang, Y., and Sun, Y. (2002). Insulin-like growth factor receptor-1 as an anti-cancer target: blocking transformation and inducing apoptosis. *Curr Cancer Drug Targets* 2, 191-207.

- Wang, Z., Li, Y., Ahmad, A., Azmi, A.S., Kong, D., Banerjee, S., and Sarkar, F.H. (2010). Targeting miRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: An emerging concept in overcoming drug resistance. *Drug Resist Updat* 13, 109-118.
- Wellner, U., Schubert, J., Burk, U.C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., Waldvogel, B., Vannier, C., Darling, D., zur Hausen, A., *et al.* (2009). The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol* 11, 1487-1495.
- Wennier, S., Li, S., and McFadden, G. (2011). Oncolytic virotherapy for pancreatic cancer. *Expert Rev Mol Med* 13, e18.
- Whitcomb, D.C., Gorry, M.C., Preston, R.A., Furey, W., Sossenheimer, M.J., Ulrich, C.D., Martin, S.P., Gates, L.K., Jr., Amann, S.T., Toskes, P.P., *et al.* (1996). Hereditary pancreatitis is caused by a mutation in the cationic trypsinogen gene. *Nat Genet* 14, 141-145.
- White, E. (2006). Mechanisms of apoptosis regulation by viral oncogenes in infection and tumorigenesis. *Cell Death Differ* 13, 1371-1377.
- Wiezorek, J., Holland, P., and Graves, J. (2010). Death receptor agonists as a targeted therapy for cancer. *Clin Cancer Res* 16, 1701-1708.
- Wilentz, R.E., Geradts, J., Maynard, R., Offerhaus, G.J., Kang, M., Goggins, M., Yeo, C.J., Kern, S.E., and Hruban, R.H. (1998). Inactivation of the p16 (INK4A) tumor-suppressor gene in pancreatic duct lesions: loss of intranuclear expression. *Cancer Res* 58, 4740-4744.
- Wilentz, R.E., Iacobuzio-Donahue, C.A., Argani, P., McCarthy, D.M., Parsons, J.L., Yeo, C.J., Kern, S.E., and Hruban, R.H. (2000). Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* 60, 2002-2006.
- Wolpin, B.M., Chan, A.T., Hartge, P., Chanock, S.J., Kraft, P., Hunter, D.J., Giovannucci, E.L., and Fuchs, C.S. (2009). ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* 101, 424-431.
- Wong, H.H., and Lemoine, N.R. (2009). Pancreatic cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 6, 412-422.

X

- Xia, J., Chen, C., Chen, Z., Miele, L., Sarkar, F.H., and Wang, Z. (2012). Targeting pancreatic cancer stem cells for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1826, 385-399.
- Xu, X., Browning, V.L., and Odorico, J.S. (2011). Activin, BMP and FGF pathways cooperate to promote endoderm and pancreatic lineage cell differentiation from human embryonic stem cells. *Mech Dev* 128, 412-427.
- Xu, Z., Chen, X., Peng, C., Liu, E., Li, Y., Li, C., and Niu, J. (2012). Hypoxia-inducible factor-1alpha suppressed hepatocellular carcinoma cell apoptosis through influencing on Omi/HtrA2 expression and its releasing from the mitochondrion. *Oncol Res* 20, 213-220.

Y

- Yamaguchi, H., Shimizu, M., Ban, S., Koyama, I., Hatori, T., Fujita, I., Yamamoto, M., Kawamura, S., Kobayashi, M., Ishida, K., *et al.* (2009). Intraductal tubulopapillary neoplasms of the pancreas distinct from pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am J Surg Pathol* *33*, 1164-1172.
- Yamano, M., Fujii, H., Takagaki, T., Kadowaki, N., Watanabe, H., and Shirai, T. (2000). Genetic progression and divergence in pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* *156*, 2123-2133.
- Yanagisawa, A., Ohtake, K., Ohashi, K., Hori, M., Kitagawa, T., Sugano, H., and Kato, Y. (1993). Frequent c-Ki-ras oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res* *53*, 953-956.
- Yarden, Y., and Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 127-137.
- Yeates, L.C., and Powis, G. (1997). The expression of the molecular chaperone calnexin is decreased in cancer cells grown as colonies compared to monolayer. *Biochem Biophys Res Commun* *238*, 66-70.
- Yen, W.C., Fischer, M.M., Hynes, M., Wu, J., Kim, E., Beviglia, L., Yeung, V.P., Song, X., Kapoun, A.M., Lewicki, J., *et al.* (2012). Anti-DLL4 has broad spectrum activity in pancreatic cancer dependent on targeting DLL4-Notch signaling in both tumor and vasculature cells. *Clin Cancer Res* *18*, 5374-5386.
- Yeo, C.J., Cameron, J.L., Sohn, T.A., Lillemoe, K.D., Pitt, H.A., Talamini, M.A., Hruban, R.H., Ord, S.E., Sauter, P.K., Coleman, J., *et al.* (1997). Six hundred fifty consecutive pancreaticoduodenectomies in the 1990s: pathology, complications, and outcomes. *Ann Surg* *226*, 248-257; discussion 257-260.
- Yoshida, T., and Hanahan, D. (1994). Murine pancreatic ductal adenocarcinoma produced by in vitro transduction of polyoma middle T oncogene into the islets of Langerhans. *Am J Pathol* *145*, 671-684.

Z

- Zamboni, G., Scarpa, A., Bogina, G., Iacono, C., Bassi, C., Talamini, G., Sessa, F., Capella, C., Solcia, E., Rickaert, F., *et al.* (1999). Mucinous cystic tumors of the pancreas: clinicopathological features, prognosis, and relationship to other mucinous cystic tumors. *Am J Surg Pathol* *23*, 410-422.
- Zeng, Y.A., and Nusse, R. (2010). Wnt proteins are self-renewal factors for mammary stem cells and promote their long-term expansion in culture. *Cell Stem Cell* *6*, 568-577.
- Zhang, W.W., Fang, X., Mazur, W., French, B.A., Georges, R.N., and Roth, J.A. (1994). High-efficiency gene transfer and high-level expression of wild-type p53 in human lung cancer cells mediated by recombinant adenovirus. *Cancer Gene Ther* *1*, 5-13.
- Zhang, Z., Zou, W., Wang, J., Gu, J., Dang, Y., Li, B., Zhao, L., Qian, C., Qian, Q., and Liu, X. (2005). Suppression of tumor growth by oncolytic adenovirus-mediated delivery of an antiangiogenic gene, soluble Flt-1. *Mol Ther* *11*, 553-562.

-
- Zhou, B.B., Zhang, H., Damelin, M., Geles, K.G., Grindley, J.C., and Dirks, P.B. (2009). Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 8, 806-823.
- Zhou, D.H., Trauzold, A., Roder, C., Pan, G., Zheng, C., and Kalthoff, H. (2008a). The potential molecular mechanism of overexpression of uPA, IL-8, MMP-7 and MMP-9 induced by TRAIL in pancreatic cancer cell. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 7, 201-209.
- Zhou, J., Wang, C.Y., Liu, T., Wu, B., Zhou, F., Xiong, J.X., Wu, H.S., Tao, J., Zhao, G., Yang, M., *et al.* (2008b). Persistence of side population cells with high drug efflux capacity in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 14, 925-930.
- Zhou, J., Wang, C.Y., Liu, T., Wu, H.S., Zhou, F., Xiong, J.X., Zhao, G., Yang, M., Yin, T., and Zhou, M.T. (2008c). [Phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin pathway is critical for survival and proliferation of pancreatic cancer stem-like side population cells]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 88, 2994-2998.
- Zhou, N., and Mo, Y.Y. (2012). Roles of microRNAs in cancer stem cells. *Front Biosci (Schol Ed)* 4, 810-818.

APÈNDIX

ARTICLE EN REVISIÓ A *STEM CELL RESEARCH***“uPAR-controlled oncolytic adenoviruses eliminate cancer stem cells in human pancreatic tumors”**

Luciano Sobrevals^{1,2*}, Ana Mato-Berciano^{1,2*}, Nerea Urtasun^{3,4}, Adela Mazo^{3,4}, Cristina Fillat^{1,2#}

¹Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer-IDIBAPS, ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona. ³Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red CIBERDEM, Barcelona, Spain.

*Luciano Sobrevals and Ana Mato-Berciano equally contributed to the work.

#Correspondence should be addressed to: Cristina Fillat, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer-IDIBAPS, Rosselló 149-153, 08036-Barcelona, Spain; phone: +34-932275400/Ext.4579; e-mail: cfillat@clinic.ub.es

Abstract

Pancreatic tumors contain cancer stem cells highly resistant to chemotherapy. The identification of therapies that can eliminate this population of cells might provide with more effective treatments. In the current work we evaluated the potential of oncolytic adenoviruses to act against pancreatic cancer stem cells (PCSC). PCSC from two patient-derived xenograft models were isolated from orthotopic pancreatic tumors treated with saline, or with the chemotherapeutic agent gemcitabine. An enrichment in the number of PCSC expressing the cell surface marker CD133 and a marked enhancement on tumorspheres formation was observed in gemcitabine treated tumors. No significant increase in the

CD44, CD24, and epithelial-specific antigen (ESA) positive cells was observed. Neoplastic sphere-forming cells were susceptible to adenoviral infection and exposure to oncolytic adenoviruses resulted in elevated cytotoxicity with both Adwt and the tumor specific AduPARE1A adenovirus. In vivo, intravenous administration of a single dose of AduPARE1A in human-derived pancreatic xenografts led to a remarkable anti-tumor effect. In contrast to gemcitabine AduPARE1A treatment did not result in PCSC enrichment. No enrichment on tumor spheres neither on the CD133+ population was detected. Therefore our data provide evidences of the relevance of uPAR-controlled oncolytic adenoviruses for the elimination of pancreatic cancer stem cells.

Keywords. Pancreatic cancer stem cells, gemcitabine, oncolytic adenovirus

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma remains one of the most aggressive and devastating tumor malignancies with an overall 5-year survival rate of less than 5% (Kern et al., 2011). The only potentially curative treatment is the complete surgical resection of the tumor. Nevertheless, even after the complete tumor resection disease progression is often described. Under such circumstances identification of therapies that can target both bulk cancer cells and tumor initiating cells are important in improving pancreatic cancer treatment.

Recent work in pancreatic cancer biology has identified a distinct subpopulation of cells termed cancer stem cell (CSC) that may represent an integral part of the development and perpetuation of the tumor. Cells bearing stem cell properties from human adenocarcinoma have been defined by the expression of specific cellular markers, their self-renewal capacity, differentiation ability and in vivo tumorigenicity. In pancreatic cancer the subpopulations of CD44+/CD24+/ESA+ (Bednar and Simeone, 2009; Li et al., 2007; Li et al., 2009); CD133+ (Hermann et al., 2007; Lonardo et al., 2011) or ALDH1+ (Rasheed et al., 2010) have been identified to fulfill all these criteria. Emerging evidences indicate that

pancreatic cancer stem cells are resistant to chemotherapy and radiation suggesting that such cells may be the source of the virtually relapse of pancreatic cancer (Balic et al., 2012). Therapeutic modalities leading to the elimination of CSC are an opportunity for the effective treatment of pancreatic cancer.

Oncolytic adenoviruses are very promising anticancer agents. They are engineered to specifically target, replicate in and destroy cancer cells (Aghi and Martuza, 2005; Fillat et al., 2010; Friedman et al., 2012; Short and Curiel, 2009). Oncolytic adenoviruses targeting the abnormal Rb/p16 pathway have been shown to be able to kill brain and breast cancer initiating cells (Eriksson et al., 2007; Jiang et al., 2008). Furthermore, oncolytic adenoviruses driven by the tissue-specific promoters multidrug resistance (mdr) and cyclo-oxygenase 2 (Cox-2) have been shown to be active in breast cancer initiating cells (Bauerschmitz et al., 2008).

Recent studies in small cell lung cancer identified cells with stem-like properties being positive for uPAR gene expression (Gutova et al., 2007; Qiu et al., 2012). As we have previously shown uPAR-controlled adenoviruses are highly active in pancreatic cancer cell lines and exert strong antitumor and anti-metastatic effects in xenografts (Huch et al., 2009). In the current study we sought to explore the ability of uPAR controlled oncolytic adenoviruses to act against pancreatic CSC (PCSC). We used two primary patient xenograft models to characterize pancreatic cancer stem cells and determined the effects of AduPARE1A on PCSC cells and compared to those of gemcitabine, the most common chemotherapeutic agent used in pancreatic cancer treatment. We found that PCSC are susceptible to adenoviral transduction and are sensitive to adenovirus mediated cell death by AduPARE1A oncolytic adenovirus. In vivo treatment with a single AduPARE1A viral administration triggered significant reduction in tumor progression. In contrast to gemcitabine treatment, AduPARE1A did not increase the PCSC population. Thus, our results show that AduPARE1A shows efficacy in suppressing pancreatic cancer stem cells and could be a beneficial therapy to treat pancreatic cancer patients.

Materials and methods

Preparation of single-cell suspensions from human PDAC tumors

Human CP15 and CP13 adenocarcinoma surgical samples were obtained and implanted into the pancreas of immunodeficient mice as previously described (Perez-Torras et al., 2011). CP15 and CP13 were selected from a tumor platform of 11 PDAC specimens. Tumorgrafts retained original morphology of the human primary tumor at the generations used in the current study. To obtain single-cell suspensions, CP15 and CP13 tumor fragments, from fresh or frozen tissue, were cut into small pieces, minced completely and then an enzymatic dissociation was applied using 200 U/ml ultrapure collagenase IV (Sigma, Freehold, NJ) in DMEM-F12 medium and incubated at 37°C for 2 to 3h. The specimens were further mechanically dissociated every 15 to 20 min by pipetting. At the end of the incubation, cell suspension was washed twice with DMEMF12 supplemented with 10% of heat inactivated fetal bovine serum (FBS). Then, cells were filtered through a 70-µm filter, collected in a fresh 50-mL conical tube and adjusted to a final volume of 15 mL per tube. In order to deplete death cells or tissue debris, tumor cell suspension was separated by density centrifugation using Ficoll-Paque Plus. Cell suspension and Ficoll layers were centrifuged at 500x g for 30 minutes with the brakes turned off. Dissociated cells were transferred to a fresh 50-mL conical tube. Fresh DMEM-F12 supplemented with 10% FBS was added to the cell suspension to dilute it 1:3. Cells were filtered through a 40-µm filter and collected by centrifugation at 450x g for 10 minutes. The cell pellet was resuspended in 1 mL of DMEM-F12 supplemented with 0,4% FBS or in PBS/2% BSA according to the procedure.

Human pancreatic tumor spheres formation and culture conditions

To generate tumorspheres, single-cell suspensions from CP15 and CP13 tumors were cultured in DMEM-F12 supplemented with 0,4% FBS (Gibco, Life Technologies), 2mM L-glutamine (Gibco, Life Technologies), 10 U/ml penicillin and 10 µg/ml streptomycin (Gibco, Life technologies), 20 µg/ml Gentamicin (Gibco, Life Technologies), B27 1x (Gibco, Life Technologies), 5 µg/ml Insulin (Insulin solution from bovine pancreas, I0516 Sigma-Aldrich),

20 ng/ml of recombinant human epidermal growth factor (HuEGF, Invitrogene, Life Technologies), 20ng/ml basic fibroblast growth factors (bFGF, BD Bioscience) at 37°C and plated onto 24 multiwells plates (Lab-Tek, Nunc) at a density of 5.000-10.000 cells/well. These plates were previously coated with 10mg/ml Poly-HEMA (Sigma-Aldrich). The medium was designated as Tumor-Initiating Cells medium or TIC medium. Cells were cultured in TIC medium for at least 1-2 weeks or until the appearance of non-adherent spherical clusters. Spheres were enzymatically dissociated (Trypsin-EDTA), and sub-cultured in TIC medium for several passages before initiating the experimental assays. To allow differentiation, dissociated sphere cells were plated under standard medium supplemented with 10% FBS.

Flow cytometry analysis

Cells were resuspended in PBS 2% BSA and incubated for 30-45 min at room temperature with the corresponding antibodies. Then samples were washed twice with PBS 2% BSA, resuspended in PBS 2% BSA containing DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma) at 1 µg/ml and incubated for 15 min on ice. The antibodies used were: anti-CD133-APC (clone CD133/1 (AC133), Miltenyi Biotec), APC-H7 Mouse Anti-Human CD44 (clone G44-26 (also known as C26), BD Pharmingen™), PE Mouse Anti-Human CD24 (clone ML5, BD Pharmingen™), PerCP-Cy5.5 Mouse Anti-Human CD326 (EpCAM) (clone EBA-1, BD Pharmingen™), anti-H2K-FITC (H100-27.R55. Miltenyi Biotec) and appropriate isotype-matched control antibodies. In all the experiments using human xenograft tissue, infiltrating mouse cells were eliminated by discarding H2K (mouse histocompatibility class I) cells during flow cytometry, as previously described (Li et al. Cancer Res. 2007). Dead cells were eliminated by using the viability dye DAPI. Flow cytometry was done using a BD™ LSR II flow cytometer or a BD FACSCanto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Data were analyzed with CELLQuest Pro software (Becton Dickinson). GFP-positive cells were quantified by flow cytometry (BD™ LRS II).

Adenoviruses

AduPARE1A and AdCMVGFPLuc, have been previously described (Alemany and Curiel, 2001; Huch et al., 2009). Adwt, the wild-type adenovirus, was obtained from the ATCC (Manassas, VA). Replication-defective viruses and Adwt were propagated in HEK293 cells, and the oncolytic AduPARE1A virus was amplified in RWP1 cells. All viruses were purified by standard cesium chloride banding. The physical particle concentration (vp/ml) was determined by optical density reading (OD260) and the plaque forming units (pfu/ml) were determined on HEK293 cells by the anti-hexon staining-based method (Cascante et al., 2007). AduPARE1A and Adwt presented an equal ratio of vp and pfu.

In vitro cytotoxicity assays

Cytotoxicity assays were performed by seeding 3.000 tumor initiating suspension cells per well in 48-well poly-HEMA coated plates and cultured in TICM. Cells were infected with serial dilutions of AduPARE1A and Ad5wt starting from 1×10^5 vp/cell to 0,001 vp/cell. Seven days later, plates were centrifuged and washed with PBS. Cell viability was measured using the MTT colorimetric assay. ID50 values were estimated from dose-response curves by standard nonlinear regression (GraFit; Erithacus Software, Horley, UK), using an adapted Hill equation.

RT-PCR

Total RNA from tumors and spheres was isolated using RNAeasy (Qiagen, Hilden, Germany) following manufacturer's instructions. Samples were treated with DNase (DNAfree, Ambion). Reverse transcription reaction was performed to generate cDNA using a Retroscript RT Kit (Ambion). The obtained cDNA was PCR amplified with uPAR gene specific primers (Fwd: 5'-GCCTTACCGAGGTTGTGTGT-3'; Rv: 5'-CATCCAGGCACTGTTCTTCA-3'). RT-PCR results were confirmed by two independent RT-PCR amplifications. E1A and uPAR expression were determined by quantitative PCR (ViaTM7, Applied Biosystem) using SYBR Green reagent and specific primers (E1A: Fwd:5'-ATCGAAGAGGTAAGTGGCTGA-3'; Rv:5'-CCTCCGGTGATAATGACAAG-3'; uPAR: Fwd: 5'-GCCTTACCGAGGTTGTGTGT-3'; Rv:5'-CATCCAGGCACTGTTCTTCA-3'). B-actin gene was used to normalize expression. B-actin specific

primers: (Fwd: 5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3'; Rv: 5'-GGGAGAGGACTGGGCCATT-3')

Orthotopic Human Pancreatic Cancer Xenografts

Orthotopic human pancreatic cancer xenografts were generated as previously described (Jose et al., 2012; Kim et al., 2009). Briefly, a laparotomy incision in the left dorsal side of the mouse was performed to expose the spleen and the pancreas. Then, 3×10^5 CP15 or 4×10^5 CP13 tumor cells were injected into the pancreas of 8-week-old male athymic nude mice (Harlan Interfauna Iberica), in a final volume of 50 μ l. Abdominal muscle layer was closed with interrupted suture and the overlying skin was closed using Autoclips® (Stoelting Europe). Animals were randomly divided in two groups: Saline, and AduPARE1A. Treatments were initiated when tumors reached a tumor volume ranging from 60 to 100 mm³, measured by dorso lateral palpation. A single dose of AduPARE1A ($5 \cdot 10^{10}$ vp/mouse) was intravenously injected. To assess the effect of the treatments, animals were euthanized 30 days after the initiation of the treatments. Pancreatic tumors were fractioned and frozen in OCT for histological analysis (Akura Finetek, Zoeterwoude) or in liquid nitrogen for molecular studies.

Orthotopic xenografts from pancreatic tumorspheres were generated as previously described (Jose et al., 2012; Kim et al., 2009) by the inoculation in the pancreas of single cell suspension after tumorsphere trypsin digestion.

Tumor growth studies

Pancreatic tumors were measured at the end of the experiments, and volumes were calculated according to the formula $V(\text{mm}^3) = 0,4 \cdot (\text{larger diameter} \cdot \text{smaller diameter}^2)$. Animal procedures met the guidelines of European Community Directive 86/609/EEC and were approved by the Local Ethical Committee.

Immunohistochemistry

Paraformaldehyde-fixed paraffin embedded tumors were obtained and 3 μ m paraffin embedded sections were stained with haematoxylin-eosin for morphological analysis. Immunofluorescence was performed in frozen tissue

sections embedded in OCT by incubating with the anti-adenovirus 2/5 E1A antibody (sc-430, Santa Cruz Biotechnology Inc). AlexaFluor 633-labeled goat anti-rabbit IgG antibody (Molecular Probes, Life Technologies) was used as a secondary antibody. The nuclei were counterstained with 5 µg/ml bis-benzimide (Hoechst 33342; Sigma) and visualized under a fluorescent microscope (Nikon Eclipse 50i, Spain). The fluorescent images were captured using a digital camera (Cool Cube1, MetaSystems).

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM. Statistical significance was estimated with non parametrical U-Mann Withney test or the parametrical t-test. A *P*-value of <0.05 was considered significant (*). Statistical analyses were carried out with Prism (version 5; GraphPad software).

Results

Characterization of cancer stem cells from human pancreatic tumors

As a first step towards the evaluation of the efficacy of oncolytic adenoviruses to eliminate cancer initiating cells in pancreatic tumors we characterized pancreatic cancer stem cells (PCSC) in patient samples derived from early passage human xenograft adenocarcinomas perpetuated in the pancreas and never expanded in vitro and designated as CP15 and CP13, (Table 1) (Perez-Torras et al., 2011). The expression of the cell surface markers CD133, and the combination of CD24, CD44 and ESA previously identified as characteristic of PCSC were analyzed by flow cytometry (Hermann, Cell Stem Cell 2007, Li Cancer Res. 2007). Because an enrichment of CSC has been reported to occur upon chemotherapeutic treatments (Mueller, Gastroenterology 2009, Hindriksen Cancers 2012), the study was performed in untreated xenografts and in xenografts from mice that received a weekly dose of gemcitabine (160 mg/Kg) for five weeks (Fig. 1A). Gemcitabine treatment slowed tumor growth progression in both CP15 and CP13 models although statistically significant effects were only observed in CP15 tumors (Fig. 1B). Two weeks after the last gemcitabine dose stem cell markers were analyzed. Flow cytometric quantification of CD133 in dissociated tumor xenografts revealed noticeable differences in

the two tumors, CP15 presented 37% of cells positive for the CD133 marker whereas 61% of CD133⁺ cells were detected in CP13. A significant increase in the number of CD133⁺ cells was observed in both CP15 and CP13 tumors upon treatment with gemcitabine (Fig. 1C). When examining the expression of CD24 CD44 and ESA cell surface marker combination, 0.6% and 1.1% of cells expressed the CD24⁺CD44⁺ESA⁺ combination in CP15 and CP13 tumors respectively. Gemcitabine treatment showed a tendency to increase the frequency of the CD24⁺CD44⁺ESA⁺ population in both CP15 and CP13 tumors (Fig. 1C). These data show that xenografts from CP15 and CP13 patient 11 samples express cell surface markers of PCSC that are enriched upon a gemcitabine treatment.

Another well defining trait of cancer stem cells is their ability to grow *in vitro* as anchorage-independent colonies termed tumorspheres. In the current work we evaluated the capacity of isolated cells from CP15 and CP13 xenografts to grow as spheres and we measured the number and size of the spheres after the first and the fifth passage. Both tumors were successfully expanded to form tumorspheres and stably propagated for at least 20 passages. Comparing features in the tumorspheres of the two tumors, no differences were observed in the size of tumorspheres although a higher number of spheres was observed in CP13 both in the first and the fifth passage. Consistent with an enrichment of PCSC upon gemcitabine treatment, the number and size of spheres was larger in tumorspheres expanded from gemcitabine treated xenografts. Differences were more remarkable in CP-15 tumors (3.8-fold increase in sphere number, 6.3-fold increase in the sphere size) (Fig. 2A). To further analyze if the tumorspheres exhibited the properties of stem cells we tested for their capacity to differentiate and to recapitulate the phenotype of the original tumor. Tumorspheres plated in standard medium displayed an epithelial phenotype typical of pancreatic cancer cell lines (Fig. 2B). Of notice the injection of single cell suspensions of tumorspheres into the pancreas of immunodeficient mice generated tumors that histologically resemble CP15 and CP13 patient's primary tumors with an early passage in nude mice (Fig. 2C).

Targeting cancer initiating cells with oncolytic adenoviruses

We tested the capacity of adenoviruses to transduce pancreatic cancer stem cells. Tumorspheres from CP15 and CP13 xenografts were infected with AdCMVGFPLuc reporter adenovirus and GFP expression was analyzed at different time-points. GFP expression was already evident at 24h post-transduction and three days later more than 80% of the cells were positive for GFP (Supplementary Fig.1). To evaluate the sensitivity of PCSC to adenoviral mediated lytic cell death, tumorspheres were incubated in the presence of different viral doses of wild type adenovirus (Adwt) and the AduPARE1A oncolytic adenovirus. A substantial cell killing effect was observed in tumorspheres after Adwt and AduPARE1A infection showing similar cytotoxicity in CP15 (ID50: 104 ± 15.42 Adwt, 108 ± 15.01 AduPARE1A). CP13 tumorspheres displayed higher sensitivity to adenoviral cytolysis (ID50: $71,72 \pm 14,7$ Adwt, $55,19 \pm 7,74$ AduPARE1A) (Fig. 3A). The increased sensitivity in CP13 vs CP15 was of 2.0-fold in AduPARE1A infected cells. This was in line with an increased expression of the uPAR gene in CP13 tumorspheres (Fig. 3B).

AduPARE1A oncolytic adenoviruses treatment does not spare pancreatic cancer stem cells

To test the effect of AduPARE1A therapy in a clinically relevant setting, a single dose of AduPARE1A 5×10^{10} vp/mice was i.v. injected into mice bearing CP15 or CP13 tumors in the pancreas (Fig. 4A). Tumor volume was measured at the end of the experiment on day 30 after treatment was initiated. AduPARE1A treatment significantly inhibited both CP15 and CP13 tumor growth (Fig. 4B). Evidence of viral replication was observed in treated tumors as shown by the expression of E1A (Fig, 5C, 5D). Current observations were limited to 30-days post-treatment due to the presence of lifethreatening tumors in the CP15 control group. However, the detection of E1A gene expression in treated tumors suggests that AduPARE1A antitumoral effects could be more extensive if followed long term.

Having shown that gemcitabine treatment significantly increased the percentage of CD133⁺ cells and the number and size of tumorspheres from CP15 and CP13 treated tumors (Fig. 1C, 2A), we determined the effects of AduPARE1A treatment on the content of CD133⁺ cells and in tumorsphere

formation capacity. Interestingly, in contrast to gemcitabine we did not identify any enrichment in the CD133⁺ cell population neither in CP15 nor in CP13 (Fig. 5A). Moreover AduPARE1A treated 13 tumors showed a tendency to form less tumorspheres than saline injected tumors in CP15 and a significant smaller proportion of tumorspheres were formed in CP13 treated tumors, at the passage analyzed (Fig. 5B).

These data indicate that AduPARE1A triggers a strong antitumoral response in pancreatic tumors and does not enrich tumors on cancer stem cells.

Discussion

Recent studies in cancer therapy favor the idea that the disconnection between response rates and overall survival may rely in the failure to effectively targeting CSC populations. Furthermore survival of these long-lived cells in the presence of toxic compounds might facilitate for additional mutations and increased resistance. In the present study we have characterized PCSC from two patient-derived tumors and shown that, although gemcitabine treatment induced partial antitumor response, it lead to an increase in cells showing CSC-like properties. In contrast, a therapeutic approach based on the single intravenous administration of AduPARE1A oncolytic adenovirus triggered remarkable anticancer effects with no increase in the PCSC pool.

In agreement with previous observations we demonstrate an enrichment in the CD133 population by gemcitabine treatment, but not in the CD24, CD44, ESA positive-cells, suggesting that cancer stem cell chemoresistance, at least with gemcitabine, might differentially affect the PCSC repertoire (Mueller et al., 2009; Venkatesha et al., 2012). Gemcitabine treatment also increased the number of neoplastic sphere-forming cells and the size of the tumorspheres. To validate the tumorigenic potential of tumorspheres we demonstrate that the tumorspheres injected directly into the mouse pancreatic tail result in tumor formation that histologically resemble the morphology of an early passage patient derived xenograft. These results support that tumorsphere derived from CP15 and CP13 tumors retain the features of tumor initiating cells in the pancreatic niche. All together, these

suggest that gemcitabine treatment enriches in neoplastic cells with features of PCSC, in both CP15 and CP13 tumors.

Oncolytic adenoviruses seem like ideal candidates to target cancer initiating cells because they are cytotoxic and are not subject to the typical mechanisms of drug resistance, such as drug efflux pumps and defective apoptotic signaling. Indeed, 15 studies with oncolytic adenoviruses in breast and brain tumors suggest that they may be effective against CSC (Alonso et al., 2012; Bauerschmitz et al., 2008; Jiang et al., 2007). These viruses are often generated on the basis of its tumor selectivity to improve control of viral replication, resulting in diminished toxicity. The use of tissue specific promoters preventing the expression of E1A in non-target tissues is a useful strategy.

Here we show that uPAR promoter controlled adenoviruses are able to kill neoplastic sphere forming cells *in vitro* with a similar or even with higher efficacy than wild type adenoviruses. This is consistent with the observation that these cells endogenously express the uPAR gene, suggesting that the transcription factors acting on the regulatory sequences of the uPAR gene are present in the target cells and can activate the uPAR promoter. Importantly *in vivo*, AduPARE1A treated tumors were much smaller than mock-treated tumors, and had a similar proportion of CD133⁺ cells, and a smaller capacity to generate tumorspheres. This is in contrast to what was observed in gemcitabine treated tumors, where we observed an enrichment in the CD133 population and an increase in tumorsphere number and size. The fact that the *in vivo* effects of AduPARE1A treatment on the CP15 and CP13 PCSC population showed decreased sphere formation but no significant changes in the percentage of CD133⁺ cells may indicate that additional PCSC present in tumorspheres, not detected by CD133 positivity, would be sensitive to AduPARE1A treatment. This highlights the need to investigate for additional PCSC cellular markers as better predictors of AduPARE1A response.

Nevertheless, our data suggest that AduPARE1A might be able to kill PCSC *in vivo*, similarly to what was seen *in vitro* and this can be appealing for pancreatic cancer treatment. Interestingly, a subpopulation of uPAR positive cells has been identified in small cell lung cancer cell lines, derived from lung and from bone marrow and brain metastasis, that possess multi-

drug resistance and clonogenic activity (Gutova et al., 16 2007). uPAR positive cells identified in the small cell lung cancer H466 were capable of forming spheres and efficiently formed transplantable tumors (Qiu et al., 2012). uPAR signaling has also been reported to induce cancer stem cell like properties in breast cancer cells (Jo et al., 2010). Recently, it has been shown that uPAR is important in the maintenance of stem cells and is highly expressed in glioma initiating cells. The regulation of malignant stem-cell renewal was proposed to be through the activation of several components of the hedgehog pathway (Gopinath et al., 2013). Moreover, a recent study provides evidences of mutual regulation mechanisms among uPAR and beta-catenin signaling in cancer stemness in medulloblastoma (Asuthkar et al., 2012). Although there are no specific data on uPAR signaling in pancreatic cancer stem cells, in the present work we show that tumorspheres from both CP15 and CP13 tumors highly express the uPAR gene, supporting a role of uPAR in pancreatic CSC biology as well as the activity of the uPAR promoter in the PCSC population.

Taken together, these results indicate that uPAR promoter is active in pancreatic cancer stem cells and uPAR-controlled oncolytic adenovirus, on top of eliminating pancreatic epithelial cancer cells, as we have previously reported (Huch et al., 2009) are able to kill neoplastic cells with PCSC properties *in vitro*. Moreover the antitumor effects of AduPARE1A and the lack of enrichment in PCSC features of treated tumors support the *in vivo* killing of pancreatic cancer stem cells.

Acknowledgements

We are indebted to the Citomics unit of the IDIBAPS for technical help. This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Economía y Competitividad BIO2011-30299-C02-02 and from CIDEM-Generalitat de Catalunya VALTEC09-2-0047. CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the ISCIII. CF group is partially financed by the Instituto de Salud Carlos III (IIS10/00014) and co-financed by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and receives partial support from the Generalitat de Catalunya SGR091527. AM is recipient of a FPU fellowship from the Spanish Ministry of Education.

References

- Aghi, M., Martuza, R. L., 2005. Oncolytic viral therapies - the clinical experience. *Oncogene*. 24, 7802-16.
- Alemaný, R., Curiel, D. T., 2001. CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors. *Gene Ther*. 8, 1347-53.
- Alonso, M. M., et al., 2012. Targeting brain tumor stem cells with oncolytic adenoviruses. *Methods Mol Biol*. 797, 111-25. Asuthkar, S., et al., 2012. Urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR)-mediated regulation of WNT/beta-catenin signaling is enhanced in irradiated medulloblastoma cells. *J Biol Chem*. 287, 20576-89.
- Balic, A., et al., 2012. Stem cells as the root of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Exp Cell Res*. 318, 691-704.
- Bauerschmitz, G. J., et al., 2008. Tissue-specific promoters active in CD44+CD24-/low breast cancer cells. *Cancer Res*. 68, 5533-9.
- Bednar, F., Simeone, D. M., 2009. Pancreatic cancer stem cells and relevance to cancer treatments. *J Cell Biochem*. 107, 40-5.
- Cascante, A., et al., 2007. GCV modulates the antitumoural efficacy of a replicative adenovirus expressing the Tat8-TK as a late gene in a pancreatic tumour model. *Gene Ther*. 14, 1471-80.
- Eriksson, M., et al., 2007. Oncolytic adenoviruses kill breast cancer initiating CD44+CD24-/low cells. *Mol Ther*. 15, 2088-93.
- Fillat, C., et al., 2010. Controlling adenoviral replication to induce oncolytic efficacy. *The Open Gene Ther. J.*, 3, 15-23.
- Friedman, G. K., et al., 2012. Targeting pediatric cancer stem cells with oncolytic virotherapy. *Pediatr Res*. 71, 500-10.19
- Gopinath, S., et al., 2013. Cathepsin B and uPAR regulate self-renewal of gliomaintiating cells through GLI-regulated Sox2 and Bmi1 expression. *Carcinogenesis*. [Epub ahead of print].
- Gutova, M., et al., 2007. Identification of uPAR-positive chemoresistant cells in small cell lung cancer. *PLoS One*. 2, e243.
- Hermann, P. C., et al., 2007. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 1, 313-23.

-
- Hindriksen, S., Bijlsma, MF., 2012. Cancer stem cells, EMT, and developmental pathway activation in pancreatic tumors. *Cancers*. 4, 985-1035.
- Huch, M., et al., 2009. Urokinase-type plasminogen activator receptor transcriptionally controlled adenoviruses eradicate pancreatic tumors and liver metastasis In mouse models. *Neoplasia*. 11, 518-28.
- Jiang, H., et al., 2007. Examination of the therapeutic potential of Delta-24-RGD in brain tumor stem cells: role of autophagic cell death. *J Natl Cancer Inst*. 99, 1410-4.
- Jiang, H., et al., 2008. Adenovirus's last trick: you say lysis, we say autophagy. *Autophagy*. 4, 118-20.
- Jo, M., et al., 2010. Cell signaling by urokinase-type plasminogen activator receptor induces stem cell-like properties in breast cancer cells. *Cancer Res*. 70, 8948-58.
- Jose, A., et al., 2012. Irreversible electroporation shows efficacy against pancreatic carcinoma without systemic toxicity in mouse models. *Cancer Lett*. 317, 16-23.
- Kern, S. E., et al., 2011. The complexity of pancreatic ductal cancers and multidimensional strategies for therapeutic targeting. *J Pathol*. 223, 295-306.
- Kim, M. P., et al., 2009. Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc*. 4, 1670-80.20
- Li, C., et al., 2007. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*. 67, 1030-7.
- Li, C., et al., 2009. Identification of human pancreatic cancer stem cells. *Methods Mol Biol*. 568, 161-73.
- Lonardo, E., et al., 2011. Nodal/Activin signaling drives self-renewal and tumorigenicity of pancreatic cancer stem cells and provides a target for combined drug therapy. *Cell Stem Cell*. 9, 433-46.
- Mueller, M. T., et al., 2009. Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 137, 1102-13.

- Perez-Torras, S., et al., 2011. Characterization of human pancreatic orthotopic tumor xenografts suitable for drug screening. *Cell Oncol (Dordr)*. 34, 511-21.
- Qiu, X., et al., 2012. Characterization of sphere-forming cells with stem-like properties from the small cell lung cancer cell line H446. *Cancer Lett*. 323, 161-70.
- Rasheed, Z. A., et al., 2010. Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 102, 340-51.
- Short, J. J., Curiel, D. T., 2009. Oncolytic adenoviruses targeted to cancer stem cells. *Mol Cancer Ther*. 8, 2096-102.
- Venkatesha, V. A., et al., 2012. Sensitization of pancreatic cancer stem cells to gemcitabine by Chk1 inhibition. *Neoplasia*. 14, 519-25.

Figure Legends

Figure 1. Analysis of pancreatic cancer stem cell markers in CP15 and CP13 patients derived xenografts treated with gemcitabine. A) Schematic representation of the treatment protocol. B) Analysis of the pancreatic tumor volumes (mm^3) 6 weeks after treatment was initiated (n=7, CP15; n=4, CP13). C) Flow cytometry quantification of CD133 cancer stem cell marker (Left) and the percentage of CD24 CD44 ESA positive cells (Right) in dissociated treated tumors xenografts (n=4). *p<0.05, **p<0.01.

Figure 2. Analysis of tumorspheres from CP15 and CP13 patient derived xenografts treated with gemcitabine. A) Images of tumorspheres from CP15 and CP13 treated tumors formed from isolated cells that grew as anchorage-independent colonies. Quantification (number) and volume (mm^3) of tumorspheres formed from the CP13 and CP15 treated tumors at passages 1 and 5 (Bar graphics) (n=6). B) Images of CP15 and CP13 tumorspheres plated in TIC medium or standard medium. C) Hematoxylin and eosin staining of pancreatic tissue sections from CP15 and CP13 xenografts (Left) or from CP15 (n=3) and CP13 (n=3) isolated tumorspheres injected into the pancreas of immunodeficient mice (Right). Scale bars 100 μm . *p<0.05, **p<0.01.

Figure 3. *In vitro* cytotoxic effects of AduPARE1A oncolytic adenovirus in CP15 and CP13 tumorspheres. A) Schematic representation of AduPARE1A and Adwt adenoviruses. MTT viability assay of CP15 (Left) and CP13 (Right) tumor spheres. A total of $3 \cdot 10^3$ cells/well were plated in triplicate and infected with a dose range of 10^{-3} to 10^5 MOIs of Ad5wt or AduPARE1A. Cell viability was measured 7 days later and is expressed as the percentage of absorbance of treated wells compared with that of mock-infected cultures. Dose-response curves and ID50 values were obtained by a standard non linear model based on the Hill equation. Data show a representative experiment (n=3). B) RT-PCR analysis of uPAR gene expression in CP15 and CP13 tumors and tumorspheres. B-actin was used as control for gene expression. Representative images and qRT-PCR.

Figure 4. *In vivo* antitumor effects of AduPARE1A oncolytic adenovirus in CP15 and CP13 orthotopic tumors. A) Schematic representation of the treatment protocol applied in orthotopic tumors derived from CP15 or CP13 single cells suspension of pancreatic xenograft. AduPARE1A ($5 \cdot 10^{10}$ vp) or saline solution were intravenously administered to mice bearing CP15 or CP13 tumors in the pancreas (n=12, n=7) or (n=8, n=8) respectively. B) Pancreatic tumor volumes (mm^3) in saline and treated tumors 30 days after virus injection are plotted as indicators of antitumor effect. C) qPCR analysis of adenoviral E1A gene expression in RT-PCR samples from CP15 treated tumors. B-Actin was used as reference gene for normalization (n=4). D) Anti-E1A immunofluorescence of CP15 tumors 30 days after i.v. administration of AduPARE1A ($5 \cdot 10^{10}$ vp) or saline solution. Two tumors of each group are shown. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005.

Figure 5. Analysis of pancreatic cancer stem cell features in CP15 and CP13 patient derived xenografts treated with AduPARE1A. A) Flow cytometry quantification of CD133 positive cells in CP15 and CP13 tumors, 30 days after i.v. administration of AduPARE1A ($5 \cdot 10^{10}$ vp) or saline solution (n=6). B) Quantification of the number of tumorspheres grown as anchorage-independent colonies from CP15 and CP13 saline (n=7) and treated tumors (n=7, n=6) respectively 22 days after plating. CP15 tumorsphere representative images (Right). Scale bars 100 μm .

Figure 1.

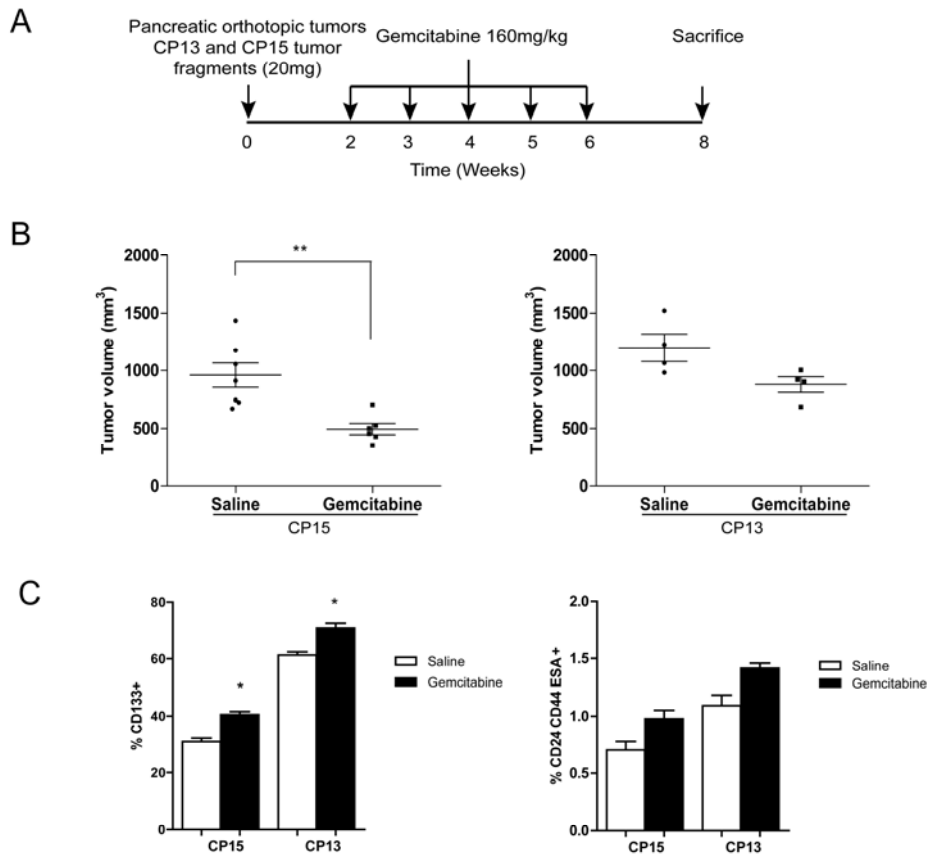


Figure 2.

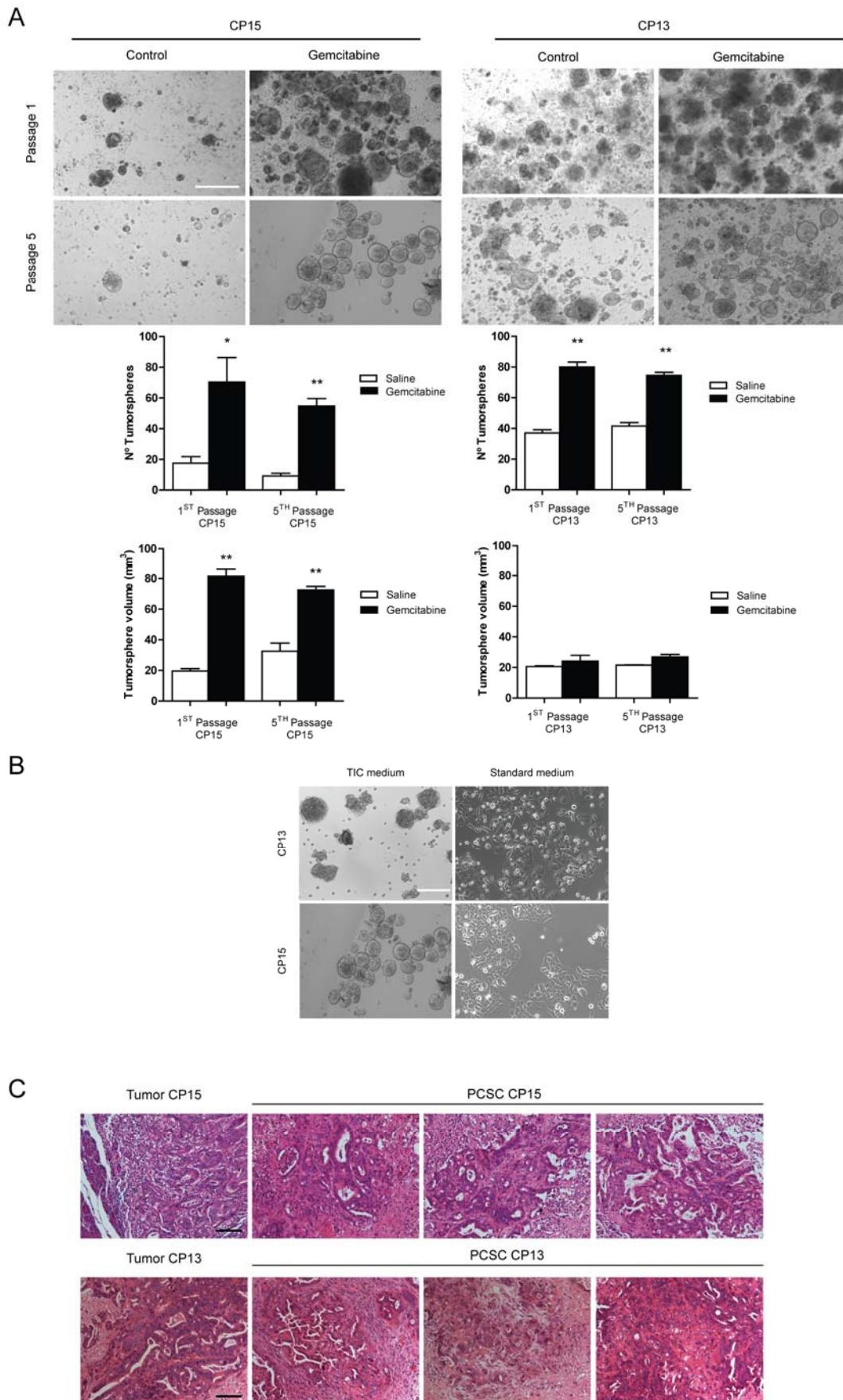


Figure 3.

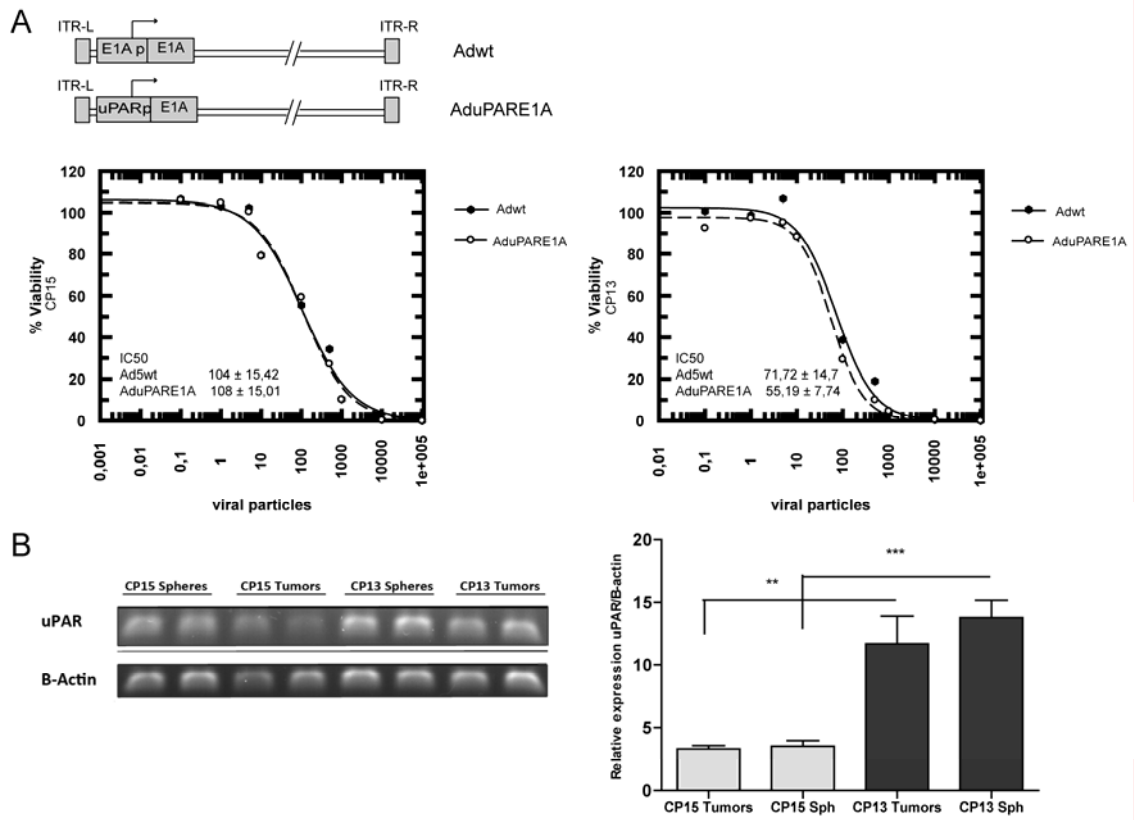


Figure 4.

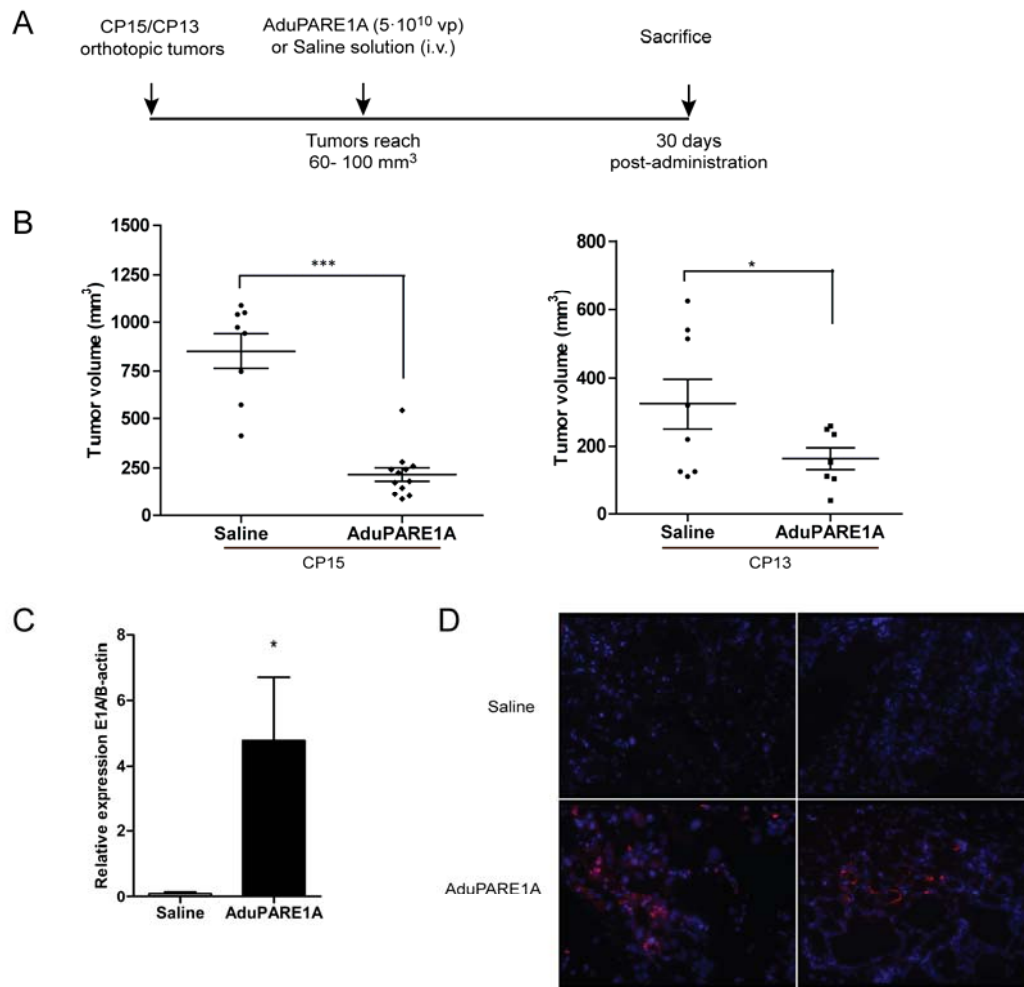


Figure 5.

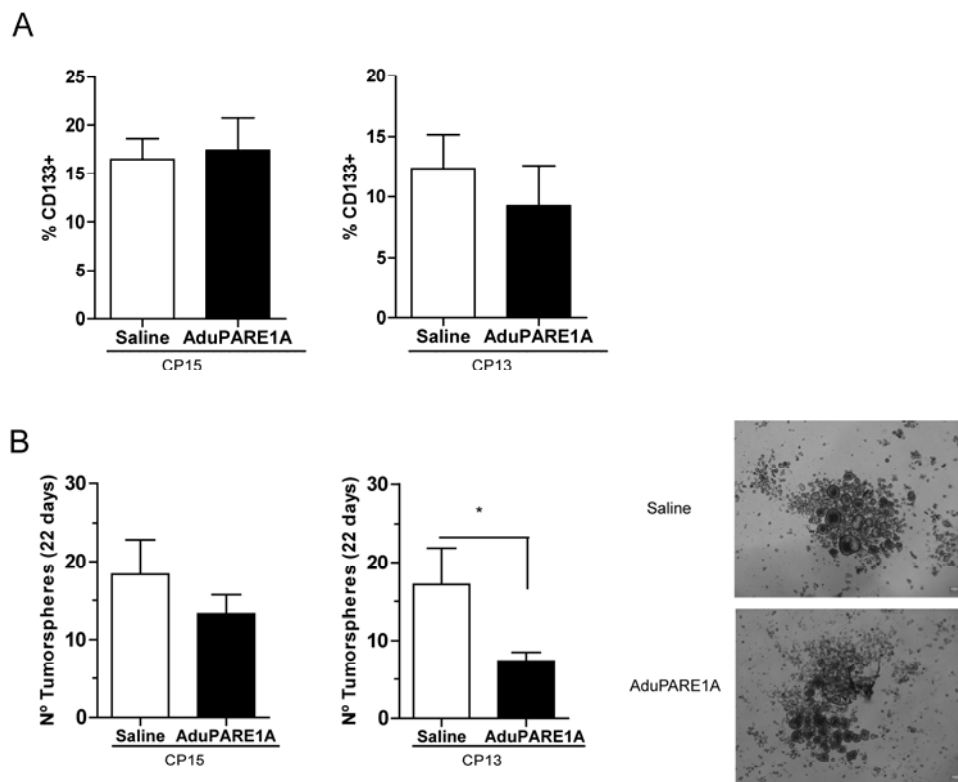


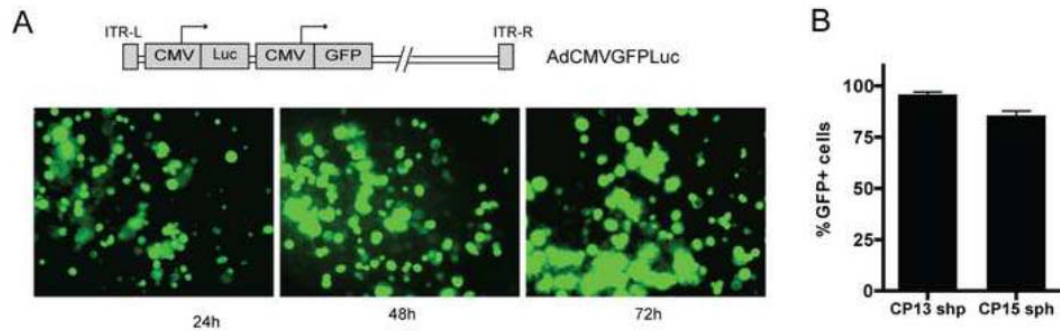
Table 1.

Table 1. Patient tumor data

Model	Tumor Staging	Nodal Invasion	Perineural Invasion	Vascular Invasion	Metastatic Recurrence	Histological Features	<i>k-Ras</i> codon 12	<i>p16</i> loss	<i>p53</i> exons 4 to 9
CP13	T2N1	2/21	1	0	LFU	Well defined glands	yes	yes	Exon5
CP15	T3N1	15/28	1	1	lymph nodes, liver, suprarenal	Irregular glandular pattern	yes	yes	wt

LFU: lost of follow up

Supplementary Figure 1.



Supplementary Figure 1. GFP expression of CP15 and CP13 derived tumorspheres transduced with the reporter adenovirus AdCMVGFPLuc. A) Schematic representation of the reporter adenovirus AdCMVGFPLuc. Images of GFP expression of CP15 tumor spheres transduced with AdCMVGFPLuc (100 MOIs) at different time points. C) Flow cytometry quantification of GFP positive cells in CP15 and CP13 tumor spheres cells at 72h after transduction with AdCMVGFPLuc (100 MOIs).