



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Medicina

Programa de Doctorat: Medicina Interna

Títol de tesi

Implicació funcional i prognosi dels fibroblasts associats a carcinoma en el càncer colorectal

Tesis doctoral presentada per

Mireia Berdiel Acer

Mireia Berdiel Acer

(doctoranda)

David Garcia i Molleví

(director)

Agusti Barnadas i Molins

(director)

Any 2014

David Garcia i Molleví, investigador principal del grup de quimioresistència i microambient tumoral de l'Institut d'investigació biomèdica de Bellvitge (IDIBELL), dins de l'Institut Català d'Oncologia de l'Hospital Duran i Reynals i Agustí Barnadas Molins, professor del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i director del Servei d'Oncologia Mèdica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, certifiquen que la tesi titulada:

Implicació funcional i prognosi dels fibroblasts associats a carcinoma en el càncer colorectal

Ha estat realitzada per Mireia Berdiel Acer sota la seva direcció i és apta per a ser defensada davant d'un tribunal per a optar al grau de doctora.

Mireia Berdiel Acer
(doctoranda)

David Garcia i Molleví
(director)

Agusti Barnadas i Molins
(director)

Barcelona, febrer 2014

AGRAÏMENTS

I arriba el moment dels agraïments...aquella part que tothom recomana que deixis pel final perquè no és important...i és cert, en part, però també és cert que la tesi implica el final d'una etapa en la que intervenen moltes persones, i com a tal, cal fer balanç. Una etapa molt rellevant a nivell científic, però també personal, perquè són moltes les persones que intervenen en ella. Unes, d'una manera més subtil, d'altres deixant més empremta, però totes influenciant en el resultat final.

Per on començar? doncs crec que és més que evident..., per qui em va donar la oportunitat de començar, realitzar i acabar la tesi. Gràcies **David** per confiar en mi com a primera becària i permetre que evolucionés científicament. Per tenir la porta del despatx sempre oberta i disponible per a qualsevol reunió improvisada; ja fos per parlar dels resultats, per plantejar qualsevol dubte, o simplement per discutir la quantitat d'imatges a posar en un pòster. Per donar-me també la oportunitat de marxar uns mesos d'estada a Holanda, gràcies.

No puc més que continuar amb els meus *compis* de grup: **Natalia, Samuel!**. Que deciros???! Pues que me ha encantado compartir estos dos últimos años con vosotros como compañeros (y que conste que no es peloteo!!). Teneros en el mismo grupo ha sido toda una experiencia. Podríamos ser los tres más distintos entre nosotros? Creo que sería difícil...aún así, y a pesar de nuestras pequeñas discrepancias, me ha encantado compartir el grupo con vosotros, tener la oportunidad de ir juntos de congreso y pasar un gran finde en Madrid!. Habéis sido mi grupo estos últimos años, pero antes no estaba sola. Mi grupo era, y lo ha sido siempre, las niñas CCR!!!! Mis inicios no habrían sido lo mismos sin ellas...!!! Gràcies **Maria**...per TOT!!.. Se'm quedarien curtes les paraules per agrair-te tot el que m'has ajudat, des del primer, fins a l'últim dia. Sempre disposada a donar un cop de mà en qualsevol cosa, des d'ajudar a preparar un *buffer*, a fer una comanda, a trobar un reactiu, a preparar un índex....fins a compartir grans i molts moments enfront la màquina de cafè!! Qui millor que tu per riure dels meus "chistes"??? ets el meu millor públic !!. Y tu **Sara**, aún recuerdo los primeros meses, muchas gracias por estar siempre dispuesta a una buena charla y con una buena sonrisa. Gracias por compartir el viaje a Thailandia, fue toda una experiencia de la que guardo muy buen recuerdo y que me alegro mucho de haber compartido contigo y con la "**Padu**". **Cris**, poc t'hem vist últimament pel laboratori i és una llàstima, però no perdem l'esperança de que tard o d'hora tornis a pujar, encara tens la poiata coberta de gradetes!!!. **Monica**, la meva veïna, quina sort compartir el mateix gust musical i poder tenir el "poder" per

posar la nostra estimada emissora... m'encanten els nostres grans moments musicals!! **Curro**, no eres precisament una "niña" CCR, pero aún así, cuantas charlas banales (y menos banales) hemos tenido, que momentos de disertaciones y discusiones varias, cuantos ratos de risas y piques, gracias por tener la lupa tan cerquita de mi poyata. **Clara**, la última nena CCR en mencionar, però no per això la menys important. Moltes gràcies per estar tant aprop inclús estant lluny, per estar sempre disposada a donar una bona abraçada i per compartir xerrades més o menys transcendents a les escales. Per ser part també de la "Chupipandi", un nom que no fa més que referència als bons amics guanyats durant la tesi, uns amics que han fet que tot fos més fàcil.

Mercè, flor, em va encantar compartir els inicis amb tu, però m'ha agradat molt més compartir tot el trajecte i l'evolució. Has estat un gran suport per mi, en tots els aspectes, i amb això jo ho dic tot. **Marta**, ets un solete, no conec persona més altruista i bona que tu, sempre disposada a xerrar i ajudar, sé que arribaràs allà on tu vulguis; i tu **Cris**, ets pura energia i saps transmetre-la, la teva motivació per la ciència és admirable i et portarà molt lluny (de fet, ja ho ha fet, i et trobem molt a faltar). **Nuri**, la meva pseudo... gràcies, no només per compartir tants moments "bojos" i no tant bojos, sinó també per estar tan aprop i ser un gran suport sobretot aquests últims mesos de tesi, i per ser tant fidel als nostres habituals i clàssics "pseudo-breaks. **Natalia**, cuan distintas somos, y cuánto lo agradezco. Gracias por ofrecerme nuevos y diferentes puntos de vista, por ser un gran apoyo en todos los momentos y por hacer que los aparentes grandes problemas se vuelvan pequeños. **Paco, Joan**, anar al LRT2 per fer-vos una visiteta i veure que sempre (o casi sempre) esteu disposats a fer petar la xerrada una estoneta, no te preu. **Ferran**...soooooo...let's dance, the last dance..., quina gran cançó; i és la nostra!!! I **Vane**, ya verás que fiestón nos vamos a pegar, de escándalo!!! ese zulo no hubiese sido lo mismo sin ti, el estrés compartido siempre se lleva mejor.

Gràcies també a unes persones claus i imprescindibles en el laboratori. **Agnès**, mil gràcies per tot el suport immunohistoquímic donat i per ajudar-me tantes vegades en tantes coses. Gràcies **Helena** per la teva proximitat i la teva bruixa alegria, és una sort tenir-te pel laboratori. **Alberto**, muchas gracias por tus consejos y tus opiniones, me encanta tenerte de vecino de poyata (supongo que porque nunca has llegado a invadir mi espacio!). Agrair també a la resta de la gent del lab; **Raúl**, compartir estos últimos meses de zulo también contigo ha sido un placer; **Eli, Gorka, Jack, Mariona, Lara**... gràcies per fer els dinars tan amens i divertits; i a tota la resta de gent del laboratori, els de virus, els d'angio, els que ja han marxat...gràcies per compartir tantes festes, tants sopars, anècdotes... i fer del laboratori un lloc més que agradable per anar a treballar.

Però els meus agraïments no es queden només dins del laboratori... també he d'agrair a les meves **nenes uni** els seus ànims i la seva compressió... Gràcies **Mar**, per estar sempre a punt per ajudar en qualsevol cosa i en qualsevol moment; **Laia**, m'encanta la teva practicitat i m'encanta poder petar la xerradeta amb tu en qualsevol moment... ets la següent eh!!!. **Nuri**, no perdre mai la teva vitalitat i optimisme, ets tot un exemple! I gràcies a totes també per compartir la nostra súper festa ochentera!!!. **Dra Rodón**, estàs ben lluny, però tot i així quan ens trobem es com si no haguessis marxat mai...tenim un skype pendent. I **Mireia**, no eres de la uni, pero como si lo fueras...ya sabes lo que es una PCR, una poiata... gracias por ser mi hermana "postiza".

Tampoc oblidar les meves nenes Can Ruti, **Annete**, **Lauriki**, ja fa anys que vaig marxar d'allà, però continuem a tope. Gràcies pels soparets varis, per les nostres vacances per Ses Illes i per fer que tot sigui molt més fàcil en la vostra companyia.

I en aquesta tesi no podeu faltar vosaltres, **Com-Pis**. Heu estat la meva segona família aquests gairebé tres anys, compartir la convivència amb vosaltres ha estat la cosa més fàcil. Moltes gràcies per tots els sopars, per totes les xerrades al sofà, per tot el suport en tots els moments, pels 30 regals...!. **Ester**, tot el que t'hauria d'agrair seria massa llarg per posar-ho per escrit, però saps que t'has convertit en una persona vital en el meu dia a dia, podríem dir que ets de les persones que més em coneixen i m'agrada la sensació de que no faci falta dir res perquè sàpigues com m'ha anat el dia... ets una amor! I tu **Xavi**, no et quedes pas curt, ets la bondat i tranquil·litat personalitzada, gràcies per la calma que transmetes i per les llargues converses, i gràcies també per aportar una companya de pis extra, la Mireia. Gràcies **Mireia** per la teva alegria constant, pel teu bon humor i pel "carinyu" que transmetes, ets una passada.

I això no queda tot aquí, també he d'agrair als de **Swing**, per ser tant vitals, tant alegres, tant entusiastes (i no només en el ball)... en fi, per ser tant "amazings" i per preocupar-se per l'estat de la meva tesi tot i ser completament aliens a la ciència (amb alguna excepció). Gràcies pels balls, per les birres, per les festes, per les jams... per tot...sou la canya!!! Ens ballem!!!

I ja per últim però no menys important, agrair a la meva família el seu suport, sobretot a tu **mama** per estar sempre. Sempre disposada a treure temps d'on sigui per fer un tomb, per fer una xerradeta, per fer un dinar, per escoltar-me, per donar-me ànims i sobretot pel teu: " Tot sortirà bé, n'estic segura". Gràcies també al **tete** i a la **Eli** per ser tan compressius i tant adaptables al meu

estrès i a la meva poca disponibilitat... I gràcies també a les iaies, a les cosines i als tiets per preocupar-se i donar els ànims necessaris en els moments oportuns.

Sense tots vosaltres, aquesta etapa, sobretot el seu final, hagués estat molt més difícil. **MOLTES GRÀCIES!!**

INDEX

INDEX DE FIGURES.....	17
INDEX DE TAULES.....	20
ABREVIATURES.....	25
INTRODUCCIÓ	29
1.INTRODUCCIÓ AL CÀNCER.....	29
1.1.Generalitats i biologia del càncer.....	29
1.2.Heterogeneïtat tumoral.	31
1.2.1.- Heterogeneïtat intra-tumoral.....	32
2.MICROAMBIENT TUMORAL	33
2.1.Generalitats de l'estroma.....	33
2.2.Funcions de l'estroma: Dualitat	34
2.3.Estroma Tumoral	36
2.3.1.- Generalitats	36
2.3.2.-Components	37
2.3.2.1.-Matriu extracel·lular (MEC),.....	37
2.3.2.2.-Tipus cel·lulars estromals	41
2.3.3.-Desmoplàsia	43
3.FIBROBLASTS ASSOCIATS A CARCINOMA	44
3.1.Generalitats dels fibroblasts	44
3.2.Fibroblasts activats.....	46
3.3.Fibroblasts senescents	47
3.4.Fibroblasts Associats a Carcinoma (CAFs).....	47
3.4.1.-Precursors.....	48
3.4.2.-Genètica i epigenètica dels CAFs	50
3.4.3.-CAFs en el procés tumoral	52
3.4.3.1.-Inici.....	52
3.4.3.2.-Progressió i angiogènesi.....	53
3.4.3.3.-Invasió	54
3.4.3.4.-Metàstasi: Hipòtesi de llavor i sòl (" <i>Seed and soil</i> ").....	55
3.4.4.-Factors responsables de la interacció CAFs- cèl·lula maligna	57

3.4.4.1.-Factors de creixement.....	58
3.4.4.2.-Proteases.....	59
3.4.4.3.- Altres factors	60
3.5.Implicacions terapèutiques.....	61
3.5.1.- Microambient tumoral i resistència a fàrmacs	61
3.5.2.-CAFs com a diana terapèutica	62
3.5.2.1.-Teràpies específiques dirigides contra els CAFs	63
3.5.3.-Perspectives.....	65
4.PERFILS D'EXPRESSION GÈNICA I MICROAMBIENT.....	65
4.1.Revisió i estat actual.....	65
4.2.Descripció dels microarrays.	66
4.2.1.-Metodologia i anàlisi	66
4.2.2.-Limitacions de la tècnica.....	70
4.3.Aplicacions: desenvolupament de classificadors	71
4.4.Perfils d'expressió gènica de l'estroma tumoral	73
4.4.1.-Signatures específiques de CAFs.....	74
5.MODEL D'ESTUDI: Càncer de còlon	75
5.1.Generalitats del càncer de còlon.....	75
5.2.Carcinogènesi i bases moleculars.....	76
5.3.Classificació, histologia i tractament	78
5.4.Factors pronòstics i predictius	80
5.5.Classificadors d'expressió gènica descrits	82
5.6.Perfil genètic de l'estroma en el càncer colorectal	85
HIPÒTESI I OBJECTIUS	89
MATERIALS I MÈTODES.....	97
1.CULTIUS CEL·LULARS	97
1.1.Línies cel·lulars i manteniment	97
1.2.Establiment cultius primaris de fibroblasts.....	99
1.2.1.-Obtenció medis condicionats.	100
1.3.Assajos <i>In vitro</i>	101
1.3.1.-Assaig de proliferació WST-1.	101

1.3.2.-Assaig de migració	102
1.3.2.1.-Sistema <i>Transwell</i>	102
1.3.2.2.- <i>Wound healing</i>	103
1.3.3.-Assaig de formació de colònies (<i>Cloning Assay</i>).	104
1.4. Assajos de viabilitat i cicle cel·lular.	104
1.4.1.- Estudi de mort cel·lular: Determinació de l'activitat de la caspasa-3.....	104
1.4.2.- Estimació de la viabilitat i contingut de l'ADN per iodur de propidi.....	105
1.4.3.- Marcatge nuclear amb DAPI.	106
1.5. Assajos <i>In vivo</i>	106
2. DETECCIÓ EXPRESSIÓ PROTEÏCA.	107
2.1. Western Blot (WB).	107
2.1.1.-Extracció i quantificació proteica.....	107
2.1.2.-SDS-PAGE i transferència a membrana de PVDF	109
2.1.3.- Immunodetecció.....	109
2.2. Immunohistoquímica	110
3. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA.	112
3.1. Extracció ARN de línies cel·lulars	112
3.2. Retrotranscripció	113
3.3. Anàlisi de l'expressió per PCR quantitativa a temps real (<i>qRT-PCR</i>).	114
3.3.1.-Principis i funcionament de la tècnica.....	114
3.3.2.- Valoració i interpretació dels resultats	116
4. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ PER TECNOLOGIA DE MICROARRAYS	117
4.1. Principis de la tècnica	117
4.2. Processament de les dades i selecció dels gens diferencialment expressats.	119
4.3. Anàlisis funcionals i d'ontologia genètica	120
5. DEFINICIÓ DE CLASSIFICADORS ESTROMALS	123
5.1. Definició de la signatura de comparativa triple. Gens de progressió en fibroblasts.	123
5.1.1.-Desenvolupament del classificador predictor de recurrència	124
5.2. Desenvolupament del classificador estromal a partir dels gens diferencials entre NCF i CAF-PT.	125
5.2.1.-Validació del classificador de 5 gens.....	127
5.2.1.1.-Validació <i>In silico</i>	127

5.2.1.2.- Validació per la tècnica de qRT-PCR	128
5.2.2.-Extracció d'ARN	128
5.2.3.-Retrotranscripció	129
5.2.4.-Anàlisi de l'expressió per qRT-PCR	129
5.2.5.-Selecció dels gens endògens i validació.....	129
5.3. Obtenció de la unitat tipificada (z-score) i classificació de pacients.....	132
6. ANÀLISIS ESTADÍSTICS I DE SUPERVIVÈNCIA	133
7.VALORACIÓ DE L'ESPECIFICITAT ESTROMAL DEL CLASSIFICADOR	135
7.1. Anàlisi de l'especificitat de l'expressió dels gens del classificador	135
7.1.1.-Especificitat cel·lular	135
7.1.2.-Implicació de la transició epiteli-mesènquima (TEM) en l'expressió dels gens del classificador.	136
7.1.3.-Estimació de la proporció de fibroblasts presents en la mostra. Signatura de col·làgens.	136
7.1.3.1.- Valor pronòstic de la signatura de col·làgens.	137
RESULTATS	141
OBJECTIU 1	141
1.1.Aïllament i establiment de cultius primaris de fibroblasts	141
1.2. Valoració dels efectes dels productes secretats al medi condicionat.....	142
1.2.1.- Efectes dels fibroblasts i dels seus medis condicionats en la proliferació de cèl·lules tumorals <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i>	142
1.2.2.- Els productes secretats pels CAFs protegeixen de la mort cel·lular per apoptosi. .	145
1.2.3.-El medi condicionat dels fibroblasts associats a la metàstasi hepàtica produeix aturada del cicle cel·lular en fase G2/M.	145
1.2.4.-El medi condicionat dels fibroblasts associats a metàstasi hepàtica incrementa la migració cel·lular en cèl·lules de càncer colorectal.	148
1.2.5.-El medi condicionat dels fibroblasts de metàstasi hepàtica indueix trets de transició epiteli-mesènquima (TEM) en les cèl·lules DLD-1.....	150
1.2.6.- Els medis condicionats de CAFs estimulen la formació de colònies.	151
1.2.7.- Inducció d'una activació sostinguda d'ERK en presència de medi condicionat de fibroblasts de metàstasi hepàtica.	153
1.3.Modificació del perfil genètic de les DLD-1 cultivades en presència dels diferents medis condicionats.....	154

1.3.1.- Els productes secretats pels fibroblasts associats a la metàstasi hepàtica modifiquen el perfil d'expressió de la línia cel·lular DLD-1.	154
1.3.2.- Sobreexpressió de la via de Wnt en cèl·lules tumorals cultivades amb medi condicionat de fibroblasts associats a metàstasi hepàtica.	156
1.3.3.- Avaluació dels productes de secreció expressats diferencialment entre els CAF-PT i els CAF-LM	157
1.4. Definició d'una signatura de gens d'expressió gradual en la seqüència de fibroblasts normals, associats a tumor primari i associats a metàstasi hepàtica. Associació amb pronòstic.	158
1.4.1.- Selecció de gens diferencials en els fibroblasts i definició d'una signatura de progressió tumoral.	158
1.4.2.- Refinament de la signatura. Desenvolupament d'un classificador.....	160
1.4.3.- Validació del classificador.....	162
1.4.4.- Associació de l'expressió gènica amb risc de progressió.....	165
1.4.5.- Cerca dels gens del classificador més associats amb pronòstic en pacients d'estadis II/III.....	166
OBJECTIU 2	173
2.1. Aïllament i caracterització de cultius primaris de fibroblasts , i valoració dels efectes en cèl·lules tumorals.	173
2.1.1.- Caracterització de parelles NCF/CAF-PT	173
2.1.2.- El medi condicionat dels CAF-PT incrementa l'agressivitat de les cèl·lules de càncer colorectal <i>in vitro</i> en termes de migració i capacitat clonogènica.....	175
2.1.3.- Augment del creixement tumoral <i>in vivo</i> en presència de CAF-PT però no amb NCF.	176
2.2. Anàlisi i determinació de gens diferencialment expressats entre ambdues subpoblacions de fibroblasts.	178
2.2.1.- Anàlisi per GSEA i associació de tots els gens desregulats amb fenotip i vies de senyalització prèviament descrites.....	178
2.2.1.1.- Vies KEGG representades.....	179
2.2.2.- Ontologia genètica dels gens desregulats entre poblacions fibroblàstiques.....	181
2.3. Selecció de gens diferencialment expressats entre NCF i CAF-PT.	183
2.3.1.- Els resultats d'expressió obtinguts en el microarray són corroborats per alguns dels gens mitjançant la tècnica de qRT-PCR i de <i>western blot</i>	185

2.3.2.-L'expressió dels gens diferencialment expressats entre NCF i CAF-PT són majoritàriament expressats pels fibroblasts i no per altres cèl·lules constituents de l'estroma ni per les pròpies cèl·lules tumorals.	186
2.4.Implicació funcional del grau d'expressió dels gens. A major expressió, major agressivitat dels CAF-PT.	187
2.4.1.-La signatura de 108 gens té un valor pronòstic aplicada en dades de bases públiques de mostres de pacients amb càncer colorectal en estadis II i III.....	189
OBJECTIU 3	190
3.1.Definició del classificador genètic: obtenció de gens amb valor pronòstic.....	190
3.1.1.-L'expressió dels 5 gens del classificador és principalment expressada per fibroblasts i no sembla estar expressada per altres tipus cel·lulars ni influenciada per processos de transició epiteli-mesènquima (TEM).....	191
3.2.El classificador de 5 gens identifica pacients de mal pronòstic en dades <i>in silico</i>.....	196
3.2.1.- Validació del classificador en una meta-cohort.....	197
3.3.Validació del classificador per qRT-PCR en una cohort de mostres de pacients	199
3.4. Limitacions del classificador. Desconeixement de la proporció d'estroma en les mostres.	204
3.4.1.-La signatura de col·làgens no presenta capacitat per a predir recurrència en les mostres de l'anàlisi per qRT-PCR.	206
3.4.2.-Millora del poder pronòstic del classificador. Eliminació de mostres amb poca quantitat d'estroma.....	209
3.5. Heterogeneïtat dels fibroblasts associats a carcinoma en el tumor primari.....	212
3.6. Relacions proteiques dels gens del classificador	213
DISCUSSIÓ	217
CONCLUSIONS.....	237
ANNEXES	239
REFERÈNCIES	263

INDEX DE FIGURES

Figura I.1. Contribucions de les cèl·lules estromals als “ <i>hallmarks of cancer</i> ”	30
Figura I.2. Estructura del microambient estromal.....	33
Figura I.3. Contribució de l'estroma a la progressió tumoral.)	35
Figura I.4. Funcions de la MEC.....	39
Figura I.5. Paper de la MEC anormal en la progressió tumoral.	40
Figura I.6. Components cel·lulars de l'estroma tumoral.	42
Figura I.7. Activació de fibroblasts.....	46
Figura I.8. Origen dels fibroblasts activats en l'estroma tumoral.....	48
Figura I.9. Representació esquemàtica dels efectes pro-tumorals produït pels CAFs.	53
Figura I.10 Evolució tumoral.....	56
Figura I.11. Interaccions fibroblasts estromals-epiteli.	58
Figura I.12. Factors de creixement més importants en la neoplàsia.	59
Figura I.13. Aplicacions clíniques dels perfils d'expressió gènica en oncologia mèdica	66
Figura I.14 Esquema general de la metodologia emprada en l'anàlisi de microarrays d'ARN	67
Figura I.15. Exemple de la representació gràfica per dendograma/ <i>heat map</i> d'un anàlisi de microarrays.	69
Figura I.16. Classificació del grau i estadis tumorals en funció del sistema TNM.....	78
Figura I. 17. Imatge microscòpiques d'adenocarcinomes en tinció d'hematoxilina-eosina.....	79
Figura M.1. Esquema d'una cambra Neubauer.	98
Figura M.2. Esquema del protocol de l'assaig de migració <i>Transwell</i>	103
Figura M.3. Imatge de la “ferida” produïda en un assaig de <i>Wound Healing</i>	104
Figura M.4. Esquema del protocol de l'assaig <i>in vivo</i>	106
Figura M.5. Imatge d'un gel d'agarosa al 1%.....	113
Figura M.6. Funcionament del <i>SYBR Green I</i> en la reacció de PCR.....	114
Figura M.7. Exemple de corbes d'amplificació i corbes de <i>Tm</i> generades a partir de l'anàlisi per <i>LightCycler® 480, SYBR Green I Master</i>	115
Figura M.8. Esquema dels cicles bàsics de qRT-PCR en un programa estàndard.	116
Figura M.9. Exemple de corba estàndard.....	117
Figura M.10. Esquema del funcionament de les sondes en els microarrays.....	118
Figura M.11. Esquema bàsic del funcionament del <i>GeneChip®Human Gene 1.0 ST Array</i>	119
Figura M.12. Elements bàsics en el mètode de <i>GSEA</i>	122
Figura M.13. Gràfic representatiu de la validació dels gens endògens.	132
Figura M.14. Exemple de la representació gràfica de la supervivència lliure de malaltia segons el model de <i>Kaplan-Meier</i>	134
FiguraR1.1. Imatge microscòpica dels cultius primaris establerts.....	142
FiguraR1.2. Representació gràfica de la proliferació mesurada per assaig amb <i>WST-1</i>	143
FiguraR1.3. Representació gràfica de la proliferació de 4 línies tumorals en presència de diferents medis condicionats durant 5, 8 i 12 dies mesurada amb assaig <i>MTT</i>	143

FiguraR1.4. Representació gràfica de la proliferació mesurada per assaig MTT en cèl·lules no mutades per <i>KRAS</i> .	144
FiguraR1.5. Pes tumoral (gr) dels tumors originats <i>in vivo</i> .	145
FiguraR1.6. Activitat caspasa-3 en les DLD-1 en presència dels medis condicionats.	146
FiguraR1.7. Marcatge amb DAPI de les cèl·lules DLD-1 sembrades en diferents medis condicionats.	147
FiguraR1.8. Expressió de proteïnes implicades en aturada del cicle cel·lular.	148
FiguraR1.9. Representació gràfica de la migració de les DLD-1 en assaig <i>wound healing</i> .	149
FiguraR1.10. Diagrama de caixes representant el nombre de cèl·lules DLD-1 migrades en assaig <i>Transwell</i> .	149
FiguraR1.11. Expressió gènica normalitzada de gens implicats en TEM.	150
FiguraR1.12. Immunohistoquímica de E-cadherina i N-cadherina.	151
FiguraR1.13. Expressió relativa dels gens associats a TEM en DLD-1.	151
FiguraR1.14. Assaig de formació de colònies.	152
FiguraR1.15. Assaig de formació de colònies resembrades.	153
FiguraR1.16. Activació de pERK en diferents medis.	153
FiguraR1.17. Morfologia de les DLD-1 en presència de MC CAF-LM i amb inhibidor de MEK (U0126).	154
FiguraR1.18. Expressió proteica de cMyc en presència dels diferents medis.	156
FiguraR1.19. Localització de la β -catenina en presència de MC CAF-LM.	157
FiguraR1.20. Heatmap dels gens diferencials entre CAF-PT i CAF-LM codificants per a productes de secreció.	158
FiguraR1.21. Esquema del procés de selecció de gens comuns d'expressió gradual.	159
FiguraR1.22. Agrupació jeràrquica no supervisada dels valors d'expressió tipificats dels 277 gens que caracteritzen la " <i>Fibroblast Progression Gene Signature</i> ".	160
FiguraR1.23. Esquema d'optimització de la signatura obtinguda per PAM.	161
FiguraR1.24. Agrupació jeràrquica no supervisada dels 25 gens del classificador.	161
FiguraR1.25. Validació proteica d'alguns gens de progressió en fibroblasts de cada tipus.	162
FiguraR1.26. Probabilitats estimades de classificació.	164
FiguraR1.27. Expressió de la signatura de 25 gens en les 34 mostres de fibroblasts de MB.	165
FiguraR1.28. Corbes <i>Kaplan-Meier</i> del GSE14333 i GSE33113 per la signatura classificadora de 25 gens.	166
FiguraR1.29. Agrupament jeràrquic no supervisat dels 19 gens en el GSE39396.	167
FiguraR1.30. Validació en el GSE14333 (conjunt de dades d'entrenament).	168
FiguraR1.31(A,B,C). Validació en el GSE17538.	169
FiguraR1.31(D,E,F). Validació en el GSE17538.	171
FiguraR1.32. Validació de la signatura de 19 gens en el GSE33113 (estadis II)	172
Figura R2.1. Expressió de marcadors de fibroblasts.	174
Figura R2.2. Assaig de <i>Wound Healing</i> en DLD-1 amb medis condicionats de mostres aparellades NCF i CAF-PT.	175
Figura R2.3. Assaig de formació de colònies.	176

Figura R2.4A/B. Pes tumoral (gr) dels tumors originats <i>in vivo</i> /Tinció H-E i marcatge Ki76 de seccions histològiques dels tumors.....	177
Figura R2.5. Representació gràfica dels resultats obtinguts de l'anàlisi de GSEA. p.....	179
Figura R2.6. Representació gràfica en <i>heatmap</i> de l'expressió dels 108 gens significativament desregulats entre NCF i CAF-PT.....	184
Figura R2.7. Expressió gènica normalitzada de 16 gens desregulats	185
Figura R2.8. Nivells d'expressió proteïca en mostres aparellades.	186
Figura R2.9. Representació gràfica de la puntuació de la signatura de 108 gens en parelles NCF-CAF-PT.	187
Figura R2.10. Assajos funcionals segons expressió signatura de 108 gens.	188
Figura R2.11. Corbes <i>Kaplan-Meier</i> per a la cohort combinada de GSE14333 i GSE17537	189
FiguraR3.1. Corba ROC del poder predictiu del classificador obtingut en el conjunt de dades d'origen (GSE14333).....	190
FiguraR3. 2. Corbes Kaplan-Meier per al GSE14333.....	191
FiguraR3.3. Diagrama de caixes representant l'expressió normalitzada dels 5 gens del classificador..	192
FiguraR3.4. Representació gràfica en <i>Heatmap</i> de l'expressió dels 5 gens del classificador en els diferents tipus cel·lulars constituents d'un tumor colorectal	193
FiguraR3.5. Representació gràfica en <i>heatmap</i> per comprovar efectes en TEM.	194
FiguraR3.6. Expressió de gens implicats en TEM en DLD-1 amb HGF.	195
FiguraR3.7. Expressió de gens implicats en TEM en DLD-1 amb medi condicionat de CAF-PT.	195
FiguraR3.8. Corbes <i>Kaplan-Meier</i> de les mostres de qRT-PCR.	201
FiguraR3.9. Corbes de supervivència en funció de la variable tractament.	203
FiguraR3.10. Diagrama de punts de les 142 mostres emprades per qRT-PCR en funció del seu estat de recurrència i valor de la signatura.	205
FiguraR3.11. Expressió de gens mesenquimals en els diferents subtipus cel·lulars.	205
FiguraR3.12. Corba ROC i corbes Kaplan-Meier de la signatura de col·làgens aplicada a les 142 mostres de la cohort de qRT-PCR.....	206
FiguraR3.13(A,B) Expressió dels col·làgens i dels gens de la signatura en la barreja de fibroblasts i cèl·lules tumorals.	207
FiguraR3.13(C) Expressió dels col·làgens i dels gens de la signatura en la barreja de fibroblasts i cèl·lules tumorals.	207
FiguraR3.14. Immunohistoquímica per PDLIM3 i α -SMA.	209
FiguraR3.15. Distribució de les mostres segons l'estat de recurrència i el valor d'expressió dels col·làgens.....	209
FiguraR3.16. Corbes <i>Kaplan-Meier</i> en mostres amb expressió de col·làgens >p20.	210
FiguraR3.17. Agrupament jeràrquic no supervisat dels 873 gens variables entre fibroblasts..	213
FiguraR3.18. Interaccions físiques entre les proteïnes codificades pels gens del classificador.....	215

INDEX DE TAULES

Taula I.1. Marcadors de fibroblasts	45
Taula I.2. Classificació del grau i estadis tumorals en funció del sistema TNM.....	78
Taula I.3. Marcadors pronòstics i predictius en el càncer colorectal.....	81
Taula I.4. Aplicacions clíniques de la tecnologia de micrarrays en el cancer colorectal.....	83
Taula M.1. Composició tampó de lisi cel·lular	108
Taula M.2. Volum dels reactius necessaris per a l'elaboració del gel de poliacrilamida	109
Taula M.3 Llistat d'anticossos emprats per WB.	110
Taula M 4. Llistat d'anticossos emprats per IHQ.	111
Taula M.5. Característiques clíniques i demogràfiques del conjunt de dades GSE14333.	126
Taula R1.1. Percentatge de cèl·lules en les diferents fases del cicle cel·lular.....	146
Taula R1.2. Vies <i>KEGG</i> representades en els gens desregulats en les DLD-1 en presència de medi condicionat de fibroblasts associats a metàstasi hepàtica.	155
Taula R1.3. Signatura de 25 gens i predicció en el conjunt de dades d'origen MB.	163
Taula R1.4. Predicció de classificació de la signatura de 25 gens en els conjunt de dades independents LP, GSE22598 i GSE31279.....	165
Taula R1.5. Anàlisi multivariant de la signatura de 19 gens aplicada al GSE17538.	170
Taula R2.1. <i>KEGG</i> . Les més representades en els gens sobreexpressats o infraexpressats.	181
Taula R2.2. Ontologia genètica dels gens desregulats.....	182
Taula R3.1. Valors de les AUC obtinguts en els diferents GSE.....	196
Taula R3.2. Anàlisi de regressió de Cox univariant en GSE17538 i GSE33113.....	197
Taula R3.3. Característiques clíniques i demogràfiques de la meta-cohort de 317 pacients.	198
Taula R3.4. Tases de supervivència de la meta-cohort en estudi	198
Taula R3.5. Probabilitats <i>a posteriori</i>	199
Taula R3 6. Característiques clíniques i demogràfiques dels pacients analitzat per qRT-PCR.	200
Taula R3.7. Supervivència lliure de malaltia (SLM) i específica de malaltia (SEM) dels pacients d'alt i baix risc de la cohort analitzada per qRT-PCR.	201
Taula R3 8. Anàlisi univariant i multivariant en les mostres de qRT-PCR.	202
Taula R3.9. Probabilitats <i>post-test</i> per al classificador de 5 gens en la cohort de pacients analitzats per qRT-PCR.	204
Taula R3.10. Supervivència lliure de malaltia (SLM) i específica de malaltia (SEM) dels pacients d'alt i baix risc de la cohort de pacients amb expressió de col·làgens > p20	211
Taula R3.11. Anàlisi univariant i multivariant.....	211
Taula R3.12. Probabilitats <i>post-test</i> en la cohort de pacients amb col·lagen >p20.....	212

ABREVIATURES

ADNc	Àcid desoxiribonucleic complementari
ARN	Àcid ribonucleic
ARNm	ARN missatger
α-SMA	Alfa actina del múscul llis
AUC	<i>Area under the curve</i> (Àrea sota la corba)
BCA	Àcid bicinconínic
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albúmina de sèrum boví)
CAF-LM	<i>Carcinoma-associated fibroblasts-liver metastasis</i> (Fibroblasts associats a carcinoma de la metàstasi hepàtica)
CAF-PT	<i>Carcinoma-associated fibroblasts-primary tumor</i> (Fibroblasts associats a carcinoma del tumor primari)
CCR	Càncer colorectal
CIMP	<i>CpG Island methylator phenotype</i> (Fenotip metilador de les illes CpG)
CIN	<i>Chromosome instability</i> (Inestabilitat cromosòmica)
Cp	<i>Crossing point</i> (punt de creuament)
CSR	<i>Core serum response</i> (nucli de resposta a sèrum)
DMSO	Dimetil sulfòxid
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
EGF/ EFGR	<i>Epidermal growth factor/receptor</i> (Factor de creixement epidèrmic)
EMDR	<i>Environment mediated drug resistance</i> (Quimioresistència deguda a microambient)
FAP	<i>Fibroblast activation protein</i> (Proteïna d'activació dels fibroblasts)
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (Sèrum boví fetal)
FDR	<i>False discovery rate</i> (Tasa de descobriment fals)
FSP-1	<i>Fibroblast specific protein-1</i> (Proteïna específica de fibroblasts-1)
HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i> (Solució salina tamponada)
HR	<i>Hazard Ratio</i> (Quocient de riscos instantanis)
IC	Interval de confiança
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LCM	<i>Laser capture microdissection</i> (Microdissecció per captura làser)
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i> (Pèrdua d'heterozigositat)
LR	<i>Likelihood Ratio</i> (Quocient de probabilitats)

Abreviatures

MC	Medi condicionat
MEC	Matriu extracel·lular
MMP	Metaloproteinases
MMR	Malaltia mínima residual
MSI	<i>Microsatellite instability</i> (Inestabilitat de microsatèl·lits)
MSS	<i>Microsatellite stability</i> (Estabilitat de microsatèl·lits)
NCF	<i>Normal colonic fibroblasts</i> (Fibroblasts de la mucosa normal)
PAM	Predicció d'anàlisi de microarrays
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> (tampó salí)
PVDF	Poliofluorur de vinilidè
qRT-PCR	<i>Quantitative real time polymerase chain reaction</i> (Reacció en cadena de la polimerasa a temps real)
r.p.m	Revolucions per minut
RMA	<i>Robust Multi-array analysis</i>
SAM	<i>Significance analysis of microarrays</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SEM	Supervivència específica de malaltia
SLM	Supervivència lliure de malaltia
TAM	<i>Tumor associated macrophages</i> (Macròfags associats a tumor)
TBS	<i>Tris buffer saline</i> (Tampó salí Tris)
TEM	Transició epiteli-mesènquima
WB	Western blot

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ AL CÀNCER

1.1. Generalitats i biologia del càncer

Tradicionalment el procés tumorigènic ha estat descrit com un procés gradual en el que les cèl·lules normals van acumulant alteracions genètiques que els hi confereixen avantatges selectives de creixement i que contribueixen a la seva transformació cap a un fenotip de cèl·lula maligne. No obstant, aquesta visió tant focalitzada en la cèl·lula tumoral ha anat evolucionant d'un temps ençà cap a una visió més àmplia, i actualment un tumor ja no és considerat exclusivament com una massa de cèl·lules tumorals, sinó que és vist com un teixit complex compost per multitud de cèl·lules no malignes que constitueixen el microambient tumoral i que influeixen en les capacitats adquirides per la cèl·lula neoplàsica (Hanahan and Coussens 2012). Aquestes propietats van ser descrites per Hanahan i Weinberg com a "*Hallmarks of cancer*" (Hanahan and Weinberg 2000; Hanahan and Weinberg 2011) i comprenen:

1. Senyals de proliferació sostinguda
2. Insensibilització a senyals anti-proliferatives
3. Resistència a mort cel·lular
4. Potencial replicatiu il·limitat
5. Angiogènesi
6. Invasió i metàstasi
7. Modificació o reprogramació del metabolisme energètic
8. Evasió de la destrucció pel sistema immunitari

L'ordre i els mecanismes pels quals es poden adquirir aquestes capacitats funcionals pot variar entre els diferents tipus de tumors, però són dues les característiques principals que permeten la seva adquisició:

1. **Inestabilitat genòmica i mutacions:** Mutacions aleatòries, reordenaments cromosòmics i canvis epigenètics poden provocar alteracions en el genoma de les cèl·lules canceroses conferint avantatge selectiu a un clon de cèl·lules i permetent el seu sobrecreixement i dominància en el teixit local.

1.2. Heterogeneïtat tumoral.

Les alteracions en oncògens i gens supressors tumorals són crucials en el desenvolupament d'un tumor, tot i que també és cert que són molts altres els mecanismes que es poden veure alterats, així com molts els tipus cel·lulars i òrgans dels quals es pot originar un tumor. Aquest fet, juntament amb el dinamisme del procés de carcinogènesi, fa que les cèl·lules malignes vagin evolucionant i que al seu torn vagin alterant el microambient que l'envolta, convertint el càncer en una malaltia altament complexa i heterogènia, tant a nivell d'un mateix individu (**heterogeneïtat intra-tumoral**) com entre individus diferents amb càncers originats del mateix tipus d'òrgan (**heterogeneïtat inter-tumoral**) (De Sousa, Vermeulen et al. 2013).

L'existència de variabilitat sovint s'ha vist relacionada amb la ineficiència dels tractaments o l'aparició de resistència i suposa un repte per predir l'evolució i el pronòstic de la malaltia.

Dues són les teories que intenten associar aquesta variabilitat amb la resistència a teràpies:

- **Concepte d'evolució clàssica:** A mida que el tumor va progressant, les anormalitats genètiques es van acumulant. La gran quantitat de divisions que es donen en un procés neoplàsic fa que siguin moltes les mutacions que poden emergir i evolucionar donant lloc a diferents subpoblacions cel·lulars (clons). La selecció d'alguns clons respecte d'altres fa que el desenvolupament tumoral pugui ser considerat com un procés d'evolució Darwiniana (Diaz-Cano 2012), generant-se una àmplia varietat de subpoblacions cel·lulars en un mateix pacient.
- **Propietats inherents en les cèl·lules tumorals:** Grups de cèl·lules presenten habilitats diferents per promoure un tumor que són inherents en elles i que depenen de la jerarquia que es produeix en un teixit tumoral (cèl·lules més o menys properes a les cèl·lules mare).

A part d'aquests dos factors, que no són mútuament excloents, l'heterogeneïtat tumoral també es veu influenciada per la cèl·lula d'origen i implica també les cèl·lules no neoplàsiques que formen part del microambient tumoral.

Breument, les causes de la heterogeneïtat tumoral podrien ser descrites:

- Genètiques: L'adquisició gradual de mutacions és la causa més freqüent de la variabilitat inter i intra-tumoral. Procés dinàmic que fa que hi hagi una pressió selectiva i l'evolució de certs clons sobre d'altres.
- Epigenètiques: Processos de metilació de l'ADN i deacetilació d'histones que es donen al llarg del procés de tumorigènesi i que s'hereten durant la divisió cel·lular sense alterar la seqüència de l'ADN (Baylin and Jones 2011).

- Cèl·lules mare: La organització jeràrquica genera un gradient de diferenciació entre les cèl·lules mare i la seva progènie que promou l'adquisició de nous canvis genètics i epigenètics i incrementa la heterogeneïtat (Sottoriva, Verhoeff et al. 2010).
- Microambient tumoral: El microambient comprèn una àmplia varietat de cèl·lules no neoplàsiques que cooperen amb les cèl·lules tumorals i intervenen en els diferents passos del desenvolupament tumoral. Tant la seva presència com la seva distribució (front invasiu vs no invasiu) en el microambient ja genera una gran variabilitat. Els factors extrínsecs produïts per les cèl·lules estromals també incrementa la heterogeneïtat influenciant la pressió clonal (ex: inflamació crònica)(Meira, Bugni et al. 2008).

1.2.1.- Heterogeneïtat intra-tumoral

En els tumors sòlids les cèl·lules tumorals no es troben aïllades de la resta de l'organisme, sinó que es troben envoltades per un conjunt de cèl·lules no tumorals embolcallades dins d'una xarxa complexa de proteïnes (matriu extracel·lular) constituint el que es coneix com a microambient tumoral. És per això que els tumors són considerats com a òrgans complexos. De fet, molts aspectes del desenvolupament tumoral simulen als que es donen en l'organogènesi o en els processos de remodelació tissular (Bissell and Radisky 2001).

La diversitat de subpoblacions cel·lulars en un mateix tumor és una característica molt freqüent en els càncers humans (inherent des dels estadis primerencs i conseqüència de la progressió tumoral), i és de gran importància tant en el diagnòstic com en el tractament de la malaltia. Pot trobar-se en gairebé tots els trets fenotípics cel·lulars com la morfologia, l'expressió gènica (de marcadors de superfície cel·lular, de factors de creixement i receptors hormonals), metabolisme, motilitat i potencials angiogènics, immunogènics i metastàtics. Tot i que gran part de la heterogeneïtat és deguda a la inestabilitat genètica que dona lloc a un fenotip concret, també és cert que hi ha una part de variabilitat no heretable i que és conseqüència de la plasticitat cel·lular i de la diferenciació de les cèl·lules mare (Marusyk and Polyak 2010).

La heterogeneïtat intra-tumoral comprèn tan les cèl·lules tumorals com els components del microambient que l'envolta. La multitud de tipus cel·lulars estromals creen un seguit de microambients tumorals que van canviant a mida que el tumor va evolucionant, des de que envaeix el teixit normal fins que colonitza òrgans distants. L'abundància, organització histològica i les característiques fenotípiques dels tipus cel·lulars estromals, així com la matriu extracel·lular, evolucionen durant la progressió tumoral i permeten el creixement primari, invasiu i metastàtic.

Aquesta evolució i remodelació dels components del microambient tumoral afegeix un grau de complexitat més a la heterogeneïtat tumoral fent que no només es trobi en la cèl·lula maligna sinó també en la resta de components que l'envolten i que constitueixen l'estroma tumoral. La quantitat relativa d'estroma i la seva composició també varien considerablement entre tumors.

2. MICROAMBIENT TUMORAL

2.1. Generalitats de l'estroma

Es coneix com a estroma o microambient estromal, el conjunt de cèl·lules no tumorals i els seus productes de secreció que constitueixen una xarxa de teixit connectiu que envolta i dona suport al parènquima (o component epitelial d'un òrgan determinat), modelant i mantenint la seva estructura tissular. L'estroma està constituït per diferents tipus cel·lulars com fibroblasts, cèl·lules endotelials i inflamatòries, que es troben integrats dins la matriu extracel·lular (MEC). Les interaccions directes o indirectes que s'estableixen entre els diferents components cel·lulars que defineixen un òrgan són les encarregades de proporcionar la informació necessària per a mantenir la diferenciació cel·lular i crear estructures tissulars complexes. Les cèl·lules epitelials reben gran varietat de senyals de l'ambient que les envolta i que les orienta per a definir les superfícies basal i apical i mantenir un estat diferenciat (Figura 12) (Bissell and Radisky 2001).



Figura 1 2.Estructura del microambient estromal. Composició de l'estroma amb les cèl·lules epitelials delimitant la membrana basal i els diferents constituents de la xarxa de teixit connectiu. Figura adaptada de Saadi A and Fitzgerald R. *Drug Discov Today*. 2006

2.2. Funcions de l'estroma: Dualitat

En condicions fisiològiques normals, la homeòstasi tissular és aconseguida gràcies a un balanç entre proliferació i mort cel·lular que es manté gràcies a la comunicació establerta entre els diferents tipus cel·lulars i que ajuda a mantenir l'arquitectura tissular, suprimint o revertint els fenotips malignes i fent que l'estroma funcioni com una barrera enfront un incipient procés tumorigènic. En els processos de desenvolupament tissular existeix un intercanvi d'informació entre les cèl·lules i el seu microambient que succeeix a través d'una complexa xarxa de senyals generada per les unions directes entre cèl·lula-cèl·lula i entre cèl·lula-matriu extracel·lular, així com entre la col·laboració amb d'altres cèl·lules estromals i específiques de teixit. Aquest intercanvi dinàmic i mutu entre les cèl·lules i el seu entorn permet la organització cel·lular en teixits i dirigeix la organogènesi durant el desenvolupament. Les cèl·lules responen tant als factors solubles com insolubles i al seu torn canvien el microambient d'una manera recíproca resultant en un sistema organitzat i diferenciat, a més, les molècules de la matriu extracel·lular juntament amb els enzims que s'encarreguen de remodelar-la defineixen i organitzen l'estructura tissular. Si el microambient no fos dominant, cada cèl·lula es comportaria de manera aleatòria i el resultat seria una massa de cèl·lules sense ordre ni destí. De fet, són vàries les evidències que corroboren la dominància del microambient sobre el comportament de les cèl·lules epitelials al suprimir la seva tumorigenicitat o fins i tot revertint el seu fenotip neoplàsic (Bissell and Radisky 2001).

Enfront una lesió inicial tumoral, la cèl·lula maligna ha de competir amb el microambient que l'envolta per tal de poder superar les pressions anti-tumorigèniques que en limiten la seva progressió. En molts casos, aquestes mutacions transformants en el compartiment epitelial no són suficients per a sobrepassar els controls del creixement normal i les cèl·lules malignes són suprimides pels mecanismes de control del microambient. Així doncs, és possible pensar que moltes de les mutacions carcinogèniques poden passar desapercibudes sense manifestar-se com a cap procés maligne (Bissell and Radisky 2001) i quedant latents en l'òrgan de l'hoste com a "càncers ocults", degut en part a les senyals anti-proliferatives proporcionades pel microambient (Bissell and Hines 2011). El funcionament global de l'organisme depèn doncs d'unes proporcions adequades i un posicionament relatiu dels diferents tipus cel·lulars que constitueixen el teixit. Una pertorbació en aquesta homeòstasi (especialment de la membrana basal) ja sigui per dany mecànic o degradació enzimàtica pot induir una resposta inflamatòria que pot ser revertida per una resposta fisiològica normal re-establint la homeòstasi i la integritat de la membrana basal. En l'inici del desenvolupament tumoral aquestes constriccions fisiològiques normals són invalidades

Un clar exemple de control de la homeòstasi tissular per part del microambient el trobem en el teixit mamari. Aquest tipus de teixit està constantment sotmès a processos de remodelació tissular que depenen de l'estat hormonal, el qual varia mensualment per fluctuacions en els nivells de les hormones sexuals o per canvis dramàtics durant la gestació, la lactància o la involució glandular (Ronnov-Jessen and Bissell 2009). Un estudi realitzat pel grup de Maffini *et al* demostrà que el teixit mamari de les rates que havien patit dos parts era capaç de restringir el desenvolupament tumoral comparat amb el teixit de rates verges (Maffini, Calabro et al. 2005). Ara bé, aquest efecte protector no és mostrava constant ja que existia un risc transitori incrementat just després de la lactància, quan es dona el procés d'involució glandular que implica una remodelació tissular similar a la donada en els processos d'inflamació o de curació de ferides i que es caracteritza per elevats nivells de MMPs (McDaniel, Rumer et al. 2006; Schedin 2006).

Un altre exemple d'aquesta co-evolució entre el compartiment epitelial i estromal es troba en un model murí de càncer de pròstata genèticament modificat i desenvolupat pel grup de Hill R, *et al*. En aquest model es demostra com la reducció o la pèrdua de p53 en el compartiment epitelial facilita la proliferació d'un petit grup de fibroblasts que responen a la senyal epitelial, i subseqüentment s'expandeixen per a constituir un component mesenquimal tumoral major. Al seu torn, aquests fibroblasts també exerceixen una pressió selectiva en el compartiment epitelial que accelera el procés neoplàsic (Hill, Song et al. 2005).

2.3. Estroma Tumoral

2.3.1.- Generalitats

El paper del microambient en la progressió tumoral ha anat guanyant importància en els últims anys descrivint-se les seves implicacions en diagnòstic, pronòstic i tractament del càncer.

D'igual manera que succeeix en l'evolució d'un ecosistema, les característiques del microambient exerceixen una pressió selectiva per a l'evolució tumoral i la invasió, fent que només aquelles cèl·lules malignes més proliferatives i resistents a l'apoptosi puguin continuar evolucionant. El mateix pretext s'aplica en la progressió metastàtica, on només les cèl·lules capaces de sobreviure en circulació i adaptar-se al nou ambient donen lloc a nous focus tumorals (Joyce and Pollard 2009) (Nguyen, Bos et al. 2009).

La progressió d'un procés tumoral és producte de les interaccions entre els diferents tipus cel·lulars i el microambient, unes interaccions recíproques i dinàmiques que juguen un paper molt important en l'evolució i determinació del fenotip del tumor. A part de la pressió que s'exerceix sobre la cèl·lula maligna, aquesta al seu torn modifica l'ambient i genera un ecosistema alterat i permissiu per a la progressió tumoral. Aquest ambient permissiu és aconseguit gràcies a les cèl·lules canceroses en secretar factors de creixement moduladors de l'estroma com: bFGF ("*basic Fibroblastic Growth Factor*"); VEGF ("*Vascular Endothelial Growth Factor*"); PDGF ("*Platelet-derived growth factor*"); EGF ("*Epidermal Growth Factor*"); interleuquines i TGF β ("*Transforming Growth Factor β* ") (Bhowmick and Moses 2005) (Elenbaas and Weinberg 2001). Aquests i altres factors alteren la homeòstasi normal tissular d'una manera similar al que succeeix en els processos de curació de ferides o d'inflamació, i actuen d'una manera paracrina per a induir reaccions estromals com l'angiogènesi o resposta inflamatòria. Esbrinar la natura d'aquestes interaccions i els mecanismes de la co-evolució entre les cèl·lules tumorals i el seu microambient és crucial per a entendre què dirigeix l'inici i la progressió d'un tumor, així com per desenvolupar noves estratègies terapèutiques.

2.3.2.-Components

L'estroma tumoral es troba dividit en dos participants. Per una banda el component no cel·lular o matriu extracel·lular i per l'altre, les cèl·lules estromals.

2.3.2.1.-Matriu extracel·lular (MEC).

La matriu extracel·lular és el component majoritari del microambient tumoral. Té una funció de suport i de manteniment de la homeòstasi tissular i el seu dinamisme i versatilitat influencien en aspectes fonamentals del comportament cel·lular, ja que de manera directa o indirecta regula gairebé tots els processos cel·lulars i és indispensable en el desenvolupament del teixit.

Segons la composició i funció estructural podem trobar dues categories de MEC (Lu, Weaver et al. 2012):

Membrana basal → produïda conjuntament per les cèl·lules epitelials, endotelials i estromals, separa l'endoteli/epiteli de l'estroma. Conté col·lagen tipus IV, laminines, fibronectines i proteïnes d'unió com nidogen i entactina. És compacta i poc porosa i juga un paper molt important en la polaritat cel·lular.

Matriu intersticial → produïda principalment per cèl·lules estromals. Rica en col·lagen fibril·lar tipus I, proteoglicans i glicoproteïnes com tenascina C i fibronectina. A l'estar altament carregada i hidratada pot unir-se a citocines i factors de creixement. Proporciona força i estructura als teixits i contribueix a les forces tensorials dels teixits.

La diversitat bioquímica i estructural dels components de la MEC li confereixen unes propietats essencials per al comportament cel·lular (figura 14) (Lu, Weaver et al. 2012):

Propietats Físiques: Rigidesa, porositat, insolubilitat i disposició. Funcionament com a barrera mecànica, d'ancoratge i facilitant la migració cel·lular.

Propietats Bioquímiques: Unió dels seus components a gran varietat de factors de creixement i participació en transducció de cascades de senyalització. Determina el grau de difusió, accessibilitat i direcció dels lligands cap als receptors. Precursor de fragments actius biològicament.

Propietats Biomecàniques: L'elasticitat variable ajuda a determinar com la cèl·lula percep les forces externes. Els complexos d'adhesió focal, constituïts per integrines i multitud de proteïnes adaptadores i de senyalització, poden ser considerats com uns sensors mecànics que uneixen el citoesquelet d'actina amb la MEC. Les cèl·lules mantenen la seva funció i morfologia a través d'un sistema de tensió integrada (constituït pels microtúbuls, juntament amb els filaments d'actina i miosina (Ingber 2008)) conegut com a tensegritat. Totes les cèl·lules de l'organisme estan sotmeses a aquest mecanisme de tensegritat i és el que fa que s'adaptin i responguin al microambient en el que resideixen. Per processos de mecano-transducció les cèl·lules són capaces de transformar els canvis mecànics que perceben del seu microambient en canvis genètics o químics (Noguera, Nieto et al. 2012). Quan una tensió mecànica és generada per moviment, es transmesa per pressió a la matriu extracel·lular que al seu torn transfereix el moviment a l'interior cel·lular a través de les integrines. Finalment, el citoesquelet tradueix aquestes forces en senyals químiques i estímuls mecànics que es transmeten a l'interior del nucli i repercuteixen en el fenotip cel·lular. Aquestes propietats no són independents entre elles, sinó que la modificació succeïda en una pot alterar el comportament cel·lular produint nous canvis en una altra. Multitud de mecanismes reguladors de producció, degradació o remodelació de la MEC existeixen per assegurar la seva integritat. Ara bé, quan el control dels enzims que s'encarreguen d'aquestes tasques es desregula per envelliment o per condicions patològiques, la MEC esdevé anormal en

quantitat, composició i topografia, i l'alteració de les diferents propietats pot tenir repercussions en el comportament de les cèl·lules epitelials i estromals, així com en la homeòstasi.



Figura 1 4. Funcions de la MEC. En funció del context, les diferents propietats de la matriu extracel·lular poden tenir efectes molt diversos en el comportament cel·lular. Figura adaptada de Lu and Werb. *JCB.2011*(Lu, Weaver et al. 2012)

A nivell molecular, la composició de la matriu extracel·lular està composta principalment:

Els col·làgens són una família de proteïnes estructurals constituïda per diferents tipus de fibres amb diferents funcions estructurals i de suport. Són les proteïnes més abundants de la matriu extracel·lular i són secretades principalment pels fibroblasts. En un procés tumoral, el seu metabolisme es troba desregulat havent-hi un increment en la seva síntesi, remodelació i organització. El creuament de les fibres de col·lagen es troba associat a l'expressió d'un enzim, l'amina-oxidasa o **LOX** i a la rigidesa de la MEC. Les fibres de col·lagen passen d'una conformació rissada i paral·lela, a una de recta i perpendicular al marge del tumor. Aquest canvi és el que fa que la MEC esdevingui més rígida i repercuteixi en les forces tensorials del teixit (Levental, Yu et al. 2009). L'increment en la tensió cel·lular fa que es perdi la morfologia tissular i la polaritat de les cèl·lules epitelials i promou la invasió cel·lular al permetre a les cèl·lules tumorals migrar al llarg de les fibres de col·lagen o activant la senyalització per integrines.

Les integrines comprenen una àmplia família de proteïnes transmembrana que són les més importants implicades en l'ancoratge de les cèl·lules amb la matriu extracel·lular (Noguera, Nieto et al. 2012). El seu domini intracel·lular (en contacte amb el citoesquelet) i el seu domini extracel·lular (capaç d'unir-se a col·lagen, laminines o altres integrines), fa que actuïn com a mecano-receptors i siguin els responsables de mitjançar la majoria dels efectes sobre les cèl·lules cancerígenes (Egeblad, Nakasone et al. 2010). Transmeten senyals des de la MEC mitjançant l'assemblatge de complexos d'adhesió focal que inicien una senyalització bioquímica que estimula

la remodelació del citoesquelet i regula el comportament cel·lular (Miranti and Brugge 2002). Aquest reagrupament de les integrines pot activar la via de la PI3K-Akt, implicada en progressió tumoral *in vivo* (Webster, Hutchinson et al. 1998) i promoure la malignitat tumoral potenciant la senyalització a través de factors de creixement (Miranti and Brugge 2002). També està reportat que la unió de fibronectina i col·lagen tipus IV als receptors d'integrines $\alpha_5\beta_1/\alpha_1\beta_1$ -integrina i $\alpha_2\beta_1$ -integrina, respectivament, pot tenir efectes pro-angiogènics (Jain 2003).

El recanvi de la MEC també és dependent de les MMPs (metaloproteinases), uns enzims de la família de les endopeptidases dependents de zinc que tenen un paper molt important en processos fisiològics com remodelació tissular i desenvolupament. Multitud de MMPs es troben sobrerregulades en l'estroma tumoral i poden induir la desmoplàsia i malignitat. En càncer, s'encarreguen de degradar i modelar la matriu extracel·lular alterant el microambient. Modulen la biodisponibilitat de factors de creixement com VEGF regulant l'angiogènesi i generant un desequilibri entre senyals pro i anti-proliferatives. Proteolíticament activen citocines com el TGF- β repercutint en proliferació i metàstasi. L'escissió de lligands o receptors que transmeten senyals pro-apoptòtiques també fan que interfereixin en la inducció de l'apoptosi de les cèl·lules malignes, i poden també reclutar cèl·lules inflamatòries en el microambient tumoral (Lu, Weaver et al. 2012) (figura 15).

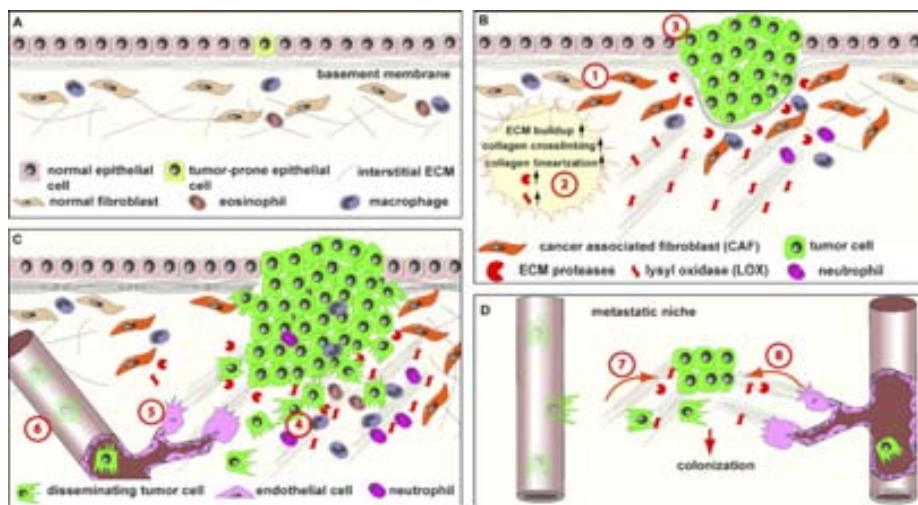


Figura 15. Paper de la MEC anormal en la progressió tumoral. A) Manteniment de la homeòstasi. **B)** Les condicions patològiques poden fer que es donin esdeveniments tumorogènics com l'activació dels tipus cel·lulars estromals(1),desregulació d'enzims degradadors de la MEC(2) i alteració cèl·lules circumdants (3). **C)** En estadis avançats, reclutament de cèl·lules immunes (4), angiogènesi (5) i invasió i metàstasi (6). **D)** MEC anormal promou la extravasació, supervivència i proliferació de les cèl·lules canceroses (7) neovascularització i expansió cap a micro i macrometastasis(8). Figura extreta de Lu and Werb. *JCB*.2011(Lu, Weaver et al. 2012).

El balanç entre les MMPs i els seus inhibidors juguen un paper molt important en la progressió tumoral, induint o suprimint l'apoptosi (Marastoni, Ligresti et al. 2008). Un balanç que afecta diferents processos fisiològics i patològics, des de la implantació embriònica fins a l'angiogènesi i carcinogènesi (Huang, Hsu et al. 2009).

Estudis de la MEC han revelat que els components del microambient tumoral són fonamentals, no només per la regulació del procés tumoral (Tlsty and Hein 2001; Tlsty and Coussens 2006), sinó que també són essencials inclús abans que el tumor aparegui. Les cèl·lules estromals són capaces de produir la transformació de les cèl·lules adjacents a través de l'alteració de la homeòstasi tissular, incloent el control de l'arquitectura, adhesió, mort cel·lular i proliferació (Pupa, Menard et al. 2002). La majoria de processos tumorals mostren un increment en la seva consistència degut a una major rigidesa de la MEC. Els canvis de la matriu activen les integrines que promouen la proliferació mitjançant la via de Ras i Erk, i a més afecten la contractilitat per la via de Rho. Alteracions micromecàniques de la MEC juntament amb la remodelació de l'estroma per part de la cèl·lula tumoral, estan lligats al fenomen de displàsia, infiltració i metastasi (Kumar and Weaver 2009). El creixement tumoral s'associa primer amb una deposició incrementada de components de la MEC i la seva densificació, i posteriorment amb una secreció massiva de MMP i digestió de la matriu peritumoral.

Els canvis que es donen en la MEC també poden afectar indirectament a les cèl·lules malignes influenciant en el comportament de les diferents cèl·lules estromals que constitueixen el microambient.

2.3.2.2.-Tipus cel·lulars estromals

Si bé és cert que cada tipus estromal en el microambient tumoral conté diferents subpoblacions cel·lulars, per tal de simplificar, i donat que no tots ells són el tema principal d'aquesta tesi, els subgrups cel·lulars seran agrupats en 3 poblacions generals: cèl·lules vasculars angiogèniques, cèl·lules immunitàries i fibroblasts associats a carcinoma (descrits més àmpliament en un apartat posterior) (figura 16).

Cèl·lules vasculars angiogèniques

El procés de formació de nous vasos sanguinis a partir dels ja existents es coneix amb el nom d'angiogènesi. És un procés essencial per al creixement i evolució dels tumors per tal d'assegurar-se nutrients i oxigen conforme la seva mida va incrementant i el flux sanguini va escassejant. Tot i

que els programes cel·lulars i moleculars són comuns als que es donen en condicions fisiològiques, els vasos que s'originen són més irregulars i inestables.

Dos tipus cel·lulars principals són els que intervenen en aquest procés: les cèl·lules endotelials i els perícits, no obstant, en el microambient tumoral, les senyals que poden emetre poden tenir implicacions en altres processos tumorals.

Les cèl·lules endotelials formen la capa interna dels vasos sanguinis i constitueixen una barrera de permeabilitat selectiva entre la paret del vas i el flux sanguini. Els perícits representen un tipus cel·lular mesenquimal especialitzat (relacionat amb les cèl·lules del múscul llis) que envolta l'endoteli dels vasos sanguinis. En condicions normals, els perícits proveeixen senyals paracrines per a mantenir l'endoteli normal quiescent. A més, col·laboren amb les cèl·lules endotelials per a sintetitzar la membrana basal vascular que ancora tant els perícits com les cèl·lules endotelials, i ajuda a la paret dels vasos sanguinis a suportar la pressió hidrostàtica del flux sanguini. Pertorbacions genètiques i farmacològiques en el reclutament i associació dels perícits ha demostrat la importància funcional d'aquestes cèl·lules donant suport a l'endoteli tumoral (Pietras and Ostman 2010). Una hipòtesi és que els tumors que tenen la vasculatura poc recoberta de perícits són més propensos a permetre la intravasació de les cèl·lules canceroses en el torrent circulatori permetent la subseqüent disseminació hematògena.

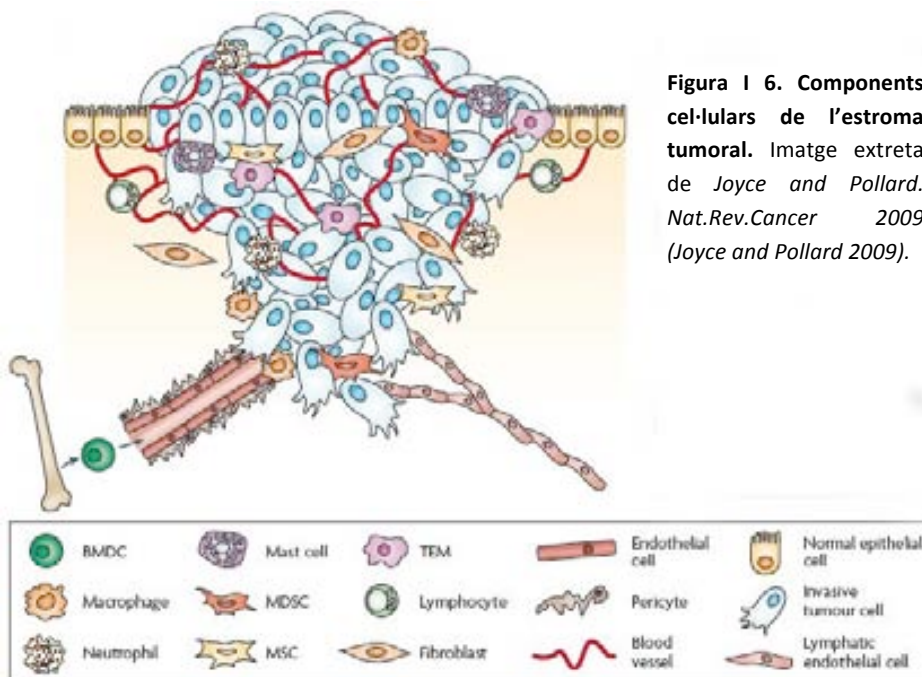


Figura 1 6. Components cel·lulars de l'estroma tumoral. Imatge extreta de *Joyce and Pollard. Nat.Rev.Cancer 2009 (Joyce and Pollard 2009).*

Cèl·lules inflamatòries

Les cèl·lules inflamatòries participen d'una manera dual tant promovent com reprimint el tumor en la majoria de lesions neoplàsiques. La idea de que les cèl·lules inflamatòries podien tenir un paper promotor tumoral començà als anys 90 amb l'evidència de que la infiltració de lesions neoplàsiques amb cèl·lules del sistema immunitari servia per a promoure la progressió tumoral. Virchow fou el primer en observar una estreta associació entre les característiques morfològiques d'un procés inflamatori i el càncer (elevats nivells de cèl·lules immunes i inflamatòries infiltrants), suggerint que un procés d'inflamació crònica podia desenvolupar en càncer (Balkwill and Mantovani 2001).

Moltes d'aquestes cèl·lules inflamatòries que s'infiltra en l'estroma tumorsals inclouen els macròfags associats a tumor o TAM (de l'anglès "*tumor associated macrophages*"), neutròfils i cèl·lules T reguladores. Els TAMs són el tipus cel·lular del sistema immune que es troba en major quantitat infiltrant el microambient tumoral (Solinas, Germano et al. 2009). Són reclutats a la zona tumoral per quimiocines com les CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 i CCL8 tot i que altres factors com VEGF, CSF-1 ("*Colony stimulin factor 1*"), SDF-1 ("*Stromal derived factor 1*") i trombospondina 1 també poden reclutar TAMs (Martin-Manso, Galli et al. 2008). Un cop en el microambient tumoral, els TAM secreten factors de creixement i citocines al microambient que indirectament contribueixen a l'alteració del microambient estromal i promouen la desmoplàsia (Apte, Haber et al. 1999). Hi ha una gran varietat de molècules de senyalització alliberades per les cèl·lules inflamatòries i que serveixen com a efectors de les accions promotores tumorsals (EGF, VEGF, FGF2, citocines i quimiocines i enzims degradadors de la matriu pro-invasius o pro-angiogènics). Les cèl·lules inflamatòries infiltrades en el tumor ajuden a sostenir l'angiogènesi, estimular la proliferació cel·lular, facilitar la invasió tissular gràcies a la seva presència en els marges del tumor i donar suport a la disseminació metastàtica (Balkwill and Mantovani 2001).

2.3.3.-Desmoplàsia

La desmoplàsia o reacció desmoplàsica és un tret característic de tumors sòlids com el de mama, pròstata, pulmó i còlon i es caracteritza per una sobreproducció de components de la matriu extracel·lular i una proliferació massiva dels fibroblasts activats (Mueller and Fusenig 2004). El teixit connectiu fibrós i dens resultant està constituït per elements cel·lulars (fibroblasts activats amb proliferació accelerada i cèl·lules immunitàries infiltrants) i per components no cel·lulars (col·làgen I, III i IV, fibronectina, laminina, osteonectina) creant un microambient únic que promou el creixement tumoral i la metastasi (Conti, Kendall et al. 2008), i al seu torn també suposa una

barrera a l'accés dels agents quimioteràpics (Merika, Syrigos et al. 2012). Els canvis en la proliferació de les cèl·lules estromals i la deposició de components de la matriu extracel·lular resulten en un canvi dramàtic en la homeòstasi tissular i en la elasticitat, així com en la pressió del fluid intersticial.

El paper de la reacció desmoplàsica en la progressió del càncer ha estat un tema controvertit ja que no està del tot clar si és un mecanisme que estimula el creixement tumoral (Conti, Kendall et al. 2008) i afavoreix la resistència al tractament amb quimioteràpics (Merika, Syrigos et al. 2012) o pel contrari representa una defensa de l'hoste per a restringir el creixement i la proliferació de les cèl·lules cancerígenes (Lunevicius, Nakanishi et al. 2001) (Elenbaas and Weinberg 2001).

3. FIBROBLASTS ASSOCIATS A CARCINOMA

3.1. Generalitats dels fibroblasts

Els fibroblasts són les cèl·lules més abundants dins del compartiment estromal i les principals responsables de la síntesi dels components de la matriu extracel·lular. Es caracteritzen per la seva morfologia fusiforme, la capacitat d'adherir-se al plàstic i per l'absència de marcadors característics d'altres llinatges cel·lulars. Sovint han estat descrits com les cèl·lules no-epiteliales, no-inflamatòries i no-vasculars del teixit connectiu. Constitutivament expressen vimentina i proteïna específica de fibroblasts 1 o FSP1 ("*Fibroblast-specific protein 1*"), encara que els fibroblasts són una població cel·lular molt heterogènia que expressa diferents marcadors, sent poc d'ells exclusius i específics únicament de fibroblasts (taula1). De fet, l'absència d'un marcador molecular fiable i específic és un dels factors limitant per al seu estudi *in vivo*. (Kalluri and Zeisberg 2006), una heterogeneïtat que també es fa evident a nivell genètic.

Un estudi genòmic realitzat al 2002 pel grup de Chang. HY, revelà que els perfils d'expressió gènica de fibroblasts de diferents regions corporals d'un mateix individu podien ser tant divergents com els observats entre els diferents llinatges de cèl·lules sanguínies; fent que fibroblasts de diferents regions poguessin ser considerats com a diferents tipus cel·lulars (diversitat topogràfica). L'estudi es va fer emprant cultius primaris de fibroblasts de 10 localitzacions anatòmiques i de 16 donants diferents per tal de tenir una àmplia varietat de mostres i condicions. Tots els fibroblasts, independentment del seu origen i condició de cultiu presentaven la mateixa morfologia i expressaven de manera homogènia el marcador mesenquimal vimentina. L'anàlisi dels seus perfils d'expressió va demostrar que els diferents fibroblasts s'agrupaven (similitud d'expressió) en funció de la seva localització anatòmica més que no pas per individu d'origen. Els gens diferencialment

expressats més significatius van determinar el que van anomenar com a transcriptoma topogràfic i feien referència a patrons d'expressió de gens de la matriu extracel·lular, de factors de creixement, diferenciació, migració... tots ells rellevants per la homeòstasi i estructuració de l'epiteli però diferents perfils d'expressió en funció de la localització dels fibroblasts. Tot i que la majoria de gens presentaven una regulació topogràfica, van veure que hi havia un grup de gens que s'expressava de manera coordinada en tots els fibroblasts (independentment de l'origen) i que es donava en resposta a l'exposició de sèrum (gens implicats en síntesi d'àcids grassos) (IYER, EISEN ET AL. 1999). Tot i tradicionalment ser considerats com a un únic tipus cel·lular, amb aquest estudi es demostrava la complexitat genètica dels fibroblasts en funció de la seva localització anatòmica (Chang, Chi et al. 2002).

Marcador	Expressió en fibroblasts	Altres localitzacions
Vimentina	Miscel·lània	Endotelials, mioepiteliais i neurones
α-actina del múscul llis o α-SMA ("<i>α-smooth muscle actin</i>")	Miofibroblasts	Cèl·lules vasculares del múscul llis, pericits i mioepiteliais
Desmina	Fibroblasts de la pell	Cèl·lules musculars i vasculares del múscul llis
Proteïna específica de fibroblasts 1 o FSP-1 ("<i>Fibroblast specific protein 1</i>")	Miscel·lània	Cèl·lules de carcinoma invasiu
Discoidin-domain receptor2	Fibroblasts cardíacs	Cèl·lules endotelials
Proteïna d'activació dels fibroblasts o FAP ("<i>Fibroblast-activation protein</i>")	Fibroblasts activats	Melanòcits activats
Integrina $\alpha 1\beta 1$	Miscel·lània	Monòcits i cèl·lules endotelials
Prolyl-4-hydroxylasa	Miscel·lània	Cèl·lules endotelials, epiteliais i cancerígenes
Pro-col·làgen 1α2	Miscel·lània	Osteoblasts i condroblasts

Taula 1. 1. Marcadors de fibroblasts. Taula adaptada de Kalluri R, Zeisberg M. (Kalluri and Zeisberg 2006)

3.2. Fibroblasts activats

Els fibroblasts quiescents inactius es caracteritzen pel seu baix índex de proliferació i mínima activitat metabòlica, no obstant, enfront d'una lesió tissular o d'un procés fibròtic comencen a proliferar i a secretar grans quantitats de components de la matriu extracel·lular i de factors de creixement, a més d'adquirir propietats contràctils. Quan això succeeix, aquests fibroblasts són denominats "fibroblasts activats o miofibroblasts". L'activació es pot donar tant pels factors de creixement secretats per les cèl·lules epitelials, macròfags i monòcits enfront del dany tissular, o per les interaccions directes o a través de molècules d'adhesió entre els fibroblasts i els leucòcits. Les espècies reactives d'oxigen o una composició alterada de la MEC (a través de les interaccions amb les integrines) també poden originar activació.

TGF- β i PDGF són les molècules clau responsables de l'activació dels fibroblasts. Mentre que el TGF- β secretat per les cèl·lules epitelials directament transforma els fibroblasts en fibroblasts activats, el PDGF és un potent agent mitogènic que estimula la proliferació dels fibroblasts activats i que indirectament indueix la transdiferenciació produint l'alliberació de TGF- β per part dels macròfags reclutats (De Wever and Mareel 2003). Els fibroblasts activats, també denominats miofibroblasts per compartir propietats de cèl·lules musculars i fibroblasts, es caracteritzen per la expressió d'una actina filamentosa, l'actina α del múscul llis (α -SMA), que els permet d'exercir forces contràctils (figura 17). Aquesta contractilitat mitjançada per les adhesions focals entre els miofibroblasts i la MEC, els permet regular la pressió i el volum del fluid intersticial mitjançant l'infraestructura del citoesquelet (Kalluri and Zeisberg 2006).

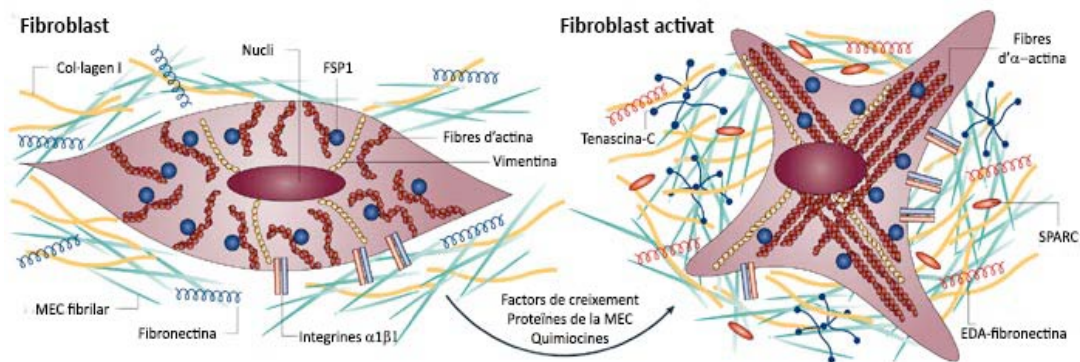


Figura 17. Activació de fibroblasts. Figura extreta de Kalluri R, Zeisberg M. *Nat Rev Cancer*. 2006 (Kalluri and Zeisberg 2006)

En condicions normals, quan el teixit malmès és reparat, els fibroblasts activats pateixen un tipus particular de mort cel·lular programada anomenada nemosis (procés d'activació cel·lular i mort específica dels fibroblasts i similar a la necrosi) i reverteixen cap al fenotip normal. En condicions patològiques com un procés tumorigènic o una inflamació crònica, aquesta activació no reverteix i els fibroblasts romanen en estat activat de manera permanent.

3.3. Fibroblasts senescents

Els fibroblasts humans senescents (subgrup en la població cel·lular que sobreviu però que és incapaç de proliferar), tenen incrementada la producció de factors de creixement, de proteïnes de la MEC i de proteïnases i poden alterar el microambient tissular i conseqüentment les cèl·lules epitelials properes. Són capaços d'estimular la proliferació de les cèl·lules epitelials pre-malignes i malignes (però no les normals) en cultiu i formar tumors en ratolins (Krtolica, Parrinello et al. 2001). Existeix una relació entre edat avançada i el risc de càncer.

3.4. Fibroblasts Associats a Carcinoma (CAFs)

Els fibroblasts associats a carcinoma o CAFs (de l'anglès "*Carcinoma-Associated Fibroblasts*") presenten un fenotip similar al dels fibroblasts activats en processos d'inflamació o de curació de ferides, amb la diferència de que la seva activació en els tumors és constant i no reverteix. És per aquest motiu pel qual els tumors han estat referits clàssicament com a "ferides que no curen mai" (Dvorak 1986). De la mateixa manera que en condicions fisiològiques els fibroblasts són els principals constituents de l'estroma normal, en l'estroma tumoral els CAFs en són els majors representats i els que juguen un paper més rellevant en el procés tumorigènic. La principal característica dels fibroblasts associats a carcinoma és l'elevada expressió de l'alfa actina del múscul llis (α -SMA) que els hi confereix unes habilitats contràctils que contribueixen a les seves capacitats promotores tumorals.

La caracterització dels CAFs a nivell molecular és un tema controvertit ja que encara que són diversos els marcadors amb els quals es poden identificar, cap d'ells és únic i exclusiu per a marcar uniformement tots els fibroblasts activats, i a més pot marcar diferents subpoblacions o altres tipus cel·lulars relacionats. Sovint són identificats per l'expressió de diferents marcadors que inclouen α -SMA, tenascin-C (TNC), periostina (POSTN), NG2 ("*Neuron-Glial Antigen 2*"), PDGFR α/β i proteïna d'activació de fibroblasts (FAP). Altres marcadors com vimentina, fibronectina, col·lagen tipus I o FSP-1 són també usats per a detectar altres tipus cel·lulars mesenquimals incloent-hi els CAFs (Togo, Polanska et al. 2013). No obstant, les anàlisis immunohistoquímiques han mostrat solapament d'alguns d'aquests marcadors, com ara NG2 i PDGFR β en cèl·lules positives per α -SMA.

Mentre que FSP-1 va ser detectat bàsicament en la població de fibroblasts no actius, suggerint que aquests marcadors poden identificar diferents poblacions de fibroblasts (*Sugimoto, Mundel et al. 2006*). Aquest solapament i diversitat de marcadors, demostra que hi ha una alta heterogeneïtat dins dels CAFs tant a nivell de marcadors com a nivell funcional.

3.4.1.-Precursors

Aquesta elevada heterogeneïtat dins dels CAFs pot ser deguda, en part, als diferents possibles precursors que poden tenir. Són diversos els models que descriuen la procedència dels fibroblasts associats a carcinoma (figura 18) , però encara que no són mútuament excloents, la contribució de cada un d'aquests processos no estan ben caracteritzats.

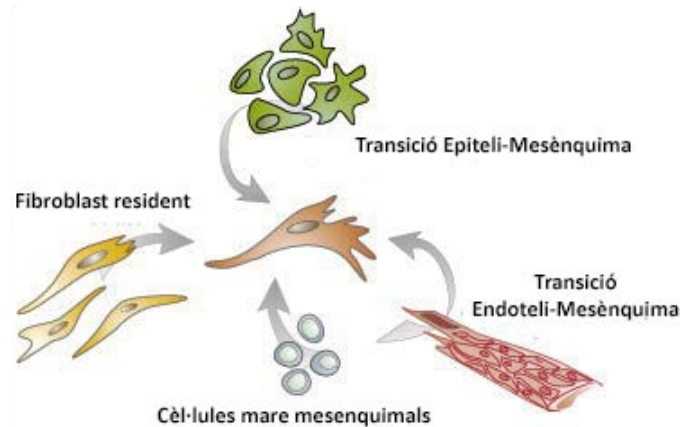


Figura 18. Origen dels fibroblasts activats en l'estroma tumoral. La transdiferenciació en fibroblasts activats pot donar-se de l'activació i reclutament dels fibroblasts residents, de la diferenciació de les cèl·lules mare mesenquimals o altres llinatges mesenquimals, o a través de la transició epiteli/endoteli mesènquima. Figura adaptada de *Östman and Augsten. Curr Opin Genet Dev. 2009 (Ostman and Augsten 2009)*

Fibroblasts locals:

L'activació i reclutament dels fibroblasts residents locals es considera com la principal font de procedència dels fibroblasts associats a carcinoma. Entre els senyals que dirigeixen aquesta activació es troben les citocines locals i els mediadors inflamatoris (De Wever, Demetter et al. 2008). Les evidències que ho corroboren són majoritàriament obtingudes a partir d'experiments *in vitro*. L'elevada expressió de factors de creixement com TGF- β , PDGF i bFGF que secreten les cèl·lules tumorals, activen els fibroblasts en cultiu i indueixen l'expressió d' α -SMA, incrementen la proliferació i la secreció de molècules de la MEC (Denk, Hoppe et al. 2003).

Cèl·lules mesenquimals:

Altres tipus cel·lulars mesenquimals residents en l'estroma com ara perícits, adipòcits o cèl·lules inflamatòries poden també transdiferenciar-se en fibroblasts activats, tot i que són necessàries més evidències experimentals per a corroborar-ho (Anderberg and Pietras 2009).

Cèl·lules mare mesenquimals:

Les cèl·lules mare mesenquimals originalment van ser aïllades de la medul·la òssia, però més tard es va veure que podien residir en tot tipus d'òrgan i que podien diferenciar-se en gran varietat de tipus cel·lulars. Està demostrat que les cèl·lules circulants de la medul·la òssia, pertanyents al tipus de cèl·lules mesenquimals, són capaces de localitzar-se i proliferar en àrees de l'estroma tumoral. Hi ha evidències que les cèl·lules de la medul·la òssia contribueixen als miofibroblasts i fibroblasts de la resposta desmoplàsica així com de l'angiogènesi tumoral (Direkze, Hodivala-Dilke et al. 2004).

Transició epiteli-mesènquima (TEM):

La transició epiteli-mesènquima o TEM és un terme que es refereix al procés que pateixen les cèl·lules epitelials quan canvien d'un fenotip epitelial amb unions estretes, a un de mesenquimal amb pèrdua d'adhesions cel·lulars. Aquest procés inclou canvis bioquímics complexes i vies de senyalització que permeten a les cèl·lules polaritzades adoptar un fenotip mesenquimal caracteritzat per una capacitat migratòria, major invasivitat i una elevada expressió de proteïnes de la matriu extracel·lular. La TEM està correlacionada amb el fenotip maligne dels carcinomes ja que les cèl·lules que pateixen aquest procés generalment es troben en el front invasiu i solen ser les impulsores del procés de metastasi (Thiery 2002). Molts factors incloent el factor de creixement d'hepatòcits (HGF), el factor de creixement epidèrmic (EGF), PDGF i TGF β indueixen el procés de TEM, iniciant gran nombre de vies de senyalització que duen a l'activació dels factors de transcripció inductors de la TEM com ara *Snail*, *Slug*, *Twist* and *FOXC2*. Un dels trets més característics d'aquest procés és la pèrdua de l'expressió de la cadherina epitelial (E-Cadherina) per part de les cèl·lules canceroses, i la subseqüent acumulació de la β -catenina al nucli (Xouri and Christian 2009). Les alteracions genètiques presents tant en les cèl·lules canceroses com en els CAFs són rarament idèntiques, la qual cosa suggereix que només una petita proporció de les cèl·lules cancerígenes i estromals comparteixen origen (Petersen, Nielsen et al. 2003).

Transició endoteli-mesènquima (TEndM):

Similar al que els hi succeeix a les cèl·lules epitelials, les cèl·lules endotelials adquireixen un fenotip mesenquimal en un procés descrit com a transició endoteli- mesènquima (TEndM). En aquest procés és perd l'expressió del marcador endotelial CD31 però es comença a expressar marcadors

de tipus mesenquimal com ara FSP-1 i α -SMA i les cèl·lules comencen a envair la membrana basal subjacent. Igual que en la TEM, el TGF- β n'és un potent inductor. En models experimentals de ratolí, cèl·lules amb co-expressió d' α -SMA o FSP-1 i el marcador endotelial CD31 han estat identificades indicant que hi ha una subpoblació de CAFs que pot derivar de cèl·lules endotelials en el front invasiu (Zeisberg, Potenta et al. 2007).

Els diferents orígens que poden tenir els CAFs no són mutuament exclouents, és més, un estudi, per a demostrar aquest fet, és basat en un model de ratolí transgènic que expressava de manera obliqua proteïna fluorescent vermella o RFP ("*Red fluorescent protein*"). Posteriorment se li van injectar cèl·lules mare de la medulla òssia marcades amb proteïna verda fluorescent o GFP ("*Green fluorescent protein*"). Després d'implantar en aquests ratolins cèl·lules de carcinoma d'ovari es va veure que la majoria de fibroblasts que marcaven per FSP-1 i FAP derivaven de les cèl·lules mare de la medulla òssia GFP+, i pel contrari, les que eren α -SMA+ i NG2+ procedien bàsicament de les cèl·lules residents del teixit local RFP+. Aquests resultats suggereixen que la població de CAFs està composta de diferents poblacions fibroblàstiques i amb diferents orígens cel·lulars (Kidd, Spaeth et al. 2012)

3.4.2.-Genètica i epigenètica dels CAFs

Les característiques fenotípiques i funcionals que confereixen als CAFs les propietats promotores tumorals que els diferencien dels seus corresponents fibroblasts normals, es mantenen de manera estable durant llargs períodes de temps en cultius *in vitro* i fins i tot en absència de cèl·lules canceroses (Orimo, Gupta et al. 2005). La independència a les cèl·lules tumorals i als seus productes de secreció per al manteniment del fenotip dels CAFs suggereix la implicació de mecanismes heretables.

Mecanismes genètics:

La presència d'alteracions genètiques en els CAFs és un tema altament controvertit degut a la dificultat tècnica que suposa el seu anàlisi (quantitat de material genètic insuficient, emmascarament del genotip per part de les cèl·lules normals i/o tumorals, generació d'artefactes en les tècniques moleculars...) (Sieben, ter Haar et al. 2000; Farrand, Jovanovic et al. 2002).

Diversos estudis han demostrat que els fibroblasts normals poden adquirir capacitats pro-tumorigèniques en ser exposats a diferents agents carcinògens o radiacions (Ohuchida, Mizumoto et al. 2004), possiblement degut a l'adquisició de mutacions somàtiques. Aquest fet reforça la

hipòtesi de la co-evolució que postula que els canvis somàtics es donen tant en les cèl·lules epitelials canceroses com en els fibroblasts associats a carcinoma. De fet, molts estudis reporten aberracions en el nombre de còpies gèniques, pèrdua d'heterozigositat o LOH (" *Loss of heterozigosity*"), inestabilitat de microsatèl·lits i mutacions puntuals en gens supressors de tumors (PTEN i TP53) i oncògens en les cèl·lules del compartiment estromal en diversos tipus tumorals (Kurose, Gilley et al. 2002) (Moinfar, Man et al. 2000) (Wernert, Locherbach et al. 2001), fins i tot en alguns estudis aïllats per la tècnica de microcaptura làser (Patocs, Zhang et al. 2007)). No obstant, aquest model de co-evolució no es troba acceptat de manera global en que presentar certes dificultats teòriques. En el cas que les mutacions somàtiques descrites en els CAFs fossin certes, aquestes suposarien un sobrecreixement dels fibroblasts mutats respecte els no mutats (en ser oncogènics *per se*), un fet que sembla que només es dona en els sarcomes però no en els carcinomes (Campbell, Polyak et al. 2009). Addicionalment, un estudi realitzat per *Allinen et al.* en el que es caracteritzaven molecularment totes les poblacions cel·lulars presents en el càncer de mama, demostrà que encara que hi haguessin canvis en l'expressió gènica en totes les poblacions cel·lulars durant el procés tumoral, només eren detectades alteracions genètiques en les cèl·lules epitelials malignes (*Allinen, Beroukhim et al. 2004*). Altres estudis han reportat també la baixa freqüència d'alteracions somàtiques, descartant-les com a responsables del manteniment de les propietats pro-tumorals dels CAFs (Qiu, Hu et al. 2008; Walter, Omura et al. 2008; Hosein, Wu et al. 2010; Campbell, Qiu et al. 2011). Tots aquests estudis demostren la controvèrsia que envolta la presència d'alteracions somàtiques en els fibroblasts associats a carcinoma i suggereixen la presència d'altres mecanismes responsables del seu fenotip.

Mecanismes epigenètics:

Alteracions epigenètiques com metilació de l'ADN, modificació d'histones i remodelació de la cromatina sorgeixen com a possibles responsables del manteniment de les propietats promotores tumorals que presenten els CAFs; tot i que és poca la informació de la que es disposa al respecte (Gonda, Varro et al. 2009). Un estudi realitzat per *Hu et al.* demostrà un perfil de metilació diferencial entre l'estroma de teixit de mama normal i el de carcinoma, suggerint la metilació de l'ADN com a mecanisme per justificar els canvis moleculars i fenotípics descrits en els CAFs (Hu, Yao et al. 2005). Més recentment, *Zong Y. et al* estudiaren els efectes d'una proteïna remodeladora de la cromatina en un model murí de càncer de pròstata demostrant efectes pro-tumorals en l'estroma modificat per aquesta proteïna (Zong, Huang et al. 2012). Contràriament, en un estudi on s'avaluava el perfil genètic diferencial entre el fibroblasts associats a carcinoma i els

fibroblasts normals en càncer de pulmó de cèl·lula gran (Navab, Strumpf et al. 2011), es va veure que tot i haver gens diferencialment expressats entre ambos subtipus, només 1 dels 46 identificats semblava candidat a hipometilació, atribuint els canvis d'expressió a altres mecanismes diferents a la metilació i també diferents a alteracions cromosòmiques.

Així doncs, tot i que les evidències són poques, l'epigenètica de l'estroma i més concretament dels CAFs, sembla ser rellevant en l'adquisició dels trets fenotípics. No obstant, poc es coneix de com les alteracions genètiques estromals succeeixen durant les interaccions tumor-mesènquima i de quines són les conseqüències funcionals d'aquests canvis epigenètics en l'estroma.

3.4.3.-CAF's en el procés tumoral

En molts dels carcinomes més freqüents com el de mama, còlon, estómac i pàncrees, l'estroma constitueix la major part de la massa tumoral, en molts casos representant fins a un 90% del volum total (Desmouliere, Guyot et al. 2004). Diversos estudis, a més, associen pitjor pronòstic a carcinomes amb major grau de desmoplàsia (Maeshima, Niki et al. 2002). El tipus cel·lular predominant en aquest tipus de tumor són els fibroblasts associats a carcinoma (Ronnov-Jessen, Petersen et al. 1996) i són responsables d'establir interaccions dinàmiques i recíproques tant amb les cèl·lules malignes com amb la resta de tipus cel·lulars constituents de l'estroma. Aquestes interaccions heterotípiques estan presents durant tot el procés tumoral i fan que els CAFs vagin evolucionant i tinguin un paper molt important en la progressió del tumor, des del seu inici fins a la invasió i metastasi (Elenbaas and Weinberg 2001).

3.4.3.1.-Inici

Els fibroblasts associats a carcinoma tenen un paper actiu en la formació de tumors sent nombroses les evidències que ho corroboren. Es va demostrar que cèl·lules epitelials prostàtiques immortalitzades però no-tumorigèniques eren capaces de desenvolupar un carcinoma en ratolins quan és co-injectaven amb CAFs; mentre que no ho feien en presència de fibroblasts normals. La transformació no es donava tampoc quan les cèl·lules immortals no-tumorigèniques eren inoculades soles, la qual cosa suggeria que una perturbació prèvia en les cèl·lules epitelials era necessària per a que es donés la transformació (Olumi, Grossfeld et al. 1999). Amb aquest experiment es demostrà que els fibroblasts derivats de tumor havien adquirit unes propietats que promouen la capacitat tumoral en comparació amb els fibroblasts normals. Un altre experiment per a remarcar la rellevància dels fibroblasts en els càncers epitelials es basa en un model de mama on es va demostrar que quan cèl·lules epitelials de mama no-transformades es trasplantaven en zones estromals que havien estat irradiades, es produïa un procés de

tumorigènesis que no es donava quan les cèl·lules epitelials eren trasplantades en zones no irradiades; indicant que anormalitats induïdes en els fibroblasts són suficients per a la formació d'una neoplàsia (*Barcellos-Hoff and Ravani 2000*). Estudis posteriors també demostraren que inclús fibroblasts no irradiats permeten el fenotip invasiu de cèl·lules pancreàtiques malignes poc diferenciades (Ohuchida, Mizumoto et al. 2004).

Aquests experiments evidencien la influència que tenen els factors paracrins secretats pels fibroblasts en la transformació de les cèl·lules epitelials (normals i carcinogèniques) i en la iniciació del procés tumoral.

3.4.3.2.-Progressió i angiogènesi

Les comunicacions específiques que s'estableixen entre els CAFs i la resta de tipus cel·lulars presents en el tumor no només participen en els estadis inicials d'un procés tumorigènic sinó que també tenen un paper molt important en la progressió al promoure el creixement tumoral i estimular el procés d'angiogènesi. Són diversos els estudis que ho han confirmat i han ajudat a entendre una mica més quines són les vies implicades.

En un model murí, la presència de CAFs fa que s'incrementi la proliferació de cèl·lules cancerígenes de mama i s'estimuli l'angiogènesi produint-se neovascularització dels tumors en reclutar-se cèl·lules endotelials progenitores o EPC ("Endothelial Progenitor Cells") (Orimo, Gupta et al. 2005). Aquests efectes van ser associats amb l'elevada expressió d'un factor secretat pels CAFs, l'SDF-1 també anomenat CXCL12, que presenta el seu receptor CXCR4 en les cèl·lules tumorals (figura 19).

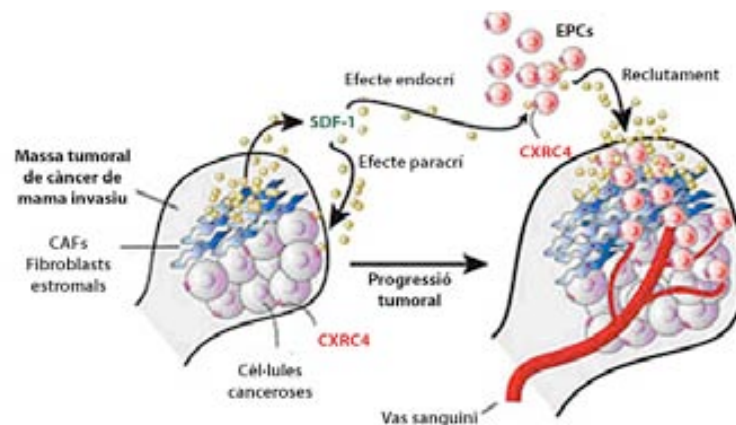


Figura 19. Representació esquemàtica dels efectes pro-tumorals produït pels CAFs. L'SDF-1 secretat pels fibroblasts permet el creixement del tumor no només estimulant l'angiogènesi en reclutar les EPC, sinó també dins la massa tumoral en produir una estimulació paracrina de les cèl·lules tumorals a través de la unió al seu receptor CXCR4 expressat en les cèl·lules carcinogèniques. Imatge extreta de *Orimo A. and Weinberg R. Cell cycle. 2006. (Orimo and Weinberg 2006)*

Al seu torn, altres estudis demostren que la secreció elevada de TGF- β 1 per part dels CAFs incrementa l'expressió de CXCR4 en cèl·lules de pròstata pre-neoplàsiques (San Francisco, DeWolf et al. 2004), posant de manifest que aquesta via de senyalització té una alta rellevància en la progressió tumoral. Posteriorment, resultats similars es presentaven en un model d'adenocarcinoma pancreàtic (alt grau de desmoplàsia), en el que mitjançant assajos *in vitro* es van estudiar els efectes dels factors solubles alliberats per les cèl·lules pancreàtiques estrellades o HPSC ("*Human Pancreatic Stellate Cells*") sobre les cèl·lules canceroses (Hwang, Moore et al. 2008). L'addició de medis condicionats incrementava la proliferació, la invasió i la formació de colònies d'una manera dosi-depenent. Els factors solubles secretats per les HPSC activaven la via de senyalització de les ERK i Akt, relacionades respectivament amb proliferació i supervivència. *In vivo* també es va demostrar que la co-injecció de cèl·lules tumorals amb HPSC induïa la progressió del tumor i la metastasi d'una manera proporcional al nombre de cèl·lules injectades. La secreció de VEGF per part dels CAFs també juga un paper molt important en l'angiogènesi, ja que permet l'activació de les integrines sobretot al unir-se a la fibronectina (Byzova, Goldman et al. 2000) (Alphonso and Alahari 2009). L'angiogènesi també és facilitada per les MMP secretades pels fibroblasts, que no només creen un espai per a que les cèl·lules endotelials puguin migrar, sinó que també provoquen l'alliberament de factors pro-angiogènics en actuar sobre components de la MEC, alliberen pericits dels vasos sanguinis i trenquen les unions entre cèl·lules endotelials al tallar la cadherina endotelial vascular (VE-Cadherina) (Rundhaug 2005)

3.4.3.3.-Invasió

La cascada d'invasió tumoral-metàstasi és un procés seqüencial que permet a les cèl·lules escapar de la massa del tumor primari per a colonitzar òrgans i teixits distants. Tot i que clàssicament s'ha considerat que aquesta seqüència es deu bàsicament a les propietats adquirides per la cèl·lula cancerosa que la converteixen en una entitat autosuficient, cada cop hi ha més evidències que suggereixen que la interacció tumor-stroma és el que en facilita la invasió, de fet, els CAFs es troben de manera abundant en el front invasiu dels tumors primaris. Els efectes pro-invasius dels CAFs poden estar regulats per interaccions heterotípiques directes entre cèl·lula-cèl·lula o bé a través de molècules solubles. Poden secretar quimiocines, citocines, i mediadors inflamatoris, que en combinació poden afectar la invasió de les cèl·lules canceroses. Alteracions en la quantitat de proteïnes de la MEC, proteïnases i els seus inhibidors, proveeixen d'una estructura d'ancoratge per a les cèl·lules cancerígenes que a més afecta a l'expressió de gens implicats en l'organització del citoesquelet.

Uns factors solubles secretats pels CAFs i que han demostrat ser uns potents agents pro-invasius en un model de càncer de còlon *in vitro*, són la tenascina-C (una glicoproteïna de la matriu extracel·lular) i el HGF (De Wever, Nguyen et al. 2004). La invasió tumoral també ve promoguda pels enzims degradadors de la matriu extracel·lular com les MMPs, que no només n'alteren la seva estructura, sinó que també alliberen factors de creixement i angiogènics que són secretats en grans quantitats pels CAFs (Kaminski, Hahne et al. 2006). La degradació de la E-cadherina que uneix les cèl·lules epitelials genera la disgregació de les cèl·lules normals i inicia una cascada d'alteracions moleculars que condueixen al procés de transició epitelial-mesènquima que al seu torn promou la capacitat invasiva de les cèl·lules tumorals (Hazan, Phillips et al. 2000).

3.4.3.4.-Metàstasi: Hipòtesi de llavor i sòl (“Seed and soil”)

La metàstasi (disseminació de cèl·lules canceroses del tumor primari a òrgans distants) és la causa més freqüent de mort en la majoria de càncers. Es tracta d'un procés seqüencial i altament selectiu que inclou la invasió local, l'entrada a la circulació sistèmica, supervivència en el transport, extravasació i l'establiment de micro i macrometàstasi.

Quan les cèl·lules tumorals passen al torrent sanguini o als vasos limfàtics, es troben sotmeses a un microambient completament diferent al que s'han d'adaptar per aconseguir metastatitzar (Joyce and Pollard 2009). De fet, dels milions de cèl·lules canceroses alliberades al torrent sanguini, només un 0.01% és capaç de sobreviure i d'extravasarse en un lloc secundari produint metàstasi.

En un teixit adient, les cèl·lules s'allotjaran, sobreviuran, s'establiran i seran capaces de créixer i metastatitzar, però al igual que en el procés d'intravasació, la localització metastàtica ofereix nous entrebancs a les cèl·lules circulants. Així doncs, com succeeix en el tumor primari, el microambient local té molta rellevància en cada un dels passos del procés metastàtic. Un microambient receptiu és necessari perquè les cèl·lules malignes s'estableixin en teixits distants i siguin capaces de formar metàstasi. En humans, certs tumors tenen preferència per a metastatitzar en determinats òrgans mentre no són capaços de fer-ho en d'altres. Això és el que es coneix com a tropisme tissular (Bos, Zhang et al. 2009).

Al 1889, Stephen Paget, un cirurgià anglès, va proposar la teoria de “Seed and Soil” (llavor i sòl) basant-se en la observació de que certs tumors tenien tropisme per un òrgan concret. Afirmava que el procés metastàtic no era a l'atzar, sinó que depenia d'una inter-comunicació entre les cèl·lules canceroses (llavors) seleccionades i un microambient local específic (sòl). La idea va ser contradita 40 anys més tard per James Ewing qui proposava que la disseminació metastàtica succeïa exclusivament per factors mecànics determinats per l'estructura anatòmica dels sistema vascular. Durant dècades, aquesta teoria va romandre vigent, fins que al 1970 la naturalesa

selectiva del procés metastàtic va ser documentada demostrant que encara que les cèl·lules tumorals arribessin a la vasculatura d'òrgans distants, la subseqüent proliferació i creixement de lesions secundàries venia influenciada per les cèl·lules específiques de l'òrgan (Fidler 2003). Fent un símil amb ecologia i el concepte de nínxol, hi ha una nova hipòtesi, la del model de nínxol metastàtic, que suggereix que un microambient adequat (nínxol pre-metastàtic) ha d'evolucionar per tal que les cèl·lules tumorals siguin capaces d'introduir-se (nínxol metastàtic) i proliferar en localitzacions secundàries (transició de micro a macrometàstasi) (Psaila and Lyden 2009). (figura 110).

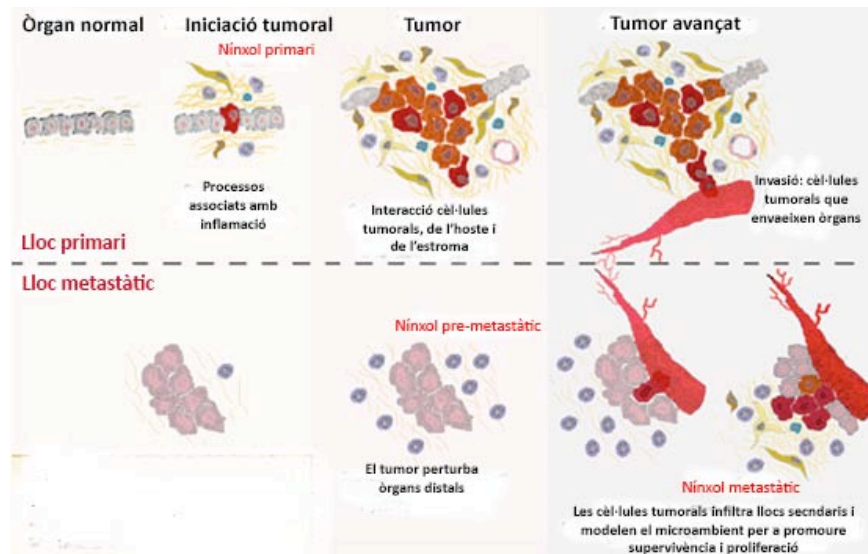


Figura 1 10. Evolució tumoral. Interaccions de les cèl·lules tumorals amb el microambient (nínxol) que l'envolta en el lloc del tumor primari (superior) i en el nínxol metastàtic (inferior). Imatge extreta de <http://www.london-research-institute.org.uk/research/ilaria-malanchi/projects>.

Hi han evidències de que factors de creixement secretats pel tumor primari preparen certs teixits per a l'allotjament de les cèl·lules tumorals i creen un microambient ric en fibronectina, factors de creixement i proteïnes remodeladores de la matriu entre d'altres, que el fan propici per a l'adhesió tumoral i invasió. L'èxit de la proliferació tumoral vindria regulada per les interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu dins del nínxol metastàtic, demostrant una altre vegada la importància de l'estroma en el desenvolupament d'un procés tumoral.

Pel que fa a la implicació dels fibroblasts associats a carcinoma en aquests procés de metàstasi, hi ha estudis que indiquen que els CAFs en el lloc metastàtic promouen la proliferació de les cèl·lules canceroses *in situ* i influeixen en el creixement del tumor. Això suggereix l'existència d'uns CAFs associats a metàstasi que s'encarregarien de crear un nínxol metastàtic donant suport a la iniciació i angiogènesi (Olaso, Salado et al. 2003).

Un altre exemple per a mostrar els efectes dels fibroblasts en el desenvolupament de metàstasi el trobem en els experiments realitzats pel grup de Grum-Schwensen. Per a demostrar el paper de la proteïna FSP1 en l'estroma, cèl·lules metastàtiques de carcinoma mamari foren trasplantades en ratolins deficients en el gen codificant per aquesta proteïna. L'absència retardava el desenvolupament i la formació de metàstasi en ratolins tot i que els efectes podien ser parcialment revertits per l'adició de fibroblasts positius per FSP1. Els resultats proposaven FSP1 com una proteïna implicada en el creixement i la metàstasi tumoral. Intracel·lularment, sembla que FSP1 interfereix en processos cel·lulars vitals com la motilitat, cycle cel·lular, invasió i supervivència, mentre que extracel·lularment sembla que quan es secretada a l'interstici tumoral, estimula la producció d'enzims degradadors de la matriu a més d'estimular la motilitat de les cèl·lules endotelials comportant-se com a factor angiogènic (*Grum-Schwensen, Klingelhofer et al. 2005*).

Un estudi realitzat al 2006 dóna evidències de que les interaccions entre les cèl·lules prostàtiques metastàtiques i els fibroblasts tenen efectes en multitud dels passos de la cadena metastàtica mencionats prèviament. Per tal de poder créixer i propagar-se als llocs metastàtics, les cèl·lules tumorals primer necessiten induir un estroma de suport (*Kaminski, Hahne et al. 2006*).

Estudis més recents han evidenciat que els CAFs estimulats a través del seu receptor de PDGF, tenen un efecte pro-metastàtic al incrementar la seva capacitat per a promoure la migració i la invasió en cèl·lules co-cultivades. La stanniocalcina-1 (STC1) és una glicoproteïna que ha estat identificada com a medidora de la inducció de PDGF en els CAFs. De fet, fibroblasts modificats genèticament per no expressar STC1 mostraren una menor capacitat per a induir metàstasi en un model ortotòpic de càncer de còlon en ratolí (*Pena, Cespedes et al. 2012*).

Els CAFs s'encarreguen també de proporcionar un entorn metabòlic adequat a les cèl·lules tumorals per tal que aquestes disposin de l'energia suficient per a créixer i metastatitzar. Aquest fenomen és conegut com "efecte Warburg" i consisteix en la transferència de metabòlits altament energètics (com lactat i piruvat) a les cèl·lules malignes properes que estan patint un metabolisme mitocondrial oxidatiu. Les cèl·lules tumorals incrementen la producció d'ATP accelerant el creixement i el potencial metastàtic (*Pavlidis, Vera et al. 2011*).

3.4.4.-Factors responsables de la interacció CAFs- cèl·lula maligna

Són moltes les molècules de senyalització implicades en cada un dels passos en els que intervien els CAFs durant l'evolució tumoral.

3.4.4.1.-Factors de creixement

Les cèl·lules malignes i els CAFs es comuniquen mitjançant factors de creixement, sent els més significants el TGF- β i el PDGF- β . La secreció de TGF- β coordina el reclutament de CAFs i la diferenciació de fibroblasts normals a fibroblasts activats, a més, nivells de TGF- β 1 i - β 2 estan sobrerregulats en els CAFs i s'encarreguen de mantenir el fenotip activat i de continuar promovent la secreció de TGF- β de manera autocrina a través de la via de senyalització de Smad2/3 (Kojima, Acar et al. 2010). TGF- β també actua de manera paracrina sobre les cèl·lules tumorals properes regulant negativament el seu creixement. Mutacions inactivants en aquesta via poden dur al desenvolupament d'una neoplasia, com va ser demostrat per Neil A. Bhowick, (Bhowmick, Chytil et al. 2004), qui va descriure l'efecte que tenia la inactivació específica en fibroblasts del gen del receptor tipus II de TGF- β en un model de ratolí. La pèrdua de la senyalització per TGF- β en els fibroblasts generava al seu torn una sobreexpressió de HGF en els mateixos que incrementava la fosforilació, i per tant l'activació, del seu receptor c-Met en les cèl·lules epitelials. Això desencadenava una activació de la senyalització paracrina per HGF que estimulava la proliferació en el compartiment epitelial (figura I11).

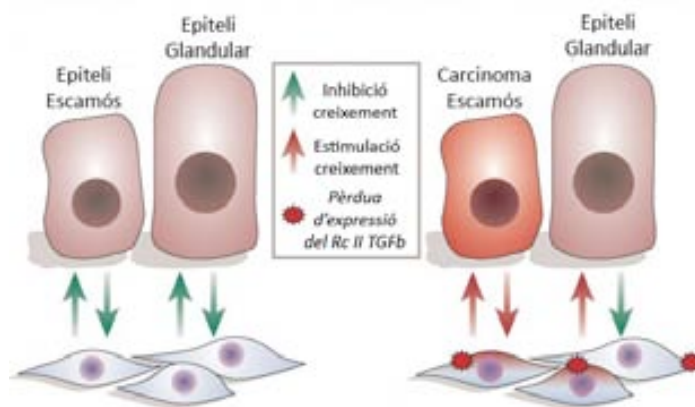


Figura I 11. Interaccions fibroblasts estromals-epiteli. El balanç no carcinògenic es manté per les interaccions dinàmiques que es donen entre el compartiment epitelial i estromal. Els fibroblasts activats poden donar suport o inclús iniciar una tumorigènesi i al seu torn, els factors de senyalització proliferatius derivats del carcinoma, actuen sobre l'estroma. Figura extreta de *Bhowmick N.A. et al. Nature 2004* (Bhowmick, Neilson et al. 2004).

L'HGF és bàsicament secretat per cèl·lules mesenquimals i el seu receptor MET es àmpliament expressat per les cèl·lules epitelials, tot i que els CAFs sobreexpressen ambdós HGF i MET, la qual cosa suggereix una estimulació del creixement de manera autocrina en les cèl·lules estromals. El paper del TGF- β de supressor tumoral a promotor pot ser explicat per la interacció que existeix entre la citocina SDF-1/CXCL12 i el seu receptor CXCR4 que es troba present en la superfície de les cèl·lules tumorals i que incrementa la seva expressió en presència del TGF- β secretat pels CAFs. La

importància d'aquest cercle de senyalització ha estat confirmat en pacients amb càncer de pulmó de cèl·lula no-petita on l'expressió tumoral de CXCR4 correlaciona positivament amb estadis avançats de la malaltia (Wald, Izhar et al. 2011). Els nivells de concentració de CXCL12 i de CXCR4 per a les cèl·lules tumorals són de gran importància en la progressió del tumor.

El PDGF és un altre factor de creixement que estimula el creixement i la divisió cel·lular, l'angiogènesi, i participa també de manera autocrina en l'estimulació de les cèl·lules tumorals.

El receptor de PDGF, el PDGFR, es troba àmpliament expressat en els fibroblasts estromals i la seva activació promou l'alliberament per part dels fibroblasts normals o CAFs de més factors de creixement com l'IGF-1 (*"Insulin-like Growth Factor-1"*), HGF, bFGF que al seu torn actuen com a promotors del creixement i de la invasió. La inducció de l'alliberament de factors de creixement de fibroblasts com FGF-2 i FGF-7 a l'estroma per part dels CAFs també promou l'angiogènesi en les cèl·lules endotelials i la proliferació de l'epiteli tumoral (Pietras, Pahler et al. 2008) (figura I12).

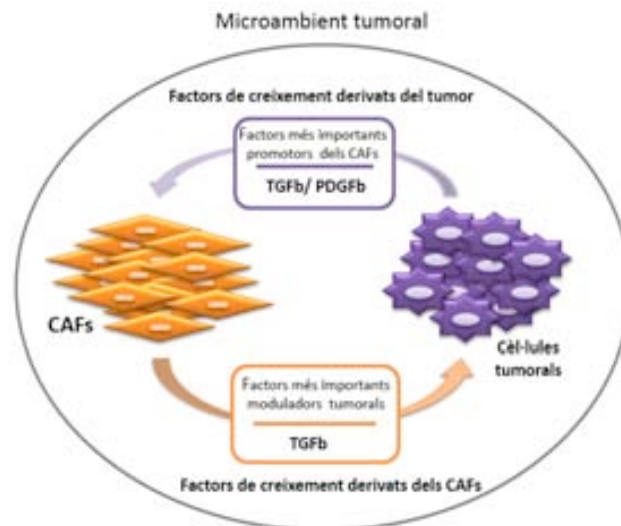


Figura I 12. Factors de creixement més importants en la neoplàsia. El TGF- β derivat dels CAFs i de la cèl·lula tumoral, juntament amb PDGF constitueixen els principals transductors de senyals entre les cèl·lules tumorals i els CAFs.

3.4.4.2.-Proteases

Són tres els tipus de proteases relacionades amb els CAFs, les metaloproteinases de la matriu o MMPs, les catepsines i les serina proteases.

La majoria de les MMPs que es troben en el microambient tumoral són secretades pels CAFs i es poden trobar lliures en la matriu extracel·lular o bé unides a la membrana cel·lular. Actuen principalment promovent la invasió i metàstasi ja que ajuden a la transició epiteli mesènquima i

faciliten la migració de les cèl·lules al degradar la matriu extracel·lular. Un exemple seria el tall del domini extracel·lular de la E-cadherina per la MMP3, que condueix a una disgregació de les cèl·lules epitelials i a unes alteracions moleculars que porten a la TEM i per tant a la invasió (Lochter, Galosy et al. 1997). Contràriament, altres MMPs com la MMP8 suprimeix la metàstasi en promoure l'adhesió a la matriu extracel·lular (Gutierrez-Fernandez, Fueyo et al. 2008).

Les catepsines són unes endoproteïnases lisosomals que tenen una àmplia varietat de funcions com regulació de l'apoptosi i diferenciació epitelial. Tenen diferents especificitats i s'expressen al llarg de tot el procés tumorigènic d'una manera específica de tipus cel·lular. S'ha vist en models *in vivo* que potencien la invasió i angiogènesi (Joyce, Baruch et al. 2004).

Dins del grup de les serina proteases trobem uPA ("*Urokinase-plasminogen activator*"), una proteasa que es requereix per a l'activació de plasminògen a plasmina i que degrada proteïnes de la MEC com el col·lagen IV, laminina i fibronectina. La unió de uPA al seu receptor de superfície, l'uPAR, comporta la proteòlisi de proteïnes de la MEC millorant la capacitat de creixement i d'invasió i iniciant un procés de senyalització a través d'integrines. La seva expressió es troba incrementada en els CAFs del front invasiu de càncers com el de mama i el de còlon (Pyke, Kristensen et al. 1991). La proteïna d'activació de fibroblasts (FAP) és una altre serina proteasa que modifica la matriu extracel·lular i promou el creixement tumoral i que també s'ha vist implicada en neovascularització (Lee, Mullins et al. 2011).

3.4.4.3.- Altres factors

Els CAFs també secreten factors no-proteolítics que són crucials per a la remodelació de la matriu extracel·lular. Un exemple és la Tenascina-C, una glicoproteïna sobre regulada en períodes d'estrès mecànic i d'hipòxia i que està altament implicada en l'angiogènesi produïda per hipòxia. Interfereix amb l'adhesió de la cèl·lula tumoral a la fibronectina promovent la seva retirada de la matriu extracel·lular i interferint en processos de senyalització cel·lular. La seva expressió en tumors ha estat associada amb proliferació, migració i evasió del sistema immunitari i mal pronòstic en diferents càncers com ara el de mama, còlon, melanoma i glioblastoma (Hofmeister, Schrama et al. 2008).

L'anhidrasa carbònica IX (CAIX) es troba expressada en la superfície cel·lular dels CAFs de càncer de còlon, de pulmó de cèl·lula no-petita i de ronyó. La seva expressió és important per a la regulació del pH, alts nivells estan associats amb l'acidosi induïda per hipòxia i prediu un pronòstic desfavorable. En condicions d'hipòxia, els CAFs que secreten CAIX poden secretar també factors angiogènics incloent-hi VEGF i PDGF (Fiaschi, Giannoni et al. 2013).

3.5. Implicacions terapèutiques

Per a controlar adequadament un càncer, cal considerar la carcinogènesis i el procés tumoral no com un esdeveniment centrat en les propietats de la cèl·lula cancerosa, sinó com una malaltia en la que hi estan implicades complexes interaccions multicel·lulars originades dins d'un nou teixit, el teixit tumoral.

La investigació en teràpies dirigides a dianes o vies de senyalització específiques en la cèl·lula tumoral és un dels pilars de la investigació oncològica actual. tot i així, la majoria de tumors segueixen tractant-se amb les teràpies citotòxiques convencionals. L'èxit del tractament emprat és molt variable, depenent tant del tipus de càncer com l'estat en el que es troba, no obstant, la resistència als fàrmacs (intrínseca o adquirida), en segueix sent el principal obstacle (Werny and Morin 2004).

3.5.1.- Microambient tumoral i resistència a fàrmacs

La resistència a la quimioteràpia i a la radioteràpia és un dels majors reptes en el tractament del càncer, i la major part de la investigació s'ha centrat en les cèl·lules malignes. No obstant, la influència que juga el microambient tumoral en l'èxit del tractament és cada cop més evident, i és que pot ser responsable proporcionar una barrera protectora impedit l'entrada del fàrmac/radiació (ex: la pressió del fluid intersticial crea una barrera que dificulta l'absorció dels components quimioteràpics); i pot generar un ambient permissiu i promotor pel creixement tumoral (ex: disminució de sensibilitat a l'apoptosi) (Morin 2003).

Un tractament ideal en el càncer suposaria l'erradicació de totes les cèl·lules malignes evitant així futures recurrències. En molts casos, però, inclús després de "respostes completes" al tractament (quan ja no s'aprecien evidències macroscòpiques de lesions tumorals), un petit però significatiu nombre de cèl·lules tumorals sobreviuen a la quimioteràpia i constitueixen el que es coneix com a "malaltia mínima residual" (MMR) (Goss and Chambers 2010).

La presència de resistència en subpoblacions cel·lulars respecte d'altres, remarca la presència d'heterogeneïtat genètica dins la massa tumoral, i pot ser:

- Resistència intrínseca: deguda a la heterogeneïtat genètica originada de la divisió asimètrica de les cèl·lules mare tumorals que genera subpoblacions cel·lulars genèticament diferents i algunes amb fenotips ja resistents (Royer and Lu 2011).
- Resistència *de novo* adquirida: deguda a canvis genètics/epigenètics que la cèl·lula tumoral va adquirint al llarg del temps com a conseqüència de les pressions

selectives a la que es troba sotmesa i que li confereixen avantatges selectives de supervivència (Basu, Nguyen et al. 2010).

En ambdós casos el paper del microambient és molt important, per una banda protegeix al tumor de l'accés del fàrmac i permet que les cèl·lules que posseeixen predisposició genètica intrínseca a la resistència puguin ser seleccionades; i per l'altre permet modificacions genètiques transcripcionals o post-traduccionals que redueixen els efectes tòxics de les drogues en les cèl·lules inicialment no resistents. Aquesta resistència a quimioteràpia deguda al microambient o EMDR (*"Environment Mediated Drug Resistance"*) implica doncs una senyalització recíproca entre les cèl·lules tumorals i el microambient circumdant.

La EMDR es pot dividir en dues subcategories (Meads, Gatenby et al. 2009{Cukierman, 2012 #272):

1. Resistència deguda a adhesió cel·lular: es dona per l'adhesió de les integrines o altres tipus de receptors de les cèl·lules tumorals als fibroblasts de l'estroma o altres components de la matriu extracel·lular (fibronectina, laminina i col·lagen). Es desencadenen mecanismes no transcripcionals com degradació d'activadors de l'apoptosi (Hazlehurst, Argilagos et al. 2007) i increment de l'estabilitat de reguladors del cicle cel·lular (Lwin, Hazlehurst et al. 2007).
2. Resistència deguda a factors solubles: produïda per citocines, quimiocines i factors de creixement secretats principalment pels fibroblasts de l'estroma que indueixen la transcripció gènica.

Són diversos els tipus cel·lulars estromals que s'associen al microambient tumoral i que per tant poden contribuir a la resistència, no obstant, els fibroblasts activats en són els majors constituents i per tant son el principal focus dels estudis en resistència.

3.5.2.-CAFs com a diana terapèutica

Les característiques biològiques dels fibroblasts associats a carcinoma que han estat descrites amb anterioritat i que els converteixen en un bon recurs terapèutic són:

- Tipus cel·lular més abundant dins de l'estroma tumoral i participació en el desenvolupament i progressió del tumor primari estimulants el creixement i promovent la neoangiogènesi.
- Contribució a la invasió i a la constitució d'un nínxol metastàtic fent que les cèl·lules tumorals puguin disseminar i colonitzar nous òrgans.

- L'expressió gènica diferencial entre l'epiteli/fibroblasts normals de la mucosa adjacent al tumor /CAFs, facilita el disseny d'estratègies terapèutiques dirigides.
- Les mutacions genètiques de nova adquisició són menys comuns en les cèl·lules estromals que en les epitelials en ser menys replicatives, el que converteix als CAFs en un tipus cel·lular més estable genèticament i menys susceptible d'evadir o fer-se resistent a la teràpia.
- Les múltiples interaccions que estableixen amb la resta de cèl·lules del compartiment estromal (cèl·lules endotelials i del sistema immunitari), els hi atorguen un paper molt important en angiogènesi i immunoregulació.

3.5.2.1.-Teràpies específiques dirigides contra els CAFs

La disminució de la quantitat dels fibroblasts de l'estroma tumoral incrementa l'absorció de fàrmacs quimioteràpics i millora els efectes del tractament (Loeffler, Kruger et al. 2006). A més, molts components que inhibeixen els CAFs directament o la seva comunicació amb el tumor estan en desenvolupament pre-clínic i clínic. Les estratègies que s'estan seguint per prevenir o endarrerir l'adquisició de resistències segueixen diverses aproximacions:

- Intervenir en la interacció directa tumor-estroma (Ristorcelli and Lombardo 2010) i impedir interaccions de la cèl·lula tumoral amb la matriu extracel·lular.

Exemples: Inhibidors d'integrines (Cox, Brennan et al. 2010):

Donada la rellevància de les interaccions establertes entre les integrines de les cèl·lules epitelials i els components del microambient en el desenvolupament de quimioresistència, el bloqueig de la senyalització a través de les integrines es presenta com una bona aproximació terapèutica (Borrirukwanit, Lafleur et al. 2007). Els mecanismes biològics en els quals es basa la resistència deguda a la senyalització per integrines poden consistir en degradació de proteïnes pro-apoptotiques o aturada del cicle cel·lular en fase G1 (Hazlehurst, Landowski et al. 2003).

- Obstaculitzar l'expressió i activitat dels factors secretats per les cèl·lules estromals:

Exemples: IL-6 i CXCL12

Els factors solubles com CXCL12 i IL-6 estan implicats en la resistència a fàrmacs i representen una bona diana terapèutica. La inhibició de l'eix CXCL12/CXCR4 amb l'ús d'antagonistes ha demostrat en diferents models pre-clínic una disminució de la proliferació tumoral, increment de l'apoptosi produïda pel fàrmac i augment de l'activitat citotòxica dels limfòcits T (Righi, Kashiwagi et al. 2011) (Rubin, Kung et al. 2003).

La interleuquina 6 (IL-6) està generalment sobrerregulada en malalties inflamatòries i càncers estromals, i la seva inhibició sembla efectiva disminuint factors estromals com CXCL12, VEGF, i IL-6 (Shain, Yarde et al. 2009; Coward, Kulbe et al. 2011).

Un altre mecanisme d'actuació per atacar als CAFs és mitjançant FAP. La seva expressió és específica de CAFs i la seva activitat enzimàtica única permet el desenvolupament de pro-fàrmacs dissenyats per a ser citotòxics en ser proteolíticament activats per FAP. Com que FAP és bàsicament expressat pels CAFs dins del tumor, el trencament proteolític del pro-fàrmac a l'interior del tumor faria que l'efecte citotòxic es donés bàsicament en les cèl·lules properes a la zona d'activació del fàrmac, tant de les tumorals com les estromals (Brennen, Rosen et al. 2012).

- Inhibició dels receptors nuclears estromals (Sherman, Downes et al. 2011).

Exemples: inhibició de gens implicats en la biosíntesi del colesterol

La Simvastatina (inhibidor d'un enzim implicat en la biosíntesi de colesterol) disminueix la proliferació tumoral i indueix aturada de cicle cel·lular a la fase G1/S. S'ha vist que el seu ús resulta en una expressió disminuïda de la integrina $\beta 1$, una mala fosforilació de FAK i conseqüentment una separació de les cèl·lules tumorals de la matriu extracel·lular conduint a la mort cel·lular en diverses línies de càncer de cap i coll (Takeda, Maruya et al. 2007). La disminució de la biosíntesi de colesterol també resulta en una disminució de l'activitat de les GTPases petites Rho, Ras i RAP 1 resultant en unes adhesions focals més dèbils disminuint l'afinitat de les integrines pels seus lligands (Schmidmaier, Baumann et al. 2004; Azab, Azab et al. 2009).

- Bloqueig general de les vies de senyalització tumorals (Cukierman and Bassi 2012):

Exemples: Inhibició de les vies de TGF β , PDGF, SHH (Sonic Hedgehog), Wnt i Notch

La via de senyalització de **SHH** es troba activada en la majoria dels càncers de pàncrees i està implicada en l'inici i manteniment de la reacció desmoplàsica (Merika, Syrigos et al. 2012). Un estudi fent ús d'un inhibidor d'aquesta via de senyalització (IPI-926) en un model murí de càncer de pàncrees ha demostrat una disminució de la reacció desmoplàsica i un increment en la densitat vascular facilitant el subministrament de fàrmacs (Olive, Jacobetz et al. 2009; Hamada, Masamune et al. 2013).

El bloqueig de la via de senyalització de PDGF per inhibidors quinases de PDGFR (Dasatinib) suprimeix significativament la proliferació dels CAFs i disminueix la pressió del fluid intersticial facilitant l'alliberament del fàrmac i incrementant l'eficiència de la quimioteràpia, atenuant el creixement tumoral (Pietras, Ostman et al. 2001; Falcon, Pietras et al. 2011).

Una altra estratègia per atacar l'activitat dels CAFs és la d'alterar la via de senyalització de TGF- β , que ja s'ha vist amb anterioritat que juga un paper molt important en la proliferació dels

fibroblasts i en el reclutament de cèl·lules del sistema immunitari. Tot i que hi ha diverses estratègies descrites dirigides al TGF- β (Paraiso and Smalley 2013), el paper crític que aquest juga, fa que hagin de ser valorades amb cura ja que una mala aproximació pot tenir efectes contraproductius.

3.5.3.-Perspectives

Són vàries les estratègies que s'estan duent a terme com a teràpia contra el càncer fent èmfasi en la població de fibroblasts associats a carcinoma, però cal tenir en compte que la presència de diferents subpoblacions d'aquests (identificades per diferents marcadors), pot dificultar molt el desenvolupament de noves teràpies dirigides contra els fibroblasts tumorals. A més, el fet que alguns marcadors siguin comuns també en fibroblasts activats no pertanyents al teixit tumoral (per lesió o inflamació), dificulta el tractament. És de gran importància, doncs, la identificació de nous biomarcadors específics i de les vies de senyalització específiques que s'activen, així com conèixer quins són els factors paracrins i autocrins secretats pels fibroblasts activats.

La implicació dels CAFs i dels seus productes en tots els passos del procés tumoral fa que abolir les proteïnes específiques estromals i les seves funcions relacionades pugui fer que els tumors esdevinguin vulnerables a les teràpies convencionals.

4. PERFILS D'EXPRESSIONI GÈNICA I MICROAMBIENT

4.1. Revisió i estat actual

La tècnica dels microarrays d'expressió gènica o d'ARN va ser descrita per primera vegada a mitjans dels anys 90 com a eina per a mesurar l'expressió de milers de gens de manera simultània (Schena, Shalon et al. 1995) (Lipshutz, Morris et al. 1995) i ràpidament va ser adoptada per a la comunitat científica per a l'estudi d'un ampli ventall de processos biològics. La majoria d'estudis comparaven dues classes biològiques per tal d'identificar un perfil d'expressió gènica diferencial que donés informació rellevant sobre gens implicats en processos biològics (per exemple, teixit normal vs teixit tumoral) (Zhang, Zhou et al. 1997). Poc després de la seva introducció es va descobrir el seu potencial com a tècnica per a identificar biomarcadors associats a diagnòstic o pronòstic, classificar malalties, monitoritzar la resposta a la teràpia i entendre els mecanismes involucrats en la formació de processos patològics, fent dels microarrays una tècnica amb ús potencial dins la biologia del càncer (Quackenbush 2006; Nannini, Pantaleo et al. 2009). Des d'aleshores, nombrosos estudis de perfils d'expressió gènica han servit per a classificar tipus de

La tecnologia microarray d'expressió gènica consta dels següents passos: (1) les sondes corresponents als diferents gens són fixades en una superfície sòlida que serà l'array, (2) l'ARNm (missatger) és extret, retrotranscrit a ADNc (complementari), marcat amb fluorescència i hibridat en l'array i (3) generació d'una imatge per fluorescència. (figura I14).

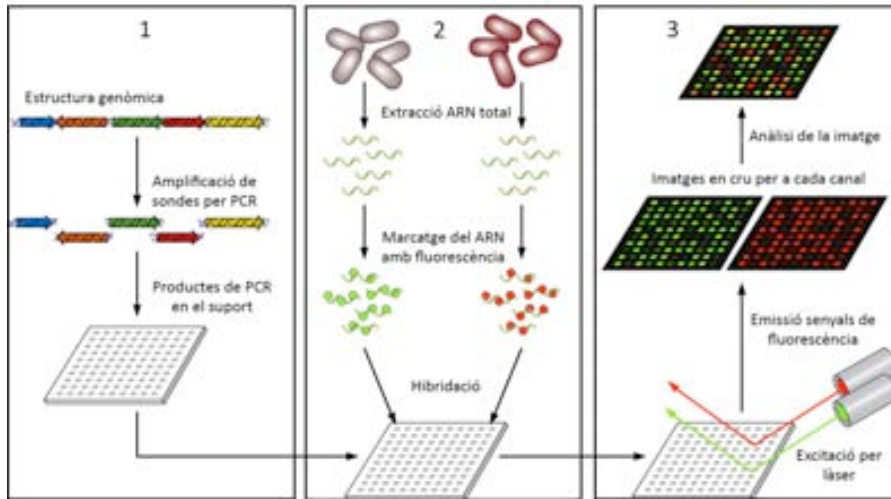


Figura I 14. Esquema general de la metodologia emprada en l'anàlisi de microarrays d'ARN

El principi darrera de la quantificació dels nivells d'expressió és que la quantitat de fluorescència en cada seqüència específica és directament proporcional a la quantitat d'ARNm present en la mostra analitzada. Un cop els microarrays han estat hibridats, les imatges resultants es fan servir per a generar un conjunt de dades que han de ser processades abans de ser analitzades i interpretades. Aquest processament previ inclou:

- **Normalització** de les dades per a corregir les diferències sistemàtiques que poden existir entre gens o arrays pel que fa a intensitats de sondes i així poder comparar la informació donada en diferents plataformes. Actualment, els mètodes principals de normalització de dades són, el mètode d'array múltiple o RMA (*"Robust Multi-array Average"*) i el mètode d'array simple MAS5 (Irizarry, Bolstad et al. 2003).

- **Correcció de senyals inespecífiques (*background*) i filtratge** per eliminar la informació que donen les hibridacions no específiques i eliminar aquells gens amb una variació mínima entre mostres.

- **Transformació** dels resultats en valors logarítmics per a millorar la distribució de les dades i facilitar l'anàlisi amb estadística paramètrica.

La gran quantitat de dades que generen els experiments de microarrays s'han de "transformar" en coneixement, ja que una llista de gens diferencialment expressats per si sola no ofereix suficient informació biològica i cal anar més lluny per a saber quines implicacions biològiques presenten. Són diverses les eines bioinformàtiques que permeten aquesta interpretació:

- **Gene Ontology (GO):** A partir d'una llista de gens diferencialment expressats entre les dues condicions comparades, es fa un anàlisi estadístic per a identificar les categories ontològiques (processos biològics, funcions moleculars, components cel·lulars) que estan sobre o infrarepresentades en la condició en estudi (Draghici, Khatri et al. 2003).
- **Gene Set Enrichment Analysis (GSEA):** És una alternativa que considera la distribució dels gens diferencialment expressats en la llista completa dels gens representats en l'array. Ordena aquests gens en funció de la seva correlació entre la seva expressió i uns fenotips concrets descrits en bases de dades públiques i permet detectar petits canvis d'expressió gènica en gens que serien omesos en l'anàlisi de gens individual (Subramanian, Tamayo et al. 2005).

Els microarrays d'expressió gènica són una bona eina per a estudiar la biologia molecular del càncer, ara bé, per a obtenir el millor benefici és essencial fer un bon estudi estadístic de les dades que aporta, ja que en considerar tants gens alhora és molt fàcil que petites variacions puguin dur a una mala interpretació dels resultats (Dunning, Curtis et al. 2010).

Per tal de disminuir la complexitat de les dades i aconseguir extreure similituds o diferències entre mostres d'una forma més intuïtiva, es tendeix a utilitzar l'anàlisi d'agrupacions (*Cluster Analysis*) que consisteix en agrupar les mostres en un nombre petit de grups basant-se en relacions de similitud. L'objectiu principal és definir els grups de manera que es minimitzi la variació dins de cada un d'ells al mateix temps que s'intenta maximitzar la variació entre grups diferents.

Es poden trobar dues situacions diferents a l'hora de dur a terme aquesta classificació:

1. **Anàlisi supervisada:** classifica la major part de les mostres basant-se en informació prèvia coneguda. Quan s'aconsegueix la creació d'un bon model, s'utilitza per a predir noves mostres.

2. **Anàlisi no supervisada:** la formació de grups es farà únicament en base a similituds d'expressió entre les mostres (mitjançant distància euclídea) i correlació de l'expressió dels gens de la matriu de dades.

Els resultats de l'agrupació poden ser representats mitjançant un dendograma en forma d'arbre o bé usant un "heat map" on les intensitats de l'expressió estan representades per una gradació de colors (figura I15).

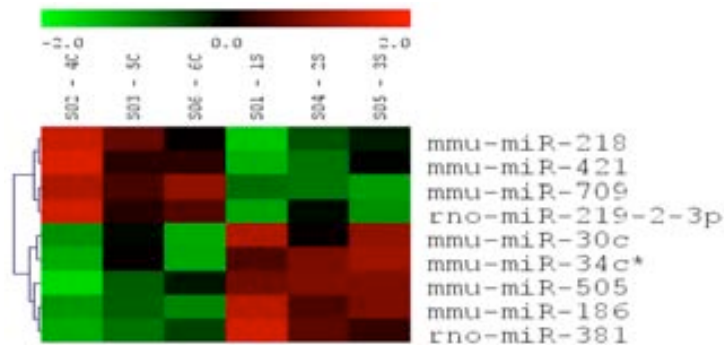


Figura I 15. Exemple de la representació gràfica per dendograma/ heat map d'un anàlisi de microarrays. Els dendogrames són les estructures en forma d'arbre de la part esquerra. Les columnes representen les mostres/pacients, identificats a la part superior de la imatge i els gens es representen en files identificats a la part dreta de la imatge. El color representa el nivell d'expressió del gen, sent vermell una alta expressió i verd, baixa. Els graus d'expressió es representen de manera graduada.

En els cas de l'anàlisi de dades de manera supervisada, són tres les aplicacions principals que se'n poden fer dels resultats dels microarrays en el camp de la biomedicina (Tarca, Romero et al. 2006):

1.-Comparació de classes: Trobar diferències en els valors d'expressió entre dos grups pre-definits de mostres (ex: identificació del gens diferencialment expressats entre teixit normal i teixit tumoral) (Zhang, Zhou et al. 1997).

2.-Predicció de classes: Identificar a quina classe pre-determinada pertany una mostra concreta en funció del seu perfil d'expressió gènica. Requereix de la construcció prèvia d'un classificador capaç de predir la pertinença a un grup en funció del seu perfil d'expressió gènica. Aquest classificador es construeix a partir de mostres de les quals se'n coneix la seva classificació i serà fet servir per estimar la probabilitat de mostres (no incloses en la construcció dels classificador) de pertànyer a un grup o un altre (ex: predir si un pacient farà recurrència o no) (Golub, Slonim et al. 1999).

3.-Descobrimet de classes: Analitza un determinat grup de perfils genètics amb l'objectiu de descobrir subgrups que comparteixin trets comuns. La definició dels subgrups estarà basada en els perfils d'expressió dels gens monitoritzats. Pot ser útil també per a identificar diferents estadiatges o severitats d'una malaltia (ex: els perfils d'expressió de dones amb càncer de mama poden ser analitzats per a identificar subgrups que tinguin un perfil similar i que comparteixin un pronòstic o trets similars) (Alizadeh, Eisen et al. 2000).

4.2.2.-Limitacions de la tècnica

Existeixen diferents mètodes de marcatge i d'hibridació que són dependent, si més no en part, de la plataforma d'hibridació utilitzada. Per altra banda, també existeix una gran variació en la metodologia emprada per a analitzar les dades, tant a nivell de filtratge i de normalització, com a nivell d'obtenció del perfil d'expressió (Dunning, Curtis et al. 2010). Amb l'objectiu de facilitar les comparacions entre estudis, la societat MGED (*Microarray Gene Expression Data*) va desenvolupar uns criteris estandarditzats anomenats MIAME (*Minimal Information About Microarray Experiment*) (Brazma, Hingamp et al. 2001) amb l'objectiu d'homogeneïtzar la informació obtinguda a través d'aquestes anàlisis, la qual recomanen que hauria de ser publicada en una base de dades pública (*GEO* o *ArrayExpress*).

Quan es valoren resultats d'experiments de microarrays hi ha conceptes que s'han de tenir en compte. El límit de detecció o sensibilitat de la tècnica va des de 1 a 10 còpies d'ARNm per cèl·lula, depenent de la tecnologia, del tipus cel·lular, etc. Aquesta sensibilitat pot ser insuficient per a detectar canvis biològicament importants en gens en els que ja es tenen baixos nivells d'expressió com per exemple els factors de transcripció. Quan els experiments de microarrays es duen a terme sota les condicions òptimes, les mesures reflecteixen la magnitud i la direcció dels canvis d'expressió d' aproximadament un 70-90% dels gens. Cal puntualitzar, que la magnitud dels canvis d'expressió observats en els experiments de microarrays és normalment diferent d'aquells mesurats amb d'altres tecnologies com ara la PCR quantitativa a temps real. Un altre concepte a tenir en compte és la reproductibilitat de la tècnica. Entre dues plataformes d'arrays diferents, és possible que els mateixos gens estiguin representats per sondes diferents, dificultant la comparació de les dues anàlisis. A més, un altre problema important és que en molts casos, no totes les sondes s'emparellen perfectament amb el gen diana i per tant poden dur a uns resultats erronis (Dunning, Curtis et al. 2010). Tot i la rellevància dels resultats, la translació de l'anàlisi de microarrays a la pràctica clínica encara no és del tot factible degut a diverses raons: (1) la manca de comparació i la superposició dels resultats obtinguts dels estudis individuals degut a la

variabilitat entre tècniques, entre tipus i preparació de mostres, tipus de plataforma i anàlisi emprats; (2) falta d'estudis de gran escala per falta de pacients disponibles i (3) dificultat per entendre i seleccionar quines dades poden ser informatives i útils per a aplicar-les en la pràctica clínica.(Simon, Radmacher et al. 2003; Simon 2008; Simon 2008).

Malgrat les seves limitacions, bàsicament metodològiques, la tecnologia microarray i concretament la identificació de perfils genètics ha significat un gran avenç en l'estudi del càncer i juntament amb altres tècniques de genòmica i proteòmica, ha permès ampliar el coneixement sobre la naturalesa d'aquesta malaltia i la resistència al tractament que els pacients desenvolupen.

4.3. Aplicacions: desenvolupament de classificadors

Una de les aplicacions més comunes de les dades d'expressió obtingudes dels estudis de microarrays d'expressió gènica és el desenvolupament de classificadors, també anomenats "signatures genètiques". Els classificadors típics dins d'un context clínic són de tipus pronòstic (en funció de com evolucioni la malaltia), predictius (diferències en les respostes al tractament) o ambdós combinats. El procés per a construir un classificador requereix (Dobbin, Zhao et al. 2008) (Simon 2008):

-Selecció dels gens diferencialment expressats entre classes: la quantitat de gens òptima depèn de com de diferent sigui l'expressió entre ambdues classes. Com més siguin les diferències a nivell d'expressió, més fàcil serà trobar un classificador i més probable serà que sigui suficient amb una llista curta de gens.

-Construcció del classificador a partir dels gens seleccionats i d'un conjunt de mostres poblacionals controls (conjunt de dades d'entrenament o *Training Set*) dels quals es coneix la informació referent a pronòstic i/o de resposta al tractament (es coneix a quina classe pertanyen).

-Validació del classificador en els perfils d'expressió gènica d'un subgrup de mostres diferents a les emprades per a la construcció (conjunt de dades de validació o *Validation/Test Set*) però de les quals també es disposa de la mateixa informació clínica. Serveix per avaluar el poder predictiu dels classificadors.

-Validació externa en altres conjunts de dades independents als usats per a la construcció i validació interna del classificador.

El desenvolupament de classificadors genètics per a millorar les decisions terapèutiques en el camp de l'oncologia clínica és una eina que està emergint àmpliament, en particular en el càncer

de mama i en el de còlon, tant a nivell pronòstic com predictiu de resposta al tractament (Nannini, Pantaleo et al. 2009; Colombo, Milanezi et al. 2011) (Kheirleseid, Miller et al. 2013). Els clínics necessiten millorar les tècniques per a la selecció de tractaments individualitzats ja que molts dels tractaments aplicats només beneficien a una minoria de pacients als qual se'ls administra. Ser capaços de predir quins pacients són més propensos a beneficiar-se del tractament, no només salvaria a molts pacients d'una toxicitat innecessària sinó que també ajudaria a saber quins fàrmacs els hi poden ser més beneficiosos i disminuiria les despeses que suposa el sobre tractament (Simon 2005). Un "retrat molecular" per a cada pacient podria permetre escollir la teràpia més efectiva de totes les existents fent que el tractament del càncer pogués esdevenir personalitzat. No obstant, les dades actuals referents a aquest tema són encara insuficients per a poder-ho aplicar a la pràctica clínica.

El tipus de càncer més estudiat amb la tecnologia dels microarrays és el càncer de mama {Cancer Genome Atlas Network, 2012 #297}. L'any 2000, 65 adenocarcinomes de mama van ser separats en subtipus segons el "retrat molecular" donat pels diferents patrons d'expressió gènica que presentaven (Perou, Sorlie et al. 2000). Posteriorment, es va trobar una correlació entre aquests subtipus i l'evolució clínica, suggerint que els patrons d'expressió gènica dels tumors donaven informació tant taxonòmica com de pronòstic (Sorlie, Perou et al. 2001). Altres estudis de descobriment de classes han demostrat que hi ha signatures genètiques capaces de discriminar els tumors de mama en funció del tipus histològic, l'estat del receptor d'estrògens i l'estat dels ganglis limfàtics (West, Blanchette et al. 2001; Zhao, Langerod et al. 2004). Els estudis de predicció de classes també han permès relacionar l'expressió gènica i el pronòstic (van 't Veer, Dai et al. 2002) (van de Vijver, He et al. 2002) i fins i tot s'ha trobat en alguns casos que poden servir per a predir la resposta al tractament (Dressman, Hans et al. 2006). Altres tumors també han estat investigats amb la tecnologia dels microarrays per a predir pronòstic com és el cas del càncer gàstric (Cho, Lim et al. 2011), de fetge (Kim, Leem et al. 2011) i de pulmó (Zhu, Ding et al. 2010; Chen, Hsu et al. 2011). El càncer colorectal (CCR) també és un dels tumors sòlids sobre els que més estudis d'expressió gènica s'han fet però seran mencionats posteriorment en l'apartat corresponent al càncer colorectal.

4.4. Perfils d'expressió gènica de l'estroma tumoral

Fins fa poc el tumor primari era la principal font d'informació en el camp dels perfils genètics, no obstant, no cal oblidar que el microambient tumoral està directament relacionat en tot el procés tumoral i pot influenciar i reflectir molts dels trets biològics que es donen en el tumor. De fet, aquesta interacció entre el tumor i el microambient de l'hoste podria en part explicar la diferent progressió i quimiosensibilitat de la mateixa malaltia en els diferents pacients.

Mentre que en els estudis inicials l'interès principal de l'anàlisi dels microarrays estava focalitzat en l'avaluació i comprensió de l'expressió gènica de la cèl·lula cancerosa com a entitat aïllada de la resta de tipus cel·lulars (considerats elements "contaminants"); en l'actualitat, la rellevància del microambient en l'evolució i característiques del tumor ha fet que siguin nombrosos els estudis d'expressió gènica que s'han centrat en aquest compartiment per entendre millor el comportament tumoral en termes de pronòstic i predicció de resposta al tractament (Vera-Ramirez, Sanchez-Rovira et al. 2010). La importància de l'estroma en tumors sòlids, com és el cas del càncer de mama, ha fet que siguin molts els estudis d'expressió gènica que s'han focalitzat en el seu microambient tumoral.

En un estudi inicial, el grup de West R.B (West, Nuyten et al. 2005), hipotetitzaven que dins d'un grup particular de tumors, els tumors de teixit tou (no-epitelials) o "soft tissue tumors" havien d'existir diferents patrons de reaccions estromals que podien afectar al creixement del tumor de diferents maneres. Van identificar un conjunt de gens diferencialment expressats entre dos tipus de tumors fibroblàstics, el **SFT** ("Solitary Fibrous tumor"): tipus de tumor mesenquimal originat en la pleura o en altre teixit tou generalment de tipus benigne; i el **DFT** (Desmoid-type fibromatosis): sobrecreixement invasiu del teixit fibrós principalment localitzat a la zona muscular i de mal pronòstic; que eren capaços d'identificar diferents patrons de reacció estromal en el càncer de mama. L'expressió dels gens específics de cada subtipus analitzada en una base de dades pública, va mostrar que els tumors es podien classificar en dos grups en funció de l'enriquiment de gens de SFT o de DFT i que a més s'associaven amb un comportament clínic diferent. Posteriorment van identificar un subgrup de gens representats en la signatura dels DFT que es trobaven expressats de manera coordinada i que estaven significativament associats a un millor pronòstic en un determinat tipus de càncer de mama (Beck, Espinosa et al. 2008).

Més endavant, i també centrats en l'estroma del càncer de mama, el grup de Finak (Finak, Bertos et al. 2008) suggeria que els canvis en l'estroma podien tenir un paper molt important en la progressió tumoral i en les conseqüències clíniques. En aquest cas van usar la tecnologia de

microdissecció de captura làser o LCM (*"Laser capture microdissection"*) per aïllar cèl·lules estromals del tumor i del compartiment normal en tumors primaris de mama per a comparar la seva expressió gènica. La signatura obtinguda, denominada **SDPP** (*"Stroma-derived prognostic predictor"*) i aplicada en un seguit de bases de dades públiques, classificava els tumors en 3 subtipus diferents en funció del seu pronòstic, a més millorava la capacitat pronostica d'altres predictors genètics quan es combinaven. Els resultats suggerien que els canvis produïts en l'estroma del càncer de mama tenien un paper molt important en la progressió de la malaltia.

Les signatures estromals no només han servit per a classificar els tumors segons la seva agressivitat, sinó que també s'han identificat signatures amb capacitat per a predir la resposta als tractaments quimioteràpics (Farmer, Bonnefoi et al. 2009) i en altres tipus de càncers com el gàstric (Saadi, Shannon et al. 2010), el de pròstata (Jia, Rahmatpanah et al. 2012) o el de fetge (Gao, Wang et al. 2011).

4.4.1.-Signatures específiques de CAFs

La connexió que existeix entre els fibroblasts associats a carcinoma i un procés de curació de ferides va fer que al 2004 el grup de *Chang HY* explorés si existia algun programa d'expressió genètica comú entre ambdós processos i que es pogués relacionar amb implicacions clíniques. El perfil genètic obtingut d'uns fibroblasts aïllats en cultiu i estimulats o no amb sèrum (per simular les condicions fisiològiques enfront una ferida), mostrava una resposta genètica comuna que incloïa un grup de gens d'expressió coordinada (induïda o reprimida) i que era independent de l'origen dels fibroblasts. Aquest grup de gens d'expressió coordinada va ser anomenat nucli de resposta a sèrum o CSR (*"core serum response"*) i es va fer servir per explorar la possible relació d'aquesta signatura amb dades públiques d'expressió gènica de tumors humans. Els resultats mostraren que els gens d'aquesta signatura CSR estaven induïts en la majoria de tumors (però no ens els seus teixits normals) i que a més proporcionava una informació de pronòstic molt valuosa, fins i tot en estadis inicials del tumor (Chang, Sneddon et al. 2004).

La creixent importància de la contribució de l'estroma, i principalment dels fibroblasts associats a carcinoma en el procés tumoral, s'ha vist reforçada per una àmplia varietat d'estudis que han demostrat perfils genètics diferencials entre els CAFs i els seus corresponents fibroblasts normals en el teixit adjacent. Molts d'aquests estudis han estat realitzats també en càncer de mama, per exemple, en el grup de Singer compararen els perfils genètics dels fibroblasts estromals de 10 dones amb càncer de mama invasiu, amb els fibroblasts estromals del teixit de mama normal

d'altres 10 dones, demostrant en els CAFs un increment en l'expressió de gens associats amb la promoció del tumor (Singer, Gschwantler-Kaulich et al. 2008). Altres treballs posteriors similars han permès identificar gens diferencialment expressats entre ambdues poblacions i principalment relacionats amb senyalització paracrina o intracel·lular, matriu extracel·lular i adhesió/migració (Bauer, Su et al. 2010) (Peng, Zhao et al. 2013); i fins i tot relacionar-los amb diferents subtipus de càncer de mama (Tchou, Kossenkov et al. 2012). En càncer de pulmó, no només han demostrat perfils genètics diferencials entre els fibroblasts associats a carcinoma i els seus corresponents normals, sinó que a més han definit una signatura associada amb pronòstic en múltiples bases de dades independents (Navab, Strumpf et al. 2011). Estudis similars s'han dut a terme també en altres tipus de càncers (Lim, Cirillo et al. 2011; Costea, Hills et al. 2013).

5. MODEL D'ESTUDI: Càncer de còlon

5.1. Generalitats del càncer de còlon

El càncer colorectal (CCR) és un dels càncers amb major incidència a nivell mundial. Segons les dades més recents del projecte GLOBOCAN, el càncer colorectal, amb més de 1,2 milions de casos nous anualment, és el tercer tipus de tumor més freqüent a nivell mundial sent responsable de més de 600.000 morts anuals i convertint-se en la quarta causa de mort per càncer. Gairebé el 60% d'aquests casos es dona en països desenvolupats, el que el converteix en un problema de salut pública de gran importància (www.iarc.fr); i amb un increment anual de la incidència del 2,6%, la tendència d'aparició s'ha duplicat en els darrers 10 anys (www.isciii.es).

La supervivència global a 5 anys després de la resecció del tumor varia en funció de l'estadi en el que es detecta, sent aproximadament del 93 % en els estadis I, d'un 80% en estadis II i arribant a al 60% en els estadis III si no s'administra tractament adjuvant (O'Connell, Maggard et al. 2004). Dels càncers localitzats inicialment, s'estima que entre un 30 i 60% desenvoluparan metàstasis, sent la supervivència als 5 anys de la malaltia metastàtica no superior al 10% (Cunningham, Atkin et al. 2010) (Weitz, Koch et al. 2005). La recaiguda després de la cirurgia en la malaltia localitzada es dona al voltant dels 3 anys i el temps fins a la progressió del tumor en els malalts metastàtics es troba al voltant dels 10 mesos. Amb l'administració dels nous fàrmacs contra una diana dirigida, més la quimioteràpia convencional, és possible assolir "medianes" de supervivència global que poden arribar fins als 20 mesos (Hurwitz, Fehrenbacher et al. 2004; Tournigand, Andre et al. 2004). El major problema del càncer de còlon és la seva capacitat per a formar tumors secundaris, principalment en fetge i pulmó. Basats en diferents estudis, el 20% de pacients presenten

metàstasi sincrònica en el moment de la identificació del tumor primari, i més del 30% desenvolupen metàstasi metacrònica durant la progressió de la malaltia (Mejia, Schulz et al. 2012).

5.2. Carcinogènesi i bases moleculars

El CCR progressa de manera seqüencial des de simples lesions de les criptes colòniques en el teixit epitelial, passant per petits tumors benignes (pòlips adenomatosos), fins a generar carcinomes malignes amb la capacitat d'envair altres teixits. El càncer de còlon es desenvolupa com una progressió guiada de múltiples etapes en què la cèl·lula normal es transformarà en neoplàsica i, encara que existeixi una seqüència de patogènesi preferent, serà l'acumulació de mutacions genètiques (entre 5 i 9) i alteracions cromosòmiques les que finalment donaran el fenotip de la cèl·lula tumoral (Cunningham, Atkin et al. 2010) (Perea, Lomas et al. 2011). La idea inicial de carcinogènesi la van aportar Fearon i Vogelstein proposant un model genètic per explicar la neoplàsia colorectal: (Fearon and Vogelstein 1990):

- Els tumors colorectals apareixen com a resultat de l'activació d'oncògens juntament amb la inactivació de gens supressors tumorals.
- Són necessàries com a mínim mutacions en 4 o 5 gens per a desenvolupar un tumor maligne.
- Les propietats del tumor depenen del total d'alteracions acumulades més que de l'ordre en què es van adquirir.
- En alguns casos, mutacions en heterozigosi de determinats gens supressors de tumors, són suficients per a donar efectes fenotípics.

Les alteracions genètiques/epigenètiques que poden dur a l'aparició d'un CCR es poden dividir en 3 subcategories (Markowitz and Bertagnolli 2009; Perea, Lomas et al. 2011; Armaghany, Wilson et al. 2012) que no són mútuament excloents:

Inestabilitat Cromosòmica (CIN):

És el mecanisme més comú que duu al desenvolupament del CCR i que es dona en un 80-85% dels casos (Grady and Carethers 2008). Implica canvis globals en el nombre de cromosomes (aneuploïdia), acompanyat amb pèrdua d'heterozigositat o LOH (pèrdua de part d'un cromosoma). Juntament amb els canvis cariotípics, en els genomes de CCR postitius per CIN també es troben mutacions específiques que poden afectar vies molt importants en la patogènesi del CCR.

Els gens supressors tumorals més freqüentment mutats són el gen *APC* (codifica per una proteïna reguladora de la via de senyalització de Wnt/ β -catenina i del citoesquelet) (Phelps, Broadbent et al. 2009); el gen *TP53*, regulador transcripcional i de resposta cel·lular a l'estrès (Zuckerman, Wolyniec et al. 2009); i tres gens localitzats en el braç llarg del cromosoma 18 (*SMAD4*, *SMAD2* i *DCC*) que s'afecten principalment per la pèrdua al·lèlica d'aquesta regió..

Entre els oncògens més comunament mutats es troben el *CTNNB1*, que codifica per la proteïna β -catenina i que té un paper molt important en la tumorigenesis del CCR (White, Chien et al. 2011); i *KRAS* i *PIK3CA*, amb un paper molt important en supervivència i proliferació cel·lular (Samuels and Waldman 2010).

Inestabilitat de Microsatèl·lits (MSI):

Es dona en un 10-15% dels CCR i la seva principal causa és la inactivació dels mecanismes de reparació dels danys en l'ADN o gens de la via de reparació de mals aparellaments o MMR ("*Mismatch Repair*") que s'encarrega de reparar canvis en l'ADN (per errors en la replicació) i mantenir-ne la seva integritat (Soreide, Janssen et al. 2006). Les proteïnes més importants d'aquesta via són *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* i *MSH6*. La inactivació de la via de reparació MMR per mutacions (en el cas de càncer hereditari o síndrome de Lynch) o per silenciament epigenètic de *MLH1* (càncer esporàdic) implica canvis en la llargada dels microsatèl·lits (regions amb repeticions de nucleòtids que es troben en molts gens) que sol produir mutacions somàtiques en els gens presents en aquestes regions. Els gens més freqüentment afectats són *PTEN*, *BAX* i *TGFBR1/2* (Iacopetta, Grieu et al. 2010). En funció del nombre de microsatèl·lits marcadors afectats, els CCR amb inestabilitat de microstatèl·lits es poden classificar en MSI-H ("*high*") quan tenen inestabilitat en com a mínim 2 dels 5 microsatèl·lits, o MSI-L ("*low*") quan present inestabilitat en menys de 2 marcadors.

Fenotip metilador de les illes CpG (CIMP):

La seva freqüència varia entre el 12-25% dels CCR (Samowitz, Albertsen et al. 2005) i es caracteritza per una metilació aberrant en les illes CpG de l'ADN (Issa 2004). Les illes CpG són regions riques en citosines i guanines que es troben situades en les regions promotores o en el primer exó en un 70% dels gens humans i que normalment no es troben metilades (Saxonov, Berg et al. 2006). En el carcinoma colorectal (comparat amb el teixit normal), aproximadament un 5% dels gens presenten una metilació aberrant en illes CpG (Schuebel, Chen et al. 2007). En funció de la quantitat de promotors metilats, es poden subdividir els tumors en CIMP-alt, CIMP-baix i CIMP-

El tractament quimioteràpic més comú usat en el CCR està basat en el 5-fluorouracil (5-FU) (generalment en combinació amb leucovorin), derivats actius platinats (oxaliplatí), i irinotecan (un inhibidor de l'enzim nuclear *Topoisomerasa I*) (Ismaili 2011).

L'ampli espectre de quimioteràpics ha estat recentment ampliat amb la possibilitat de tractament amb anticossos monoclonals com cetuximab i panitumumab, que van dirigits i bloquegen el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) aturant la cascada de senyalització important per al creixement i divisió de les cèl·lules tumorals i que han estat aprovats per les diferents agències reguladores sanitàries en malalties metastàtiques (Ng and Zhu 2008; Okamoto 2009).

Tot i que els paràmetres clínics tradicionals d'estadiatge són la principal eina de decisió terapèutica, no semblen ser del tot suficients per a discriminar pacients de CCR amb millor o pitjor pronòstic ja que en molts casos les respostes al tractament no son satisfactòries.

Mentre que en pacients amb càncer de còlon estadi III la quimioteràpia adjuvant és el tractament estàndard per excel·lència, el paper de la quimioteràpia en l'estadi II encara és controvertit. Així i tot, s'ha definit un subgrup de pacients que presenten un risc incrementat de recidiva. Aquest subgrup es caracteritza per presentar un càncer de còlon amb diferents característiques clínico-patològiques: perforació, obstrucció, pT4, histologia poc diferenciada, < 12 nòduls limfàtics ressecats, invasió vascular (Benson, Schrag et al. 2004).

En els últims anys, el coneixement de la biologia del càncer colorrectal ha permès avaluar diferents factors moleculars com a potencials marcadors pronòstics o predictius de resposta al tractament. Entre aquests destaca la inestabilitat de microsatèl·lits, un dels paràmetres moleculars que ha estat relacionat amb supervivència en càncer de còlon estadi II en estudis retrospectius i estudis associats a assajos clínics fase III (Roth, Delorenzi et al. 2012) (Guastadisegni, Colafranceschi et al. 2010).

5.4. Factors pronòstics i predictius

Els factors pronòstics són aquells que determinen l'evolució natural de la malaltia independentment del tractament, mentre que els factors predictius proporcionen informació sobre la resposta al tractament. Tot i que l'estadiatge en el moment del diagnòstic és el factor pronòstic més important en el CCR, és un fet que tumors histològicament idèntics poden presentar diferents pronòstics així com diferent resposta als fàrmacs, fent-se més evident la necessitat de trobar nous marcadors pronòstics i predictius.

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

2

DNA Marker	Comments
Prognostic	
APC	A germ-line mutation defines the colorectal-cancer predisposition syndrome, familial adenomatous polyposis, with an 80 to 100% lifetime risk of colorectal cancer. Patients with germ-line APC mutations undergo prophylactic colectomy or proctocolectomy.
MLH1, MSH2, MSH6	A germ-line mutation in these and, less commonly, in other mismatch-repair genes defines hereditary non-polyposis colon cancer, with a 40 to 80% lifetime risk of colorectal cancer, as well as an increased risk of endometrial cancer. Patients with germ-line mismatch-repair gene mutations undergo frequent colonoscopic surveillance and may be considered for prophylactic colectomy and hysterectomy.
MLH1 methylation-associated silencing	The somatic inactivation of MLH1 in primary colorectal cancers is evidenced by either detection of DNA microsatellite instability or loss of tumor MLH1 protein expression on immunohistochemical analysis, and is more frequent in early-stage colorectal cancers than in advanced disease. Such inactivation may be a marker of more indolent disease or a better prognosis in the absence of adjuvant chemotherapy. ^{104,104}
18q Loss of heterozygosity	The somatic loss of heterozygosity at chromosomal location 18q, a site containing genes associated with colorectal cancer (e.g., SMAD4 and SMAD2), is associated with a poorer outcome in patients with stage II or stage III colon cancer than that in patients with tumors retaining both parental alleles at 18q. ¹⁰⁵
Predictive	
KRAS	The somatic mutation produces unrestricted activity of signaling through the MAPK and PI3K cascades. Patients with stage IV colorectal cancer and activating mutations in KRAS do not have a response to EGFR-inhibitor therapy. ⁹³⁻⁹⁴
BRAF V600E	The somatic mutation activating this kinase causes unrestricted MAPK pathway signaling. Patients with stage IV colorectal cancer and the activating BRAF V600E mutation do not have a response to EGFR-inhibitor therapy. ⁹⁴
MLH1 methylation-associated silencing	The loss of the mismatch-repair function contributes to the loss of other tumor suppressors (e.g., TGFBR2 and BAX). Patients with mismatch-repair-deficient tumors may not have a response to fluorouracil and may have an improved response to irinotecan-containing regimens. ^{106,107}

21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 9

El percentatge d'estroma intratumoral en pacients amb càncer colorectal també ha emergit recentment com a factor pronòstic independent de la resta de factors mencionats, ja que diversos estudis han demostrat que un alt percentatge d'estroma intra-tumoral prediu un pitjor pronòstic en pacients amb CCR (Mesker, Liefers et al. 2009; Huijbers, Tollenaar et al. 2012). Un paràmetre que també va ser avaluat en càncer de mama i d'esòfag (Courrech Staal, Wouters et al. 2010; de Kruijf, van Nes et al. 2010) emergint com a un factor pronòstic addicional.

L'elevada heterogeneïtat del càncer colorectal fa que els factors pronòstics i predictius actuals no siguin suficients per a pronosticar i determinar un bon tractament per aquest tipus de tumor. La gran diversitat de vies moleculars que poden estar alterades en la seva patologia, així com la contribució dels factors no-tumorals (microambient estromal) en la progressió i evolució del càncer fan necessari un coneixement més exhaustiu d'aquesta patologia.

Els perfils d'expressió gènica semblen una bona eina per a determinar grups de gens diferencialment expressats en grups de pacients amb diferents evolucions clíniques.

5.5. Classificadors d'expressió gènica descrits

El càncer colorectal és un dels tumors sòlids més ben estudiats usant la tecnologia dels microarrays i això és degut a diversos motius:

- És considerat com un bon model biològic de tumorigènesis perquè la seva progressió clínica d'adenoma a carcinoma d'estadi inicial i a carcinoma d'estadi avançat, sembla donar-se paral·lelament a les diferents alteracions moleculars.
- Els paràmetres clínics i patològics tradicionals no són suficients per a discriminar del tot els pacients d'alt i baix risc.
- Una àmplia varietat de fàrmacs citotòxics estan sent usats en la pràctica clínica diària, però fins al moment l'ús de marcadors moleculars amb valor predictiu de resposta al tractament és controvertit.

Les aplicacions clíniques de la tecnologia dels microarrays en el CCR es poden subdividir en (1) estudis del procés de la carcinogènesi i classificació molecular, (2) estudis per a la predicció de prognosi i (3) estudis per a la predicció de resposta al tractament (Nannini, Pantaleo et al. 2009) (taula I4).

L'avaluació del perfil molecular del CCR ha estat, i continua sent, un dels principals objectius de la tecnologia dels microarrays amb la finalitat d'identificar patrons moleculars comuns que en permetin la seva classificació i serveixin per a predir el pronòstic en els diferents estadiatges. Tot i que són molts els estudis ja descrits per a la classificació molecular del CCR (*Nannini, Pantaleo et al. 2009*), el nombre de classificadors ha augmentat considerablement en els últims anys.

Àmbit de recerca	Objectiu de l'estudi	Disseny de l'estudi
Procés de Carcinogènesi	- Identificació d'alteracions en l'expressió gènica d'acord amb el desenvolupament del tumor. - Classificació Molecular	Comparació de classes - Entre mucosa colònica normal, adenoma i carcinomes - Tumors primaris i metastasis - Tumors del lateral dret o esquerre
Predicció de pronòstic	-Identificació d'alteracions en l'expressió gènica relacionades amb l'estadi del tumor - Identificació de patrons d'expressió associats amb potencial metastàtic del tumor primari - Estratificació molecular en funció de l'evolució clínica.	Comparació de classes -Comparació entre tumors primaris de diferents estadiatges, metastàtics i no metastàtics i tumors primaris vs metastasi. ↓ Predicció de classes Anàlisi supervisat
Predicció de resposta al tractament	-Identificació de patrons d'expressió gènica relacionats amb la resposta al tractament.	Comparació de classes Comparació entre responedors i no responedors ↓ Predicció de classes Anàlisi supervisat

Taula I. 4. Aplicacions clíniques de la tecnologia de micrarrays en el cancer colorectal. Taula adaptada de *Nannini et al. Cancer Treat Rev, 2009.* (Nannini, Pantaleo et al. 2009)

Basant-se en una classificació no supervisada de 326 mostres de càncer de còlon, el grup de Loboda *et al.* (Loboda, Nebozhyn et al. 2011) va descriure una signatura basada en gens de transició epitelial mesènquima (TEM) que separava els tumors en dues grans subpoblacions: epitelilals vs mesenquimals, i que a més era capaç de predir la recurrència i el pronòstic tant en estadis II com III. Aquesta classificació segons TEM també va ser descrita en un altre grup que a més els subdividia amb 5 subtipus diferents que tenien uns perfils que es veien ben representats en un panell de diferents línies cel·lulars (Schlicker, Beran et al. 2012). Seguint la mateixa metodologia d'agrupament no supervisat, 4 subtipus tumorals amb característiques biològiques i clíniques diferents van ser identificats: subtipus d'alt estroma, subtipus de baix estroma, subtipus mucinós i subtipus relacionat amb les immunoglobulines; sense mostrar correlació amb els estadis histopatològics però sí amb trets clinicopatològics i temps de supervivència (Perez-Villamil, Romera-Lopez et al. 2012). Altres subtipus identificats per Oh *et al.* mostren diferències en supervivència en resposta a quimioteràpia (Oh, Park et al. 2012). Nous subtipus i classificacions

moleculares han estat descrites recentment i han estat també associades amb pronòstic i resposta al tractament (Budinska, Popovici et al. 2013; De Sousa, Wang et al. 2013) (Sadanandam, Lyssiotis et al. 2013).

La classificació molecular és necessària per a una millor identificació dels pacients d'alt risc amb CCR i que requereixen uns tractaments més agressius i un seguiment més exhaustiu. Ja que el comportament biològic agressiu d'un tumor pot estar relacionat amb el seu perfil genètic, es raonable assumir que les signatures de pronòstic específiques poden proporcionar informació útil per a tal efecte. Un dels principals paradigmes en el càncer colorectal és la estratificació de risc en pacients en estadi II i III i el seu conseqüent tractament amb quimioteràpia. En la pràctica clínica, els marcadors clínics i patològics només són capaços d'identificar una petita part d'aquells pacients d'estadi II que tenen un alt risc de recurrència després de la resecció quirúrgica. En la última dècada, nombrosos esforços han estat realitzats per tal d'identificar nous marcadors moleculares capaços de discriminar entre els pacients de baix i alt risc d'una manera més individualitzada i mitjançant la identificació de perfils d'expressió gènica. Al 2004, es va identificar una signatura de 23 gens que era capaç de predir la recurrència en els pacients d'estadi II amb bon poder predictiu (78%) (Wang, Jatkoe et al. 2004). D'altres estudis s'han centrat en trobar bons marcadors pronòstics capaços de discriminar bon i mal pronòstic en pacients en estadi II-III (Barrier, Lemoine et al. 2005) i d'altres en trobar patrons d'expressió específica per a poder predir el potencial metastàtic en un tumor primari (Bertucci, Salas et al. 2004) (D'Arrigo, Belluco et al. 2005). Una revisió feta al 2009 (Lu, Salpeter et al. 2009) demostrava el potencial predictiu de pronòstic dels perfils d'expressió gènica en pacients de CCR d'estadi II fent un meta-anàlisi amb les dades de 8 estudis diferents i una cohort de 271 pacients. Tot i que els resultats demostraren el potencial que tenen els perfils d'expressió gènica per a predir el pronòstic, un dels principals problemes fou la manca de solapament entre els gens identificats en els diferents estudis. El grup de Lascorz va fer servir la informació de 23 perfils d'expressió gènica per tal d'identificar, mitjançant diverses eines bioinformàtiques, processos biològics i vies cel·lulars comunes representades en els perfils d'expressió estudiats (Lascorz, Chen et al. 2011). Posteriorment, el grup de O'Connell (O'Connell, Lavery et al. 2010) basant-se en la tècnica de la reacció en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a temps real, va dur a terme un estudi d'expressió gènica en pacients de CCR d'estadis II - III tractats només amb cirurgia o amb cirurgia més quimioteràpia adjuvant. De 48 gens inicials extrets d'una combinació d'estudis, foren 7 els identificats com a bons predictors de pronòstic en aquests tipus de pacients, passant a formar part d'un test diagnòstic validat i disponible comercialment, l'*Oncotype DX® Colon Cancer Assay* (Clark-Langone, Sangli et al. 2010);

Webber, Lin et al. 2010). Altres classificadors predictius de pronòstic han estat descrits posteriorment com *ColoPrint* (millora la predicció de risc en pacients en estadis primerencs) (Salazar, Roepman et al. 2010),, o el *ColoGuideEx* (especifica per estadis II) (Agesen, Sveen et al. 2012), i el *ColoGuidePro* (amb més potencial pronòstic en estadis III) (Sveen, Agesen et al. 2012).

L'aplicabilitat clínica de moltes d'aquestes signatures de pronòstic i la seva capacitat de predicció, va ser avaluada per eines estadístiques en diferents grups de dades independents i disponibles en bases de dades públiques, conclouent que són necessàries millors estratègies per a la validació externa de moltes de les signatures genètiques descrites (Sanz-Pamplona, Berenguer et al. 2012).

Tot i l'àmplia aplicabilitat dels perfils d'expressió gènica en diagnòstic, classificació i pronòstic, l'ús per a predir la resposta al tractament encara no està ben definit ja que la majoria de signatures han estat derivades de línies cel·lulars (Arango, Wilson et al. 2004; Shimizu, Ishikawa et al. 2005) i la seva utilitat en pacients és controvertida. Són pocs els estudis que es centren en perfils d'expressió gènica de pacients (Del Rio, Molina et al. 2007) i és que obtenir signatures capaces de predir la resposta a un tractament és més complicat (Borst, 2010 #195).

Contràriament, encara que la metàstasi hepàtica es presenta com la principal causa de mort en els pacients amb càncer colorectal, poc es coneix respecte els mecanismes moleculars i cel·lulars responsables, i pocs són els estudis d'expressió gènica que s'han centrat en la comparació entre tumors primaris i metàstasis. Tot i així, s'han fet diverses aproximacions per a identificar signatures metastàtiques mitjançant la tecnologia dels microarrays d'expressió (Nadal, Maurel et al. 2007):

- Comparar perfils transcripcionals entre tumors primaris (amb i sense metàstasi) (Bertucci, Salas et al. 2004).
- Comparar expressió gènica del tumor primari amb la seva metàstasi aparellada (D'Arrigo, Belluco et al. 2005).
- Comparar perfils d'expressió en línies cel·lulars de càncer colorectal amb diferent potencial metastàtic (Hegde, Qi et al. 2001).

L'heterogeneïtat molecular que presenta el càncer colorectal és una de les principals raons per les quals és tan difícil unificar perfils moleculars capaços d'explicar la biologia i el comportament de la malaltia en els diferents pacients.

5.6. Perfil genètic de l'estroma en el càncer colorectal

Tot i la importància de l'estroma tumoral en el càncer de còlon, la informació a nivell d'expressió gènica dels seus components no és molt àmplia. Com ja s'ha esmentat anteriorment, són molts els

estudis que s'han centrat en les diferències funcionals entre els fibroblasts associats a carcinoma i els seus corresponents normals en molts tipus de tumor; no obstant, en el càncer de còlon aquesta informació és més escassa, sent pocs els treballs al respecte.

Una dècada enrere, el perfil genètic dels fibroblasts associats a carcinoma en la metastasi hepàtica va ser comparada amb la de fibroblasts més allunyats de la lesió metastàtica i fibroblasts de la pell. Van descriure un perfil d'expressió clarament diferenciat en els fibroblasts associats a carcinoma en la metastasi hepàtica que estava caracteritzat per l'expressió de gens implicats en remodelació de la matriu extracel·lular, angiogènesi i promotors del creixement i confirmaven que els fibroblasts formaven un microambient favorable per a les cèl·lules canceroses (Nakagawa, Liyanarachchi et al. 2004). En un estudi més recent, el grup de E.Batlle descriu com els alts nivells de TGF β secretats per les cèl·lules tumorals (que tenen la via de TGF β inactivada) són capaços d'estimular el seu microambient estromal, principalment els CAFs, que al seu torn incrementen l'eficiència de les cèl·lules tumorals per a colonitzar els diferents òrgans en induir un programa pro-metastàtic que confereix un avantatge a les cèl·lules metastàtiques (Calon, Espinet et al. 2012).

Més recentment, el grup de C.Peña ha demostrat com la heterogeneïtat dels fibroblasts associats a carcinoma en el càncer de còlon, no només es manifesta a nivell fenotípic repercutint de manera diferencial sobre l'agressivitat de les cèl·lules canceroses; sinó que també presenta una signatura genètica en els CAFs que permet classificar els pacients de càncer de còlon en alt o baix risc de recurrència (Herrera, Islam et al. 2013).

Tots aquests estudis reporten com d'importants són els fibroblasts associats a carcinoma en el marc del càncer colorectal i la seva progressió. Conèixer quines són les vies moleculars implicades entre la comunicació que s'estableix entre ambdós tipus cel·lulars pot ajudar a entendre millor els processos implicats en l'evolució del tumor, així com també pot identificar noves possibles dianes terapèutiques, ja que el trencament de la comunicació entre el tumor i el seu estroma pot ser clau per evitar la recurrència o fins i tot la metastasi. Inclús la heterogeneïtat dins de la població dels fibroblasts associats a carcinoma ens pot permetre classificar als pacients segons el seu risc de recurrència afegint-se com a marcador pronòstic addicional i contribuint en les decisions clíniques.

HIPÒTESI I OBJECTIUS

HIPÒTESI I OBJECTIUS

Els punts generals en els que es fonamenta el present treball són els següents:

- La influència del microambient en l'evolució i progressió del tumor, i la seva implicació en el pronòstic de molts tipus de tumors sòlids que es presenten amb un alt grau de desmoplàsia com els de mama, pulmó, pròstata i còlon.
- Importància dels fibroblasts, components majoritaris de l'estroma tumoral i responsables de processos d'iniciació, progressió i metàstasi; així com també involucrats en fenòmens de resistència a tractaments.
- Tipus cel·lular amb un origen controvertit, però la seva transformació a partir dels fibroblasts locals normals n'és la principal font. Conèixer els canvis que es donen a nivell genètic en aquesta transformació pot ajudar a entendre les diferències fenotípiques i pot permetre identificar biomarcadors moleculars que poden ser emprats com a possibles dianes terapèutiques..
- La tecnologia de microarrays permet l'anàlisi de multitud de gens de manera simultània i té una gran potencialitat com a eina de determinació de nous marcadors entre dues poblacions diferents de fibroblasts, en aquest cas els normals respecte els associats a carcinoma en el tumor primari i en la metàstasi hepàtica.

De manera més específica, els punts en els que es centra són:

1. Durant el procés tumoral, la cèl·lula cancerígena es va trobant amb diferents microambients als quals s'ha d'enfrontar i adaptar per a poder continuar amb la tumorigènesi. En el cas del càncer colorectal aquests microambients són:
 - a. Mucosa colònica normal: on la cèl·lula epitelial esdevé tumorigènica i comença a patir canvis genètics i fenotípics que al seu torn modifiquen l'estroma en el qual es troba.
 - b. Tumor primari: la proliferació descontrolada de les cèl·lules tumorals fan que envaeixin els teixits adjacents alterant el comportament de l'estroma circumdant i repercutint en la pròpia cèl·lula tumoral.
 - c. Metàstasi hepàtica: Un petit percentatge de cèl·lules tumorals són capaces d'envair òrgans distants i establir-se en un nou microambient originant nous tumors.

2. Les diferències funcionals i genètiques entre els fibroblasts els identifica com un tipus cel·lular molt heterogeni, tant en un mateix individu com entre individus diferents. La seva caracterització a nivell genètic i la determinació de marcadors específics és un dels reptes més importants al voltant d'aquest tipus cel·lular.
 - a. L'ús de mostres aparellades de fibroblasts de la mucosa colònica adjacent al tumor i dels fibroblasts associats a tumor primari, pot permetre la identificació de marcadors moleculars diferencials entre ambdues subpoblacions dins d'un mateix individu.
 - b. Identificar marcadors moleculars més específics i els canvis transcripcionals que s'esdevenen, poden ajudar a esbrinar mecanismes implicats en l'activació dels fibroblasts no tumorals o a diferenciar entre els fibroblasts activats de diferents localitzacions i diverses funcionalitats.
3. El procés de tumorigènesis no només depèn de la cèl·lula tumoral sinó que també es veu influenciat pel canvis esdevinguts en el microambient estromal que l'envolta i l'acompanya. Els fibroblasts en són els components majoritaris, i en els tumors sòlids com el de còlon la seva influència és molt rellevant.
 - a. L'estroma tumoral ha demostrat tenir un valor pronòstic en altres tipus de tumors com el de mama, pulmó i pròstata, tots ells caracteritzats per un alt grau de desmoplàsia.
 - b. Sent els fibroblasts els principals constituents d'aquest estroma, la seva caracterització molecular i genètica pot proporcionar informació addicional sobre el pronòstic de la malaltia.
 - c. En el cas del càncer colorectal, nous factors pronòstics són necessaris per a millorar les decisions clíniques que envolten a un grup determinat de pacients d'estadi II i III.

HIPÒTESI

El perfil d'expressió dels fibroblasts associats a carcinoma és útil per pronosticar la supervivència dels pacients afectats de carcinoma colorectal estadis II/III, i és una eina per a generar noves dianes terapèutiques

OBJECTIU GENERAL

L'objectiu general d'aquesta tesi és identificar marcadors moleculars entre fibroblasts del teixit normal adjacent al tumor, fibroblasts associats a carcinoma en tumors primaris de còlon i fibroblasts associats a metàstasi hepàtica; i definir una signatura genètica a partir d'aquests gens que permetin donar un valor pronòstic a l'estroma (o als fibroblasts que el constitueixen) i que serveixin per a millorar la classificació clínica de pacients afectes per càncer de còlon en estadis II i III. Aquest objectiu principal es troba subdividit en tres objectius més concrets:

OBJECTIU 1:

Determinar com es modifiquen les capacitats funcionals i transcripcionals de les cèl·lules de carcinoma colorectal en funció de la interacció amb els fibroblasts amb els que conviurà al llarg de la progressió tumoral; i estudiar el perfil transcripcional d'aquests fibroblasts per determinar si existeix un programa transcripcional comú associat a progressió tumoral i pronòstic.

Objectius específics:

- Aïllament i establiment de cultius primaris de fibroblasts de la mucosa normal, associats al tumor primari i associats a la metàstasi hepàtica en pacients amb càncer colorectal. Valoració dels efectes dels productes secretats al medi en la viabilitat i l'agressivitat de les cèl·lules tumorals.
- Emprant la tecnologia dels microarrays, definir una signatura de gens d'expressió comú i gradual en la seqüència de fibroblasts normals, associats a tumor primari i associats a metàstasi hepàtica i que tingui valor pronòstic.

OBJECTIU 2:

Conèixer quins són els canvis funcionals que proporcionen els fibroblasts aparellats del teixit normal adjacent al tumor i els associats a tumor primari en les cèl·lules tumorals. Definir un perfil d'expressió genètic diferencial i identificació de biomarcadors útils com a dianes terapèutiques i/o amb valor pronòstic.

Objectius específics:

- Establiment de cultius primaris de fibroblasts de la mucosa colònica adjacent al tumor i associats al tumor primari, i caracterització de la influència sobre el comportament de la cèl·lula tumoral.
- Anàlisi i determinació de gens diferencialment expressats entre ambdues subpoblacions de fibroblasts fent ús de la tecnologia dels microarrays, i associació del perfil genètic amb processos biològics.
- Definició d'una signatura genètica diferencial entre ambdues subpoblacions de fibroblasts i exploració de les seves implicacions funcionals i pronòstiques.

OBJECTIU 3:

Definir un classificador genètic estromal amb poder predictiu de recurrència en pacients afectes de càncer colorectal en estadis II i III. Trasl·lat a la pràctica clínica amb la tècnica de qRT-PCR.

Objectius específics

- Identificació del mínim nombre de gens amb poder predictiu sobre recurrència, i desenvolupament d'un classificador.
- Validar l'aplicació d'aquest classificador en dades d'expressió de microarrays disponibles en bases de dades públiques i per la tècnica de la qRT-PCR
- Valorar la capacitat de detectar gens d'expressió estromal en mostres corresponents a tot el teixit tumoral.

MATERIALS I MÈTODES

MATERIALS I MÈTODES

1. CULTIUS CEL·LULARS

1.1. Línies cel·lulars i manteniment

Per a la realització d'aquesta tesi doctoral es van utilitzar diferents línies cel·lulars humanes de càncer de còlon obtingudes de la ATCC (*American Type Culture Collection*).

La majoria d'experiments d'aquesta tesi es van realitzar amb les següents línies:

- **DLD-1:** Línia epitelial tumoral aïllada d'un adenocarcinoma primari humà de còlon en d'estadi Dukes C (T/N1/M0, T/N2/M0 o T3/N0/M0).
- **SW1116:** Línia tumoral derivada d'un adenocarcinoma de còlon d'estadi Dukes A grau III (T1/N0/M0).
- **SW480:** Línia cel·lular establerta a partir d'un adenocarcinoma primari de còlon d'estadi Dukes B (T3/N0/M0 o T4/N0/M0)
- **SW620:** Línia cel·lular establerta a partir de la metàstasi en el nòdul limfàtic del mateix pacient del qual es va obtenir la SW480.

Altres línies cel·lulars de càncer de còlon també emprades en aquest treball però d'una manera més puntual van ser: HCT116, HT-29, RKO, LoVo, Caco2, KM12C, Colo-205, HCT-15 i Co115.

Totes les línies tumorals descrites i emprades són epitelials adherents que creixen en monocapa a 37°C i 5% CO₂ en atmosfera humida. El creixement i manteniment de les línies cel·lulars es va fer usant medi de cultiu DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium and HAM's F12*, Lonza BioWhittaker®) amb sèrum boví fetal inactivat (FBS de l'anglès "*Fetal bovine serum*", Gibco®) al 10%, Hepes 10mM (Gibco®) i una combinació d'antibiòtics de penicil·lina i streptomicina a l'1%. Per tal de mantenir les cèl·lules viables, el medi de cultiu es reemplaçava per medi fresc cada 2-3 dies valorant el ritme de creixement de cada línia i tornant a sembrar-les en arribar a un 70-80% de confluència o en funció del nombre de cèl·lules requerit per al disseny experimental.

Periòdicament eren sotmeses al test de micoplasma.

La tripsinització i comptatge cel·lular per als diferents procediments experimentals es realitza segons el protocol:

- Retirar medi de cultiu i rentar amb tampó fosfat salí PBS 1x ("*Phosphate Buffer Saline*", PAA®)

1.2. Establiment cultius primaris de fibroblasts

Mostres quirúrgiques de pacients amb càncer colorectal van ser recollides a partir del setembre del 2008, sota la supervisió del comitè ètic de l'Hospital Universitari de Bellvitge i gràcies al Servei d'anatomia patològica. Teixits de la mucosa colònica morfològicament normal (com a mínim 5cm allunyat del marge de resecció quirúrgica), del tumor primari de còlon i de la metastasi hepàtica (en cas que hi hagués) van servir per a l'establiment dels cultius primaris de fibroblasts.

En condicions estèrils i sota cabina de flux laminar, els teixits proporcionats van ser processats de la següent manera:

- Neteja del tumor amb medi salí HBSS (de l'anglès "*Hank's Buffered Salt Solution*", Gibco®).
- Disgregació mecànica de la peça quirúrgica fent ús d'un bisturí
- Recuperació del teixit disgregat en 10ml de HBSS. Repartir el volum en dos tubs diferents complementant amb HBSS fins a un volum final de 10ml.
- Centrifugació a 700r.p.m 5' i eliminació del sobrenedant.
- Resuspendre el pellet d'un dels tubs amb medi de cultiu DMEM-F12 10% FBS i sembrar en plaques de 6cm de diàmetre (procediment de disgregació mecànica exclusivament).
- L'altre pellet sotmetre'l a disgregació enzimàtica afegint colagenasa IV i dispasa (proteases que disgreguen el teixit connectiu però que no alteren les unions intercel·lulars) a 37°C durant tota la nit (o/n).
- Recuperació del teixit disgregat i rentats amb medi HBSS. Centrifugació durant 5 min a 1000r.p.m
- Eliminar el sobrenedant i resuspendre el pellet cel·lular amb medi DMEM-F12 10% FBS i filtrar a través dels "col·ladors cel·lulars" amb porus de 70 µm de diàmetre (BD Falcon®) per individualitzar les cèl·lules.
- Repartir el volum filtrat en plaques de cultiu petites (6cm diàmetre).
- Mantenir plaques a l'incubador a 37°C i al 5% de CO₂
- Permetre l'adhesió de les cèl·lules i canviar el medi fresc comprovant la morfologia de les cèl·lules adherides.

Durant el transcurs d'aquesta tesi, el mètode d'aïllament va ser reemplaçat per una metodologia basada en la separació de les cèl·lules epitelials i fibroblasts mitjançant l'ús d'anticossos amb càrrega magnètica (MACS: *Magnetic Cell Separation*, Milteny Biotech, Auburn, CA, EEUU).

Els teixits disgregats amb col·lagenasa i dispasa es barregen amb Dynabeads® (boletes magnètiques) conjugades amb un anticòs específic per cèl·lules epitelials (anti-EPCAM, Invitrogen) per a eliminar-les; mentre els fibroblasts són positivament seleccionats amb *microbeads* amb anticòs específic de fibroblasts (Milteny Biotech).

Un cop establerts els cultius primaris de fibroblasts de la mucosa colònica normal adjacent al tumor (NCF: *Normal colonic fibroblasts*), dels fibroblasts associats a carcinoma del tumor primari (CAF-PT: *Carcinoma associated fibroblasts-primary tumor*) i dels fibroblasts associats a carcinoma en la metàstasi hepàtica (CAF-LM: *Carcinoma associated fibroblast –liver metastasis*), es van mantenir en les mateixes condicions d'incubació que les línies cel·lulars però durant no més de 10-15 doblatges. Durant el procés de manteniment de fibroblasts es van anar obtenint extractes proteics i d'ARN per a posteriorment fer la seva caracterització mitjançant les tècniques de Western Blot i PCR quantitativa (descrites posteriorment), així com també es procedia a la congelació dels mateixos.

El procés de congelació de cèl·lules es el següent:

- A partir de les cèl·lules tripsinitzades i centrifugades (veure apartat 1.1: protocol tripsinització i comptatge), retirar el sobrenedant i resuspendre el pellet amb 5ml de PBS (per acabar d'eliminar les restes de medi i tripsina).
- Centrifugar 5' a 1000r.p.m i resuspendre el pellet amb la solució de congelació : FBS+10% DMSO (dimetil sulfòxid).
- Aliquotar en criotubs i immediatament guardar a -80°C.

1.2.1.-Obtenció medis condicionats.

Medis condicionats (MC) dels diferents fibroblasts aïllats en cultiu es van obtenir per a la realització dels experiments posteriors. Segons el tipus d'assaig plantejat, el medi condicionat contenia FBS al 10% (per assajos funcionals de duració superior a 24h) o sense FBS (per assajos d'estimulació a curts temps). Els fibroblasts en confluència d'un 80-90% es renten dues o tres vegades amb PBS per eliminar les restes cel·lulars i són incubats durant 48h amb medi de cultiu DMEM-F12 contenint o no FBS al 10%. Transcorregut aquest període de temps, el medi es recull, es centrifuga 5min a 3000 r.p.m (per eliminar restes cel·lulars que hi poguessin quedar) i es filtra amb filtres de porus de 22µm de diàmetre (Millex® GS, Millipore). Els medis condicionats són guardats a -80°C o a 4°C en funció de la immediatesa del seu ús.

1.3. Assajos *In vitro*

Per a poder definir els efectes sobre les línies epitelials testades dels productes alliberats pels fibroblasts en els medis condicionats, diversos tipus d'assajos cel·lulars es van dur a terme comparant els efectes produïts amb la condició control (medi de cultiu fresc) o amb els altres medis.

1.3.1.-Assaig de proliferació WST-1.

La proliferació cel·lular es va quantificar usant el sistema colorimètric amb el reactiu WST-1 (*Cell Proliferation Reagent WST-1*. Roche[®]). Aquest assaig es basa en la capacitat de les cèl·lules vives per incorporar les sals de *tetrazolium* (color groc) i metabolitzar-les mitjançant un complex mecanisme cel·lular. La reducció d'aquesta sal és àmpliament dependent de la producció glicolítica de NAD(P)H en les cèl·lules viables. La quantitat de sals de formazà formades és directament proporcional al nombre de cèl·lules metabòlicament actives que hi ha en el medi i és quantificable mitjançant l'ús de lectors colorimètrics.

Per a realitzar els experiments es sembren cèl·lules en plaques de 96 pous (Nunclon, NUNC[®]) a la densitat òptima per a cada línia cel·lular i per evitar la saturació dels pous en les condicions controls al final de l'experiment. Un cop adherides en el fons del pou (24h), el medi de cultiu es substitueix per medi de cultiu sense FBS i es manté a les cèl·lules en aquestes condicions durant 12 hores per a que sincronitzin el seu cicle cel·lular. Passat aquest temps, les cèl·lules són incubades durant el període de temps requerit en cada experiment amb 100µl de medi condicionat/medi de cultiu estàndard. Finalitzat el període d'incubació, el medi de cultiu és reemplaçat amb 100µL de medi de cultiu DMEM-F12 lliure de sèrum al que se li afegeixen 10µL del reactiu WST-1. Després de 2 hores d'incubació a 37⁰C i en condicions de foscor, es mesura l'absorbància a una longitud d'ona de 450nm en un lector de microplaques.

Per tal de conèixer a quina quantitat de cèl·lules correspon cada valor d'absorbància, es va realitzar una corba patró per a cada tipus cel·lular. En una placa de 96 pous es sembla una dilució seriada amb nombre de cèl·lules conegut (1000, 2500, 5000, 10000, 25000, 50000, 100000) fent sis rèpliques en cada cas. Un cop passat el temps mínim requerit per a que s'adhereixin, es quantifica l'absorbància de la manera esmentada anteriorment i la corba resultant s'aplica als valors d'absorbància que s'obtenen dels experiments.

1.3.2.-Assaig de migració

1.3.2.1.-Sistema *Transwell*

La migració cel·lular és el moviment de les cèl·lules d'una àrea cap a una altre generalment en resposta a senyals químiques. Per a mesurar la motilitat de les cèl·lules en contacte amb els diferents medis condicionats es va usar una placa de 96 pous contenint inserts *Transwell* (Corning® HTS *Transwell*®). Aquest sistema es basa en que aquest tipus de plaques disposen de dos compartiments separats per uns filtres de policarbonat amb porus de 8 µm de diàmetre. A la cambra superior o insert *Transwell* es sembren les cèl·lules de les quals es vol avaluar la migració i en el pou inferior s'hi afegeix l'agent migrador (ja sigui el MC corresponent o un altre tipus cel·lular). La quantitat de cèl·lules que travessen els porus de l'insert i arriben al pou inferior són mesurades amb la fluorescència emesa per calceïna AM. La calceïna AM[®]) és un component fluorimètric que es fa servir per a detectar la viabilitat cel·lular. En les cèl·lules vives, la calceïna AM no fluorescent és convertida a calceïna verda fluorescent després de la hidròlisi produïda per les esterases intracel·lulars. La quantitat de fluorescència resultant és mesurada en un lector de fluorescència amb uns filtres de longitud d'ona de 485nm d'excitació i 520 nm d'emissió.

El nombre corresponent de cèl·lules per a cada tipus cel·lular en un volum final de 50µl i amb DMEM-F12 lliure de sèrum és sembrat en la cambra superior del pou. La cambra inferior és carregada amb 150 µl dels diferents medis condicionats o DMEM-F12 per al control. Després d'una incubació (37⁰C, 5% CO₂) de 48 hores en contacte amb els diferents medis condicionats, les cèl·lules de la cambra superior que travessen el filtre i arriben a la cambra inferior son tenyides amb calceïna AM (1,2 µl en 1ml CDS -*cell dissociation solution*) durant 1 hora Igual que en l'assaig de proliferació, és necessari l'elaboració d'una corba patró prèvia per a poder determinar a quantes cèl·lules equival el nivell de fluorescència (figura M2).

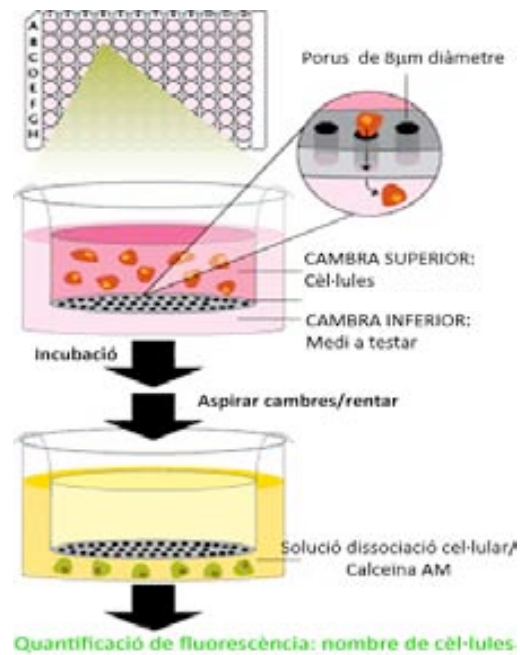


Figura M 2. Esquema del protocol de l'assaig de migració usant el sistema de placa *Transwell*.

1.3.2.2.-Wound healing

Un altre mètode fet servir per a mesurar la motilitat cel·lular és l'assaig de *wound healing* o curació de ferides. El seu principi es basa en que enfront d'una lesió tissular les cèl·lules són capaces de migrar cap a la zona on s'ha originat la lesió per tal d'iniciar el procés de reparació i regeneració. L'assaig es realitza en plaques de cultiu de 6cm de diàmetre i les cèl·lules es sembren i es deixen fins a assolir una confluència màxima en monocapa. Després de tenir les cèl·lules en medi de cultiu lliure de sèrum boví durant 12 hores (per aconseguir sincronització cel·lular), es genera una "ferida" en la monocapa cel·lular fent ús d'una punta de pipeta de 200µl. Posteriorment es realitzen diversos rentats amb PBS per eliminar les cèl·lules flotants i s'addicionen els medis condicionats corresponents. Una fotomicrografia es realitza immediatament després de produir la ferida (T=0) i també a 1, 3, 5 7 i 24 hores (figura M3). Per a cada condició es fixen tres punts al llarg de la ferida realitzada per tal de mesurar la distància entre els dos marges fent ús d'un microscopi calibrat (Leica *software*, *Wetzlar*, Alemanya). Per avaluar la capacitat migratòria de les cèl·lules es calcula la distància entre els dos marges en cada punt del temps i un cop fetes totes les mesures es valora quant han avançat les cèl·lules en 24 hores d'assaig.

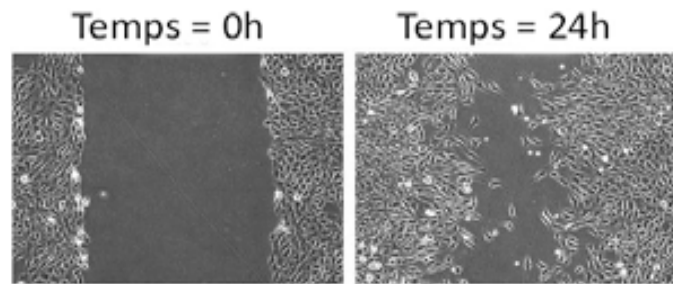


Figura M 3. Imatge de la "ferida" produïda en un assaig de *Wound Healing*.

1.3.3.- Assaig de formació de colònies (*Cloning Assay*).

L'assaig de formació de colònies és un assaig de supervivència cel·lular que avalua la capacitat d'una única cèl·lula en una població per a créixer i formar una colònia. És el mètode escollit per determinar la mort cel·lular reproductiva després de tractaments amb radiació o altres agents citotòxics. En el cas dels medis condicionats, l'objectiu d'aquest assaig és valorar si els factors solubles presents en els medis condicionats dels diferents fibroblasts són capaços de conferir a les cèl·lules aïllades una major capacitat clonogènica. Per a realitzar l'experiment es sembla un nombre molt baix de cèl·lules (250) en plaques de 6cm de diàmetre i s'incuben amb els diferents medis durant 15 dies. Finalitzat el temps d'incubació es retira el medi de les plaques, es renten amb PBS i s'afegeix metanol durant 10' per a que es fixin les colònies. Posteriorment són tenyides amb cristall violeta durant 10' i posteriorment comptades sota el microscopi

1.4. Assajos de viabilitat i cicle cel·lular.

1.4.1.- Estudi de mort cel·lular: Determinació de l'activitat de la caspasa-3

L'efecte dels diferents medis condicionats en la mort cel·lular per apoptosi es va mesurar determinant l'activitat de la caspasa 3 mitjançant l'assaig amb el substrat fluorogènic *Ac-DEVD-AMC caspase 3* (BD Pharmingen™). *Ac-DEVD-AMC* és un tetrapèptid sintètic fluorogènic, substrat de la caspasa-3. La caspasa 3, que s'activa en les fases inicials de l'apoptosi, talla el tetrapèptid entre D i AMC alliberant el substrat fluorogènic AMC que és quantificat en un fluoròmetre. L'apoptosi per caspasa 3 va ser avaluada en la línia cel·lular DLD-1 en presència dels diferents medis condicionats (DMEM-F12 10%, MC NCF, MC CAF-PT i MC CAF-LM) i en 4 temps diferents (6h, 24h, 48h i 72h). Pels temps curts es van sembrar 5×10^5 cèl·lules i pels temps llargs $2,5 \times 10^5$ cèl·lules.

Els extractes proteics es van obtenir tant per les cèl·lules flotants com per les adherents, emprant el tampó de llisi: Tris-HCl 5mM, EDTA 20mM i Tritó X-100X al 0,5% i seguint el mateix protocol d'extracció i quantificació proteica descrit en l'apartat 2.2.1.

La reacció de l'activitat caspasa 3 es va dur a terme en una placa de 96 pous (fent duplicats per a cada mostra) i afegint:

- 75µl tampó de reacció (HEPES 1M, glicerol 10%, ditiotretitol 1M).
- 25µl (X volum del llistat proteic contenint 20µg proteïnes + tampó de llisi)
- 48µl H₂O
- 2µl substrat (Ac-DEVD-AMC caspase3, 1mg/ml)
- Incubació 2h a 37°C en la foscor.
- Lectura de la fluorescència (excitació 365nm i emissió 410-480nm).

Els nivells d'activitat caspasa3 es representen amb unitats arbitràries /µg proteïna.

1.4.2.- Estimació de la viabilitat i contingut de l'ADN per iodur de propidi.

L'anàlisi de fases del cicle cel·lular es va realitzar amb el mètode d'incorporació de iodur de propidi (IP). El iodur de propidi és un agent intercalant de l'ADN que marca aquesta molècula i serveix tant per avaluar la viabilitat cel·lular com per quantificar el seu contingut en les anàlisis de cicle cel·lular, intercalant-se entre les bases de l'ADN de les cèl·lules mortes (no és capaç de penetrar la membrana de les cèl·lules vives).

El procediment seguit per avaluar el contingut de IP en les cèl·lules DLD-1 tractades amb els diferents medis condicionats durant 48 i 96h va ser el següent:

- Tripsinització de les cèl·lules tractades.
- Centrifugació durant 5' a 1000 r.p.m, resuspendre amb PBS 1x i fer el comptatge cel·lular.
- Agafar el volum necessari per contenir 150.000 cèl·lules i fixar-les amb etanol absolut fred durant la nit (o/n).
- Centrifugar les cèl·lules fixades 5' a 1000 r.p.m i resuspendre el pellet en 800µl de PBS amb FBS 1%.
- Afegir 100µl de solució de IP 10x i 100µl de RNasa A (10mg/ml).
- Incubar la mescla 30' a 37°C i analitzar les mostres en el citòmetre de flux (Beckman Coulter).

3L) L'impact de la 2^e aon de la vie sur le développement

La 2^e aon (de 12 à 24 mois) est une période cruciale pour le développement physique et cognitif de l'enfant. C'est à ce moment que l'enfant commence à marcher, à parler et à explorer son environnement de manière autonome. Les expériences vécues pendant cette période ont un impact durable sur la formation de la personnalité et des schémas de pensée de l'individu.

2

3L) L'impact de la 2^e aon de la vie sur le développement

La 2^e aon est une période de développement rapide. L'enfant apprend à marcher, à parler et à explorer son environnement. Les expériences vécues pendant cette période ont un impact durable sur la formation de la personnalité et des schémas de pensée de l'individu.

Les expériences vécues pendant la 2^e aon ont un impact durable sur la formation de la personnalité et des schémas de pensée de l'individu. C'est à ce moment que l'enfant commence à marcher, à parler et à explorer son environnement de manière autonome. Les expériences vécues pendant cette période ont un impact durable sur la formation de la personnalité et des schémas de pensée de l'individu.

2

2

2

2

2

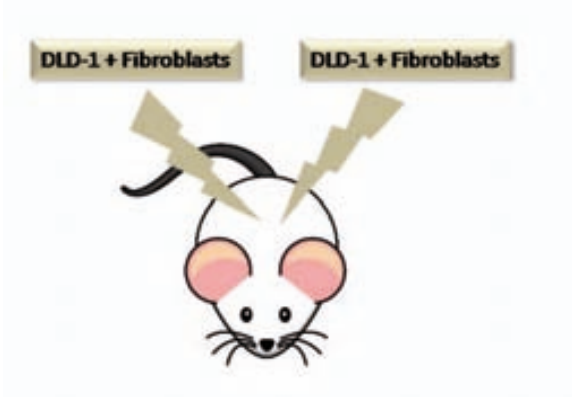
2

2

2

2

2



Le 2^e aon de la vie est une période cruciale pour le développement physique et cognitif de l'enfant. C'est à ce moment que l'enfant commence à marcher, à parler et à explorer son environnement de manière autonome. Les expériences vécues pendant cette période ont un impact durable sur la formation de la personnalité et des schémas de pensée de l'individu.

Els tumors obtinguts van ser fixats amb formol, inclosos en parafina i tallats en seccions de 3µm per al seu posterior anàlisi histològic. Les diferents seccions obtingudes van ser tenyides mitjançant la tinció amb hematoxilina-eosina:

- Desparafinar amb bateria de 4 xilols (10 minuts en cada un)
- Hidratació amb etanols i H₂Od
 - 3 x 5 min en etanol absolut
 - 3 x 5 min en etanol 96⁰
 - 3 x 5 min en etanol 70⁰
 - 5 min etanol 50⁰
 - 5 min en H₂Od
- Tinció de 10 min amb una solució d'hematoxilina de Harris (Merck)
- Rentat amb aigua de l'aixeta i doble viratge amb HCl a l'1% i aigua amoniaca.
- Tinció de 30 segons en una solució d'eosina (Merck) al 25% en etanol 80%.
- Deshidratació:
 - 1 min etanol 70%
 - 3 x 1 min etanol 96⁰
 - 3 x 1 min en etanols absoluts
 - 4 x 3 min en xilol
- Muntatge amb medi de muntatge DPX i observació al microscopi.

2. DETECCIÓ EXPRESSIÓ PROTEÏCA

L'expressió proteica tant per la caracterització dels fibroblasts com per la validació dels diferents gens identificats per la tecnologia de microarrays es va valorar per diferents tècniques immunològiques.

2.1. Western Blot (WB)

2.1.1.-Extracció i quantificació proteica

L'extracció de proteïnes es va fer a partir dels extractes de llisi obtinguts a partir de les cèl·lules en cultiu i seguint el protocol següent (tot el procés es realitza en fred):

- Aspirar el medi de cultiu en el que tenim les cèl·lules i ràpidament posar-les sobre gel i afegir PBS fred per a fer els rentats. Repetir el procés de rentat 2-3 vegades.

- Afegir un volum adequat (100-500µL segons la mida de la placa de cultiu) de tampó de llisi: RIPA + Inhibidors (taula M1).
- Rascar amb l'ajut d'un *cell scraper* (Nunc™)
- Recuperar el volum del tampó de llisi + cèl·lules en un tub *ependorff* d'1,5ml i deixar a 4⁰C en agitació durant uns 30'.
- Centrifugar a 4⁰C durant 20' i a 12000r.p.m.
- Recuperar sobrenedant contenint els extractes proteics totals.
- QUANTIFICACIÓ PROTEICA amb el kit *Pierce™ BCA Protein Assay* (Thermo Scientific). Test colorimètric per a la detecció i quantificació de les proteïnes totals, que es basa en la reducció de Cu⁺² a Cu⁺¹ per les proteïnes en medi alcalí i la consegüent reacció colorimètrica que es dona per la quelació de dues molècules de BCA (àcid bicinconínic) amb una de Cu¹⁺. El protocol a seguir és el següent:
- Elaboració d'una corba estàndard amb unes dilucions de concentracions conegudes d'una proteïna comuna com és l'albumina de sèrum boví (BSA): 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0025 mg/ml.

TAMPÓ DE LISI RIPA	
PBS 1x	98mL (1x)
SDS 10%	1mL (0,1%)
Na Deoxicolat	0,5gr (0,5%)
NP40 (Nonidet)	1mL (1%)

- Preparació del reactiu de treball de BCA:
 - (n estàndards + n mostres)* 2-3 rèpliques * 200µL (volum final de reactiu de treball per pou en placa de 96 pous) = Volum total de reactiu de treball BCA.
 - Volum total / 50 µL = volum reactiu B
 - Volum reactiu B - volum total = Volum reactiu A

RIPA + INHIBIDORS PROTEASES/ FOSFATASES	
Tampó de lisi RIPA 1x	8950µL
Inhibidor proteases 25x (Roche® Tablets)	400µL
Ortovanadat	40µL
PMSF 100mM	100µL
β-glicerol	500µL
Leupatina 1mg/ml	10µL

- Dispensar 200µL del reactiu de treball en cada pou.
- Afegir 10µL dels estàndards
- Afegir 1µL de la mostra + 9µL aigua (dilució de la proteïna 1/10).
- Cobrir la placa i deixar-la 30' a 37⁰C.
- Lectura en un lector de plaques colorimètric a una longitud d'ona de 562nm

Taula M. 1. Composició tampó de lisi cel·lular

La recta patró es considera vàlida si pel mètode dels mínims quadrats el valor R^2 és > a 0,95.

Un cop quantificades les proteïnes es calcula el volum necessari per a carregar entre 20-40µg de proteïna (en funció de la proteïna a detectar i l'anticòs emprat) en el gel de poliacrilamida.

2.1.2.-SDS-PAGE i transferència a membrana de PVDF

L'electroforesi de proteïnes es va realitzar en gels desnaturalitzants amb SDS (SDS-PAGE) a un percentatge entre el 10-15% en funció del pes de la proteïna a detectar(major concentració com menor sigui el pes de la proteïna a detectar)(taula M2).

GEL SEPARADOR	8%	10%	12,5%	15%	GEL CONCENTRADOR	4%
TRIS 1,5M pH8,8	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml	TRIS 0,5M pH6,8	2,5ml
Acrilamida 40%	2ml	2,5ml	3,125ml	3,75ml	Acrilamida 40%	1ml
SDS 10%	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	SDS 10%	0,1ml
H2O _{dd}	5,45ml	4,95ml	4,325ml	3,7ml	H2O _{dd}	6,4ml
APS 10×	100µl	100µl	100µl	100µl	APS 10×	100µl
TEMED	15µl	15µl	15µl	15µl	TEMED	15µl

Taula M. 2. Volum dels reactius necessaris per a l'elaboració del gel de poliacrilamida.

Les proteïnes es dilueixen 1:1 en tampó Laemmli 2x (*BIO-RAD*) contenint β-mercaptoetanol i es deixen 5' a 95°C per a ser desnaturalitzades. Es carreguen en el gel de poliacrilamida i com una mostra més es carrega també un marcador de pes molecular de proteïnes (*BenchMark™ Pre stained Protein Ladder*). S'aplica al gel a un voltatge de 100V en presència de tampó de carrera per a que es produeixi la migració de les proteïnes

Tampó de carrera: Tris 27mM, Glicina 197mM i SDS 10%

Per a transferir les proteïnes del gel separades durant la electroforesi a una membrana de PVDF (*Roche®*), aquesta s'activa prèviament amb metanol pur, es renta amb H₂O durant 5' i posteriorment s'incuba amb tampó de transferència durant 10' més. Per a la transferència s'aplica un voltatge de 100V al sistema durant 1hora.

Tampó de transferència: Tris 27mM, Glicina 197mM, pH8,3 i metanol 20%

2.1.3.- Immunodetecció

El procés per a detectar els nivells proteics de les diferents proteïnes testades en aquesta tesi és el següent.

- Activació de les membranes PVDF amb metanol absolut
- Rentat amb H₂O i incubació amb tampó de transferència fred.

- Bloqueig de les membranes amb solució "llet" al 10% durant 1h a temperatura ambient en agitació contínua.
- Incubació amb els anticossos primaris diluïts en tampó de bloqueig 1% durant 2h a temperatura ambient o bé tota la nit (o/n) a 4°C en agitació contínua.
- Rentat de les membranes amb TBS (*Tris buffer saline*)-Tween 0,1% (x3)
- Incubació amb els anticossos secundaris durant 45-60' a temperatura ambient i en agitació.
- Rentat de les membranes amb TBS-Tween 0,1% (x3)
- Revelat de les membranes amb un mètode luminescent no radioactiu basat en la detecció amb la peroxidasa HRP (*Horseradish Peroxidase*), l'ECL (*GE Healthcare*) i film de revelar.

El llistat dels diferents anticossos que s'han usat en aquesta tesi per a la detecció per Western Blot, es troben en la taula M3.

PROTEINA (pes molecular)	Anticòs 1ari (dilució)	Anticòs 2ri (dilució)	Taula M. 3 Llistat d'anticossos emprats per WB. La taula mostra el nom de la proteïna i el seu pes molecular (kDa) així com la casa comercial i dilució del anticòs primari i secundari.
E-CADHERINA (120kDa)	BD 1/1000	Ratoli (1/2000)	
α -SMA (42kDa)	1/1000	Ratoli (1/2000)	
VIMENTINA (58kDa)	Invitrogen 1/1000	Ratoli (1/2000)	
VINCULINA (130kDa)	Invitrogen 1/400	Ratoli (1/2000)	
VE-CADHERINA (115kDa)	Abcam 1/3000	Ratoli (1/2000)	
TUBULINA (60kDa)	Sigma 1/5000	Ratoli (1/2000)	
CDH2 (120kDa)	BD (1/500)	Ratoli (1/2000)	
ENC1 (66kDa)	BD (1/250)	Ratoli (1/2000)	
TNFSF4 (30kDa)	Sigma 1/250	Conill (1/2000)	
ST6GALNAC5 (38kDa)	Abcam 1/500	Conill (1/2000)	
SEMA5A (107kDa)	Sigma 1/200	Conill (1/2000)	
SLC7A2 (72kDa)	Sigma 1/200	Conill (1/2000)	
TGF β 2 (25kDa)	Abcam 1/500	Ratoli (1/2000)	

2.2. Immunohistoquímica

La localització tissular i cel·lular de les diferents proteïnes estudiades es va valorar amb tècniques d'immunohistoquímica en mostres de teixit seguint el següent protocol:

- Desparafinar i hidratar les mostres : 10' xilol (4x); 5' etanol (absolut 2x, 96% 2x, 70% 2x i 50% 2x) i 5' en H₂O destil·lada
- Desenmascament de l'epítot amb citrat sòdic 1x a pH6 o EDTA a pH9 (en funció de l'anticòs), per a deixar la part de l'antigen reconeguda per l'anticòs accessible.
 - En una olla a pressió afegir 1L de citrat sòdic 1x / EDTA amb els teixits en els portaobjectes (és important vigilar que en cap moment les mostres quedin eixutes) i escalfar en un fogó a la màxima potència fins que comenci a bullir (10' aproximadament).

- Disminuir la T^a i deixar les mostres a l'olla durant uns 2'.
- Retirar del fogó, obrir la tapa i deixar refredar durant uns 20' mantenint les mostres en el tampó citrat.
- Inhibició de la peroxidasa endògena: 20 minuts a T^a ambient amb una solució de peròxid d'hidrogen: 13ml H₂O₂ 33% + 128ml H₂O + 60ml metanol
- Rentat amb aigua destil·lada: 5'
- Rentat amb TBS 1x (*Tris-Buffered Saline* 50mM Tris-HCl + 150mM NaCl, pH 7,5) amb tritó 0.1%: 5' (3x)
- Incubació amb sèrum bloquejant a una dilució 1/20: 5'a T^a ambient.
- Incubació anticòs primari diluït en solució bloquejant i deixar tota la nit (o/n) a 4^o C
- Rentat amb TBS-Tritó: 5' (3x)
- Incubació anticòs secundari *En Vision™* (DAKO) durant 30' a T^a ambient.
- Rentat amb TBS-Tritó: 5' (3x)
- Revelat amb el cromògen 3-3'-Daminobenzidina (DAB, DAKO)
- Passem per aigua destil·lada i seguidament per aigua de l'aixeta per eliminar restes de DAB.
- Contratació amb Hematoxilina: 2-3 "
- Rentar amb abundant aigua
- Deshidratar : passant per etanols i xilols, el protocol invers al de desparafinar.
- Muntar amb medi de muntatge DPX i observar en el microscopi.

Diferents proteïnes van ser valorades amb aquesta tècnica (incorporant algunes modificacions en el protocol en funció de les propietats i característiques de l'anticòs primari), totes elles llistades a la taula M4.

PROTEINA	Anticòs 1ari (dilució)	Anticòs 2ri
PDLIM3	Sigma Prestige 1/200	Conill
α-SMA	Invitrogen 1/500	Ratolí
Ki67	<i>Thermo Scientific</i>	Conill

Taula M. 4. Llistat d'anticossos emprats per IHQ.

3. ANÀLISI DE L'EXPRESSION GÈNICA

3.1. Extracció ARN de línies cel·lulars

L'extracció de l'ARN es va fer a partir dels pellets cel·lulars tant de les línies tumorals d'adenocarcinoma de còlon com dels fibroblasts dels cultius primaris. El mètode emprat va ser amb el reactiu TRIzol® i el kit de purificació per columna *PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen)*.

El protocol descrit en el kit és el que es mostra a continuació.

- Afegir 1mL de TRIzol® als pellets cel·lulars i resuspendre
- Afegir 200µL de cloroform i agitar 15'' manualment. Deixar a temperatura ambient fins que es separin les fases
- Centrifugar a 12000r.p.m durant 15' a 4°C.
- Transferir la fase aquosa contenint l'ARN a un nou tub i afegir el mateix volum d'etanol 70%.
- Transferir el volum a la columna proporcionada pel kit i centrifugar 15'' a 12000r.p.m. Decantar el volum del tub col·lector (fer el procés fins a finalitzar amb el volum de mostra).
- Afegir 700µL del tampó de rentat *WB I (Wash buffer I)* i centrifugar 15'' a 12000r.p.m. Decantar el contingut del tub col·lector.
- Afegir 500µL del tampó de rentat *WB II (Wash buffer II)* i centrifugar 15'' a 12000r.p.m. Decantar el contingut del tub col·lector. Repetir una vegada.
- Centrifugar la columna durant 1' a 12000r.p.m per acabar d'eliminar restes dels tampons i transferir la columna a un tub nou.
- Eluir l'ARN de la membrana de la columna afegint entre 20-40µL d'aigua (en funció del pellet cel·lular) i deixar 1' a temperatura ambient.
- Centrifugar 2' a 12000r.p.m.
- Recuperar l'eluit contenint l'ARN purificat.
- QUANTIFICACIÓ DE L'ARN: La quantificació de l'ARN es va realitzar mitjançant l'ús de

l'espectrofotòmetre NanoDrop ND-100 (*NanoDrop Technologies Inc., Rockland, DE*) que mesura l'absorbància a 260nm (la franja dels àcids nucleics) per a determinar la concentració de l'ARN en nanograms/µL i la qualitat de la mostra (A_{260}/A_{280}).

Per a treballar amb microarrays i amb estudis d'expressió és imprescindible obtenir ARN de bona qualitat ($1,8 > \text{RATIO } A_{260}/A_{280} < 2,1$) i ben purificat (no presència d'ADN). La presència d'ADN pot

Els resultats es presenten mitjançant corbes d'amplificació en la que es representen els valors de fluorescència emesa per a cada mostra envers el cicle en el que comença a detectar-se, anomenat punt de creuament o *Cp* ("Crossing point"). Per a poder extrapolar i conèixer quant de transcrit del gen conté la mostra problema, en cada reacció s'hi afegeix una dilució seriada d'ADNc de concentració coneguda amb la que es genera una corba estàndard amb valors logarítmics corresponents a les diferents concentracions.

L'especificitat del producte amplificat es detecta mitjançant les corbes *Tm* o de fusió que indiquen la T^a a la que les cadenes de la doble hèlix es separen i que depèn de la mida del fragment amplificat i de la quantitat de bases G-C que conté (figura M7).

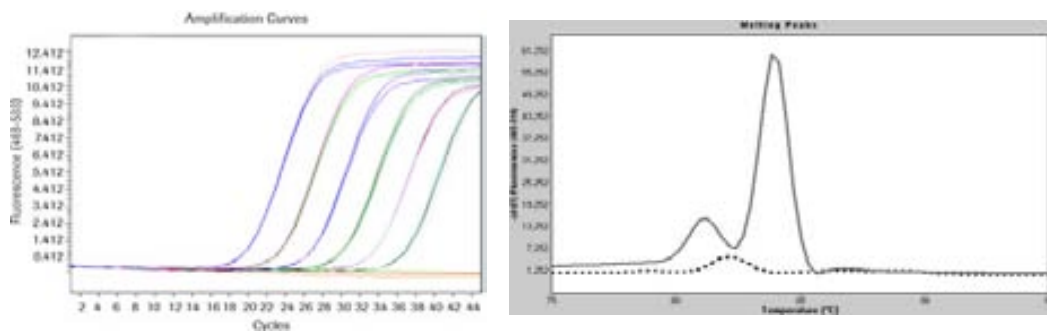


Figura M 7.Exemple de corbes d'amplificació i corbes de *Tm* generades a partir de l'anàlisi per *LightCycler*® 480, *SYBR Green I Master*.

Els experiments d'anàlisi d'expressió dels diferents gens es va fer en plaques de 384 pous i introduint:

- 2 rèpliques per a cada mostra
- 2 rèpliques de control negatiu
- 2 rèpliques de control negatiu de la retrotranscripció
- 2 rèpliques d'un punt de la corba estàndard

En cada pou s'hi afegiren 1µl d'ADNc de la mostra problema o de les dilucions del ADNc de concentració coneguda, i 9 µl de la mix de reacció de qRT-PCR composta per:

- 5µl *SYBR Green Master I mix*
- 0,1µl encebador *forward* (100µM)
- 0,1µl encebador *reverse* (100µM)
- 3,8µl H₂O

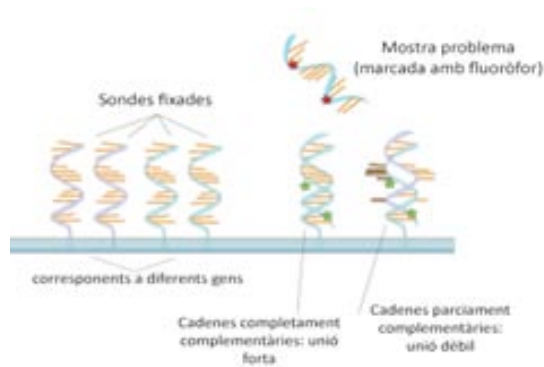


Figura M 10. Esquema del funcionament de les sondes en els microarrays. Les sondes fixades corresponents a seqüències específiques de gens són fixades sobre un suport sòlid i hibridades amb l'ADNc de la mostra problema marcat amb un fluoròr concret. L'emissió de fluorescència només es donarà si la hibridació és total.

Existeixen dos tipus de microarrays en funció de l'experiment a realitzar. En els microarrays de dos colors o de dos canals s'hibriden alhora dues mostres que volen ser comparades i cada una de les quals està marcada amb un fluoròfor diferent. Els fluoròfors més comunament emprats per al marcatge del ADNc inclouen Cy3 i Cy5 que tenen una emissió de fluorescència a una longitud d'ona de 570nm i 670nm respectivament i corresponen als colors verd i vermell en l'espectre de llum. Les dues mostres marcades amb els diferents fluoròfors son barrejades i hibridades en un únic microarray que posteriorment és escanejat per a visualitzar la fluorescència dels dos fluoròfors després de l'excitació amb un feix d'una determinada longitud d'ona. Es tracta d'una hibridació per competició i les intensitats relatives de cada fluoròfor són analitzades per a identificar gens sobre o infraexpressats. L'altre tipus d'array es denominat microarray d'oligonucleòtids i es tracta d'un disseny més avançat que el de dos colors. No es basa en hibridació competitiva (cada mostra conté un únic color), les sondes es sintetitzen directament sobre el xip, i cada gen està representat per un grup de sondes curtes en comptes de per una sola; d'aquest tipus són els microarrays d'expressió descrits en aquesta tesi, concretament la plataforma d'Affymetrix *GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array* (cobreix 36079 sondes) (figura M11). El protocol es va realitzar a la unitat de genòmica funcional de l'Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona (IRBB) seguint els passos següents:

1. Reacció de síntesi de la llibreria genòmica
2. Amplificació de la llibreria
3. "Neteja del ADNc de doble cadena"
4. Fragmentació del ADNc
5. Protocol de marcatge amb fluoròfors
6. Hibridació de la mostra problema
7. Rentat i eliminació de material no hibridat.
8. Escaneig dels resultats

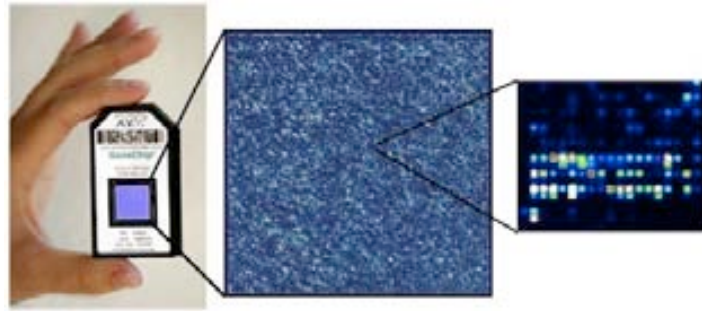


Figura M 11. Esquema bàsic del funcionament del *GeneChip®Human Gene 1.0 ST Array*. Xip contenint les sondes d'oligonuclèotids i intensitat del senyal proporcionada per la hibridació de la mostra problema. Imatge extreta de <http://www.stemcore.ca/services/microarrays>

Un cop escanejats els microarrays, cada una de les imatges és analitzada detalladament per a descartar possibles artefactes produïts durant el procés de marcatge i hibridació de les sondes. Les dades obtingudes són interpretades, normalitzades i transformades en valors numèrics fent servir la funció *justRMA* del paquet bioinformàtic *Simpleaffy* (Wilson and Miller 2005) de Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>).

En el treball descrit en aquesta tesi es van realitzar dos anàlisis d'expressió per microarrays segons els diferents objectius. Per una banda es va dur a terme una anàlisi d'expressió de comparativa triple entre NCF (n=9), CAF-PT (n=14) i CAF-LM (n=11); i per l'altre es va analitzar l'expressió entre 8 parelles de fibroblasts normals (NCF) i els seus corresponents fibroblasts associats a carcinoma de tumor primari (CAF-PT). L'ARN dels cultius primaris de fibroblasts va ser extret seguint el protocol descrit en l'apartat 3.1 i posteriorment transferit a la unitat de genòmica del IRBB per a la realització dels microarrays.

4.2. Processament de les dades i selecció dels gens diferencialment expressats.

Les dades resultants normalitzades van ser analitzades per tal d'identificar sondes diferencialment expressades entre els grups cel·lulars en estudi. La tècnica emprada va ser l'anàlisi de significança de microarrays o *SAM* ("Significance Analysis of Microarrays") que forma part del paquet estadístic "R" i que va ser realitzada per la Unitat de Biomarcadors i susceptibilitat de l'Institut Català d'Oncologia de l'Hospitalet i de l'Institut d'investigació biomèdica de Bellvitge.

El mètode estadístic *SAM*, proposat per Tibshirani *et al* al 2008 (Tusher, Tibshirani et al. 2001), és una tècnica que identifica gens amb canvis d'expressió estadísticament significatius mitjançant un

estadístic no-paramètric similar al *t*-test específic per a cada gen. Mesura diferències d'expressió entre grups i incorporant una quantitat fixa al denominador (variància estimada) per tal d'evitar considerar com a significants gens amb poca variància. La seva significança (*p*-valor) es mesura usant permutacions de les dades, i a més, una estimació de la taxa de descobriment fals (FDR "*False Discoverey Rate*") o *q*-valor, és també proporcionada per a poder determinar possibles errors en el processament. En cada comparació els gens són ordenats en funció del significat del canvi (sobre o infraexpressats) en les expressions diferencials entre grups, i els gens amb una significança que sobrepassa el llindar estipulat són considerats rellevants. També permet determinar el paràmetre de *fold-change* (descriu quants més canvis d'expressió hi ha entre una condició i una altre), per assegurar que els gens triats tinguin un canvi d'expressió mínim pre-especificat.

El criteri aplicat per a seleccionar el llistat de sondes considerades rellevants va ser:

- Sondes amb com a mínim, un gen associat
- Mitjana *RMA* d'expressió logarítmica >4 per eliminar informació de fons i aquelles sondes en baixa abundància.

On *RMA* (*Robust Multi-array Analysis*) és un mètode per a normalitzar els nivells d'intensitat de les sondes en les mesures fetes amb els xips gènics d'*Affymetrix* que consisteix en la correcció de les senyals inespecífiques, la normalització per a poder comparar resultats entre múltiples xips i la obtenció d'una única mesura d'expressió per sonda expressada en escala de \log_2 . (https://www.chem.agilent.com/Library/technicaloverviews/Public/RMA_Probe_Summarization).

- Desviació estàndard de *RMA* $> 0,1$ per evitar seleccionar sondes amb baixa variabilitat
- *q*-valor (FDR) $<0,05$
- *Fold-change* >2 per als gens sobreexpressats i $< 0,5$ per als infraexpressats

4.3. Anàlisis funcionals i d'ontologia genètica

De la llista de gens seleccionats a partir de les diferències d'expressió entre els dos grups analitzats, es fa una anàlisi d'ontologies genètiques per tal de determinar els termes biològics sobrerrepresentats en el total dels gens disposats en el microarray. Aquest mètode permet determinar vies de senyalització o processos biològics que poden estar associats amb un dels grups experimentals ja que considera els gens de manera conjunta i no individualment.

En aquesta tesi s'ha usat la base de dades pública *DAVID* (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* - <http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) per a explorar el significat

biològic de la llista de gens en termes de: procés biològic, component cel·lular i funció molecular.

L'anàlisi es va realitzar en aquells gens amb un FDR q-valor $< 0,1$.

Una altra eina bioinformàtica per a explorar el significat biològic de l'expressió de tots els gens identificats en el microarray és el *GSEA* (*Gene Set Enrichment Analysis* - <http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) (Subramanian, Tamayo et al. 2005). L'anàlisi per *GSEA* es fonamenta en l'ús de la base de dades *Molecular Signature Database (MSigDB)* que està constituïda per grups de gens anomenats *gene sets (S)* que presenten una mateixa anotació, és a dir, són grups de gens característics d'un fenotip concret identificats en altres estudis previs de microarrays. D'aquesta manera *GSEA* determina si els components dins d'un *gene set* concret tendeixen a trobar-se representats en la part superior (o inferior) de la nostra llista de gens, correlacionant-se així amb la distinció de classe fenotípica. Amb aquest anàlisi, a més, es tenen en consideració aquells gens infravalorats en les anàlisis prèvies deguts als valors mínims en canvi d'expressió que representen a nivell individual. Donat un pre-determinat grup definit de gens *S* (ex: implicats en una mateixa via metabòlica, localitzats en el mateix cromosoma, pertanyents a una mateixa categoria ontològica...), l'objectiu de *GSEA* és determinar si els components de *S* es troben distribuïts de manera aleatòria en la nostra llista de gens diferencial o pel contrari es troben representats en la part superior o inferior de la mateixa (és a dir, en els sobreexpressats o en els infraexpressats). Aquest mètode es basa en el càlcul del *Enrichment Score (ES)*, que reflexa el grau en el que el grup de gens *S* es troba representat en els extrems de la nostra llista de gens ordenada. L'*score* o puntuació es calcula baixant pel llistat de gens i incrementant el valor estadístic en trobar el gen de *S* representat, i disminuint-lo en trobar gens no presents en *S*. La magnitud de l'increment depèn de la correlació del gen amb el fenotip. L'*ES* és la màxima desviació de zero trobada en la llista. Un *ES* positiu indica un enriquiment dels gens del fenotip *S* en l'extrem superior de la nostra llista (gens sobreexpressats), mentre que un *ES* negatiu indica que els gens de *S* es troben representats en els gens inferiors en la llista (menys representats). Posteriorment es normalitzen el *Enrichment score* i se'n obtenen els *Normalized Enrichment Score (NES)* a partir dels quals es calcula el *FDR* amb l'objectiu de reduir la probabilitat de detectar falsos positius. Els resultats de les anàlisis proporcionen un gràfic com el que es mostra en la figura M12.

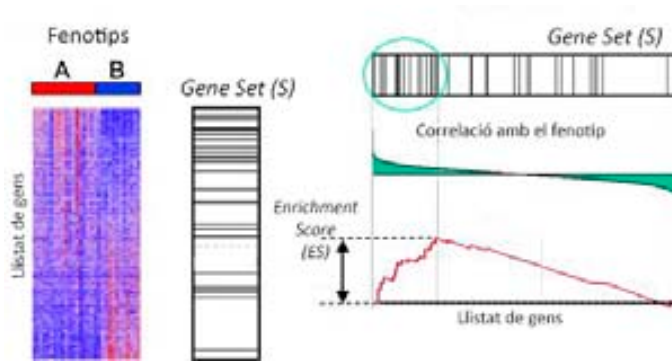


Figura M 12. Elements bàsics en el mètode de GSEA. Els fenotips o llistat de gens diferencialment expressats obtinguts en el microarray; el *gene set* (*S*) relacionat amb un fenotip concret conegut; i l'obtenció del *enrichment score*. Figura adaptada de *Subramanian et al*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2005 (*Subramanian, Tamayo et al.*

Per a la identificació de possibles fenotips relacionats amb el grup de gens trobats, la cerca es va fer de manera global emprant tots els subgrups disponibles en la base de dades *Molecular Signature Database (MSigDB)* en el moment de l'anàlisi:

- C1 → Grups de gens posicionals: per a cada cromosoma humà i banda citogenètica.
- C2 → Grups de gens conservats: de bases de dades de vies metabòliques, de publicacions en *Pubmed*.
- C3 → Grups de gens de motius preservats: basat en motius cis-reguladors conservats en anàlisis comparatius entre humà, ratolí, rata i gos.
- C4 → Grups de gens computacionals: definits per gran col·leccions de dades obtingudes de microarrays centrats en càncer.

Finalitzada la cerca, aquells fenotips amb un *ES* significatiu ($FDR < 0,05$) van ser considerats. En el moment en el que es van realitzar les anàlisis, aquests eren els subgrups. Posteriorment van ser definits 3 més, però no considerats en l'anàlisi: C5, C6 i C7:

- C5 → Grups de gens basats en ontologies genètiques: gens agrupats dins dels mateixos termes ontològics.
- C6 → Signatures oncogèniques: definides directament de dades d'expressió gènica de microarrays obtingudes d'alteracions gèniques produïdes en càncer.
- C7 → Signatures immunològiques: definides directament de dades d'expressió gènica extretes d'estudis immunològics.

Per a determinar si hi ha un enriquiment dels nostres gens desregulats en vies metabòliques particulars descrites prèviament en grups de gens, es va emprar la base de dades KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) que proporciona informació sobre vies de senyalització. La significança estadística de l'ES va ser estimada de 1000 permutacions.

5. DEFINICIÓ DE CLASSIFICADORS ESTROMALS

En el transcurs d'aquesta tesi s'han descrit diversos classificadors en funció de l'objectiu a aconseguir. Un primer classificador s'ha definit en base als resultats de les dades d'expressió dels fibroblasts normals, fibroblasts associats a tumor primari i fibroblasts associats a metàstasi hepàtica (comparative triple); i l'objectiu és definir un classificador constituït per gens comuns en les tres poblacions i que presentin una expressió gradual i seqüencial. Un segon classificador ha estat definit a partir de les dades d'expressió obtingudes entre els fibroblasts normals i els fibroblasts associats a carcinoma de mostres aparellades per a identificar un conjunt de gens l'expressió dels quals ens permeti distingir entre fibroblasts normals i associats a carcinoma; i posteriorment desenvolupar un classificador basat en aquest subconjunt de gens de la llista inicial que sigui capaç de predir la probabilitat de recurrència d'un pacient basant-se en l'expressió d'aquests gens estromals específics.

5.1. Definició de la signatura de comparativa triple. Gens de progressió en fibroblasts.

La primera signatura descrita en aquesta tesi és la resultant de la comparativa triple entre els perfils d'expressió de NCF, CAF-PT i CAF-LM; que pretèn identificar gens comuns que segueixin una expressió gradual en aquesta seqüència (i que presentin un canvi d'expressió o *fold change* > 1,5 en cada transició). Seguint els criteris de la metodologia SAM descrits en l'apartat 4.2; els gens diferencialment expressats (n=277) van ser sotmesos a la metodologia PAM per a la obtenció d'un classificador amb el mínim nombre de gens i capaç de categoritzar cada fibroblast del conjunt de dades inicials (conjunt de dades MB) en funció de l'expressió dels seus gens.

La metodologia de predicció d'anàlisi de microarrays (PAM) classifica les mostres en funció de les dades d'expressió gènica emprant el mètode "*nearest shrunken centroid*" (centroide reduït més proper). El *centroid* és la mitjana de l'expressió gènica de cada gen en cada classe dividit per la desviació estàndard de la mateixa classe (en aquest cas, classe=tipus de fibroblasts). El mètode de classificació de *nearest centroid* (*centroid* més proper), agafa el perfil d'expressió gènica d'una

mostra i el compara amb els centroids de cada classe. La classe que presenta el valor de centroid més proper a la mostra, és la classe predita per aquesta mostra (Tibshirani, Hastie et al. 2002). El mètode redueix el *centroid* de cada classe cap a un *centroid* general per a totes les classes i ho fa amb un valor lliandar. Les avantatges d'aquesta reducció són: 1) fer el classificador més acurat reduint el nombre de gens inespecífics i 2) fer una selecció automàtica de gens. La tria del valor lliandar pot ser feta mitjançant el mètode PAM, que realitza 10-validacions creuades amb uns valors de lliandar diferent. Les mostres són dividides en 10 parts iguals, i per a cada part, el classificador es construeix amb les 9 parts restants i és provat en la part sobrant. Això es fa per un nombre de valors de lliandars diferents i la tasa d'error de mala classificació per a cada validació creuada és reportat per a cada lliandar. Es tira aquell lliandar que proporcioni la tasa d'error de mala classificació més baixa (<http://statweb.stanford.edu/~tibs/PAM/Rdist/howwork.html>). Així doncs, el mètode PAM proporciona un llistat de gens significatius (classificador) l'expressió dels quals caracteritza cada classe de fibroblasts

El classificador obtingut en el conjunt de dades MB, és sotmès a una validació externa per veure quina capacitat de classificació té en dades d'expressió diferents a les d'origen. Per a fer-ho, es seleccionen diferents conjunts de dades d'expressió gènica (GSE) de la base de dades pública GEO (*Gene Expression Omnibus*- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) que estan associades amb diferents experiments i plataformes d'arrays.

Els GSE seleccionats:

- GSE31279: Informació de 24 mostres obtingudes per microscopia de captura làser (10 mucoses normals, 10 d'estroma tumoral i 4 d'estroma de metàstasi).
- GSE22598: 17 parelles de mostres corresponent al teixit normal de la mucosa colònica i al corresponent carcinoma colorectal del mateix pacient.
- LP: dades d'expressió de resultats obtinguts d'una altra tesi elaborada en el mateix grup i corresponent a 19 carcinomes colorectals i 21 metàstasis hepàtiques.

5.1.1.-Desenvolupament del classificador predictor de recurrència

A partir dels gens que comprenen la signatura de progressió en fibroblasts (FGP), es procedeix al desenvolupament d'un classificador amb capacitat per a predir recurrència en un conjunt de dades d'expressió gènica independent a l'usat per a definir la signatura. A partir del GSE14333, amb els gens de FGP i amb la metodologia PAM, s'identifiquen gens rellevants capaços de

classificar entre pacients recurrents i no recurrents. La validació interna (per a comprovar l'especificitat i sensibilitat del classificador) és fa mitjançant el mètode de validació creuada. La validació creuada és una tècnica utilitzada per avaluar els resultats d'una anàlisi estadística i garantir que són independents entre les dades d'entrenament (dades amb les que s'origina el classificador) i de prova (dades amb les que s'avalua el poder del classificador i que són independents a les d'entrenament), i s'usa en anàlisis on el que es pretén és estimar com de precís és un model predictiu. En aquest cas, la validació creuada es fa seguint el mètode de deixant-ne un fora (*Leave-one-out cross validation*), que implica separar les dades de manera que per a cada iteració tinguem una sola mostra com a prova i tota la resta comprenent les dades d'entrenament (per a dissenyar el classificador) (Boulesteix, Strobl et al. 2008). Posteriorment es realitza una validació externa emprant el GSE17538.

Amb els gens obtinguts en el classificador es calcula la unitat tipificada (z-score) i és classifiquen els pacients en alt o baix risc segons l'expressió obtinguda. La validació es fa en:

- GSE17538 : Informació de 111 pacients (50 estadis II i 61 estadis III)
- GSE33113: Informació de 90 pacients d'estadi II

Aquests conjunts de dades van ser triats perquè les dades corresponien a l'expressió de mostres de tot el tumor sense enriquiment de cèl·lules tumorals i amb una certesa d'un mínim percentatge estromal del 30%. Donat que alguns casos eren comuns entre GSE17538 i GSE14333, aquests van ser exclosos de la validació.

5.2. Desenvolupament del classificador estromal a partir dels gens diferencials entre NCF i CAF-PT.

El segon classificador definit s'obté a partir del llistat de gens diferencials entre els fibroblasts normals i els associats a carcinoma. Es realitza un estudi de predicció de classes per a identificar aquells que tinguin una major capacitat per a predir recurrència i que puguin definir un classificador. Es pretén també que aquest classificador sigui d'un nombre de gens reduït per tal de poder valorar-ho a nivell de laboratori amb la tècnica de la qRT-PCR, molt més assequible econòmicament i a nivell pràctic.

El procés per a desenvolupar el classificador requereix del llistat de gens propi (gens d'expressió diferencial entre NCF i CAF-PT) i també de dades d'expressió gènica d'una sèrie de pacients d'unes característiques determinades (en el nostre cas afectes de càncer colorectal) i que a més contingui informació clínica sobre l'esdeveniment que volem predir (recurrència o no recurrència).El

conjunt de dades per a desenvolupar el classificador predictor de recurrència és també el GSE14333. Descrit al 2009 per Jorissen *et al* (Jorissen, Gibbs *et al.* 2009), aquest conjunt de dades correspon als perfils d'expressió gènica de 290 pacients amb càncer colorectal (estadis I-IV) que van ser obtinguts mitjançant la plataforma d'Affymetrix *Human Genome U133Plus 2.0 arrays*. La quantitat de mostres disponibles i la seva informació clínica, així com la plataforma d'arrays amb la que es va dur a terme l'anàlisi foren els principals criteris per a la seva selecció. Tot i així, per a poder desenvolupar un classificador adequat als requeriments en aquest objectiu de la tesi, el conjunt de dades va ser sotmès a un filtratge per eliminar els estadis I i IV i tots aquells casos en els que el seguiment fos inferior a 3 anys o no hi hagués informació sobre la recurrència.

Després d'aquest filtratge el nombre final de pacients va quedar en 135 i les dades clíniques i demogràfiques disponibles són les que es presenten resumides en la taula M5.

GSE14333

Nombre pacients en el cohort		135
Sexe	<i>Home</i>	76 (56.3%)
	<i>Dona</i>	59 (43.7%)
Mitjana d'edat		64.38
Estadiatge	<i>Estadi I</i>	-
	<i>Estadi II</i>	64 (47.4%)
	<i>Estadi III</i>	71 (52.6%)
Localització	<i>Còlon</i>	118 (87.4%)
	<i>Recte</i>	17 (12.6%)
Quimioteràpia adjuvant	<i>si</i>	69 (51.1%)
	<i>no</i>	66 (48.9%)
Recurrència	<i>si</i>	48 (35.6%)
	<i>no</i>	87 (64.4%)

Taula M. 5. Característiques clíniques i demogràfiques del conjunt de dades GSE14333. GSE emprat per a la construcció del classificador. Dels 209 casos inicials, el criteri aplicat ens va deixar amb 135 casos de pacients en estadi II o III.

El procediment bioinformàtic per al desenvolupament del classificador predictiu de recurrència en estadis II-III a partir del llistat de gens desregulats entre fibroblasts normals i associats a carcinoma va ser dut a terme per la Unitat de Biomarcadors i susceptibilitat de l'Institut Català d'Oncologia de l'Hospitalet i de l'Institut d'investigació biomèdica de Bellvitge, de la manera descrita a continuació:

1.-Obtenció dels valors d'expressió *RMA* per als gens desregulats entre NCF i CAF-PT.

2.-Mantenint la proporció entre els estadis II i III, dividir aleatòriament als 135 pacients del GSE14333 en 3 grups iguals. Dos dels tres grups son combinats i denominats com a com a conjunt de dades d'entrenament (*Training dataset*), i serà emprat per a desenvolupar el classificador. El grup restant és denominat com conjunt de dades de prova (*Test Dataset*) i serà fet servir per a validar el classificador obtingut).

3.-Aplicació d'un mètode de regressió logística binària (GLMNET) per a cada un dels gens del llistat inicial fent servir la recurrència com a variable dependent. Selecció dels gens amb un p-valor <0,01 per a estimar un model de regressió logística multivariant en el conjunt de dades d'entrenament GSE14333, i posteriorment en el conjunt de dades de prova.

4.- Repetició del procés 1000 vegades (fent noves particions dels grups però sempre mantenint la proporció d'estadis) i obtenció de 1000 classificadors preliminars diferents. Els diferents gens candidats es van ordenar en funció del percentatge en el que apareixien en les diferents signatures intermèdies. Es van seleccionar aquells que estaven presents en més d'un 50% d'aquestes (sense tenir en compte el coeficient de regressió).

5.- Obtenció del classificador final i validació interna.

L'esquema del desenvolupament del classificador, així com de la seva posterior validació es troba en format gràfic en l'annex 2.

5.2.1.-Validació del classificador de 5 gens.

5.2.1.1.-Validació *In silico*

L'aplicabilitat i la robustesa dels gens identificats en el classificador com a predictius de recurrència van ser avaluats en el conjunt de dades d'origen GSE14333 (validació interna) i en diferents conjunts de dades independents (validació externa) obtinguts també de la base de dades públiques GEO i que seguien el següent criteri:

- Haver estat analitzades amb la plataforma *Affymetrix Human Genome U133Plus 2.0 arrays* (plataforma que presenta major similaritat de sondes amb la usada en aquesta tesi: *Affymetrix GeneChip®Human Gene 1.0 ST Array*).
- Perfils d'expressió corresponents a tot el teixit tumoral sense que s'hagi fet enriquiment de cèl·lules epitelials (per exemple, per tècnica de captura làser) per tal d'assegurar una presència mínima de estroma del 20%.

Per a poder comprovar que l'expressió dels gens del classificador és principalment estromal es va dur a terme també una validació negativa en la que el poder predictiu va ser valorat en un parell de conjunts de dades corresponents a perfils d'expressió de cèl·lules epitelials tumorals (GSE18105 i GSE21510) obtingudes per la tècnica de microscopia de captura làser (LCM).

La informació clínica o demogràfica dels pacients que formen part de cada conjunt de dades en la majoria de casos no són proporcionades per l'investigador en qüestió i això en limita el seu anàlisi. Per tal de poder augmentar el nombre de casos amb els que valorar si el classificador té un bon poder predictiu, es van agrupar els pacients dels GSE17538 i GSE33113 amb altres dos no analitzats individualment (GSE26882 i GSE31595).

GSE26882 → 114 pacients; estadi I:6; estadi II:63; estadi III:45; recurrents:43; no recurrents:71

GSE31595 → 34 pacients; estadi II:17; estadi III:17; no-recurrents: 26; recurrents:8

5.2.1.2.- Validació per la tècnica de qRT-PCR

En aquesta part del projecte es va voler avaluar el poder predictiu de l'expressió dels gens en mostres de teixit tumoral procedents de biòpsies de pacients amb càncer colorectal estadis II i III; mitjançant la tècnica de la qRT-PCR.

L'estudi s'ha fet de manera retrospectiva en 142 mostres d'ARN de pacients amb CCR, disponibles en el Banc de Tumors de l'Institut Català d'Oncologia de l'Hospitalet

El criteri per a la inclusió de les mostres a l'estudi va ser:

- Seguiment superior a 3 anys o recurrència
- CCR en estadis II i III
- Quantitat i qualitat del ARN en condicions per a poder realitzar les anàlisis.

5.2.2.-Extracció d'ARN

El procés d'extracció d'ARN de les mostres incloses en l'estudi es va fer a partir d'una peça quirúrgica del tumor primari que va ser disgregada mecànicament amb l'ajut d'un bisturí i posteriorment sotmesa al mateix protocol d'extracció per TRIzol® descrit en l'apartat corresponent a les línies cel·lulars (Materials i mètodes 3.1). Tot i l'estat de criopreservació (-80°C) dels ARNs cedits es va avaluar la seva integritat mitjançant gels d'agarosa i es van quantificar per NanoDrop. Tots els ARNs van ser ajustats a una concentració de 100ng/μl abans de ser retrotranscrits.

5.2.3.-Retrotranscripció

El procés de retrotranscripció va ser realitzat segons el protocol per a la retrotranscriptasa *M-MLV* (apartat 3.2) partint d'1µl ARN a 100ng/µL. No obstant, aquesta quantitat inicial va haver de ser incrementada (triplicada) en alguns casos en veure que l'expressió dels gens endògens estava molt per sota dels límits de detecció de la resta de mostres.

Com a ARN calibrador (per a realitzar les corbes estàndard per a cada gen) es va emprar una barreja d'ARN de fibroblasts associats a carcinoma (CAF-PT) i una altre de fibroblasts normals (NCF); tots ells provinents dels propis cultius primaris. La retrotranscripció per aquest tipus de mostres es va fer partint d'1µl d'ARN ajustat a 1000ng/µl i posteriorment fent dilucions seriades del material retrotranscrit obtenint els següents punts: 1000, 500, 250, 100 i 10. Es va assegurar que el volum de corba estàndard fos suficient per a ser aplicat en totes les anàlisis i reduir així la variabilitat en els resultats.

5.2.4.-Anàlisi de l'expressió per qRT-PCR

El disseny dels encebadors emprats en la qRT-PCR per a cada gen de la signatura, més el dels gens endògens es va fer seguint l'estratègia mencionada prèviament (apartat 3.3.1). En tots els casos la mida del producte amplificat originat no superava els 200 parells de bases per tal d'assegurar l'amplificació del gen encara que el material genètic estigués degradat.

A causa de la necessitat que totes les mostres poguessin ser comparables entre elles i donada la impossibilitat que fossin analitzades en una mateixa placa, es va calcular per al calibrador o mostra de referència (del qual sempre se'n afegia la mateixa quantitat coneguda), la recta de regressió o corba estàndard per a cada un dels gens analitzats i en cada placa, comprovant que l'eficiència de la reacció fos propera a 2 (+/- 0,2). La recta patró final per a cada gen es va obtenir calculant la mitjana dels valors obtinguts en cada reacció. La quantitat de l'ADNc de totes les mostres va ser extrapolat a partir d'aquesta única recta. La seqüència dels encebadors dels 5 gens del classificador es mostren en l'annex 1.

5.2.5.-Selecció dels gens endògens i validació

En la comparació de l'expressió gènica entre diferents mostres és crucial considerar les variacions experimentals que poden sorgir com pot ser la quantitat inicial de material, el procediment d'extracció de l'ARN i les eficiències de la retrotranscripció. Per a solucionar aquest fet, la precisió de la qRT-PCR recau en la normalització amb un gen endogen com a control. Un dels requisits per a considerar un gen endogen com a idoni és que s'ha d'expressar adequadament en el teixit

d'interès, però sobretot ha de mostrar una mínima variabilitat d'expressió entre mostres. Comunament, la normalització del gen diana amb un estàndard endogen és aplicada. No obstant, diferències en els nivells d'expressió del gen de referència en diferents teixits o estats patològics s'han vist reportats i és necessari cercar gens endògens que s'adeqüin al tipus de mostra que es va a analitzar. Per tal de poder decidir els millors gens per a emprar-los com a gens endògens per a normalitzar les dades d'expressió de l'ADNc del teixit de tumor de còlon d'aquest estudi, es va procedir a fer un sondatge entre diferents possibles gens de referència trobats en la literatura per tal d'utilitzar el més adient per al tipus de mostra en estudi:

- **ACTB, GAPDH i B2M:** clàssicament considerats com a bons estàndards però envoltats de controvèrsia pel que fa al seu ús ja que els seus nivells d'expressió poden variar en funció de les condicions experimentals o l'estat de la malaltia.
- **PMM1:** La seva variabilitat està descrita (juntament amb la de 20 gens endògens més) en un estudi de la variabilitat en diferents tipus de teixits tumorals i normals (Rubie, Kempf et al. 2005). Els autors descriuen *PMM1* juntament amb *ACTB* com dos dels gens amb menys variabilitat entre mostres de càncer colorectal i el seu corresponent teixit normal.
- **HPRT1, PPIA i IPO8 :** Segons Sorby et al. (Sorby, Andersen et al. 2010), aquests tres gens sorgeixen com a candidats a gens de referència en càncer de còlon. En aquest estudi analitzen la idoneïtat de 16 gens candidats mitjançant les eines bioinformàtiques *geNorm* (Vandesompele, De Preter et al. 2002) i *NormFinder* (Andersen, Jensen et al. 2004) que valoren la variabilitat i estabilitat. Descriuen la combinació *HPRT1/PPIA* i la *IPO8/PPIA* com les més idònies per a normalitzar dades d'expressió gènica en estudis amb mostres de càncer de còlon metastàtic i no metastàtic.
- **RPS13:** gen que codifica per a una proteïna ribosomal component de la subunitat 40S. L'elecció d'aquest gen sorgeix del llistat de gens dels diferents conjunts de dades treballats (GSE14333, GSE17538 i GSE33113) ordenats segons la seva variabilitat. Ens interessa saber aquells gens amb menys variabilitat d'expressió entre recurrents i no recurrents. *RPS13* es troba dins dels gens menys variables en els 6 grups (3 conjunts de dades per 2 grups cada un) estant entre els 326 primers amb menys variabilitat. Aquest gen també està descrit com a poc variable a (Andersen, Jensen et al. 2004).

Els encebadors dissenyats per a amplificar tots aquests gens endògens es mostren en l'annex 1.

Les condicions de la reacció per a la amplificació dels gens endògens es van ajustar per a tenir la mateixa T^a que la dels gens diana i així poder ser avaluats alhora en la placa de 384 pous minimitzant la variabilitat.

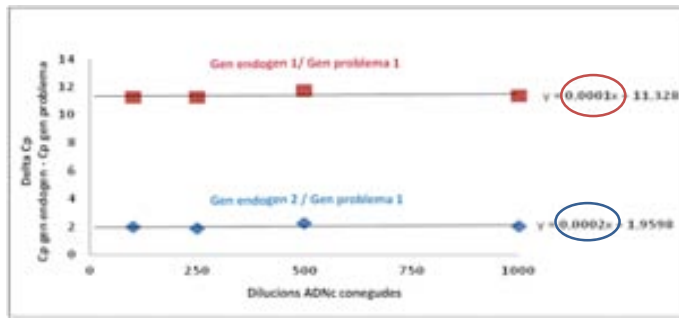
Per a poder decidir els gens endògens o *housekeeping* més idonis per a la normalització de les mostres en estudi es va procedir a avaluar l'estabilitat i variabilitat de la seva expressió per qRT-PCR en un grup de 10 mostres de teixit tumoral de les mateixes característiques que les de la sèrie a analitzar. Els resultats obtinguts en valor de C_p foren carregats en un programa informàtic disponible a la xarxa: <http://leonxie.com/referencegene.php> que avalua la variabilitat i estabilitat de l'expressió d'aquests gens basant-se en 4 *softwares* diferents: Mètode comparatiu de *Delta Cp* (Silver, Best et al. 2006), *BestKeeper* (Pfaffl, Tichopad et al. 2004), *Normfinder* (Andersen, Jensen et al. 2004), *Genorm* (Vandesompele, De Preter et al. 2002); i identifica el millor o la combinació dels millors per a la normalització de les mostres de la sèrie. La utilització de dos gens endògens ens va permetre homogeneïtzar les variacions entre mostres que poguessin existir i donar més robustesa a l'anàlisi (Vandesompele, De Preter et al. 2002). El factor de normalització o mitjana geomètrica dels dos gens endògens seleccionats (PMM1 i ACTB) va servir per a normalitzar els valors d'expressió dels altres gens.

Tot i que teòricament el material retrotranscrit i emprat en l'anàlisi d'expressió per qRT-PCR era el mateix en totes les mostres, abans de procedir a la normalització de les dades es realitzà un estudi de la linearitat de l'expressió entre els gens endògens i els diferents gens problema.

Es va comprovar que existís una relació lineal entre el gen problema i el gen endogen en cada punt de la dilució (C_p d'expressió). La diferència de C_p entre el gen problema i el gen endogen en cada punt de la dilució ha de ser constant ($m < 0,2$) (figura M13).

D'aquesta manera es van poder afegir a l'estudi aquelles mostres a les que es va haver d'augmentar la quantitat d'ARN a retrotranscriure per donar inicialment valors d'expressió molt baixos, fins i tot en els gens de referència.

2
2
2
2
2
2
2



Exercici 2: Les veïnes de la ciutat de Barcelona són molt nombroses i moltes d'elles són molt antigues. (u) a partir d'aquesta informació, el grup de treball ha decidit estudiar la presència de l'alel 5' de l'gen problema 1 en una mostra de 1000 individus. Els resultats són els següents:

2

1) L'alel 5' de l'gen problema 1 és dominant i el 25% de la població ho porta. Calculeu la freqüència de l'alel 5' de l'gen problema 1 i la freqüència de l'alel 3' de l'gen problema 1.

En aquest exercici, el grup de treball ha decidit estudiar la presència de l'alel 5' de l'gen problema 1 en una mostra de 1000 individus. Els resultats són els següents: 250 individus porten l'alel 5' de l'gen problema 1, 750 individus porten l'alel 3' de l'gen problema 1. Calculeu la freqüència de l'alel 5' de l'gen problema 1 i la freqüència de l'alel 3' de l'gen problema 1.

2
2
2
2
2

$$p = \frac{2 \times \text{Alel 5'} + \text{Alel 3'}}{2 \times \text{Total}} = \frac{2 \times 250 + 750}{2 \times 1000}$$

- (1) p → (u) freqüència de l'alel 5'
- X → (u) freqüència de l'alel 3'
- z → (u) freqüència de l'alel 5' i 3'

En aquest exercici, el grup de treball ha decidit estudiar la presència de l'alel 5' de l'gen problema 1 en una mostra de 1000 individus. Els resultats són els següents: 250 individus porten l'alel 5' de l'gen problema 1, 750 individus porten l'alel 3' de l'gen problema 1. Calculeu la freqüència de l'alel 5' de l'gen problema 1 i la freqüència de l'alel 3' de l'gen problema 1.

- 54) (u) Calculeu la freqüència de l'alel 5' de l'gen problema 1 i la freqüència de l'alel 3' de l'gen problema 1.
- 55) (u) Calculeu la freqüència de l'alel 5' de l'gen problema 1 i la freqüència de l'alel 3' de l'gen problema 1.

55W

3. Càlcul del Factor de Normalització per a cada mostra: mitjana geomètrica del valor dels dos gens endògens (*PMM1* i *ACTB*).
4. Normalització de la quantitat d'ADNc de cada gen fent el quocient amb la mitjana geomètrica del factor de normalització.
5. Transformació dels valors en \log_2 i càlcul de la unitat tipificada.

El sumatori de les unitats tipificades de cada gen en una mostra és el que dóna el valor global de l'expressió de la signatura/classificador i el que determina el grup al que pertany segons el punt de tall establert. Les mostres es classificaran en alt o baix risc segons el seu valor d'expressió respecte el punt de tall aplicat. Valors d'expressió superiors al punt de tall seran considerats d'elevada expressió i per tant de major risc; contràriament, valors per sota del punt de tall correspondran a mostres de baixa expressió i per tant menor risc.

6. ANÀLISI ESTADÍSTIC I DE SUPERVIVÈNCIA

Les anàlisis de les dades obtingudes en aquest treball es van realitzar amb el paquet estadístic SPSS 21.0 i es van realitzar diferents tests estadístics en funció de les dades a analitzar. En els assajos funcionals *in vitro*, per a determinar si existien diferències significatives entre dos grups de mostres independents en relació a la variable d'estudi es va utilitzar el test estadístic U de Mann-Whitney. ($p < 0,05$).

Pel que fa a la valoració de la robustesa dels classificadors descrits, el poder predictiu de recurrència dels gens del classificador en el conjunt de dades d'origen s'avalua mitjançant l'anàlisi de la corba ROC ("*Receiver Operating Characteristics*"). Es tracta d'una representació gràfica de la sensibilitat enfront (1-especificitat) per a un sistema classificador binari que proporciona eines per a seleccionar els models més òptims. L'indicador més usat és l'àrea sota la corba o **AUC** ("*Area Under the Curve*") que es pot interpretar com la probabilitat que un test classifiqui correctament una mostra a l'atzar. Com més proper a 1 sigui el valor de la AUC, major és la probabilitat d'una classificació correcta. Un valor d'AUC de 0,5 implica una predicció que no és millor que la que es donaria per atzar. Per a valorar l'eficàcia real del classificador com a test diagnòstic, i saber si realment la seva aplicació en la població proporciona valor predictiu, es va avaluar la sensibilitat i l'especificitat. Seguint l'estadística Bayesiana es van calcular també les probabilitats a *posteriori*, per a saber si l'aplicació del predictor de recurrència afegeix informació significativa a la probabilitat *a priori* coneguda pels factors clàssics de diagnòstic.

l'anàlisi univariant i amb la finalitat d'aïllar grups de variables (edat, sexe, ...) que poguessin també influir en el temps a la progressió, es realitzà una anàlisi multivariant segons el model de regressió múltiple de Cox.

Per a esbrinar el potencial clínic de l'aplicabilitat de l'expressió global dels gens del classificador es van avaluar les probabilitats *post-test* a la recurrència i es van comparar amb la probabilitat inicial d'acord amb la proporció d'esdeveniments esperada (prevalença de la recurrència).

Aquests resultats van acompanyats del quocient de probabilitat o *likelihood ratio* (LR) que és la probabilitat que un resultat sigui l'esperat (recurrència) en el pacient amb alta expressió, comparat amb la probabilitat que el mateix resultat sigui l'esperat (recurrència) en un pacient amb baixa expressió.

LR(+): quocient entre els positius vertaders i els falsos positius.

LR(-): quocient entre els falsos negatius i els veritables negatius.

7. VALORACIÓ DE L'ESPECIFICITAT ESTROMAL DEL CLASSIFICADOR

7.1. Anàlisi de l'especificitat de l'expressió dels gens del classificador

7.1.1.-Especificitat cel·lular

L'expressió dels gens del classificador en altres tipus cel·lulars diferents als fibroblasts es va voler avaluar per comprovar-ne la seva especificitat.

Per qRT-PCR es van analitzar els nivells d'expressió dels diferents gens en 13 línies cel·lulars de càncer colorectal diferents: DLD-1, SW620, SW480, SW1116 HCT116, HT-29, RKO, LoVo, Caco2, KM12C, Colo-205, HCT-15 i Co115; i en els fibroblasts aïllats en cultiu primari. La seva expressió va ser comparada emprant els valors normalitzats pel gen endogen *GAPDH*.

Adicionalment, es van emprar les dades d'expressió de microarrays del GSE39396 per a conèixer l'expressió dels gens del classificador en altres tipus cel·lulars constituents d'un tumor de còlon. El GSE39396, descrit pel grup d'E. Batlle (Calon, Espinet et al. 2012), conté la informació gènica de 4 poblacions cel·lulars, aïllades pel mètode FACS en 6 pacients amb càncer colorectal: EPCAM+ cèl·lules epitelials, CD45+ cèl·lules inflammatòries, CD31+ cèl·lules endotelials i FAP α + fibroblasts associats a carcinoma.

7.1.2.-Implicació de la transició epiteli-mesènquima (TEM) en l'expressió dels gens del classificador.

Per a conèixer si l'expressió dels gens seleccionats incrementava en les cèl·lules epitelials patint el fenomen de transició epiteli-mesènquima, la seva expressió, així com la de gens clàssicament relacionats amb TEM com ara: *SNAIL1*, *ZEB1*, *SLUG*, *VIM* va ser avaluada en unes dades d'expressió de microarrays resultants del co-cultiu de les cèl·lules tumorals DLD-1 i dels fibroblasts de la mucosa colonica normal (NCF) durant 5 dies (experiment de microarrays emprat per a un altre projecte dins del mateix grup). També s'afegiren a aquest anàlisi les dades d'expressió dels monocultius i dels microarrays dels fibroblasts associats a carcinoma (CAF-PT) emprats per a definir el classificador. Es van avaluar els resultats mitjançant la representació gràfica en un dendograma mostrant les agrupacions segons la diferència d'expressió. Les mostres es van agrupar segons la distància euclídia i els gens segons el valor de correlació.

Paral·lelament, les línies tumorals DLD-1 i SW620, cultivades en medi de cultiu estàndard, van ser estimulades amb HGF (10ng/ml) durant 8 hores. L'extracció del seu ARN es va fer seguint el protocol esmentat prèviament (apartat 3.1) i l'expressió dels gens del classificador i de gens involucrats en la TEM com *SNAIL1*, *ZEB1* i *SLUG* va ser mesurada mitjançant qRT-PCR.

7.1.3.-Estimació de la proporció de fibroblasts presents en la mostra. Signatura de col·làgens.

La desconeixença de la proporció de fibroblasts presents en les mostres analitzades per qRT-PCR plantejava el repte d'estimar-ne la seva quantitat per tal de fer una millor interpretació dels resultats. Els tres gens d'expressió específica de fibroblasts amb menys variabilitat (desviació estàndard < 0,3) entre NCF i CAF-PT van ser seleccionats per a definir la signatura de col·làgens per a determinar la quantitat de fibroblasts en la mostra. Dels gens específics de fibroblasts descrits a GSE39396, els gens amb expressió més alta en fibroblasts respecte els altres subtipus cel·lulars, i amb menor variabilitat (desviació estàndard < 0,3) van ser els escollits per a constituir la signatura de col·làgens. El valor d'expressió de col·lagen o puntuació, es calcula de la mateixa manera que l'expressió del classificador (apartat 5.3). Per a comprovar que en les mostres la presència de cèl·lules epitelials tumorals no disminuïa l'eficiència de l'extracció del material genètic dels fibroblasts, es va procedir a l'elaboració d'una corba de col·làgens en una sèrie de mostres amb percentatges variables de fibroblasts i cèl·lules tumorals conegudes.

- 4 línies de cultius primaris de fibroblasts (NCF i CAF-PT) i 4 línies epitelials de càncer colorectal van ser crescudes en cultiu fins a assolir la confluència d'un 80-90%.
- Tripsinització, barreja de les cèl·lules del mateix tipus (epitelials per una banda i fibroblasts per una altra) i comptatge amb la cambra de Neubauer (apartat 1.1).
- Elaboració d'una corba de dilucions:

% Fibroblasts	Nombre fibroblasts	Nombre cèl·lules epitelials
0%	---	1.000.000
10%	100.000	900.000
30%	300.000	700.000
50%	500.000	500.000
100%	1.000.000	---

- Ajuntar les cèl·lules epitelials i els fibroblasts comptats en un mateix tub i centrifugar 5' a 1000.r.p.m. Descartar sobrenedant.
- Extracció de l'ARN a partir dels pellets cel·lulars (emprant el mètode de TriZol® més columna), quantificació i retrotranscripció (apartats 3.1 i 3.2).
- Valoració de l'expressió dels gens de la signatura de col·làgens i dels gens del classificador en els diferents punts de dilució usant la tècnica de la qRT-PCR.
- Correlació percentatge de fibroblasts- signatura col·làgens/classificador.

7.1.3.1.- Valor pronòstic de la signatura de col·làgens.

L'expressió de la signatura de col·làgens va ser determinada en les 142 mostres de la cohort analitzada per qRT-PCR i la seva capacitat per predir recurrència va ser mesurada amb el valor de l'àrea sota la corba ROC, i amb les probabilitats *a posteriori* (estadística Bayesiana)

La seva associació amb la supervivència lliure de malaltia va ser avaluada mitjançant les corbes de *Kaplan-Meier* i la funció estadística *Log-Rank*.

RESULTATS

RESULTATS

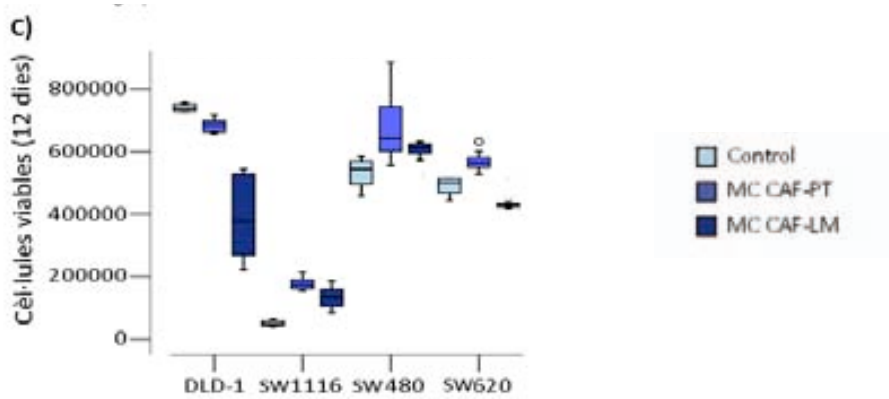
OBJECTIU 1:

Determinar com es modifiquen les capacitats funcionals i transcripcionals de les cèl·lules de carcinoma colorectal en funció de la interacció amb els fibroblasts amb els que conviurà al llarg de la progressió tumoral; i estudiar el perfil transcripcional d'aquests fibroblasts per a determinar si existeix un programa transcripcional comú associat a progressió tumoral i pronòstic.

La primera part dels resultats d'aquest primer objectiu es troba complementada en format article en l'apartat d'annexes (annex 3); i la segona constitueix un segon article sotmès i pendent d'acceptació en el moment de redacció de la memòria (***Carcinoma-associated fibroblast transcriptomic program predicts clinical outcome in stage II/III colorectal cancer.*** Molecular Cancer)

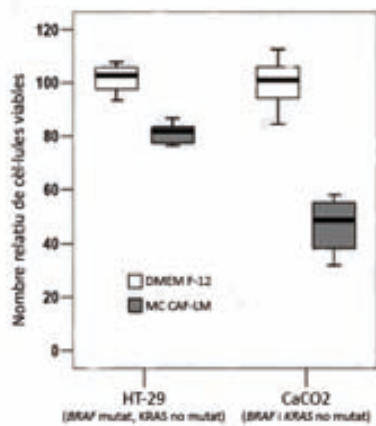
1.1. Aïllament i establiment de cultius primaris de fibroblasts .

Cultius primaris de fibroblasts de la mucosa colònica normal adjacent al tumor primari (NCF), del tumor primari (CAF-PT) i de la metàstasi hepàtica (CAF-LM) de pacients amb càncer colorectal van ser establerts satisfactòriament obtenint un total de 15 NCFs, 15 CAF-PT (per a 13 pacients es van aconseguir mostres aparellades) i 11 CAF-LM. La comprovació que les cèl·lules aïllades en cultiu eren fibroblasts es va fer inicialment per observació microscòpica per a verificar que la seva morfologia es corresponia amb l'estructura allargada i fusiforme descrita per aquest tipus cel·lular. A la figura R1.1 es mostren les imatges microscòpiques d'alguns dels cultius de fibroblasts aïllats. Seguidament, i de manera rutinària es va fer una caracterització molecular de marcadors clàssics mesenquimals com la vimentina, vinculina, N-cadherina i α -SMA) per assegurar que les cèl·lules aïllades fossin realment fibroblasts i de E-cadherina i VE-cadherina per excloure que no hi hagués contaminació per altres tipus cel·lulars com cèl·lules epitelials i endotelials.



2

El treball a continuació s'ha desenvolupat amb l'objectiu d'avaluar l'eficàcia dels diferents tractaments en funció de la presència o absència de mutacions en els gens BRAF i KRAS. Per a això, s'han utilitzat quatre línees cel·lulars: DLD-1, SW1116, SW480 i SW620. Els resultats mostren que el tractament amb MC CAF-LM provoca una disminució significativa del nombre de cèl·lules viables respecte al control i al MC CAF-PT, especialment en les línees DLD-1 i SW1116.

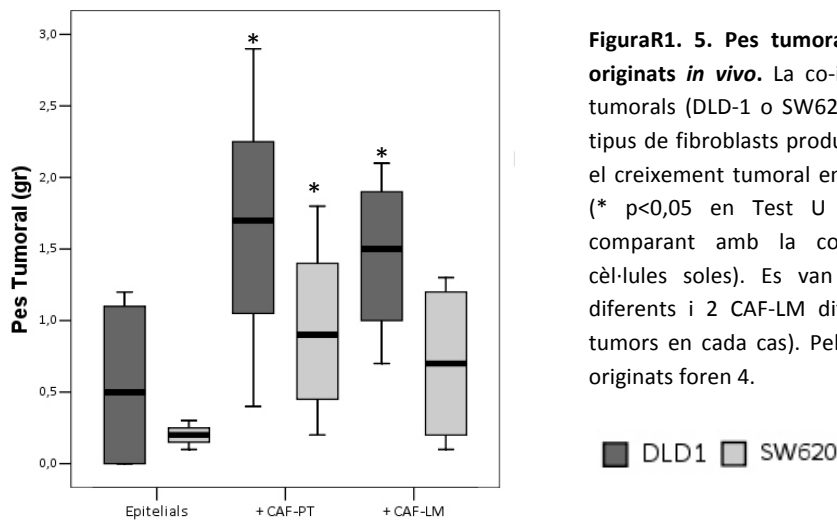


El treball a continuació s'ha desenvolupat amb l'objectiu d'avaluar l'eficàcia dels diferents tractaments en funció de la presència o absència de mutacions en els gens BRAF i KRAS. Per a això, s'han utilitzat dues línees cel·lulars: HT-29 i CaCO2. Els resultats mostren que el tractament amb MC CAF-LM provoca una disminució significativa del nombre de cèl·lules viables respecte al control i al DIMEM F-12, especialment en la línia CaCO2.

2

El treball a continuació s'ha desenvolupat amb l'objectiu d'avaluar l'eficàcia dels diferents tractaments en funció de la presència o absència de mutacions en els gens BRAF i KRAS. Per a això, s'han utilitzat dues línees cel·lulars: HT-29 i CaCO2. Els resultats mostren que el tractament amb MC CAF-LM provoca una disminució significativa del nombre de cèl·lules viables respecte al control i al DIMEM F-12, especialment en la línia CaCO2.

2



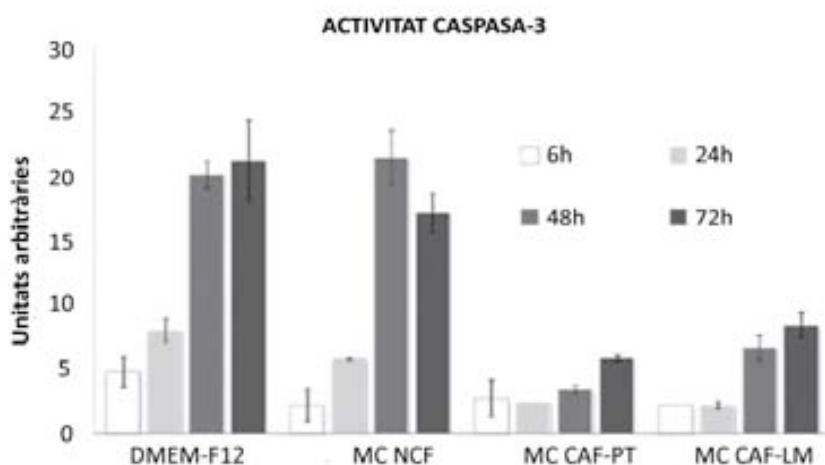
1.2.2.- Els productes secretats pels CAFs protegeixen de la mort cel·lular per apoptosi.

La disminució en la proliferació que produïen els medis condicionats de fibroblasts de metàstasi hepàtica anava acompanyada de la presència de nombroses cèl·lules flotants en el medi. Aquesta observació va fer pensar en la possibilitat que aquests medis condicionats fossin responsables de provocar mort cel·lular. Per a comprovar aquest fet, es va valorar l'apoptosi tant en les cèl·lules adherides com en les cèl·lules flotants presents en el medi. L'assaig de l'activitat de la caspasa-3 en cèl·lules DLD-1 tractades amb els diferents medis condicionats mostrà uns nivells d'activitat caspasa-3 que eren inferiors en presència dels medis condicionats dels fibroblasts del tumor primari i de la metàstasi, en comparació amb els produïts en presència de medi estàndard o medi dels fibroblasts normals. Aquests resultats suggerien doncs, que els factors solubles secretats pels CAF-PT i pels CAF-LM semblaven protegir de la mort cel·lular per apoptosi (Figura R1.6).

1.2.3.-El medi condicionat dels fibroblasts associats a la metàstasi hepàtica produeix aturada del cycle cel·lular en fase G₂/M.

Els resultats obtinguts demostraven que la disminució en el nombre de cèl·lules viables en presència de medi condicionat de fibroblasts de metàstasi hepàtica no era deguda a una major mort cel·lular per apoptosi. Així doncs, es va voler avaluar si el que estava succeint era un alentiment del cycle cel·lular. Mitjançant el mètode de quantificació d'ADN per citometria de flux amb marcatge amb iodur de propidi, es va valorar en quina fase del cycle cel·lular es trobaven les DLD-1 estimulades amb els diferents medis durant 48 i 96h. Mentre que les cèl·lules DLD-1 en

presència de MC de fibroblasts normals i de fibroblasts associats a carcinoma tenien el cicle aturat majoritàriament en G_0/G_1 , les que havien estat en contacte amb medi condicionat dels fibroblasts de la metàstasi hepàtica es trobaven en major proporció aturades a G_2/M , principalment a les 48h. (Taula R1.2).



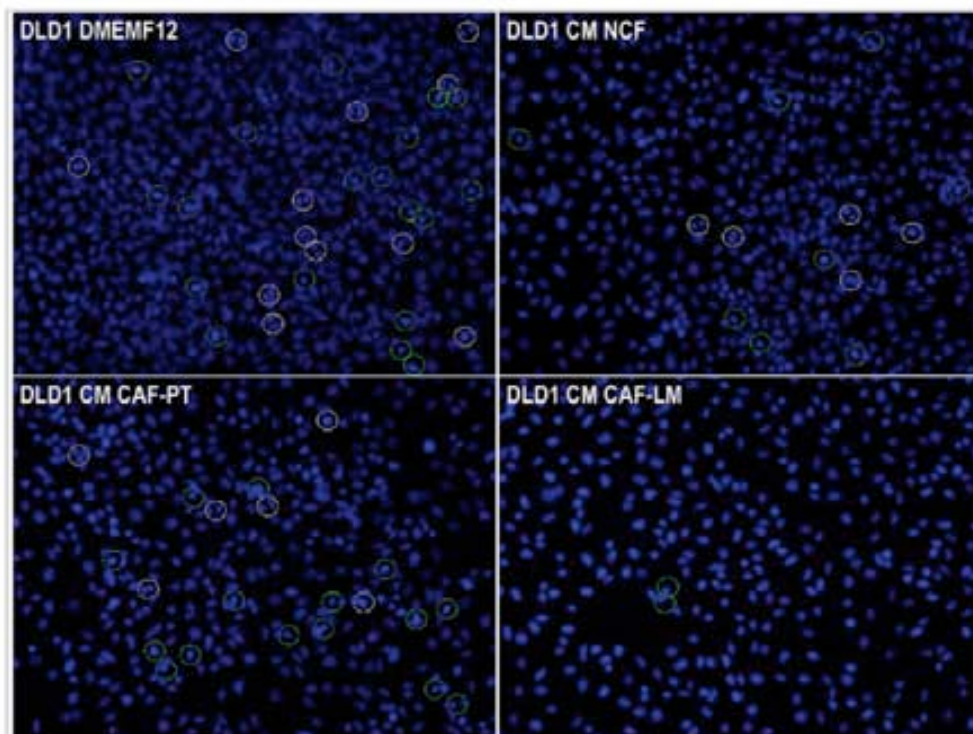
FiguraR1.6. Activitat caspasa-3 en les DLD-1 en presència dels medis condicionats. Després de 6, 24, 48 i 72h en cultiu en presència dels diferents medis, l'activitat caspasa-3 va ser mesurada en els cèl·lules DLD-1, tant en les adherides com les que estaven surant en el medi. Els medis condicionats de CAFs semblaven otorgar un efecte protector a l'apoptosi. El gràfic mostra la mitjana de 2 experiments, de 8 rèpliques cada un.

		48h		96h	
		Mitjana	Des.Est	Mitjana	Des.Est
DMEM-F12	G_0/G_1	76.25	0.35	78.59	0.89
	S	2.63	0.52	5.60	0.83
MC NCF	G_2/M	21.08	0.11	16.05	0.04
	G_0/G_1	83.92	1.84	81.91	0.98
MC CAF-PT	S	2.86	0.78	3.43	0.66
	G_2/M	12.99	2.77	14.07	0.23
MC CAF-LM	G_0/G_1	87.53	1.60	77.08	1.63
	S	2.93	0.94	5.75	1.22
MC CAF-LM	G_2/M	9.50	0.75	16.48	0.37
	G_0/G_1	67.05	0.11	77.63	0.49
	S	2.21	0.55	1.23	0.07
	G_2/M	30.86	1.04	20.60	0.48

Taula R1.1. Percentatge de cèl·lules en les diferents fases del cicle cel·lular. La quantitat de marcatge amb iodur de propidi va ser avaluada després de 48 i 96h en presència dels medis de cultiu mitjançant citometria de flux amb marcatge de iodur de propidi.

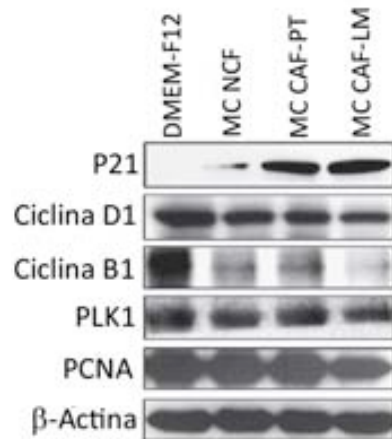
Per a corroborar aquests resultats obtinguts per marcatge amb iodur de propidi, les cèl·lules van ser crescudes en cobreobjectes en presència dels diferents medis durant 5 dies. El marcatge del nucli amb DAPI en les cèl·lules fixades, mostrà una proporció més alta de cèl·lules en mitosi en les condicions amb DMEM-F12, MC NCF i MC CAF-PT; mentre que en presència del medi condicionat dels fibroblasts associats a metàstasi hepàtica, el nombre de cèl·lules iniciant mitosi després de 5 dies en cultiu era molt més reduït. A més, el marcatge intens amb DAPI suggeria una elevada càrrega de material genètic en el nucli però sense completar mitosi (Figura R1.7).

Per a complementar aquests resultats referents a l'aturada de cicle cel·lular, vam avaluar els nivells de diferents proteïnes relacionades amb el control del cicle cel·lular, especialment aquelles involucrades en l'esdeveniment de transició de G₂ a M, mitjançant la tècnica de western blot (Figura R1.8).



FiguraR1.7.Marcatge amb DAPI de les cèl·lules DLD-1 sembrades en diferents medis condicionats. Després de 5 dies en cultiu en presència dels 4 medis en estudi, les cèl·lules van ser fixades i marcades amb DAPI. Les circumferències verdes senyalen metafases i les blanques, anafases. Addicionalment, la intensitat del marcatge amb DAPI es correlaciona amb quantitat d'ADN. Les fotografies demostren que les cèl·lules cultivades amb MC CAF-LM presenten més quantitat de material genètic.

Vam trobar que el medi condicionat induïda una inhibició en la ciclina B1, especialment remarcable en el cas del medi condicionat dels fibroblasts de la metàstasi hepàtica. L'expressió de la ciclina D1, expressada en G₁, mostrà que després de 5 dies en presència de MC de CAF-LM, semblava haver-hi menys cèl·lules en aquesta fase del cicle cel·lular. PLK1 també es presentà lleugerament disminuïda en les cèl·lules cultivades amb MC CAF-LM suggerint una disminució de l'entrada en mitosis d'aquestes cèl·lules. Els nivells de la proteïna P21, reguladora de les anteriorment esmentades, també es trobava augmentada en medis condicionats de CAFs (Figura R1.8).



FiguraR1.8.Expressió de proteïnes implicades en aturada del cicle cel·lular. Després de 96 hores de cultiu de les DLD-1 amb els diferents medis, es van avaluar els nivells de les proteïnes P21, CICLEINA D1 (fase G₁ inicial), CICLEINA B1 (transició de G₂ a M) PLK1 (fase M) i PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*; de la fase S)

1.2.4.-El medi condicionat dels fibroblasts associats a metàstasi hepàtica incrementa la migració cel·lular en cèl·lules de càncer colorectal.

Un altre paràmetre que es va voler avaluar va ser la capacitat migratòria de les cèl·lules epitelials tumorals en presència dels diferents medis condicionats. La capacitat migratòria de les DLD-1 en presència dels diferents medis condicionats va ser mesurada mitjançant l'assaig de *wound healing* i el sistema *Transwell*. En una primera aproximació es va realitzar un assaig de *wound healing* emprant medis condicionats aparellats (és a dir, pertanyents a un mateix pacient), observant-se que el tractament amb medi condicionat de fibroblasts associats a metàstasi hepàtica induïda increment en la migració en comparació amb la resta de medis, fent que a les 24h els marges de la ferida ja estiguessin pràcticament tancats (Figura R1.9, panell superior). Els resultats van ser confirmats emprant més medis condicionats de cada localització però sense ser aparellats (panell inferior).

1.2.5.-El medi condicionat dels fibroblasts de metàstasi hepàtica induïx trets de transició epiteli-mesènquima (TEM) en les cèl·lules DLD-1.

Comparant amb la condició control, el cultiu de les DLD-1 en presència de medi condicionat dels fibroblasts de metàstasi hepàtica, progressivament induïa l'expressió de factors de transcripció clàssicament associats amb el procés de transició epiteli-mesènquima. Com es mostra en la figura R1.11, l'expressió de ZEB-1, SNAI1 i SLUG es veu incrementada amb el temps, coincidint amb una sobreexpressió de N-cadherina però no E-cadherina. A més, a nivell proteic, les DLD-1 cultivades en medi DMEM-F12 mostraven una distribució de la E-cadherina localitzada entre les unions cel·lulars. Aquesta distribució de la E-cadherina passava a ser citoplasmàtica en presència del medi condicionat dels CAF-LM. La sobreexpressió de la N-cadherina era també evident a nivell proteic per immunohistoquímica (Figura R1.12). Comparant amb medis condicionats de les altres localitzacions, el medi dels fibroblasts associats a metàstasi hepàtica semblava molt més eficient conferint trets típics de TEM evidenciats per l'expressió del factors de transcripció associats a aquest procés (Figura R1.13).

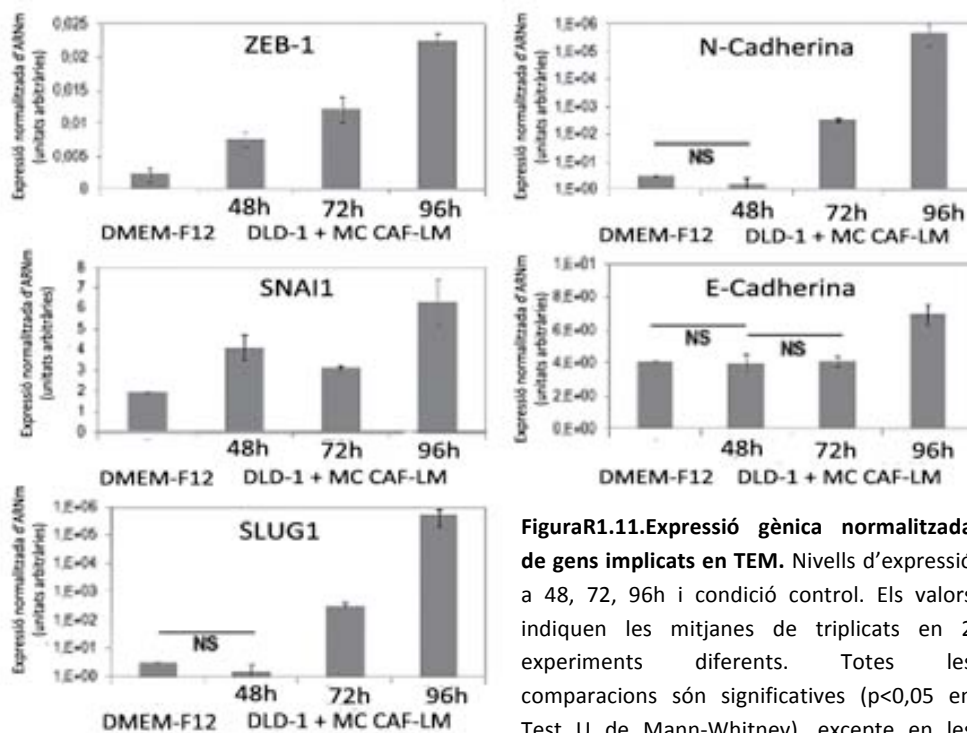
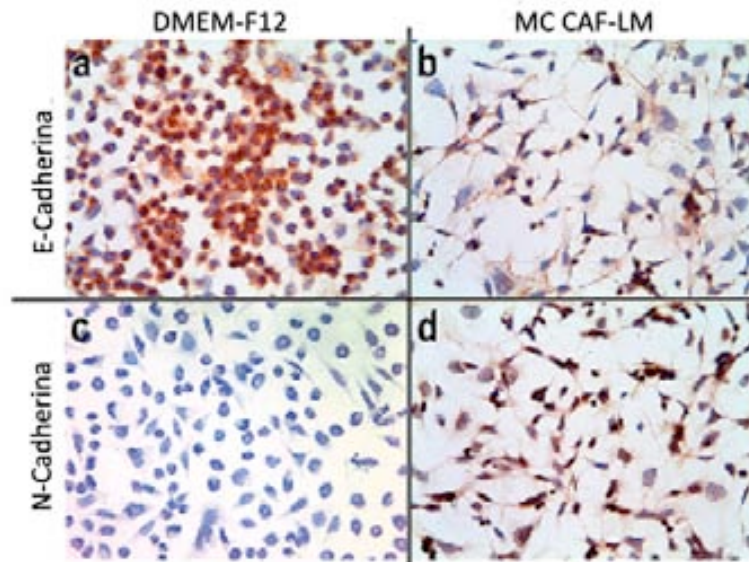
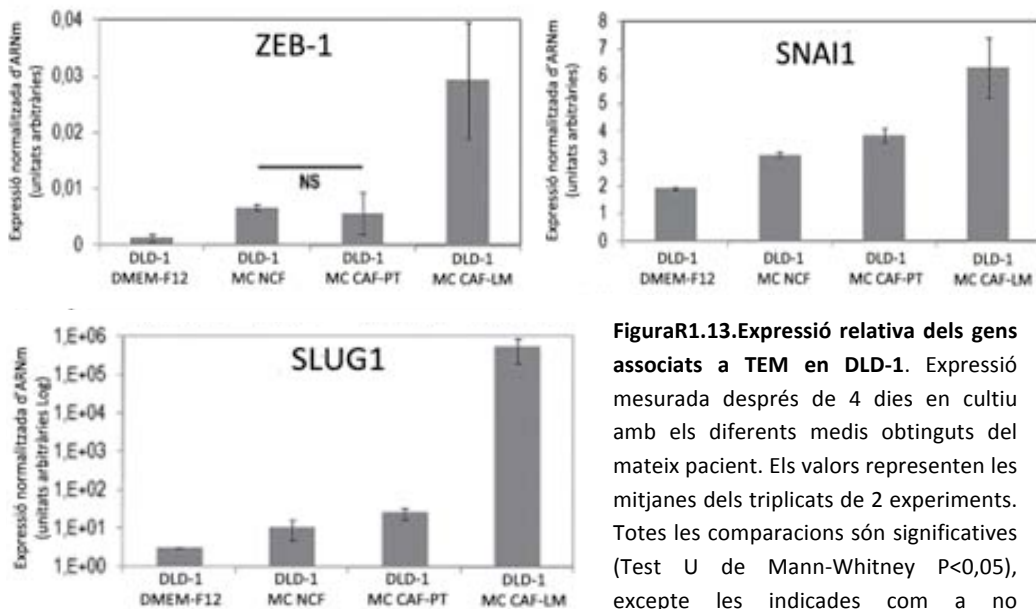


Figura R1.11. Expressió gènica normalitzada de gens implicats en TEM. Nivells d'expressió a 48, 72, 96h i condició control. Els valors indiquen les mitjanes de triplicats en 2 experiments diferents. Totes les comparacions són significatives ($p < 0,05$ en Test U de Mann-Whitney), excepte en les marcades com a no significatives (NS).



FiguraR1.12. Immunohistoquímica de E-cadherina i N-cadherina. Localització de les cadherines en les DLD-1 tractades amb medi condicionat de fibroblasts associats a metàstasi hepàtica i DMEM-F12.



FiguraR1.13. Expressió relativa dels gens associats a TEM en DLD-1. Expressió mesurada després de 4 dies en cultiu amb els diferents medis obtinguts del mateix pacient. Els valors representen les mitjanes dels triplicats de 2 experiments. Totes les comparacions són significatives (Test U de Mann-Whitney $P < 0,05$), excepte les indicades com a no significatives (NS).

1.2.6.- Els medis condicionats de CAFs estimulen la formació de colònies.

La capacitat clonogènica dels medis condicionats dels diferents fibroblasts també va ser avaluada. Com es mostra en la figura R1.14A, el medi condicionat dels fibroblasts aïllats era capaç d'estimular la formació de colònies en comparació amb la condició control (DMEM-F12); sent el nombre de colònies major en presència dels medis condicionats associats a tumor primari i

metàstasi. Una observació interessant respecte la morfologia de les colònies originades fou la presència d'un fenotip espiculat, amb prolongacions de la membrana, especialment en aquelles DLD-1 que havien estat en contacte amb el medi condicionat dels fibroblasts associats a metàstasi hepàtica; un fenotip que podria assimilar-se al donat en un procés de transició epiteli-mesènquima (Figura R1.14B). Complementàriament, les cèl·lules DLD-1 sembrades durant 5 dies en presència de MC CAF-LM van ser resembrades per avaluar si seguien mantenint les capacitats clonogèniques. Les cèl·lules resembrades van mostrar una major formació de colònies (i de major mida) quan es trobaven en presència del medi condicionat dels fibroblasts associats a metàstasi hepàtica. En canvi, les cèl·lules que eren resembrades amb medi DMEM-F12 perdien aquestes capacitats clonogèniques.

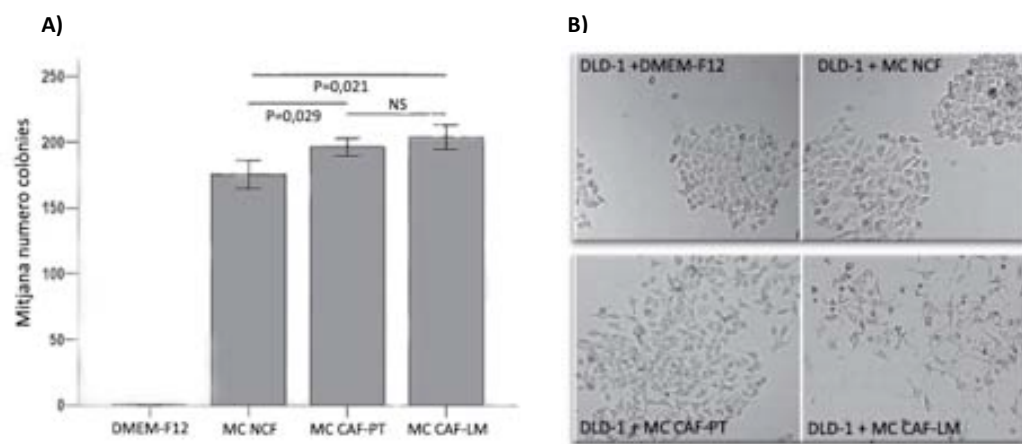
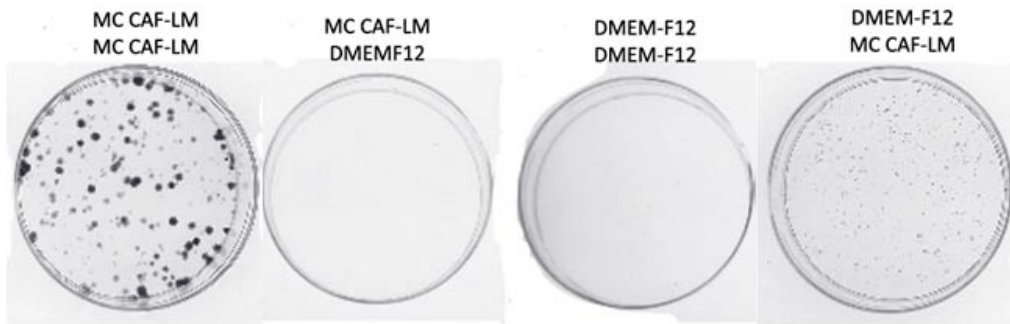


Figura R1.14. Assaig de formació de colònies. A) Els medis condicionats dels diferents fibroblasts aïllats induïxen la formació de colònies comparant amb les condicions control després de 15 dies de cultiu. Comparativament els CAFs (tant de tumor primari com de metàstasi hepàtica) són significativament més eficients que els NCF (Test U de Mann-Whitney, $P < 0,05$). B) La morfologia de les DLD-1 en presència del medi condicionat dels CAF-LM mostra un fenotip espiculat similar al esdevingut en un procés de transició epiteli-mesènquima.

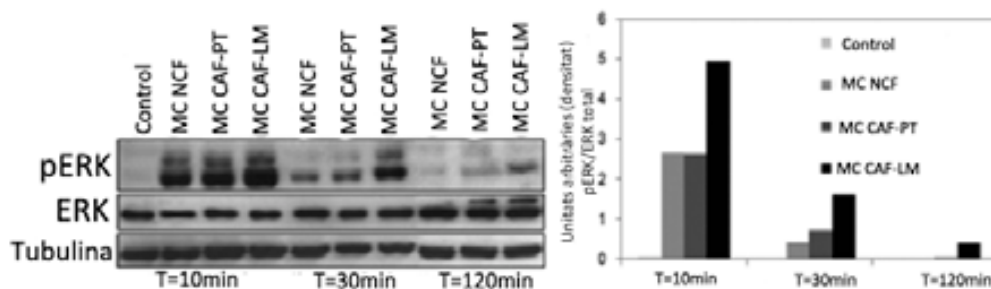
Adicionalment, i per saber si aquesta capacitat clonogènica era mantinguda, les cèl·lules que havien estat cultivades durant 5 dies en presència de medi condicionat de fibroblasts associats a metàstasi hepàtica van ser resembrades en diferents condicions. Al tornar-les a sembrar en MC CAF-LM, és va observar la formació de colònies d'una mida superior a les originades quan les cèl·lules no havien estat tractades prèviament. En presència de DMEM-F12, en cap cas es formaren colònies (independentment del tractament previ) (figura R1.15).



FiguraR1.15. Assaig de formació de colònies resembrades. Les cèl·lules tractades durant 5 dies amb MC CAF-LM, mantenen i incrementaven les seves capacitats clonogèniques si es resembraven en el mateix medi, però en canvi no conservaven aquesta capacitat si es resembraven en medi estàndard. Quan pre-cultivades amb DMEM-F12, la formació de colònies en presència de MC CAF-LM era major comparant amb la seva condició control, però d'una mida inferior a les originades quan pre-tractades amb MC CAF-LM.

1.2.7.- Inducció d'una activació sostinguda d'ERK en presència de medi condicionat de fibroblasts de metàstasi hepàtica.

Donada la implicació de la via de les MAPK en processos de migració i proliferació es va voler avaluar el seu estat d'activació en la línia cel·lular DLD-1 després de trobar-se en presència dels diferents medis condicionats durant 0, 10, 30 i 120 minuts. Com s'observa en la figura R1.16, l'addició dels diferents medis condicionats a la línia cel·lular DLD-1, induïa un increment en la fosforilació d'ERK, comparant amb la condició control. Tot els medis condicionats incrementaven la fosforilació d'ERK als 10 minuts d'estimulació, no obstant, aquesta només era present després de 2 hores en presència del medi condicionat de metàstasi hepàtica.



FiguraR1.16. Activació de pERK en diferents medis. Els llisats proteics de les DLD-1 tractades amb diferents medis durant 10, 30 i 120 min van ser analitzats per l'activació d'ERK. Als 10 min l'activació era evident en tots els medis, disminuint als 30 min i sent només evident als 120 min en presència de MC CAF-LM. Els nivells totals d'ERK no es veien afectats pels diferents medis. La tubulina es va emprar com a control de càrrega. En el marge dret es mostra la quantificació emprant el programa informàtic *Quantity One*.

En 2024, l'Institut de Recherche en Biologie Cellulaire (IRBC) a été créé par la fusion de l'Institut de Recherche en Biologie Cellulaire (IRBC) et de l'Institut de Recherche en Biologie Cellulaire (IRBC). L'IRBC est un institut de recherche en biologie cellulaire qui a été créé par la fusion de l'Institut de Recherche en Biologie Cellulaire (IRBC) et de l'Institut de Recherche en Biologie Cellulaire (IRBC). L'IRBC est un institut de recherche en biologie cellulaire qui a été créé par la fusion de l'Institut de Recherche en Biologie Cellulaire (IRBC) et de l'Institut de Recherche en Biologie Cellulaire (IRBC).

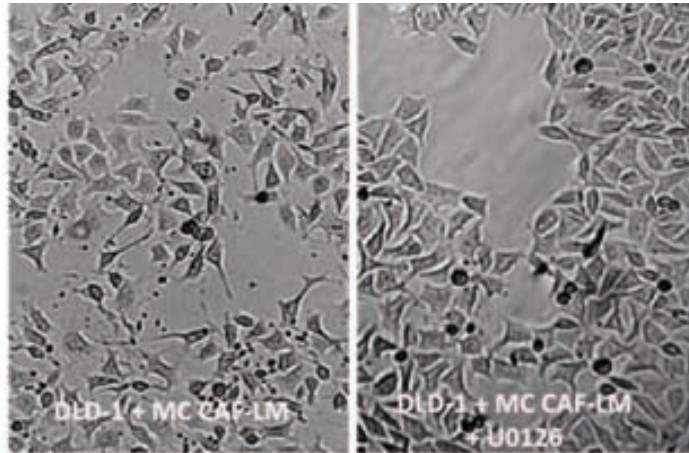


Figure 1: Micrographs showing cell morphology under different conditions. The left panel shows DLD-1 + MC CAF-LM, and the right panel shows DLD-1 + MC CAF-LM + J0126. The images illustrate the effect of J0126 on cell morphology.

3.1: Impact de la température sur la croissance cellulaire

La température a un impact significatif sur la croissance cellulaire. Les cellules se développent mieux à des températures optimales, généralement entre 37°C et 40°C. Des températures plus basses ou plus élevées peuvent ralentir ou même arrêter la croissance.

3.2: Impact de la concentration en nutriments sur la croissance cellulaire

La concentration en nutriments est un facteur crucial pour la croissance cellulaire. Une concentration adéquate de nutriments permet une croissance optimale, tandis qu'une concentration insuffisante peut limiter la croissance.

desregulats es troben en l'annex 7 formant part de l'article publica). Entre aquests gens és troben alguns relacionats amb la reorganització del citoesquelet i invasivitat (*ARF6*, *ACTR2*, *RHOB* i *MALAT1*), també gens rellevants en el procés carcinogènic del càncer colorectal com ara *CDH1*, *CTNNB1*, *DDX7* i *MAP3K1*, importants reguladors de les vies de senyalització de Wnt i Ras-ERK. El gen més sobreexpressat és el *PRSS1*, el qual codifica pel tripsinògen, una serina proteasa. De les sondes que es troben infraregulades en presència de MC CAF-LM trobem diverses relacionades amb proliferació (*Ki67*, *ciclinaE2*, *CDCA3*, *CDC45L*), relacionades amb mitosi, citocinesis i progressió del cicle cel·lular (*ECT2*, *KIF14*, *KIF15*, *PLK1*, *survivina* i *CENPA*); resultats que van en concordança amb les observacions experimentals prèvies de disminució de la proliferació i aturada de cicle en les cèl·lules cultivades en medi condicionat de fibroblasts de metàstasi hepàtica. L'anàlisi d'ontologies genètiques emprant l'eina bioinformàtica *DAVID (Database Annotation, Visualization and Integrated Discovery)* correlacionava les dades bioinformàtiques amb els assajos funcionals i revelà la sobreexpressió significativa de gens implicats en processos de resposta a estímuls i curació de ferides (*wound healing*) (la taula d'ontologies genètiques es troba en l'annex 7 formant part de l'article publicat). Els gens infraregulats corresponen bàsicament a gens de control del cicle cel·lular.

L'anàlisi per GSEA també revelà que els gens desregulats en CAF-LM es trobaven relacionats amb diferents vies *KEGG* descrites, les més representatives amb un FWER $P < 0,02$, mostrades en la taula R1.3. Les 4 categories principals més representatives foren: reorganització del citoesquelet i senyalització per MAPK, vies de Wnt i cicle cel·lular.

Nom de la via KEGG	Mida	ES	NES	NOM P	FDR q	FWER P
HSA04520_ADHERENS_JUNCTION	74	0,319	2,900	0,000e+00	0,000	0,001
HSA05130_PATHOGENIC_ESCHERICHIA_COLL_INFECTION_EHEC	47	0,399	2,948	0,000e+00	0,001	0,001
HSA05131_PATHOGENIC_ESCHERICHIA_COLL_INFECTION_EPEC	47	0,399	2,973	0,000e+00	0,001	0,001
HSA05212_PANCREATIC_CANCER	73	0,317	2,812	0,000e+00	0,001	0,002
HSA04010_MAPK_SIGNALING_PATHWAY	247	0,183	2,665	0,000e+00	0,001	0,003
HSA05220_CHRONIC_MYELOID_LEUKEMIA	75	0,268	2,426	2,972e-03	0,003	0,019
HSA05210_COLORECTAL_CANCER	84	0,243	2,331	0,000e+00	0,007	0,046
HSA05110_CHOLERA_INFECTION	41	0,318	2,257	0,000e+00	0,010	0,077
HSA05213_ENDOMETRIAL_CANCER	52	0,285	2,229	0,000e+00	0,011	0,091
HSA04510_FOCAL_ADHESION	189	0,167	2,219	1,410e-03	0,011	0,098
HSA04662_B_CELL_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	61	0,266	2,213	1,541e-03	0,010	0,103
HSA05215_PROSTATE_CANCER	86	0,235	2,199	0,000e+00	0,010	0,112
HSA04514_CELL_ADHESION_MOLECULES	129	0,194	2,189	1,391e-03	0,009	0,117
HSA04310_WNT_SIGNALING_PATHWAY	143	0,187	2,192	0,000e+00	0,010	0,117
HSA04810_REGULATION_OF_ACTIN_CYTOSKELETON	196	0,165	2,174	0,000e+00	0,010	0,136
HSA04110_CELL_CYCLE	109	0,198	2,130	1,441e-03	0,012	0,172

Taula R1.2. Vies KEGG representades en els gens desregulats en les DLD-1 en presència de medi condicionat de fibroblasts associats a metàstasi hepàtica. Consideració d'aquelles amb FWER $P < 0,02$. Mida: nombre de gens del total representats en la via descrita; ES: *enrichment score*; NES: *normalized enrichment score*; NOMp-valor: p-valor nominal, FDR q-valor: *False discovery rate* i FWER (*Family wise error rate*).

1.3.2.- Sobreexpressió de la via de Wnt en cèl·lules tumorals cultivades amb medi condicionat de fibroblasts associats a metàstasi hepàtica.

Les dades experimentals prèvies havien mostrat que gens de la via de Wnt com *E-cadherina* i *Snail* es trobaven sobreexpressats a nivell d'ARNm. Addicionalment, a nivell proteic es va poder comprovar també com un altre gen de la via de Wnt com *c-Myc* també es trobava sobre-expressat en les cèl·lules cultivades en presència de medi condicionat dels fibroblasts de la metàstasi hepàtica, tant en la línia cel·lular DLD-1 (mutant pel gen *APC*), com en la línia cel·lular HCT-116 (no mutada per *APC*) (Figura R1.18)

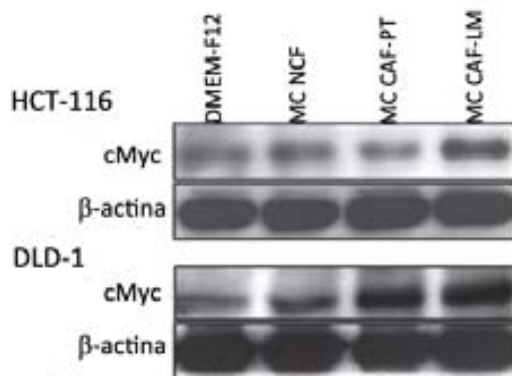
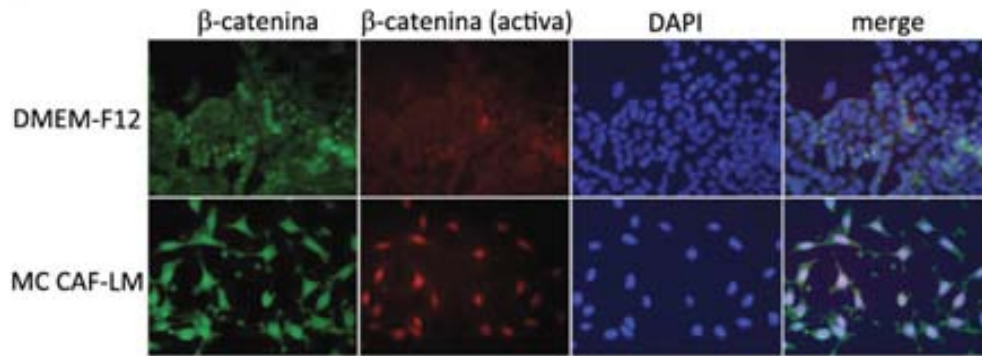


Figura R1.18. Expressió proteica de cMyc en presència dels diferents medis. L'estimulació amb MC CAF-LM produeix una sobreexpressió de cMyc en comparació amb la resta de medis, i aquesta es dona tant en la línia cel·lular DLD-1 (mutant pel gen *APC*) com en la línia cel·lular HCT-116 (no mutada pel gen *APC*). En totes dues línies la sobreexpressió és evident, però és més clara en la no mutada, on la via de Wnt està constitutivament activa.

Posteriorment vam comprovar si hi havia translocació de la β -catenina activa al nucli cel·lular, i vam observar com després de 72 hores en cultiu en presència del medi dels fibroblasts de metàstasi hepàtica, la forma activa de la proteïna havia estat translocada al nucli (un dels esdeveniments finals de la via de Wnt). En les cèl·lules tractades amb DMEM-F12 com a control, no es donava aquest fet (figura R1.19).



FiguraR1.19. Localització de la β -catenina en presència de MC CAF-LM. La β -catenina es transloca al nucli (un dels esdeveniments finals de la via de Wnt), quan cultivada amb medi de cultiu dels fibroblasts associats a metàstasi hepàtica. Després de 72hores en cultiu no només s'observa la sobreexpressió de β -catenina, sinó també la translocació de la seva forma activa al nucli de les DLD-1

1.3.3.- Avaluació dels productes de secreció expressats diferencialment entre els CAF-PT i els CAF-LM

Les observacions prèvies indicaven la presència de factors en el medi condicionat dels fibroblasts de metàstasi hepàtica, no presents en els altres medis, i que podrien ser els responsables de les diferents propietats fenotípiques conferides a les cèl·lules epitelials.

Una primera aproximació es va fer comparant els perfils genètics dels fibroblasts associats a metàstasi hepàtica i els fibroblasts associats a tumor primari, considerant només aquells gens amb ontologies corresponents a productes de secreció localitzats en la regió extracel·lular i components de la matriu extracel·lular. Amb aquest filtratge es va aconseguir fer una selecció d'aquells gens que codificaven per a proteïnes de la matriu extracel·lular i que podien ser candidates de ser secretades pels fibroblasts, i per tant responsables de la interacció amb les DLD-1. Entre els gens candidats que complien aquestes característiques, aquells que presentaven una diferència d'expressió (*fold change*) >2 van ser escollits. El resultat fou que d'aquests gens de secreció, 63 estaven sobreexpressats en els CAF-LM respecte els CAF-PT; i 91 eren de major expressió en els CAF-PT. Tal i com queda il·lustrat en el heatmap (figura R1.20), els productes de secreció d'ambdós tipus de CAFs són molt diferents. Cal destacar també que en l'anàlisi no supervisat, tres CAF-PT quedaven agrupats entre els CAF-LM, és a dir, el seu perfil global d'expressió per aquests gens s'assimila més al que presenten els CAF-LM que no pas als de la resta dels CAF-PT.

Així doncs, el fenotip observat en les cèl·lules epitelials en presència dels diferents medis condicionats pot ser conseqüència dels productes diferencials que aquests expressen i que poden estar determinant el seu comportament.

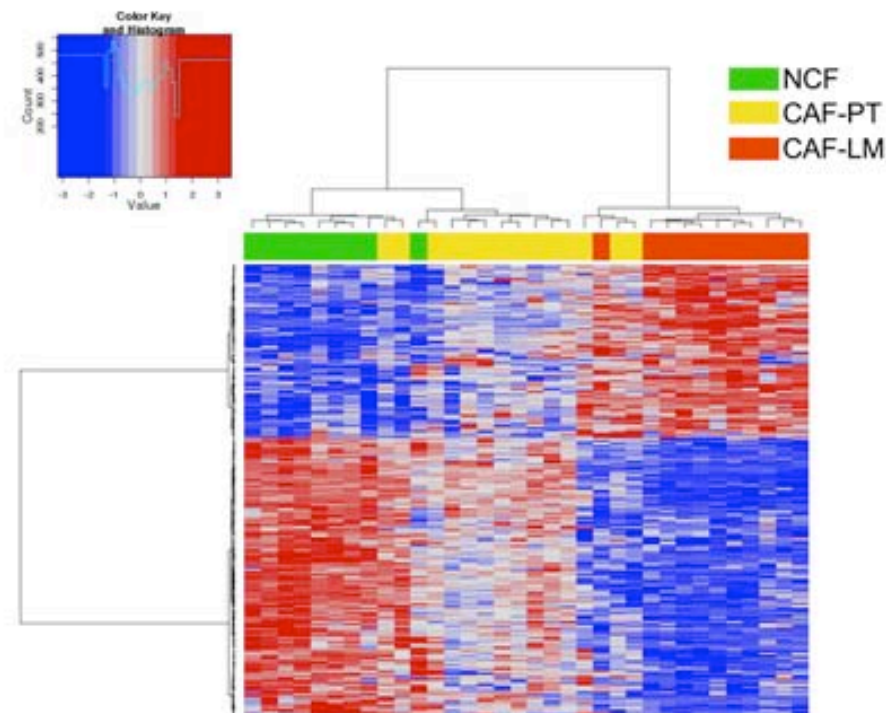


Figura R1.22. Agrupació jeràrquica no supervisada dels valors d'expressió tipificats dels 277 gens que caracteritzen la "Fibroblast Progression Gene Signature". Representació en dendograma dels 277 gens l'expressió dels quals millor diferencia els tres tipus de fibroblasts seguint la progressió del càncer. En la part superior es representen els 34 fibroblasts emprats agrupats segons la seva expressió. Els CAF-PT (groc) i els NCF (verds) són agrupats en una mateixa classe, tot i que hi ha 3 fibroblasts associats a tumor primari que s'agrupen amb els fibroblasts de metàstasi hepàtica (vermell) perquè tenen una expressió més similar.

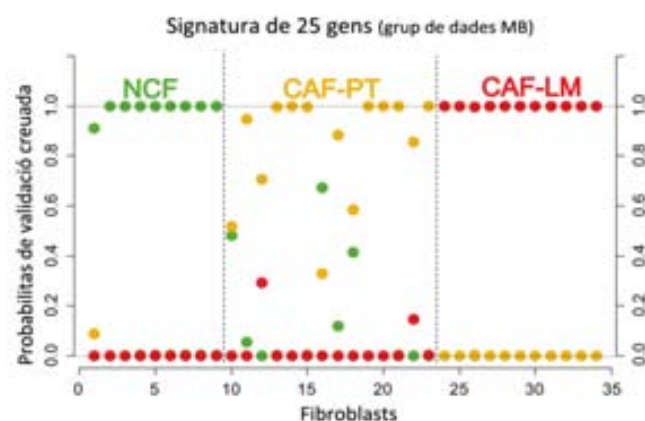
1.4.2.-Refinament de la signatura. Desenvolupament d'un classificador

La signatura FGP de 277 gens va ser refinada per tal de determinar el mínim nombre de gens l'expressió diferencial dels qual fos capaç de caracteritzar cada un dels tipus de fibroblasts presents en la progressió del càncer colorectal. Les dades d'expressió dels 34 fibroblasts emprats en l'anàlisi per microarrays (NCF=9, CAF-PT=14 i CAF-LM=11) i denominades com a conjunt de dades MB, van ser analitzades amb el mètode PAM (*Prediction Analysis for Microarrays*) emprant el mètode de "nearest shrunken centroid" per a definir el classificador que millor caracteritzés cada tipus de fibroblast (NCF vs CAF-PT vs CAF-LM). Les dades d'expressió van ser sotmeses a una validació creuada *ten-fold* en la que les mostres són dividides aleatòriament en 10 parts iguals. Aquest mètode va definir com a 25 el nombre mínim de gens capaç de discriminar entre els tres tipus de fibroblasts amb l'error predit de mala classificació més baix (figura R1.23).

hepàtica i altres 3 com a fibroblasts normals. Aquests resultats van en concordança amb els observats prèviament en el *heatmap* on s'observava que alguns dels CAF-PT s'agrupaven amb els CAF-LM (correlació d'expressió). Unes probabilitats de mala classificació representades en la figura R1.26.

GEN	GRUP	Expressió mitjana (Log ratio)			
		NCF	CAF-PT	CAF-LM	
ARHGD1B	SE	-0.0179	0	0.9268	
C5orf46	SE	0	0	0.8287	
TMEM176B	IE	0	0	-0.5635	
TSPAN2	IE	0	0	-0.5229	
EYA4	IE	0	0	-0.4271	
CYP39A1	IE	0	0	-0.327	
ADH1B	IE	0.3203	0	0	
SRGN	SE	0	0	0.3089	
CHRD1	IE	0	0	-0.304	
PTX3	SE	0	0	0.1956	
SLC7A2	SE	0	0	0.1849	
TGFB2	SE	-0.172	0	0	
SFRP4	SE	0	0	0.1665	
FBLN1	IE	0	0	-0.1621	
ULBP2	SE	-0.1598	0	0.0049	
FBN2	IE	0	0	-0.1571	
CCDC81	SE	0	0	0.1485	
GPR1	SE	0	0	0.1256	
TNFSF4	SE	-0.0732	0	0	
CHL1	IE	0	0	-0.0609	
UACA	SE	0	0	0.056	
TCF21	IE	0	0	-0.0406	
NTF3	SE	-0.0191	0	0	
HECW2	SE	0	0	0.0072	
SLC38A4	IE	0	0	-0.0004	
Dataset MB		Predicció			
Estat real		NCF	CAF-PT	CAF-LM	Tasa d'error de classe
NCF		9	0	0	0
CAF-PT		3	8	3	0.428
CAF-LM		0	0	11	0
Tasa d'error global =0.174 (validació creuada)					

Taula R1.3. Signatura de 25 gens i predicció en el conjunt de dades d'origen MB. L'expressió mitjana (raó Log) dels *shrunken centroids* per a cada tipus de fibroblast. La columna descriu la direcció de l'expressió en la seqüència NCF→CAF-LM. SE: gens sobreexpressats en la seqüència de CAF-LM a NCF, i IE indica infraexpressió. En la predicció de classes, els CAF-PT són els que major error de mala classificació aporten, ja que dels 14 totals, 3 són classificats com a NCF i 3 com a CAF-LM. Les altres dues categories són classificades correctament en el 100% dels casos.



FiguraR1.26. Probabilitats estimades de classificació. Els fibroblasts del conjunt de dades MB (d’entrenament) són classificats segons la seva pertinença real (panell superior) i la predita (panell inferior). Els fibroblasts normals (NCF) i els fibroblasts associats a metàstasi hepàtica, són tots classificats correctament mentre que els associats a tumor primari tenen majors probabilitats de ser mal classificats

Posteriorment, la signatura de 25 gens de classificació, va ser validada en tres conjunts de dades independents, dos d’ells corresponents a mostres de tot el tumor (GSE22598 i LP) i un d’ells corresponent a mostres obtingudes per microscopia de captura làser (GSE31279). La descripció detallada dels quals es troba en l’apartat 5.1 dels materials i mètodes. L’objectiu era veure si el classificador obtingut era capaç també de classificar mostres corresponents a tumor, i no originades de fibroblasts en cultiu. Com es mostra en la taula R1.5, la probabilitat de classificar correctament una mostra és molt alta (tases d’error global molt baixes), la qual cosa permet concloure que l’expressió d’aquests 25 gens caracteritza molt bé els fibroblasts de cada tipus.

Així doncs, en funció de l’expressió d’aquests gens de la signatura, el classificador permetia saber amb una elevada probabilitat a quina classe corresponien els fibroblasts de les mostres, si a mucosa normal, a tumor primari o a metàstasi hepàtica. Els fibroblasts associats a carcinoma (CAF-PT) són els que mostren una major variabilitat a l’hora de classificar-se, sent alguns d’ells classificats com a fibroblasts de metàstasi hepàtica i d’altres com a fibroblasts normals (resultats que concorden amb els diferents *heatmaps* vistos anteriorment).

VALIDACIÓ			
Conjunt de dades LP	Predicció		
	Tumor primari	Metàstasi hepàtica	Tasa d’error
Tumor primari	16	3	0.158
Metàstasi hepàtica	0	21	0
Tasa d’error global =0.075 (validació creuada)			

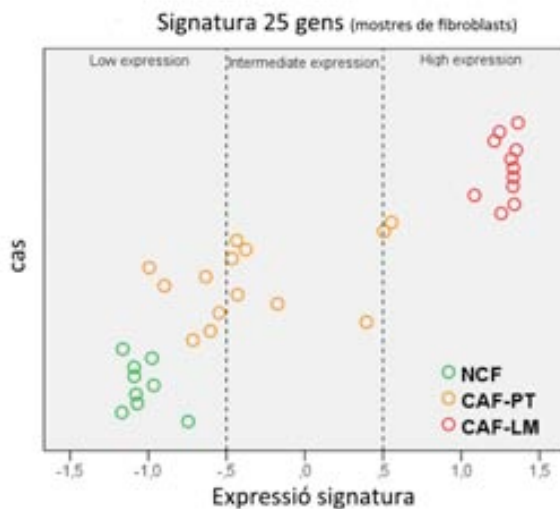
GSE22598			
Estat real	Normal mucosa	Tumor primari	Tasa d’error
	Normal mucosa	15	2
Tumor primari	0	17	0
Tasa d’error global =0.059 (validació creuada)			

GSE31279	Predicció			Tasa d'error
	Estroma normal	Estroma t. primari	Met. hepàtica	
Estroma normal	9	1	0	0.10
Estroma tumor primari	3	7	0	0.30
Metàstasi hepàtica	1	0	3	0.25
Tasa d'error global=0.203 (validació creuada)				

Taula R1.4. Predicció de classificació de la signatura de 25 gens en els conjunt de dades independents LP, GSE22598 i GSE31279. La tasa de predicció del classificador en els diferents conjunts de dades.

1.4.4.-Associació de l'expressió gènica amb risc de progressió

Dels fibroblasts analitzats, els associats a tumor primari eren els que mostraven una major variabilitat de classificació en tots els conjunts de bases de dades. Aquesta heterogeneïtat present en els CAF-PT podria associar-se amb pronòstic en assumir que aquells fibroblasts de tumor primari amb una expressió global de la signatura més propera als fibroblasts associats a metàstasi hepàtica podrien conferir un major risc que aquells amb una menor expressió, més similar als de la mucosa normal (figura R1.27).



FiguraR1.27. Expressió de la signatura de 25 gens en les 34 mostres de fibroblasts de MB. Els fibroblasts de la mucosa colònica normal (NCF -verd), els associats a tumor primari (CAF-PT-taronja) i els associats a metàstasi hepàtica (CAF-LM-vermell). Les mostres de CAF-PT són les que tenen uns valors d'expressió més variable, tenint algunes mostres valors d'expressió similars als de CAF-LM i d'altres sent més propers als NCF.

Per tal d'avaluar el potencial pronòstic d'aquest classificador de 25 gens es van emprar els conjunts de bases de dades GSE14333 (166 pacients amb càncer colorectal estadis I-III) i el GSE33113 (90 pacients d'estadi II). Els pacients van ser assignats en 3 categories en funció de la seva expressió global de la signatura, sent classificats com a d'alt risc aquells amb una expressió superior a la mitjana + 0,5 desviació estàndard, expressió intermèdia a aquells amb valors +/- 0,5 respecte la mitjana; i els de baixa expressió amb valors inferiors a la mitjana en >0,5 desviacions estàndard. La supervivència en aquests dos conjunts de dades va ser avaluada amb la funció

estadística *Log Rank* i les corbes *Kaplan-Meier* i els resultats indicaren que aquests gens estaven associats a pronòstic en tots dos casos (figura R1.28).

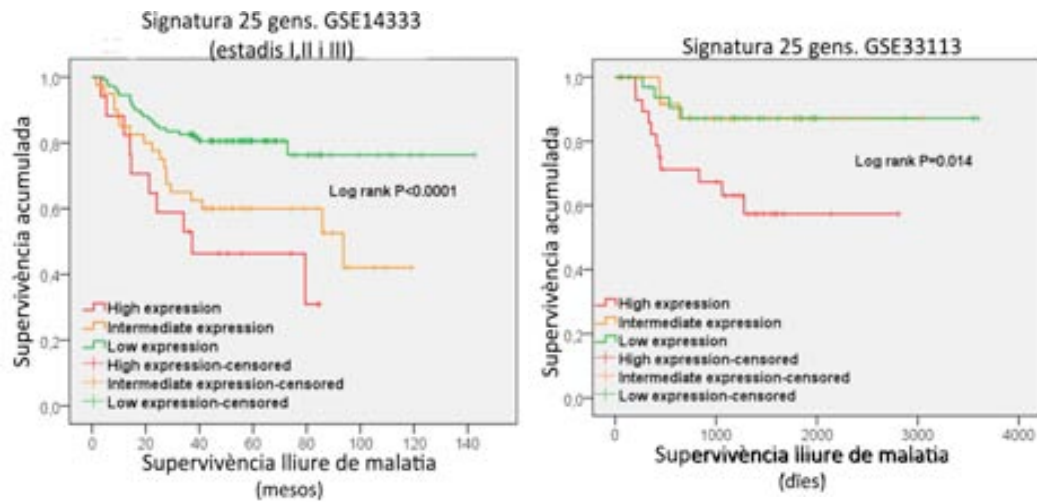


Figura R1.28. Corbes *Kaplan-Meier* del GSE14333 i GSE33113 per la signatura classificadora de 25 gens. Les mostres d'ambdues cohorts categoritzades segons la signatura de 25 gens en alta, intermèdia i baixa expressió. (*Log Rank*, $P < 0,0001$ i $P = 0,014$ respectivament).

El patró d'expressió dels fibroblasts semblava associar-se amb pronòstic en ambdues cohorts. Categoritzant els pacients en dos grups: alt risc (expressió > mitjana) i baix risc (expressió < mitjana), els pacients amb una elevada expressió dels 25 gens també mostraven un major risc de recurrència que aquells amb una baixa expressió (*Hazard Ratio*, $HR = 2,870$; $95\% \text{ IC} = 1,608-5,122$, test de versemblança (LR) $P < 0,0001$). Així doncs, l'expressió dels 25 gens no només era útil per a classificar els fibroblasts, sinó que també semblava tenir aplicabilitat en pronòstic en mostres de tumor primari. Aquesta signatura es va obtenir independentment de l'expressió de les mostres de tumor i de les dades clíniques del pacient, la qual cosa remarcava l'important poder predictiu de l'estroma en la progressió del càncer.

1.4.5.-Cerca dels gens del classificador més associats amb pronòstic en pacients d'estadis II/III.

Vist el bon poder pronòstic del classificador de 25 gens obtingut a partir de la signatura de gens d'expressió seqüencial en fibroblasts, el següent pas fou trobar aquells gens dins de la signatura inicial de 277, amb millor capacitat per a predir recurrència en pacients en estadis II-III.

Un procés més optimitzat del mètode PAM va permetre obtenir una signatura de 19 gens fent servir el GSE14333 com a grup de dades d'entrenament. La puntuació de cada gen derivat del PAM va associar-se amb l'estat del pacient (recurrent o no) i el nivell d'expressió del gen durant la

progressió del càncer (augmentant o disminuint). La validació independent en el GSE17538 va mostrar una especificitat del 79,7% i una sensibilitat del 54,9% després de la validació creuada.

D'aquests 19 gens de la signatura, 15 eren sobreexpressats en la seqüència NCF<CAF-PT<CAF-LM i per tant sobreexpressats en la progressió del tumor, mentre que 4 gens es trobaven infraexpressats en aquesta seqüència. Per analitzar l'expressió específica cel·lular d'aquests 19 gens de la signatura es van emprar les dades d'expressió del GSE39396 (apartat 7.1.1 de material i mètodes), representant l'expressió de 4 subtipus cel·lulars específics aïllats per citometria: (EPCAM+ cèl·lules epitelials, CD45+ cèl·lules inflamatòries, CD31+ cèl·lules endotelials i FAP α + fibroblasts associats a carcinoma). L'expressió de la majoria d'aquests gens (com es mostra en la figura R1.29) es troba majoritàriament representada en el compartiment estromal.

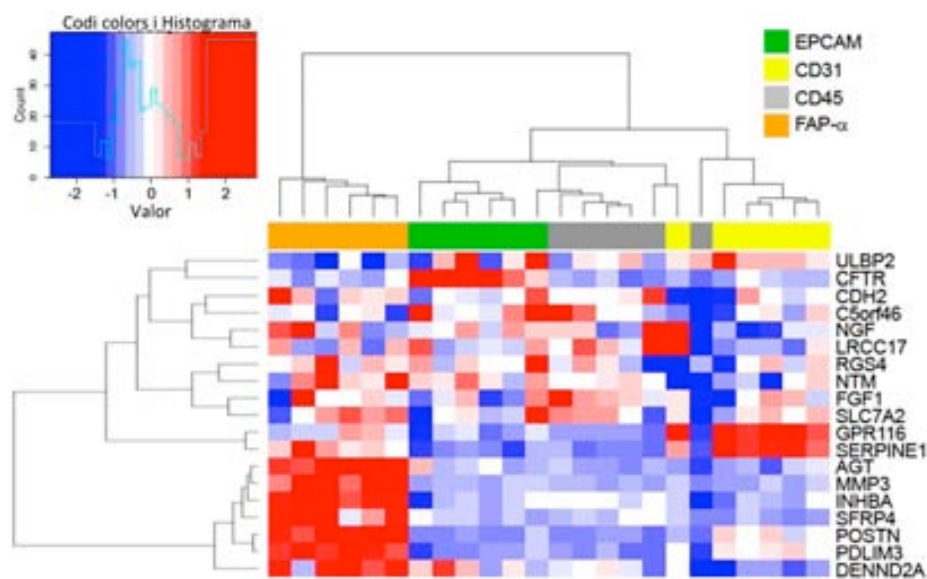
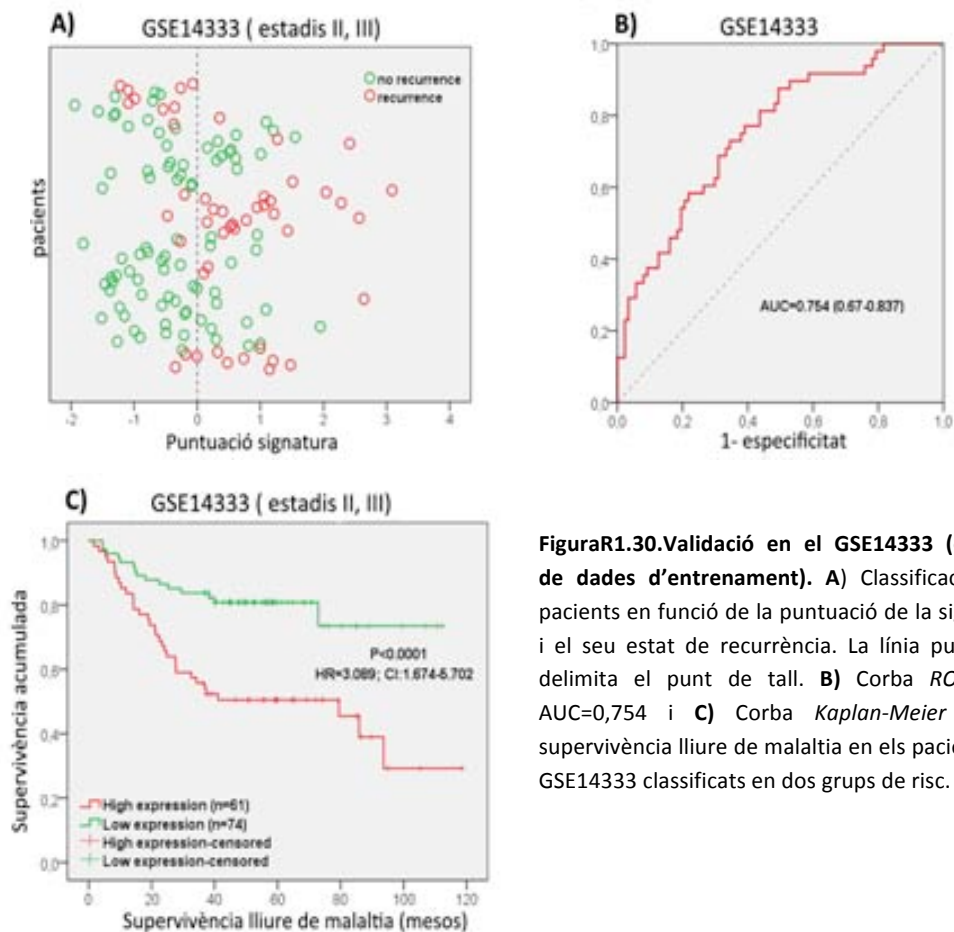


Figura R1.29. Agrupament jeràrquic no supervisat dels 19 gens de la signatura en el GSE39396. El heatmap mostra com els fibroblasts associats a carcinoma, FAP α + (taronja), s'associen en un grup separat respecte l'expressió dels 19 gens en la resta de poblacions cel·lulars.

Un cop comprovada l'especificitat estromal d'aquesta signatura, i amb l'objectiu de validar el seu valor pronòstic, es van classificar els pacients del GSE14333 en funció de l'expressió global dels 19 gens de la signatura. Assumint la mateixa importància biològica per a tots ells, es va obtenir el sumatori de les unitats tipificades de cada un (*z-scores*), aplicant un coeficient de +1 en els gens sobreexpressats i un coeficient de -1 en els infraexpressats. Amb aquests valors, i usant la mitjana de les puntuacions com a punt de tall, aquells pacients amb valors >0 eren considerats d'alt risc, i els que tenien una puntuació <0, de baix risc. Aquest criteri va ser aplicat als GSE14333 i el

classificador de recurrència identificà 74 pacients de baixa expressió i 61 d'alta expressió. El poder predictiu de l'expressió de la signatura en la recurrència es va determinar amb l'àrea sota la corba ROC (AUC= 0,754); i la supervivència lliure de malaltia entre els pacients d'alt i baix risc va donar positiva en la funció estadística de *Log Rank* (HR=3,089; 95% IC=1,674-5,702; P<0,0001) (figura R1.30 A, B i C).



FiguraR1.30. Validació en el GSE14333 (conjunt de dades d'entrenament). **A)** Classificació dels pacients en funció de la puntuació de la signatura i el seu estat de recurrència. La línia puntejada delimita el punt de tall. **B)** Corba ROC amb AUC=0,754 i **C)** Corba Kaplan-Meier de la supervivència lliure de malaltia en els pacients del GSE14333 classificats en dos grups de risc.

Un altre cohort independent de 111 pacients d'estadis II/III (GSE17538) va ser usada per avaluar l'aplicació de l'expressió de la signatura de 19 gens com a classificador. En aquesta cohort, 61 pacients van ser definits d'alt risc i 50 de baix risc amb una AUC=0,79 (Figura R1.31 A i B).

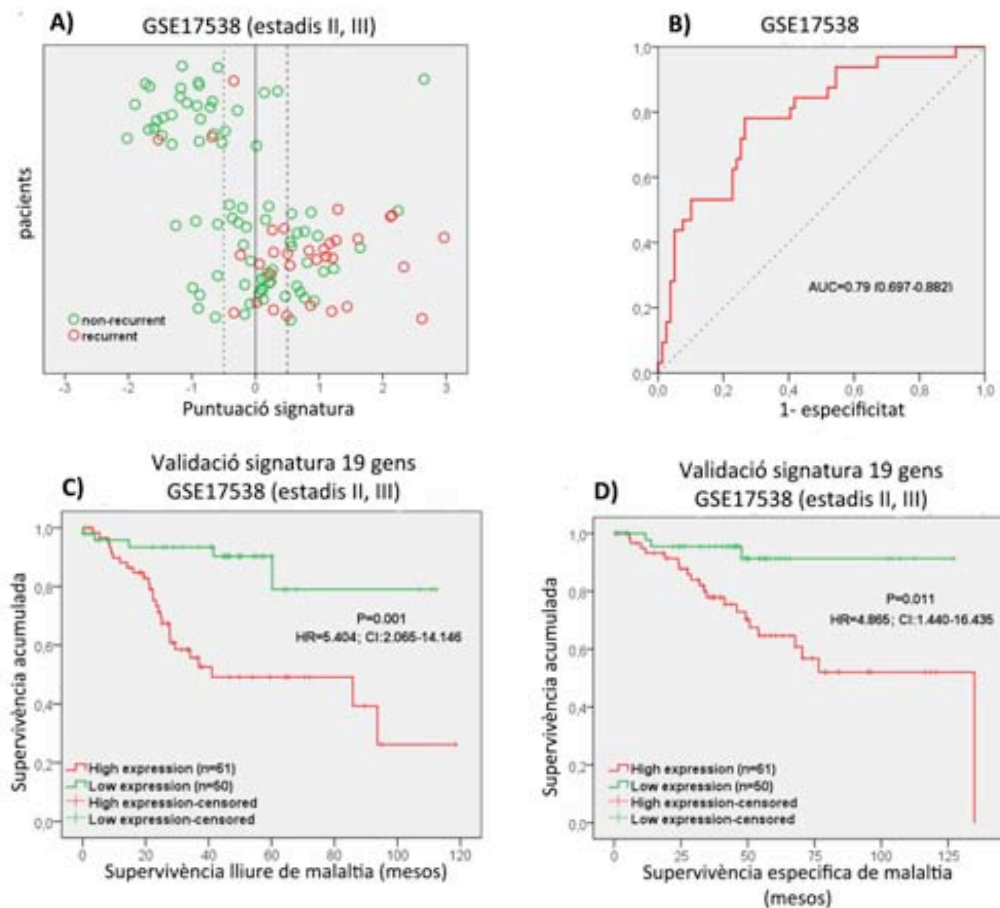


Figura R1.31. Validació en el GSE17538. A) Classificació dels pacients en funció de la puntuació de la signatura i el seu estat de recurrència. La línia negra delimita el punt de tall i les puntejades $\pm 0,5$ desv.est. B) Corba ROC amb $AUC=0,79$ i C) i D) Corbes Kaplan-Meier de la supervivència lliure de malaltia i de la supervivència específica de malaltia en els pacients del GSE17538 classificats en dos grups de risc.

La prevalença en aquesta població era del 29% i les probabilitats posteriors positives i negatives, del 44% (95% IC 37-52%) i del 10% (95% IC= 5-20%) respectivament. Estratificant els pacients per estadis, la prevalença dels pacients d'estadi II era del 18% amb probabilitats posteriors positives i negatives del 28% (95% IC=21-36%) i 5% (95% IC=1-25%) respectivament. Un punt interessant és que en aquesta cohort el marge de decisió clínica era més ampli en els pacients d'estadi III, amb una prevalença del 38% i unes probabilitats posteriors positives i negatives del 59% (95% IC=48-70%) i 14% (95% IC=6-29%) respectivament; fent que la diferència entre ambdues fos de 45 punts. L'anàlisi de regressió de Cox univariant indicava que els pacients considerats d'alt risc tenien un HR de 5,404 ($P=0,001$) en la supervivència lliure de malaltia (SLM), i un HR=4,865 ($P=0,011$) en la supervivència específica de malaltia (SEM) (Figura R1.31 C i D).

En l'anàlisi multivariant, després d'ajustar per les variables d'estadi, grau, sexe i edat; l'expressió de la signatura de 19 gens quedà com la única variable estadísticament significativa per la supervivència lliure de malaltia (HR=5,465 , 95% IC=1-898-15,740 , P=0,002). La signatura de 19 gens també es trobava independentment associada a la supervivència específica de malaltia (P=0,018) (taula R1.6).

Anàlisi multivariant de la signatura de 19 gens en GSE17538							
		Supervivència lliure de malaltia			Supervivència específica de malaltia		
		HR	95% CI	p-valor	HR	95% CI	p-valor
Edat	>55 anys	1,384	,614-3,120	,433	1,455	,569-3,718	,434
Sexe	home	0.89	,423-1,875	,760	0,93	,378-2,284	,874
Grau	Ben diferenciat	1		,340	1		,532
	Moderadament diferenciat	,826	,180-3,780	,805	1,603	,198-12,968	,658
	Poc diferenciat	1,772	,304-10,335	,525	2,879	,285-29,110	,370
Estadi	3 vs 2	2,034	,915-4,523	,082	3,455	,1,126-10,596	,030
Signatura 19 gens	Alta vs baixa	5,465	1,898-15,740	,002	5,844	1,354-25,221	,018

Taula R1.5. Anàlisi multivariant de la signatura de 19 gens aplicada al GSE17538. La signatura de 19 gens es manté com a únic factor estadísticament significatiu tant en la supervivència lliure de malaltia com en la supervivència específica de malaltia.

Adicionalment, estratificant els nivells d'expressió en tres grups (risc alt, intermedi i baix) es va veure que els pacients amb baixa expressió (<0,5 desviacions estàndard per sota de la mitjana, (n=35); intermèdia (n=39) i d'alta expressió (>0,5 desviacions estàndard per sobre la mitjana, n=37) tenien una supervivència lliure de malaltia del 91%, 68% i 48% respectivament. Aquest resultat clarament indicava que el nivell d'expressió conjunta dels 19 gens de la signatura es trobava associat amb la progressió al càncer; una tendència que també s'observava respecte la supervivència específica de malaltia (Figura R1.31 E, F i G)

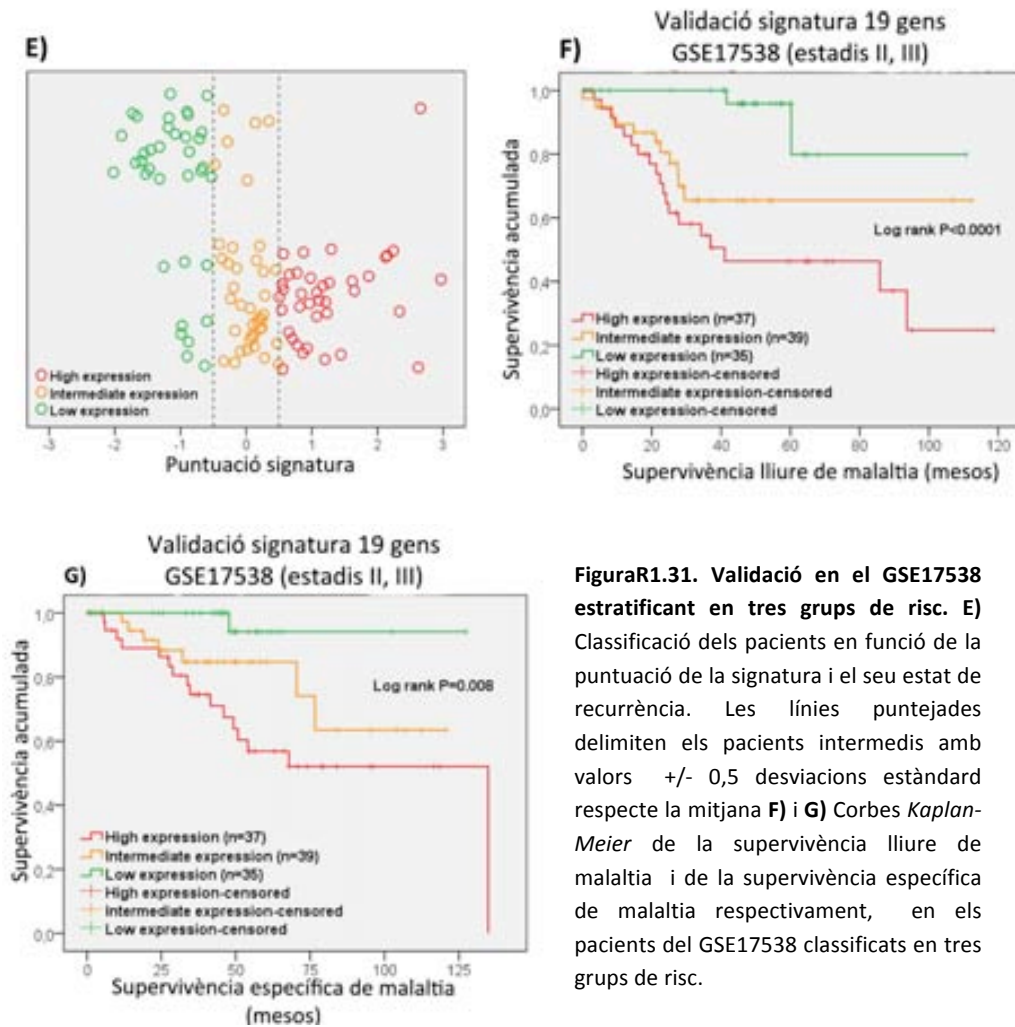


Figura R1.31. Validació en el GSE17538 estratificant en tres grups de risc. E) Classificació dels pacients en funció de la puntuació de la signatura i el seu estat de recurrència. Les línies puntejades delimiten els pacients intermedis amb valors $\pm 0,5$ desviacions estàndard respecte la mitjana F) i G) Corbes Kaplan-Meier de la supervivència lliure de malaltia i de la supervivència específica de malaltia respectivament, en els pacients del GSE17538 classificats en tres grups de risc.

Per a confirmar el valor pronòstic en els pacients d'estadi II, es va emprar una tercera cohort independent corresponent a 90 pacients d'aquestes característiques (GSE33113). L'aplicació del classificador en aquesta cohort presentava una AUC=0,715, i una elevada expressió de la signatura en aquests pacients s'associava amb mal pronòstic (HR=6,189, 95% IC 2,05-18,682 ;P=0,001). La prevalença en aquesta cohort era d'un 21% i les probabilitats posteriors positives i negatives tenien uns valors de 39% (95% IC=30-48%) i 8% (95% IC=3-17%) respectivament. En estratificar els valors d'expressió en tres categories (baixa, intermèdia i alta), el risc de recurrència també es mostrava associat amb la puntuació del classificador (figura R1.32).

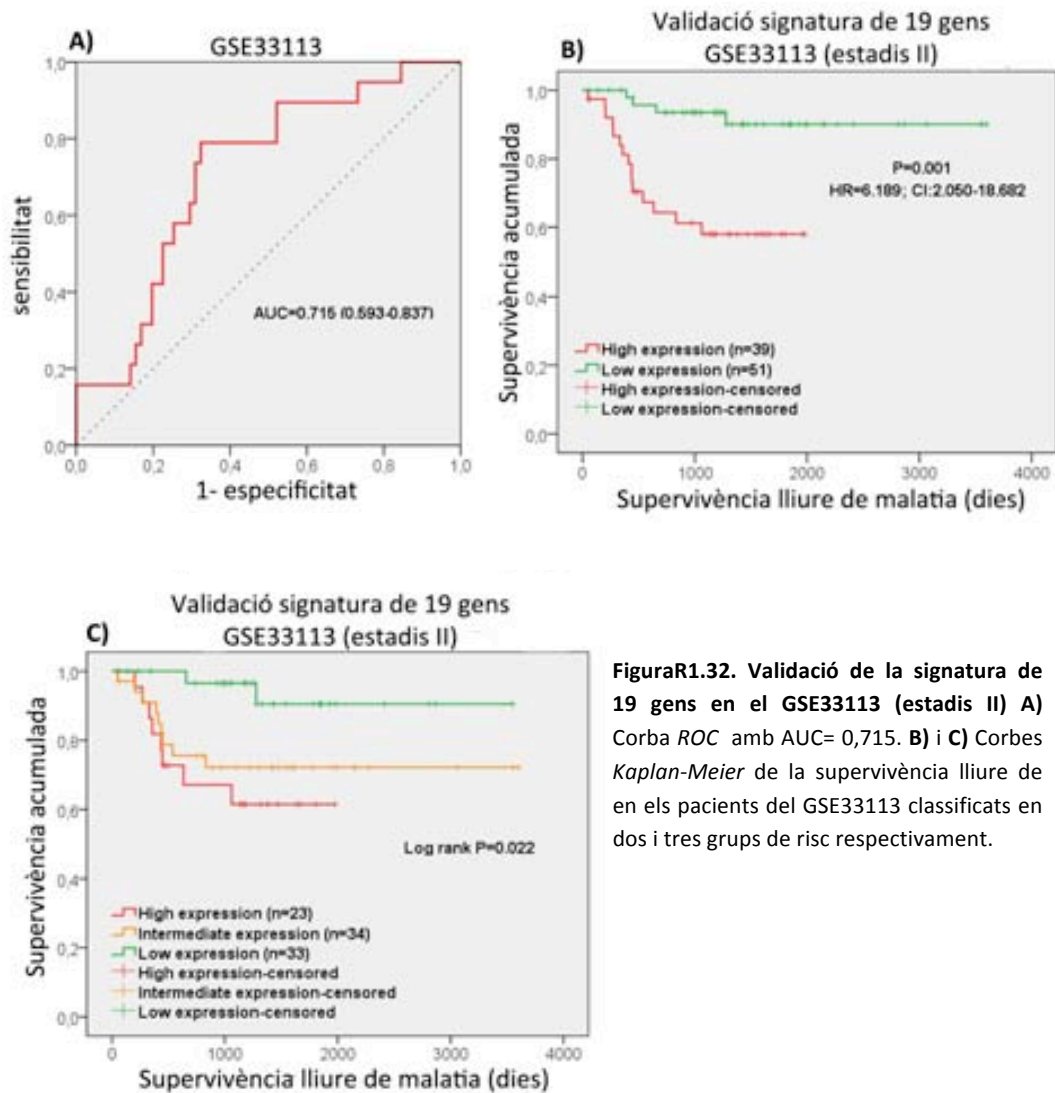


Figura 1.32. Validació de la signatura de 19 gens en el GSE33113 (estadis II) A) Corba ROC amb AUC= 0,715. B) i C) Corbes Kaplan-Meier de la supervivència lliure de en els pacients del GSE33113 classificats en dos i tres grups de risc respectivament.

Així doncs, en els dos conjunts de dades utilitzats, el classificador semblava identificar clarament els pacients de baix risc, especialment els pacients d'estadi II, els quals es podrien beneficiar de la omissió de quimioteràpia (sobretot els pacients T4N0, clínicament classificats com d'alt risc). Desafortunadament, la informació clínica disponible dels pacients que constitueixen els diferents conjunts de dades només fa referència a l'edat, sexe, estat de recurrència, grau (només en el cas del GSE17538), estadiatge i temps de supervivència.

OBJECTIU 2:

Conèixer quins són els canvis funcionals que proporcionen els fibroblasts aparellats del teixit normal adjacent al tumor i els associats a tumor primari en les cèl·lules tumorals. Definir un perfil d'expressió genètic diferencial i identificació de biomarcadors útils com a dianes terapèutiques i/o amb valor pronòstic.

La informació corresponent a aquest segon objectiu es troba redactada en un article sotmès i pendent d'acceptació en el moment de redacció de la memòria escrita (*Differences between CAFs and their paired NCF from adjacent colonic mucosa reveal functional heterogeneity of CAFs, providing prognostic information.* Molecular Oncology)

2.1. Aïllament i caracterització de cultius primaris de fibroblasts , i valoració dels efectes en cèl·lules tumorals.**2.1.1.- Caracterització de parelles NCF/CAF-PT**

Les parelles de fibroblasts NCF i CAF-PT descrites en l'objectiu 1 (apartat 1.1) van ser caracteritzades a nivell molecular determinant la presència de marcadors mesenquimals clàssics. A partir de l'ARN i dels extractes proteics dels fibroblasts aïllats se'n va confirmar la seva naturalesa mesenquimal mitjançant l'anàlisi de l'expressió de diferents biomarcadors moleculars específics tant a nivell d'expressió gènica com a nivell proteic. Per la tècnica de qRT-PCR es van avaluar els nivells d'expressió de l'alfa actina de múscul llis (α -SMA), de la vimentina i de la citoqueratina 18, proteïna característica del citoesquelet de les cèl·lules epitelials i emprada per confirmar l'absència de contaminació epitelial (Figura R2.1A). A nivell proteic, a part d'aquests mateixos biomarcadors (a excepció de la citoqueratina 18), també es van avaluar els nivells d'expressió de la E-cadherina i la VE-cadherina (típiques de cèl·lules epitelials i endotelials respectivament) i d'un altre marcador mesenquimal com és la vinculina (Figura R2.1B).

Pel que fa a l'expressió de l' α -SMA, un marcador característic de fibroblasts activats, tot i que la seva expressió es mostrava major en els CAF-PT en la majoria de parelles, un percentatge de NCF expressaven més aquest gen que els seus corresponents aparellats tumorals.

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

2

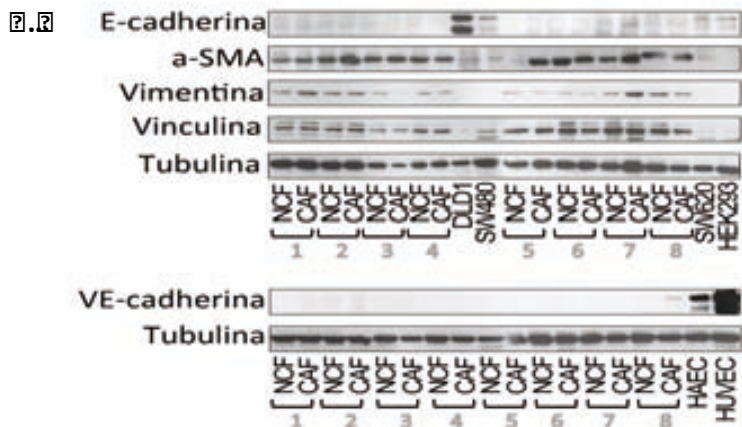
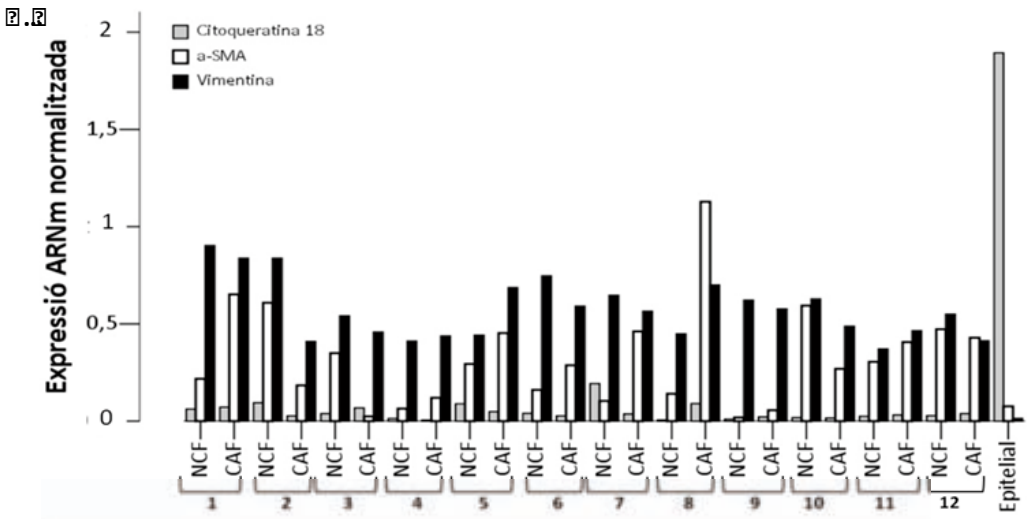
2

2

2

2

2



El 2013, el Dr. David García i el Dr. Miquel Àngel Guzmán, a través del Departament de Ciències Bàsiques de la Universitat de Girona, van descobrir que les cèl·lules canceroses (CAF) podrien expressar moltes de les molècules que són típiques de les cèl·lules epitelials. Aquesta descoberta és important perquè indica que les CAF podrien tenir un origen epitelial, cosa que podria ajudar a entendre millor el desenvolupament i el progrés d'aquests tumors. Els investigadors van utilitzar tècniques de biologia molecular i bioquímica per demostrar que les CAF expressen moltes de les molècules que són típiques de les cèl·lules epitelials, com ara l'E-cadherina i l'a-SMA. Aquesta descoberta té implicacions importants per a la comprensió de la biologia de les CAF i per a la identificació de nous objectius terapèutics.

2

2.2. Anàlisi i determinació de gens diferencialment expressats entre ambdues subpoblacions de fibroblasts.

Per a trobar una raó genètica a la heterogeneïtat funcional mostrada entre els NCF i els CAF-PT en el microambient d'un tumor primari de còlon, en aquesta tesi ens vam voler centrar en els canvis a nivell transcriptòmic entre parelles de fibroblasts de NCF i CAF-PT d'un mateix pacient per tal d'identificar perfils d'expressió diferencial entre subpoblacions d'un mateix origen. L'estudi d'expressió per microarray es va realitzar amb 8 de les 13 parelles de NCF-CAF-PT obtingudes per a la realització d'aquesta tesi.

Després dels processos de quantificació de la imatge, filtratge i normalització de les dades resultants dels microarrays, es va obtenir un total de 108 sondes desregulades (corresponents a 108 gens) entre els NCF i els CAFs. La implicació i rellevància biològica d'aquests gens diferencialment expressats es va analitzar seguint diferents estratègies.

2.2.1.-Anàlisi per GSEA i associació de tots els gens desregulats amb fenotip i vies de senyalització prèviament descrites.

Inicialment, per a tenir una visió global, es va emprar el llistat complet de gens desregulats i es va avaluar el significat biològic de la seva variació coordinada en els canvis d'expressió observats entre els NCF i els CAF-PT. Mitjançant el mètode del GSEA, es van seleccionar aquells fenotips que presentaven un FDR < 0,05 i es va determinar que el perfil d'expressió dels gens sobreexpressats en CAF-PT es correlacionava amb el perfil d'expressió dels gens que s'indueïen en els fibroblasts en resposta a sèrum, i que el mateix succeïa amb els infraexpressats al correlacionar-se amb els gens reprimits en resposta a sèrum. Aquest perfil va ser descrit pel grup de Chang et al (Chang, Sneddon et al. 2004) en estudiar els gens que s'indueïen en fibroblasts de diferents localitzacions anatòmiques quan se'ls afegia sèrum en el seu medi de cultiu. S'associaven també amb el perfil del *fibroblast core serum response*, corresponent al mateix patró d'expressió mencionat anteriorment però havent descartat gens de cicle cel·lular.

Aquests resultats es mostraven consistents amb els reportats per Chang *et al* (Chang, Sneddon et al. 2004) que suggerien que en els carcinomes hepatocel·lulars i en els de pròstata els teixits normals mostraven el fenotip corresponent als gens reprimits en resposta a sèrum, mentre que els tumors presentaven el fenotip de gens induïts en resposta a sèrum o gens activats en *wound healing*. En aquest article associaven el fenotip de *wound-healing* amb pronòstic i el fet que els nostres gens desregulats es trobessin relacionats va fer reforçar la hipòtesi que els gens que

expressen els fibroblasts activats en el tumor i que els diferencien dels seus corresponents en el teixit normal adjacent poden ser rellevants a l'hora de determinar l'agressivitat de les cèl·lules tumorals o de la resta de components de l'estroma tumoral, contribuint així en la progressió del procés carcinogènic. Els resultats obtinguts del GSEA en format gràfic es mostren en la figura R2.5

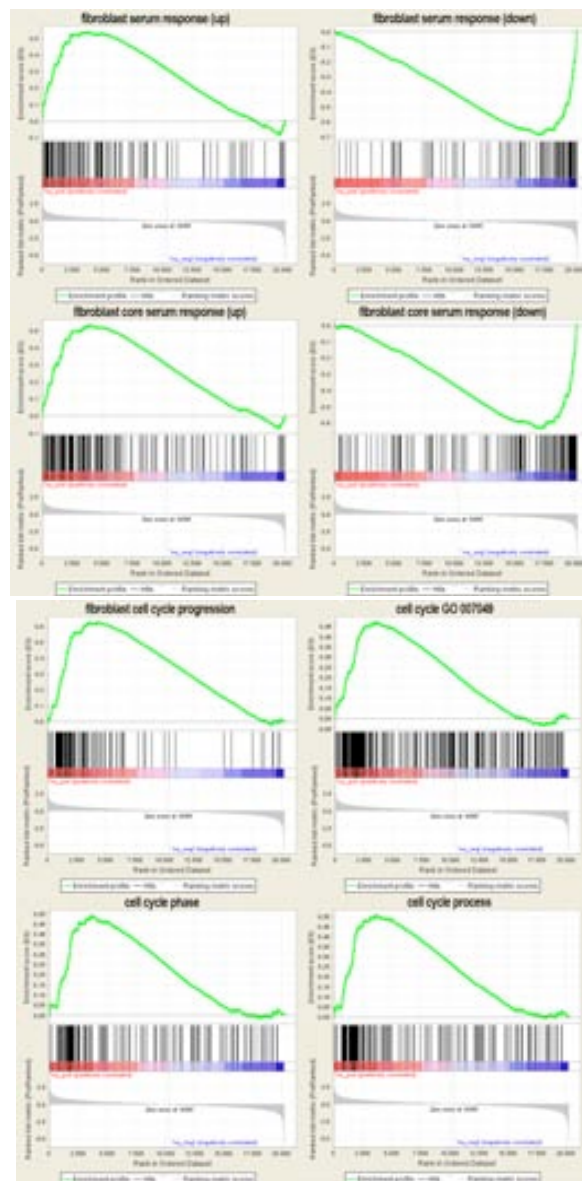


Figura R2.5. Representació gràfica dels resultats obtinguts de l'anàlisi de GSEA. El llistat ordenat dels gens desregulats es mostra en la barra inferior (de major a menor expressió: vermell-blau). L'*enrichment score (ES)* mostra quant de similar és la nostra llista amb el fenotip determinat, sent la màxima desviació de 0 el punt on més es troben representats els gens del fenotip.

2.2.1.1.- Vies KEGG representades

L'anàlisi per GSEA també revelà que els gens desregulats en CAF-PT es trobaven relacionats amb diferents vies KEGG descrites, les més representatives amb un FDR<0,01 mostrades en la taula R2.1.

VIES SOBREEXPRESADES EN CAF-PT (KEGG)					
Nom	N	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
HSA04510_FOCAL_ADHESION	189	0.235	3.441	0	0.00E+00
HSA04110_CELL_CYCLE	111	0.290	3.297	0	0.00E+00
HSA04310_WNT_SIGNALING_PATHWAY	146	0.219	2.878	0	0.00E+00
HSA04810_REGULATION_OF_ACTIN_CYTOSKELETON	197	0.186	2.766	0	6.28E-04
HSA05222_SMALL_CELL_LUNG_CANCER	85	0.274	2.756	0	5.02E-04
HSA05213_ENDOMETRIAL_CANCER	52	0.337	2.754	0	4.19E-04
HSA04360_AXON_GUIDANCE	126	0.207	2.590	0	9.67E-04
HSA05215_PROSTATE_CANCER	86	0.244	2.528	0	1.11E-03
HSA05223_NON_SMALL_CELL_LUNG_CANCER	53	0.308	2.523	0	9.88E-04
HSA05214_GLIOMA	63	0.287	2.518	0	8.89E-04
HSA04520_ADHERENS_JUNCTION	75	0.248	2.429	0	1.81E-03
HSA04514_CELL_ADHESION_MOLECULES	129	0.202	2.420	0	1.75E-03
HSA05220_CHRONIC_MYELOID_LEUKEMIA	76	0.250	2.405	0	1.78E-03
HSA04670_LEUKOCYTE_TRANSENDOTHELIAL_MIGRATION	107	0.209	2.346	2.08E-03	2.38E-03
HSA05211_RENAL_CELL_CARCINOMA	68	0.250	2.299	2.10E-03	3.36E-03
HSA04115_P53_SIGNALING_PATHWAY	65	0.248	2.249	4.12E-03	4.43E-03
HSA04512_ECM_RECEPTOR_INTERACTION	86	0.217	2.214	0.00E+00	5.32E-03
HSA04530_TIGHT_JUNCTION	129	0.175	2.180	2.11E-03	6.61E-03
HSA05212_PANCREATIC_CANCER	73	0.229	2.177	2.07E-03	6.33E-03
HSA00562_INOSITOL_PHOSPHATE_METABOLISM	47	0.275	2.168	2.20E-03	6.18E-03
HSA05210_COLORECTAL_CANCER	84	0.212	2.164	2.11E-03	6.08E-03
HSA05130_PATHOGENIC_ESCHERICHIA_COLI_INFECTION_EHEC	50	0.266	2.163	2.11E-03	5.80E-03
HSA01430_CELL_COMMUNICATION	135	0.172	2.150	2.06E-03	5.99E-03
HSA05131_PATHOGENIC_ESCHERICHIA_COLI_INFECTION_EPEC	50	0.266	2.140	2.02E-03	6.05E-03
HSA03050_PROTEASOME	22	0.388	2.113	4.17E-03	7.16E-03
HSA04012_ERBB_SIGNALING_PATHWAY	83	0.207	2.101	2.24E-03	7.70E-03
HSA05221_ACUTE_MYELOID_LEUKEMIA	53	0.255	2.098	4.36E-03	7.50E-03
HSA04070_PHOSPHATIDYLINOSITOL_SIGNALING_SYSTEM	73	0.218	2.041	8.44E-03	1.13E-02
HSA04540_GAP_JUNCTION	93	0.186	1.981	8.32E-03	1.57E-02
HSA04120_UBIQUITIN_MEDIATED_PROTEOLYSIS	39	0.273	1.944	4.19E-03	1.91E-02
HSA00190_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	125	0.159	1.940	6.52E-03	1.90E-02
HSA00970_AMINOACYL_TRNA_BIOSYNTHESIS	37	0.283	1.929	1.43E-02	1.98E-02
HSA04210_APOPTOSIS	81	0.191	1.919	2.11E-03	2.01E-02
HSA04916_MELANOGENESIS	99	0.176	1.903	2.03E-03	2.19E-02
HSA00240_PYRIMIDINE_METABOLISM	85	0.183	1.897	8.46E-03	2.18E-02
HSA04320_DORSO_VENTRAL_AXIS_FORMATION	27	0.311	1.860	1.58E-02	2.58E-02
HSA05218_MELANOMA	71	0.185	1.754	1.30E-02	4.45E-02

VIES INFRAEXPRESADES EN CAF-PT (KEGG)						
Nom	N	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	
HSA00980_METABOLISM_OF_XENOBIOTICS_BY_CYTOCHROME_P450	61	-0.438	-3.869	0.00E+00	0.00E+00	
HSA00641_3_CHLOROACRYLIC_ACID_DEGRADATION	15	-0.728	-3.249	0.00E+00	0.00E+00	
HSA00350_TYROSINE_METABOLISM	58	-0.3826	-3.213	0.00E+00	0.00E+00	
HSA00071_FATTY_ACID_METABOLISM	45	-0.422	-3.201	0.00E+00	0.00E+00	
HSA00561_GLYCEROLIPID_METABOLISM	57	-0.364	-3.100	0.00E+00	0.00E+00	
HSA00480_GLUTATHIONE_METABOLISM	35	-0.455	-2.993	0.00E+00	0.00E+00	
HSA00120_BILE_ACID_BIOSYNTHESIS	38	-0.4226	-2.930	0.00E+00	1.32E-04	
HSA03320_PPAR_SIGNALING_PATHWAY	65	-0.305	-2.764	0.00E+00	3.39E-04	
HSA00624_1_AND_2_METHYLNAPHTHALENE_DEGRADATION	23	-0.495	-2.748	0.00E+00	3.02E-04	
HSA00010_GLYCOLYSIS_AND_GLUONEOGENESIS	63	-0.297	-2.610	0.00E+00	4.44E-04	
HSA00590_ARACHIDONIC_ACID_METABOLISM	50	-0.323	-2.581	0.00E+00	4.04E-04	
HSA04060_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	245	-0.149	-2.324	0.00E+00	3.41E-03	
HSA00380_TRYPTOPHAN_METABOLISM	58	-0.272	-2.278	0.00E+00	4.76E-03	
HSA00220_UREA_CYCLE_AND_METABOLISM_OF_AMINO_GROUPS	30	-0.343	-2.181	1.89E-03	7.75E-03	
HSA00280_VALINE_LEUCINE_AND_ISOLEUCINE_DEGRADATION	44	-0.282	-2.167	5.66E-03	7.91E-03	
HSA00512_O_GLYCAN_BIOSYNTHESIS	29	-0.339	-2.155	0.00E+00	8.27E-03	
HSA03010_RIBOSOME	62	-0.241	-2.107	4.04E-03	9.76E-03	
HSA04610_COMPLEMENT_AND_COAGULATION_CASCADES	68	-0.2226	-2.060	1.97E-03	1.34E-02	
HSA00340_HISTIDINE_METABOLISM	41	-0.270	-1.946	2.01E-03	2.68E-02	
HSA00410_BETA_ALANINE_METABOLISM	25	-0.336	-1.897	5.92E-03	3.46E-02	
HSA00640_PROPANOATE_METABOLISM	34	-0.289	-1.875	7.81E-03	3.73E-02	
HSA02010_ABC_TRANSPORTERS_GENERAL	44	-0.249	-1.830	1.17E-02	4.63E-02	

Taula R2.1. KEGG. Les més representades en els gens sobreexpressats (taula superior) o en els infraexpressats (taula inferior) dels CAF-PT respecte els NCF, considerant un FDR < 0,01. N: nombre de gens del total representats en la via descrita; ES: *enrichment score*; NES: *normalized enrichment score*; NOM p-valor: p-valor nominal i FDR q-valor : *False discovery rate*.

2.2.2.- Ontologia genètica dels gens desregulats entre ambdues poblacions fibroblàstiques.

Seguidament es va emprar l'eina bioinformàtica DAVID (*Database Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) per a classificar la funció gènica dels gens desregulats entre CAF-PT i NCF restringint la cerca a aquells gens que presentaven un q-valor < 0,1, quedant una llista final de 305 sondes infraexpressades ($p=0,003$) i 97 sondes sobrerrepresentades ($p=0,001$).

L'anàlisi d'ontologies genètiques revelà que els gens sobreexpressats en CAF-PT es trobaven bàsicament associats amb processos biològics relacionats amb el desenvolupament (*TGFB2*, *PDGFC*, *cMET*, *CADM1*, *WNT2*) i amb senyalització cel·lular (*TFAP2C*, *NTF-3*, *SEMA5A*, *EFNB2* i *INHBA*) (taula R2.2 superior) Els gens infraexpressats en els CAFs s'agrupaven en categories relacionades amb processos d'homeòstasis (*SNCA*, *AGT*, *ABCA1*, *PL2G4A* i *BCL-2*), resposta a

estímuls externs (*CCL8*, *CCL7*, *CCL11*, *CCL13*, *proS1*) i senyalització intercel·lular (*FGF10*, *FGF13*, *LYN*, *TNFSF10*, *NOVA1*) (taula R2.2 inferior).

Ontologia genètica dels gens sobreexpressats en CAF-PT					
Categoria	Processos biològics	N	p-valor	fold enrichment	FDR
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0048731~system development</i>	31	3,08E-08	2,802	4,90E-05
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0048856~anatomical structure development</i>	32	4,82E-08	2,669	7,66E-05
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0007399~nervous system development</i>	19	1,58E-06	3,669	2,51E-03
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0048513~organ development</i>	24	1,73E-06	2,91	2,75E-03
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0032502~developmental process</i>	33	2,21E-06	2,211	3,52E-03
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0007275~multicellular organismal development</i>	31	3,13E-06	2,283	4,98E-03
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0007267~cell-cell signaling</i>	13	1,92E-05	4,548	3,05E-02

Ontologia genètica dels gens infraexpressats en CAF-PT.					
Categoria	Processos biològics	N	p-valor	fold enrichment	FDR
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0048878~chemical homeostasis</i>	28	2,30E-08	3,532	3,96E-05
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0006629~lipid metabolic process</i>	35	8,42E-08	2,793	1,45E-04
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0065008~regulation of biological quality</i>	50	1,14E-07	2,204	1,97E-04
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0007584~response to nutrient</i>	14	2,58E-07	6,433	4,45E-04
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0009605~response to external stimulus</i>	36	4,42E-07	2,556	7,62E-04
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0042592~homeostatic process</i>	31	1,53E-06	2,666	2,63E-03
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0042221~response to chemical stimulus</i>	42	4,43E-06	2,124	7,63E-03
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0007267~cell-cell signaling</i>	26	6,22E-06	2,792	1,07E-02
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0048754~branching morphogenesis of a tube</i>	9	6,82E-06	8,907	1,18E-02
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0009991~response to extracellular stimulus</i>	15	8,32E-06	4,386	1,44E-02
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0031667~response to nutrient levels</i>	14	1,20E-05	4,571	2,06E-02
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0008202~steroid metabolic process</i>	14	1,26E-05	4,548	2,18E-02
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0006869~lipid transport</i>	12	1,46E-05	5,36	2,51E-02
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0009725~response to hormone stimulus</i>	19	1,69E-05	3,321	2,91E-02
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0001658~branching involved in ureteric bud morphogenesis</i>	6	1,80E-05	17,543	3,10E-02
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0060675~ureteric bud morphogenesis</i>	6	1,80E-05	17,543	3,10E-02
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0001763~morphogenesis of a branching structure</i>	9	1,81E-05	7,823	3,12E-02
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0006766~vitamin metabolic process</i>	9	2,00E-05	7,719	3,45E-02
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0006873~cellular ion homeostasis</i>	19	2,03E-05	3,277	3,49E-02
GOTERM_BP_ALL	<i>GO:0055082~cellular chemical homeostasis</i>	19	2,51E-05	3,225	4,33E-02

Taula R2.2. Ontologia genètica dels gens desregulats. Processos biològics en el que estan involucrats els gens desregulats. N: nombre de gens representats en el terme biològic, FDR: *false discovery rate*.

2.3. Selecció de gens diferencialment expressats entre NCF i CAF-PT.

Mitjançant l'anàlisi pel mètode estadístic *SAM*, del total de gens desregulats es va obtenir un llistat de 109 sondes diferencialment expressades entre els NCF i CAF-PT. El criteri per a la selecció d'aquestes sondes va ser el següent:

- Tenir com a mínim un gen associat.
- Expressió mitjana del valor d'*RMA* (valor logarítmic) >4 per a descartar inespecificitats i sondes poc abundants.
- Desviació estàndard de l'expressió logarítmica de *RMA* $>0,1$ per a descartar sondes amb baixa variabilitat.
- *FDR* q-valor $< 0,05$
- *Fold change* >2 per als gens sobreexpressats i $<0,5$ en els infraexpressats.

De les 109 sondes obtingudes diferencialment expressades, 39 corresponents a 38 gens descrits es classificaven com a sobreexpressades en el grup dels CAF-PT respecte els NCF; mentre que 70 sondes (corresponents a 70 gens coneguts) es trobaven infraexpressades en els CAF-PT respecte els NCF. El llistat dels 108 gens diferencialment expressats així com la funció seva funció es troba en l'apartat d'annexes (annex 5)

Els perfils d'expressió dels gens desregulats significativament entre NCF i CAF-PT van ser explorats per anàlisi d'agrupament jeràrquic no-supervisat i les mostres van ser agrupades segons la seva similitud gènica quedant clarament agrupats els CAF-PT per una banda, i els NCF per l'altre independentment del seu origen. Aquests resultats demostraren que els CAF-PT presenten un perfil d'expressió gènica més similars entre ells que no pas amb els seus aparellats normals (figura R2.6).

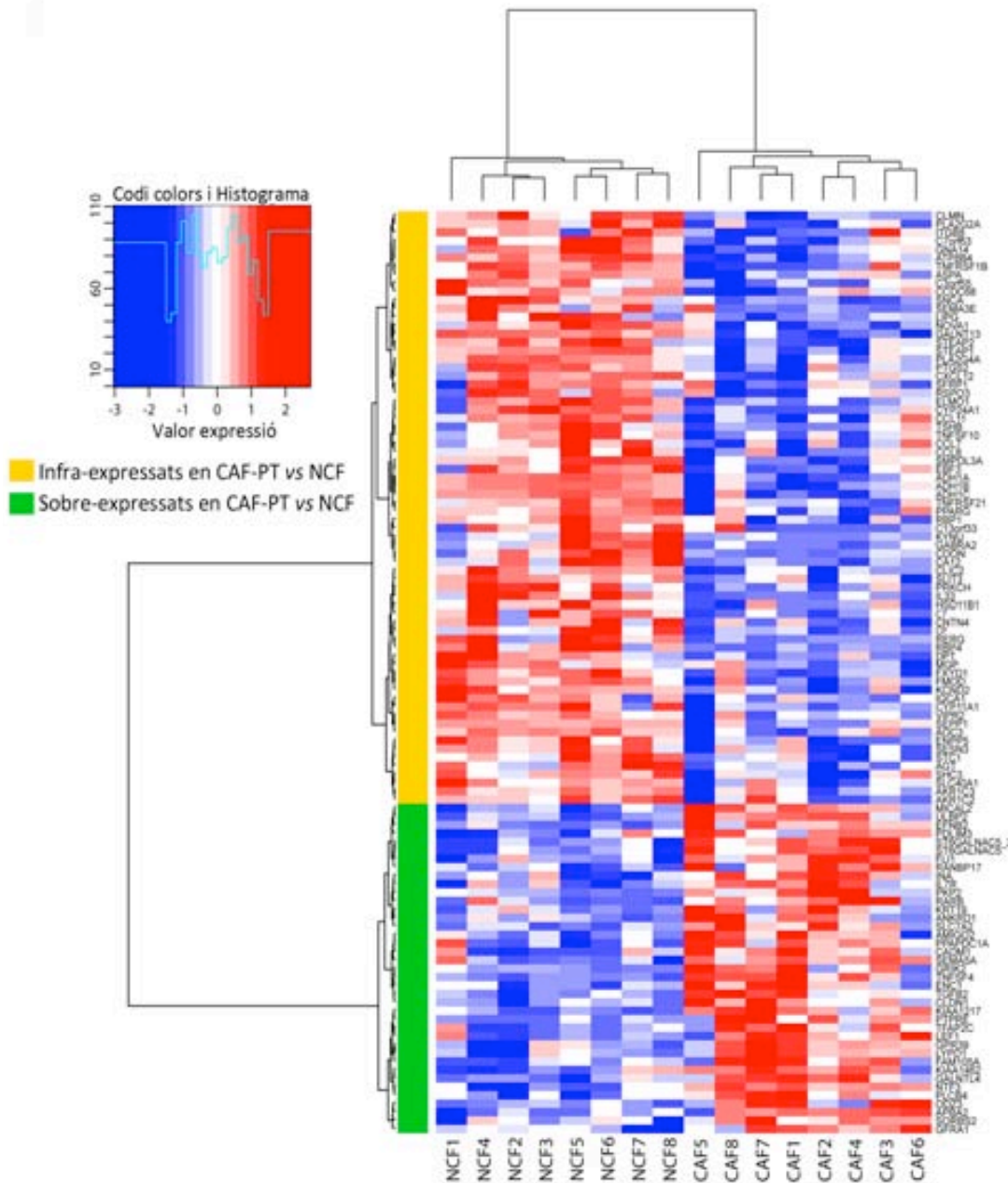
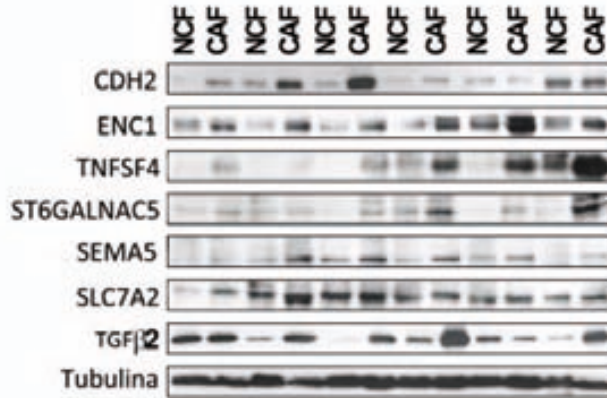


Figura R2.6. Representació gràfica en *heatmap* de l'expressió dels 108 gens significativament desregulats entre NCF i CAF-PT. El grau d'expressió és representat per una gradació de colors on el vermell representa la màxima expressió i el blau la mínima. Els fibroblasts emprats en l'anàlisi de microarrays es classifiquen clarament segons el nivell d'expressió dels gens, agrupant-se els NCF i els CAF-PT per separat. Les columnes representen les mostres emprades en l'anàlisi i les files representen els diferents gens seleccionats. Aquests s'agrupen segons si es troben infraexpressats en CAF-PT (groc) o sobreexpressats (verd). Les mostres s'agrupen més pel seu caràcter activat que no pas el seu origen.

... (, arq... ó, Ga, (l et, s ... auq (s ...

... (l et, s ... àuq... (... (... s ...



... (... (...

... DsgvlyevDf ... and2ónG2f gvD33

... (l et, s ... auq... (... (... s ...

5α%

2.4.1.-La signatura de 108 gens té un valor pronòstic aplicada en dades de bases públiques de mostres de pacients amb càncer colorectal en estadis II i III.

Tenint en compte les dades prèvies dels resultats *in vivo*, es va voler fer una primera aproximació per a esbrinar el valor pronòstic que pogués tenir l'expressió d'aquests 108 gens *in silico*. Aquest anàlisi es va fer emprant dades d'expressió de pacients amb càncer colorectal disponibles en bases de dades públiques. El conjunts de dades escollits van ser: GSE14333 i GSE17537 que van ser combinats donant lloc a una cohort de 267 pacients d'estadis I-III; i el GSE33113 de 89 pacients de càncer colorectal d'estadi II. Es va calcular la puntuació global dels 108 gens per a cada un dels pacients de la cohort i es van dicotomitzar segons el seu valor, establint la mitjana com a punt de tall. Els pacients amb valors d'expressió superior al punt de tall eren considerats d'alta expressió i per tant d'alt risc, i els de valors inferiors de baix risc.

El temps a la recurrència (calculat en mesos) o supervivència lliure de malaltia (SLM) va ser avaluat per a tots els pacients d'ambdues cohorts i es va establir la seva relació amb l'expressió global dels 108 gens mitjançant el model de corbes de *Kaplan-Meier* i la funció estadística *Log-Rank* (diferències significatives entre grups d'alta i baixa expressió quan $p < 0,05$) (figura R2.11 A i B). Aquests resultats semblaven atribuir un valor predictiu pronòstic a l'expressió dels gens desregulats entre NCF i CAF-PT.

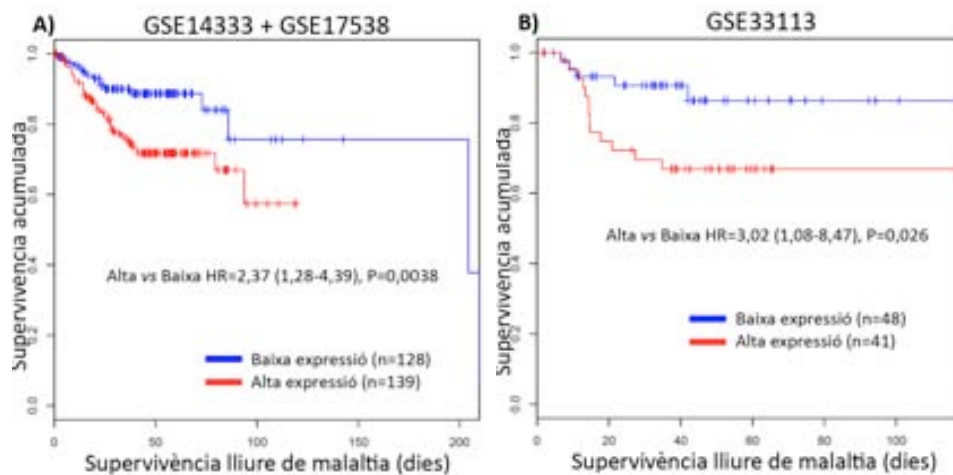


Figura R2.11. Corbes Kaplan-Meier per a la cohort combinada de GSE14333 i GSE17537 (A) i pel GSE33113 (B). En totes dues cohorts, els pacients classificats com de baixa puntuació (blau) presenten un major temps a la recurrència que els pacients d'alta puntuació (vermell) que és estadísticament significatiu ($P=0,0038$ i $P=0,026$ respectivament).

El model de classificació és un model matemàtic que intenta predir la classe d'un objecte basant-se en un conjunt de característiques.

El model de classificació és un model matemàtic que intenta predir la classe d'un objecte basant-se en un conjunt de característiques. El model de classificació és un model matemàtic que intenta predir la classe d'un objecte basant-se en un conjunt de característiques.

El model de classificació és un model matemàtic que intenta predir la classe d'un objecte basant-se en un conjunt de característiques. El model de classificació és un model matemàtic que intenta predir la classe d'un objecte basant-se en un conjunt de característiques.

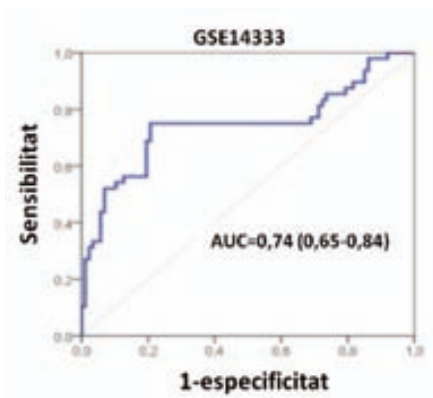
El model de classificació és un model matemàtic que intenta predir la classe d'un objecte basant-se en un conjunt de característiques. El model de classificació és un model matemàtic que intenta predir la classe d'un objecte basant-se en un conjunt de característiques.

El model de classificació és un model matemàtic que intenta predir la classe d'un objecte basant-se en un conjunt de característiques.

El model de classificació és un model matemàtic que intenta predir la classe d'un objecte basant-se en un conjunt de característiques. El model de classificació és un model matemàtic que intenta predir la classe d'un objecte basant-se en un conjunt de característiques.

El model de classificació és un model matemàtic que intenta predir la classe d'un objecte basant-se en un conjunt de característiques. El model de classificació és un model matemàtic que intenta predir la classe d'un objecte basant-se en un conjunt de característiques.

El model de classificació és un model matemàtic que intenta predir la classe d'un objecte basant-se en un conjunt de característiques.



El model de classificació és un model matemàtic que intenta predir la classe d'un objecte basant-se en un conjunt de característiques. El model de classificació és un model matemàtic que intenta predir la classe d'un objecte basant-se en un conjunt de característiques.

5>F

L'associació entre el temps a la progressió (o supervivència lliure de malaltia) en el conjunt de dades GSE14333 emprat en l'elaboració del model va ser avaluat mitjançant el model de corbes de supervivència de *Kaplan-Meier* i la funció estadística Log Rank. El punt de tall emprat en aquesta ocasió per a dividir els pacients en grups d'alta o baixa expressió (i per tant d'alt i baix risc) va ser la prevalença a la recurrència en la cohort d'estudi (35,6%) (figura R3.2).

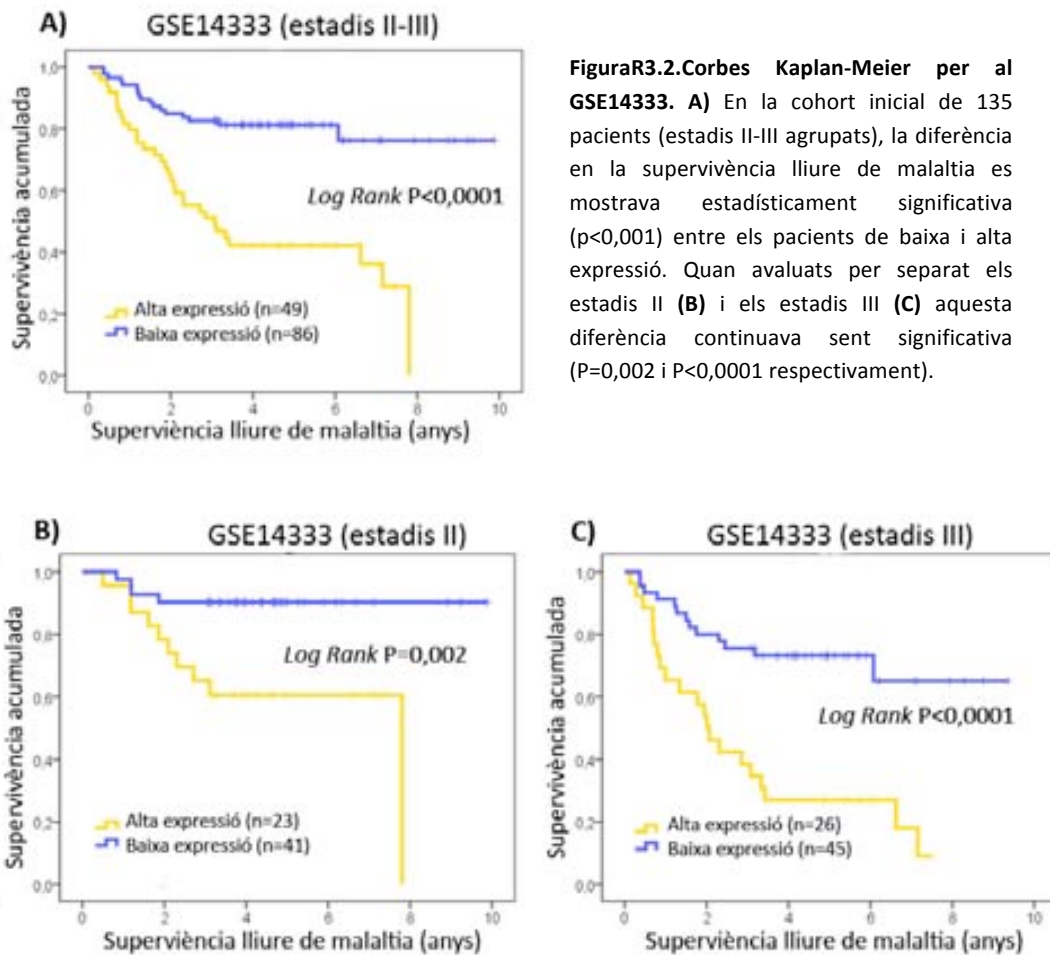


Figura R3.2. Corbes Kaplan-Meier per al GSE14333. A) En la cohort inicial de 135 pacients (estadis II-III agrupats), la diferència en la supervivència lliure de malaltia es mostrava estadísticament significativa ($p < 0,001$) entre els pacients de baixa i alta expressió. Quan avaluats per separat els estadis II (**B**) i els estadis III (**C**) aquesta diferència continuava sent significativa ($P = 0,002$ i $P < 0,0001$ respectivament).

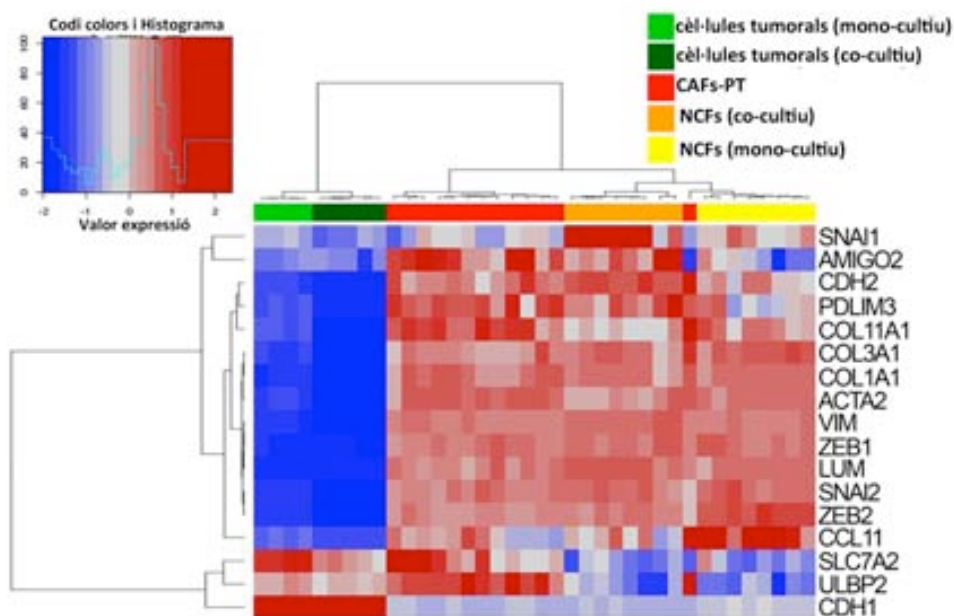
3.1.1.-L'expressió dels 5 gens del classificador és principalment expressada per fibroblasts i no sembla estar expressada per altres tipus cel·lulars ni influenciada per processos de transició epiteli-mesènquima (TEM).

Tot i que els gens del classificador van ser obtinguts a partir d'un llistat de gens de fibroblasts, vam voler comprovar l'especificitat de l'expressió d'aquests en altres tipus cel·lulars per veure'n la possible repercussió a nivell de tot el tumor, realitzant diferents aproximacions.

L'expressió es va avaluar en unes dades d'expressió de microarrays corresponents a:

- Cèl·lules tumorals en monocultiu (DLD-1)
- Cèl·lules tumoral (DLD-1) en co-cultiu amb fibroblasts normals adjacents al tumor (NCF), mitjançant sistema *Transwell*.
- NCF en mono-cultiu
- NCF en co-cultiu amb cèl·lules epitelials DLD-1
- CAFs en mono-cultiu.

L'objecte d'aquest co-cultiu era veure com canviava el perfil d'expressió gènica d'ambdós tipus cel·lulars a l'estar en contacte mitjançant el sistema *Transwell* (contacte indirecte per factors solubles secretats al medi) durant 5 dies. Les dades d'aquests microarrays d'expressió, sorgides d'un altre projecte de tesi dins del nostre grup de recerca, es van fer servir en aquesta tesi únicament per a aquest efecte. Com es mostra en la figura R3.5, les cèl·lules epitelials després de l'exposició als factors solubles secretats pels fibroblasts en el co-cultiu per *Transwell*, no adquireixen trets de transició epiteli-mesènquima després de 5 dies en contacte.



FiguraR3.5.Representació gràfica en *heatmap* per comprovar efectes en TEM. Expressió dels 5 gens del classificador (*AMIGO2*, *PDLIM3*, *CCL11*, *ULBP2* i *SLC7A2*), de gens associats amb la transició epiteli-mesènquima (*ACTA2*, *ZEB1*, *ZEB2*, *SNAI1*, *SNAI2*,*CDH2* i *CDH1*) i gens mesenquimals (*COL11A1*, *COL3A1*, *COL1A1*, *VIM*, *LUM*). En columnes es representen el tipus cel·lulars.

Un cop comprovats aquests aspectes relacionats amb l'especificitat de l'expressió dels gens del classificador, vam procedir a estudiar el seu valor pronòstic en altres conjunts de dades independents i diferents a l'usat en el seu desenvolupament (GSE14333).

3.2. El classificador de 5 gens identifica pacients de mal pronòstic en dades *in silico*.

Es va voler conèixer com era el poder predictiu de recurrència del model constituït per *CCL11*, *PDLIM3*, *AMIGO2*, *ULBP2* i *SLC7A2* aplicant-lo a diferents conjunts de dades independents. Primerament, per tal de corroborar que l'expressió d'aquests gens donava informació de l'estroma de la mostra tumoral, es va valorar si el classificador també tenia poder pronòstic en mostres enriquides en cèl·lules tumorals. Per aquest motiu es van emprar les dades d'expressió de dos conjunts de dades corresponents a mostres obtingudes per la tècnica microscopia de captura làser. Com a validació positiva es van emprar 3 conjunts de dades corresponents a expressió de tot el tumor (assegurant una presència de component estromal > 20%). Per a tots aquests conjunts de dades es va avaluar el poder predictiu del model de 5 gens calculant l'àrea sota la corba (AUC). Els valors obtinguts per a cada un dels GSE emprats es resumeixen en la taula R3.1.

Conjunt de dades GEO	AUC (IC)	Sèries de mostres	Taula R3. 1. Valors de les AUC obtinguts en els diferents GSE. 3 conjunts de dades van servir com a validació positiva (dades d'expressió de tot el tumor o contenint més d'un 20% d'estroma), mentre que els conjunts de dades d'expressió de cèl·lules tumorals obtingudes per LCM no mostraven poder predictiu (valor d'AUC molt proper a 0,5).
GSE17538	0,84 (0,76-0,93)	Validació positiva	
GSE14095	0,68 (0,50-0,76)	Validació positiva	
GSE33113	0,68 (0,53-0,83)	Validació positiva	
GSE18105 (LCM)	0,52 (0,38-0,65)	Validació negativa	
GSE21510 (LCM)	0,54 (0,43-0,66)	Validació negativa	

L'obtenció d'aquests resultats va permetre demostrar l'especificitat estromal del classificador de 5 gens al no presentar poder predictiu en les mostres de LCM. Així doncs, mentre que la capacitat per a predir recurrència en els conjunts de dades contenint informació de tot el tumor (GSE17538, GSE14095 i GSE33113) era similar al valor d'AUC obtingut pel GSE14333; en els conjunts de dades de mostres enriquides en cèl·lules tumorals (GSE18105 i GSE21510) el valor de la AUC es trobava molt proper a 0,5 i per tant no oferia més predicció que la que es donaria per atzar.

L'associació entre el temps a la progressió i l'expressió global dels gens del classificador també va ser avaluada mitjançant les corbes de Kaplan-Meier i la funció estadística Log Rank.

Per a cada cohort avaluada els pacients van ser dividits en dos grups usant com a punt de tall la prevalença a la recurrència en cada cohort d'estudi i sent classificats com d'alt risc de recurrència aquells amb valors superiors al punt de tall i designats com de baix risc aquells amb valors inferiors. Els resultats de l'anàlisi de regressió de Cox univariant per a cada cohort es mostra en la taula R3.2. En el cas del GSE14095 l'absència de dades referents a la supervivència va fer que no es pogués dur a terme aquest anàlisi (només es disposava de dades respecte la recurrència).

GEO	Recurrència	HR	IC (95%)	Log Rank (p-valor)
GSE17538	31,7%			
Estadis II-III		6,090 (1,37)	2,94-12,619 (1,22-1,54)	<0,0001
Estadis II		10,335	2,075-51,46	0,004
Estadis III		4,36	1,84-10,312	0,001
GSE33113	27,9%			
Estadis II		2,92 (1,206)	1,83-7,2 (1,036-1,403)	0,020 (0,016)

Taula R3.2. Anàlisi de regressió de Cox univariant en GSE17538 i GSE33113. A la taula es mostra la prevalença a la recurrència en cada cohort d'estudi (percentatge de pacients assignats en el grup d'alt risc), el quocient de riscos instantanis o HR (*Hazard ratio*), l'interval de confiança (IC) i el p-valor del test *Log Rank*. Entre parèntesis els valors obtinguts considerant el valor d'expressió dels 5-gens com a una variable continua sent l'HR l'increment del risc en augmentar l'expressió 1 desviació estàndard.

3.2.1.- Validació del classificador en una meta-cohort

Per a ampliar el valor dels resultats obtinguts vam combinar els conjunts de dades previs GSE17538 i GSE33113 amb dos més no emprats anteriorment com el GSE31595 (només 38 pacients, molt pocs per avaluar-lo independentment) i el GSE26892 per a originar una meta-cohort més àmplia de 317 pacients. Les característiques clíniques i demogràfiques de la meta-cohort obtinguda es mostren a continuació (taula R3.3).

Meta-cohort (GSE17538,GSE33113, GSE26892, GSE31595)		
Nombre pacients		317
Sexe	<i>Home</i>	104 (51.2%)*
	<i>Dona</i>	99 (48.8%)*
Mitjana d'edat		66.91*
Estadiatge	<i>Estadi I</i>	28 (8.8%)
	<i>Estadi II</i>	176 (55.5%)
	<i>Estadi III</i>	113 (35.6%)
Recurrència	<i>si</i>	103 (32.5%)
	<i>no</i>	214 (67.5%)

Taula R3.3. Característiques clíniques i demogràfiques de la meta-cohort de 317 pacients. Obtinguda de la combinació de diferents conjunts de dades, dels 317 casos obtinguts, un 32,5% són identificats com d'alt risc i un 67,5% de baix risc. Hi ha dades que només es troben disponibles per a 203 casos(*).

El valor global d'expressió del classificador en cada conjunt de dades va ser calculat a partir de les unitats tipificades (*z-score*) de cada gen, minimitzant així l'impacte del biaix originat en ser les dades de diferents centres i plataformes d'anàlisi. Els corresponents anàlisis de supervivència van ser realitzats i els resultats obtinguts resumits en la taula R3.4

		SLM (5 anys)	HR	IC (95%)	Log Rank (p-valor)
Tots els estadis	Alta expressió	39%	3,018	2,05-4,45	<0,0001
	Baixa expressió	72%			
Estadis II	Alta expressió	39%	3,62	2,069-6,323	<0,0001
	Baixa expressió	76%			
Estadis III	Alta expressió	34%	2,203	1,26-3,86	0,006
	Baixa expressió	59%			

Taula R3.4. Tases de supervivència de la meta-cohort en estudi . Separant els pacients en grups d'alta o baixa expressió i fent servir la prevalença com a punt de tall. En tots els estadis la diferència en supervivència lliure de malaltia (SLM) als 5 anys entre els pacients d'alta i baixa expressió és estadísticament significativa. HR (*Hazard Ratio*), IC (interval de confiança).

Per a esbrinar el potencial que podria tenir la valoració de la expressió global d'aquests 5 gens en la predicció de la recurrència en la pràctica clínica, es van calcular les probabilitats *post-test* i es van comparar amb la probabilitat esperada (prevalença de la recurrència en la població).

Tenint en compte tots els estadiatges de la meta-cohort estudiada (recurrència esperada del 32,5%) els resultats foren els mostrats en la taula R3.5.

	Prevalença	LR+	LR-	Probabilitat Post-test (+)	Probabilitat Post-test (-)	Diferència	
Meta-cohort de validació <i>in silico</i>	Tots els estadis	0.325 (0.27-0.38)	2.38 (1.75-3.24)	0.60 (0.48-0.75)	0.53 (0.43-0.63)	0.22 (0.19-0.27)	0.31
	Estadi I	0.11 (0.02-0.28)	2.08 (0.33-13.0)	0.79 (0.35-1.79)	0.2 (0.01-0.7)	0.08 (0.015-0.29)	0.12
	Estadi II	0.29 (0.22-0.36)	2.54 (1.69-3.8)	0.56 (0.40-0.77)	0.51 (0.37-0.64)	0.18 (0.12-0.26)	0.33
	Estadi III	0.43 (0.34-0.53)	2.04 (1.23-3.38)	0.65 (0.48-0.88)	0.61 (0.44-0.75)	0.33 (0.23-0.45)	0.28

Taula R3.5. Probabilitats *a posteriori*. La taula mostra la prevalença en cada subgrup (equivalent a la probabilitat esperada de recurrència). LR (*Likelihood Ratio*) o quocient de probabilitat positiva i negativa i probabilitats post-test amb la diferència entre la positiva i la negativa.

Considerant tots els estadis, la probabilitat d'un pacient identificat com d'alt risc de recaure augmentava fins al 53% mentre que disminuïa al 22% en el cas de baix risc (diferència absoluta de 31%). En estratificar els pacients segons el seu estadiatge, en els estadis I per als pacients d'alt risc la probabilitat de recurrència passava d'un 11% a un 20% i disminuïa al 8% en els pacients de baix risc. En el cas dels estadis II i III el potencial clínic de l'expressió de la signatura de 5 gens es mostrava major, ja que la probabilitat de recurrència pels d'alt risc augmentava d'un 29% a un 51% en els estadis II i d'un 43% a un 61% en els estadis III, havent-hi una diferència absoluta entre les probabilitats post-test positiva i negativa de 33% i 28% respectivament. L'absència de més dades clíniques no va fer possible comparar la signatura de 5 gens amb d'altres factors clínics per a les dades *in silico*.

3.3. Validació del classificador per qRT-PCR en una cohort de mostres de pacients

Els resultats de la validació *in silico* amb els diferents conjunts de dades va permetre poder associar el classificador amb temps a la progressió en dades d'expressió obtingudes per tecnologia de microarrays. Per a poder portar aquest test a un àmbit més ampli d'aplicació clínica vam estudiar l'expressió en 142 mostres de pacients amb càncer colorectal per la tècnica de qRT-PCR. Les característiques d'aquesta cohort en estudi eren molts similars a les descrites pels GSE14333 pel que fa a nombre de pacients, proporció d'estadis i percentatge de pacients tractats amb adjuvència. Referent a la distribució en la localització del tumor (còlon i recte) si que hi havia més discrepàncies, però dades prèvies ((Sanz-Pamplona, Cordero et al. 2011) havien demostrat que a nivell molecular no hi ha diferències entre el còlon i el recte (taula R3.6).

Mostres de validació per qRT-PCR

Nombre pacients		142
Sexe	<i>Home</i>	80 (56.3%)
	<i>Dona</i>	62 (43.7%)
Mitjana d'edat		66.71
Estadiatge	<i>Estadi I</i>	-
	<i>Estadi II</i>	62 (43.7%)
	<i>Estadi III</i>	80 (56.3%)
Localització	<i>Còlon</i>	91 (64.1%)
	<i>Recte</i>	51 (35.9%)
Grau	<i>Baix</i>	128 (90.1%)
	<i>Alt</i>	14 (9.9%)
Nòduls aïllats	<i>>14</i>	96 (67.6%)
	<i><14</i>	46 (32.4%)
QTadjuvant	<i>si</i>	74 (52.1%)
	<i>no</i>	68 (47.9%)
Recurrència	<i>si</i>	43 (30.3%)
	<i>no</i>	99 (69.7%)

Taula R3.6. Característiques clíniques i demogràfiques dels pacients analitzat per qRT-PCR. 142 casos de pacients amb CCR i obtinguts de la base de dades per al seu posterior anàlisi d'expressió gènica per qRT-PCR. QT: quimioteràpia

El valor total de l'expressió dels gens del classificador va ser obtingut sumant per a cada mostra la unitat tipificada (*z-score*) de cada gen (canviant de signe el valor de l'expressió de *CCL11* pel fet de ser un gen protector). Els pacients van ser dicotomitats segons el valor de la seva expressió global tenint com a punt de tall la prevalença a la recurrència. En aquesta cohort el 30,3% del pacients va ser considerat d'alt risc (proporció de recurrents en la cohort d'estudi), mentre que el 69,7% van ser classificats com de baix risc. L'anàlisi de supervivència es va fer per a tots els pacients conjuntament i per estadis separats (figura R3.8 i taula R3.7).

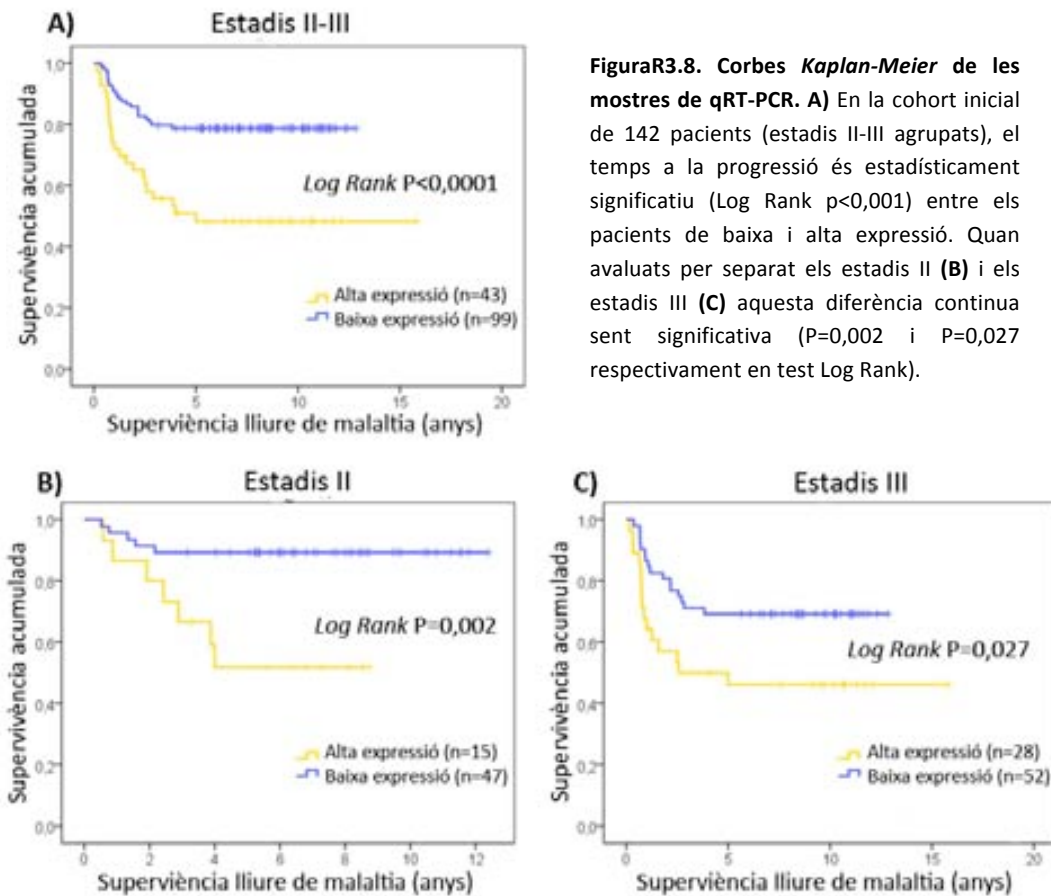


Figura R3.8. Corbes Kaplan-Meier de les mostres de qRT-PCR. A) En la cohort inicial de 142 pacients (estadis II-III agrupats), el temps a la progressió és estadísticament significatiu (Log Rank $p<0,001$) entre els pacients de baixa i alta expressió. Quan avaluats per separat els estadis II (**B**) i els estadis III (**C**) aquesta diferència continua sent significativa ($P=0,002$ i $P=0,027$ respectivament en test Log Rank).

	Signatura 5-gens	Tots estadis	Estadi II	Estadi III	
Cohort validació per qRT-PCR (n=142)	SLM	Alta expressió	46%	52%	43%
		Baixa expressió	79%	89%	69%
	SEM	Alta expressió	55%	58%	53%
		Baixa expressió	84%	89%	79%

Taula R3.7. Supervivència lliure de malaltia (SLM) i supervivència específica de malaltia (SEM) dels pacients d'alt i baix risc de la cohort analitzada per qRT-PCR.

Per a conèixer la rellevància dels altres factors clínics en la predicció de recurrència, es va dur a terme un anàlisi univariant amb totes les característiques de la cohort d'estudi. Encara que l'expressió de la signatura de 5-gens es presentà com a un bon factor predictiu de recurrència ($p<0,0001$), altres paràmetres com l'estadi (III), el baix grau de diferenciació i la invasió limfàtica també s'associaven amb mal pronòstic en aquesta cohort.

Posteriorment aquestes variables van ser incloses en un anàlisi multivariant i la signatura de 5 gens va quedar com a únic factor independent predictiu de recurrència (taula R3.8).

Cohort inicial (n=142)	Univariant			Multivariant		
	P valor	HR	95% IC	P valor	HR	95,0% IC
Sexe (Home vs dona)	0.07	0.55	0.29-1.04			
Edat >55 anys	0.88	0.93	0.37-2.36			
Estadi (III vs II)	0.013	2.33	1.19-4.53	0.072	1.96	0.94-4.08
Localització (recte vs còlon)	0.055	1.79	0.99-3.26			
Grau (alt vs baix)	0.033	2.42	1.07-5.45	0.502	1.35	0.56-3.206
Nòduls aïllats (<14 vs >14)	0.063	1.77	0.97-3.24			
Invasió limfàtica (no)	0.049	0.53	0.28-0.99	0.406	0.75	0.38-1.48
Quimioteràpia adjuvant (no)	0.083	1.71	0.93-3.14			
Signatura col·làgens*	0,551	1,04	0,91-1,18			
Classificador 5-gens (alta vs baixa)	<0.0001	2,95	1.62-5.37	0.004	2.5	1.34-4.69
Classificador 5-gens (continua, +1DE)	0.005	1.19	1.05-1.34	0.032	1.56	1.01-1.32

Taula R3.8. Anàlisi univariant i multivariant en les mostres de qRT-PCR. L'estadi, el grau de diferenciació i la invasió limfàtica, juntament amb la signatura de 5 gens; s'associen amb pronòstic. L'anàlisi multivariant d'aquestes variables destaquen el classificador de 5 gens com a únic factor pronòstic independent ($p=0.004$). considerant-la com a variable contínua només manté la significança en l'anàlisi univariant. * la signatura de col·làgens també va ser inclosa en aquest anàlisi però la seva descripció es presenta en l'apartat 3.4.1.

A continuació vam analitzar quin era el potencial pronòstic del classificador en considerar només aquells pacients no sotmesos a tractament amb quimioteràpia ($n=68$) i es va poder comprovar (tal i com es mostra en la figura R3.9A que el classificador continuava estant associat amb la recurrència en el pacients no tractats. A més, en els pacients amb elevada expressió (i per tant elevat risc) semblava associar-se a un clar benefici de la quimioteràpia mentre que els pacients amb baixa expressió no semblaven mostrar millores en el pronòstic en presència de tractament quimioteràpic (figura R3.9 B i C). Si només considerem els 68 pacients de la cohort que no reben tractament amb quimioteràpia, el classificador de 5 gens clarament s'associa amb recurrència ($HR=3,53$; $IC\ 95\% 1,6-7,78$; $P=0,001$). Estratificant el total de pacients en dos grups de risc (associat amb el classificador) en funció de si han rebut tractament o no; només els pacients d'alt risc (alta expressió) semblen presentar un benefici en el tractament. L'administració de quimioteràpia als pacients considerats de baix risc segons el classificador, no suposa millores en la supervivència ($P=0,213$).

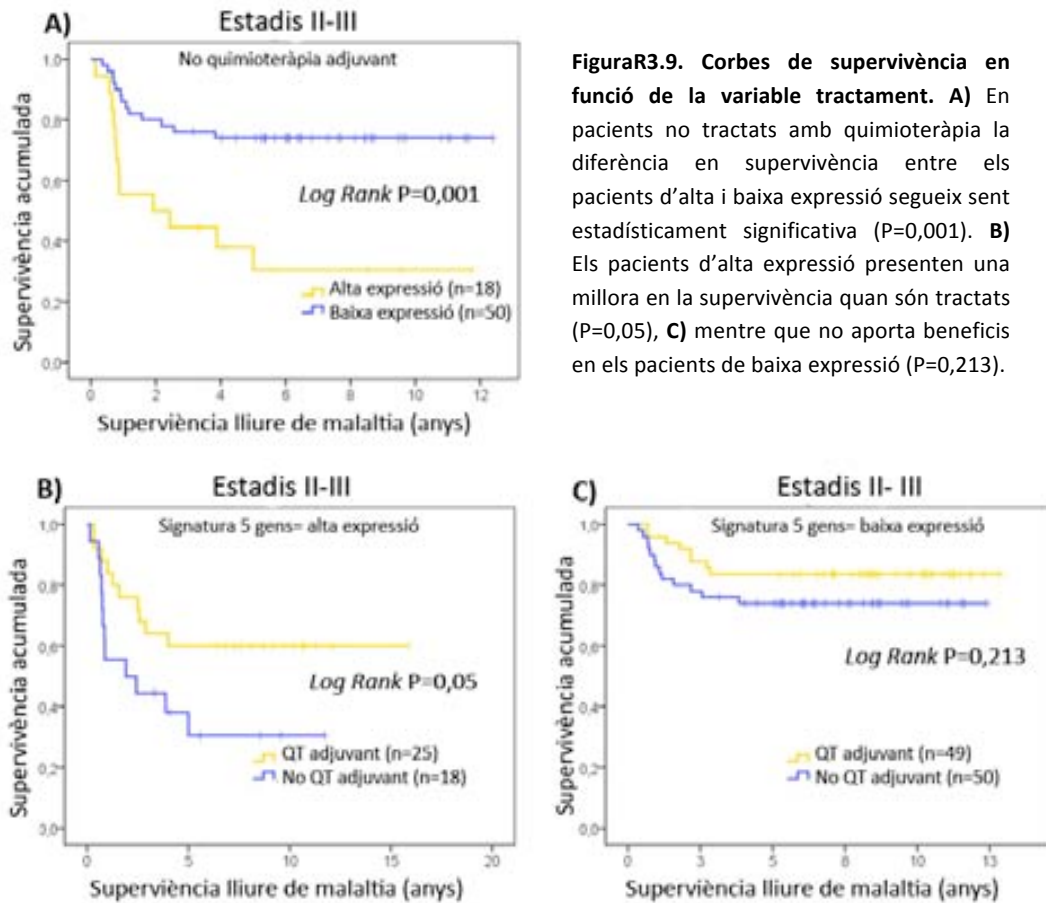


Figura R3.9. Corbes de supervivència en funció de la variable tractament. A) En pacients no tractats amb quimioteràpia la diferència en supervivència entre els pacients d'alta i baixa expressió segueix sent estadísticament significativa ($P=0,001$). B) Els pacients d'alta expressió presenten una millora en la supervivència quan són tractats ($P=0,05$), C) mentre que no aporta beneficis en els pacients de baixa expressió ($P=0,213$).

Tenint en compte només els pacients d'estadi II ($n=62$), 40 d'ells no van rebre quimioteràpia. Dins d'aquest grup de no tractats d'estadi II, el classificador de 5 gens identifica un 20% amb un alt risc de recurrència ($HR=8,38$; $95\%IC$ 1,95-35,5; $P=0,004$). L'administració de la quimioteràpia adjuvant en aquest grup de risc podria induir un benefici en la supervivència (**$HR=0,263$; $95\%IC$ 0,05-1,34; $P=0,106$**), tot i que seria necessària una cohort més àmplia per a millorar el poder estadístic.

Per altra banda, 47 dels pacients d'estadi II són classificats com de baix risc i el 32% d'aquests van rebre quimioteràpia. Potser aquests pacients podrien ser considerats com a sobre-tractats ja que sembla que els pacients de baix risc no es beneficiïn de la quimioteràpia adjuvant.

Amb l'objectiu de conèixer el valor clínic del classificador, les probabilitats *post-test* van ser calculades per a totes les mostres analitzades per qRT-PCR (taula R3.9).

		Prevalença	LR+	LR-	Probabilitat <i>post-test</i> (+)	Probabilitat <i>post-test</i> (-)	Diferència
Cohort inicial de validació per qRT-PCR	Tots els estadis	0.30 (0.23-0.39)	2.41 (1.51-3.82)	0.60 (0.43-0.83)	0.51 (0.36-0.66)	0.21 (0.13-0.3)	0.30
	Estadi II	0.19 (0.11-0.32)	3.64 (1.64-8.07)	0.50 (0.25-0.97)	0.47 (0.22-0.73)	0.11 (0.04-0.24)	0.36
		0.39 (0.28-0.5)	1.82 (1-3.29)	0.70 (0.49-1)	0.54 (0.34-0.72)	0.31 (0.19-0.45)	0.23
	Estadi III						

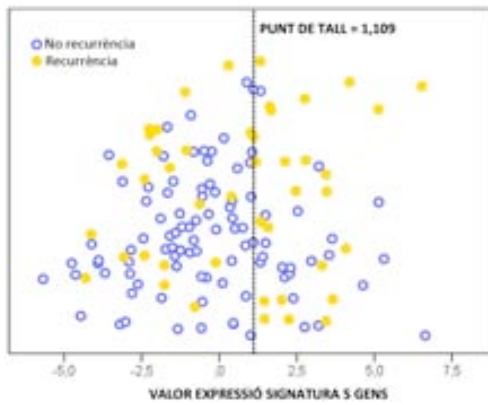
Taula R3.9. Probabilitats *post-test* per al classificador de 5 gens en la cohort de pacients analitzats per qRT-PCR. La diferència entre les probabilitats *post-test* positiva i negativa és 36% en els estadis II i 23% en els estadis III.

Com indiquen els resultats presentats en la taula R3.9, la probabilitat de predir la recurrència incrementa si es té en compte l'expressió dels gens del classificador. La probabilitat de recurrència teòrica (sense distingir entre estadis) passa de ser del 30% en un inici, augmentant fins al 51% en els tumors d'alta expressió i disminuint al 21% quan baixa expressió (probabilitat *post-test* negativa). No obstant el valor més significatiu d'aquest anàlisi fou veure les repercussions en els pacients d'estadi II on la probabilitat teòrica de recurrència del 19% augmentava fins al 47% en els pacients d'alta expressió i disminuïa fins a l'11% en els de baixa expressió. Tot i que no tant espectaculars, en els pacients d'estadi III l'avaluació de l'expressió dels gens del classificador també suggeria una millora en la predicció de recurrència.

3.4. Limitacions del classificador. Desconeixement de la proporció d'estroma en les mostres.

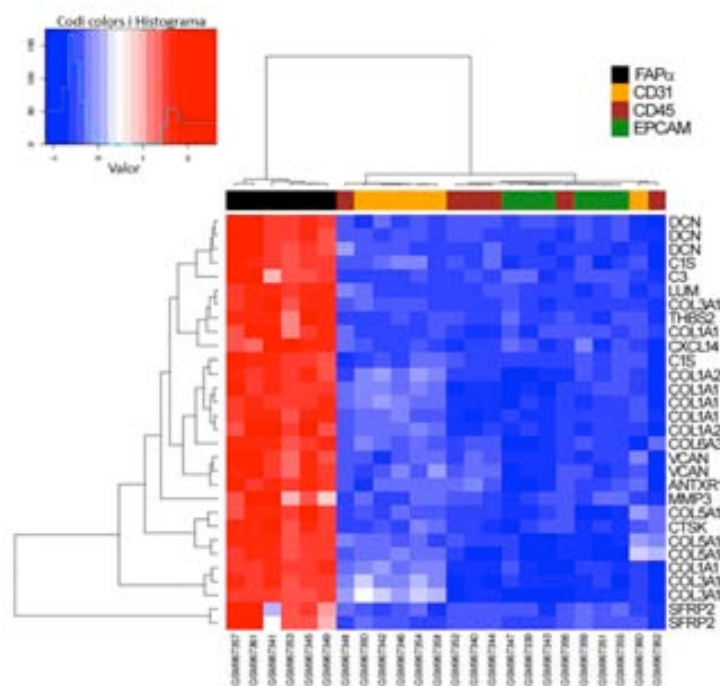
Encara que el poder predictiu del classificador era elevat en mostres de tot el tumor, hi havia un percentatge d'aquestes que era mal classificada. En representar el pacients en un diagrama de punts en funció del valor global del classificador i l'estat de recurrència observarem que una petita proporció d'aquests no eren ben predits (figura R3.10). Vam considerar la possibilitat que fossin mostres amb poca proporció d'estroma (fibroblasts) les que es trobaven mal classificades. Poc estroma en la peça tumoral d'origen podria implicar unemascament del poc ARNm de fibroblasts per part del material genètic de la resta de cèl·lules tumorals.

Com a eina per a poder millorar el valor pronòstic del classificador ens vam decidir a estimar la quantitat de fibroblasts en les mostres a partir de l'expressió de gens típics d'aquest tipus cel·lular. A partir de les diferents dades de microarrays emprades en aquesta tesi, vam definir una signatura genètica constituïda pels gens més específics de fibroblasts i menys variables entre la població de CAFs.



FiguraR3.10. Diagrama de punts de les 142 mostres emprades per qRT-PCR en funció del seu estat de recurrència i valor de la signatura. En blau es representen els pacients no recurrents i en groc els recurrents. El punt de tall divideix en dos grups els pacients, sent els de la dreta els d'alt risc (perquè major expressió) i els de l'esquerra els de baix risc.

Els gens designats per a construir la signatura de fibroblasts foren: *COL1A1*, *COL3A1* i *LUM*, codificants respectivament pels col·làgens tipus I, tipus III i pel lumican (proteoglicà àmpliament present en les matrius intersticials unint fibres de col·lagen). La seva selecció es basà en la seva especificitat d'expressió en fibroblasts i no en altres tipus cel·lulars presents en el tumor (basant-nos en les dades del GSE39396) (figura R3.11), i en ser els que presentaven una menor variabilitat d'expressió entre els fibroblasts emprats en els microarrays.



FiguraR3.11. Expressió de gens mesenquimals en els diferents subtipus cel·lulars. Representació gràfica en dendograma dels gens clàssics mesenquimals expressats en les diferents poblacions cel·lulars del GSE3936.

Aquests 3 gens específics de fibroblasts van constituir el que d'ara endavant serà referit com a signatura de col·làgens. L'estratègia per a calcular el seu valor fou la mateixa que la emprada per a calcular el valor del classificador de 5 gens. És a dir, fent el sumatori de les unitats tipificades (*z-score*) de cada gen per a cada mostra.

3.4.1.-La signatura de col·làgens no presenta capacitat per a predir recurrència en les mostres de l'anàlisi per qRT-PCR.

La capacitat per a predir recurrència dels col·làgens va ser avaluada mitjançant l'àrea sota la corba ROC (AUC) i l'anàlisi de supervivència en la cohort de qRT-PCR (figura R3.12). Vam poder comprovar que la quantitat de col·lagen present en la mostra no tenia poder pronòstic en la cohort avaluada i per tant es podia suggerir que la capacitat pronòstica del classificador de 5 gens reflectia l'estat fisiològic dels fibroblasts més que no pas la seva abundància en la mostra analitzada.

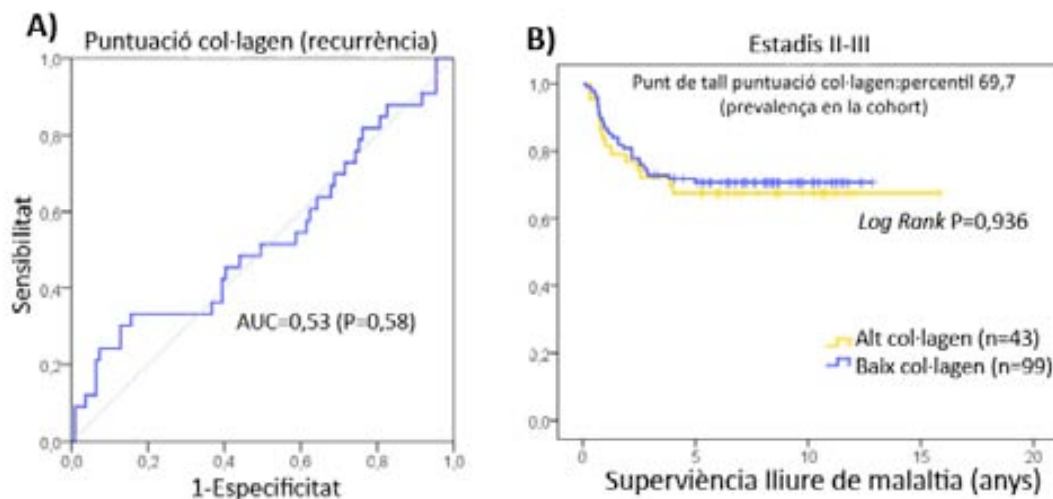


Figura R3.12. Corba ROC i corbes Kaplan-Meier de la signatura de col·làgens aplicada a les 142 mostres de la cohort de qRT-PCR. A) L'àrea sota la corba de la signatura de col·làgens té un valor de 0,53 indicant la seva incapacitat per a predir la recurrència en aquestes mostres. **B)** Tanmateix, classificant la cohort de pacients en grups d'alta i baixa expressió (fent servir de punt de tall la prevalença a la recurrència) no existeixen diferències en el temps de supervivència sense malaltia (*Log Rank P=0,69*).

Seguidament, i per confirmar que la detecció de transcrits d'ARNm dels fibroblasts no es veïés afectada per la presència de les cèl·lules epitelials en el tumor (eficiències d'extracció d'ARNm diferents) es va realitzar una primera aproximació amb cèl·lules *in vitro*. L'anàlisi per qRT-PCR dels gens de la signatura dels col·làgens mostrà que l'extracció conjunta d'ARN de fibroblasts i cèl·lules

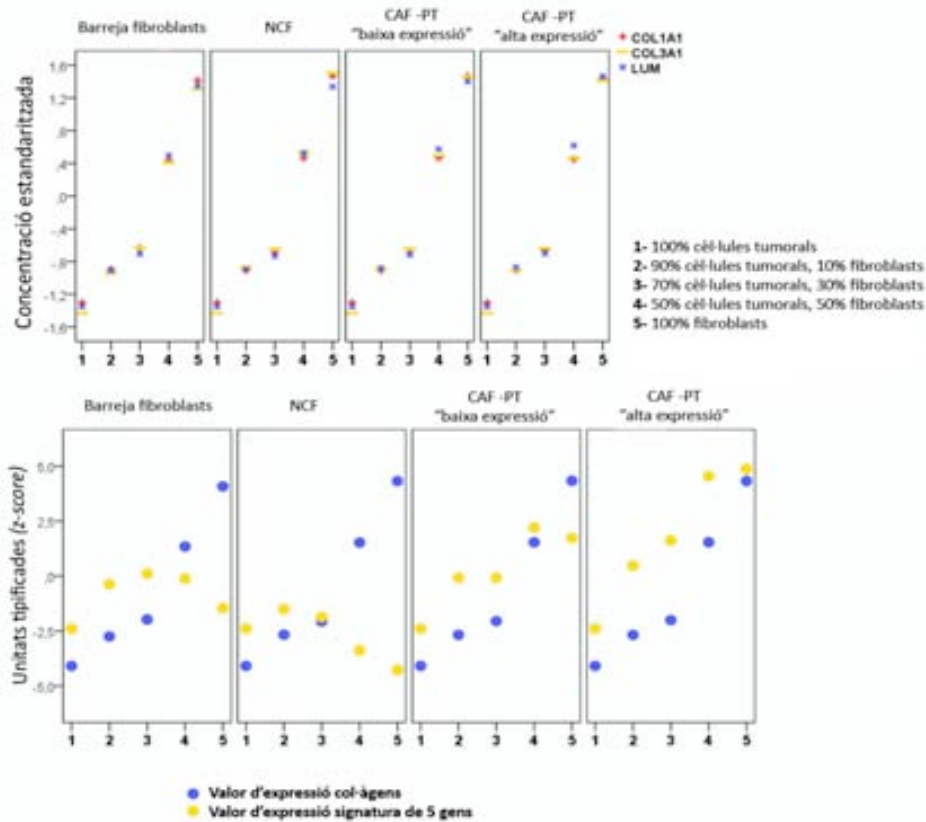


Figura R3.13C. Expressió dels col·làgens i dels gens de la signatura en la barreja de fibroblasts i cèl·lules tumorals. En el panell superior es mostra com la concentració dels gens de la signatura de col·làgens augmenta de manera directament proporcional a la quantitat de fibroblasts presents en la barreja (independent del tipus que siguin), mentre que l'anàlisi de l'expressió de la signatura de 5 gens en les mateixes mostra no depèn de la quantitat de fibroblasts emprats, sinó de la naturalesa (o estat fisiològic) d'aquests (panell inferior).

Posteriorment, per immunohistoquímica es va explorar l'expressió d'una de les proteïnes del classificador, PDLIM3. La seva expressió va ser avaluada en mostres amb elevada quantitat d'estroma però amb diferent valor d'expressió del classificador, es a dir, d'alt i baix risc. Els resultats presentats en la figura R3.14, demostren que totes dues mostres, tot i marcar abundantment per α -SMA (similar quantitat d'estroma), difereixen en l'expressió de PDLIM3 suggerint que la quantitat de fibroblasts presents en el tumor no té perquè ser un reflex del grau del classificador.

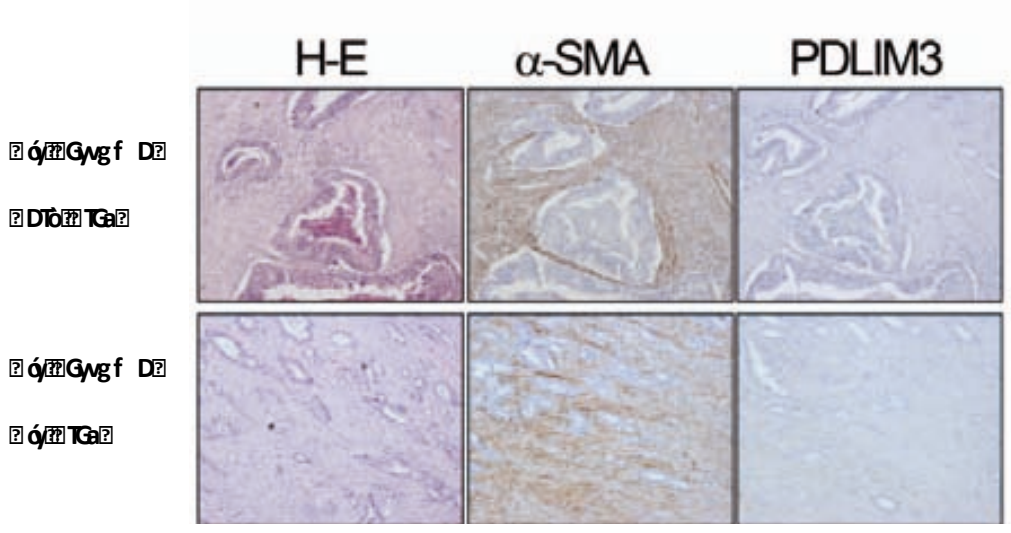


Fig 2. IHC analysis of α-SMA and PDLIM3 expression in the tumor stroma. The IHC analysis was performed on paraffin-embedded sections of tumor tissues from the Glyf D and TGA groups. The α-SMA and PDLIM3 expression was detected by immunohistochemistry. The H-E staining was used as a control. The results are shown in the figure.

2

Fig 3. IHC analysis of α-SMA and PDLIM3 expression in the tumor stroma. The IHC analysis was performed on paraffin-embedded sections of tumor tissues from the Glyf D and TGA groups. The α-SMA and PDLIM3 expression was detected by immunohistochemistry. The H-E staining was used as a control. The results are shown in the figure.

The IHC analysis was performed on paraffin-embedded sections of tumor tissues from the Glyf D and TGA groups. The α-SMA and PDLIM3 expression was detected by immunohistochemistry. The H-E staining was used as a control. The results are shown in the figure.

2

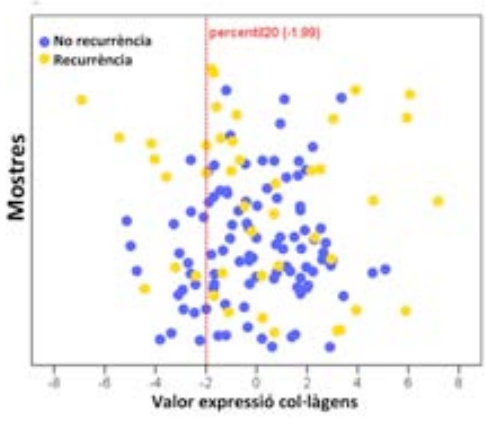
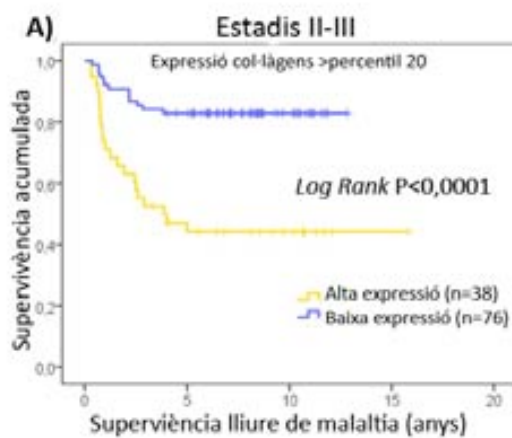


Fig 3. IHC analysis of α-SMA and PDLIM3 expression in the tumor stroma. The IHC analysis was performed on paraffin-embedded sections of tumor tissues from the Glyf D and TGA groups. The α-SMA and PDLIM3 expression was detected by immunohistochemistry. The H-E staining was used as a control. The results are shown in the figure.

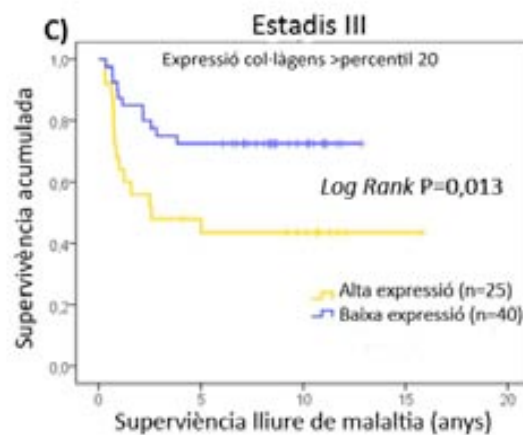
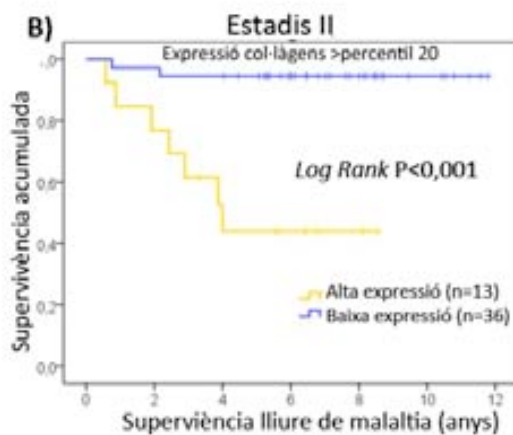
2

WF > 2

La prevalença a la recurrència en aquest nou subgrup era d'un 30%, sent considerats el 30% dels pacients d'alt risc i el 70% restant de baix risc. Aplicant aquest nou punt de tall, es va tornar a calcular l'associació entre la supervivència i l'expressió dels gens del classificador. Les corbes *Kaplan-Meier* derivades van mostrar que el poder pronòstic del classificador millorava molt amb aquesta nova cohort. Tenint en compte tots els estadiatsges, la supervivència lliure de malaltia (SLM) als 5 anys per als pacients d'alta expressió era d'un 42% mentre que arribava al 83% pels de baixa expressió. Estratificant per estadis, en pacients d'estadis II la supervivència augmentava fins a un 94% en els de baixa expressió. Tot i que sense ser tant espectaculars, en els pacients d'estadi III tenir una baixa expressió implicava un 73% de supervivència respecte el 40% en els d'alta expressió. Respecte la supervivència específica de malaltia (SEM), les taxes de supervivència també milloraven modestament respecte la cohort inicial (Figura R3.16 i taula R3.10).



FiguraR3.16. Corbes *Kaplan-Meier* de la cohort de mostres amb expressió de col·làgens >p20. La diferència de supervivència entre els pacients d'alta i baixa expressió són estadísticament significatives tant mirant estadis II-III conjuntament (A), com considerant-los de manera estratificada (B i C)



	Classificador 5-gens	Tots estadis	Estadi	Estadi	
			II	III	
Cohort qRT-PCR (col·lagen > p20) (n=114)	SLM	Alta expressió	42%	44%	40%
		Baixa expressió	83%	94%	73%
	SEM	Alta expressió	52%	52%	52%
		Baixa expressió	85%	92%	80%

Taula R3.10. Supervivència lliure de malaltia (SLM) i supervivència específica de malaltia (SEM) dels pacients d'alt i baix risc de la cohort de pacients amb expressió de col·làgens > p20

Adicionalment es va dur a terme un anàlisi univariant i multivariant per veure la influència d'altres paràmetres clínics en la predicció de pronòstic. Tot i que en l'anàlisi univariant molts altres factors clínics com l'estadi, la localització, el grau de diferenciació i la invasió limfàtica tenien valor pronòstic, el classificador de 5 gens seguia sent el més significatiu ($p < 0.0001$). Tot i així, considerant totes aquestes variables de manera conjunta en l'anàlisi multivariant, només el classificador es mostrava com a potent factor predictiu de recurrència ($p = 0,001$) (taula R3.11).

Cohort qRT-PCR (col·lagen > p20) (n=114)	Anàlisi univariant			Anàlisi multivariant		
	P valor	HR	95,0% IC	P valor	HR	95,0% IC
Sexe (Home vs dona)	0,115	0,57	0,28-1,15			
Edat >55 anys	0,49	0,68	0,2-2,15			
Estadi (III vs II)	0,021	2,46	1,15-5,28	0,151	1,93	0,79-4,72
Localització (recte vs còlon)	0,017	2,27	1,16-4,46	0,068	1,98	0,95-4,15
Grau (alt vs baix)	0,033	2,61	1,08-6,31	0,931	1,04	0,4-2,7
Nòduls aïllats (<14 vs >14)	0,008	2,49	1,27-4,89	0,015	2,42	1,18-4,94
Invasió limfàtica (no)	0,049	0,5	0,28-1	0,187	0,59	0,27-1,28
Quimioteràpia adjuvant (no)	0,075	1,86	0,94-3,68			
Signatura 5-gens (alta vs baixa)	<0,0001	4,2	2,1-8,4	0,001	3,57	1,69-7,52

Taula R3.11. Anàlisi univariant i multivariant. Resultat en la nova cohort després de descartar aquells pacients amb baix estroma (col·lagen > p20).

Les probabilitats *post-test* també van ser calculades amb aquestes noves dades i vam poder comprovar que els pacients amb baixa quantitat d'estroma interferien negativament amb la capacitat predictiva del classificador ja que la seva eliminació feia que les probabilitats *post-test* incrementessin considerablement respecte la cohort inicial. Aquests resultats es mostren molt més evidents en el cas de l'estadi II on la probabilitat *post-test* positiva, és a dir, la probabilitat que un pacient d'alta expressió pateixi recurrència passa del 18% al 54% i la de que ho faci un de baix risc disminueix fins al 5%. En el cas dels estadis III els resultats també milloren respecte la cohort

inicial, tot i que d'una manera menys evident (taula R3.12). Aquests resultats donen rellevància al classificador com a factor predictiu, sobretot en els estadis II.

		Prevalença	LR+	LR-	Probabilitat post-test (+)	Probabilitat post-test (-)	Diferència
Cohort inicial qRT-PCR (col·lagen >p20) (n=114)	Tots els estadis	0,30 (0,22-0,39)	2,91 (1,77-4,78)	0,48 (0,31-0,75)	0,55 (0,38-0,71)	0,17 (0,09-0,27)	0,38
	Estadi II	0,18 (0,09-0,32)	5,19 (2,29-11,73)	0,26 (0,09-0,89)	0,54 (0,26-0,80)	0,05 (0,01-0,2)	0,49
	Estadi III	0,38 (0,27-0,51)	2,04 (1,1-3,75)	0,61 (0,38-0,96)	0,56 (0,35-0,75)	0,27 (0,15-0,44)	0,29

Taula R3.12. Probabilitats *post-test* en la cohort de pacients amb col·lagen >p20.

3.5. Heterogeneïtat dels fibroblasts associats a carcinoma en el tumor primari.

Amb el pretext que el classificador de 5 gens és un reflex de l'estat fisiològic dels fibroblasts més que no pas de la seva quantitat en el tumor, es va assumir que probablement podria existir varietat de fenotips en els fibroblasts associats a tumor dins del mateix individu com a conseqüència de les diferents interaccions establertes, sent així una font més d'heterogeneïtat intratumoral. Per a explorar aquest concepte es van seleccionar els gens amb més variabilitat d'expressió entre tots els fibroblasts analitzats. Com a punt de tall es va establir una desviació estàndard >0,75, el que va permetre que s'incloguessin 879 sondes corresponents a 873 gens. Els fibroblasts van ser classificats segons la seva expressió emprant el mètode d'agrupació jeràrquic no supervisat (figura R3.17). Les mostres s'agruparen en dos grups principals d'expressió (basats en la distància euclídia), mentre que els gens, agrupats per correlació es dividien en tres subgrups diferents. Segons anàlisis d'ontologia genètica, els gens que formaven part del grup 1 es correlacionaven amb gens implicats en adhesió, migració, curació de ferides i angiogènesi. Curiosament, en aquest grup també es trobaven els 4 gens de risc del classificador: *PDLIM3*, *ULBP2*, *AMIGO2* i *SLC7A2*, i altres gens prèviament associats amb agressivitat tumoral com ara *IL6*, *LIF*, *SERPINE1*, *HBEGF*, *FAP*, *CCL7*, *CCL8*, *TGFB2*, *MMP1*, *MMP3*, *MMP12*, *POSTN*, *STC1* i *TNC* entre d'altres. El segon subgrup es correlacionava amb gens de cicle cel·lular i mitosi, mentre que els dels tercer tenien a veure amb gens de resposta inflamatòria com ara *CCL11* (el gen protector del classificador), i d'altres com *CCL13*, *CXCL6*, *CXCL2*, *CXCL1*, *CXCL14*, *A2M*, *FOS*, *TLR3*, *IL6R*, *KIT* i *IL8* entre d'altres.

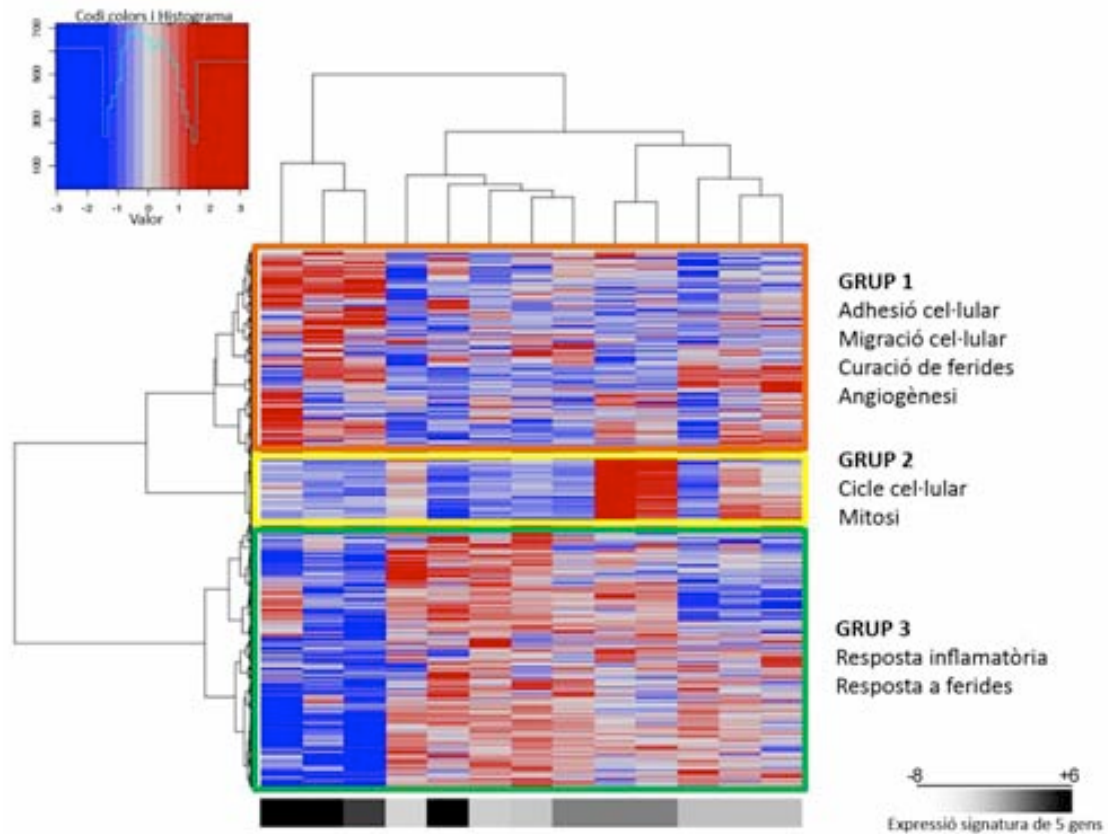


Figura R3.17. Agrupament jeràrquic no supervisat dels 873 gens més variables entre fibroblasts. Els fibroblasts es subdivideixen en 2 grups que es diferencien per l'expressió de gens agrupats en termes d'agressivitat (grup 1 i 2) o de protecció (grup3).

3.6. Relacions proteiques dels gens del classificador

Les possibles interaccions físiques a nivell proteic dels productes codificats pels 5 gens del classificador, van ser explorades a nivell proteic fent ús del programa bioinformàtic BIANA. Malgrat que la seva expressió conjunta sembla ser important en el pronòstic, les seves proteïnes no mostren interacció física directe entre elles, a excepció de la proteïna AMIGO2 i SLC7A2 que interaccionen a través d'un intermediari (UBCEP2). (figura R3.18).

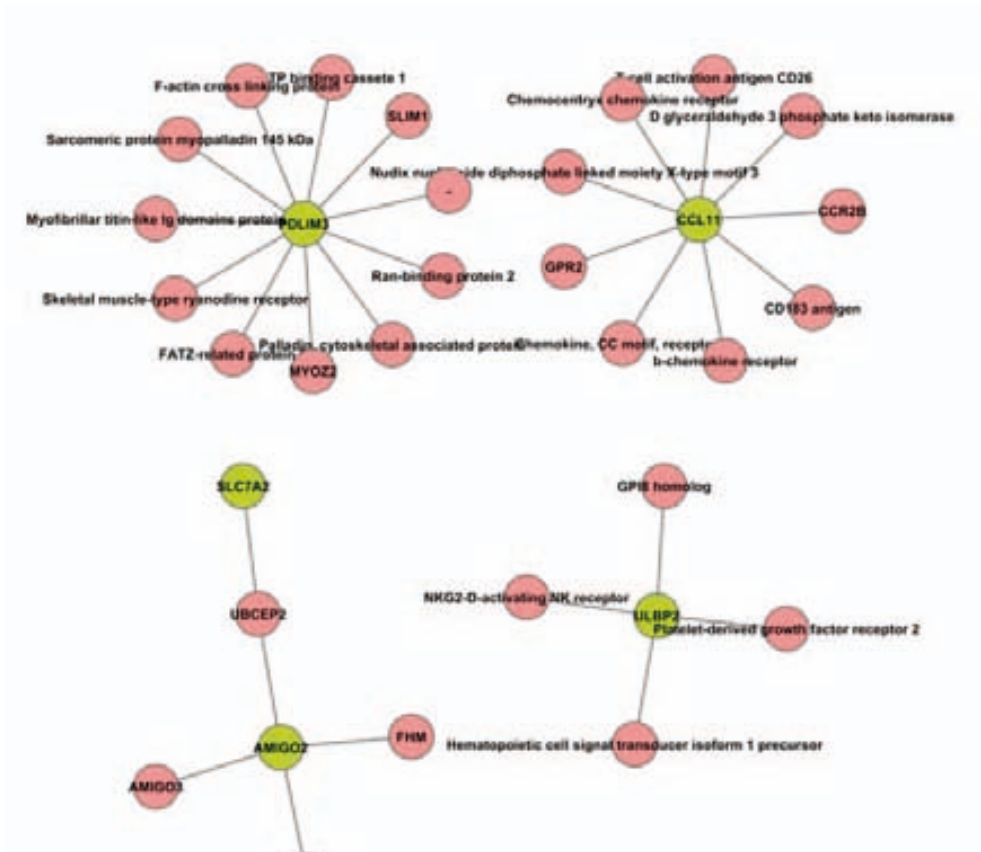


Figure 2: Network diagram showing interactions between proteins. Central nodes are highlighted in yellow, and peripheral nodes are in pink. The diagram illustrates the complex network of interactions involving COL1A1, CCL11, AMIGO2, and IL1BP1, along with various other proteins such as SLM1, Nucleoside diphosphate linked moiety X-type motif 3, Ran-binding protein 2, Chemokine, CC motif, receptor, GPR1, CD183 antigen, Ii-chemokine receptor, T-cell activation antigen CD26, Chemokine receptor, D glyceraldehyde 3 phosphate keto isomerase, CCR2B, GP1B homolog, NRG2-D-activating NK receptor, Platelet-derived growth factor receptor 2, Hematopoietic cell signal transducer isoform 1 precursor, and FHM.

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ PER OBJECTIUS

OBJECTIU 1:

Determinar com es modifiquen les capacitats funcionals i transcripcionals de les cèl·lules de carcinoma colorectal en funció de la interacció amb els fibroblasts amb els que conviurà al llarg de la progressió tumoral; i estudiar el perfil transcripcional d'aquests fibroblasts per a determinar si existeix un programa transcripcional comú associat a progressió tumoral i pronòstic.

Tot i presentar unes característiques comunes que en permeten la seva identificació: morfologia allargada, absència de marcadors d'altres llinatges cel·lulars (Kalluri and Zeisberg 2006), principals productors de components de la matriu extracel·lular i implicació en processos de cicatrització (Tomasek, Gabbiani et al. 2002); els fibroblasts són un tipus cel·lular molt heterogeni tant a nivell funcional com transcriptòmic, sent reportat que el seu perfil d'expressió gènica depèn de la seva demarcació anatòmica (Chang, Chi et al. 2002). Malgrat aquest fet, en aquest primer objectiu del treball experimental hem pogut definir un perfil d'expressió gènica comú entre els diferents fibroblasts amb els que interaccionarà la cèl·lula maligne durant un procés tumoral (en el model de càncer colorectal), i que presenten una expressió gradual (creixent o decreixent) al llarg de la progressió, des del teixit normal, passant pel tumor primari i fins que evoluciona cap a metàstasi hepàtica.

A nivell funcional s'ha pogut comprovar com els factors solubles secretats en els medis condicionats pels diferents fibroblasts són suficients per a produir efectes variables en les diverses línies tumorals avaluades. La capacitat dels fibroblasts associats a carcinoma per a promoure la proliferació cel·lular i per tant el creixement tumoral, ha estat reportada en gran quantitat d'estudis i en una àmplia varietat de models tumorals com el de carcinoma de llengua (Lin, Liu et al. 2011), càncer d'endometri (Subramaniam, Tham et al. 2013), carcinoma escamós de cap i coll (Wheeler, Shi et al. 2013), en càncer d'ovari (Xu, Xu et al. 2013), de mama (Hawsawi, Ghebeh et al. 2008) i fins i tot en hepatocarcinoma (Jia, Wang et al. 2013). En el nostre model hem pogut comprovar com en les diferents línies avaluades (independentment del seu estadiatge), el medi condicionat dels fibroblasts associats a carcinoma del tumor primari (CAF-PT) confereix una major estimulació de la proliferació comparant amb els fibroblasts normals de la mucosa adjacent al

tumor (NCF) i la condició control. Diferències que han estat descrites en estudis previs (Wels, Kaplan et al. 2008), tot i que alguns treballs demostren només petites diferències entre l'efecte dels CAFs i dels fibroblasts normals de mama (Lebret, Newgreen et al. 2007) i en d'altres fins i tot un efecte inhibitori dels fibroblasts normals comparats amb els CAFs (Sadlonova, Mukherjee et al. 2007). Contràriament, s'observa com els fibroblasts associats a la metàstasi hepàtica (CAF-LM) provoquen una disminució en la proliferació de les diferents línies tumorals, no només comparant amb els CAF-PT, sinó també relacionant-los amb la condició control. La disminució de la proliferació en les metàstasis hepàtiques en comparació amb el tumor primari ha estat descrita en d'altres estudis (Li, Miki et al. 2001; Agui, McConkey et al. 2002) i va amb concordança amb els resultats obtinguts pel grup de Ganepola (Ganepola, Mazziotta et al. 2009), on mitjançant anàlisis d'expressió gènica entre tumors primaris i metàstasi hepàtica troben una disminució en l'expressió de gens relacionats amb la progressió de cicle cel·lular en les mostres corresponents a la metàstasi hepàtica, entre ells el gen corresponent a la ciclina D1 (*CCND1*); que en el nostre estudi es troba infraexpressat a nivell proteic en la línia cel·lular cultivada amb el medi de cultiu dels fibroblasts de metàstasi hepàtica. En el nostre model, mentre que les cèl·lules sembrades amb medi condicionat de fibroblasts normals i associats al tumor primari aturen el seu cicle cel·lular principalment en G₁/S, quan es cultiven amb el medi procedent dels fibroblasts de la metàstasi hepàtica ho fan en G₂/M. Aquesta aturada en la progressió del cicle cel·lular en G₂/M en presència del medi condicionat de fibroblasts de metàstasi hepàtica, va acompanyada d'una disminució en l'apoptosi, és a dir, els factors secretats per aquests fibroblasts protegeixen de la mort cel·lular programada d'igual manera que ho fan els fibroblasts associats a tumor primari. No obstant, el balanç global fa que la viabilitat cel·lular es vegi disminuïda en presència del medi condicionat dels fibroblasts associats a metàstasi hepàtica, un concepte que ja havia estat descrit prèviament per les cèl·lules mesenquimals (Ramasamy, Lam et al. 2007; Qiao, Xu et al. 2008) i que és molt plausible tenint en compte que ambdós tipus cel·lulars comparteixen moltes similituds, sobretot en referència a les proteïnes que secreten (Klopp, Gupta et al. 2011). Una altre troballa d'interès remarcable, és la generació d'una subpoblació de cèl·lules tumorals tractades amb medi condicionat de CAF-LM, molt més resistents. D'acord amb aquest aspecte, només unes poques cèl·lules romanen viables, però semblen ser reminiscents si es correlacionen amb l'aparença radiològica de les metàstasis hepàtiques. Una observació interessant és que les cèl·lules que romanen adherides a la placa presenten un major potencial clonogènic, la qual cosa suggereix que els fibroblasts associats a la metàstasi hepàtica tenen capacitat per a desenvolupar un nínxol de cèl·lules mare. De fet, ha estat descrit que les cèl·lules que envolten les cèl·lules mare no només mantenen l'activitat de Wnt sinó

que també són capaços d'induir la senyalització de la via de Wnt a altres cèl·lules més diferenciades, restaurant així la seva clonogenicitat (Vermeulen, De Sousa, et al. 2010). Una altre observació interessant és que les cèl·lules en presència del medi condicionat dels fibroblasts associats a la metàstasi hepàtica semblen presentar trets característics de transició epiteli-mesènquima molt més eficientment que la resta de cèl·lules exposades als altres medis. A més, es tornen més agressives en termes de migració que no pas les cultivades amb el medi dels fibroblasts del tumor primari. Aquest increment en la migració en detriment a la proliferació, podria ser conseqüència al fet ja conegut de que quan les cèl·lules migren, alenteixen el seu cicle cel·lular i dediquen l'energia a migrar en comptes de proliferar, en un procés regulat per Snail (Vega, Morales et al. 2004). En el model emprat en aquest treball, les cèl·lules cultivades amb medi condicionat de fibroblasts normals o fibroblasts associats a tumor primari, detenen el seu cicle cel·lular en G1/S, mentre les que estan en presència del medi condicionat dels fibroblasts de la metàstasi hepàtica aturen el cicle en G2/M. Els nivells de P21 en les cèl·lules sembrades amb MC CAF-PT confirmen el control regular a G1/S perquè P21 és un inhibidor de cdk4 i cdk2. A més, la inducció de P21 es va trobar que també inhibia l'expressió de múltiples proteïnes implicades en l'execució i control de mitosi (Matsumoto, Hayashi, et al. 1999) (Chang, Watanabe, et al. 2000). A més, les dades transcripcionals de les DLD-1 sembrades amb el medi condicionat de fibroblasts associats a metàstasi hepàtica són consistents amb aquests resultats (per GSEA i GO). Per altra banda, l'augment de la migració en la línia cel·lular en presència dels factors secretats pels fibroblasts de la metàstasi hepàtica, va acompanyada de l'adquisició de trets morfològics que s'assimilen als que pateixen les cèl·lules fent transició epiteli-mesènquima. Un fenotip que es veu revertit amb l'addició d'inhibidors de la via de ERK i que és corroborat amb l'augment de l'expressió de gens implicats en aquest procés com son *ZEB-1*, *SNAI1*, *SLUG*, *CDH2*. La duració de l'activació d'ERK és la responsable del destí cel·lular (Murphy and Blenis 2006), sent una activació de duració sostinguda (com la apreciada en presència del medi procedent dels fibroblasts de la metàstasi hepàtica) descrita com a responsable de la diferenciació cap a una morfologia similar a les neurones, un esdeveniment vist en cèl·lules de feocromocitoma PC12 (Robbins, Cheng et al. 1992) i també en fibroblasts (Mansour, Matten et al. 1994). Aquests canvis morfològics poden ser en part conseqüència de la infraexpressió en proteïnes reguladores de les unions intercel·lulars, un esdeveniment necessari per a la migració i motilitat (Sherer and Mothes 2008), i evidenciat per la internalització de la E-cadherina. Així doncs, les alteracions fenotípiques esdevingudes, tant a nivell de proliferació com de migració i morfologia, han de ser considerades com a processos multifactorials i no atribuïbles a un únic factor. No obstant, és fa evident que aquesta

transformació depèn dels factors solubles alliberats pels fibroblasts associats a la metastasi hepàtica suggerint la inducció d'un perfil d'expressió en les cèl·lules epitelials. D'acord amb això, *CTNNB1*, *ARF6*, *ACTR2* i *RHO*, sobreexpressats en les DLD-1 en presència de MC CAF-LM, estan implicats en la remodelació del citoesquelet. S'ha vist que la sobreexpressió de *CTNNB1* (β -catenina) inhibeix la proliferació en les cèl·lules de neuroblastoma (Sangkhathat, Nara, et al. 2006), i que *ARF6* regula propietats tumorigèniques i invasives, fent que les cèl·lules que el sobreexpressen també presentin el fenotip observat (Muralidharan-Chari, Hoover, et al. 2009). També s'ha observat una sobreexpressió de *MAP3K1*, un important regulador de la via de Ras/ERK i també implicat en la via canònica de Wnt, que positivament regula l'expressió de gens diana de Wnt (Sue Ng, Mahmoudi, et al. 2010), com s'aprecia en les dades per GSEA. Unes dades que es mostren consistents amb l'activació d'ERK observada en les DLD-1 en presència del medi dels fibroblasts associats a metastasi hepàtica.

Així doncs, la capacitat de les cèl·lules malignes per establir-se i créixer en una localització distant, no només depèn del seu perfil genètic, sinó també del microambient que l'envolta, ja que una mateixa línia cel·lular pot comportar-se de manera diferent en funció de l'ambient al que es trobi sotmesa, suggerint que les alteracions provocades pels estímuls rebuts de l'estroma circumdant són imprescindibles en el procés metastàtic. Un fet que es veu de manifest en explorar els perfils d'expressió dels CAF-PT i dels CAF-LM, on s'aprecia una expressió diferencial de productes de secreció localitzats en la regió extracel·lular i components de la matriu extracel·lular entre ambdós tipus de fibroblasts que podria estar explicant les diferents conseqüències fenotípiques. Les dades obtingudes es veuen reforçades per vèries evidències que demostren que les interaccions entre les cèl·lules canceroses i les estromals són crucials per a que el procés metastàtic es dugui a terme (Mueller and Fusenig 2004; Barrier, Roser et al. 2007), tot i que no està clar si aquest potencial metastàtic s'origina en les cèl·lules tumorals i/o en l'estroma tumoral (Bernards and Weinberg 2002; Ramaswamy, Ross et al. 2003).

Seguint amb aquestes evidències, i amb la intenció d'identificar els mecanismes moleculars reguladors de les metastasis hepàtiques en el càncer colorectal, s'han comparat els perfils d'expressió gènica dels fibroblasts en la mucosa normal, en el tumor primari i en la metastasi hepàtica. L'anàlisi cronològic dels diferents contribuïdors en la progressió del càncer pot permetre aclarir els processos moleculars implicats des de la carcinogènesi fins a la metastasi, una aproximació ja realitzada pel grup de Yamasaki (Yamasaki, Takemasa et al. 2007). Malgrat les diferències a nivell transcripcional conseqüència de la diferent demarcació dels fibroblasts (Chang, Chi et al. 2002), s'ha pogut identificar un llistat comú de gens l'expressió dels quals és correlaciona

amb la progressió del càncer. La importància de basar-se en gens comuns es deu a que la comparació dels perfils d'expressió gènica de tumors localitzats en dos òrgans diferents pot portar a la falsa identificació de gens específics d'òrgan en comptes de gens associats a tumor (Ki, Jeung et al. 2007). Els gens identificats corresponen a un subgrup dels denominats gens comuns de resposta a sèrum (Chang, Sneddon et al. 2004) i presenten un augment/disminució gradual de la seva expressió en la seqüència de fibroblasts normals a metàstasi hepàtica. L'escalabilitat observada en aquesta resposta podria lligar amb les capacitats regeneratives dels diferents òrgans enfront una ferida (com per exemple el fetge) i la major capacitat dels fibroblasts associats a metàstasi hepàtica d'induir fenotips de transició epiteli-mèsenchima (tal i com s'ha vist en els assajos funcionals). El programa transcripcional en resposta a ferides sembla ser molt més efectiu en el fetge que no pas en els tumors primaris i podria explicar el major grau de desmoplàsia que es troba associat amb mal pronòstic (Huijbers, Tollenaar et al. 2012), suggerint que els canvis en l'estroma juguen un paper molt important en la progressió i pronòstic de la malaltia. Diversos estudis d'expressió gènica s'han fet per a trobar diferències entre les diferents regions en les que es troba la cèl·lula tumoral en la progressió del càncer colorectal (Ramaswamy, Ross et al. 2003) (Del Rio, Mollevi et al. 2013) però sense discernir entre els gens d'origen tumoral i estromal. Recentment, molts classificadors estromals han estat identificats en diferents tipus de tumors com el de mama (Finak, Bertos et al. 2008), pròstata (Jia, Rahmatpanah et al. 2012), pulmó (Navab, Strumpf et al. 2011) i hepatocarcinoma (Gao, Wang et al. 2011), fins i tot un ha estat descrit en càncer d'esòfag emprant mostres obtingudes per microscopia de captura làser i ha permès identificar gens estromals capaços de discriminar entre les formes preinvasives i invasives i relacionar-los amb pronòstic (Saadi, Shannon et al. 2010). No obstant, aproximacions similars no han estat descrites per l'estroma del càncer colorectal. Centrant l'atenció en els fibroblasts constituents de l'estroma tumoral de diferents regions, s'ha identificat una signatura de 19 gens capaç de predir la recurrència en mostres corresponents a tot el tumor. L'escalabilitat del patró comú d'expressió gènica s'ha obtingut a partir de fibroblasts aïllats de diferents demarcacions anatòmiques, el que remarca la importància de l'estroma, o concretament d'aquest tipus cel·lular, en la oncogènesi del tumor de còlon. Uns resultats que es veuen reforçats per una signatura descrita prèviament obtinguda de mostres de tot el tumor i on la majoria dels 48 gens més rellevants són d'origen estromal (O'Connell, Lavery et al. 2010). Tenint en compte que en les mostres d'estudi la relació entre la proporció de tumor/estroma era desconeguda, la capacitat per a detectar el senyal d'expressió de la signatura emfatitza la importància de la seva contribució.

S'han presentat dues maneres complementàries d'interpretar els resultats, que poden ser d'important rellevància depenent de l'escenari clínic. Inicialment, l'anàlisi de resultats mitjançant la metodologia PAM ha permès la identificació de gens rellevants en un esdeveniment binari (recurrència/no-recurrència) i que es presenten altament específics després de la validació creuada. Posteriorment, s'ha obtingut una puntuació de la signatura que revela la significança biològica dels gens seleccionats per PAM. Segons les dades d'expressió obtingudes, els fibroblasts associats a tumor primari és mostren com els fibroblasts que més error classificació presenten, és a dir, segons la seva expressió de la signatura, poden ser considerats com a fibroblasts normals o com a fibroblasts de metàstasi el que tindria una relació evident amb pronòstic. De fet, segons Ramaswamy *et al*, ja que la mort relacionada amb tumor en la majoria dels casos es deguda a la metàstasi, és plausible pensar que els pacients que presenten signatures d'expressió gènica en el tumor primari similar a la de les metàstasi, són més susceptibles de patir un pitjor pronòstic (Ramaswamy, Ross *et al*. 2003). En els nostres resultats podria suggerir que els pacients en els que els fibroblasts associats a tumor primari presenten un fenotip més similar als fibroblasts de la metàstasi hepàtica poden tenir un pitjor pronòstic. Així doncs, els gens descrits no només són capaços de predir un esdeveniment binari (recurrència vs no recurrència) sinó que també el seu grau d'expressió (o puntuació) remarca una rellevància biològica en presentar-se com a un bon factor independent predictiu de pronòstic, inclús en els pacients d'estadi III. Aquest fet reforça el paper de l'estroma, en particular dels fibroblasts, com a components importants en la progressió del càncer. Basant-nos en el resultats obtinguts, l'objectiu primer proporciona informació acurada per a prendre una decisió clínic, ja que el classificador obtingut s'aplica bé per a identificar pacients de baix risc els quals es podrien beneficiar d'una omisió de la quimioteràpia adjuvant si fos validat en mostres clíniques independents. Això pot ser molt significatiu en aquells pacients estadis II (T4N0/perforació/poc diferenciats) o pacients MSS, als quals se'ls oferiria quimioteràpia adjuvant tot i la possibilitat de no obtenir beneficis. En estadis III, la signatura també diferencia els pacients de baix risc, però aquests resultats necessiten ser corroborats en sèries més àmplies i en assajos clínics per a convencer als clínics de la omisió completa de quimioteràpia en aquests pacients, inclús en els pacients del subgrup T2N1, els quals presenten millor pronòstic clínic. S'ha pogut observar doncs, que la signatura de 19 gens és capaç de diferenciar els pacients d'alt i baix risc en un petit grup de pacients d'estadis II/III no tractats (n=66; P=0,032).

OBJECTIU 2:

Conèixer quins són els canvis funcionals que proporcionen els fibroblasts aparellats del teixit normal adjacent al tumor i els associats a tumor primari en les cèl·lules tumorals. Definir un perfil d'expressió genètic diferencial i identificació de biomarcadors útils com a dianes terapèutiques i/o amb valor pronòstic.

En aquest segon objectiu experimental, gràcies a l'ús de la tecnologia dels microarrays d'expressió s'han pogut descriure les diferències transcripcionals entre els fibroblasts associats a tumor primari de còlon (CAF-PT) i els seus aparellats de la mucosa normal adjacent (NCF). Ha estat definida una signatura constituïda per 108 gens diferencialment expressats entre ambdues poblacions l'expressió dels quals en permet la seva classificació i correlaciona directament amb majors capacitats proliferatives i migratòries. La rellevància biològica dels fibroblasts associats a carcinoma en el microambient tumoral ha estat reconeguda en una àmplia varietat d'estudis on s'atribueixen unes majors capacitats pro-tumorals als CAFs en comparació als fibroblasts normals, tant en models *in vitro* (Hawsawi, Ghebeh et al. 2008),(Bauer, Su et al. 2010),(Navab, Strumpf et al. 2011; Costea, Hills et al. 2013), com *in vivo* (Olumi, Grossfeld et al. 1999). La importància de la senyalització paracrina existent entre les cèl·lules tumorals i els fibroblasts ha estat evidenciada en estudis previs emprant medis de cultius condicionats (Hwang, Moore et al. 2008) (Hu, Wang et al. 2013). Addicionalment, en el nostre estudi s'ha pogut observar com els factors solubles que secreten els fibroblasts associats a carcinoma en el medi de cultiu són més eficients que els secretats pels seus corresponents normals, en conferir majors capacitats migratòries i clonogèniques a diferents línies epitelials tumorals. Uns efectes demostrats també en un model *in vivo* on s'evidencia la importància de la interacció directa entre ambdós tipus cel·lulars per a promoure el creixement tumoral, un efecte promotor molt més potent induït per la presència de CAFs que no pas per la dels seus corresponents normals procedents del mateix individu. La histologia dels diferents tumors subcutanis al final de l'experiment ens demostra que aquest increment en la mida tumoral no es deu a una major proporció de fibroblasts en els tumors originats pels CAFs, sinó que probablement sigui conseqüència d'un increment en l'eficiència proliferativa de les cèl·lules tumorals co-injectades amb els fibroblasts associats a tumor .

Les diferències en les propietats pro-tumorals d'ambdues poblacions de fibroblasts ha estat explorada en termes d'expressió gènica en diferents models de tumors sòlids (Costea, Hills et al.

2013) (Hawsawi, Ghebeh et al. 2008) (Navab, Strumpf et al. 2011) (Peng, Zhao et al. 2013) però fins el nostre coneixement no ha estat realitzat en càncer de còlon emprant mostres aparellades. Una part important de l'heterogeneïtat inter i intra-individual és conseqüència del compartiment estromal (De Sousa, Vermeulen et al. 2013). Comparar perfils d'expressió de fibroblasts normals o sans amb els de CAF d'individus diferents pot generar resultats confosos en no saber si la diferència d'expressió obtinguda és realment diferència entre les dues subpoblacions de fibroblasts o pel contrari és producte de l'heterogeneïtat inter-individual. Així doncs, a l'emprar mostres aparellades hem volgut minimitzar aquests efectes fent èmfasi en la heterogeneïtat intra-tumoral. Comparant els fibroblasts del teixit normal adjacent al tumor i els fibroblasts associats al tumor d'un mateix individu podem obtenir informació molt valuosa a l'hora d'identificar processos implicats en la transformació tumoral i fins i tot a l'hora d'identificar biomarcadors que ens puguin ser útils com a diana terapèutica a l'anar dirigits específicament contra els CAFs sense afectar els altres tipus de fibroblasts. L'absència de marcadors específics i únics de CAFs és una desavantatge a l'hora de tractar amb aquest tipus cel·lular (Kalluri and Zeisberg 2006), una variabilitat que no només depèn de la seva demarcació anatòmica (Chang, Chi et al. 2002) sinó que també pot ser conseqüència de la diversitat de possibles precursors que els poden originar com ara: cèl·lules precursors de la medul·la òssia (Quante, Tu et al. 2011), cèl·lules mesenquimals (Mishra, Humeniuk et al. 2008), cèl·lules epitelials o endotelials patint un procés de transició a mesènquima (Thiery 2002; Xouri and Christian 2009; Cirri and Chiarugi 2011) (Zeisberg, Potenta et al. 2007) o els propis fibroblasts locals (De Wever, Demetter et al. 2008), considerats com la principal font de procedència dels fibroblasts associats a carcinoma i així acceptat en el nostre model. En explorar el perfil genètic d'expressió de les dues subpoblacions de fibroblasts en estudi hem volgut a) identificar mecanismes moleculars responsables dels efectes pro-tumorigènics, b) identificar biomarcadors útils com a possibles dianes terapèutiques dirigides específicament cap a l'estroma tumoral i c) avaluar el valor pronòstic dels gens diferencialment expressats. Emprant 8 mostres aparellades s'ha definit un llistat de 108 gens d'expressió diferencial entre CAFs i NCFs, l'anàlisi d'agrupament jeràrquic dels quals permet la separació de les mostres en 2 grups. El patró d'agrupament es basa en l'origen anatòmic de la mostra més que no pas en l'individu de procedència, és a dir, tots els fibroblasts associats al tumor tenen una expressió més similar entre ells que no pas la tenen amb els seus corresponents fibroblasts adjacents del teixit normal, indicant que podria existir un patró comú d'expressió implicat en els mecanismes moleculars responsables de l'adquisició de tumorigeneïtat dels CAFs. L'anàlisi per GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) ens ha permès explorar els processos moleculars en els que estan implicats aquests gens

d'expressió variable, obtenint una correlació dels gens de sobreexpressió en CAF amb un patró d'expressió definit com a fenotip de *wound healing* (curació de ferides) o de resposta a sèrum. Aquest fenotip de *wound healing* va ser descrit pel grup de Chang, qui revelava que tot i presentar programes transcripcionals diferents, els fibroblasts de diferents regions anatòmiques compartien un programa d'expressió gènica coordinada i comuna en resposta a l'estimulació amb sèrum (Chang, Sneddon et al. 2004). Sent conscients de les semblances que existeixen entre un procés tumoral i un procés de curació de ferides (Dvorak 1986), els investigadors buscaren associació d'aquest fenotip amb càncers humans, trobant una forta correlació entre ambdós processos i relacionant-ho amb pronòstic. En aquest mateix estudi de Chang, els fibroblasts cultivats en absència de sèrum també presentaven un patró comú d'expressió que anomenaren signatura de gens reprimits en sèrum i que la presentaven els teixits normals. Aquesta signatura és la que correspon amb les nostres dades d'expressió en els gens sobreexpressats en els fibroblasts normals (o el que és el mateix, infraexpressats en els CAFs). L'anàlisi d'ontologies genètiques ens va permetre identificar en quins processos biològics es trobaven més representats els gens diferencialment expressats. Mentre que la major part dels gens sobreexpressats en CAFs s'associaven amb processos relacionats amb el desenvolupament (*TGFB2*, *PDGFC*, *cMET*, *CADM1*, *WNT2*) i amb senyalització cel·lular (*TFAP2C*, *NTF-3*, *SEMA5A*, *EFNB2* i *INHBA*); els gens sobreexpressats en NCFs es trobaven representats en processos d'homeòstasi (*SNCA*, *AGT*, *ABCA1*, *PL2G4A* i *BCL-2*), resposta a estímuls externs (*CCL8*, *CCL7*, *CCL11*, *CCL13*, *proS1*) i senyalització intercel·lular (*FGF10*, *FGF13*, *LYN*, *TNFSF10*, *NOVA1*). La pertinença dels fibroblasts a aquestes funcions biològiques trobaria la seva raó funcional en el paper dual que juga l'estroma; inicialment sent responsable de mantenir la homeòstasi tissular i posteriorment culpable de promoure el procés tumorigènic (Bissell and Hines 2011). La visió global dels gens diferencialment expressats ens permet associar canvis d'expressió amb el procés tumorigènic; però amb l'objectiu de trobar biomarcadors útils com a diana terapèutica cal fer un anàlisi més exhaustiu dels gens de manera individual, i trobar gens específics dels fibroblasts associats a carcinoma que no siguin expressats ni pels fibroblasts del teixit normal adjacent al tumor ni pels fibroblasts de la mucosa sana. Respecte a la disponibilitat de biomarcadors capaços de diferenciar-nos entre les dues subpoblacions de fibroblasts en estudi, un resultat inesperat, va ser la presència d'expressió d' α -SMA per part dels fibroblasts del teixit normal adjacent al tumor. Un fet que suggereix que aquests fibroblasts, tot i formar part del teixit histològicament normal (però només 5cm allunyat del tumor) podrien haver començat a adquirir canvis de fenotip activat, fent que no puguin ser considerats completament normals. Addicionalment, vam observar elevats nivells d'expressió de

gens codificant per citocines pro-inflamatòries (*CCL11, CCL8, CCL7, CXCL12*) i molècules de la família TNF (*TNFS10, TNFRSF1B, TNFRSF21*) en aquests fibroblasts adjacents al tumor. Uns resultats que indicarien un perfil pro-inflamatori (Coussens and Werb 2002). Aquests resultats es veuen reforçats pels obtinguts pel grup de Hawsawi, on es reporta la primera evidència de que fibroblasts adjacents al tumor, tot i provenir d'un teixit histològicament normal i sense contacte amb cèl·lules tumorals, contenen canvis genètics que els diferencien dels fibroblasts del teixit sa i també dels fibroblasts del tumor primari (Hawsawi, Ghebeh et al. 2008). Faria falta l'ús de fibroblasts procedents de donants sans per a determinar realment les diferències entre els normals i els tumorals, una aproximació que no s'ha dut en aquesta treball experimental per impossibilitat d'obtenció de mostres de còlon sans. La raó biològica per la qual els fibroblasts del teixit adjacent mostren aquest fenotip activat pro-inflamatori podria respondre a dues possibilitats: a) conseqüència de la interacció paracrina amb les cèl·lules tumorals per a crear un nínxol adequat per al creixement del tumor o b) resposta defensiva de l'hoste per a impedir la progressió tumoral. Considerant el global dels 108 gens desregulats, és interessant remarcar que existeix un solapament d'alguns dels gens de la signatura amb d'altres prèviament obtingudes en càncer de mama (Bauer, Su et al. 2010), pulmó (Navab, Strumpf et al. 2011) o carcinoma d'esòfag (Zhang, Fu et al. 2009); on *TNFSF4, ST6GALNAC5, TGFB2, TFAPC* i *LEF1* es troben entre els sobreexpressats mentre que *NOVA1, PDE3B, SLIT3, AKR1C1* i *AKR1C2* entre els infraexpressats. El grau de solapament existent entre els programes transcripcionals de diversos tipus de càncers (adhesió focal, via de senyalització de Wnt, direcció axonal, entre d'altres) suggereix que la interacció entre les cèl·lules tumorals i els fibroblasts associats a carcinoma pot induir l'estimulació de processos biològics i vies de senyalització comunes independentment de l'òrgan d'origen. Una idea que es veuria reforçada per la correlació anteriorment descrita entre el fenotip de *wound healing* (resposta a sèrum) i el procés tumoral (Chang, Sneddon et al. 2004). Un altre aspecte a tenir en consideració, és la heterogeneïtat inter i intra-individual, un concepte clau en un procés tumoral tant per pronòstic com per resposta al tractament (De Sousa, Vermeulen et al. 2013). Un estudi recent emprant fibroblasts associats a carcinoma aïllats de mostres de càncer de còlon demostra la presència d'heterogeneïtat entre CAFs i defineix una signatura genètica associada amb capacitats pro-migratòries i amb pronòstic (Herrera, Islam et al. 2013). Tanmateix, la signatura de 108 gens que es descriu en aquesta tesi també demostra correlació directa amb paràmetres funcionals dels CAFs com proliferació i migració, el que podria suggerir que els fibroblasts amb uns valors superiors d'expressió de la signatura serien més probables de ser els responsables de l'elevada reacció desmoplàsica en alguns tumors colorectals. De fet, alguns autors han presentat

pitjor pronòstic en aquells tumors amb major proporció de fibroblasts presents en el tumor (Mesker, Liefers et al. 2009; de Kruijf, van Nes et al. 2010; Huijbers, Tollenaar et al. 2012). En el nostre estudi trobem una associació entre l'expressió dels 108 gens desregulats i la supervivència lliure de malaltia en dues cohorts diferents de pacients amb càncer colorectal d'estadis II-III, sent classificats d'alt o baix risc en funció del nivell d'expressió. En la cohort de pacients GSE33113 (només considerant pacients d'estadi II), el valor pronòstic que sembla aportar aquesta signatura afegiria un valor addicional donada la controvèrsia que existeix en aquests tipus de pacients a l'hora de decidir el tractament. En aquesta validació *in silico*, tot i valorar l'expressió dels 108 gens en mostres corresponents a tot el teixit tumoral, és a dir, contenint dades d'expressió tant de cèl·lules estromals com tumorals, l'expressió és detectada i capaç de predir pronòstic. Dades que suggereixen que canvis en l'estroma poden jugar un paper crucial en la progressió del tumor, i tot i que la capacitat de predir pronòstic de la signatura és bastant específica d'estroma (l'expressió d'aquests gens en diferents línies tumorals i en altres components cel·lulars constituents d'un tumor de còlon va confirmar la seva especificitat d'expressió en fibroblasts en més d'un 50% dels gens desregulats), la informació pot ser detectada en mostres de tot el tumor.

Per últim, i amb l'objectiu de trobar molècules rellevants com a possibles dianes terapèutiques, es va explorar alguns dels gens desregulats per veure si podien ser bons candidats en el tractament del càncer (especialment aquells secretats o sent receptors de membrana), amb la intenció d'atacar només aquells fibroblasts que poden estar exercint una funció protectora contra els agents quimioteràpics sobre les cèl·lules tumorals. Fent ús de l'aplicació web <http://dgidb.genome.wustl.edu/> es va trobar que dos dels gens sobreexpressats en CAFs ja disposaven de fàrmacs que podrien ser un bon recurs per a atacar els fibroblasts. Per una banda, el receptor β de l'àcid retinoic (RAR β) quan està expressat en el compartiment estromal és un potent inductor de la tumorigènesis mitjançant la senyalització per la via CXCL12/CXCR4/ErbB2. La seva supressió implica una remodelació de l'estroma durant la progressió tumoral que inclou una disminució en l'angiogènesi, en el reclutament de cèl·lules inflamatòries i en el nombre de fibroblasts activats (Liu, Nugoli et al. 2010). La disponibilitat de diferents retinoids (com per exemple Tamibarotè) podria ser una aproximació important per al tractament del càncer, especialment alterant la comunicació entre les cèl·lules tumorals i estromals. Un altre gen diferencialment expressat és el *TGFB2*, actualment hi ha teràpies dirigides especialment contra aquest factor de creixement (belangenpumatucl-L), actualment en fase III en càncer de pulmó de cèl·lula no petita (Nemunaitis 2009; Decoster, Wauters et al. 2011).

OBJECTIU 3:

Definir un classificador genètic estromal amb poder predictiu de recurrència en pacients afectes de càncer colorectal en estadis II i III. Trasl·lat a la pràctica clínica amb la tècnica de qRT-PCR.

A partir del llistat de gens desregulats obtinguts en l'objectiu anterior, en aquesta ocasió s'ha desenvolupat, validat i traslladat a la tècnica de qRT-PCR un classificador genètic format per 5 gens (*ULPB2*, *SLC7A2*, *PDLIM3*, *AMIGO2* i *CCL11*) l'expressió conjunta dels quals s'associa amb recurrència en pacients amb càncer colorectal en estadis II-III. Malgrat que els perfils d'expressió gènica amb la tecnologia dels microarrays ha demostrat l'estimació de pronòstic i classificació de subtipus en molts tipus de tumors (Tsujiño, Seshimo et al. 2007; Finak, Bertos et al. 2008; Jia, Rahmatpanah et al. 2012; Mefford and Mefford 2012; De Sousa, Wang et al. 2013) (Gao, Wang et al. 2011), l'ús d'aquests a la pràctica clínica té un ús encara limitat degut a la baixa reproductibilitat, discrepàncies entre plataformes diferents i la necessitat de mostres de teixit fresc (Ramaswamy 2004); per això, la tècnica de la qRT-PCR aplicada a un nombre reduït de gens es molt més manejable, reproduïble i clínicament útil.

La utilitat de pronòstic de l'estroma està sent cada cop més valorada tot i que de manera rutinària no se'n ha vist la seva aplicació. El percentatge entre tumor/estroma és un mètode que molts autors han presentat com eina útil per a classificar el pronòstic de certs tipus de tumors (Tsujiño, Seshimo et al. 2007; de Kruijf, van Nes et al. 2010; Huijbers, Tollenaar et al. 2012; Dekker, van de Velde et al. 2013), tot i així és una tècnica que pot presentar cert biaix i que no té en consideració l'heterogeneïtat a nivell transcripcional existent entre els propis CAFs. Aquesta heterogeneïtat dels CAFs, descrita a (Herrera, Islam et al. 2013) i en la discussió prèvia d'aquesta memòria, suggereix la idea que l'estat fisiològic d'aquests fibroblasts (fent referència al seu estat transcripcional) podria ser molt més rellevant a l'hora de determinar el pronòstic que no pas ho seria la proporció en la que es troben en el tumor. La variabilitat resultant pot ser conseqüència de la diferent localització espacial dins del microambient tumoral (més pròxim o allunyat al marge invasiu) que fa que les interaccions amb les cèl·lules del voltant siguin diferents, o bé pot ser deguda a la demarcació anatòmica del tumor i a les forces mecàniques i compressives que exerceix el teixit del voltant (tensegriat) (Noguera, Nieto et al. 2012) (Ingber 2002). Dins d'un mateix tumor, doncs, poden ser diverses les respostes biològiques aportades pels CAFs (més o menys tumorigèniques), però seria el balanç global entre aquestes respostes el que determinaria un millor o pitjor pronòstic.

Per exemple, l'anàlisi no supervisada dels gens més variables entre els propis CAFs distingeix dos patrons característics d'expressió. Per una banda els CAFs amb els 4 gens de risc de la signatura sobreexpressats (*AMIGO2*, *ULBP2*, *SLC7A2* i *PDLIM3*) i el gen protector *CCL11* infraexpressat, determinen un subgrup caracteritzat per la sobreexpressió de gens implicats en processos de migració, *wound healing*, angiogènesi, i per la infraexpressió de gens inflamatoris. Contràriament, un segon grup presenta enriquiment en gens inflamatoris i infraexpressió dels gens de risc de la signatura. Uns resultats que concorden amb dades prèvies d'una signatura estromal en càncer de mama on es descriu que les mostres amb millor pronòstic es caracteritzen per la sobreexpressió de gens relacionats amb el sistema immunitari (Finak, Bertos et al. 2008).

A nivell molecular, moltes són les classificacions en termes de pronòstic que s'han fet basant-se en el compartiment estromal. Per exemple, el grup de Perez-Villamil (Perez-Villamil, Romera-Lopez et al. 2012) descriu 4 subtipus diferents de càncer de còlon i identifica una signatura de 167 gens associada amb els subtipus de baix estroma i que classifica als pacients en funció del risc; una signatura que es caracteritza per baixa expressió de gens implicats en interaccions entre la matriu extracel·lular-receptors i adhesions focals. Un altre grup també presenta una classificació del càncer de còlon en 5 subtipus diferents basada en l'expressió gènica, on el grup de pitjor pronòstic es caracteritza amb gens de desenvolupament mesenquimal i components de la matriu extracel·lular (Marisa, de Reynies et al. 2013). Una classificació en subtipus que també es presentada pel grup de Budinska (Budinska, Popovici et al. 2013) on el que presenta pitjor pronòstic es troba associat amb el perfil mesenquimal o de signatura de transició epiteli-mesenquima, demostrant una vegada més la importància de la reacció estromal en la progressió de la malaltia. Més recentment un altre grup (Roepman, Schlicker et al. 2013) ha descrit un fenotip d'expressió gènica mesenquimal que identifica un grup de tumors amb pitjor pronòstic i que no presenten benefici amb tractament adjuvant. Aquest subtipus està enriquit en gens que codifiquen per components de la matriu extracel·lular com *SPARC*, *COL5A2*, *DCN*, *COL6A1* i *CXCL12* entre d'altres, sent productes especialment sintetitzats per fibroblasts. Un altre classificació basada en subtipus moleculars n'identifica tres de diferents, sent el designat com a CCS3 el de pitjor pronòstic. Corresponent a tumors relativament heterogenis respecte l'estat de MSS, MSI i CIMP i que també conté una ampla proporció de pacients amb mutacions de *BRAF* i *KRAS* (De Sousa, Wang et al. 2013). La signatura d'aquest subtipus està enriquida en proteïnes que remodelen la matriu extracel·lular i en gens que estan implicats en processos de transició epiteli-mesenquima, trets característics dels fibroblasts. Dels 146 gens descrits en aquesta signatura, els gens sobreexpressats en el subtipus CCS3 són gens d'expressió pràcticament exclusiva de fibroblasts

com ara *INHBA*, *VCAN*, *FAP*, *PDGFC* o *CXCL12*. De fet, dos dels gens de la nostra signatura estromal: *PDLIM3* i *ULBP2* estan inclosos en aquesta signatura de 146 gens i sobrerrepresentats en el grup de mal pronòstic. Apart d'aquests dos gens no s'ha identificat solapament dels altres gens del classificador amb dades d'expressió gènica d'altres signatures de càncer de còlon, un fet que podria ser justificat tenint en compte el reduït nombre de gens que constitueixen el classificador (només 5) i l'origen dels gens diferencials (cultius primaris de fibroblasts). Molt sovint, les signatures d'expressió gènica obtingudes per anàlisi de microarrays són difícils d'interpretar respecte a la biologia de la malaltia. En el nostre cas, els 5 gens descrits no mostren associació funcional entre ells, el que suggereix que possiblement regulen de manera addicional gens i vies de senyalització clau, més que no pertànyer al mateix procés biològic. Les funcions que realitzen les proteïnes que codifiquen els gens de la signatura són ben diverses i en alguns casos ambigües. El gen *PDLIM3* codifica per la proteïna LIM associada a alfa-actinina i juga un paper important en la organització dels filaments d'actina en les cèl·lules musculars (Henderson, Pomies et al. 2003). La seva infraexpressió ha estat descrita en una signatura molecular associada amb fenotip mutat de *p53* en pacients de càncer colorectal estadi III amb estabilitat de microsatèl·lits de pitjor pronòstic (Katkooi, Shanmugam et al. 2012), on també s'ha descrit la infraexpressió d'*AMIGO2*, gen codificant per una molècula d'adhesió amb domini d'immunoglobulines implicada en interaccions intercel·lulars, transducció de senyals i amb elevada expressió associada en adenocarcinomes gàstrics (Rabenau, O'Toole et al. 2004). Implicat també en metàstasis segons un estudi de perfils d'expressió comparativa entre tumors primaris i metàstasis (Tsoi, Qin et al. 2011). *ULBP2* s'expressa en la superfície de les cèl·lules tumorals i la seva unió al receptor NKG2D activa les cèl·lules NK desencadenant una acció citolítica (Textor, Fiegler et al. 2011), s'ha vist però, que els fibroblasts associats a melanoma tenen un efecte inhibitori sobre les cèl·lules NK (Balsamo, Scordamaglia et al. 2009). *CCL11* és el gen "protector" de la signatura en tant que la seva sobreexpressió es correlaciona amb millor pronòstic. Es considera la molècula més potent en el reclutament d'eosinòfils en condicions d'inflamació, sent molt importants limitant la carcinogènesi. Les cèl·lules epitelials i els fibroblasts en són els majors productors (Simson, Ellyard et al. 2007). No obstant, en fibroblasts de pulmó la seva expressió es troba induïda en resposta a TNF- α i IL-4 (Rokudai, Terui et al. 2006) i incrementa la seva proliferació, l'activitat de MMP2 i la síntesi de col·lagen permeten la migració dels fibroblasts de pulmó en resposta a quimiocines no específiques (Puxeddu, Bader et al. 2006). Contràriament, també s'han descrit altres funcions pel gen *CCL11* ja que la unió als seus receptors CCR2, CCR3 i CCR5 provoca reestructuració del citoesquelet, activació de les vies MAPK i a més pot estar implicat en creixement tumoral i

metàstasis, inducció de molècules proangiogèniques, factor de creixement fibroblàstic, IL-6, VEGF, i MMP2 en cèl·lules del múscul llis. La seva baixa presència en el sèrum de pacients amb càncer d'ovari es relaciona amb creixement i invasió del tumor i la seva reducció pot ser deguda a segrest de CCL11 pels seus receptors en les cèl·lules tumorals d'ovari (Levina, Nolen et al. 2009).

Per últim, *SLC7A2* codifica per un transportador de membrana que juga un paper important en l'activació de macròfags i en la fibrosis pulmonar, però amb un paper no ben definit pel que fa al càncer (Niese, Chiaramonte et al. 2010) (Thompson, Pesce et al. 2008). Malgrat que el global dels gens dels classificadors no proporcionen una explicació biològica conjunta, la determinació de la seva expressió no disminueix la utilitat potencial clínica que puguin tenir com a biomarcadors (Quackenbush 2006).

Tenint en compte la rellevància que sembla tenir l'estroma en el pronòstic del càncer colorectal, els resultats d'aquest tercer objectiu volen remarcar la importància de l'estat transcripcional dels fibroblasts associats a carcinoma com a principals components d'aquest estroma. Els 5 gens descrits en el classificador són d'expressió principalment fibroblàstica, no obstant, tot i que tant els conjunts de bases de dades analitzats *in silico* com les mostres analitzades per qRT-PCR pertanyen a tot el teixit tumoral, la signatura estromal sembla no diluir-se en el compartiment epitelial ja que en els conjunts de dades contenint informació només d'epiteli no demostren cap valor predictiu. Un aspecte vist en un altre estudi on analitzaven els gens estromals en diferents estadiatsges del càncer d'esòfag (Saadi, Shannon et al. 2010) i que prèviament havien estat descrites en un estudi on demostraven que en mostres macro dissecades, els gens que eren específicament estromals eren detectats tot i la presència de cèl·lules epitelials (de Bruin, van de Pas et al. 2005). A més, la bona aplicació del classificador en dades d'expressió procedents de diferents tecnologies (microarray vs qRT-PCR), indica que tot i ser un classificador específic de l'estroma tumoral, la seva senyal pot ser detectada sempre i quan hi hagi un mínim de percentatge estromal present en la mostra. Un aspecte que va ser cobert a través de la signatura de col·làgens definida pels gens *COL1A1*, *COL3A1* i *LUM*. La seva detecció ha servit no només per assegurar una mínima quantitat de fibroblasts en la mostra (i així minimitzar els falsos negatius), sinó per descartar que el que realment ens estigués donant el valor pronòstic fos la quantitat d'estroma i no les seves característiques d'expressió. Tot i que el grau de col·lagen indicat per aquesta signatura sembla reflectir la quantitat de fibroblasts presents en la mostra, indicant per tant la reacció desmoplàstica, la manca de valor pronòstic que demostra suggereix que més que la quantitat de fibroblasts presents en la peça del tumor analitzada, el que realment és rellevant és el grau d'expressió dels gens del classificador. La detecció de l'expressió d'aquests 5 gens permet la

identificació d'aquells pacients d'estadi II amb un alt risc de recurrència (independentment del seu grau d'extensió) i la dels pacients d'estadi III que tenen un baix risc. Per aquells pacients en estadi II amb una baixa puntuació del classificador de 5 gens (segons el punt de tall establert), la supervivència lliure de malaltia als 5 anys era > 90%, el que podria suggerir que el benefici de la quimioteràpia en pacients d'aquestes característiques podria ser mínim. La controvèrsia al voltant del benefici de l'administració de quimioteràpia en els pacients en estadi II existeix, tot i així, l'estudi QUASAR (Gray, Barnwell et al. 2007) suggereix que hi ha un subgrup de pacients en estadi II amb alt risc de recurrència que es beneficiarien del tractament adjuvant. En estadis III, la quimioteràpia és administrada de manera rutinària a tots els pacients, malgrat tot, un 40% recauen (Andre, Boni et al. 2004). Per aquests motius, el classificador podria ser útil a l'hora de triar aquells pacients en estadi II amb un elevat risc de recurrència als quals se'ls hi podria oferir tractament adjuvant. En canvi, per a pacients d'estadi III, malgrat identificar clarament un grup de bon pronòstic, més evidències serien necessàries per a convèncer als clínics de la ommissió de tractament en aquests pacients. Així doncs, l'aplicació clínica del classificador estromal de 5 gens podria proporcionar una informació addicional més acurada de risc de recurrència de la que proporcionen els criteris clínico-patològics convencionals, i podria ser útil per a facilitar la selecció d'aquells pacients en estadi II d'alt risc que es podrien beneficiar de la teràpia adjuvant. Per altra banda, el reduït nombre de gens que constitueixen el classificador, així com la seva validació emprant la tècnica de la qRT-PCR, el converteixen en una eina molt més fàcilment aplicable que altres signatures més àmplies. Com en d'altres classificadors descrits, un punt dèbil de l'estudi és l'anàlisi retrospectiu de mostres recollides de manera prospectiva. Més estudis són necessaris per a confirmar si aquests pacients d'estadi II d'alt risc de recurrència segons el classificador estromal podrien obtenir una millora clínica si rebessin quimioteràpia adjuvant. No obstant, l'extensiva validació *in silico* (en 3 conjunts de dades independents) i en mostres analitzades per qRT-PCR, en demostra la seva robustesa.

L'expressió gènica de cèl·lules epitelials en un procés de transició epitelial-mesènquima podria contribuir a l'increment de la senyal proporcionada pels gens del classificador. L'absència de valor pronòstic dels gens del classificador en conjunts de dades d'informació exclusiva de cèl·lules tumorals obtingudes per la tècnica de captura làser, confirma que el poder pronòstic que tenen aquests gens no es troba en el compartiment epitelial i per tant la seva influència és mínima. Tanmateix, en explorar l'expressió dels gens en les diferents subpoblacions cel·lulars presents en un tumor de còlon vam comprovar que l'expressió era molt més elevada en els fibroblasts que no pas en les cèl·lules tumorals o en la resta de cèl·lules constituents de l'estroma. Així doncs, el valor

pronòstic de la signatura depèn de l'estroma tumoral, més concretament, dels fibroblasts que en ells s'hi presenten, i la presència de cèl·lules patint una transició epiteli-mesènquima no afecta al senyal donat. A més, l'anàlisi genètic de l'estroma tumoral rarament presenta canvis idèntics entre les cèl·lules tumorals i els fibroblasts estromals, i pocs patòlegs consideren el procés de TEM com a una explicació general per a l'existència d'estroma reactiu en els tumors (Qiu, Hu et al. 2008).

DISCUSSIÓ GENERAL

El paper que juga el microambient estromal en les diferents etapes d'un procés tumoral és imprescindible per a que la cèl·lula tumoral adquireixi i mantingui les característiques malignes (Hanahan and Weinberg 2011; Hanahan and Coussens 2012). El present estudi s'ha volgut focalitzar en els fibroblasts associats a carcinoma, els principals components del microambient estromal de tumors sòlids com el de còlon, per a comparar-los tant a nivell funcional com transcripcional amb d'altres fibroblasts presents també en l'evolució del tumor com són els fibroblasts de la mucosa colònica adjacent al tumor primari (NCF) i els fibroblasts associats a la metastasi hepàtica (CAF-LM). Mitjançant l'ús de l'anàlisi d'expressió per microarrays s'han pogut identificar gens comuns o diferencialment expressats entre les diferents subpoblacions de fibroblasts en estudi. Tenint en compte l'elevat grau d'heterogeneïtat intra i inter-tumoral, no només de les cèl·lules malignes sinó també en el microambient circumdant; trobar similituts transcripcionals entre els diferents fibroblasts que participen en la progressió d'un tumor ha permès identificar biomarcadors moleculars específics de la progressió i que poden ser útils com a possibles dianes terapèutiques a l'anar dirigits específicament contra els fibroblasts pro-tumorals. Una aproximació molt més acurada en el cas de la comparació de mostres de fibroblasts aparellats de tumor primari i mucosa normal, en el que es minimitza la variabilitat inter-individual a l'emprar mostres procedents d'un mateix individu.

Paral·lelament, l'anàlisi dels gens diferencialment expressats ha permès també la obtenció de diversos classificadors estromals capaços de predir pronòstic en pacients amb càncer colorectal en estadis II-III. Uns classificadors que podrien ser útils en proporcionar als clínics eines addicionals per a millorar la predicció de risc en aquests pacients i oferir un tractament més personalitzat. Són moltes les diverses signatures genètiques que han estat identificades recentment mitjançant l'ús de la tecnologia de microarrays per a millorar el diagnòstic i l'estratificació de risc de pacients amb càncer colorectal. No obstant, són pocs els classificadors genòmics definits fins al moment que han estat traslladats a la pràctica clínica (*Oncotype DX* (Webber, Lin et al. 2010) i *ColoPrint* (Salazar,

Roepman et al. 2010)), un fet que pot ser conseqüència de problemes tècnics com l'ús d'un reduït nombre de mostres per a definir-lo, l'elevat nombre de gens que inclou, dificultat de translació entre plataformes diferents (microarrays vs qRT-PCR) o heterogeneïtat entre les cohorts emprades (Simon 2005). Així doncs, la cerca d'una única i específica signatura d'expressió gènica capaç de predir pronòstic és un repte molt gran ja que per a definir un bon marcador predictiu de pronòstic serien necessaris milers de pacients (Jochumsen, Tan et al. 2009). En aquest treball hem definit un classificador estromal amb una elevada predicció de recurrència en els 3 conjunts de dades independents emprats i que a més ha estat traslladat i validat a nivell clínic mitjançant l'anàlisi per qRT-PCR en un altre conjunt de mostres. Si bé és cert que són necessaris assajos prospectius, randomitzats i multicèntrics per a poder implementar els perfils d'expressió gènica a les decisions clíniques referents als pacients amb càncer colorectal (Lu, Salpeter et al. 2009), en aquesta tesi s'ha volgut ampliar el coneixement en el camp de les signatures genètiques fent èmfasi en el compartiment estromal del tumor.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

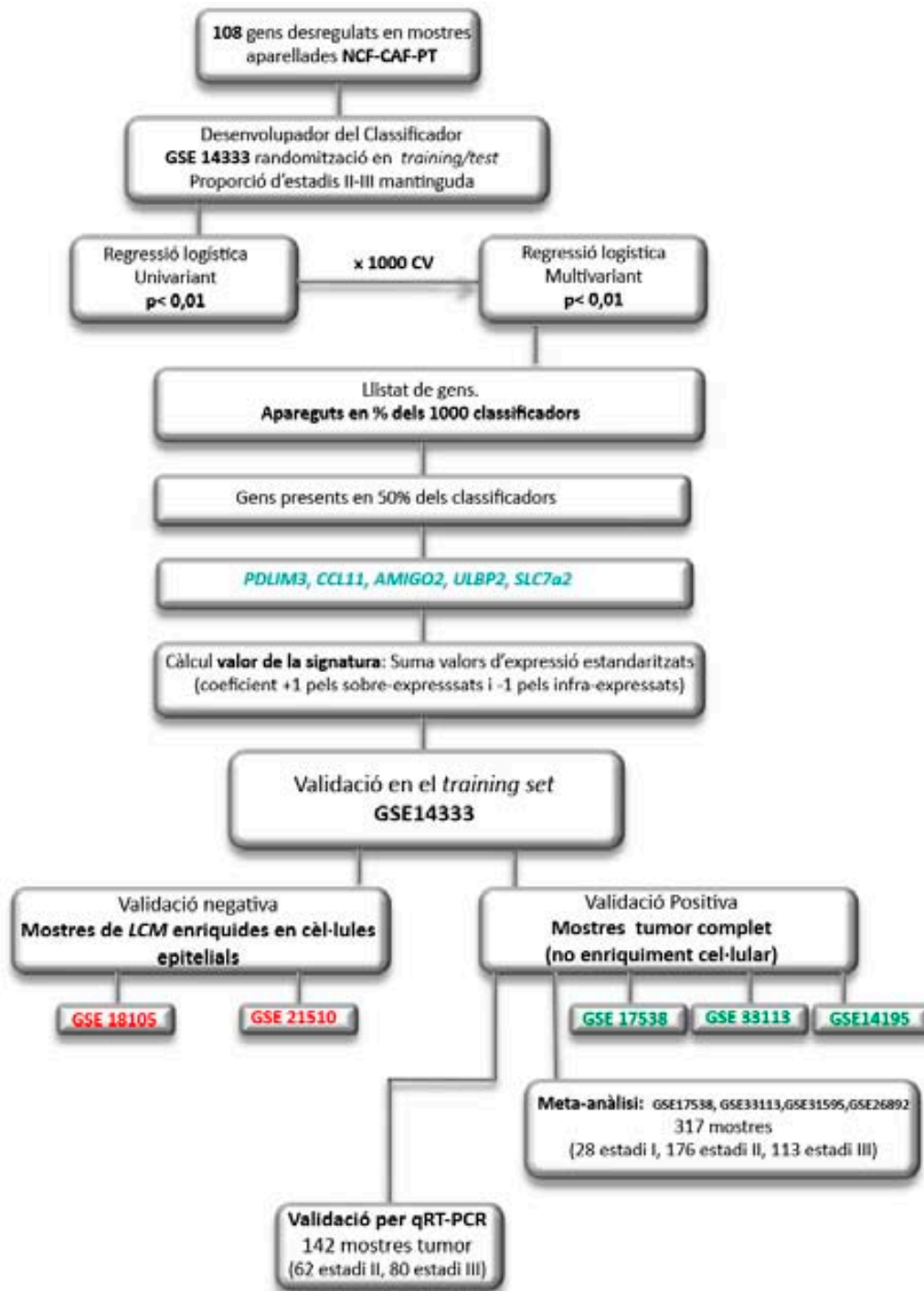
1. Les cèl·lules tumorals de carcinoma colorectal responen de forma diferencial als productes secretats pels miofibroblasts de les diferents demarcacions anatòmiques amb els que interaccionarà al llarg de la progressió tumoral.
2. En particular, els fibroblasts associats a carcinoma de metàstasi hepàtica, a diferència dels CAFs de tumor primari, disminueixen la proliferació, incrementen la migració i la invasió de les cèl·lules tumorals.
3. Els miofibroblasts de les diferents localitzacions anatòmiques del carcinoma colorectal presenten un perfil transcriptòmic diferent. Ara bé, es pot definir una signatura d'expressió gènica de resposta al sèrum comú a les tres demarcacions i gradual al llarg de la progressió tumoral.
4. Així mateix, amb només 19 gens d'aquesta signatura en comú podem classificar els pacients afectats de carcinoma colorectal estadis II/III en funció del seu risc de recurrència.
5. Donada l'alta heterogeneïtat dels miofibroblasts, és fonamental tant l'ús de mostres aparellades com de fibroblasts de la mucosa normal adjacent al tumor per tal d'identificar nous biomarcadors i dianes terapèutiques en els fibroblasts associats a carcinoma en càncer colorectal.
6. El classificador de 5 gens estromals, obtingut a partir dels 108 gens diferencialment expressats entre NCF i CAF, proporciona una informació més acurada del risc de recurrència que les variables clíniques convencionals i pot facilitar la selecció de pacients estadi II d'alt risc que podrien beneficiar-se amb tractament adjuvant.
7. El poder predictiu dels classificador incrementa significativament si es selecciona en el moment de la diagnosi una biòpsia del tumor relativament rica en estroma tumoral.
8. L'estat fisiològic dels CAFs és més rellevant per la prognosi del càncer colorectal que la quantitat de fibroblasts presents en el tumor.
9. Els CAFs són cèl·lules molt heterogènies, i per tant, múltiples i diferents respostes biològiques es troben presents alhora en un mateix tumor. El balanç net entre aquestes respostes és el que proveeix el valor pronòstic.

ANNEXES

ANNEX 1: Seqüències dels encebadors emprats en els diferents apartats d'aquesta tesi.

GEN	ENCEBADOR "FORWARD" 5'-3'	ENCEBADOR "REVERSE" 5'-3'	UTILITZACIÓ
<i>GAPDH</i>	GCATCCTGGGCTACACTGA	CCACCACCCTGTTGCTGTA	Gen endogen
<i>KRT18</i>	TCAGCAGATTGAGGAGAGCA	GAGCTGCTCCATCTGTAGGG	Caracterització fibroblasts
<i>ASMA</i>	AATGGCTCTGGGCTCTGTAA	TGGTGATGATGCCATGTTCT	
<i>VIM</i>	GAGAAATTGCAGGAGGAG	GCTCCTGGATTTCCTCTT	
<i>CLDN1</i>	CCGTTGGCATGAAGTGATG	CCAGTGAAGAGAGCCTGACC	
<i>CXCL12</i>	TCAGCCTGAGCTACAGATGC	CTTTAGCTTCGGGTCAATGC	Validació resultats de microarrays
<i>EFNB2</i>	CTGCTGGATCAACCAGGAAT	GATGTTGTTCCCGAATGTC	
<i>NTF-3</i>	GAAACGCGATGTAAGGAAGC	CCAGCCCACGAGTTTATTGT	
<i>PKP2</i>	GCAAATGGTTTGCTCGATTT	GGCTGGTAATCTGCAATGGT	
<i>TGFB2</i>	CCGGAGGTGATTTCCATCTA	CTCCATTGCTGAGACGTCAA	
<i>SEMA5A</i>	AGATCCTGCACAGCCAGAGT	CAGGCTTGTGATTTCTTCA	
<i>TNFSF4</i>	GCTGGTGGCCTCTGTAATTC	TGGGAAGTGAGGATGAAACC	
<i>ST6GALNAC5</i>	TTACTCGCCACAAGATGCTG	GCACCATGCCATAAACATTG	
<i>WNT2</i>	GTGGATGCAAAGGAAAGGAA	AGCCAGCATGTCCTGAGAGT	
<i>NRXN3</i>	ACTCAGTGCCTATTTCTATC	CTATAGTGAAGCTGGAGGA	
<i>INHBA</i>	GCACTTGAAGAAGAGACCCG	GTCTTCTGGCTGTTCTCTGA	
<i>FGF13</i>	ACAAGCCTGCAGCTCATTTT	CATTGTGGCTCATGGATTTG	
<i>COL11A1</i>	CCAGGTTTACCAGTCCCTCA	GGGAATTGAGGGAACCAAAT	
<i>PMM1</i>	ACGGGACGGTGCAGTATAAG	GGAACCTCGATGAAGGTTCCA	
<i>ACTB</i>	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	
<i>HPRT1</i>	TGCTCGAGATGTGATGAAGG	TCCCTGTTGACTGGTCATT	
<i>PPIA</i>	AGGGTTCCTGCTTTCACAGA	GTCTTGGCAGTGCAGATGAA	
<i>IPO8</i>	TCAGTGCATTCCACTCTTCG	TCATGATGCCCAAGAAAACA	
<i>RSP13</i>	GCTGTTGCAAAGCATCTTGA	AGGGCAGAGGCTGTAGATGA	
<i>B2M</i>	CGCTGGCGGGCATTCTCTG	TGCGGCATCTTCAAACCTCCAT	
<i>AMIGO2</i>	TCGTTTGCAAAGCTGAACAC	GCAGAAGCACTTCCAGAACC	
<i>ULBP2</i>	GCAAGGATGTCTTGTGAGCA	GGCCACAACCTTGTCTTCT	Gens classificador estromal
<i>PDLIM3</i>	TTCAGAGTGCTCCAGGAAT	TCAGGGTGCCGTAATTATC	
<i>SLC7A2</i>	CTTACGACCAGCCAAATGT	TGATGGCATGAACTCCGTAA	
<i>CCL11</i>	AACCACCTGCTGCTTTAACC	TCCTGCACCCACTTCTTCTT	
<i>COL1A1</i>	AGCCAGCAGATCGAGAACAT	TCTTGTCTTGGGGTCTTG	Gens signatura
<i>COL3A1</i>	GACCCTAACCAAGGATGCAA	GGAAGTTCAGGATTGCCGTA	
<i>LUM</i>	CCTGGTTGAGCTGGATCTGT	CGGTGGAAGACTGGTTTCTG	
<i>SLUG</i>	GCGATGCCAGTCTAGAAAA	GCAGTGAGGGCAAGAAAAAG	Gens TEM
<i>SNAIL</i>	TTTACCTTCCAGCAGCCCTA	CCTCATCTGACAGGGAGGTC	
<i>ZEB</i>	GCTGGGAGGATGACAGAAAG	CCTCTGGTCTTCTCAGGTG	

ANNEX 2: Esquema del procés per al desenvolupament del classificador de 5 gens i la seva posterior validació *in silico* i per qRT-PCR.



ANNEX 3: Llistat de 277 gens d'expressió comú i gradual en la seqüència de NCF – CAF-PT i CAF-LM

Sobreespressats en la seqüència NCF/CAF-PT/CAF-LM

ID sonda	Símbol gen	Fold changes			q-valor	Descripció gen
		CAF-PT/NCF	CAF-LM/CAF-PT	CAF-LM/CAF-LM		
8114970	C5orf46	1.773	14.845	4.22E-05	0	chromosome 5 open reading frame 46
8130173	RAET1L	1.667	1.665	4.22E-05	0	retinoic acid early transcript 1L
7898413	PADI1	1.535	1.590	4.22E-05	0	peptidyl arginine deiminase, type I
8020455	GATA6	1.598	2.751	4.22E-05	0	GATA binding protein 6
8058450	GPR1	2.921	3.498	4.22E-05	0	G protein-coupled receptor 1
8111387	ADAMTS12	1.663	2.451	4.22E-05	0	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 12
8100382	CHIC2	1.616	3.392	4.22E-05	0	cysteine-rich hydrophobic domain 2
7938485	MICAL2	2.320	2.180	4.22E-05	0	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2
7909789	TGFB2	4.254	1.710	4.22E-05	0	transforming growth factor, beta 2
7953284	NTF3	2.429	1.601	4.22E-05	0	neurotrophin 3
8110932	SEMA5A	2.956	2.526	4.22E-05	0	semaphorin 5A
8122720	ULBP2	3.896	1.531	4.22E-05	0	UL16 binding protein 2
7945245	NTM	1.976	2.891	4.22E-05	0	neurotrimin
8020878	MAPRE2	1.508	2.648	4.22E-05	0	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2
8112007	EMB	1.941	4.055	4.22E-05	0	embigin homolog (mouse)
8114805	FGF1	1.642	2.564	4.22E-05	0	fibroblast growth factor 1 (acidic)
7997504	CDH13	1.624	3.521	4.22E-05	0	cadherin 13, H-cadherin (heart)
7942957	PRSS23	1.725	1.669	4.22E-05	0	protease, serine, 23
8126798	GPR116	1.513	6.179	4.22E-05	0	G protein-coupled receptor 116
8091283	PLOD2	1.829	1.628	4.22E-05	0	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2
8083594	PTX3	1.658	3.914	4.22E-05	0	pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta
8112615	ENC1	1.919	3.319	4.22E-05	0	ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)
8075910	RAC2	1.586	1.956	4.22E-05	0	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)
7961532	ARHGDI3	1.687	10.129	4.22E-05	0	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta

244	7922337	TNFSF18	1.551	2.594	4.22E-05	0	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 18
	7912520	NPPB	1.951	21.345	4.22E-05	0	natriuretic peptide precursor B
	8022674	CDH2	2.314	3.324	4.22E-05	0	cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)
	8135069	SERPINE1	2.414	2.124	4.22E-05	0	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
	8104022	PDLIM3	3.207	3.096	4.22E-05	0	PDZ and LIM domain 3
	8144786	SLC7A2	2.127	5.056	4.22E-05	0	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y ⁺ system), member 2
	7965094	E2F7	1.793	2.534	4.22E-05	0	E2F transcription factor 7
	8108905	KCTD16	2.206	1.815	4.22E-05	0	potassium channel tetramerisation domain containing 16
	7990054	UACA	2.204	7.039	4.22E-05	0	uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats
	8081219	ST3GAL6	1.836	2.220	4.22E-05	0	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6
	7955637	KRT18	2.563	2.516	4.22E-05	0	keratin 18
	8102831	C4orf49	2.078	3.194	4.22E-05	0	chromosome 4 open reading frame 49
	8163149	PTPN3	1.551	1.557	4.22E-05	0	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3
	8006736	DUSP14	1.590	1.510	4.22E-05	0	dual specificity phosphatase 14
	8077441	BHLHE40	1.988	2.030	4.22E-05	0	basic helix-loop-helix family, member e40
	7942941	CCDC81	1.528	4.529	4.23E-05	0	coiled-coil domain containing 81
	8058849	MARCH4	2.000	1.598	4.23E-05	0	membrane-associated ring finger (C3HC4) 4
	7934979	ANKRD1	4.973	7.189	4.23E-05	0	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)
	8107673	GRAMD3	1.824	1.929	4.23E-05	0	GRAM domain containing 3
	8130674	PDE10A	1.724	2.311	4.23E-05	0	phosphodiesterase 10A
	8140534	SEMA3C	1.795	3.222	4.23E-05	0	sema domain, immunoglobulin domain (lg), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C
	7927964	SRGN	1.830	17.546	4.23E-05	0	serglycin
	8097058	CEP170L	1.591	1.827	4.24E-05	0	centrosomal protein 170kDa-like
	8149574	CSGALNACT1	1.519	2.838	4.24E-05	0	chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1
	8103630	SH3RF1	1.564	1.763	4.25E-05	0	SH3 domain containing ring finger 1
	7995838	MT1X	1.550	2.897	4.25E-05	0	metallothionein 1X
	8139207	INHBA	1.939	1.824	4.26E-05	0	inhibin, beta A
	7922343	TNFSF4	9.118	2.465	4.28E-05	0	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4
	7922807	GLT25D2	2.091	1.868	4.28E-05	0	glycosyltransferase 25 domain containing 2

7964733	RPSAP52	1.943	4.516	4.29E-05	0	ribosomal protein SA pseudogene 52
8057898	HECW2	1.532	2.827	4.30E-05	0	HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2
8154245	PDCD1LG2	1.623	2.198	4.32E-05	0	programmed cell death 1 ligand 2
8139087	SFRP4	1.771	9.160	4.34E-05	0	secreted frizzled-related protein 4
8109830	CCDC99	1.603	2.189	4.43E-05	0	coiled-coil domain containing 99
7983478	C15orf48	2.059	11.537	4.44E-05	0	chromosome 15 open reading frame 48
8007363	WNK4	2.507	1.811	4.45E-05	0	WNK lysine deficient protein kinase 4
8056491	SCN9A	1.915	1.886	4.67E-05	0	sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha subunit
7995697	LPCAT2	1.557	1.650	4.80E-05	0	lysophosphatidylcholine acyltransferase 2
7975459	SIPA1L1	1.504	1.549	4.92E-05	0	signal-induced proliferation-associated 1 like 1
8149749	TNFRSF10D	1.518	1.641	5.09E-05	0	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, with truncated death domain
7962212	PKP2	2.453	1.689	5.13E-05	0	plakophilin 2
8078529	STAC	1.932	2.874	5.14E-05	0	SH3 and cysteine rich domain
7995797	MT1E	1.995	5.331	5.15E-05	0	metallothionein 1E
7976012	NRXN3	5.443	1.909	5.36E-05	0	neurexin 3
8085138	OXTR	1.922	1.860	5.93E-05	0	oxytocin receptor
7906919	RG54	1.803	7.067	6.34E-05	0	regulator of G-protein signaling 4
7972750	COL4A1	1.510	1.536	6.37E-05	0	collagen, type IV, alpha 1
8120654	KCNQ5	1.860	1.745	6.96E-05	0	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 5
7918869	NGF	1.584	2.044	8.15E-05	0	nerve growth factor (beta polypeptide)
7963567	KRT8	1.714	2.181	8.95E-05	0	keratin 8
8098006	GLRB	1.647	1.506	9.21E-05	0	glycine receptor, beta
8177732	HLA-A	1.640	1.777	9.73E-05	0	major histocompatibility complex, class I, A
7909503	SERTAD4	2.557	1.556	1.01E-04	0	SERTA domain containing 4
7984259	RNU5B-1	1.580	5.525	1.16E-04	0	RNA, USB small nuclear 1
8054479	MALL	1.940	1.654	1.52E-04	0	mal, T-cell differentiation protein-like
7946983	SAA2	2.910	2.545	1.68E-04	0	serum amyloid A2
8015268	KRT34	4.600	1.551	2.58E-04	2.96E-05	keratin 34
7995793	MT1L	1.549	1.963	2.68E-04	2.96E-05	metallothionein 1L (gene/pseudogene)

8063458	DOK5	2.092	2.492	3.54E-04	2.96E-05	docking protein 5
8092726	CLDN1	1.870	2.406	3.63E-04	2.96E-05	claudin 1
7934570	KCNMA1	1.804	2.183	4.07E-04	2.96E-05	potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1
8145793	SNORD13	1.693	2.595	4.60E-04	7.80E-05	small nucleolar RNA, C/D box 13
8174201	BEX1	2.133	4.555	1.82E-03	1.40E-04	brain expressed, X-linked 1
8147049	FABP5L1	1.881	1.928	2.05E-03	2.93E-04	fatty acid binding protein 5-like 1 (pseudogene)
8114572	HBEGF	1.761	1.610	2.25E-03	2.93E-04	heparin-binding EGF-like growth factor
8005955	SNORD42A	1.686	3.452	3.74E-03	5.78E-04	small nucleolar RNA, C/D box 42A
8105267	ITGA2	2.207	2.435	4.16E-03	5.78E-04	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)
7981996	SNRPN	1.730	1.640	5.15E-03	5.78E-04	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N
8135218	LRRC17	1.710	2.989	5.90E-03	5.78E-04	leucine rich repeat containing 17
7971077	POSTN	3.413	3.003	1.03E-02	1.10E-03	periostin, osteoblast specific factor
7926545	PLXDC2	2.363	1.576	1.20E-02	1.99E-03	plexin domain containing 2
7990345	SEMA7A	1.630	1.740	1.24E-02	1.99E-03	semaphorin 7A, GPI membrane anchor (John Milton Hagen blood group)
8145361	NEFM	1.593	1.908	4.00E-02	5.59E-03	neurofilament, medium polypeptide

Infraexpressats en la seqüència NCF-CAF-PT – CAF-LM

Fold changes

ID sonda	Simbol gen	CAF- LM/CAF- PT		p-valor	q-valor	Descripció gen
		PT/NCF	PT			
8022572	OSBPL1A	0.657	0.430	4.224E-05	0	oxysterol binding protein-like 1A
7923700	LRRN2	0.458	0.589	4.224E-05	0	leucine rich repeat neuronal 2
7990333	CYP11A1	0.300	0.546	4.224E-05	0	cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1
8115261	CCDC69	0.424	0.294	4.224E-05	0	coiled-coil domain containing 69
8134117	FZD1	0.623	0.614	4.224E-05	0	frizzled homolog 1 (Drosophila)
8175444	FGF13	0.633	0.623	4.224E-05	0	fibroblast growth factor 13
7908907	ADORA1	0.516	0.463	4.224E-05	0	adenosine A1 receptor
7950409	KCNE3	0.606	0.530	4.224E-05	0	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3
7981142	CLMN	0.486	0.440	4.224E-05	0	calmin (calponin-like, transmembrane)
7903407	AMY2B	0.590	0.362	4.224E-05	0	amylase, alpha 2B (pancreatic)
8140420	FDPSL2A	0.587	0.502	4.224E-05	0	MGC44478
7993458	C16orf45	0.666	0.423	4.224E-05	0	chromosome 16 open reading frame 45
8143790	TMEM176B	0.608	0.062	4.224E-05	0	transmembrane protein 176B
8024062	CFD	0.282	0.336	4.224E-05	0	complement factor D (adipsin)
8101881	ADH1B	0.053	0.379	4.224E-05	0	alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide
8139057	ELMO1	0.333	0.552	4.224E-05	0	engulfment and cell motility 1
7925452	GREM2	0.305	0.214	4.224E-05	0	gremlin 2, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)
7973724	KIAA1305	0.577	0.480	4.224E-05	0	KIAA1305
8122176	TCF21	0.432	0.287	4.224E-05	0	transcription factor 21
7917649	TGFBR3	0.288	0.373	4.224E-05	0	transforming growth factor, beta receptor III
8047577	ALS2CR8	0.604	0.422	4.224E-05	0	amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 8
8157804	OLFML2A	0.549	0.535	4.224E-05	0	olfactomedin-like 2A
8126770	CYP39A1	0.627	0.055	4.224E-05	0	cytochrome P450, family 39, subfamily A, polypeptide 1
8096116	AGPAT9	0.514	0.308	4.224E-05	0	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9

7996377	CES8	0.650	0.581	4.224E-05	0	carboxylesterase 8 (putative)
8128894	REV3L	0.490	0.664	4.224E-05	0	REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta (yeast)
7903162	TMEM56	0.425	0.500	4.224E-05	0	transmembrane protein 56
8092169	TNFSF10	0.254	0.224	4.224E-05	0	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
7905789	IL6R	0.565	0.327	4.224E-05	0	interleukin 6 receptor
7917304	MCOLN3	0.601	0.545	4.224E-05	0	mucolipin 3
7952752	ADAMTS8	0.549	0.363	4.224E-05	0	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 8
8180411	ELMO1	0.510	0.476	4.224E-05	0	engulfment and cell motility 1
8126750	ENPP5	0.522	0.287	4.224E-05	0	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5 (putative function)
8022145	L3MBTL4	0.650	0.557	4.224E-05	0	l(3)mbt-like 4 (Drosophila)
8066985	FAM65C	0.530	0.514	4.224E-05	0	family with sequence similarity 65, member C
8081953	GTF2E1	0.649	0.416	4.224E-05	0	general transcription factor IIE, polypeptide 1, alpha 56kDa
7906954	PBX1	0.547	0.641	4.224E-05	0	pre-B-cell leukemia homeobox 1
7937039	EBF3	0.356	0.509	4.224E-05	0	early B-cell factor 3
8122150	EYAA4	0.351	0.111	4.224E-05	0	eyes absent homolog 4 (Drosophila)
8003667	SERPINF1	0.498	0.211	4.224E-05	0	serpin peptidase inhibitor, clade F, member 1
8121794	SMPDL3A	0.364	0.293	4.224E-05	0	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A
8049752	SNED1	0.427	0.443	4.224E-05	0	sushi, nidogen and EGF-like domains 1
7917676	GLMN	0.572	0.535	4.224E-05	0	glomulin, FKBP associated protein
7903393	S1PR1	0.567	0.182	4.224E-05	0	sphingosine-1-phosphate receptor 1
7918857	TSPAN2	0.650	0.110	4.224E-05	0	tetraspanin 2
8174654	KLHL13	0.436	0.521	4.224E-05	0	kelch-like 13 (Drosophila)
8180376	AKR1C1	0.382	0.239	4.224E-05	0	aldo-keto reductase family 1, member C1
8044813	TMEM37	0.654	0.566	4.224E-05	0	transmembrane protein 37
8161362	KGFLP2	0.634	0.453	4.224E-05	0	keratinocyte growth factor-like protein 2
7932744	ARMC4	0.486	0.334	4.224E-05	0	armadillo repeat containing 4
7961757	ST8SIA1	0.541	0.206	4.224E-05	0	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1
8089040	MINA	0.648	0.567	4.224E-05	0	MYC induced nuclear antigen
8120067	SLC25A27	0.569	0.307	4.224E-05	0	solute carrier family 25, member 27

7926506	CACNB2	0.411	0.348	4.224E-05	0	calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit
7931832	AKR1C2	0.377	0.318	4.224E-05	0	aldo-keto reductase family 1, member C2
8043244	ATOH8	0.596	0.501	4.224E-05	0	atonal homolog 8 (Drosophila)
8174513	CHRD1	0.400	0.068	4.224E-05	0	chordin-like 1
8157173	MUSK	0.310	0.390	4.224E-05	0	muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase
8144213	VIPR2	0.381	0.173	4.224E-05	0	vasoactive intestinal peptide receptor 2
7962559	SLC38A4	0.626	0.112	4.224E-05	0	solute carrier family 38, member 4
7903507	FAM102B	0.547	0.326	4.224E-05	0	family with sequence similarity 102, member B
7934916	CH25H	0.648	0.481	4.224E-05	0	cholesterol 25-hydroxylase
7969613	GPC6	0.572	0.343	4.224E-05	0	glypican 6
8042195	AHSA2	0.614	0.587	4.224E-05	0	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 2 (yeast)
8081686	BOC	0.598	0.426	4.224E-05	0	Boc homolog (mouse)
8156706	TMOD1	0.666	0.259	4.224E-05	0	tropomodulin 1
8089714	LSAMP	0.425	0.254	4.224E-05	0	limbic system-associated membrane protein
8151942	HRSP12	0.637	0.618	4.224E-05	0	heat-responsive protein 12
8073775	FBLN1	0.574	0.123	4.224E-05	0	fibulin 1
8111915	SEPP1	0.247	0.049	4.224E-05	0	selenoprotein P, plasma, 1
8097957	GUCY1A3	0.331	0.302	4.224E-05	0	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3
8018754	CYGB	0.638	0.316	4.224E-05	0	cytoglobin
8077270	CHL1	0.446	0.086	4.224E-05	0	cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)
8091327	PLSCR1	0.648	0.618	4.224E-05	0	phospholipid scramblase 1
7961755	ST8SIA1	0.615	0.241	4.224E-05	0	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1
8131205	SDK1	0.432	0.388	4.224E-05	0	sidekick homolog 1, cell adhesion molecule (chicken)
8027431	ZNF536	0.449	0.547	4.224E-05	0	zinc finger protein 536
8007420	AOC3	0.140	0.326	4.224E-05	0	amine oxidase, copper containing 3 (vascular adhesion protein 1)
7931888	ANKRD16	0.650	0.582	4.224E-05	0	ankyrin repeat domain 16
7947512	PAMR1	0.512	0.363	4.224E-05	0	peptidase domain containing associated with muscle regeneration 1
7924987	AGT	0.481	0.435	4.224E-05	0	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)
8086908	PLXNB1	0.611	0.530	4.224E-05	0	plexin B1

8065444	ACSS1	0.581	0.610	4.224E-05	0	acyl-CoA synthetase short-chain family member 1
8009353	PITPNC1	0.636	0.549	4.224E-05	0	phosphatidylinositol transfer protein, cytoplasmic 1
8168855	ARMCX4	0.617	0.588	4.224E-05	0	armadillo repeat containing, X-linked 4
8146427	PCMTD1	0.600	0.624	4.224E-05	0	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 1
8113800	FBN2	0.633	0.063	4.224E-05	0	fibrillin 2
7958784	ALDH2	0.659	0.463	4.232E-05	0	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)
8126436	PRPH2	0.459	0.399	4.232E-05	0	peripherin 2 (retinal degeneration, slow)
7903777	GSTM5	0.640	0.161	4.232E-05	0	glutathione S-transferase mu 5
7939559	TSPAN18	0.650	0.243	4.232E-05	0	tetraspanin 18
8073890	GRAMD4	0.520	0.612	4.232E-05	0	GRAM domain containing 4
7904293	PTGFRN	0.252	0.574	4.232E-05	0	prostaglandin F2 receptor negative regulator
8111019	DNAH5	0.602	0.570	4.232E-05	0	dynein, axonemal, heavy chain 5
8101893	ADH1C	0.398	0.484	4.232E-05	0	alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide
8118734	ITPR3	0.658	0.440	4.232E-05	0	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3
8081171	CRYBG3	0.568	0.496	4.232E-05	0	beta-gamma crystallin domain containing 3
8135661	CFTR	0.550	0.239	4.232E-05	0	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
8166784	TSPAN7	0.375	0.454	4.232E-05	0	tetraspanin 7
8149927	CLU	0.660	0.509	4.232E-05	0	clusterin
8099132	CYTL1	0.561	0.489	4.241E-05	0	cytokine-like 1
7926786	APBB1IP	0.623	0.245	4.241E-05	0	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 1 interacting protein
7990943	FLJ40113	0.662	0.428	4.241E-05	0	golgi autoantigen, golgin subfamily a-like pseudogene
8062461	LBP	0.509	0.628	4.241E-05	0	lipopolysaccharide binding protein
7976560	BDKRB2	0.553	0.453	4.249E-05	0	bradykinin receptor B2
8107520	TNFAIP8	0.600	0.465	4.249E-05	0	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8
8095751	DKFZP564O0823	0.577	0.096	4.249E-05	0	DKFZP564O0823 protein
8126760	RCAN2	0.646	0.240	4.249E-05	0	regulator of calcineurin 2
7920271	S100A4	0.509	0.130	4.249E-05	0	S100 calcium binding protein A4
7955441	METTL7A	0.402	0.206	4.249E-05	0	methyltransferase like 7A
8048432	CYP27A1	0.373	0.583	4.249E-05	0	cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1

8091260	SLC9A9	0.666	0.314	4.249E-05	0	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 9
8175393	ARHGGEF6	0.600	0.524	4.257E-05	0	Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6
8145317	ADAMDEC1	0.591	0.421	4.257E-05	0	ADAM-like, decysin 1
7961580	LMO3	0.373	0.514	4.257E-05	0	LIM domain only 3 (rhombotin-like 2)
8152314	RSPO2	0.595	0.286	4.274E-05	0	R-spondin 2 homolog (Xenopus laevis)
8049471	CXCR7	0.592	0.498	4.283E-05	0	chemokine (C-X-C motif) receptor 7
8003814	ASPA	0.294	0.388	4.291E-05	0	aspartoacylase (Canavan disease)
8018038	ABCA5	0.443	0.660	4.291E-05	0	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 5
8023401	CCDC68	0.501	0.357	4.308E-05	0	coiled-coil domain containing 68
8122142	SNORD101	0.617	0.629	4.308E-05	0	small nucleolar RNA, C/D box 101
8109383	GRIA1	0.416	0.583	4.342E-05	0	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 1
8147573	OSR2	0.501	0.551	4.342E-05	0	odd-skipped related 2 (Drosophila)
8163202	SVEP1	0.521	0.505	4.342E-05	0	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1
7960757	C1RL	0.628	0.662	4.350E-05	0	complement component 1, r subcomponent-like
8113666	SEMA6A	0.623	0.140	4.367E-05	0	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A
8175666	GABRE	0.622	0.561	4.393E-05	0	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, epsilon
8129573	MOXD1	0.558	0.181	4.443E-05	0	monooxygenase, DBH-like 1
8148070	COL14A1	0.585	0.179	4.452E-05	0	collagen, type XIV, alpha 1
8139212	GLI3	0.606	0.567	4.469E-05	0	GLI family zinc finger 3
7925929	AKR1C3	0.264	0.616	4.502E-05	0	aldo-keto reductase family 1, member C3
8022612	ZNF521	0.532	0.463	4.536E-05	0	zinc finger protein 521
8077899	PPARG	0.379	0.501	4.545E-05	0	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
8013606	VTN	0.588	0.384	4.570E-05	0	vitronectin
8088848	PDZRN3	0.578	0.554	4.684E-05	0	PDZ domain containing ring finger 3
7930714	ATRNL1	0.605	0.556	4.705E-05	0	attractin-like 1
7974366	PTGER2	0.589	0.555	4.849E-05	0	prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa
7931977	ITIH5	0.387	0.465	4.874E-05	0	inter-alpha (globulin) inhibitor H5
8096959	ANK2	0.604	0.230	5.128E-05	0	ankyrin 2, neuronal
8098620	FAM149A	0.493	0.616	5.208E-05	0	family with sequence similarity 149, member A

8143397	DENN2A	0.464	0.493	5.254E-05	0	DENN/MADD domain containing 2A
7962000	PTH1H	0.493	0.550	5.267E-05	0	parathyroid hormone-like hormone
7960947	A2M	0.534	0.199	5.356E-05	0	alpha-2-macroglobulin
8095694	PF4V1	0.636	0.343	5.364E-05	0	platelet factor 4 variant 1
7951178	TRPC6	0.456	0.356	5.470E-05	0	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6
7974533	PELI2	0.652	0.657	5.550E-05	0	pellino homolog 2 (Drosophila)
8057677	SLC40A1	0.321	0.403	5.681E-05	0	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1
8177222	CD24	0.630	0.079	6.175E-05	0	CD24 molecule
8093858	STK32B	0.486	0.330	6.581E-05	0	serine/threonine kinase 32B
8021695	DOK6	0.584	0.645	8.000E-05	0	docking protein 6
8083968	NLGN1	0.468	0.396	8.811E-05	0	neuroligin 1
8123446	SMOC2	0.434	0.144	9.651E-05	0	SPARC related modular calcium binding 2
7933084	NAMPT	0.559	0.593	9.858E-05	0	nicotinamide phosphoribosyltransferase
7987385	MEIS2	0.637	0.649	1.026E-04	0	Meis homeobox 2
8163892	C9orf31	0.666	0.637	1.155E-04	0	chromosome 9 open reading frame 31
8095110	KIT	0.452	0.520	1.270E-04	0	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
8109333	GPX3	0.609	0.381	1.331E-04	0	glutathione peroxidase 3 (plasma)
8131844	GNPMB	0.459	0.483	1.746E-04	2.959E-05	glycoprotein (transmembrane) nmb
8095697	CXCL1	0.649	0.209	1.809E-04	2.959E-05	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)
8103415	C4orf18	0.594	0.661	1.957E-04	2.959E-05	chromosome 4 open reading frame 18
7985786	ACAN	0.356	0.390	2.161E-04	2.959E-05	aggrecan
8174598	IL13RA2	0.342	0.340	2.414E-04	2.959E-05	interleukin 13 receptor, alpha 2
7929511	ENTPD1	0.357	0.384	2.601E-04	2.959E-05	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1
7916493	PPAP2B	0.560	0.455	2.968E-04	7.805E-05	phosphatidic acid phosphatase type 2B
7951284	MMP3	0.468	0.340	3.849E-04	7.805E-05	matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
8009502	KCNJ2	0.549	0.629	3.983E-04	7.805E-05	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2
7898693	ALPL	0.501	0.516	4.646E-04	7.805E-05	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
7984813	ISLR	0.598	0.451	4.971E-04	7.805E-05	immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat
7938293	SNORA45	0.619	0.265	5.094E-04	7.805E-05	small nucleolar RNA, H/ACA box 45

8076415	RNU13P1	0.583	0.423	5.624E-04	7.805E-05	RNA, U13 small nuclear pseudogene 1
8094870	SHISA3	0.471	0.425	1.191E-03	2.935E-04	shisa homolog 3 (Xenopus laevis)
8109159	LOC728264	0.617	0.486	1.534E-03	2.935E-04	hypothetical LOC728264
7921916	RG55	0.461	0.449	2.509E-03	5.780E-04	regulator of G-protein signaling 5
8121916	RSPO3	0.402	0.328	5.905E-03	1.097E-03	R-spondin 3 homolog (Xenopus laevis)
8133372	ELN	0.600	0.487	6.583E-03	1.097E-03	elastin
7961514	MGP	0.285	0.575	1.508E-02	3.358E-03	matrix Gla protein
8095688	CXCL6	0.653	0.533	2.187E-02	5.589E-03	chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)
8006440	CCL7	0.632	0.381	2.524E-02	5.589E-03	chemokine (C-C motif) ligand 7
8037283	PSG4	0.551	0.620	1.664E-01	4.631E-02	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 4

ANNEX 4: Ontologies genètiques dels gens desregulats en la seqüència de NCF-CAF-PT i CAF-LM

overexpressed along the sequence NCF, CAF-PT, CAF-LM						
Category	Term	Count	PValue	Fold Enrichment	FDR	
GOTERM_BP_ALL	GO:0009611~response to wounding	31	4.86E-07	2.841	8.42E-04	
GOTERM_BP_ALL	GO:0042060~wound healing	17	2.04E-06	4.319	3.54E-03	
GOTERM_BP_ALL	GO:0009605~response to external stimulus	41	4.62E-06	2.173	8.00E-03	
GOTERM_BP_ALL	GO:0008544~epidermis development	16	5.95E-06	4.222	1.03E-02	
GOTERM_BP_ALL	GO:0007398~ectoderm development	16	1.36E-05	3.94	2.36E-02	
GOTERM_BP_ALL	GO:0048856~anatomical structure development	82	1.59E-05	1.568	2.75E-02	
GOTERM_BP_ALL	GO:0048513~organ development	62	1.80E-05	1.723	3.11E-02	
GOTERM_BP_ALL	GO:0048731~system development	77	1.81E-05	1.595	3.13E-02	
GOTERM_BP_ALL	GO:0006928~cell motion	26	1.81E-05	2.64	3.14E-02	
GOTERM_BP_ALL	GO:0050878~regulation of body fluid levels	13	3.24E-05	4.491	5.61E-02	
GOTERM_BP_ALL	GO:0001568~blood vessel development	17	5.09E-05	3.346	8.81E-02	
infraexpressed along the sequence NCF, CAF-PT, CAF-LM						
Category	Term	Count	PValue	Fold Enrichment	FDR	
GOTERM_BP_ALL	GO:0050727~regulation of inflammatory response	12	9.41E-07	7.021	1.64E-03	
GOTERM_BP_ALL	GO:0051270~regulation of cell motion	18	1.62E-06	4.147	2.83E-03	
GOTERM_BP_ALL	GO:0042127~regulation of cell proliferation	40	2.51E-06	2.263	4.38E-03	
GOTERM_BP_ALL	GO:0009611~response to wounding	30	7.01E-06	2.546	1.22E-02	
GOTERM_BP_ALL	GO:0002526~acute inflammatory response	12	9.74E-06	5.559	1.70E-02	
GOTERM_BP_ALL	GO:0045595~regulation of cell differentiation	28	1.60E-05	2.541	2.80E-02	
GOTERM_BP_ALL	GO:0045597~positive regulation of cell differentiation	18	1.62E-05	3.495	2.82E-02	
GOTERM_BP_ALL	GO:0030334~regulation of cell migration	15	2.72E-05	3.947	4.75E-02	
GOTERM_BP_ALL	GO:0040012~regulation of locomotion	16	2.82E-05	3.706	4.92E-02	
GOTERM_BP_ALL	GO:0009605~response to external stimulus	41	2.93E-05	2.012	5.10E-02	
GOTERM_BP_ALL	GO:0006950~response to stress	63	3.49E-05	1.682	6.10E-02	
GOTERM_BP_ALL	GO:0006954~inflammatory response	21	3.98E-05	2.900	6.94E-02	
GOTERM_BP_ALL	GO:0050793~regulation of developmental process	33	4.75E-05	2.184	8.29E-02	
GOTERM_BP_ALL	GO:0032101~regulation of response to external stimulus	14	5.65E-05	3.940	9.85E-02	

ANNEX 5: Llistat de 108 gens diferencialment expressats entre els NCF i els CAF-PT

SOBREEXPRESSATS EN CAF-PT					
Sonda	Simbol gen	fold change	p-valor	q-valor	Descripció del gen
7922343	TNFSF4	9,820	0,000	0,00E+00	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4
7934979	ANKRD1	5,599	0,001	4,77E-02	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)
8104570	FAM105A	4,979	0,000	1,75E-02	family with sequence similarity 105, member A
8102232	LEF1	4,910	0,000	1,11E-02	lymphoid enhancer-binding factor 1
7902441	ST6GALNAC5	3,811	0,000	0,00E+00	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 5
8104901	IL7R	3,561	0,000	1,11E-02	interleukin 7 receptor
8110932	SEMA5A	3,362	0,000	0,00E+00	semaphorin 5A
8104022	PDLIM3	3,229	0,000	1,75E-02	PDZ and LIM domain 3
8055314	LYPD1	3,031	0,000	2,37E-02	LY6/PLAUR domain containing 1
8092726	CLDN1	2,965	0,000	0,00E+00	claudin 1
8109938	RANBP17	2,947	0,000	1,11E-02	RAN binding protein 17
7931353	PTPRE	2,929	0,000	2,21E-02	protein tyrosine phosphatase, receptor type, E
7909789	TGFB2	2,928	0,000	0,00E+00	transforming growth factor, beta 2
8063536	TFAP2C	2,911	0,000	0,00E+00	transcription factor AP-2 gamma (activating enhancer binding protein 2 gamma)
8045336	GPR39	2,870	0,000	3,42E-02	G protein-coupled receptor 39
8121225	GRIK2	2,827	0,000	2,37E-02	glutamate receptor, ionotropic, kainate 2
7926679	KIAA1217	2,811	0,000	0,00E+00	KIAA1217
8015349	KRT19	2,734	0,000	3,42E-02	keratin 19
8060897	PLCB4	2,643	0,000	0,00E+00	phospholipase C, beta 4
7962212	PKP2	2,575	0,000	1,11E-02	plakophilin 2
7953284	NTF3	2,558	0,000	0,00E+00	neurotrophin 3
7936494	GFRA1	2,520	0,000	1,75E-02	GDNF family receptor alpha 1
8180266	ST6GALNAC5	2,507	0,000	1,11E-02	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 5
8122720	ULBP2	2,453	0,000	1,75E-02	UL16 binding protein 2
7945132	FLI1	2,442	0,000	0,00E+00	Friend leukemia virus integration 1
7930980	PPAPDC1A	2,389	0,000	3,42E-02	phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 1A
7982187	APBA2	2,383	0,000	1,11E-02	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 2

25

07972713	EFNB2	2,356	0,000	1,11E-02	<i>ephrin-B2</i>
7962579	AMIGO2	2,286	0,001	4,77E-02	<i>adhesion molecule with Ig-like domain 2</i>
8098441	ODZ3	2,284	0,001	3,65E-02	<i>odz, odd Oz/ten-m homolog 3 (Drosophila)</i>
7946641	GALNTL4	2,177	0,000	1,11E-02	<i>UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 4</i>
7932826	KIAA1462	2,130	0,000	3,42E-02	<i>KIAA1462</i>
7938485	MICAL2	2,122	0,000	1,75E-02	<i>microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2</i>
8144786	SLC7A2	2,121	0,000	1,75E-02	<i>solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2</i>
8112615	ENC1	2,117	0,000	2,21E-02	<i>ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)</i>
8104035	SORBS2	2,107	0,000	3,42E-02	<i>sorbin and SH3 domain containing 2</i>
8078286	RARB	2,061	0,000	1,11E-02	<i>retinoic acid receptor, beta</i>
7930208	INA	2,052	0,000	1,11E-02	<i>internexin neuronal intermediate filament protein, alpha</i>
7951807	CADM1	2,002	0,000	1,75E-02	<i>cell adhesion molecule 1</i>

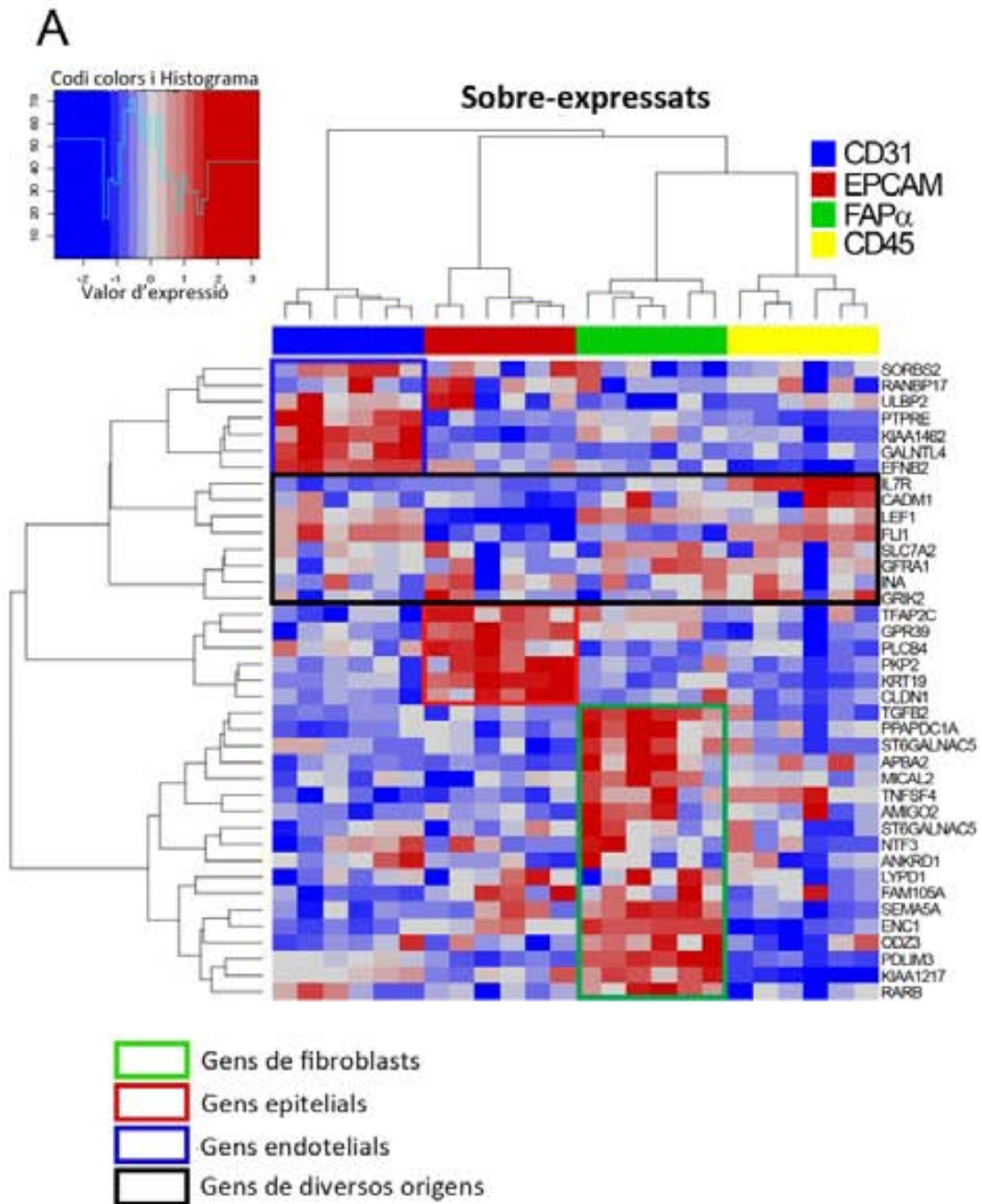
INFRAEXPRESSED IN CAF-PT

Sonda	Simbol gen	fold change	p-valor	q-valor	Descripció del gen
8101881	ADH1B	0,088	0,000	0,00E+00	<i>alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide</i>
8067140	CYP24A1	0,108	0,000	0,00E+00	<i>cytochrome P450, family 24, subfamily A, polypeptide 1</i>
8045776	GALNT13	0,141	0,000	0,00E+00	<i>UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13 (GalINAc-T13)</i>
8154295	IL33	0,179	0,000	0,00E+00	<i>interleukin 33</i>
8134030	STEAP1	0,207	0,000	0,00E+00	<i>six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1</i>
7961514	MGP	0,238	0,001	3,42E-02	<i>matrix Gla protein</i>
8111915	SEPP1	0,240	0,000	1,47E-02	<i>selenoprotein P, plasma, 1</i>
8135705	KCND2	0,250	0,000	0,00E+00	<i>potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2</i>
7935116	RBP4	0,250	0,000	0,00E+00	<i>retinol binding protein 4, plasma</i>
8121916	RSPO3	0,257	0,001	2,37E-02	<i>R-spondin 3 homolog (Xenopus laevis)</i>
7933194	CXCL12	0,265	0,000	0,00E+00	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)</i>
8007420	AOC3	0,271	0,000	0,00E+00	<i>amine oxidase, copper containing 3 (vascular adhesion protein 1)</i>
8101874	ADH1A	0,272	0,000	0,00E+00	<i>alcohol dehydrogenase 1A (class I), alpha polypeptide</i>
7988644	ATP8B4	0,279	0,000	0,00E+00	<i>ATPase, class I, type 8B, member 4</i>
7951077	SESN3	0,282	0,001	2,37E-02	<i>sestrin 3</i>

8091385	CP	0,297	0,000	1,75E-02	ceruloplasmin (ferroxidase)
7989501	CA12	0,308	0,000	0,00E+00	carbonic anhydrase XII
8023401	CCDC68	0,309	0,001	3,42E-02	coiled-coil domain containing 68
8134036	STEAP2	0,309	0,000	0,00E+00	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 2
8161892	GNA14	0,311	0,000	0,00E+00	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 14
7952526	CDON	0,328	0,000	0,00E+00	Cdon homolog (mouse)
7922976	PTGS2	0,329	0,000	0,00E+00	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
8131666	ITGB8	0,335	0,002	4,77E-02	integrin, beta 8
7913216	PLA2G2A	0,336	0,000	0,00E+00	phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)
8101893	ADH1C	0,336	0,000	0,00E+00	alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide
8126750	ENPP5	0,339	0,000	0,00E+00	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5 (putative function)
7937039	EBF3	0,339	0,000	1,47E-02	early B-cell factor 3
8105084	C7	0,341	0,000	0,00E+00	complement component 7
8006445	CCL11	0,342	0,000	1,75E-02	chemokine (C-C motif) ligand 11
7923578	FMOD	0,344	0,001	2,37E-02	fibromodulin
7978391	NOVA1	0,349	0,000	0,00E+00	neuro-oncological ventral antigen 1
7961540	RERG	0,357	0,000	0,00E+00	RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor
7974835	PRKCH	0,361	0,000	0,00E+00	protein kinase C, eta
8057677	SLC40A1	0,362	0,000	1,47E-02	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1
8100109	GABRA2	0,370	0,000	0,00E+00	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 2
8149825	STC1	0,373	0,000	1,75E-02	stanniocalcin 1
8003814	ASPA	0,376	0,000	0,00E+00	aspartoacylase (Canavan disease)
8139057	ELMO1	0,381	0,000	0,00E+00	engulfment and cell motility 1
8121794	SMPDL3A	0,384	0,000	0,00E+00	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A
7908351	PLA2G4A	0,390	0,000	0,00E+00	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)
8140650	SEMA3E	0,391	0,002	4,77E-02	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3E
8101762	SNCA	0,394	0,000	0,00E+00	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)
7968351	C13orf33	0,398	0,000	1,75E-02	chromosome 13 open reading frame 33
8006453	CCL8	0,407	0,001	3,42E-02	chemokine (C-C motif) ligand 8
7924987	AGT	0,410	0,000	0,00E+00	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)
8077899	PPARG	0,411	0,000	2,21E-02	peroxisome proliferator-activated receptor gamma

7931832	AKR1C2	0,422	0,000	2,21E-02	<i>aldo-keto reductase family 1, member C2</i>
8144213	VIPR2	0,426	0,001	2,37E-02	<i>vasoactive intestinal peptide receptor 2</i>
7922130	DPT	0,426	0,000	0,00E+00	<i>dermatopontin</i>
8092169	TNFSF10	0,431	0,000	1,75E-02	<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10</i>
8162216	SHC3	0,432	0,000	1,75E-02	<i>SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 3</i>
7925929	AKR1C3	0,433	0,001	2,37E-02	<i>aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II)</i>
8134051	C7orf63	0,433	0,000	0,00E+00	<i>chromosome 7 open reading frame 63</i>
8083599	C3orf55	0,438	0,000	1,75E-02	<i>chromosome 3 open reading frame 55</i>
7897877	TNFRSF1B	0,443	0,000	1,47E-02	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B</i>
8115691	SLIT3	0,446	0,000	1,75E-02	<i>slit homolog 3 (Drosophila)</i>
7904203	TSHB	0,452	0,001	2,37E-02	<i>thyroid stimulating hormone, beta</i>
8091078	RBP1	0,454	0,000	1,47E-02	<i>retinol binding protein 1, cellular</i>
7981142	CLMN	0,455	0,000	0,00E+00	<i>calmin (calponin-like, transmembrane)</i>
8176234	CLIC2	0,461	0,000	1,47E-02	<i>chloride intracellular channel 2</i>
8006440	CCL7	0,462	0,002	4,77E-02	<i>chemokine (C-C motif) ligand 7</i>
8027760	FXD1	0,464	0,000	1,47E-02	<i>FXD domain containing ion transport regulator 1</i>
7990333	CYP11A1	0,466	0,000	1,47E-02	<i>cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1</i>
8077323	CNTN4	0,470	0,000	1,47E-02	<i>contactin 4</i>
8150428	SFRP1	0,471	0,001	2,37E-02	<i>secreted frizzled-related protein 1</i>
8059878	IQCA1	0,475	0,001	2,37E-02	<i>IQ motif containing with AAA domain 1</i>
8045539	KYNU	0,479	0,001	2,21E-02	<i>kynureninase (L-kynurenine hydrolase)</i>
7909446	HSD11B1	0,485	0,001	3,65E-02	<i>hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1</i>
8021169	LIPG	0,490	0,000	1,47E-02	<i>lipase, endothelial</i>
8126839	TNFRSF21	0,492	0,001	3,42E-02	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21</i>

ANNEX 6: Heatmaps de l'expressió dels 108 gens en diferents poblacions cel·lulars



ANNEX 7: Article publicat corresponent a l'objectiu 1: ***Hepatic carcinoma-associated fibroblasts promote an adaptative response in colorectal cancer cells that inhibit proliferation and apoptosis: nonresistant cells die by nonapoptotic cell death.*** Neoplasia (New York, N.Y.). 2011;13(10):931-46. 2011;13(10):931-46.)

REFERÈNCIES

REFERÈNCIES

A

- Agesen, T. H., A. Sveen, et al. (2012). "ColoGuideEx: a robust gene classifier specific for stage II colorectal cancer prognosis." *Gut* **61**(11): 1560-7.
- Agui, T., D. J. McConkey, et al. (2002). "Comparative study of various biological parameters, including expression of survivin, between primary and metastatic human colonic adenocarcinomas." *Anticancer Res* **22**(3): 1769-76.
- Alizadeh, A. A., M. B. Eisen, et al. (2000). "Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling." *Nature* **403**(6769): 503-11.
- Alphonso, A. and S. K. Alahari (2009). "Stromal cells and integrins: conforming to the needs of the tumor microenvironment." *Neoplasia* **11**(12): 1264-71.
- Allinen, M., R. Beroukhi, et al. (2004). "Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer." *Cancer Cell* **6**(1): 17-32.
- Amado, R. G., M. Wolf, et al. (2008). "Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer." *J Clin Oncol* **26**(10): 1626-34.
- Anderberg, C. and K. Pietras (2009). "On the origin of cancer-associated fibroblasts." *Cell Cycle* **8**(10): 1461-2.
- Andersen, C. L., J. L. Jensen, et al. (2004). "Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets." *Cancer Res* **64**(15): 5245-50.
- Andre, T., C. Boni, et al. (2004). "Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer." *N Engl J Med* **350**(23): 2343-51.
- Apte, M. V., P. S. Haber, et al. (1999). "Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis." *Gut* **44**(4): 534-41.
- Arango, D., A. J. Wilson, et al. (2004). "Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells." *Br J Cancer* **91**(11): 1931-46.
- Armaghany, T., J. D. Wilson, et al. (2012). "Genetic alterations in colorectal cancer." *Gastrointest Cancer Res* **5**(1): 19-27.
- Azab, A. K., F. Azab, et al. (2009). "RhoA and Rac1 GTPases play major and differential roles in stromal cell-derived factor-1-induced cell adhesion and chemotaxis in multiple myeloma." *Blood* **114**(3): 619-29.

B

- Balkwill, F. and A. Mantovani (2001). "Inflammation and cancer: back to Virchow?" *Lancet* **357**(9255): 539-45.
- Balsamo, M., F. Scordamaglia, et al. (2009). "Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(49): 20847-52.
- Barcellos-Hoff, M. H. and S. A. Ravani (2000). "Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells." *Cancer Res* **60**(5): 1254-60.
- Barrier, A., A. Lemoine, et al. (2005). "Colon cancer prognosis prediction by gene expression profiling." *Oncogene* **24**(40): 6155-64.
- Barrier, A., F. Roser, et al. (2007). "Prognosis of stage II colon cancer by non-neoplastic mucosa gene expression profiling." *Oncogene* **26**(18): 2642-8.

- Barron, D. A. and D. R. Rowley (2012). "The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression." *Endocr Relat Cancer* **19**(6): R187-204.
- Basu, D., T. T. Nguyen, et al. (2010). "Evidence for mesenchymal-like sub-populations within squamous cell carcinomas possessing chemoresistance and phenotypic plasticity." *Oncogene* **29**(29): 4170-82.
- Bauer, M., G. Su, et al. (2010). "Heterogeneity of gene expression in stromal fibroblasts of human breast carcinomas and normal breast." *Oncogene* **29**(12): 1732-40.
- Baylin, S. B. and P. A. Jones (2011). "A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications." *Nat Rev Cancer* **11**(10): 726-34.
- Beck, A. H., I. Espinosa, et al. (2008). "The fibromatosis signature defines a robust stromal response in breast carcinoma." *Lab Invest* **88**(6): 591-601.
- Benson, A. B., 3rd, D. Schrag, et al. (2004). "American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer." *J Clin Oncol* **22**(16): 3408-19.
- Bernards, R. and R. A. Weinberg (2002). "A progression puzzle." *Nature* **418**(6900): 823.
- Bertucci, F., S. Salas, et al. (2004). "Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters." *Oncogene* **23**(7): 1377-91.
- Bhowmick, N. A., A. Chytil, et al. (2004). "TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia." *Science* **303**(5659): 848-51.
- Bhowmick, N. A. and H. L. Moses (2005). "Tumor-stroma interactions." *Curr Opin Genet Dev* **15**(1): 97-101.
- Bhowmick, N. A., E. G. Neilson, et al. (2004). "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression." *Nature* **432**(7015): 332-7.
- Bissell, M. J. and W. C. Hines (2011). "Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression." *Nat Med* **17**(3): 320-9.
- Bissell, M. J. and D. Radisky (2001). "Putting tumours in context." *Nat Rev Cancer* **1**(1): 46-54.
- Borrirukwanit, K., M. A. Lafleur, et al. (2007). "The type I collagen induction of MT1-MMP-mediated MMP-2 activation is repressed by alphaVbeta3 integrin in human breast cancer cells." *Matrix Biol* **26**(4): 291-305.
- Bos, P. D., X. H. Zhang, et al. (2009). "Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain." *Nature* **459**(7249): 1005-9.
- Boulesteix, A. L., C. Strobl, et al. (2008). "Evaluating microarray-based classifiers: an overview." *Cancer Inform* **6**: 77-97.
- Brazma, A., P. Hingamp, et al. (2001). "Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data." *Nat Genet* **29**(4): 365-71.
- Brennen, W. N., D. M. Rosen, et al. (2012). "Targeting carcinoma-associated fibroblasts within the tumor stroma with a fibroblast activation protein-activated prodrug." *J Natl Cancer Inst* **104**(17): 1320-34.
- Budinska, E., V. Popovici, et al. (2013). "Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer." *J Pathol* **231**(1): 63-76.
- Byzova, T. V., C. K. Goldman, et al. (2000). "A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins." *Mol Cell* **6**(4): 851-60.

C

- Calon, A., E. Espinet, et al. (2012). "Dependency of colorectal cancer on a TGF-beta-driven program in stromal cells for metastasis initiation." *Cancer Cell* **22**(5): 571-84.
- Callagy, G., E. Cattaneo, et al. (2003). "Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays." *Diagn Mol Pathol* **12**(1): 27-34.

- Campbell, I., K. Polyak, et al. (2009). "Clonal mutations in the cancer-associated fibroblasts: the case against genetic coevolution." *Cancer Res* **69**(17): 6765-8; discussion 6769.
- Campbell, I., W. Qiu, et al. (2011). "Genetic changes in tumour microenvironments." *J Pathol* **223**(4): 450-8.
- Cirri, P. and P. Chiarugi (2011). "Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin." *Am J Cancer Res* **1**(4): 482-97.
- Clark-Langone, K. M., C. Sangli, et al. (2010). "Translating tumor biology into personalized treatment planning: analytical performance characteristics of the Oncotype DX Colon Cancer Assay." *BMC Cancer* **10**: 691.
- Colombo, P. E., F. Milanezi, et al. (2011). "Microarrays in the 2010s: the contribution of microarray-based gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction." *Breast Cancer Res* **13**(3): 212.
- Conti, J. A., T. J. Kendall, et al. (2008). "The desmoplastic reaction surrounding hepatic colorectal adenocarcinoma metastases aids tumor growth and survival via alpha v integrin ligation." *Clin Cancer Res* **14**(20): 6405-13.
- Costea, D. E., A. Hills, et al. (2013). "Identification of two distinct carcinoma-associated fibroblast subtypes with differential tumor-promoting abilities in oral squamous cell carcinoma." *Cancer Res* **73**(13): 3888-901.
- Courrech Staal, E. F., M. W. Wouters, et al. (2010). "The stromal part of adenocarcinomas of the oesophagus: does it conceal targets for therapy?" *Eur J Cancer* **46**(4): 720-8.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." *Nature* **420**(6917): 860-7.
- Coward, J., H. Kulbe, et al. (2011). "Interleukin-6 as a therapeutic target in human ovarian cancer." *Clin Cancer Res* **17**(18): 6083-96.
- Cox, D., M. Brennan, et al. (2010). "Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities." *Nat Rev Drug Discov* **9**(10): 804-20.
- Cukierman, E. and D. E. Bassi (2012). "The mesenchymal tumor microenvironment: a drug-resistant niche." *Cell Adh Migr* **6**(3): 285-96.
- Cunningham, D., W. Atkin, et al. (2010). "Colorectal cancer." *Lancet* **375**(9719): 1030-47.
- Curtis, C., S. P. Shah, et al. (2012). "The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups." *Nature* **486**(7403): 346-52.
- Chang, H. Y., J. T. Chi, et al. (2002). "Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20): 12877-82.
- Chang, H. Y., J. B. Sneddon, et al. (2004). "Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds." *PLoS Biol* **2**(2): E7.
- Chang, Y. T., C. C. Wu, et al. (2011). "Secretome-based identification of ULBP2 as a novel serum marker for pancreatic cancer detection." *PLoS One* **6**(5): e20029.
- Chen, D. T., Y. L. Hsu, et al. (2011). "Prognostic and predictive value of a malignancy-risk gene signature in early-stage non-small cell lung cancer." *J Natl Cancer Inst* **103**(24): 1859-70.
- Cheng, Y. Y., H. Jin, et al. (2008). "Fibulin 1 is downregulated through promoter hypermethylation in gastric cancer." *Br J Cancer* **99**(12): 2083-7.
- Cho, H. J., K. E. Baek, et al. (2012). "Proteomics-based strategy to delineate the molecular mechanisms of RhoGDI2-induced metastasis and drug resistance in gastric cancer." *J Proteome Res* **11**(4): 2355-64.
- Cho, J. Y., J. Y. Lim, et al. (2011). "Gene expression signature-based prognostic risk score in gastric cancer." *Clin Cancer Res* **17**(7): 1850-7.

D

- D'Arrigo, A., C. Belluco, et al. (2005). "Metastatic transcriptional pattern revealed by gene expression profiling in primary colorectal carcinoma." *Int J Cancer* **115**(2): 256-62.
- Dannenberg, L. O., H. J. Chen, et al. (2006). "Differential regulation of the alcohol dehydrogenase 1B (ADH1B) and ADH1C genes by DNA methylation and histone deacetylation." *Alcohol Clin Exp Res* **30**(6): 928-37.
- de Bruin, E. C., S. van de Pas, et al. (2005). "Macrodissection versus microdissection of rectal carcinoma: minor influence of stroma cells to tumor cell gene expression profiles." *BMC Genomics* **6**: 142.
- de Kruijf, E. M., J. G. van Nes, et al. (2010). "Tumor-stroma ratio in the primary tumor is a prognostic factor in early breast cancer patients, especially in triple-negative carcinoma patients." *Breast Cancer Res Treat* **125**(3): 687-96.
- De Sousa, E. M. F., L. Vermeulen, et al. (2013). "Cancer heterogeneity--a multifaceted view." *EMBO Rep* **14**(8): 686-95.
- De Sousa, E. M. F., X. Wang, et al. (2013). "Poor-prognosis colon cancer is defined by a molecularly distinct subtype and develops from serrated precursor lesions." *Nat Med* **19**(5): 614-8.
- De Wever, O., P. Demetter, et al. (2008). "Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth." *Int J Cancer* **123**(10): 2229-38.
- De Wever, O. and M. Mareel (2003). "Role of tissue stroma in cancer cell invasion." *J Pathol* **200**(4): 429-47.
- De Wever, O., Q. D. Nguyen, et al. (2004). "Tenascin-C and SF/HGF produced by myofibroblasts in vitro provide convergent pro-invasive signals to human colon cancer cells through RhoA and Rac." *FASEB J* **18**(9): 1016-8.
- Decoster, L., I. Wauters, et al. (2011). "Vaccination therapy for non-small-cell lung cancer: review of agents in phase III development." *Ann Oncol* **23**(6): 1387-93.
- Dekker, T. J., C. J. van de Velde, et al. (2013). "Prognostic significance of the tumor-stroma ratio: validation study in node-negative premenopausal breast cancer patients from the EORTC perioperative chemotherapy (POP) trial (10854)." *Breast Cancer Res Treat* **139**(2): 371-9.
- Del Rio, M., F. Molina, et al. (2007). "Gene expression signature in advanced colorectal cancer patients select drugs and response for the use of leucovorin, fluorouracil, and irinotecan." *J Clin Oncol* **25**(7): 773-80.
- Del Rio, M., C. Mollevi, et al. (2013). "Specific extracellular matrix remodeling signature of colon hepatic metastases." *PLoS One* **8**(9): e74599.
- Denk, P. O., J. Hoppe, et al. (2003). "Effect of growth factors on the activation of human Tenon's capsule fibroblasts." *Curr Eye Res* **27**(1): 35-44.
- Desmouliere, A., C. Guyot, et al. (2004). "The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior." *Int J Dev Biol* **48**(5-6): 509-17.
- Diaz-Cano, S. J. (2012). "Tumor heterogeneity: mechanisms and bases for a reliable application of molecular marker design." *Int J Mol Sci* **13**(2): 1951-2011.
- Direkze, N. C., K. Hodivala-Dilke, et al. (2004). "Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts." *Cancer Res* **64**(23): 8492-5.
- Dobbin, K. K., Y. Zhao, et al. (2008). "How large a training set is needed to develop a classifier for microarray data?" *Clin Cancer Res* **14**(1): 108-14.
- Draghici, S., P. Khatri, et al. (2003). "Global functional profiling of gene expression." *Genomics* **81**(2): 98-104.
- Dressman, H. K., C. Hans, et al. (2006). "Gene expression profiles of multiple breast cancer phenotypes and response to neoadjuvant chemotherapy." *Clin Cancer Res* **12**(3 Pt 1): 819-26.

- Dunning, M. J., C. Curtis, et al. (2010). "The importance of platform annotation in interpreting microarray data." *Lancet Oncol* **11**(8): 717.
- Dvorak, H. F. (1986). "Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing." *N Engl J Med* **315**(26): 1650-9.

E

- Egeblad, M., E. S. Nakasone, et al. (2010). "Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism." *Dev Cell* **18**(6): 884-901.
- Elenbaas, B. and R. A. Weinberg (2001). "Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation." *Exp Cell Res* **264**(1): 169-84.

F

- Falcon, B. L., K. Pietras, et al. (2011). "Increased vascular delivery and efficacy of chemotherapy after inhibition of platelet-derived growth factor-B." *Am J Pathol* **178**(6): 2920-30.
- Farmer, P., H. Bonnefoi, et al. (2009). "A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer." *Nat Med* **15**(1): 68-74.
- Farrand, K., L. Jovanovic, et al. (2002). "Loss of heterozygosity studies revisited: prior quantification of the amplifiable DNA content of archival samples improves efficiency and reliability." *J Mol Diagn* **4**(3): 150-8.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell* **61**(5): 759-67.
- Fiaschi, T., E. Giannoni, et al. (2013). "Carbonic anhydrase IX from cancer-associated fibroblasts drives epithelial-mesenchymal transition in prostate carcinoma cells." *Cell Cycle* **12**(11): 1791-801.
- Fidler, I. J. (2003). "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited." *Nat Rev Cancer* **3**(6): 453-8.
- Finak, G., N. Bertos, et al. (2008). "Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer." *Nat Med* **14**(5): 518-27.
- Finak, G., S. Sadekova, et al. (2006). "Gene expression signatures of morphologically normal breast tissue identify basal-like tumors." *Breast Cancer Res* **8**(5): R58.
- Fleming, M., S. Ravula, et al. (2012). "Colorectal carcinoma: Pathologic aspects." *J Gastrointest Oncol* **3**(3): 153-73.
- Ford, C. E., E. Jary, et al. (2013). "The Wnt gatekeeper SFRP4 modulates EMT, cell migration and downstream Wnt signalling in serous ovarian cancer cells." *PLoS One* **8**(1): e54362.
- Fujita, A., A. Shida, et al. (2011). "Clinical significance of Rho GDP dissociation inhibitor 2 in colorectal carcinoma." *Int J Clin Oncol* **17**(2): 137-42.

G

- Ganepola, G. A., R. M. Mazziotta, et al. (2009). "Gene expression profiling of primary and metastatic colon cancers identifies a reduced proliferative rate in metastatic tumors." *Clin Exp Metastasis* **27**(1): 1-9.
- Gao, Q., X. Y. Wang, et al. (2011). "Tumor stroma reaction-related gene signature predicts clinical outcome in human hepatocellular carcinoma." *Cancer Sci* **102**(8): 1522-31.
- Golub, T. R., D. K. Slonim, et al. (1999). "Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring." *Science* **286**(5439): 531-7.
- Gonda, T. A., A. Varro, et al. (2009). "Molecular biology of cancer-associated fibroblasts: can these cells be targeted in anti-cancer therapy?" *Semin Cell Dev Biol* **21**(1): 2-10.
- Goss, P. E. and A. F. Chambers (2010). "Does tumour dormancy offer a therapeutic target?" *Nat Rev Cancer* **10**(12): 871-7.

- Grady, W. M. and J. M. Carethers (2008). "Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis." *Gastroenterology* **135**(4): 1079-99.
- Gray, R., J. Barnwell, et al. (2007). "Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study." *Lancet* **370**(9604): 2020-9.
- Grum-Schwensen, B., J. Klingelhofer, et al. (2005). "Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4(mts1) gene." *Cancer Res* **65**(9): 3772-80.
- Guastadisegni, C., M. Colafranceschi, et al. (2010). "Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data." *Eur J Cancer* **46**(15): 2788-98.
- Gutierrez-Fernandez, A., A. Fueyo, et al. (2008). "Matrix metalloproteinase-8 functions as a metastasis suppressor through modulation of tumor cell adhesion and invasion." *Cancer Res* **68**(8): 2755-63.

H

- Hamada, S., A. Masamune, et al. (2013). "Novel therapeutic strategies targeting tumor-stromal interactions in pancreatic cancer." *Front Physiol* **4**: 331.
- Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: WHO Classification of tumours of the digestive system. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, eds. Lyon: IARC Press, 2010: 134-46.
- Hanahan, D. and L. M. Coussens (2012). "Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment." *Cancer Cell* **21**(3): 309-22.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-74.
- Hawsawi, N. M., H. Ghebeh, et al. (2008). "Breast carcinoma-associated fibroblasts and their counterparts display neoplastic-specific changes." *Cancer Res* **68**(8): 2717-25.
- Hazan, R. B., G. R. Phillips, et al. (2000). "Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis." *J Cell Biol* **148**(4): 779-90.
- Hazlehurst, L. A., R. F. Argilagos, et al. (2007). "Beta1 integrin mediated adhesion increases Bim protein degradation and contributes to drug resistance in leukaemia cells." *Br J Haematol* **136**(2): 269-75.
- Hazlehurst, L. A., T. H. Landowski, et al. (2003). "Role of the tumor microenvironment in mediating de novo resistance to drugs and physiological mediators of cell death." *Oncogene* **22**(47): 7396-402.
- Hegde, P., R. Qi, et al. (2001). "Identification of tumor markers in models of human colorectal cancer using a 19,200-element complementary DNA microarray." *Cancer Res* **61**(21): 7792-7.
- Henderson, J. R., P. Pomies, et al. (2003). "ALP and MLP distribution during myofibrillogenesis in cultured cardiomyocytes." *Cell Motil Cytoskeleton* **54**(3): 254-65.
- Herrera, M., A. B. Islam, et al. (2013). "Functional Heterogeneity of Cancer-Associated Fibroblasts from Human Colon Tumors Shows Specific Prognostic Gene Expression Signature." *Clin Cancer Res*.
- Hibi, K., H. Mizukami, et al. (2012). "FBN2 methylation is detected in the serum of colorectal cancer patients with hepatic metastasis." *Anticancer Res* **32**(10): 4371-4.
- Hill, R., Y. Song, et al. (2005). "Selective evolution of stromal mesenchyme with p53 loss in response to epithelial tumorigenesis." *Cell* **123**(6): 1001-11.
- Hofmeister, V., D. Schrama, et al. (2008). "Anti-cancer therapies targeting the tumor stroma." *Cancer Immunol Immunother* **57**(1): 1-17.

- Hosein, A. N., M. Wu, et al. (2010). "Breast carcinoma-associated fibroblasts rarely contain p53 mutations or chromosomal aberrations." *Cancer Res* **70**(14): 5770-7.
- Hu, C., Z. Wang, et al. (2013). "Effects of cancer-associated fibroblasts on the migration and invasion abilities of SGC-7901 gastric cancer cells." *Oncol Lett* **5**(2): 609-612.
- Hu, M., J. Yao, et al. (2005). "Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers." *Nat Genet* **37**(8): 899-905.
- Huang, A. C., S. C. Hsu, et al. (2009). "Involvement of matrix metalloproteinases in the inhibition of cell invasion and migration through the inhibition of NF- κ B by the new synthesized ethyl 2-[N-p-chlorobenzyl-(2'-methyl)]anilino-4-oxo-4,5-dihydrofuran-3-carboxylate (JOTO1007) in human cervical cancer Ca ski cells." *In Vivo* **23**(4): 613-9.
- Huang, Y. W., R. A. Jansen, et al. (2009). "Identification of candidate epigenetic biomarkers for ovarian cancer detection." *Oncol Rep* **22**(4): 853-61.
- Huijbers, A., R. A. Tollenaar, et al. (2012). "The proportion of tumor-stroma as a strong prognosticator for stage II and III colon cancer patients: validation in the VICTOR trial." *Ann Oncol* **24**(1): 179-85.
- Hurwitz, H., L. Fehrenbacher, et al. (2004). "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer." *N Engl J Med* **350**(23): 2335-42.
- Hwang, R. F., T. Moore, et al. (2008). "Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression." *Cancer Res* **68**(3): 918-26.

I

- Iacopetta, B., F. Grieco, et al. (2010). "Microsatellite instability in colorectal cancer." *Asia Pac J Clin Oncol* **6**(4): 260-9.
- Ingber, D. E. (2002). "Cancer as a disease of epithelial-mesenchymal interactions and extracellular matrix regulation." *Differentiation* **70**(9-10): 547-60.
- Ingber, D. E. (2008). "Tensegrity and mechanotransduction." *J Bodyw Mov Ther* **12**(3): 198-200.
- Irizarry, R. A., B. M. Bolstad, et al. (2003). "Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data." *Nucleic Acids Res* **31**(4): e15.
- Ismaili, N. (2011). "Treatment of colorectal liver metastases." *World J Surg Oncol* **9**: 154.
- Issa, J. P. (2004). "CpG island methylator phenotype in cancer." *Nat Rev Cancer* **4**(12): 988-93.
- Iyer, V. R., M. B. Eisen, et al. (1999). "The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum." *Science* **283**(5398): 83-7.

J

- Jain, R. K. (2003). "Molecular regulation of vessel maturation." *Nat Med* **9**(6): 685-93.
- Jia, C. C., T. T. Wang, et al. (2013). "Cancer-associated fibroblasts from hepatocellular carcinoma promote malignant cell proliferation by HGF secretion." *PLoS One* **8**(5): e63243.
- Jia, Z., F. B. Rahmatpanah, et al. (2012). "Expression changes in the stroma of prostate cancer predict subsequent relapse." *PLoS One* **7**(8): e41371.
- Jochumsen, K. M., Q. Tan, et al. (2009). "Gene expression profiles as prognostic markers in women with ovarian cancer." *Int J Gynecol Cancer* **19**(7): 1205-13.
- Jorissen, R. N., P. Gibbs, et al. (2009). "Metastasis-Associated Gene Expression Changes Predict Poor Outcomes in Patients with Dukes Stage B and C Colorectal Cancer." *Clin Cancer Res* **15**(24): 7642-7651.
- Joyce, J. A., A. Baruch, et al. (2004). "Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis." *Cancer Cell* **5**(5): 443-53.
- Joyce, J. A. and J. W. Pollard (2009). "Microenvironmental regulation of metastasis." *Nat Rev Cancer* **9**(4): 239-52.

K

- Kalluri, R. and M. Zeisberg (2006). "Fibroblasts in cancer." *Nat Rev Cancer* **6**(5): 392-401.
- Kaminski, A., J. C. Hahne, et al. (2006). "Tumour-stroma interactions between metastatic prostate cancer cells and fibroblasts." *Int J Mol Med* **18**(5): 941-50.
- Karapetis, C. S., S. Khambata-Ford, et al. (2008). "K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer." *N Engl J Med* **359**(17): 1757-65.
- Katkoori, V. R., C. Shanmugam, et al. (2012). "Prognostic significance and gene expression profiles of p53 mutations in microsatellite-stable stage III colorectal adenocarcinomas." *PLoS One* **7**(1): e30020.
- Kheirelseid, E. A., N. Miller, et al. (2013). "Clinical applications of gene expression in colorectal cancer." *J Gastrointest Oncol* **4**(2): 144-57.
- Ki, D. H., H. C. Jeung, et al. (2007). "Whole genome analysis for liver metastasis gene signatures in colorectal cancer." *Int J Cancer* **121**(9): 2005-12.
- Kidd, S., E. Spaeth, et al. (2012). "Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma." *PLoS One* **7**(2): e30563.
- Kim, S. M., S. H. Leem, et al. (2011). "Sixty-five gene-based risk score classifier predicts overall survival in hepatocellular carcinoma." *Hepatology* **55**(5): 1443-52.
- Kim, T. O., J. Park, et al. (2013). "DNA hypermethylation of a selective gene panel as a risk marker for colon cancer in patients with ulcerative colitis." *Int J Mol Med* **31**(5): 1255-61.
- Kim, Y. H., H. C. Lee, et al. (2011). "Epigenomic analysis of aberrantly methylated genes in colorectal cancer identifies genes commonly affected by epigenetic alterations." *Ann Surg Oncol* **18**(8): 2338-47.
- Klopp, A. H., A. Gupta, et al. (2011). "Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth?" *Stem Cells* **29**(1): 11-9.
- Kojima, Y., A. Acar, et al. (2010). "Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(46): 20009-14.
- Krtolica, A., S. Parrinello, et al. (2001). "Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(21): 12072-7.
- Kumar, S. and V. M. Weaver (2009). "Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell." *Cancer Metastasis Rev* **28**(1-2): 113-27.
- Kurose, K., K. Gilley, et al. (2002). "Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas." *Nat Genet* **32**(3): 355-7.

L

- Lascorz, J., B. Chen, et al. (2011). "Consensus pathways implicated in prognosis of colorectal cancer identified through systematic enrichment analysis of gene expression profiling studies." *PLoS One* **6**(4): e18867.
- Laurent-Puig, P., A. Cayre, et al. (2009). "Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer." *J Clin Oncol* **27**(35): 5924-30.
- Lebret, S. C., D. F. Newgreen, et al. (2007). "Induction of epithelial to mesenchymal transition in PMC42-LA human breast carcinoma cells by carcinoma-associated fibroblast secreted factors." *Breast Cancer Res* **9**(1): R19.
- Lee, H. O., S. R. Mullins, et al. (2011). "FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells." *BMC Cancer* **11**: 245.

- Levental, K. R., H. Yu, et al. (2009). "Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling." *Cell* **139**(5): 891-906.
- Levina, V., B. M. Nolen, et al. (2009). "Role of eotaxin-1 signaling in ovarian cancer." *Clin Cancer Res* **15**(8): 2647-56.
- Li, J. Q., H. Miki, et al. (2001). "Expression of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 correlates with metastasis and prognosis in colorectal carcinoma." *Hum Pathol* **32**(9): 945-53.
- Li, X., J. Wang, et al. (2011). "Overexpression of RhoGDI2 correlates with tumor progression and poor prognosis in colorectal carcinoma." *Ann Surg Oncol* **19**(1): 145-53.
- Lim, K. P., N. Cirillo, et al. (2011). "Fibroblast gene expression profile reflects the stage of tumour progression in oral squamous cell carcinoma." *J Pathol* **223**(4): 459-69.
- Lin, J., C. Liu, et al. (2011). "Carcinoma-associated fibroblasts promotes the proliferation of a lingual carcinoma cell line by secreting keratinocyte growth factor." *Tumour Biol* **32**(3): 597-602.
- Lipshutz, R. J., D. Morris, et al. (1995). "Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity." *Biotechniques* **19**(3): 442-7.
- Liu, E. T. (2004). "Expression genomics and cancer biology." *Pharmacogenomics* **5**(8): 1117-28.
- Liu, X., M. Nugoli, et al. (2010). "Stromal retinoic acid receptor beta promotes mammary gland tumorigenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(2): 774-9.
- Loboda, A., M. V. Nebozhyn, et al. (2011). "EMT is the dominant program in human colon cancer." *BMC Med Genomics* **4**: 9.
- Lochter, A., S. Galosy, et al. (1997). "Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant phenotype in mammary epithelial cells." *J Cell Biol* **139**(7): 1861-72.
- Loeffler, M., J. A. Kruger, et al. (2006). "Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake." *J Clin Invest* **116**(7): 1955-62.
- Louie, E., X. F. Chen, et al. (2012). "Neurotrophin-3 modulates breast cancer cells and the microenvironment to promote the growth of breast cancer brain metastasis." *Oncogene* **32**(35): 4064-77.
- Lu, A. T., S. R. Salpeter, et al. (2009). "Gene expression profiles as predictors of poor outcomes in stage II colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis." *Clin Colorectal Cancer* **8**(4): 207-14.
- Lu, P., V. M. Weaver, et al. (2012). "The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression." *J Cell Biol* **196**(4): 395-406.
- Lunevicius, R., H. Nakanishi, et al. (2001). "Clinicopathological significance of fibrotic capsule formation around liver metastasis from colorectal cancer." *J Cancer Res Clin Oncol* **127**(3): 193-9.
- Lwin, T., L. A. Hazlehurst, et al. (2007). "Cell adhesion induces p27Kip1-associated cell-cycle arrest through down-regulation of the SCFSkp2 ubiquitin ligase pathway in mantle-cell and other non-Hodgkin B-cell lymphomas." *Blood* **110**(5): 1631-8.

M

- Maeshima, A. M., T. Niki, et al. (2002). "Modified scar grade: a prognostic indicator in small peripheral lung adenocarcinoma." *Cancer* **95**(12): 2546-54.
- Maffini, M. V., J. M. Calabro, et al. (2005). "Stromal regulation of neoplastic development: age-dependent normalization of neoplastic mammary cells by mammary stroma." *Am J Pathol* **167**(5): 1405-10.
- Mansour, S. J., W. T. Matten, et al. (1994). "Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase." *Science* **265**(5174): 966-70.

- Marastoni, S., G. Ligresti, et al. (2008). "Extracellular matrix: a matter of life and death." Connect Tissue Res **49**(3): 203-6.
- Marisa, L., A. de Reynies, et al. (2013). "Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value." PLoS Med **10**(5): e1001453.
- Markowitz, S. D. and M. M. Bertagnolli (2009). "Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer." N Engl J Med **361**(25): 2449-60.
- Martin-Manso, G., S. Galli, et al. (2008). "Thrombospondin 1 promotes tumor macrophage recruitment and enhances tumor cell cytotoxicity of differentiated U937 cells." Cancer Res **68**(17): 7090-9.
- Marusyk, A. and K. Polyak (2010). "Tumor heterogeneity: causes and consequences." Biochim Biophys Acta **1805**(1): 105-17.
- Matsumoto, Y., K. Hayashi, et al. (1999). "Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells." Curr Biol **9**(8): 429-32.
- McDaniel, S. M., K. K. Rumer, et al. (2006). "Remodeling of the mammary microenvironment after lactation promotes breast tumor cell metastasis." Am J Pathol **168**(2): 608-20.
- Meads, M. B., R. A. Gatenby, et al. (2009). "Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease." Nat Rev Cancer **9**(9): 665-74.
- Mefford, D. and J. Mefford (2012). "Stromal genes add prognostic information to proliferation and histoclinical markers: a basis for the next generation of breast cancer gene signatures." PLoS One **7**(6): e37646.
- Meira, L. B., J. M. Bugni, et al. (2008). "DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice." J Clin Invest **118**(7): 2516-25.
- Mejia, A., S. Schulz, et al. (2012). "Molecular staging individualizing cancer management." J Surg Oncol **105**(5): 468-74.
- Merika, E. E., K. N. Syrigos, et al. (2012). "Desmoplasia in pancreatic cancer. Can we fight it?" Gastroenterol Res Pract **2012**: 781765.
- Mesker, W. E., G. J. Liefers, et al. (2009). "Presence of a high amount of stroma and downregulation of SMAD4 predict for worse survival for stage I-II colon cancer patients." Cell Oncol **31**(3): 169-78.
- Miranti, C. K. and J. S. Brugge (2002). "Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction." Nat Cell Biol **4**(4): E83-90.
- Mishra, P. J., R. Humeniuk, et al. (2008). "Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells." Cancer Res **68**(11): 4331-9.
- Mithani, S. K., I. M. Smith, et al. (2011). "Use of integrative epigenetic and cytogenetic analyses to identify novel tumor-suppressor genes in malignant melanoma." Melanoma Res **21**(4): 298-307.
- Moinfar, F., Y. G. Man, et al. (2000). "Concurrent and independent genetic alterations in the stromal and epithelial cells of mammary carcinoma: implications for tumorigenesis." Cancer Res **60**(9): 2562-6.
- Moravcikova, E., E. Krepla, et al. (2012). "Down-regulated expression of apoptosis-associated genes AP1 and UACA in non-small cell lung carcinoma." Int J Oncol **40**(6): 2111-21.
- Morin, P. J. (2003). "Drug resistance and the microenvironment: nature and nurture." Drug Resist Updat **6**(4): 169-72.
- Mueller, M. M. and N. E. Fusenig (2004). "Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer." Nat Rev Cancer **4**(11): 839-49.
- Muralidharan-Chari, V., H. Hoover, et al. (2009). "ADP-ribosylation factor 6 regulates tumorigenic and invasive properties in vivo." Cancer Res **69**(6): 2201-9.

Murphy, L. O. and J. Blenis (2006). "MAPK signal specificity: the right place at the right time." Trends Biochem Sci **31**(5): 268-75.

N

- Nadal, C., J. Maurel, et al. (2007). "Is there a genetic signature for liver metastasis in colorectal cancer?" World J Gastroenterol **13**(44): 5832-44.
- Nakagawa, H., S. Liyanarachchi, et al. (2004). "Role of cancer-associated stromal fibroblasts in metastatic colon cancer to the liver and their expression profiles." Oncogene **23**(44): 7366-77.
- Nannini, M., M. A. Pantaleo, et al. (2009). "Gene expression profiling in colorectal cancer using microarray technologies: results and perspectives." Cancer Treat Rev **35**(3): 201-9.
- Navab, R., D. Strumpf, et al. (2011). "Prognostic gene-expression signature of carcinoma-associated fibroblasts in non-small cell lung cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(17): 7160-5.
- Nemunaitis, J. J. (2009). "Gene immunotherapy for non-small cell lung cancer." Methods Mol Biol **542**: 499-514.
- Ng, K. and A. X. Zhu (2008). "Targeting the epidermal growth factor receptor in metastatic colorectal cancer." Crit Rev Oncol Hematol **65**(1): 8-20.
- Nguyen, D. X., P. D. Bos, et al. (2009). "Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization." Nat Rev Cancer **9**(4): 274-84.
- Niese, K. A., M. G. Chiaramonte, et al. (2010). "The cationic amino acid transporter 2 is induced in inflammatory lung models and regulates lung fibrosis." Respir Res **11**: 87.
- Noguera, R., O. A. Nieto, et al. (2012). "Extracellular matrix, biotensegrity and tumor microenvironment. An update and overview." Histol Histopathol **27**(6): 693-705.

O

- O'Connell, J. B., M. A. Maggard, et al. (2004). "Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging." J Natl Cancer Inst **96**(19): 1420-5.
- O'Connell, M. J., I. Lavery, et al. (2010). "Relationship between tumor gene expression and recurrence in four independent studies of patients with stage II/III colon cancer treated with surgery alone or surgery plus adjuvant fluorouracil plus leucovorin." J Clin Oncol **28**(25): 3937-44.
- Oh, S. C., Y. Y. Park, et al. (2012). "Prognostic gene expression signature associated with two molecularly distinct subtypes of colorectal cancer." Gut **61**(9): 1291-8.
- Ohuchida, K., K. Mizumoto, et al. (2004). "Radiation to stromal fibroblasts increases invasiveness of pancreatic cancer cells through tumor-stromal interactions." Cancer Res **64**(9): 3215-22.
- Okamoto, I. (2009). "Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR-targeted anticancer therapy." FEBS J **277**(2): 309-15.
- Olaso, E., C. Salado, et al. (2003). "Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis." Hepatology **37**(3): 674-85.
- Olive, K. P., M. A. Jacobetz, et al. (2009). "Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer." Science **324**(5933): 1457-61.
- Olumi, A. F., G. D. Grossfeld, et al. (1999). "Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium." Cancer Res **59**(19): 5002-11.
- Orimo, A., P. B. Gupta, et al. (2005). "Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion." Cell **121**(3): 335-48.
- Orimo, A. and R. A. Weinberg (2006). "Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type." Cell Cycle **5**(15): 1597-601.

Ostman, A. and M. Augsten (2009). "Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players." *Curr Opin Genet Dev* **19**(1): 67-73.

P

- Paik, S., S. Shak, et al. (2004). "A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer." *N Engl J Med* **351**(27): 2817-26.
- Paraiso, K. H. and K. S. Smalley (2013). "Fibroblast-mediated drug resistance in cancer." *Biochem Pharmacol* **85**(8): 1033-41.
- Patocs, A., L. Zhang, et al. (2007). "Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations and nodal metastases." *N Engl J Med* **357**(25): 2543-51.
- Pavlidis, S., I. Vera, et al. (2011). "Warburg meets autophagy: cancer-associated fibroblasts accelerate tumor growth and metastasis via oxidative stress, mitophagy, and aerobic glycolysis." *Antioxid Redox Signal* **16**(11): 1264-84.
- Peeters, M., K. S. Oliner, et al. (2013). "Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer." *Clin Cancer Res* **19**(7): 1902-12.
- Pena, C., M. V. Cespedes, et al. (2012). "STC1 expression by cancer-associated fibroblasts drives metastasis of colorectal cancer." *Cancer Res* **73**(4): 1287-97.
- Peng, Q., L. Zhao, et al. (2013). "Biological characteristics and genetic heterogeneity between carcinoma-associated fibroblasts and their paired normal fibroblasts in human breast cancer." *PLoS One* **8**(4): e60321.
- Perea, J., M. Lomas, et al. (2011). "Molecular basis of colorectal cancer: towards an individualized management?" *Rev Esp Enferm Dig* **103**(1): 29-35.
- Perez-Villamil, B., A. Romera-Lopez, et al. (2012). "Colon cancer molecular subtypes identified by expression profiling and associated to stroma, mucinous type and different clinical behavior." *BMC Cancer* **12**: 260.
- Perou, C. M., T. Sorlie, et al. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." *Nature* **406**(6797): 747-52.
- Petersen, O. W., H. L. Nielsen, et al. (2003). "Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a nonmalignant stroma." *Am J Pathol* **162**(2): 391-402.
- Pfaffl, M. W., A. Tichopad, et al. (2004). "Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations." *Biotechnol Lett* **26**(6): 509-15.
- Phelps, R. A., T. J. Broadbent, et al. (2009). "New perspectives on APC control of cell fate and proliferation in colorectal cancer." *Cell Cycle* **8**(16): 2549-56.
- Pietras, K. and A. Ostman (2010). "Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma." *Exp Cell Res* **316**(8): 1324-31.
- Pietras, K., A. Ostman, et al. (2001). "Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumors." *Cancer Res* **61**(7): 2929-34.
- Pietras, K., J. Pahler, et al. (2008). "Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting." *PLoS Med* **5**(1): e19.
- Psaila, B. and D. Lyden (2009). "The metastatic niche: adapting the foreign soil." *Nat Rev Cancer* **9**(4): 285-93.
- Pupa, S. M., S. Menard, et al. (2002). "New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression." *J Cell Physiol* **192**(3): 259-67.
- Puxeddu, I., R. Bader, et al. (2006). "The CC chemokine eotaxin/CCL11 has a selective profibrogenic effect on human lung fibroblasts." *J Allergy Clin Immunol* **117**(1): 103-10.

Pyke, C., P. Kristensen, et al. (1991). "Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas." *Am J Pathol* **138**(5): 1059-67.

Q

Qiao, L., Z. Xu, et al. (2008). "Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model." *Cell Res* **18**(4): 500-7.

Qiu, W., M. Hu, et al. (2008). "No evidence of clonal somatic genetic alterations in cancer-associated fibroblasts from human breast and ovarian carcinomas." *Nat Genet* **40**(5): 650-5.

Quackenbush, J. (2006). "Microarray analysis and tumor classification." *N Engl J Med* **354**(23): 2463-72.

Quante, M., S. P. Tu, et al. (2011). "Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth." *Cancer Cell* **19**(2): 257-72.

R

Rabenau, K. E., J. M. O'Toole, et al. (2004). "DEGA/AMIGO-2, a leucine-rich repeat family member, differentially expressed in human gastric adenocarcinoma: effects on ploidy, chromosomal stability, cell adhesion/migration and tumorigenicity." *Oncogene* **23**(29): 5056-67.

Ramasamy, R., E. W. Lam, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth." *Leukemia* **21**(2): 304-10.

Ramaswamy, S. (2004). "Translating cancer genomics into clinical oncology." *N Engl J Med* **350**(18): 1814-6.

Ramaswamy, S., K. N. Ross, et al. (2003). "A molecular signature of metastasis in primary solid tumors." *Nat Genet* **33**(1): 49-54.

Richards, K. L., B. Zhang, et al. (2010). "Methylation of the candidate biomarker TCF21 is very frequent across a spectrum of early-stage nonsmall cell lung cancers." *Cancer* **117**(3): 606-17.

Righi, E., S. Kashiwagi, et al. (2011). "CXCL12/CXCR4 blockade induces multimodal antitumor effects that prolong survival in an immunocompetent mouse model of ovarian cancer." *Cancer Res* **71**(16): 5522-34.

Ristorcelli, E. and D. Lombardo (2010). "Targeting Notch signaling in pancreatic cancer." *Expert Opin Ther Targets* **14**(5): 541-52.

Robbins, D. J., M. Cheng, et al. (1992). "Evidence for a Ras-dependent extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(15): 6924-8.

Roepman, P., A. Schlicker, et al. (2013). "Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition." *Int J Cancer* **134**(3): 552-62.

Rokudai, A., Y. Terui, et al. (2006). "Differential regulation of eotaxin-1/CCL11 and eotaxin-3/CCL26 production by the TNF-alpha and IL-4 stimulated human lung fibroblast." *Biol Pharm Bull* **29**(6): 1102-9.

Ronnov-Jessen, L. and M. J. Bissell (2009). "Breast cancer by proxy: can the microenvironment be both the cause and consequence?" *Trends Mol Med* **15**(1): 5-13.

Ronnov-Jessen, L., O. W. Petersen, et al. (1996). "Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction." *Physiol Rev* **76**(1): 69-125.

Roth, A. D., M. Delorenzi, et al. (2012). "Integrated analysis of molecular and clinical prognostic factors in stage II/III colon cancer." *J Natl Cancer Inst* **104**(21): 1635-46.

- Royer, C. and X. Lu (2011). "Epithelial cell polarity: a major gatekeeper against cancer?" *Cell Death Differ* **18**(9): 1470-7.
- Rubie, C., K. Kempf, et al. (2005). "Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues." *Mol Cell Probes* **19**(2): 101-9.
- Rubin, J. B., A. L. Kung, et al. (2003). "A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(23): 13513-8.
- Rundhaug, J. E. (2005). "Matrix metalloproteinases and angiogenesis." *J Cell Mol Med* **9**(2): 267-85.

S

- Saadi, A., N. B. Shannon, et al. (2010). "Stromal genes discriminate preinvasive from invasive disease, predict outcome, and highlight inflammatory pathways in digestive cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(5): 2177-82.
- Sadanandam, A., C. A. Lyssiotis, et al. (2013). "A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy." *Nat Med* **19**(5): 619-25.
- Sadlonova, A., S. Mukherjee, et al. (2007). "Human breast fibroblasts inhibit growth of the MCF10AT xenograft model of proliferative breast disease." *Am J Pathol* **170**(3): 1064-76.
- Salazar, R., P. Roepman, et al. (2010). "Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer." *J Clin Oncol* **29**(1): 17-24.
- Samowitz, W. S., H. Albertsen, et al. (2005). "Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer." *Gastroenterology* **129**(3): 837-45.
- Samuels, Y. and T. Waldman (2010). "Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers." *Curr Top Microbiol Immunol* **347**: 21-41.
- San Francisco, I. F., W. C. DeWolf, et al. (2004). "Expression of transforming growth factor-beta 1 and growth in soft agar differentiate prostate carcinoma-associated fibroblasts from normal prostate fibroblasts." *Int J Cancer* **112**(2): 213-8.
- Sangkhatat, S., K. Nara, et al. (2006). "Artificially accumulated beta-catenin inhibits proliferation and induces neurite extension of neuroblastoma cell line NB-1 via up-regulation of trkA." *Oncol Rep* **16**(6): 1197-203.
- Sanz-Pamplona, R., A. Berenguer, et al. (2012). "Clinical value of prognosis gene expression signatures in colorectal cancer: a systematic review." *PLoS One* **7**(11): e48877.
- Sanz-Pamplona, R., D. Cordero, et al. (2011). "Gene expression differences between colon and rectum tumors." *Clin Cancer Res* **17**(23): 7303-12.
- Saxonov, S., P. Berg, et al. (2006). "A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(5): 1412-7.
- Schedin, P. (2006). "Pregnancy-associated breast cancer and metastasis." *Nat Rev Cancer* **6**(4): 281-91.
- Schena, M., D. Shalon, et al. (1995). "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray." *Science* **270**(5235): 467-70.
- Schlicker, A., G. Beran, et al. (2012). "Subtypes of primary colorectal tumors correlate with response to targeted treatment in colorectal cell lines." *BMC Med Genomics* **5**: 66.
- Schmidmaier, R., P. Baumann, et al. (2004). "The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma by geranylgeranylation of Rho protein and activation of Rho kinase." *Blood* **104**(6): 1825-32.

- Schuebel, K. E., W. Chen, et al. (2007). "Comparing the DNA hypermethylome with gene mutations in human colorectal cancer." *PLoS Genet* **3**(9): 1709-23.
- Seymour, M. T., S. R. Brown, et al. (2013). "Panitumumab and irinotecan versus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type, fluorouracil-resistant advanced colorectal cancer (PICCOLO): a prospectively stratified randomised trial." *Lancet Oncol* **14**(8): 749-59.
- Shain, K. H., D. N. Yarde, et al. (2009). "Beta1 integrin adhesion enhances IL-6-mediated STAT3 signaling in myeloma cells: implications for microenvironment influence on tumor survival and proliferation." *Cancer Res* **69**(3): 1009-15.
- Sherer, N. M. and W. Mothes (2008). "Cytosomes and tunneling nanotubes in cell-cell communication and viral pathogenesis." *Trends Cell Biol* **18**(9): 414-20.
- Sherman, M. H., M. Downes, et al. (2011). "Nuclear receptors as modulators of the tumor microenvironment." *Cancer Prev Res (Phila)* **5**(1): 3-10.
- Shimizu, D., T. Ishikawa, et al. (2005). "Prediction of chemosensitivity of colorectal cancer to 5-fluorouracil by gene expression profiling with cDNA microarrays." *Int J Oncol* **27**(2): 371-6.
- Sieben, N. L., N. T. ter Haar, et al. (2000). "PCR artifacts in LOH and MSI analysis of microdissected tumor cells." *Hum Pathol* **31**(11): 1414-9.
- Silver, N., S. Best, et al. (2006). "Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR." *BMC Mol Biol* **7**: 33.
- Simon, R. (2005). "Roadmap for developing and validating therapeutically relevant genomic classifiers." *J Clin Oncol* **23**(29): 7332-41.
- Simon, R. (2008). "Challenges of microarray data and the evaluation of gene expression profile signatures." *Cancer Invest* **26**(4): 327-32.
- Simon, R. (2008). "Microarray-based expression profiling and informatics." *Curr Opin Biotechnol* **19**(1): 26-9.
- Simon, R., M. D. Radmacher, et al. (2003). "Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification." *J Natl Cancer Inst* **95**(1): 14-8.
- Simson, L., J. I. Ellyard, et al. (2007). "Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance." *J Immunol* **178**(7): 4222-9.
- Singer, C. F., D. Gschwantler-Kaulich, et al. (2008). "Differential gene expression profile in breast cancer-derived stromal fibroblasts." *Breast Cancer Res Treat* **110**(2): 273-81.
- Solinas, G., G. Germano, et al. (2009). "Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation." *J Leukoc Biol* **86**(5): 1065-73.
- Sorby, L. A., S. N. Andersen, et al. (2010). "Evaluation of suitable reference genes for normalization of real-time reverse transcription PCR analysis in colon cancer." *J Exp Clin Cancer Res* **29**: 144.
- Soreide, K., E. A. Janssen, et al. (2006). "Microsatellite instability in colorectal cancer." *Br J Surg* **93**(4): 395-406.
- Sorlie, T., C. M. Perou, et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10869-74.
- Sottoriva, A., J. J. Verhoeff, et al. (2010). "Cancer stem cell tumor model reveals invasive morphology and increased phenotypical heterogeneity." *Cancer Res* **70**(1): 46-56.
- Subramaniam, K. S., S. T. Tham, et al. (2013). "Cancer-associated fibroblasts promote proliferation of endometrial cancer cells." *PLoS One* **8**(7): e68923.
- Subramaniam, A., P. Tamayo, et al. (2005). "Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(43): 15545-50.
- Sue Ng, S., T. Mahmoudi, et al. (2010). "MAP3K1 functionally interacts with Axin1 in the canonical Wnt signalling pathway." *Biol Chem* **391**(2-3): 171-80.

- Sugimoto, H., T. M. Mundel, et al. (2006). "Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment." *Cancer Biol Ther* **5**(12): 1640-6.
- Sveen, A., T. H. Agesen, et al. (2012). "ColoGuidePro: a prognostic 7-gene expression signature for stage III colorectal cancer patients." *Clin Cancer Res* **18**(21): 6001-10.

T

- Takeda, I., S. Maruya, et al. (2007). "Simvastatin inactivates beta1-integrin and extracellular signal-related kinase signaling and inhibits cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma cells." *Cancer Sci* **98**(6): 890-9.
- Tarca, A. L., R. Romero, et al. (2006). "Analysis of microarray experiments of gene expression profiling." *Am J Obstet Gynecol* **195**(2): 373-88.
- Tchou, J., A. V. Kossenkov, et al. (2012). "Human breast cancer associated fibroblasts exhibit subtype specific gene expression profiles." *BMC Med Genomics* **5**: 39.
- Textor, S., N. Fiegler, et al. (2011). "Human NK cells are alerted to induction of p53 in cancer cells by upregulation of the NKG2D ligands ULBP1 and ULBP2." *Cancer Res* **71**(18): 5998-6009.
- Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." *Nat Rev Cancer* **2**(6): 442-54.
- Thompson, R. W., J. T. Pesce, et al. (2008). "Cationic amino acid transporter-2 regulates immunity by modulating arginase activity." *PLoS Pathog* **4**(3): e1000023.
- Tibshirani, R., T. Hastie, et al. (2002). "Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(10): 6567-72.
- Tlsty, T. D. and L. M. Coussens (2006). "Tumor stroma and regulation of cancer development." *Annu Rev Pathol* **1**: 119-50.
- Tlsty, T. D. and P. W. Hein (2001). "Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals." *Curr Opin Genet Dev* **11**(1): 54-9.
- Togo, S., U. M. Polanska, et al. (2013). "Carcinoma-associated fibroblasts are a promising therapeutic target." *Cancers (Basel)* **5**(1): 149-69.
- Tomasek, J. J., G. Gabbiani, et al. (2002). "Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(5): 349-63.
- Tournigand, C., T. Andre, et al. (2004). "FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study." *J Clin Oncol* **22**(2): 229-37.
- Tsoi, L. C., T. Qin, et al. (2011). "Consistent Differential Expression Pattern (CDEP) on microarray to identify genes related to metastatic behavior." *BMC Bioinformatics* **12**: 438.
- Tsujino, T., I. Seshimo, et al. (2007). "Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer." *Clin Cancer Res* **13**(7): 2082-90.
- Tsunoda, S., E. Smith, et al. (2009). "Methylation of CLDN6, FBN2, RBP1, RBP4, TFPI2, and TMEFF2 in esophageal squamous cell carcinoma." *Oncol Rep* **21**(4): 1067-73.
- Tusher, V. G., R. Tibshirani, et al. (2001). "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(9): 5116-21.

V

- van 't Veer, L. J., H. Dai, et al. (2002). "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer." *Nature* **415**(6871): 530-6.
- van de Vijver, M. J., Y. D. He, et al. (2002). "A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer." *N Engl J Med* **347**(25): 1999-2009.
- Vandesompele, J., K. De Preter, et al. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." *Genome Biol* **3**(7): RESEARCH0034.

- Vega, S., A. V. Morales, et al. (2004). "Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death." *Genes Dev* **18**(10): 1131-43.
- Vera-Ramirez, L., P. Sanchez-Rovira, et al. (2010). "Gene-expression profiles, tumor microenvironment, and cancer stem cells in breast cancer: latest advances towards an integrated approach." *Cancer Treat Rev* **36**(6): 477-84.
- Vermeulen, L., E. M. F. De Sousa, et al. (2010). "Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment." *Nat Cell Biol* **12**(5): 468-76

W

- Wald, O., U. Izhar, et al. (2011). "Interaction between neoplastic cells and cancer-associated fibroblasts through the CXCL12/CXCR4 axis: role in non-small cell lung cancer tumor proliferation." *J Thorac Cardiovasc Surg* **141**(6): 1503-12.
- Walter, K., N. Omura, et al. (2008). "Pancreatic cancer associated fibroblasts display normal allelotypes." *Cancer Biol Ther* **7**(6): 882-8.
- Wang, Y., T. Jatko, et al. (2004). "Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer." *J Clin Oncol* **22**(9): 1564-71.
- Webber, E. M., J. S. Lin, et al. (2010). "Oncotype DX tumor gene expression profiling in stage II colon cancer. Application: prognostic, risk prediction." *PLoS Curr* **2**.
- Webster, M. A., J. N. Hutchinson, et al. (1998). "Requirement for both Shc and phosphatidylinositol 3' kinase signaling pathways in polyomavirus middle T-mediated mammary tumorigenesis." *Mol Cell Biol* **18**(4): 2344-59.
- Weiss, D., C. Stockmann, et al. (2013). "Protein expression and promoter methylation of the candidate biomarker TCF21 in head and neck squamous cell carcinoma." *Cell Oncol (Dordr)* **36**(3): 213-24.
- Weitz, J., M. Koch, et al. (2005). "Colorectal cancer." *Lancet* **365**(9454): 153-65.
- Wels, J., R. N. Kaplan, et al. (2008). "Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells." *Genes Dev* **22**(5): 559-74.
- Wernert, N., C. Locherbach, et al. (2001). "Presence of genetic alterations in microdissected stroma of human colon and breast cancers." *Anticancer Res* **21**(4A): 2259-64.
- Wernyj, R. P. and P. J. Morin (2004). "Molecular mechanisms of platinum resistance: still searching for the Achilles' heel." *Drug Resist Updat* **7**(4-5): 227-32.
- West, M., C. Blanchette, et al. (2001). "Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(20): 11462-7.
- West, R. B., D. S. Nuyten, et al. (2005). "Determination of stromal signatures in breast carcinoma." *PLoS Biol* **3**(6): e187.
- Wheeler, S. E., H. Shi, et al. (2013). "Enhancement of head and neck squamous cell carcinoma proliferation, invasion, and metastasis by tumor-associated fibroblasts in preclinical models." *Head Neck*.
- White, B. D., A. J. Chien, et al. (2011). "Dysregulation of Wnt/beta-catenin signaling in gastrointestinal cancers." *Gastroenterology* **142**(2): 219-32.
- Wilson, C. L. and C. J. Miller (2005). "Simpleaffy: a BioConductor package for Affymetrix Quality Control and data analysis." *Bioinformatics* **21**(18): 3683-5.

X

- Xiao, W., J. Wang, et al. (2013). "Fibulin-1 is down-regulated through promoter hypermethylation and suppresses renal cell carcinoma progression." *J Urol* **190**(1): 291-301.

Xouri, G. and S. Christian (2009). "Origin and function of tumor stroma fibroblasts." Semin Cell Dev Biol **21**(1): 40-6.

Xu, L. N., B. N. Xu, et al. (2013). "Tumor-associated fibroblast-conditioned medium promotes tumor cell proliferation and angiogenesis." Genet Mol Res **12**(4): 5863-71.

Y

Yamasaki, M., I. Takemasa, et al. (2007). "The gene expression profile represents the molecular nature of liver metastasis in colorectal cancer." Int J Oncol **30**(1): 129-38.

Z

Zeisberg, E. M., S. Potenta, et al. (2007). "Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts." Cancer Res **67**(21): 10123-8.

Zhang, C., L. Fu, et al. (2009). "Fibroblast growth factor receptor 2-positive fibroblasts provide a suitable microenvironment for tumor development and progression in esophageal carcinoma." Clin Cancer Res **15**(12): 4017-27.

Zhang, L., W. Zhou, et al. (1997). "Gene expression profiles in normal and cancer cells." Science **276**(5316): 1268-72.

Zhao, H., A. Langerod, et al. (2004). "Different gene expression patterns in invasive lobular and ductal carcinomas of the breast." Mol Biol Cell **15**(6): 2523-36.

Zhu, C. Q., K. Ding, et al. (2010). "Prognostic and predictive gene signature for adjuvant chemotherapy in resected non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **28**(29): 4417-24.

Zlobec, I., M. Bihl, et al. (2011). "Comprehensive analysis of CpG island methylator phenotype (CIMP)-high, -low, and -negative colorectal cancers based on protein marker expression and molecular features." J Pathol **225**(3): 336-43.

Zong, Y., J. Huang, et al. (2012). "Stromal epigenetic dysregulation is sufficient to initiate mouse prostate cancer via paracrine Wnt signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(50): E3395-404.

Zuckerman, V., K. Wolynec, et al. (2009). "Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence." J Pathol **219**(1): 3-15.