

UNIVERSITAT DE BARCELONA

Departament de Genètica

Mecanismes de transducció de senyal implicats en l'efecte  
dels inhibidors selectius de COX-2 en el tractament del  
càncer de còlon

ISOLDA CASANOVA RIGAT

2004

Mecanismes de transducció de senyal implicats en l'efecte dels  
inhibidors selectius de COX-2 en el tractament del càncer de còlon

Memòria presentada per  
**Isolda Casanova Rigat**

Per optar al grau de  
**Doctora en Biologia**

Tesi realitzada sota la direcció de  
Dr. Ramon Mangues Bafalluy  
en el Laboratori d'Investigació Gastrointestinal  
Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau  
adscria al Departament de Genètica  
de la Facultat de Biologia  
Programa de Doctorat de Genètica (Bienni 1998-2000)  
Tutor : Florenci Serras Rigalt

Dr. Ramon Mangues

Dr. Florenci Serras

Isolda Casanova

Barcelona, Maig del 2004

***Als meus pares***

***Al Hamouda***

# **AGRAÏMENTS**

Ja fa un temps que m'he estat imaginant aquest moment, pensant en totes les persones a qui voldria mencionar en aquests agraïments. Haig de confessar, que només de pensar-hi, m'emocionava moltes vegades. D'una banda, perquè escriure aquesta darrera pàgina de la meva tesi significa haver finalitzat una treball de sis anys, que m'ha suposat un gran esforç. Però, d'altra banda, m'emocionava en adonar-me de que són moltes les persones que m'han ajudat, i a les que estic agraïda per diferents motius. Intentaré, en aquestes ratlles, recordar-les a totes elles ja que, sense el seu suport, científic i personal, de ben segur que no hauria aconseguit arribar fins aquí.

Començaré per agrair a tots els que m'han ajudat i animat a iniciar-me en el món de la recerca. Per això, haig d'agrair primer a la Montse Corominas per donar-me els primers coneixements sobre el càncer i per fer que, des del primer dia, m'interessés especialment en aquest camp. També agrair a la Montse i al Florenci Serras per donar-me la oportunitat d'iniciar-me en el món de la ciència i per a ensenyar-me les primeres "llicions" del treball en un laboratori. A ells, i a totes les persones del seu grup (Berta, Montse, Anna), agrair totes les estones que vam passar en companyia de les nostres estimades Drosophiles. Al Florenci, gràcies també per ser el meu tutor en aquesta tesi i per estar disponible sempre que l'he necessitat.

En la meva continuïtat en el món de la recerca, haig d'agrair al Gabriel Capellà l'oportunitat d'iniciar la meva tesi doctoral en el Laboratori d'Investigació Gastrointestinal, del que, en aquells moments, n'era el coordinador. Gràcies per tot Gabi, i en especial, perquè sempre m'has fet sentir que podia comptar amb tú pel que fes falta.

Durant aquests sis anys en el Laboratori d'Investigació Gastrointestinal, he viscut moltes etapes diferents, de cadascuna d'elles en guardo records ben especials. A tota la gent de la "primera etapa", la Sara, la Gemma, la Pali, la Bibi, la Mònica i l'Eva, voldria donar-vos les gràcies per la vostra acollida, perquè entrar en un lloc nou a vegades no és fàcil però, gràcies a vosaltres, no em va costar gens adaptar-me al laboratori. Gràcies pels vostres consells quan era "novata" i per totes les estones compartides a Sant Pau. Després vingueren temps de canvis i començà una nova època al LIG. A tota la gent amb qui vam compartir aquells temps, l'Ester, la Sílvia i la Lourdes, gràcies pels bons moments passats, per la "marxeta" del laboratori i pels brindis dels divendres. A la Lourdes, gràcies no només per ajudar-me sempre en el laboratori

sinó també per fer-ho en els moments complicats de la meua vida, amistosats com la teua n'hi ha poques i m'alegro de que la seguim mantenint malgrat les distàncies.

Poc a poc, va anar arribant gent nova al laboratori i marxant-ne d'altra i va arribar així la tercera i darrera etapa viscuda en el LIG. Ara, ja som una "gran família" i vull agrair a tots el bon "rotllo" del laboratori i la bona disposició per ajudar sempre en el que faci falta. Amb les persones amb qui més he compartit la feina, i que m'han "patit" més directament, el Carlos i la Mònica, moltíssimes gràcies per tot. Gràcies a tots dos perquè heu fet gran part del treball d'aquesta tesi, sense vosaltres de ben segur que no l'hauria pogut realitzar. Vull també agrair-vos la vostra paciència, les ganes de treballar, el bon humor i l'optimisme que tant m'ha ajudat en èpoques més difícils i que han fet del "COX team" un equip inoblidable. Gràcies també "a les d'Esteve", la Virtu, la Judith i l'Arabel.la, en especial pels treballs in vivo i per estar sempre disposades a donar un cop de mà. Gràcies al Miquel Àngel, la Mireia, la Matilde i la Cristina (et trobem a faltar!) per totes les estones passades al laboratori en les que hem compartit moltes coses més a part de feina. A la Matilde, gràcies per les xerrades a l'hora del cafè, per les aturades de les cinc (a tú també Miquel Àngel!) i pels consells i ajuda especialment aquests darrers temps. Finalment, agrair al Ramon Mangues, director d'aquesta tesi, l'oportunitat de realitzar aquest treball, els consells científics, la paciència i la confiança dipositada en mi que han contribuït a augmentar el meu interès en el món de la recerca.

Molta més gent de Sant Pau també m'ha recolzat durant tots aquests anys. Gràcies a la gent del laboratori del Lluís Vila, en especial a la Mercedes, per l'ajuda i bona disponibilitat per a fer tants i tants cromatogrames. Gràcies també a l'Eduard, perquè sempre estàs disposat a donar un cop de mà, un consell, un protocol, una mica d'anticòs... També agrair tots els altres laboratoris que, d'una manera o una altra, m'han ajudat: als d'anatomia patològica, als de la "caseta", als de cardio, als d'hemato, als de bioquímica, moltes gràcies a tots!

Gran part del treball d'aquesta tesi no s'hauria pogut realitzar sense la col·laboració amb els Laboratoris Esteve. Per això, vull agrair a tota la gent amb qui hem col·laborat, al Dr. Erill i al Toni Parraga, amb els que vam iniciar la col·laboració, i als de la segona etapa, especialment la Inés i la Rosa, amb qui he mantingut més contacte. Gràcies a tots per donar-me l'oportunitat de col·laborar en el desenvolupament dels nous fàrmacs i per haver pogut utilitzar tot aquest treball en la meua tesi doctoral.

És evident que l'ajuda a nivell científic ha sigut indispensable per a mi al llarg d'aquests anys, però tant o més important ha estat el recolzament personal de moltes altres persones a les que vull aprofitar aquesta ocasió per donar-los les gràcies.

Moltíssimes gràcies a tots els meus amics, amb els que he compartit tants bons moments i que també m'han recolzat en hores baixes. Al grup de Badalona, que he tingut al costat des de ben petita i amb qui he compartit moltes hores d'esplai, excursions, festes, xerrades, però sobretot una bona amistat que, malgrat els anys, es segueix mantenint ben viva. A tot el grup Kitxop, monitors i nanos (ara ja no tant nanos!), per tots els dissabtes a la tarda, reunions dels divendres, excursions, colònies i campaments, que van fer dels meus anys d'esplai una època inoblidable. A tota la gent del Takyllakta, amb els qui he compartit experiències per a escriure un llibre sencer. Gràcies a tots perquè vam compartir un bocí de la nostra vida que és un tresor per a mi, per les hores de reunions, pels "compartirs", pels "àbrassos" i, sobretot, perquè les estades a Perú foren els dies més especials de la meva vida. Gràcies en especial a en Xavi, responsable després de molt insistir, de la bogeria que vam viure. Hi ha moltíssima gent de Perú a qui tinc també molt per agrair, en especial que fessin canviar radicalment la meva manera de veure i entendre la vida i que m'oferissin, sense condicions, la seva amistat. Gràcies al John, amb qui, gràcies a les meravelles d'internet, puc seguir mantenint una bona amistat i a tot el grup d'EJE, en general, per acollir-me com una més i donar-me la seva confiança. Gràcies també al "padrecito" i a tota la gent de la Parròquia, per a fer-me sentir que Pamplona Alta era també casa meva. Finalment, moltíssimes gràcies al Sergio, el meu fillol peruà, a la meva "comadre" Dina, i al Víctor, perquè sempre sereu la meva família peruana i, malgrat les distàncies, sempre formareu part de la meva vida. Al Víctor, gràcies per compartir amb mi uns moments tan difícils i donar-me un exemple de senzillesa i fortalesa que mai podré oblidar i que tant ha influït en la meva vida.

Però encara queden amics d'aquestes terres a qui agrair moltes més coses. Al grup de Biologia (i respectius), perquè vam iniciar junts la carrera compartint moltes hores de classe, de pràctiques, de bar, biomarxes i amb els qui m'alegro de seguir mantenint una bona amistat, compartint ara calçotades, casaments, sopars, sortides i naixements!

Al grup de Santa Coloma, amb qui compartim la part més important de la nostra vida. Gràcies, molt especialment a l'Agustí i a l'Eulàlia. A l'Agustí per la seva generositat i per ajudar-me en els moments més difícils. A l'Eulàlia, haig d'agrair-li tantes coses que mai acabaria. Gràcies per la teva amistat, comprensió, consells, recolzament i per ser-hi sempre que et necessito. També agrair-te tot els temps passats a la Trini, gràcies a tu, al Jose M<sup>a</sup>, a tots els voluntaris i als "no voluntaris" per donar-me a conèixer un món que era per mi desconegut i en el que vaig descobrir i aprendre tantes i tantes coses.

Gràcies a la Sílvia, per l'amistat des de petites i per l'any de convivència de grans, gràcies a la Beli, al Víctor, al Vicenç, a la Carmen, a l'Andreu, al Toni, a la Sílvia, a l'Oscar, gràcies a tots

per la vostra amistat. Gràcies a la Mely, perquè malgrat que som tan diferents sempre he pensat que érem ànimes bessones, perquè hem viscut juntes moments molt “intensos” i especials (Perú, Trini, Índia) i per la teva paciència en els meus moments “crítics”, sense la qual, moltes coses no haurien pogut passar.

Finalment, moltíssimes gràcies a tota la meva família. Als meus germans, la Mèria, en Xavier, l'Ignasi i la Montse, perquè compartir la meva vida amb vosaltres m'ha fet adonar del privilegi que tinc de formar part d'una família nombrosa. Gràcies a tots, perquè m'heu ajudat i recolzat en tot des de ben petita. Gràcies als “nou vinguts”, cunyats-da, nebot i nebodes, perquè heu fet que la família fos encara més nombrosa i que qualsevol trobada sigui sempre una gran festa. Gràcies a les àvies (a la iaia i a l'àvia!) pel vostre afecte i generositat que sempre ha estat molt important per mi. Gràcies molt especialment als meus pares, tinc tantes coses per agrair que és impossible enumerar-les totes. Gràcies pel vostre esforç, la vostra paciència, el vostre recolzament incondicional i per acceptar sempre les meves decisions, sense vosaltres res del que he fet hauria estat possible. A mida que passen els anys, més m'adono que quant us estimo i més valoro tot el que heu fet, i seguiu fent, per mi.

Gràcies finalment al Hamouda perquè compartir la vida amb tu és el millor que m'ha passat, perquè al teu costat he après moltes coses i perquè pensar en el futur al teu costat m'il·lusiona i em fa molt feliç. Gràcies també per la teva paciència, en especial aquests darrers mesos de feina **أحبك**. Gràcies a tota la família del Marroc, a la “Hasha” Taika i tots els Heljam, perquè heu fet que des del primer dia em sentís com una més de la família **شكرا**.

***Moltíssimes gràcies a tots!!!***

# ÍNDEX

---



## ÍNDIX

<b>ÍNDIX</b> .....	<b>i</b>
<b>ABREVIATURES</b> .....	<b>xiii</b>

## INTRODUCCIÓ

<b>1. CÀNCER</b> .....	<b>1</b>
1.1 Definició .....	<b>1</b>
1.2 Oncogens i gens supressors de tumors .....	<b>1</b>
1.2.1 Oncogens .....	<b>2</b>
1.2.2 Els gens supressors de tumors .....	<b>2</b>
<b>2. CÀNCER COLORECTAL</b> .....	<b>4</b>
2.1 Epidemiologia del càncer colorectal .....	<b>4</b>
2.2 Estadiatge del càncer colorectal .....	<b>4</b>
2.3 El Càncer Colorectal Esporàdic .....	<b>6</b>
2.4 El Càncer Colorectal Hereditari .....	<b>6</b>
2.4.1 Poliposi Còlica Familiar (PCF) .....	<b>7</b>
2.4.2 Càncer Colorectal Hereditari no Poliposi (CCHNP) .....	<b>7</b>
<b>3. MECANISMES MOLECULARS EN LA PATOGÈNESI DEL CCR</b> .....	<b>9</b>
3.1 Bases genètiques del càncer colorectal .....	<b>9</b>
3.1.1 Inestabilitat de microsatèl.lits (MIN).....	<b>9</b>
3.1.2 Inestabilitat cromosòmica (CIN) .....	<b>10</b>
3.2 Vies de transducció de senyals alterades en el Càncer Colorectal .....	<b>13</b>
3.2.1 La via Wnt .....	<b>13</b>
3.2.2 La via K-Ras .....	<b>17</b>
3.2.3 La via de TGF- $\beta$ .....	<b>18</b>
3.2.4 El gen supressor de tumors p53 .....	<b>20</b>
3.2.5 Senyalització per E-Cadherina .....	<b>21</b>
3.3 Les adhesions focals i el càncer colorectal .....	<b>22</b>
3.3.1 Components de les adhesions focals .....	<b>22</b>
3.3.1.1 Les Integrines .....	<b>22</b>
3.3.1.2 FAK.....	<b>23</b>
3.3.1.3 SRC.....	<b>24</b>
3.3.1.4 p130Cas.....	<b>25</b>
3.3.1.5 ILK .....	<b>27</b>
3.3.1.6 Paxillin .....	<b>28</b>
3.3.1.7 PI3K .....	<b>28</b>

3.3.2 Vies regulades per les adhesions focals .....	29
3.3.2.1 Regulació del citoesquelet i migració .....	29
3.3.2.2 Regulació de la proliferació .....	30
3.3.2.3 Regulació de l'apoptosi.....	30
3.3.2.4 Anoikis .....	31
3.4 Les adhesions focals i el càncer .....	31
<b>4. TRACTAMENT DEL CÀNCER COLORECTAL .....</b>	<b>33</b>
4.1 Teràpia adjuvant.....	33
4.2 Tractament quimioteràpic actual .....	33
4.3 Noves dianes terapèutiques en el tractament del CCR .....	35
<b>5. LES CICLOOXIGENASSES .....</b>	<b>38</b>
5.1 Funció de les ciclooxigenasses .....	38
5.2 El metabolisme eicosanoid .....	39
5.3 Els inhibidors de ciclooxigenasses .....	40
5.3.1 Els Antiinflamatoris no Esteroidals (AINEs).....	40
5.3.2 Els Inhibidors selectius de COX-2 .....	41
5.4 Relació entre ciclooxigenasses i càncer .....	42
5.5 Efecte antitumoral dels inhibidors selectius de COX-2 .....	44
5.6 Mecanisme d'acció antitumoral dels inhibidors de COX-2 .....	45
5.6.1 Evidències a favor de la dependència de COX-2 .....	45
5.6.2 Evidències a favor de la independència de COX-2.....	45
5.6.3 Vies implicades en el mecanisme d'acció dels inhibidors de COX-2.....	46
<b>6. MECANISMES D'ACCIÓ DELS FÀRMACS ANTITUMORALS .....</b>	<b>47</b>
6.1 Apoptosi .....	47
6.1.1 Definició .....	47
6.1.2 Característiques morfològiques .....	48
6.1.3 Fases funcionals de l'apoptosi .....	48
6.1.4 Diferències entre necrosi i apoptosi .....	52
6.1.5 Apoptosi i càncer .....	53
6.2 El Cicle cel·lular .....	54
6.3 Senescència .....	55
<b>7. MODELS ANIMALS PER L'AVALUACIÓ D'ACTIVITAT ANTITUMORAL.....</b>	<b>57</b>
7.1 Models animals de carcinogènesi química .....	57
7.2 Ratolins genèticament modificats .....	58
7.3 Models de xenotrasplantament en ratolins atímics .....	58
7.3.1 Implantació subcutània .....	59
7.3.2 Implantació ortotòpica .....	59

## OBJECTIUS

<b>OBJECTIUS</b> .....	<b>61</b>
------------------------	-----------

## MATERIALS I METODEDES

<b>1. EXPERIMENTS IN VITRO</b> .....	<b>63</b>
--------------------------------------	-----------

1.1 Cultius cel·lulars .....	63
1.1.1 Línies cel·lulars .....	63
1.1.2 Subcultiu de cèl·lules .....	63
1.1.3 Congelació i descongelació de línies cel·lulars .....	64
1.1.4 Test de Micoplasma .....	64
1.1.5 Cultiu de cèl·lules en suspensió .....	65
1.2 Anàlisi de la viabilitat cel·lular (XTT) .....	65
1.3 Mesura de l'Activitat Ciclooxygenassa .....	67
1.3.1 Inhibició de l'activitat COX en sang humana total .....	67
1.3.2 Mesura dels productes de COX .....	67
1.4 Test d'Apoptosi (Tinció Hoescht) .....	68
1.5 Pèrdua d'ancoratge .....	68
1.6 Western Blot .....	69
1.6.1 Extracció de proteïnes .....	69
1.6.2 Extracció proteica de la fracció citosòlica .....	70
1.6.3 Quantificació de proteïnes .....	70
1.6.4 Electroforesi i transferència .....	71
1.6.5 Hibridació de les membranes .....	71
1.7 Immunofluorescència .....	72
1.8 Transfecció de cèl·lules en cultiu .....	73
1.8.1 Plàsmids .....	73
1.8.2 Transformació de bacteris competents .....	74
1.8.3 Transfecció amb Lipofectamine-Plus Reagent .....	74

<b>2. EXPERIMENTS IN VIVO EN RATOLINS ATÍMICS</b> .....	<b>76</b>
---	-----------

2.1 Animals .....	76
2.2 Tumors .....	76
2.3 Tècniques quirúrgiques .....	76
2.4 Tractament amb el fàrmac .....	77
2.4.1 Preparació i administració del fàrmac .....	77
2.4.2 Avaluació de l'activitat antitumoral .....	77
2.5 Processament dels tumors .....	78
2.5.1 Anàlisi histopatològic .....	78
2.5.2 Test d'apoptosi .....	78
2.5.3 Extracció de proteïna dels tumors .....	79

<b>3. PROCESSAMENT DE LES DADES I ANÀLISI ESTADÍSTIC</b> .....	<b>79</b>
--	-----------

## RESULTATS

<b>1. DETERMINACIÓ DE L'EFECTE ANTITUMORAL IN VITRO DE COMPOSTOS INHIBIDORS SELECTIUS DE COX-2 EN CÈL·LULES DE CARCINOMA DE CÒLON.....</b>	<b>81</b>
1.1 L'efecte antitumoral in vitro del Celecoxib, Rofecoxib i Valdecoxib no està relacionat amb la seva capacitat d'inhibició de COX-2 .....	81
1.2 Comparació entre el celecoxib i l'E6087, un nou compost inhibidor de COX-2 .	83
1.3 L'E6232 i l'E6231 són els dos enantiòmers de l'E6087 i tenen diferent capacitat d'inhibir COX-2 .....	83
1.4 Comparació de l'efecte antitumoral in vitro del celecoxib, l'E6087, l'E6232 i l'E6231 en quatre línies cel·lulars de carcinoma de còlon humà .....	84
1.5 Les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en suspensió esdevenen resistents al celecoxib, l'E6087, l'E6232 i l'E6231.....	87
1.6 Les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en suspensió són sensibles a la Gemcitabina.....	89
1.7 L'activitat i l'expressió de COX-2 no varien en les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en adhesió o en suspensió .....	90
1.8 Inhibició de l'activitat COX en tractar les cèl·lules HCA7 i TD20 amb els inhibidors de COX-2 .....	92
<b>2. MECANISME D'ACCIÓ DEL CELECOXIB IN VITRO EN CÈL·LULES DE CARCINOMA DE CÒLON .....</b>	<b>94</b>
2.1 El celecoxib indueix apoptosi en les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en adhesió .....	94
2.2 La inducció d'apoptosi per celecoxib és dependent de l'activació de les caspases .....	97
2.3 El celecoxib indueix l'activació de caspases i la proteolisi de PARP en les cèl·lules TD20 i HCA7 .....	98
2.4 El celecoxib indueix la sortida de citocrom c de la mitocòndria .....	99
2.5 Regulació de les proteïnes de la família Bcl-2 pel celecoxib .....	100
2.6 Efecte del celecoxib en el cicle cel·lular .....	102
<b>3. EFECTE DEL CELECOXIB EN L'ANCORATGE CEL·LULAR .....</b>	<b>103</b>
3.1 El celecoxib indueix la pèrdua d'ancoratge de les cèl·lules .....	103
3.2 Efecte del celecoxib en les proteïnes implicades en les adhesions focals .....	104
3.3 Efecte del celecoxib en les proteïnes implicades en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula ....	106
3.4 Efecte de l'inhibidor de la via PI3K/Akt Wortmannin .....	106
3.5 Efecte de l'inhibidor de Src, PP2, en les cèl·lules TD20 i HCA7 .....	107
3.6 L'activació de Src o Fak no altera l'efecte del celecoxib en TD20 .....	109
3.7 Anàlisi molecular dels transfectants de Fak i Src.....	110
3.8 El celecoxib indueix la proteolisi de p130Cas generant un fragment de 31KDa ..	111
3.9 El fragment proteolitzat de p130Cas es transloca al nucli en cèl·lules tractades amb celecoxib.....	112
3.10 La sobreexpressió de p130Cas disminueix l'efecte del celecoxib.....	115
3.11 Anàlisi molecular dels transfectants de p130Cas .....	115

<b>4. RESISTÈNCIA AL CELECOXIB DE LES CÈL·LULES EN SUSPENSÍO .....</b>	<b>117</b>
4.1 El celecoxib no indueix apoptosi en les cèl·lules en suspensió .....	117
4.2 El celecoxib no activa les caspases en cèl·lules en suspensió .....	121
<b>5. ALTERACIÓ DELS CONTACTES FOCALS EN LES CÈL·LULES EN SUSPENSÍO.....</b>	<b>122</b>
5.1 Efecte del celecoxib en proteïnes de les adhesions focals en cèl·lules en suspensió.....	122
5.2 Efecte del celecoxib en les proteïnes implicades en l'adhesió cèl·lula-cèl·lula ....	123
5.3 Efecte de l'inhibidor de la via PI3K/Akt Wortmannin en les cèl·lules en suspensió i en la seva sensibilitat al celecoxib .....	124
5.4 El celecoxib i l'inhibidor de Src, PP2, no tenen efecte citotòxic sinèrgic en les cèl·lules en suspensió .....	124
5.5 El celecoxib no indueix la proteolisi de p130Cas en cèl·lules en suspensió .....	126
5.6 El celecoxib no indueix la translocació al nucli de p130Cas en cèl·lules en suspensió.....	127
<b>6. MECANISME D'ACCIÓ DEL CELECOXIB EN TUMORS XENOTRASPLANTATS DE CARCINOMA DE CÒLON .....</b>	<b>129</b>
6.1 El celecoxib redueix el volum tumoral en els xenotrasplants subcutanis i ortotòpics de TD20 .....	129
6.2 El celecoxib redueix el pes total dels tumors en els xenotrasplants ortotòpics però no en els subcutanis .....	131
6.3 El celecoxib indueix més necrosi macroscòpica en els tumors subcutanis que en els ortotòpics .....	131
6.4 El celecoxib augmenta el nivell de necrosi microscòpica en els tumors implantats subcutàniament .....	133
6.5 El celecoxib indueix apoptosi en els tumors implantats ortotòpicament .....	133
6.6 El celecoxib no produeix toxicitat en els animals xenotrasplantats .....	135
6.7 El celecoxib indueix l'activació de caspasa-9 en els tumors implantats ortotòpicament .....	135
6.8 El celecoxib indueix la desregulació de les proteïnes implicades en els contactes focals en els tumors ortotòpics .....	137
<b>7. DESENVOLUPAMENT DE NOUS COMPOSTOS ANTITUMORALS .....</b>	<b>139</b>
7.1 Síntesi de nous compostos d'estructura relacionada amb el celecoxib .....	140
7.2 Posada a punt del mètode de cribatge de nous compostos antitumorals .....	141
7.3 El celecoxib és igual d'efectiu a les 60h i 4h d'exposició en PC3 .....	142
7.4 Cribatge de nous compostos antitumorals mitjançant assajos de citotoxicitat a 4h .....	143
7.5 Activitat inhibidora de COX-2 dels nous compostos d'estructura relacionada amb el celecoxib .....	144
7.6 Els nous compostos indueixen apoptosi en les cèl·lules TD20 i PC3 .....	146
7.7 Els nous compostos indueixen l'apoptosi a través de la sobreexpressió de Bax i l'activació de les caspases 9,3 i 7 .....	151
7.8 Els nous compostos indueixen una ràpida pèrdua d'ancoratge en les cèl·lules TD20 i PC3.....	153

7.9 Efecte dels nous compostos en proteïnes de les adhesions focals .....	155
7.10 Els nous compostos indueixen la proteolisi de p130Cas generant un fragment de 31KDa .....	156
7.11 p130Cas canvia de localització en les cèl·lules TD20 tractades amb els compostos E6122 i E6165.....	157
7.12 La sobreexpressió de p130Cas redueix l'efecte antitumoral in vitro dels compostos E6122 i E6165.....	159

## **DISCUSSIÓ**

<b>1. ELS COMPOSTOS INHIBIDORS DE COX-2 TENEN UN MECANISME D'ACCIÓ ANTITUMORAL INDEPENDENT DE LA INHIBICIÓ DE COX-2 .....</b>	<b>161</b>
<b>2. MECANISME D'ACCIÓ IN VITRO DEL CELECOXIB .....</b>	<b>168</b>
<b>3. MECANISME D'ACCIÓ DEL CELECOXIB EN TUMORS XENOTRASPLANTATS DE CARCINOMA DE CÒLON .....</b>	<b>179</b>
<b>4. DESENVOLUPAMENT DE NOUS COMPOSTOS ANTITUMORALS MÉS POTENTS QUE EL CELECOXIB .....</b>	<b>183</b>

## **CONCLUSIONS**

<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>187</b>
--------------------------	------------

## **BIBLIOGRAFIA**

<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>189</b>
---------------------------	------------

## ÍNDIX DE TAULES

<b>Taula 1.</b> Classificació del càncer colorectal pel sistema TNM .....	5
<b>Taula 2.</b> Criteris d'Amsterdam I, II i de Bethesda per al diagnòstic de CCHNP .....	8
<b>Taula 3.</b> Inhibidors específics de COX-2 actualment disponibles per ús clínic .....	42
<b>Taula 4.</b> Efecte dels inhibidors de COX-2 en cèl·lules de carcinoma de còlon .....	82
<b>Taula 5.</b> Capacitat d'inhibició de COX-1 i COX-2 del celecoxib, l'E6087 i els seus enantiòmers .....	84
<b>Taula 6.</b> Efecte dels compostos inhibidors de COX-2 en cèl·lules de carcinoma de còlon ...	85
<b>Taula 7.</b> Comparació de l'efecte dels compostos analitzats en les línies de còlon .....	87
<b>Taula 8.</b> Inhibició de l'activitat de COX-2 dels compostos inhibidors de COX-2 en les cèl·lules HCA7 cultivades en adhesió i en suspensió .....	93
<b>Taula 9.</b> Efecte del celecoxib amb i sense pretractament amb zVADfmk en TD20 .....	98
<b>Taula 10.</b> Efecte del celecoxib amb i sense preincubació amb PP2 en TD20 .....	109
<b>Taula 11.</b> Efecte del celecoxib amb i sense tractament amb PP2 en TD20 .....	125
<b>Taula 12.</b> Efecte del celecoxib en el volum final tumoral en els experiments in vivo amb tumors TD20 implantats en localització ortotòpica i subcutània .....	130
<b>Taula 13.</b> Valors d'AUC de les corbes del volum tumoral en els tumors subcutanis control i tractats amb celecoxib .....	131
<b>Taula 14.</b> Efecte del celecoxib en el pes total final dels tumors de localització subcutània i ortotòpica.....	132
<b>Taula 15.</b> Percentatge de necrosi macroscòpica en els grups control i tractat de localització subcutània i ortotòpica .....	132
<b>Taula 16.</b> Percentatge de necrosi microscòpica presents en els tumors controls i tractats amb celecoxib implantats subcutàniament i ortotòpicament.....	133
<b>Taula 17.</b> Efecte del celecoxib a diferents temps d'exposició en TD20.....	142
<b>Taula 18.</b> Efecte del celecoxib i dels nous compostos en les cèl·lules TD20 i PC3 .....	143
<b>Taula 19.</b> Efecte dels celecoxib i dels nous compostos en les cèl·lules HCA7.....	145
<b>Taula 20.</b> Inhibició de l'activitat COX-2 en les cèl·lules HCA7 .....	146
<b>Taula 21.</b> Efecte de la sobreexpressió de p130Cas en la sensibilitat als compostos E6122 i E6165.....	159





## ÍNDIX DE FIGURES

<b>Figura 1.</b> Model de Vogelstein de la tumorigènesi colorectal .....	<b>11</b>
<b>Figura 2.</b> Regulació de la via Wnt .....	<b>16</b>
<b>Figura 3.</b> Regulació de la via TGF- $\beta$ .....	<b>19</b>
<b>Figura 4.</b> Dominis estructurals de FAK .....	<b>24</b>
<b>Figura 5.</b> Dominis estructurals de Src .....	<b>25</b>
<b>Figura 6.</b> Dominis estructurals de p130Cas .....	<b>26</b>
<b>Figura 7.</b> Dominis estructurals d'ILK .....	<b>27</b>
<b>Figura 8.</b> Vies de senyalització activades per la unió de la cèl·lula a l'ECM .....	<b>29</b>
<b>Figura 9.</b> Via de les ciclooxygenases .....	<b>40</b>
<b>Figura 10.</b> Regulació de l'apoptosi .....	<b>52</b>
<b>Figura 11.</b> Regulació del cicle cel·lular .....	<b>55</b>
<b>Figura 12.</b> Corbes dosi-resposta de l'efecte antitumoral in vitro del celecoxib, rofecoxib i valdecoxib en cèl·lules de còlon .....	<b>82</b>
<b>Figura 13.</b> Estructura química del celecoxib i l'E6087 .....	<b>83</b>
<b>Figura 14.</b> Corbes dosi-resposta de l'efecte del celecoxib, E6087, E6232 i E6231 en les cèl·lules de còlon .....	<b>85</b>
<b>Figura 15.</b> Nivells d'expressió de COX-2 de les línies cel·lulars de carcinoma de còlon .....	<b>86</b>
<b>Figura 16.</b> Corbes dosi-resposta de l'efecte del celecoxib, l'E6087, E6232 i E6231 en cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en adhesió i en suspensió .....	<b>88</b>
<b>Figura 17.</b> Corbes dosi-resposta de l'efecte de la gemcitabina en les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en adhesió i en suspensió .....	<b>89</b>
<b>Figura 18.</b> Cromatograma realitzat amb una mescla de prostaglandines purificades .....	<b>91</b>
<b>Figura 19.</b> Comparació dels nivells dels productes de COX i d'expressió de COX-2 en les cèl·lules HCA7 i TD20 cultivades en adhesió i en suspensió .....	<b>91</b>
<b>Figura 20.</b> Nivells de PGE <sub>2</sub> en cèl·lules TD20 control i tractades amb 0,1 $\mu$ M de celecoxib .....	<b>93</b>
<b>Figura 21.</b> Inducció d'apoptosi en les línies cel·lulars TD20 i HCA7 .....	<b>95</b>
<b>Figura 22.</b> Efecte del celecoxib en les cèl·lules TD20 amb i sense preincubació amb zVADfmk .....	<b>97</b>
<b>Figura 23.</b> Nivells d'expressió i/o activació de les caspases activadores 8 i 9, de les caspases executores 3 i 7 i de proteolisi de PARP en les cèl·lules TD20 .....	<b>99</b>
<b>Figura 24.</b> Nivells de citocrom c en la fracció citosòlica en cèl·lules TD20 i HCA7 control i tractades amb celecoxib.....	<b>100</b>
<b>Figura 25.</b> Nivells d'expressió de proteïnes de la família de Bcl-2 en les cèl·lules TD20 i HCA7 control i tractades amb celecoxib.....	<b>101</b>

<b>Figura 26.</b> Nivells d'expressió de les ciclines D3, E, A i B1, de PCNA i de l'inhibidor de cicle p21 en les cèl·lules TD20 i HCA7 control i tractades amb celecoxib .....	<b>102</b>
<b>Figura 27.</b> Percentatge de cèl·lules en suspensió en tractar les cèl·lules TD20 i HCA7 amb celecoxib .....	<b>104</b>
<b>Figura 28.</b> Nivells d'expressió i/o fosforilació de proteïnes implicades en les adhesions focals en les cèl·lules TD20 i HCA7 control i tractades amb celecoxib .....	<b>105</b>
<b>Figura 29.</b> Nivells d'expressió de les proteïnes implicades en les unions cèl·lula-cèl·lula en les cèl·lules TD20 i HCA7 control i tractades amb celecoxib .....	<b>106</b>
<b>Figura 30.</b> Efecte del celecoxib en les cèl·lules TD20 i HCA7 amb i sense preincubació amb Wortmannin .....	<b>107</b>
<b>Figura 31.</b> Efecte de l'inhibidor de Src, PP2, en la viabilitat de les cèl·lules TD20 i HCA7..	<b>108</b>
<b>Figura 32.</b> Corbes dosi-resposta de l'efecte del celecoxib en les cèl·lules TD20 i HCA7 amb i sense pretractament amb PP2 .....	<b>108</b>
<b>Figura 33.</b> Valors d'IC <sub>50</sub> del celecoxib en els transfectants de pcDNA3, FAKmyr i Src531.	<b>109</b>
<b>Figura 34.</b> Expressió de proteïnes implicades en les adhesions focals en els transfectants de FAK, Src i control .....	<b>110</b>
<b>Figura 35.</b> Proteolisi de p130Cas en un fragment de 31KDa en les cèl·lules TD20 i HCA7 control i tractades amb celecoxib .....	<b>111</b>
<b>Figura 36.</b> Immunofluorescència de p130Cas en cèl·lules TD20 i HCA7 control i tractades amb celecoxib .....	<b>113</b>
<b>Figura 37.</b> Valors d'IC <sub>50</sub> del celecoxib en els transfectants de p130Cas i control .....	<b>115</b>
<b>Figura 38.</b> Expressió de proteïnes implicades en adhesions focals en els transfectants de p130Cas i control.....	<b>116</b>
<b>Figura 39.</b> Inducció d'apoptosi en les línies cel·lulars TD20 i HCA7 cultivades en suspensió tractades amb celecoxib o vehicle .....	<b>119</b>
<b>Figura 40.</b> Nivells d'expressió i/o activació de les caspases 8, 9, 3 i 7 en les cèl·lules TD20 i HCA7 en suspensió tractades amb celecoxib o vehicle .....	<b>121</b>
<b>Figura 41.</b> Nivells d'expressió i/o fosforilació de proteïnes implicades en les adhesions focals en les cèl·lules TD20 i HCA7 en suspensió tractades amb celecoxib o vehicle .....	<b>123</b>
<b>Figura 42.</b> Nivells d'expressió d'E-cadherina i $\beta$ -catenina en les cèl·lules TD20 i HCA7 en suspensió tractades amb celecoxib o vehicle .....	<b>123</b>
<b>Figura 43.</b> Corbes dosi-resposta de l'efecte del celecoxib en les cèl·lules TD20 i HCA7 en suspensió amb i sense preincubació amb Wortmannin .....	<b>124</b>
<b>Figura 44.</b> Efecte de l'inhibidor de Src, PP2, en la viabilitat de les cèl·lules TD20 i HCA7 cultivades en suspensió.....	<b>125</b>
<b>Figura 45.</b> Corbes dosi-resposta de l'efecte del celecoxib en les cèl·lules TD20 i HCA7 amb i sense pretractament amb PP2.....	<b>126</b>

<b>Figura 46.</b> Proteolisi de p130Cas en un fragment de 31KDa en les cèl·lules TD20 i HCA7 en suspensió tractades amb celecoxib o vehicle.....	126
<b>Figura 47.</b> Immunofluorescència de p130Cas en cèl·lules TD20 i HCA7 en suspensió control o tractades amb celecoxib.....	127
<b>Figura 48.</b> El celecoxib redueix el volum tumoral en tumors TD20 implantats en localització subcutània i ortotòpica .....	130
<b>Figura 49.</b> Efecte del celecoxib en la reducció del pes total tumoral i en el percentatge de necrosi macroscòpica en tumors TD20 implantats en localització subcutània i ortotòpica ....	132
<b>Figura 50.</b> Anàlisi de la necrosi microscòpica dels tumors control i tractats amb celecoxib implantats subcutàniament i ortotòpicament.....	134
<b>Figura 51.</b> Anàlisi de la inducció d'apoptosi en tumors controls i tractats amb celecoxib implantats subcutàniament i ortotòpicament.....	134
<b>Figura 52.</b> Pes dels animals durant els experiments subcutanis i ortotòpics .....	135
<b>Figura 53.</b> Anàlisi de l'expressió i activació de caspasa-9 i de proteolisi de PARP en tumors ortotòpics control i tractats amb celecoxib .....	136
<b>Figura 54.</b> Anàlisi de l'expressió i activació de caspasa-9 i de proteolisi de PARP en tumors subcutanis control i tractats amb celecoxib .....	137
<b>Figura 55.</b> Anàlisi de l'expressió i activació de Fak i Src i d'expressió i proteolisi de p130Cas en un fragment de 31KDa en tumors ortotòpics control i tractats amb celecoxib ...	138
<b>Figura 56.</b> Anàlisi de l'expressió i activació de Fak i Src i d'expressió i proteolisi de p130Cas en un fragment de 31KDa en tumors subcutanis control i tractats amb celecoxib ..	138
<b>Figura 57.</b> Estructura química del celecoxib i dels nous compostos derivats .....	140
<b>Figura 58.</b> Efecte del celecoxib a diferents temps d'exposició en les cèl·lules TD20 .....	141
<b>Figura 59.</b> Efecte del celecoxib a 4h i 60h d'exposició en les cèl·lules PC3 .....	142
<b>Figura 60.</b> Valors d'IC <sub>50</sub> dels nous compostos en les cèl·lules TD20 i PC3 .....	144
<b>Figura 61.</b> Inducció d'apoptosi causada pel celecoxib i els nous compostos en TD20 .....	147
<b>Figura 62.</b> Inducció d'apoptosi causada pel celecoxib i els nous compostos en PC3 .....	149
<b>Figura 63.</b> Anàlisi del nivell d'expressió i activació de caspases i proteolisi de PARP en cèl·lules TD20 control i tractades amb els nous compostos .....	152
<b>Figura 64.</b> Anàlisi del nivells d'expressió de proteïnes de la família Bcl-2 en cèl·lules TD20 control i tractades amb els nous compostos .....	152
<b>Figura 65.</b> Percentatge de cèl·lules en suspensió a les 15h de tractament amb celecoxib i compostos relacionats en les cèl·lules TD20 i PC3.....	154
<b>Figura 66.</b> Anàlisi del nivell d'expressió de proteïnes de les adhesions focals en cèl·lules TD20 control i tractades amb els nous compostos.....	155
<b>Figura 67.</b> Proteolisi de p130Cas en un fragment de 31KDa en cèl·lules TD20 control i tractades amb els nous compostos .....	156

<b>Figura 68.</b> Immunofluorescència de p130Cas en cèl·lules TD20 control i tractades amb E6122 i E6165.....	<b>157</b>
<b>Figura 69.</b> Valors d'IC <sub>50</sub> dels compostos E6122 i E6165 en cèl·lules TD20 transfectades amb pcDNA3 i p130Cas .....	<b>159</b>
<b>Figura 70.</b> Model molecular de l'efecte del celecoxib .....	<b>176</b>

## **ABREVIATURES**

**5-FU** : 5-Fluorouracil

**AINEs** : Antiinflamatoris No Esteroidals

**AOM** : Azoxymethane

**APC** : Adenomatous Polyposis Coli

**bHLH**: Basic Helix Loop Helix

**CAS** : Crk Associated Substrate

**CCHNP** : Càncer Colorectal Hereditari no Poliposi

**CCR** : Càncer Colorectal

**CDK** : Cyclin Dependent Kinase

**CIN** : Inestabilitat Cromosòmica

**COX-1** : Ciclooxygenassa-1

**COX-2** : Ciclooxygenassa-2

**CSK** : C-terminal SRC kinase

**DCC**: Deleted in Colorectal Cancer

**DMSO** : Dimethyl Sulfoxide

**DPC4** : Deleted in Pancreatic Cancer locus 4

**ECM** : Matriu Extracel.lular

**EGFR** : Epidermal Growth Factor Receptor

**ERK** : Extracellular Signal-Regulated Kinase

**FAK** : Focal Adhesion Kinase

**FDA** : Food and Drug Administration

**GSK3b** : Glycogen synthase kinase  $\beta$

**HHT** : àcid hidroxieptadecatrienoic

**ICE** : Interleukin-1 $\beta$  Converting Enzyme

**ILK** : Integrin Linked Kinase

**JNK** : c-Jun N-terminal kinase

**LV** : Leucovorín Càlcic

**MAPK** : Mitogen Activated Protein Kinase

**MIN** : Inestabilitat de Microsatèl.lits

**MMR** : Mismatch repair

**PARP** : Poly(ADP-Ribose) Polymerase

**PCF** : Poliposi Còlica Familiar

**PCNA** : Proliferating Cell Nuclear Antigen

**PG** : Prostaglandina

**PI3K** : Phosphatidylinositol-3 kinase

**PKB** : Protein Kinase B

**PTP-PEST**: Protein Tyrosine Phosphatase-PEST

**SFKs** : Src Family Kinases

**TGF $\beta$**  : Tumor Growth Factor  $\beta$

**TXA<sub>2</sub>** : Tromboxà A<sub>2</sub>

**VEGFR** : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

# INTRODUCCIÓ

---

# 1. CÀNCER

## 1.1 DEFINICIÓ

El càncer és una malaltia d'origen genètic que agrupa una diversitat de patologies que tenen en comú el creixement descontrolat de cèl·lules que adquireixen capacitat invasiva i metastàtica. El càncer és el resultat de dos processos successius: l'augment de la proliferació d'un grup de cèl·lules que formaran un tumor i, posteriorment, l'adquisició de capacitat invasiva que els permet migrar i proliferar en d'altres òrgans o teixits donant lloc a metastasi. Els tumors que no tenen capacitat invasiva i no formen metastasi s'anomenen **tumors benignes o adenomes**, mentre que els que són capaços d'envair i formar metastasi en els teixits circumdants o distants, després d'entrar en el sistema sanguini o limfàtic, s'anomenen **tumors malignes o càncers**.

Els càncers es classifiquen segons el teixit i tipus cel·lular a partir del que s'han originat. El 90% dels càncers són generats per cèl·lules epitelials i s'anomenen **carcinomes**. Els càncers derivats de cèl·lules del teixit conjuntiu o muscular són els **sarcomes**. Les **leucèmies, limfomes i mielomes** s'originen de cèl·lules del sistema hematopoètic i els **neuroblastomes i gliomes** deriven de cèl·lules del sistema nerviós.

El càncer té un origen monoclonal. Totes les cèl·lules que formen un tumor benigne o maligne deriven d'una única cèl·lula que ha adquirit una alteració que li confereix un avantatge proliferatiu respecte a les cèl·lules veïnes. Després, es donen mutacions addicionals i té lloc una evolució, seleccionant-se les cèl·lules amb característiques més agressives.

## 1.2 ONCOGENS I GENS SUPRESSORS DE TUMORS

Les mutacions causants dels processos tumorals es donen en, al menys, dos tipus de gens: els protooncogens i els gens supressors de tumors .



### **1.2.1 Els Oncogens**

Són formes mutades de gens normals anomenats protooncogens que confereixen un guany dominant de funció que contribueix a que la cèl·lula esdevingui tumoral. La funció d'aquests gens acostuma a estar relacionada amb la regulació de la proliferació cel·lular i l'apoptosi. La seva mutació estimula el creixement, la invasivitat i les característiques malignes de les cèl·lules tumorals. L'activació dels oncogens pot donar-se per diferents mecanismes (mutacions puntuals, delecions, translocacions, amplificacions) que produeixen una sobreexpressió o alteració de la funció de la proteïna. Dins d'aquest grup hi ha els receptors amb activitat tirosina-quinasa (ex: EGFR), membres de les cascades de transducció de senyals (ex: Ras, Crk, Akt), factors de transcripció (ex: c-myc, c-jun) i proteïnes implicades en el control del cicle cel·lular (ex: Ciclina D1) (Duffy MJ, 1993; Tahara E, 1990; Hunter and Pines, 1994).

### **1.2.2 Els Gens supressors de tumors**

La seva funció normal és controlar el cicle cel·lular, evitant el creixement excessiu i mantenint les característiques de les cèl·lules que especifiquen la seva localització original. Aquests gens indueixen l'aparició del tumor quan, al mutar, deixen d'expressar-se o produeixen una proteïna no funcional. Són gens recessius, en general s'inactiva un al·lel per mutació puntual i l'altre per deleció malgrat que en alguns casos tenen efecte fenotípic en heterozigosi.

Els gens supressors de tumors es divideixen en Gatekeeper i Caretaker (Kinzler and Vogelstein, 1996)

- 1) Els gens **Gatekeeper** controlen la proliferació cel·lular. La seva pèrdua és necessària per a una etapa en la progressió tumoral. Actuen directament impedit el creixement tumoral i en restaurar la seva funció es reverteix el fenotip tumoral. Dins d'aquest grup hi ha els gens adenomatous polyposis coli (Apc) i Dpc4/Smad4, implicats en els tumors colorectals (Kinzler and Vogelstein, 1996; Takaku et al., 1998).

- 2) Els gens **Caretaker** mantenen l'estabilitat del genoma i són responsables de corregir els errors que es produeixen durant la replicació de l'ADN. La seva mutació condueix a l'acumulació de múltiples errors en el genoma, fet que es coneix amb el nom de fenotip mutador. Dins d'aquest grup hi ha gens de reparació de l'ADN com MSH2 i MLH1, implicats en els tumors colorectals, (Kinzler and Vogelstein, 1996) , la quinasa ATM (Canman and Lim, 1998) i BRCA (Li et al., 2000). També formen part d'aquest grup gens del checkpoint mitòtic, com BUB1 i BUBR1 (Cahill et al., 1998), que en mutar-se produeixen inestabilitat cromosòmica i afavoreixen l'aparició de noves mutacions.

## **2. CÀNCER COLORECTAL**

### **2.1 EPIDEMIOLOGIA DEL CÀNCER COLORECTAL**

En els països desenvolupats, el càncer és la segona causa de mort, provocant que una de cada cinc persones mori degut a aquesta malaltia. El càncer colorectal (CCR) és la quarta forma de càncer més freqüent a nivell mundial. A Catalunya, l'any 2000 es diagnosticaren 27.500 nous casos de càncer dels quals 3.980 foren CCR. Del total de càncers diagnosticats, la freqüència relativa del CCR ocupa el tercer lloc en homes (després del càncer de pulmó i de pròstata) i el segon lloc en dones (després del de mama). En termes de taxa d'incidència bruta, per cada 100.000 homes apareixen 62 casos nous de CCR en un any, taxa lleugerament superior a la de les dones, que és de 56.6 casos per cada 100.000 dones/any (Borràs JM et al., 2001). A Catalunya suposa, anualment, l'aparició de 1.800 casos nous en els homes i 1.500 en les dones, essent responsable d'unes 830 i 470 morts respectivament (Borràs JM et al. 1997).

Les dades de mortalitat per CCR ens indiquen la gravetat del seu impacte en la població. A Catalunya, així com a la resta de la Unió Europea, el CCR és la segona causa de mort per càncer tant en homes com en dones (Maestro de las Casas et al., 1997). En homes, la mortalitat per CCR és una mica superior que en les dones: en termes de taxa bruta suposa 34 defuncions/100.000 habitants per any en homes i 27.6 defuncions/100.000 habitants per any en dones. S'estima que anualment es produeixen 394.000 morts per CCR a tot el món.

### **2.2 ESTADIATGE DEL CÀNCER COLORECTAL**

El paràmetre més valorat a l'hora de determinar el potencial maligne dels tumors i que té més capacitat pronòstica és el grau d'extensió tumoral a través de les diferents capes de la paret intestinal. L'any 1932, Dukes i col·laboradors, van establir un criteri de classificació dels tumors colorectals en funció del grau d'invasió que presenten. Segons aquest criteri es classifiquen els tumors en quatre tipus :

- **Dukes A** : L'avanç del tumor es limita a la mucosa o submucosa.
- **Dukes B** : El tumor envaeix la capa muscular inferior o la subserosa però no afecta els ganglis limfàtics.
- **Dukes C** : El tumor presenta invasió dels ganglis limfàtics.
- **Dukes D** : El tumor produeix invasió dels òrgans distants.

Posteriorment, es va desenvolupar el sistema d'estadiatge TNM (Hutter et al., 1986) pel CCR que és més complet però més difícil d'utilitzar. Aquest sistema de classificació considera paràmetres clínics, radiològics i d'anatomia patològica classificant els tumors en quatre estadis diferents (**Taula 1**).

**Taula 1.** Classificació del càncer colorectal pel sistema TNM

<b>Estadi I</b>	T1	N0	M0
	T2		
<b>Estadi II</b>	T3	N0	M0
	T4		
<b>Estadi III</b>	Qualsevol T	N1,2	M0
<b>Estadi IV</b>	Qualsevol T	N3	M+

<b>T1 :</b>	Invasió fins a la submucosa
<b>T2 :</b>	Invasió parcial de la muscular pròpia
<b>T3 :</b>	Si hi ha serosa : Envaeix la muscular pròpia fins la subserosa o la serosa (sense sobrepassar-la) o la grassa pericòlica (sense sobrepassar el mesenteri). Si no hi ha serosa : Envaeix la muscular pròpia.
<b>T4 :</b>	Si hi ha serosa : infiltra el peritoneu o infiltra, a través seu, òrgans o estructures veïnes (inclou la invasió d'un altre segment colorectal a través de la serosa) El tumor envaeix directament altres òrgans o estructures i/o perfora el peritoneu. Si no hi ha serosa : envaeix altres òrgans (vagina, pròstata, urèter, ronyó...)
<b>N0:</b>	Els ganglis limfàtics no estan afectats
<b>N1 :</b>	1-4 ganglis positius
<b>N2 :</b>	>4 ganglis positius
<b>N3 :</b>	Metàstasi en qualsevol gangli situat sobre trajectes vasculars.
<b>M0 :</b>	No hi ha metàstasi a distància
<b>M+ :</b>	Metàstasi a distància (fetge, peritoneu, pulmó, cervell, ossos)

T es refereix a l'estat del tumor primari, N al nombre de ganglis limfàtics afectats i M a la disseminació metastàtica.

Aquestes classificacions tenen una importància clínica elevada ja que tenen capacitat pronòstica i determinen l'abordatge terapèutic que seguirà el malalt en funció de l'estadi del tumor.

### **2.3 EL CÀNCER COLORECTAL ESPORÀDIC**

La majoria de càncers colorectals (CCR) es donen de forma esporàdica (85%) essent un dels principals factors de risc les dietes riques en greixos i pobres en fibra, fruites i verdures així com l'excés de consum d'alcohol (Trock B et al., 1990; Giovannucci et al., 1993). L'edat mitjana al diagnòstic és de 68 anys en homes i de 70 en dones. La probabilitat acumulada de desenvolupar CCR abans dels 75 anys és d'1 de cada 54 en homes i d'1 de cada 56 dones (aproximadament 2%).

El CCR no es dona amb la mateixa freqüència en tot el món (Boyle and Langman, 2000). El CCR és característic de països desenvolupats i occidentals, en els quals s'ha observat un augment lent, però constant, de la incidència. Aquest increment podria ser atribuït als factors de risc ambientals relacionats amb la seva aparició, especialment la dieta.

Les variacions en quant a freqüència del CCR en les diferents poblacions evidencien el paper fonamental dels factors ambientals en l'etiologia del CCR (Viñes et al., 2003). Dins dels factors ambientals podem incloure la dieta, l'estil de vida, les pràctiques socioculturals, les condicions medioambientals... Es calcula que un 70-80% dels CCR poden atribuir-se a aquests factors. Això situa al CCR com un dels principals càncers en el que les causes poden ser identificades i en el que es podria evitar una gran proporció amb estratègies preventives.

### **2.4 EL CÀNCER COLORECTAL HEREDITARI**

Els càncers colorectals amb component hereditari suposen aproximadament el 15% dels diagnosticats malgrat que només el 3-5% dels casos es donen en el context de síndromes familiars ben definits genèticament.

Les dues síndromes hereditaris més freqüents i ben estudiades són: la Poliposi Còlica Familiar (PCF) i el Càncer Colorectal Hereditari No Poliposi (CCHNP). La classificació en aquestes síndromes es fa depenent de la presència o absència de múltiples pòlips en el còlon i el recte (Lynch et al., 2003) .

#### **2.4.1 Poliposi Còlica Familiar (PCF)**

És una malaltia hereditària autosòmica dominant que causa l'aparició de centenars a milers de tumors colorectals (pòlips adenomatosos o adenomes) durant els primers 20 o 30 anys de vida. Malgrat tractar-se de tumors benignes, el fet de que apareixen en gran quantitat gairebé garanteix que alguns acabaran progressant donant lloc a carcinomes de tal manera que, si no s'efectua tractament quirúrgic, la pràctica totalitat de malalts desenvoluparan CCR abans dels 50 anys. Els pacients de PCF també tenen major risc de patir càncer de tiroides, intestí prim, estómac i cervell (Giardiello FM, 1995; Hamilton et al., 1995).

#### **2.4.2 Càncer Colorectal Hereditari no Poliposi (CCHNP)**

Aquesta síndrome es caracteritza per una predisposició hereditària autosòmica dominant al CCR no associada a la presència d'un excés de pòlips. El CCHNP dóna lloc a l'aparició d'adenomes en el còlon a edats més joves que en la població general i amb més rapidesa de transformació maligna. L'edat mitjana d'aparició és als 45 anys.

El desenvolupament precoç de CCR es localitza predominantment en el còlon dret i té una elevada tendència a presentar lesions sincròniques (múltiples càncers colorectals durant els sis mesos posteriors a la ressecció quirúrgica) o metacròniques (aparició de càncer colorectal més de sis mesos després de la cirurgia) (Lynch et al., 1999). També s'associa a un risc incrementat de tumors extracolònics, especialment endometri, tracte urinari superior (pelvis renal i urèter), budell prim, ovari, estómac, pàncreas, cervell i tumors cutanis (Watson and Lynch, 1994 ; Aarnio et al., 1999).

Actualment el diagnòstic clínic d'aquesta síndrome es basa en el compliment dels anomenats criteris d'Amsterdam I i II o els criteris de Bethesda (Vasen et al., 1991; Vasen et al., 1999; Rodriguez-Bigas et al., 1997) (**Taula 2**).

**Taula 2.** Criteris d'Amsterdam I, II i de Bethesda per al diagnòstic de CCHNP

<b>CRITERIS D'AMSTERDAM I (l'individu els ha de complir TOTS)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>→ 3 o més familiars amb CCR (confirmació histopatològica), un d'ells familiar de 1r grau dels altres dos (i exclusió de PCF)</li><li>→ 2 generacions successives afectes</li><li>→ 1 o més CCR diagnosticats abans dels 50 anys</li></ul>
<b>CRITERIS AMSTERDAM II (l'individu els ha de complir TOTS)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>→ 3 o més familiars amb CCR o un tumor associat a CCHNP, un d'ells familiar de 1r grau dels altres dos</li><li>→ 2 generacions successives afectes</li><li>→ 1 o més tumors diagnosticats abans dels 50 anys</li></ul>
<b>CRITERIS DE BETHESDA (l'individu ha de complir un d'ells)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>→ Individus de famílies que compleixen els criteris d'Amsterdam</li><li>→ Individus amb 2 càncers associats a CCHNP (incloent CCR metacrònic o sincrònic o tumors extracolònics)</li><li>→ Individus amb CCR i un familiar de 1r grau amb CCR i/o un tumor associat a CCHNP (un d'ells diagnosticat abans dels 45 anys) i/o un adenoma colònic (diagnosticat abans dels 40 anys)</li><li>→ Individus amb CCR o càncer d'endometri diagnosticat abans dels 45 anys</li><li>→ Individus amb CCR dret, indiferenciat, diagnosticat abans dels 45 anys</li><li>→ Individus amb CCR en cèl·lules en anell de segell, abans dels 45 anys</li><li>→ Individus amb adenomes colònics diagnosticats abans dels 40 anys</li></ul>

### **3. MECANISMES MOLECULARS EN LA PATOGÈNESI DEL CCR**

#### **3.1 BASES GENÈTIQUES DEL CÀNCER COLORECTAL**

El CCR és un bon model per estudiar les alteracions genètiques implicades en el desenvolupament de les neoplàsies. Això és degut a que la majoria de tumors colorectals malignes (carcinomes) provenen de tumors benignes preexistents (adenomes) i a que és possible obtenir mostres de tumors en diversos estadis de desenvolupament des d'adenomes molt petits fins a carcinomes metastàtics. A més, en el desenvolupament del CCR hi contribueixen tant factors hereditaris com ambientals i això permet l'estudi de les alteracions genètiques heretades i de les somàtiques.

Durant el progrés del CCR es dona una acumulació progressiva d'alteracions genètiques i epigenètiques que causen la transformació de les cèl·lules de l'epiteli colònic. La pèrdua de l'estabilitat genòmica és un pas clau en el procés tumorogènic que crea un ambient permissiu per a que es donin mutacions de gens supressors de tumors i oncogens (Grady WM, 2004). El CCR pot presentar, al menys, dos tipus d'instabilitat genòmica: **instabilitat de microsatèl.lits** i **instabilitat cromosòmica**.

##### **3.1.1 Inestabilitat de microsatèl.lits (MIN)**

Aquests tumors es caracteritzen per la presència de múltiples mutacions que afecten preferentment a fragments repetitius d'ADN (microsatèl.lits) distribuïts al llarg del genoma. Aquest fenomen s'anomena **instabilitat de microsatèl.lits** i és degut a una acumulació d'errors en la replicació de l'ADN causada per la mutació dels gens implicats en la reparació de desaparellaments (Mismatch repair, MMR). S'han identificat mutacions de diversos gens de reparació: hMSH2, hMLH1, hMSH6, hPMS1, hPMS2. (Leach et al., 1993). La presència de mutacions en aquests gens comporta que la cèl·lula tingui un mecanisme reparador de desaparellament deficient el que es tradueix en l'acumulació de mutacions somàtiques a dos nivells. Per una banda, a nivell de microsatèl.lits, la majoria dels quals estan localitzats en ADN intrònic i, conseqüentment, la seva afectació no té



significat patològic. D'altra banda, els errors de replicació també poden afectar a unitats repetitives d'ADN incloses dins els marcs de lectura de diferents gens (APC, TGFBR2, bax...) els quals juguen papers claus en la regulació de la proliferació, diferenciació o mort cel·lular. La presència d'instabilitat de microsatèl·lits s'associa a un millor pronòstic (González-García et al., 2000) i també a una major resistència al tractament quimioteràpic convencional (Kavanagh et al., 1995).

Una minoria dels CCR esporàdics (15%) presenten instabilitat de microsatèl·lits mentre que la inactivació del sistema MMR causada per mutacions germinals dona lloc a la síndrome de CCHNP ( Nicolaidis et al., 1994).

### **3.1.2 Inestabilitat cromosòmica (CIN)**

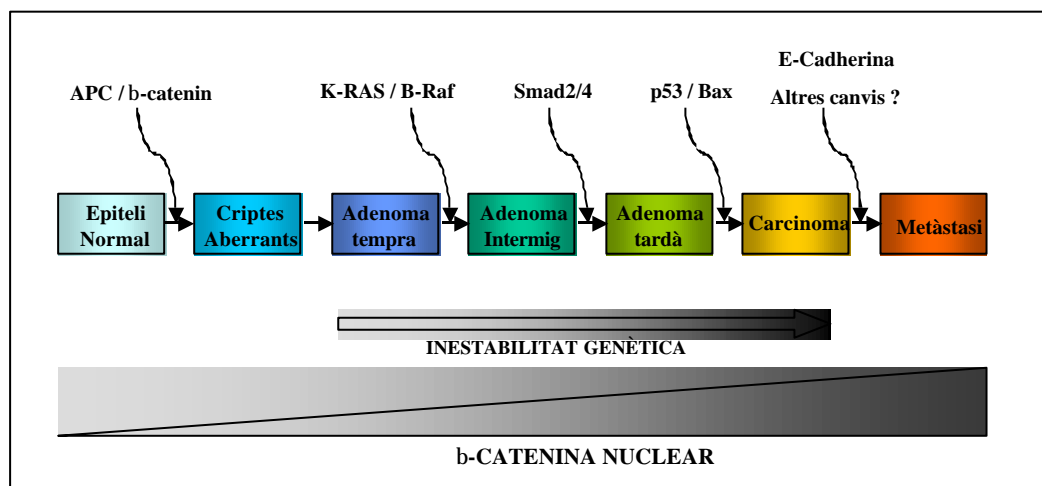
La instabilitat cromosòmica (CIN) és el tipus d'instabilitat genòmica més freqüent en el CCR i s'observa en, aproximadament, el 85% dels tumors. Els càncers amb CIN són aneuploides i presenten una taxa de pèrdues i guanys cromosòmics molt elevada (Eshleman et al., 1998; Lengauer et al., 1997). S'han identificat patrons específics de guanys i pèrdues cromosòmiques que es donen en la progressió d'adenoma-carcinoma i s'ha demostrat que l'adquisició de CIN és un aconteixement temprà en la formació del tumor que augmenta amb la progressió tumoral (Ried et al., 1999; Rooney et al., 1999; Hermsen et al., 2002). Malgrat això, els mecanismes responsables de la CIN només s'han identificat en un petit percentatge dels CCR. Algunes de les possibles causes de l'adquisició de CIN són l'alteració de proteïnes implicades en els checkpoints que regulen la replicació de l'ADN (Cahill et al., 1998; Myung et al., 2001) i l'alteració dels telòmers (Maser and Depinho, 2002).

Fearon i Vogelstein (1990) van proposar un model genètic pel desenvolupament de la tumorigènesi colorectal que implica, fonamentalment, la via de la instabilitat cromosòmica. Aquest model inclou els següents punts:

1. Els tumors colorectals apareixen com a resultat de l'activació mutacional d'oncogens juntament amb la inactivació mutacional de gens supressors de tumors. Es requereixen menys alteracions per l'aparició de tumors benignes que per l'aparició de carcinomes.

2. Es requereix la mutació de 4 ó 5 gens, com a mínim, per a la formació d'un tumor maligne.
3. Malgrat que les alteracions genètiques acostumen a tenir lloc seguint un ordre determinat, el més important per a determinar les propietats biològiques del tumor és l'acumulació total dels canvis i no pas l'ordre en el que es donen els mateixos.
4. En alguns casos, la mutació de gens supressors de tumors dona un efecte fenotípic tot i presentar-se en heterozigosi, per tant, alguns gens supressors de tumors no serien recessius a nivell cel·lular.

Segons aquestes premisses i partint de diversos estudis en els que s'analitzaven les freqüències de les alteracions genètiques recurrents en tumors colorectals, es va dissenyar un model de la tumorigènesis colorectal identificant l'aparició de mutacions amb els diferents estadis de la progressió tumoral. Inicialment però, no estaven descrits alguns dels gens implicats sinó només els loci on es veien mutacions. Estudis posteriors han permès identificar les proteïnes codificades en aquests loci. L'esquema actualitzat del model de Vogelstein es presenta en la **Figura 1**.



**Figura 1.** Model de Vogelstein de la tumorigènesis colorectal

Segons aquest model, les alteracions del gen **APC** (Adenomatous Polyposis Coli) són necessàries i suficients pel desenvolupament del tumor epitelial benigne o adenoma. També pot donar-se el cas que aquest gen no estigui mutat però que estiguin alterats d'altres gens de la via de transmissió de senyals Wnt ( $\beta$ -catenina, Tcf4) en la que participa el gen APC (Polakis P, 2000).

El desenvolupament de l'adenoma es modifica en adquirir una mutació de l'oncogen **K-Ras**. Aquestes mutacions s'associen a un creixement tridimensional de l'adenoma, a un augment de la resistència a l'apoptosi i a una major capacitat angiogènica de la cèl·lula tumoral. Més d'un 50% dels adenomes més grans d'un cm tenen mutacions en els codons 12 i 13 de K-ras (Vogelstein et al., 1989).

En la transició d'adenoma intermig a tardà s'ha vist un augment de les pèrdues al·lèliques en la regió 18q21 (Fearon and Vogelstein, 1990; Fearon ER, 1995). Fins al moment s'han descrit dos gens supressors de tumors localitzats en aquest locus: **DCC** (Deleted in Colorectal Cancer) i **Smad4/DPC4** (Deleted in Pancreatic Cancer locus 4). El gen DCC codifica per una proteïna de membrana amb homologia amb les molècules N-CAM. La seva pèrdua pot influir en la motilitat i en la supervivència cel·lular. Aproximadament en el 40% dels adenomes i carcinomes es detecta la deleció de DCC (Fearon and Pierceall, 1995). El gen Samd4 codifica per una proteïna de la via de transducció de senyals iniciada per TGF- $\beta$ . Aproximadament un 20% dels adenomes tenen alteracions d'Smad4 i aquest percentatge és major en els CCR, on s'associa amb disseminació metastàtica (Massagué et al., 2000; Hanahan and Weinberg, 2000).

En la transició adenoma-carcinoma tindria un paper rellevant la mutació del gen supressor de tumors **p53**. Aquest gen codifica per una proteïna reguladora del cicle cel·lular que indueix parada del cicle quan hi ha dany a l'ADN per a que es pugui reparar. Si la cèl·lula no aconsegueix reparar el dany, a causa de l'excessiva acumulació de mutacions, p53 indueix l'apoptosi. Entre el 50-70% dels CCR tenen mutacions d'aquest gen (Baker et al., 1989).

En la transició d'adenoma ben diferenciat a carcinoma invasiu molts tumors perden l'expressió d'E-cadherina. Aquesta proteïna té un paper fonamental en les unions intercel·lulars. En general, la disminució de la funció d'E-cadherina correlaciona amb desdiferenciació, creixement tumoral invasiu i metàstasi (Birchmeier and Behrens, 1994).

Les mutacions germinals del gen d'Apc causen la síndrome de PCF. A finals dels 80 es va demostrar que la malaltia estava lligada a marcadors en el cromosoma 5q21 (Bodmer et al., 1987; Leppert et al., 1987) i va ser l'any 1991 quan finalment es va identificar el gen Apc com a causant d'aquesta síndrome en demostrar-se la cosegregació d'al·lels mutants d'Apc en germans bessons afectats (Grodén et al., 1991; Nishisho et al., 1991). La presència de mutacions germinals en aquest gen ha permès el diagnòstic molecular de la malaltia i, consegüentment, la seva aplicació en el cribatge familiar.

Malgrat que el model de Vogelstein de la tumorigènesis colorectal ha estat àmpliament acceptat durant molts anys, actualment hi ha alguns autors que no recolzen aquest model perquè no podria explicar tots els càncers. D'altres, en canvi, continuen afirmant que el model seria vàlid només amb algunes modificacions, com ara que no és només important l'acumulació de mutacions sinó que l'ordre seria també determinant (Arends JW, 2000). Només les cèl·lules epitelials colorectals que adquireixen successives alteracions de les vies Wnt, TGF $\beta$  i la mutació de p53, en aquest ordre estricte, obtindrien les condicions òptimes per a la progressió tumoral. D'altres autors proposen un altre model en el que l'alteració inicial en el tumor no seria en la via Wnt sinó causada pel silenciament epigenètic d'altres gens implicats en apoptosi i en mecanismes de reparació de l'ADN (Jass et al., 2002).

## **3.2 VIES DE TRANSDUCCIÓ DE SENYAL ALTERADES EN EL CÀNCER COLORECTAL**

Per entendre el paper funcional de les diferents mutacions descrites en un tipus tumoral concret, és important l'estudi de les alteracions dels productes dels gens afectats en el context de les vies de transducció de senyal en les que participen. A continuació, es descriuen les principals vies implicades en el desenvolupament del CCR, l'alteració de les quals s'ha vist relacionada amb les diferents etapes de la progressió tumoral.

### **3.2.1 La via Wnt**

La via Wnt (**Figura 2**) està implicada en diversos processos de diferenciació durant el desenvolupament embrionari i la seva activació permanent dóna lloc a la formació de tumors. Aquesta via té un important paper en: especificació del destí cel·lular, proliferació, migració, polaritat i mort cel·lular (Moon and Kimelman, 1998 ; Wodarz and Nusse, 1998; Peifer and Polakis, 2000).

### **Components de la Via Wnt:**

- **Fora de la cèl·lula:** Les proteïnes Wnt formen una família de glicoproteïnes secretades que regulen les interaccions cèl·lula-cèl·lula durant l'embriogènesis. El seu mecanisme d'acció s'ha pogut estudiar en diferents sistemes (*Drosophila*, *C.elegans*, en embrions de *Xenopus* i en ratolins) ja que es tracta d'una família de proteïnes altament conservada entre diferents espècies.

Les proteïnes Wnt són secretades i s'uneixen a glicosaminoglicans de la matriu extracel·lular i es mantenen unides a la membrana cel·lular (Bradley and Brown, 1990; Reichsman et al., 1996). L'activació de la via es dona quan les proteïnes Wnt s'uneixen a membres de dues famílies de receptors de membrana, la família Frizzled (Fzd) (Wodarz and Nusse, 1998) i la família de proteïnes relacionades amb el receptor LDL (LRPs) (Bejsovec A, 2000).

- **A la membrana cel·lular:** Els receptors Fzd tenen un domini amino-terminal ric en cisteïnes (CRD) que uneix Wnt, set dominis transmembrana i una petita cua citoplasmàtica que conté un domini PDZ consensus a C-terminal. Hi ha deu membres de Fzd descrits a humans actualment. L'any 2000, noves evidències en *Drosophila*, *Xenopus* i ratolins, indicaren que el receptor FZD s'unia també a un co-receptor de la família LRP (Wehrli et al., 2000; Tamai et al., 2000; Pinson et al., 2000). Les LRPs són proteïnes simples transmembrana que contenen quatre repeticions EGF-like i tres repeticions LDL-receptor type A en el domini extracel·lular. El domini intracel·lular és ric en prolines.

Diferents autors donen suport a un model de coreceptor en el qual LRP5/LRP6 s'unirien a Wnt formant complexos juntament amb Fzd i transduirien el senyal downstream. Una de les observacions que recolzen aquest model seria que hi ha una proteïna inhibidora, Dickkopf-1, que s'uneix a LRP5 o LRP6 inhibint la formació del complex amb Wnt i, per tant, l'activació de la via (Bafico et al., 2001).

- **Al citoplasma:** Després de la unió de Wnt, la proteïna axin és translocada a la membrana on interacciona amb la cua intracel·lular de LRP-5 (Mao et al., 2001). Alhora, la unió de Wnt al receptor Fzd produeix la hiperfosforilació de Dishevelled que fosforila i inhibeix l'activitat de GSK3 $\beta$  (Yanagawa et al., 1995). Aleshores,  $\beta$ -catenina és

defosforilada, queda lliure al citoplasma i es dirigeix cap al nucli on activarà la transcripció de diversos gens.

En absència de senyalització per Wnt, GSK3 $\beta$  fosforila  $\beta$ -catenina en 4 residus amino-terminals, (Behrens et al., 1998; Kishida et al., 1998; van Noort et al., 2002) marcant-la per a que s'uneixi a la proteïna  $\beta$ -TrCP, sigui ubiquitinitzada i posteriorment degradada per la via del proteosoma (Hart et al., 1999). Abans de la fosforilació de  $\beta$ -catenina per GSK3 $\beta$ , CKI fosforila  $\beta$ -catenina a Ser-45 creant un "priming site" que és necessari i suficient per a que GSK3- $\beta$  pugui fosforilar en Thr41, Ser37 i Ser33 (Amit et al., 2002; Liu et al., 2002). El complex de degradació de  $\beta$ -catenina està format per GSK3 $\beta$ , axin i APC. Axin i APC formen una estructura que permet a GSK3 $\beta$  fosforilar  $\beta$ -catenina però també axin i APC. La fosforilació d'axin és important per la seva estabilitat (Yamamoto et al., 1999) i serveix com a estructura per a unir GSK3 $\beta$ , CKI, APC i  $\beta$ -catenina.

**APC** és una proteïna de 312 KDa que té múltiples funcions en migració cel·lular, adhesió, regulació del cicle cel·lular i estabilitat cromosòmica (Peifer and Polakis, 2000). El seu paper crític en tumorigènesis recau en la seva funció com a regulador negatiu de la via Wnt (Fodde R, 2002). Malgrat això, s'ha vist que APC no és absolutament necessari per al correcte funcionament del complex de degradació de  $\beta$ -catenina ja que la sobreexpressió d'axin pot compensar l'absència d'APC funcional (Nakamura et al., 1998; Hart et al., 1998). A més del paper estructural, APC també té la capacitat de capturar i acompanyar la  $\beta$ -catenina nuclear cap al complex de degradació citoplasmàtic (Henderson BR, 2000; Rosin-Arbesfeld et al., 2000)

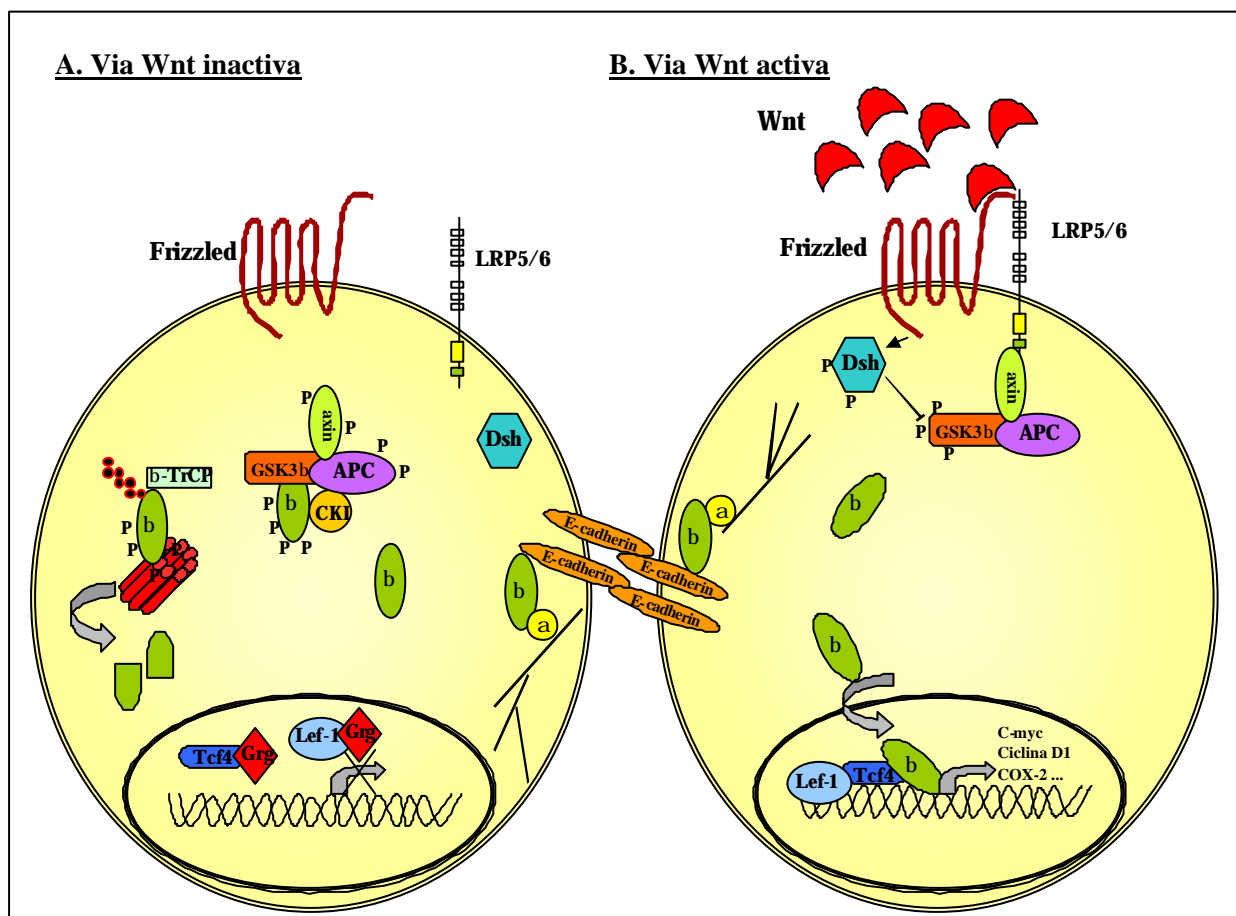
**$\beta$ -Catenina** és l'ortòleg a mamífers de la proteïna Armadillo de *Drosophila* i és la peça clau de la senyalització de la via Wnt. Va ser descrita originalment com un component de les unions adherents on uneix E-cadherina amb  $\alpha$ -catenina i, consegüentment, la xarxa de microfilaments d'actina del citoesquelet (Nagafuchi and Takeichi, 1989; Cowin P, 1994). Gran part d'aquesta proteïna està ocupada per 12 repeticions en tàndem anomenades repeticions Arm que medien les interaccions proteïna-proteïna amb cadherines, APC, axin i TCF (Huber et al., 1997; von Kries et al., 2000).

- **En el nucli :** Quan hi ha senyalització per la via Wnt,  $\beta$ -catenina entra al nucli però no s'uneix directament a l'ADN sinó que actua com un cofactor essencial dels factors de transcripció TCF/LEF activant la transcripció de diversos gens.

La família de factors **TCF/LEF** té quatre membres : TCF1, LEF1, TCF3 i TCF4 que foren identificats originalment com a factors de transcripció específics de cèl·lules limfoides (Travis et al., 1991; van de Wetering et al., 1991). Aquestes proteïnes tenen una caixa HMG (high mobility group) que uneix l'ADN de manera específica de seqüència i el doblega (Giese et al., 1992). S'han descrit diversos gens diana regulats per TCF/LEF: c-myc (He et al., 1998), ciclina D1 (Tetsu and McCormick, 1999), PPAR $\delta$  (He et al., 1999), MDR-1, MMP7, COX-2 i gastrin (Wong and Pignatelli, 2002).

En absència de senyalització per Wnt, TCF/LEF s'uneixen a una família de proteïnes anomenades Groucho que actuen com repressors transcripcionals (Roose et al., 1998; Brantjes et al., 2001), ajudant a mantenir silenciats els gens diana de TCF reclutant histones deacetilasses que condensen la cromatina (Chen et al., 1999).

Un alt percentatge de tumors colorectals presenten la via Wnt permanentment activada degut a la mutació de diferents proteïnes (APC,  $\beta$ -catenina, Tcf4), l'efecte final comú és sempre l'estabilització i translocació a nucli de la  $\beta$ -catenina (Polakis P, 2000).



**Figura 2.** Regulació de la via Wnt inactiva (A) i activa (B).  $\beta$ =  $\beta$ -catenina;  $\alpha$ =  $\alpha$ -catenina

### 3.2.2 La via K-Ras

Els gens ras es van identificar com els elements genètics transformants de dos retrovirus que induïen la ràpida formació d'un tumor en els animals infectats: les soques Harvey i Kirsten del virus de sarcoma de rata (Harvey JJ, 1964; Kirsten and Mayer, 1967). Posteriorment, foren aïllats en humans i es van identificar tres gens ras: K-ras, H-ras i N-ras.

Els gens de la família Ras codifiquen per una família de proteïnes altament conservades amb homologia a les proteïnes G (Lowy and Willumsen, 1993). Són proteïnes monomèriques de 21KDa que estan implicades en la transducció de senyals.

La proteïna K-Ras té, al menys, tres dominis: un domini d'unió a GTP/GDP, un domini d'ancoratge a la cara interna de la membrana plasmàtica i un domini d'interacció amb dianes cel·lulars. Quan K-Ras es troba unit a GDP està en forma inactiva, després de l'activació, el GDP és canviat a GTP per proteïnes intercanviadores de nucleòtids (Sos, GRF). K-Ras actiu interacciona amb molècules senyalitzadores downstream per a induir la proliferació cel·lular. Normalment, K-Ras és immediatament desactivat per la hidròlisi intrínseca de GTP que és estimulada per GAP o NF1. Les mutacions oncogèniques de K-Ras inhibeixen la seva activitat GTPàsica permetent que estigui permanentment en estat actiu (Barbacid M, 1987). Les mutacions més comuns de K-ras es donen en els codons 12, 13 i 61 que corresponen a les zones d'unió de GTP/GDP. La conseqüència d'aquestes mutacions és que aproximadament el 30% de la proteïna Ras es troba unida a GTP, fet que significa un guany de funció senyalitzadora, mentre que en les cèl·lules normals només ho fa menys del 0.3% (Scheele et al., 1995).

Ras està implicat en múltiples vies de senyalització essent un punt on convergeixen senyals induïts per factors de creixement, citoquines, hormones, neurotransmissors que actuen a través de receptors de tirosina-quinases (EGFR, PDGFR...). Un cop activat, Ras transmet aquest senyal induint diverses vies reguladores de processos cel·lulars com el cicle cel·lular, l'apoptosi, la reorganització del citoesquelet, adhesió cel·lular i transcripció gènica. Una de les principals funcions de Ras és la transmissió dels senyals provinents dels factors de creixement a través de la via de transducció de senyals de Raf/MAPKK/MAPK que activa diversos substrats implicats en la progressió del cicle, la regulació de l'apoptosi i la transcripció de gens (Malumbres and Pellicer, 1998). Una altra de les vies més



importants activades per Ras és la via de PI3K/Akt. Ras activa la subunitat catalítica de PI3K (p110) que, a través de PKB/AKT, transmet senyals de supervivència cel·lular .

El gen K-Ras és el que es troba més freqüentment mutat en el CCR malgrat que en un petit percentatge també s'han observat mutacions d'N-Ras. El 58% dels adenomes més grans d'un cm tenen mutacions de Ras en comparació amb només un 9% dels adenomes menors d'un cm (Vogelstein et al., 1988). Aquest fet indica que les alteracions de K-Ras promouien el creixement de l'adenoma en etapes tempranes de la progressió tumoral.

### **3.2.3 La via de TGF- $\beta$**

El TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor) és una citoquina secretada que té una gran diversitat d'efectes biològics que inclouen proliferació, diferenciació, migració i apoptosi (Roberts and Sporn, 1990; Massagué J., 1998).

En humans, hi ha tres isoformes de TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3) que són sintetitzades com a proproteïnes precursors. TGF- $\beta$ , un cop processat, senyalitza en forma d'homodímers actius a través de receptors serin/treonin quinassa transmembrana anomenats receptors TGF- $\beta$  tipus I (T $\beta$ RI) i tipus II (T $\beta$ RII) (Franzén et al., 1993; Lin et al., 1992). TGF- $\beta$  s'uneix inicialment a T $\beta$ RII induint el reclutament de T $\beta$ RI i la formació d'un complex heteromèric (Wrana et al., 1994). A continuació, T $\beta$ RII transfosforila T $\beta$ RI i l'activa. L'activació de T $\beta$ RI és causada per la creació d'un lloc d'unió per les proteïnes Smad que són els substrats de T $\beta$ RI (Huse et al., 2001). Les proteïnes Smad es divideixen en tres subfamílies (Heldin et al., 1997):

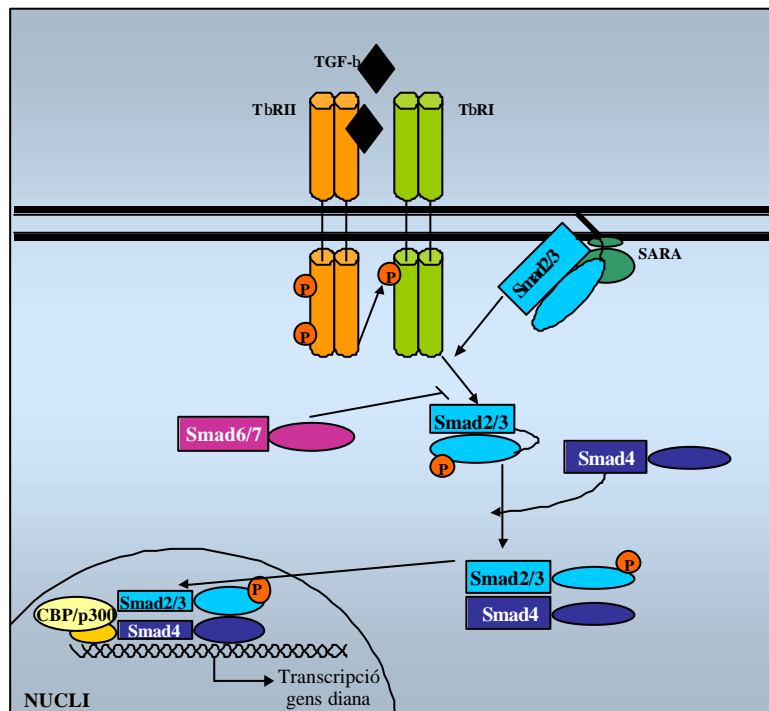
- **R-Smads** (Smads activades per receptors) : Smad 2 i Smad 3
- **Co-Smads** (Smads mediadores ) : Smad4
- **I-Smads** (Smads inhibidores ) : Smad6 i Smad7

Quan la via de TGF $\beta$  no està activada, les proteïnes R-Smad es mantenen unides a la membrana plasmàtica a través de la proteïna SARA (Smad Anchor for Receptor Activation). Aquesta proteïna té un domini d'unió als fosfolípids de la membrana, un domini d'unió a Smads i, a través del domini C-terminal, es manté associada amb T $\beta$ RI (Tsukazaki et al., 1998). Un cop T $\beta$ RI és activat, fosforila els R-Smads que es dissociaran

de la proteïna SARA formant un complexe heteromèric amb Smad4 (Lagna et al., 1996). A continuació, els complexes Smad es transloquen al nucli on s'uneixen amb cofactors i comoduladors d'unió a l'ADN específics per regular la transcripció. Els gens diana dependran de la composició del complexe transcripcional (Massagué and Wotton, 2000).

Els Smads inhibidors interactuen amb T $\beta$ RI activat competint amb els R-Smads i inhibint la seva activació (Hayashi et al., 1997) (**Figura 3**).

L'activitat supressora de tumors de la via de TGF- $\beta$  ve donada, en part, per la seva capacitat d'inhibir el creixement de les cèl·lules epitelials i limfoides, de les quals deriven gran part del càncers. Aquest efecte inhibidor del creixement és causat, en part, per la inhibició de l'expressió de c-myc . Aquesta repressió es dona per la unió del complexe de Smads a un element inhibidor de TGF- $\beta$  que es troba en el promotor de c-myc (Chen et al., 2001). D'altra banda, la via de TGF- $\beta$  indueix l'expressió de p21<sup>CIP1</sup> i p15<sup>INK4b</sup>, dos inhibidors de les cdks que aturen el cicle en la fase G1 (Reynisdottir et al., 1995; Hu et al., 1998). Els components de la via de TGF- $\beta$  més freqüentment mutats en càncer són Smad4, originalment identificat com DPC4 (deleted in pancreatic cancer 4) i el receptor tipus II (T $\beta$ RII) (Massagué et al., 2000; Hanahan and Weinberg, 2000), tot i que, en menor freqüència, també s'han trobat mutacions en Smad2 i el receptor tipus I (T $\beta$ RI) (De Caestecker et al., 2000).



**Figura 3.** Regulació de la via TGF- $\beta$

### **3.2.4 El gen supressor de tumors p53**

p53 és un factor de transcripció que està implicat en el manteniment de l'estabilitat genòmica a través del control del cycle cel·lular i l'apoptosi en resposta a l'estrès genotòxic.

p53 normalment s'expressa en nivells molt baixos i és activat quan hi ha dany a l'ADN que pot ser causat per radiacions  $\gamma$  o ultraviolades o per agents quimioterapèutics (Lane DP, 1993). La seva activació dóna lloc a la transcripció de gens que regulen directament la progressió del cycle cel·lular i l'apoptosi. Entre aquest gens trobem: p21<sup>CIP1</sup>, Gadd45, MDM2, Bax, Ciclina G i molts d'altres (Somasundaram K, 2000). L'expressió d'aquests gens atura la replicació de l'ADN i indueix la seva reparació, si el dany no pot ser reparat, p53 induirà la mort de la cèl·lula per apoptosi (El-Deiry et al., 1994; Smith et al., 1994).

La regulació de p53 es dóna principalment per la proteïna Mdm2 que inhibeix p53 en cèl·lules sense dany a l'ADN. El control de Mdm2 és exercit per tres mecanismes diferents. D'una banda, s'uneix al domini de transactivació de p53 inhibint la seva activitat transcripcional (Mommmand et al., 1992). D'altra banda, Mdm2 també media la ubiquitinització de p53 enviant-la a degradació per la via del proteosoma (Honda and Yasuda, 2000). Finalment, Mdm2 afavoreix la sortida de p53 del nucli perquè conté un senyal d'exportació nuclear (Roth et al., 1998). En resposta a l'estrès cel·lular, p53 es fosforila en residus específics serina-treonina, bloqueja la seva interacció amb Mdm2 i és estabilitzada i activada (Schon et al., 2002). La proteïna ARF també pot unir-se a Mdm2 bloquejant la funció repressora d'aquesta proteïna i induint l'estabilització de p53 (Pomerantz et al., 1998).

p53 és un factor de transcripció amb activitat supressora de tumors. Es localitza en el locus 17p13.1 i es troba mutat en el 50% dels adenocarcinomes de còlon (Vogelstein et al., 1989). No s'han detectat mutacions de p53 en els adenomes de còlon el que indica que seria un procés tardà que mediarà la transició de l'adenoma al carcinoma (Vogelstein et al., 1988). En diferents tipus de tumors també s'ha descrit una sobreexpressió de Mdm2 que inhibiria l'activitat de p53 (Eymin et al., 2002)

### 3.2.5 Senyalització per E-cadherina

Les cadherines constitueixen una família de glicoproteïnes mediadores de les unions cèl.lula-cèl.lula a través d'interaccions homotípiques calci dependents (Takeichi M, 1991). S'han identificat més de 16 molècules de cadherina de les quals les més conegudes són E-cadherina (epitelial) i N-cadherina (neural) (Kemler R, 1992).

La E-cadherina es troba principalment localitzada en les unions de la zonula adherens de les cèl.lules epitelials. La seva part extracel.lular conté tres dominis que s'activen en presència de calci interaccionant amb la molècula d'E-cadherina de la cèl.lula veïna per a formar unions intercel.lulars. El domini citoplasmàtic s'associa amb proteïnes de la família de les catenines (Takeichi M, 1991), concretament amb  $\beta$ -catenina o  $\gamma$ -catenina que s'uniran alhora amb molècules d' $\alpha$ -catenina formant-se així complexos E-cadherina/ $\beta$ -catenina/ $\alpha$ -catenina o bé E-cadherina/ $\gamma$ -catenina/ $\alpha$ -catenina (Hinck et al., 1994).  $\alpha$ -catenina media la interacció entre els complexos cadherina/catenina i el citoesquelet d'actina a través de la seva associació amb  $\alpha$ -actinin (Knudsen et al., 1995) i els filaments d'actina (Rimm et al., 1995) (**Figura 2**).

L'expressió d'E-cadherina és regulada per elements reguladors positius i negatius localitzats en la regió promotora 5' (Behrens et al., 1991; Girolodi et al., 1997). En aquesta regió hi ha tres motius E-box que funcionen com a reguladors negatius d'E-cadherina en unir repressors transcripcionals com els de la família Snail (Cano et al., 2000; Batlle et al., 2000) i Zeb (Comijn et al., 2001). Aquests motius E-box també tindrien una funció reguladora positiva que és mediada pels factors de transcripció bHLH (basic helix loop helix) (Batlle et al., 2000). La família Snail té un paper clau en la repressió de l'expressió d'E-cadherina durant el desenvolupament i la progressió dels carcinomes. Les proteïnes Snail són repressors transcripcionals que s'uneixen a l'E-box del promotor d'E-cadherina a través de dits de Zinc (Cano et al., 2000). S'ha descrit que la funció repressora d'Snail podria ser mediada, en part, per la competència amb factors de transcripció dHLH per la unió de l'E-box (Kataoka et al., 2000).

Els complexos cadherina-catenina també poden ser regulats per fosforilació.  $\beta$ -catenina és fosforilada en tirosines per Src i aquesta modificació produeix el desensamblatge dels complexos cadherina-catenina i la pèrdua de l'adhesió cèl.lula-cèl.lula (Behrens J, 1993; Hamaguchi et al., 1993). A més, EGFR i HGFR també fosforilen  $\beta$ -catenina en tirosines.

En tumors colorectals els nivells de fosforilació en tirosines de  $\beta$ -catenina es troben freqüentment augmentats (Takayama et al., 1998).

El desenvolupament dels carcinomes és en part caracteritzat per l'habilitat de les cèl·lules tumorals de vèncer les unions cèl.lula-cèl.lula i envair d'altres teixits. La funció d'E-cadherina es perd freqüentment durant el desenvolupament de molts càncers epitelials, inclòs el CCR (Birchmeier et al., 1994). Diferents mecanismes poden causar la pèrdua de la funció d'E-cadherina, com la deleció o inactivació mutacional del gen d'E-cadherina (Bracke et al., 1996). En la majoria de carcinomes, la pèrdua d'E-cadherina és causada per la desregulació dels factors de transcripció o per la hipermetilació del promotor (Graff et al., 1998; Cheng et al., 2001). Alteracions en altres proteïnes del complexe d'adhesió cèl.lula-cèl.lula també poden alterar la funció d'E-cadherina. Per exemple, l'expressió d' $\alpha$ -catenina o  $\beta$ -catenina truncades inhibeix la funcionalitat d'E-cadherina (Bullions et al., 1997; Oyama et al., 1994).

### 3.3 LES ADHESIONS FOCALS I EL CÀNCER COLORECTAL

La interacció de les cèl·lules amb proteïnes de la matriu extracel.lular (ECM) genera senyals intracel.lulars importants per la proliferació, supervivència, apoptosi i migració. Aquesta interacció es dona a través d'unes estructures anomenades **adhesions focals**, formades per receptors transmembrana, anomenats **integrines**, i per proteïnes estructurals i senyalitzadores. Les proteïnes estructurals tenen la funció d'unir les integrines amb el citoesquelet d'actina, les més importants són: paxillin, talin,  $\alpha$ -actinin, vinculin i tensin. Les proteïnes senyalitzadores s'uneixen a aquest complexe de proteïnes i, mitjançant successives fosforilacions, activen diverses vies de transducció de senyals necessàries per a la viabilitat cel·lular, les més importants són : FAK, Src, p130Cas, ILK i PI3K.

#### 3.3.1 Components de les adhesions focals :

##### 3.3.1.1 Les Integrines

Els receptors transmembrana de la família de les integrines tenen la funció de transmetre a la cèl·lula els senyals provinents de les proteïnes de la matriu extracel.lular (ECM).

Estructuralment, les integrines estan formades per subunitats  $\alpha$  i  $\beta$  unides en heterodímers donant lloc a més de 20 receptors diferents amb patrons d'expressió específics i que juguen un paper important en molts processos cel·lulars (Schlaepfer and Hunter, 1998). Les integrines no tenen activitat catalítica de manera que els senyals iniciats per la interacció ECM-integrina es transdueixen a l'interior de la cèl·lula a través de l'activació de proteïnes associades. S'han descrit diverses tirosines quinases no receptors que poden ser activades ràpidament per les integrines i que transmeten els senyals a través de l'activació de diferents vies (Guan JL, 1997; Parsons and Parsons, 1997) . Quan les integrines interaccionen amb les proteïnes de l'ECM, s'agrupen en la membrana segrestant les diferents proteïnes que formen les adhesions focals.

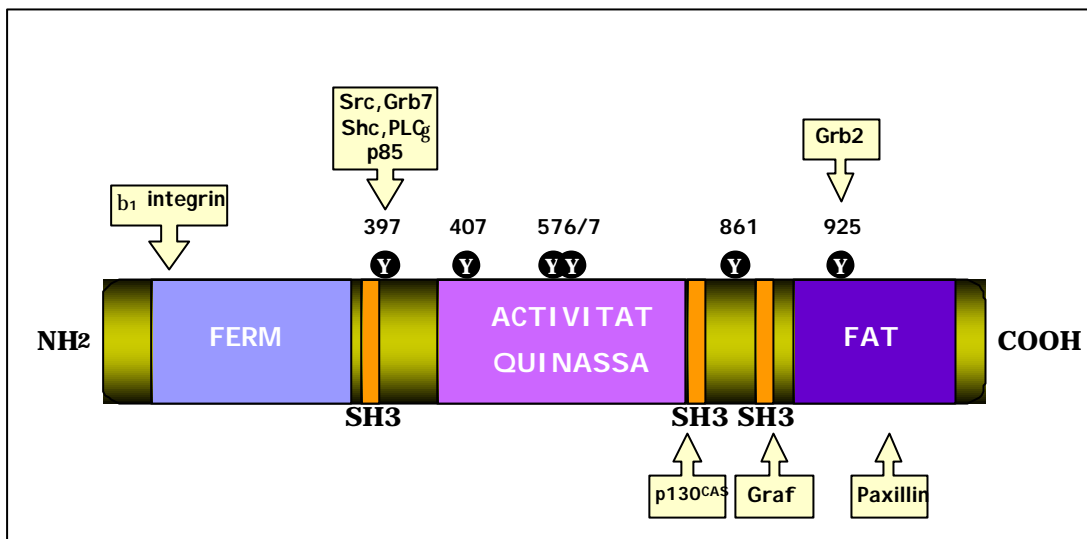
### 3.3.1.2 FAK (Focal Adhesion Kinase)

FAK és una tirosina quinasa no receptora que té papers claus en la regulació de la supervivència, la progressió del cicle i la migració cel·lular. Colocalitza amb les integrines en els contactes focals i la seva activitat augmenta per la unió de la cèl·lula a les proteïnes de l'ECM (Hanks and Polte, 1997).

**Estructura:** FAK és una proteïna amb un pes molecular de 125 KDa, d'estructura molt conservada entre diferents espècies. Té tres dominis: un N-terminal, un domini central amb activitat catalítica i un domini C-terminal (Schaller MD et al., 1992) (**Figura 4**). En el domini N-terminal hi ha una seqüència anomenada FERM implicada en les interaccions amb els dominis citoplasmàtics de receptors transmembrana (Schaller MD, 2001). En el domini C-terminal hi ha una regió anomenada FAT (focal adhesion targetting) que és necessària per la seva localització en els complexos d'adhesió focals a través de la unió amb paxillin, que uneix directament els dominis citoplasmàtics de les integrines, així com amb una altra proteïna del complexe focal, vinculin (Liu et al., 1999; Schaller et al., 1995).

**Activació:** La unió de les integrines a les proteïnes de l'ECM indueix l'activació de FAK per autofosforilació en la Tyr397. Aquest lloc de fosforilació uneix i activa proteïnes amb dominis SH2 com Src, PI3K i PLC $\gamma$  (Schaller MD et al., 1994). Src fosforila aleshores d'altres residus tirosina de FAK en el domini catalític (Tyr407, Tyr576 i Tyr577) i C-terminal (Tyr861 i Tyr925). Les fosforilacions de la Tyr576 i Tyr577 per Src augmenten l'activitat enzimàtica de FAK permetent la creació de nous llocs d'unió per d'altres efectors (Calalb et al., 1995; Eide et al., 1995). La fosforilació de la Tyr925 crea un lloc

d'unió pel domini SH2 de Grb2, una proteïna adaptadora que media l'activació de la via MAPK (Schlaepfer et al., 1994; Chen et al., 1998).



**Figura 4.** Dominis estructurals de FAK i interaccions amb d'altres proteïnes (Y: tirosines fosforilades).

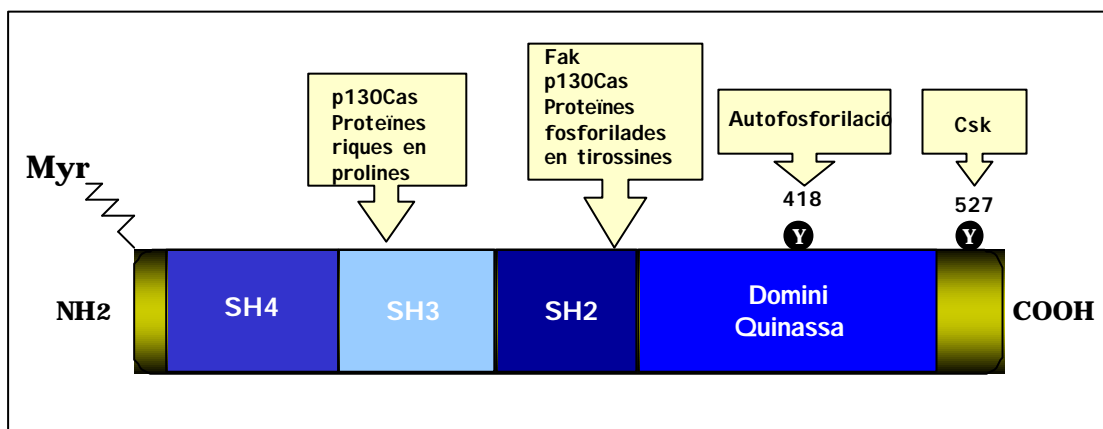
### 3.3.1.3 SRC

Src fou el primer oncogen descrit i va ser aïllat dels virus de Sarcoma de Rous en pollastres (Rous P, 1911). Src també fou la primera proteïna descrita amb activitat tirosina quinassa intrínseca (Hunter and Sefton, 1980). Forma part d'una família de proteïnes, SFKs (Src family kinases), que comprèn diverses proteïnes associades a membrana no receptores amb activitat tirosina quinassa i que estan implicades en una gran diversitat de processos cel·lulars. Les SFKs són activades per una varietat d'estímuls que promouen proliferació, supervivència, motilitat i invasivitat incloent activació de receptors de citoquines, receptors tirosina-quinasses, receptors lligats a proteïnes G i integrines (Thomas and Brugge, 1997).

**Estructura:** Src té un domini N-terminal amb un senyal de localització a membrana, anomenat SH4 (Src homology 4 domain), un domini SH3, un domini SH2, un domini tirosina quinassa i una seqüència reguladora (Frame MC, 2002) (**Figura 5**). Src es manté inactiva a través d'una sèrie d'interaccions intramoleculares que restringeixen l'accessibilitat del lloc actiu del domini quinassa a l'ATP i als seus substrats. Aquesta conformació és causada per la fosforilació d'un residu tirosina (Tyr527) que, en estar

fosforilat, interacciona amb el domini SH2 (Xu et al., 1997). Csk és una quinassa inhibidora que fosforila Src en Tyr527 i l'inactiva.

**Activació:** En estat inactiu, Src es localitza al voltant de la regió perinuclear de la cèl·lula (Kaplan et al., 1992). El canvi de localització des del citoplasma a la membrana, després de l'activació, requereix canvis en l'organització del citoesquelet d'actina que són controlats per proteïnes de la família Rho (Fincham et al., 1996). L'activació de Src es dona per la unió a Fak, que en autofosforilar-se en Tyr397, crea un lloc d'unió pel domini SH2 de Src (Schaller et al., 1994). Src fosforila Fak en diversos residus tirosina augmentant així la seva activitat (Calalb et al., 1995). A més, Src també fosforila una gran varietat de substrats, inclòs ell mateix. Alguns dels substrats més importants de Src són: Fak, p130Cas i paxillin. Src també es localitza en les adhesions cèl·lula-cèl·lula on colocalitza amb E-cadherina induint, per la seva activitat catalítica, el desensamblatge de les adhesions dependents d'E-cadherina (Owens et al., 2000).



**Figura 5.** Dominis estructurals de Src i interaccions amb d'altres proteïnes (Y: tirosines fosforilades; Myr: senyal de miristilació per unió a membrana).

### 3.3.1.4 p130Cas (Crk-Associated Substrate)

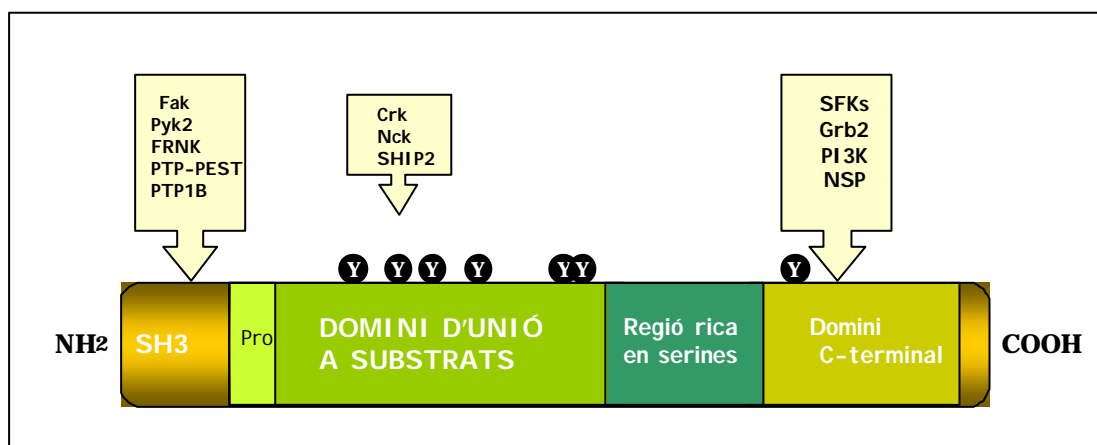
p130Cas fou identificada com una proteïna de 130KDa que estava altament fosforilada en residus tirosina en cèl·lules transformades per v-Src (Matsuda et al., 1990) i v-Crk (Sakai et al., 1994). Mutacions en v-Src i v-Crk que bloquejaven la seva unió a p130Cas també inhibien l'activitat transformant d'aquests oncogens, fet que indicava que p130Cas



tindria un paper clau en el procés de transformació cel·lular (Kanner et al., 1991; Mayer and Hanafusa, 1990).

**Estructura:** p130Cas conté un domini N-terminal SH3 (src-homology 3), seguit d'un curt segment ric en prolines, un llarg domini d'unió a substrats, una regió rica en serines i un domini C-terminal (Songyang Z., 2001) **(Figura 6)**. El domini d'unió a substrats conté múltiples tirosines que poden ser fosforilades i servir de lligands per altres proteïnes amb dominis SH2 (src-homology 2) o PTB (pTyr binding). En el domini C-terminal també hi ha diversos llocs d'interacció amb proteïnes (Burnham et al., 1996). S'han identificat nombroses proteïnes que interaccionen amb p130Cas in vivo malgrat que la regulació i funció d'alguns d'aquests complexos encara no està ben establert.

**Activació:** L'activació de FAK, després de la unió de les integrines a l'ECM, crea uns llocs d'unió per p130Cas. p130Cas s'uneix al domini C-terminal de FAK a través del seu domini SH3 (Polte and Hanks, 1995) i és activada per fosforilació en tirosines directament per FAK, creant-se un lloc d'unió per Src que fosforila p130Cas en més residus tirosina permetent la unió de més substrats (Astier et al., 1997; Tachibana et al., 1997). Un cop fosforilat, p130Cas uneix, a través dels dominis SH2 fosforilats, diverses proteïnes com Crk (Sattler et al., 1997). Aquestes unions indueixen el reclutament d'altres quinasses i una augment de la activitat i dels llocs d'unió de p130Cas creant-se així una xarxa de proteïnes senyalitzadores que transdueixen els senyals de les integrines al nucli (Mayer et al., 1995).



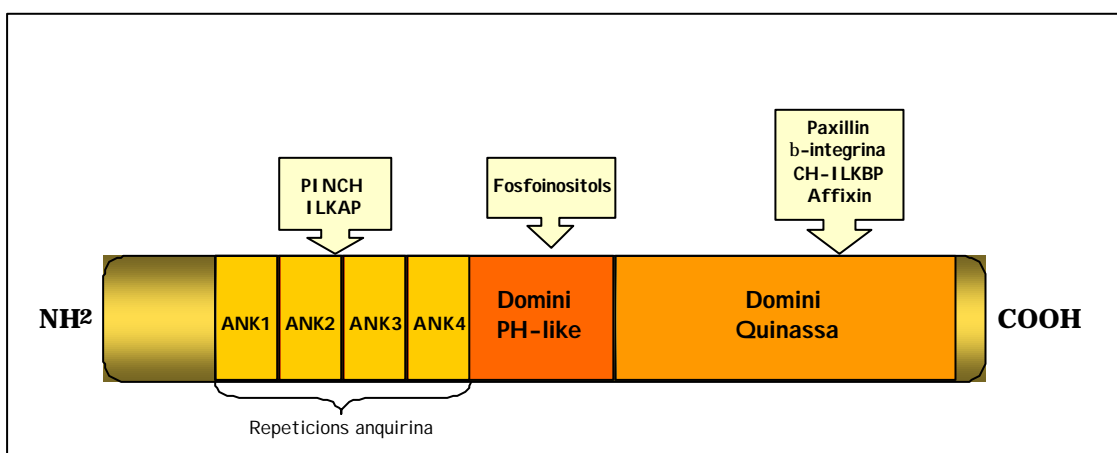
**Figura 6.** Dominis estructurals de p130Cas i interaccions amb d'altres proteïnes.  
(Y: tirosines fosforilades; Pro: Regió rica en prolines)

### 3.3.1.5 ILK (Integrin-linked kinase)

ILK és una serina-treonina quinassa que va ser identificada per la seva capacitat d'interaccionar amb el domini citoplasmàtic de la integrina  $\beta 1$  (Hannigan et al., 1996). Es troba localitzada en les adhesions focals (Li et al., 1999) i en les adhesions fibrilars (Guo et al., 2001) i la seva funció està implicada en l'adhesió cel·lular, la dispersió cel·lular, la migració i l'ensamblatge de la matriu de fibronectina (Tu et al., 2001).

**Estructura :** ILK conté quatre repeticions anquirina en la regió N-terminal, un domini central "PH-like" que s'uneix a fosfatidilinositol(3,4,5)trisfosfat, i un domini quinassa C-terminal que uneix les subunitats  $\beta$  de les integrines i paxillin (Wu and Dedhar, 2001) (**Figura 7**).

**Activació:** ILK té una activitat quinassa basal baixa que és estimulada per les unions de la cèl·lula a l'ECM i per alguns factors de creixement (Dedhar, 2000). La seva activitat és estimulada per la unió del producte de PI3K PI3,4,5-trifosfat al domini PH-like d'ILK (Dedhar S, 2000). L'activitat d'ILK és regulada negativament per dues fosfatases, PTEN i ILKAP (Attwell et al., 2003). ILK pot fosforilar les integrines  $\beta_1$ , GSK3 i Akt (Persad et al., 2001). La sobreexpressió d'ILK indueix la pèrdua de les adhesions cèl·lula-cèl·lula com a conseqüència de la disminució de l'expressió d'E-cadherina i de la translocació de  $\beta$ -catenina al nucli (Somasiri et al., 2001). La disminució de l'expressió d'E-cadherina és probablement deguda a l'activació per ILK del seu repressor Snail (Tan et al., 2001) i la translocació de  $\beta$ -catenina al nucli és conseqüència de la inhibició de GSK-3 causada per la fosforilació per ILK (Persad et al., 2001).



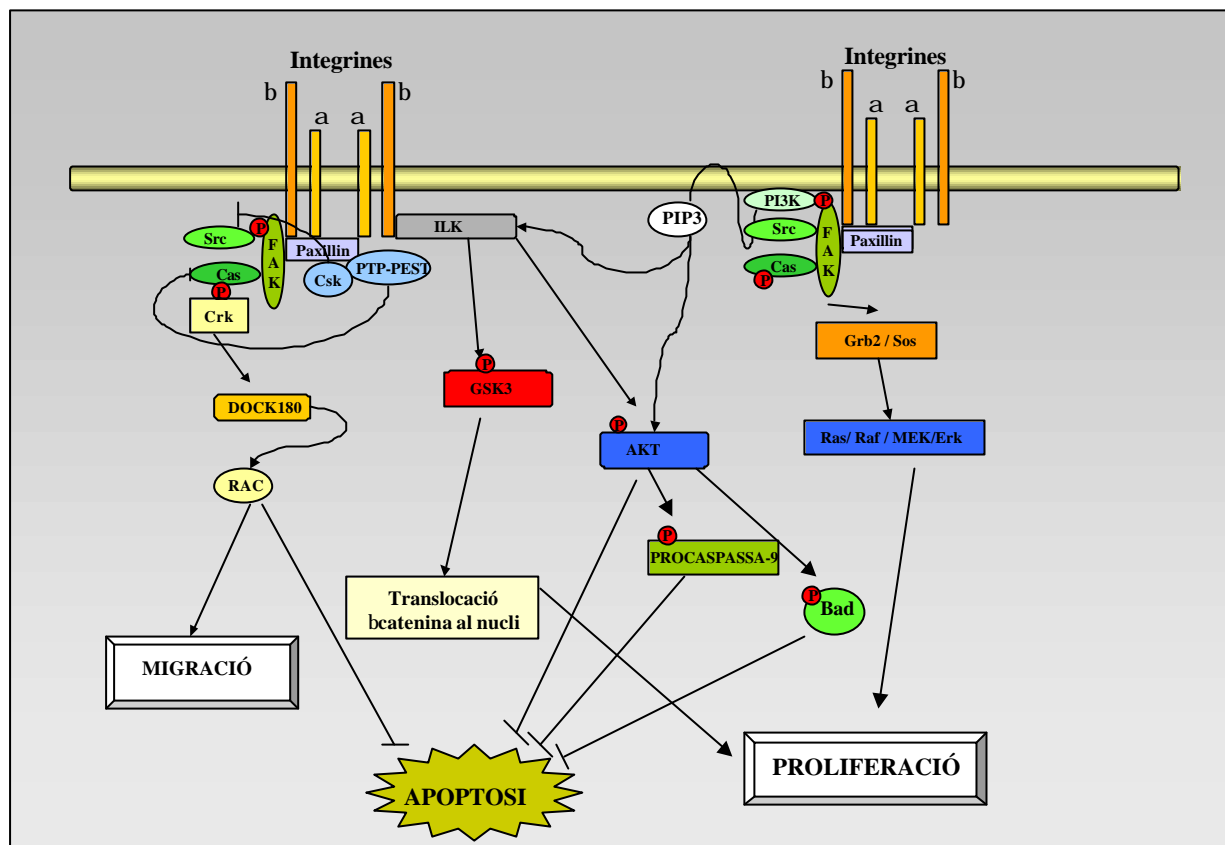
**Figura 7.** Dominis estructurals d'ILK i interaccions amb d'altres proteïnes.

### 3.3.1.6 Paxillin

És una proteïna adaptadora multidomini que es localitza en les adhesions focals. La unió de Paxillin a les adhesions focals es dona a través dels dominis LIM que interaccionen directament amb les  $\beta$ -integrines (Schaller et al., 1995). Paxillin no té activitat catalítica així que es considera que actua com proteïna estructural en les adhesions focals proveint diversos llocs d'unió per la interacció amb d'altres proteïnes senyalitzadores o del citoesquelet. La unió de Fak i Src forforila paxillin en Tyr31 i Tyr118 creant un lloc d'unió per Crk que pot associar-se amb p130Cas (Birge et al., 1993). Reguladors negatius de les adhesions focals com Csk (inhibidor de Src) i PTP-PEST (fosfatasa que defosforila p130Cas) també s'uneixen a paxillin permetent així que es localitzin aprop de les seves dianes (Schaller and Parsons, 1995; Shen et al., 1998).

### 3.3.1.7 PI3K

PI3K és un heterodímer format per una subunitat reguladora de 85KDa (p85) i una subunitat catalítica de 110KDa (p110). La fosforilació de Fak en Tyr397 uneix la subunitat p85 de PI3K localitzant-la així a membrana i activant-la. PI3K fosforila aleshores lípids inositols de membrana en la posició 3' de l'anell inositol generant PI 3-fosfat(PI(3)P), PI 3,4-bifosfat (PI(3,4)P2) i PI 3,4,5-trifosfat (PI(3,4,5)P3). Aquests lípids estan implicats en processos cel·lulars com la proliferació, supervivència, reorganització del citoesquelet i trànsit de membrana (Carpenter and Cantley, 1996). Akt és una molècula efectora de PI3K, que és activada per la unió de PI(3,4)P2 o PI(3,4,5)P3 al seu domini PH i és translocada a la membrana plasmàtica on serà fosforilada per PDK1, una serina-treonina quinasa que també conté dominis PH i és regulada de manera semblant pels productes lipídics de PI3K (Andjekovic M et al., 1997; Franke et al., 1997). Akt és una serina treonina quinasa que promou la supervivència cel·lular i bloqueja l'apoptosi. Akt indueix l'expressió d'E2F i de la ciclina D1, afavorint la progressió del cicle cel·lular, i inhibeix per fosforilació l'activitat de GSK3 $\beta$ , que regula la degradació via ubiquitina de la  $\beta$ -catenina i la ciclina D1 (Liang and Slingerland, 2003; Brennan et al., 1997; Sharma et al., 2002). També regula directament la maquinària apoptòtica a diversos nivells, fosforilant i inactivant Bad, proteïna proapoptòtica de la família Bcl-2, i inhibint la funció de l'apoptosoma en fosforilar la procaspasa-9 (Cardone et al., 1998).



**Figura 8.** Vies de senyalització activades per la unió de la cèl·lula a la matriu extracel·lular

### **3.3.2 Vies regulades per les adhesions focals**

#### **3.3.2.1 Regulació del citoesquelet i migració**

S'han descrit diverses vies activades per les adhesions focals que participarien en la regulació del citoesquelet i la migració.

La fosforilació de p130Cas indueix la formació de complexes amb Crk (Cheresh et al., 1999). Aquesta associació provoca que el domini SH2 de Crk recluti la proteïna DOCK180 a la membrana plasmàtica i la posterior activació de Rac causant així l'ondulació ("ruffling") de la membrana. L'activació de la via de les MAPK, a través de l'associació de Grb2 amb FAK també tindria un paper important en la migració ja que Erk1/2 controlen l'ensamblatge de l'actina i miosina (Lai et al., 2000). La interacció de PI3K amb FAK també és necessària per la migració ja que PI3K està implicat en el control del reordenament de l'actina mediat per les proteïnes Rho (Reiske et al., 2000).

### 3.3.2.2 Regulació de la proliferació

Quan les cèl·lules entren en mitosi perden l'ancoratge a l'ECM mantenint-se desenganxades fins que es completa la citocinesi. Aquesta disrupció de l'ancoratge està regulada per p130Cas, Fak, Src i Crk. Durant la mitosi, p130Cas, Fak i paxillin són fosforilades en serines i treonines i defosforilades en tirosines (Yamakita et al., 1999). Els nivells de complexos Fak-p130Cas i Fak-Src disminueixen durant la mitosi. L'entrada en la fase G1 del cicle, ve acompanyada per la defosforilació d'aquestes proteïnes en serines i treonines i la fosforilació en tirosines formant-se de nou els complexos Fak-p130Cas i Fak-Src i l'ancoratge de l'ECM. La progressió en la fase G1 i la síntesi d'ADN requereix l'associació directa de Fak i p130Cas (Reiske et al., 2000). D'altra banda, també s'ha descrit que FAK regularia l'expressió de ciclina D1 a través de la senyalització per Erk (Zhao et al., 2000). A més, l'activació de les vies d'Erk i JNK per Fak i p130Cas permetrien accelerar el pas de la fase G1 a la fase S (Zhao et al., 1998).

### 3.3.2.3 Regulació de l'apoptosi

Els canvis en el citoesquelet i en l'adhesió cel·lular que tenen lloc durant l'apoptosi s'associen freqüentment amb la proteolisi de moltes proteïnes reguladores del citoesquelet com p130Cas, Fak, paxillin i Src (Kook et al., 2000). Diversos estímuls proapoptòtics (etoposide, nocodazole, radiació UV...) indueixen la proteolisi d'aquestes proteïnes (Chan et al., 1999; Harrington et al., 2001). El mecanisme pel qual les adhesions focals inhibeixen l'apoptosi inclou diverses vies com la de PI3K/Akt (Chan et al., 1999).

La proteolisi de p130Cas i la disrupció de les adhesions focals durant l'apoptosi inhibeixen la transmissió de senyals de supervivència provinents de l'ECM. D'altra banda, diverses evidències indiquen que el fragment de 31KDa resultant de la proteolisi de p130Cas podria tenir un paper actiu en la inducció de l'apoptosi. Aquesta funció podria exercir-la actuant com a dominant negatiu de p130Cas inhibint així la seva senyalització, però estudis recents també han demostrat que el fragment proteolitzat de p130Cas (de 31KDa) podria actuar com a repressor del factor de transcripció E2A inhibint així la transcripció de determinats gens com p21<sup>CIP1</sup> (Kim et al., 2004).

### 3.3.2.4 Anoikis

L'anoikis és el procés apoptòtic induït per la pèrdua d'ancoratge cel·lular (Frisch et al., 1994). L'ancoratge cel·lular no té un paper únicament estructural sinó que també és important en la supervivència cel·lular, per aquest motiu, la seva pertorbació indueix freqüentment el procés apoptòtic.

L'anoikis pot ser induïda per la pèrdua d'ancoratge de la cèl·lula a la matriu extracel·lular (ECM) i també per la pèrdua dels contactes cèl·lula-cèl·lula.

◆ **Ancoratge Cèl·lula-ECM:** Diverses proteïnes implicades en l'ancoratge a la ECM s'han implicat en anoikis. La sobreexpressió de diversos tipus d'integrines protegeix la cèl·lula de l'anoikis mentre que la seva inhibició pot induir aquest procés de mort (Brooks et al., 1994; Fukai et al., 1998). FAK, Src, p130Cas i ILK estan també implicades en l'anoikis, la sobreexpressió d'aquestes proteïnes inhibeix l'anoikis mentre que la seva inhibició estimula aquest procés apoptòtic (Chan et al., 1994; Xu et al., 1996; Attwell, 2000). També s'ha demostrat que p130Cas és proteolitzat durant l'anoikis (Wei et al., 2004).

◆ **Unions Cèl·lula-Cèl·lula:** Aquestes unions estan mediades per les cadherines. Aquestes proteïnes tenen també un important paper en la inducció de senyals de supervivència. El bloqueig de la unió d'E-cadherina indueix anoikis (Kantak and Kramer, 1998; Frisch and Francis, 1994) mentre que el manteniment de les unions cèl·lula-cèl·lula inhibeix l'anoikis malgrat que s'hagi perdut l'ancoratge a l'ECM (Pullan et al., 1996).

## 3.4 Les adhesions focals i el càncer

El paper de les proteïnes de les adhesions focals en la progressió tumoral està evidenciat perquè en molts tipus tumorals s'observa una sobreexpressió de Fak, Src, p130Cas i ILK, en molts casos associada l'adquisició d'invasivitat i metastasi.

- **FAK:** Nivells elevats d'mRNA de FAK correlacionen amb la progressió de tumors epitelials i mesenquimals a fenotips invasius i metastàtics (Weiner et al., 1993). A més, estudis a nivell de proteïna també han demostrat un augment dels nivells de FAK quan els tumors desenvolupen capacitat d'invasió i metastasi (Owens et al., 1995). FAK, està

sobreexpressat en una gran diversitat de tipus tumorals, incloent els colorectals (Cance et al., 2000). Així, els carcinomes colorectals primaris i les metàstasis a fetge, tenen alts nivells de FAK (Lark et al., 2003).

- **SRC:** S'ha descrit, en tumors de còlon altament agressius, una mutació activadora de Src en el lloc de fosforilació inhibidor de la proteïna (Tyr527) (Irby et al., 1997). Malgrat això, molts tumors no presenten mutació del gen de Src però sí sobreexpressió que correlaciona amb l'adquisició de capacitat metastàtica dels tumors colorectals (Talamonti et al., 1993).
- **p130Cas:** En càncer de mama es va identificar p130Cas com a la proteïna codificada en el locus BCAR1 (Breast cancer anti-estrogen resistance 1) que fou identificat perquè la seva sobreexpressió induïa resistència al tamoxifè (Brinkman et al., 2000). Alts nivells d'expressió de p130Cas en tumors de mama correlacionen amb una menor supervivència i una menor resposta a la teràpia amb tamoxifè (Van der Flier et al., 2000). La implicació de p130Cas en altres càncers humans encara no està molt estudiada però hi ha evidències que indiquen que el creixement de cèl·lules de melanomes malignes va acompanyat per un augment de la fosforilació de p130Cas (Eisenmann et al., 1999). p130Cas també és important en el desenvolupament i progressió de leucèmies (Dejong et al., 1997).
- **ILK:** L'expressió i l'activitat d'ILK està augmentada en pòlips de pacients amb PCF i en carcinomes colorectals (Marotta et al., 2001). El paper d'ILK en el procés tumorigènic és en part degut a que induïx l'activació de la via Wnt, translocant la  $\beta$ -catenina al nucli (Novak et al., 1998), inhibeix l'expressió d'E-cadherina (Perl et al., 1998) i activa la via d'Akt (Delcommenne et al., 1998).

D'altra banda, l'anoikis també té una gran rellevància en l'estudi del càncer doncs les cèl·lules tumorals, quan metastatitzen, han adquirit resistència a l'anoikis (Ruoslahti and Reed, 1994) L'adquisició de resistència a l'anoikis és un pas crític en la transformació metastàtica dels tumors. La sobreexpressió d'oncogens com ras, raf, rac i src, així com la deleció de gens supressors de tumors com PTEN i p53, tornen les cèl·lules resistents a l'anoikis (Nikiforov et al., 1996; Coniglio et al., 2001). En models animals, els tumors resistents a l'anoikis presenten una major incidència de lesions metastàsiques i de supervivència cel·lular en la circulació sanguínia (Zhu et al., 2001).

## **4. TRACTAMENT DEL CÀNCER COLORECTAL**

L'estadi del tumor en el moment del diagnòstic és el principal factor pronòstic de cara a la supervivència. La cirurgia és sempre el tractament d'elecció en els tumors ressecables i dona lloc a la cura d'un 50% dels pacients. Un 90% dels pacients amb un tumor que ha envaït la mucosa o submucosa superen els 5 anys de supervivència després de la resecció quirúrgica. Aquest percentatge va disminuint a mesura que augmenta el grau d'invasió fins a arribar a un 56% si hi ha afectació de fins a 4 nòduls limfàtics (De Vita, 1997).

### **4.1 TERÀPIA ADJUVANT**

L'objectiu del tractament adjuvant és millorar els resultats de la cirurgia. Aproximadament el 75-80 % dels pacients amb càncer de còlon presenten tumor localitzat. Tanmateix, després del tractament amb cirurgia, un 40% dels pacients presenten recidiva tumoral, per aquest motiu, en les últimes dècades hi ha hagut molt interès en establir una teràpia adjuvant que eviti la recurrència tumoral (Chau and Cunningham, 2002). Mentre que la radioteràpia és sovint considerada part de la teràpia adjuvant en càncer de recte, no s'han demostrat bons resultats en càncer de còlon (Materson et al., 1999).

### **4.2 TRACTAMENT QUIMIOTERÀPIC ACTUAL**

El tractament quimioteràpic adjuvant després de la cirurgia radical es basa actualment en la utilització de la combinació 5-FU/LV i Oxaliplatí o Irinotecan com tractament d'elecció.

- **5-FLUOROURACIL (5-FU):** És el fàrmac més utilitzat en la teràpia adjuvant del CCR. Després de la seva activació metabòlica a 5-fluoro-2'-deoxiuridilat, aquesta fluoropirimidina es combina amb el metiltetrahidrofolat per formar un complex terciari amb la timidilat sintassa i interferir en la síntesi de l'ADN inhibint la conversió de deoxiuridilat en timidilat (Chu E, 2003). Aquest fàrmac també actua incorporant-se a l'ARN per interferir en la seva transcripció o a la molècula d'ADN.



Entre els anys 1970 i 1980 es va iniciar la teràpia adjuvant en CCR. Realitzant un tractament amb 5-Fluorouracil (5-FU) en esquemes setmanals, en el càncer avançat el promig de resposta era d'un 20% (Higgins et al., 1971). Durant els anys 1990 es van iniciar estudis combinant el 5-FU amb levamisol i amb àcid folínic. Els primers estudis van determinar efectivitat en la combinació de 5-FU amb levamisol tot i que els resultats variaven segons l'estadi del tumor. En pacients amb estadi III, es va obtenir una disminució del 40% de la recurrència i del 33% de la mortalitat (Moertel et al., 1995). L'any 1990, la conferència de consens de l'Insitut Nacional del Càncer de USA (NIH) va recomanar l'ús d'aquesta combinació quimioteràpica en la pràctica clínica en els pacients amb estadi III (NIH consensus conference, 1990).

Posteriorment, es van iniciar estudis de la combinació de 5-FU amb àcid folínic o Leucovorín càlcic (LV) en diferents dosis i esquemes d'administració demostrant-se un benefici d'entre el 4 i el 16% en l'allargament de vida de 3-5 anys en pacients en estadi III (Wolmark et al., 1993). En un meta-anàlisi sobre 2751 pacients amb CCR avançat comparant l'associació de 5-FU/LV enfront a 5-FU sol, es veié que la combinació duplicava la taxa de resposta (23% vs. 12%).

- **FLUOROPYRIMIDINES ORALS:** La via oral constitueix una alternativa a l'administració en infusió continua del 5-FU. Aquest fàrmac té però una escassa biodisponibilitat i un catabolisme molt ràpid per la dihidropirimidina deshidrogenassa. Per aquest motiu, s'han desenvolupat fluoropirimidines orals alternatives utilitzant profàrmacs com la capecitabina o bé, combinant amb inhibidors de la dihidropirimidina deshidrogenassa. La Capecitabina és un fàrmac ben absorbit per la mucosa gastrointestinal i és convertit a 5-FU per un triple procés enzimàtic. Resultats de dos estudis randomitzats que comparen el tractament amb Capecitabina enfront a 5-FU/LV demostren una supervivència equivalent amb un millor perfil de tolerància (Hoff PM, 2003).
- **IRINOTECAN (CPT-11):** És un derivat sintètic de la camptotecina (alcaloide natural) que actua inhibint la topoisomerasa I interferint així en la replicació de l'ADN. El metabolit actiu de l'Irinotecan (SN38) promou l'estabilització del complex format per l'ADN i la topoisomerasa ocasionant una interrupció de la replicació de l'ADN i la inducció d'apoptosi. Alguns estudis han demostrat que l'administració conjunta de 5-

FU/LV/Irinotecan millora la taxa de resposta i la supervivència en comparació amb 5-FU/LV (Takimoto and Arbut, 2001).

- **OXALIPLATÍ:** És un derivat del platí de tercera generació que no presenta els grups amino lliures enllaçats al platí (com el cisplatí) sinó que té una estructura rígida, voluminosa i cíclica. Es combina amb l'ADN formant unions que impedeixen la reparació i la formació de la cadena de replicació. La seva combinació amb 5-FU o amb 5-FU/LV millora la taxa de resposta però té com inconvenient una alta toxicitat (De Gramont et al., 2000).

### 4.3 NOVES DIANES TERAPÈUTIQUES EN EL TRACTAMENT DEL CCR

Els fàrmacs quimioteràpics clàssics interfereixen la síntesi de l'ADN, inhibint enzims importants per la replicació, com és el cas del 5-FU, o bé creant aductes a l'ADN que impedeixen la seva replicació, com l'oxaliplatí. Aquest tipus de fàrmacs tenen però un greu inconvenient que és la seva elevada toxicitat ja que interfereixen tant en les cèl·lules tumorals com en les normals donant lloc a nombrosos efectes adversos. El major coneixement dels processos genètics i moleculars que estan implicats en la progressió desde l'epiteli normal fins al tumor ha obert noves possibilitats tant al diagnòstic com a la terapèutica del càncer colorectal. El desenvolupament de teràpies més específiques, dirigides a anomalies moleculars presents únicament en les cèl·lules tumorals, suposarà un millor índex terapèutic amb menor toxicitat sobre els teixits sans.

Actualment estan en fase d'estudi nous fàrmacs antitumorals dirigits específicament a dianes que estan implicades en el procés tumoral :

- **Inhibidors del Receptor del Factor de Creixement Epidèrmic (EGFR):** L'EGFR és un receptor de membrana sobreexpressat en una gran varietat de tumors, entre ells el CCR. Alts nivells d'expressió d'EGFR estan associats amb malaltia avançada i mala prognosi. L'activació de l'EGFR suposa l'estimulació del creixement tumoral, proliferació, angiogènesi, capacitat invasiva i metastàtica, així com la inhibició de l'apoptosi. Actualment s'estan estudiant diferents tipus d'inhibidors del EGFR com a possibles fàrmacs antitumorals. D'una banda s'estan desenvolupant molècules amb

activitat inhibidora del domini tirosina quinasa del receptor i, d'altra banda, anticossos monoclonals que impedeixen la interacció entre el lligant i el receptor.

El ZD1839 és un inhibidor de l'EGFR que ha mostrat activitat antitumoral sol i en combinació amb d'altres fàrmacs com el paclitaxel o l'irinotecan. Actualment, s'estan duent a terme assajos clínics per a determinar el seu possible ús clínic (Douglass EC, 2003).

Un altre inhibidor de l'EGFR, OSI-774, ha demostrat una bona tolerància i activitat antitumoral en assajos clínics en fase II. Aviat s'iniciaran estudis de fase III per aquests fàrmacs (Grünwald and Hidalgo, 2003).

El C225 o cetuximab (Eritux) és un anticòs monoclonal que s'uneix al domini extracel·lular de l'EGFR amb una afinitat major que els seus lligands naturals i bloqueja la fosforilació de l'EGFR induïda per EGF en línies cel·lulars. S'ha vist també que C225 inhibeix el creixement tumoral i allarga la supervivència en ratolins atòmics xenotrasplantats. S'han realitzat assajos clínics en pacients refractaris de càncer de còlon en progressió després del tractament amb irinotecan veient que l'addició de C225 a l'irinotecan indueix una taxa de resposta del 22%. L'administració de C225 en monoteràpia en estudis de fase II dona una taxa de resposta de quasi el 10%. Actualment s'estan duent a terme assajos de fase II i III per explorar l'efecte d'aquest fàrmac en altres estadis del CCR (Mendelshon and Baselga, 2003; Sridhar et al., 2003; Grünwald and Hidalgo, 2003).

- **Inhibidors del Receptor del Factor de Creixement Vascular Endotelial (VEGFR):**

El VEGFR és un receptor fonamental en l'angiogènesi i està sobreexpressat en molts tumors humans en els que comporta un factor pronòstic desfavorable.

El PTK787/zk 222584 (PTK/ZK) és un inhibidor selectiu del VEGFR. Estudis en fase I han demostrat que és un compost ben tolerat en pacients amb malaltia avançada que sobreexpressen VEGFR en administracions cròniques. Actualment s'han iniciat estudis en fase Ib d'aquest inhibidor sol i en combinació amb d'altres fàrmacs (Thomas et al., 2003).

Bevazucimab és un anticòs monoclonal murí humanitzat dirigit contra VEGFR que ha donat resultats prometedors en assajos en fase I i fase II (Hurwitz et al., 2003).

- **Estabilitzadors de microtúbuls:** Epothilone B és un agent estabilitzador dels microtúbuls que també ha donat resultats prometedors tant en CCR com en d'altres tipus de càncers. Actualment, s'estan duent a terme estudis en fase II (Rothermel et al., 2003).
- **Inhibidors de COX-2:** Diverses evidències indiquen que l'enzim ciclooxigenasa podria tenir un paper important en càncer de colon, d'una banda per la funció realitzada per les prostaglandines així com pel fet que la isoforma COX-2 es troba sobreexpressada en teixits colorectals tumorals. Actualment s'estan estudiant diversos inhibidors selectius de COX-2 com a fàrmacs quimiopreventius i pel tractament de tumors establerts (Stoehlmacher and Lenz, 2003). Hi ha però força controvèrsia sobre si la seva veritable diana terapèutica d'aquests compostos és COX-2 o actuarien per un altre mecanisme d'acció independent.

## **5. LES CICLOOXIGENASSES**

### **5.1 FUNCIO DE LES CICLOOXIGENASSES**

Les ciclooxigenasses, també anomenades prostaglandin H sintasses o prostaglandin endoperòxid sintasses, són enzims que catalitzen el pas limitant en la síntesi de prostaglandines i tromboxans.

La ciclooxigenassa-1 (COX-1) va ser purificada i caracteritzada per primera vegada els anys 1970 (Miyamoto et al., 1976). COX-1 s'expressa constitutivament en molts teixits: ronyó, pulmó, estómac, intestí...(Kargman et al., 1996). La seva activitat és responsable de produir prostaglandines citoprotectives com la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) que són crítiques per al manteniment de la integritat de la mucosa gàstrica (Allison et al., 1992; Miller TA, 1983).

L'any 1991, es va descobrir i clonar una segona isoforma de l'enzim, la ciclooxigenassa-2 (COX-2) (Kujubu et al., 1991). Les dues isoformes són molt semblants en estructura i activitat però el seu patró d'expressió és diferent. La majoria de teixits, exceptuant la placenta, la màcula densa del ronyó i el cervell, no expressen COX-2 constitutivament (Harris et al., 1994; Hirst et al., 1995). Hi ha una gran varietat d'estímuls extracel·lulars i intracel·lulars que indueixen ràpidament l'expressió de COX-2: lipopolisacàrid, interleuquina-1 (IL-1), factor de necrosi tumoral (TNF), sèrum, EGF, TGF $\alpha$ , àcid retinoic, àcid araquidònic...(Fu et al., 1990; Coyne et al., 1992; Geng et al., 1995; Jones et al., 1993; DeWitt and Meade, 1993; Hamasaki et al., 1993; Dubois et al., 1994; Bazan et al., 1994). Aquesta inducció de COX-2 és transitòria i l'enzim retorna als nivells basals a les 24-48h.

Fins fa pocs anys es considerava que COX-1 seria la responsable de la síntesi de prostaglandines implicades en el manteniment de les funcions fisiològiques normals i COX-2 només actuaria després d'estímuls determinats provocant reaccions adverses a l'organisme com inflamació, febre i dolor. Darrerament però, s'ha vist que aquest model no és tan senzill i que COX-2 també podria tenir funcions fisiològiques com ara el manteniment del balanç del flux renal. A més, recentment s'ha descrit una altra isoforma de la ciclooxigenassa, COX-3 que prové del gen de COX-1 per splicing alternatiu (Chandrasekharan et al., 2002).

## 5.2 EL METABOLISME EICOSANOID

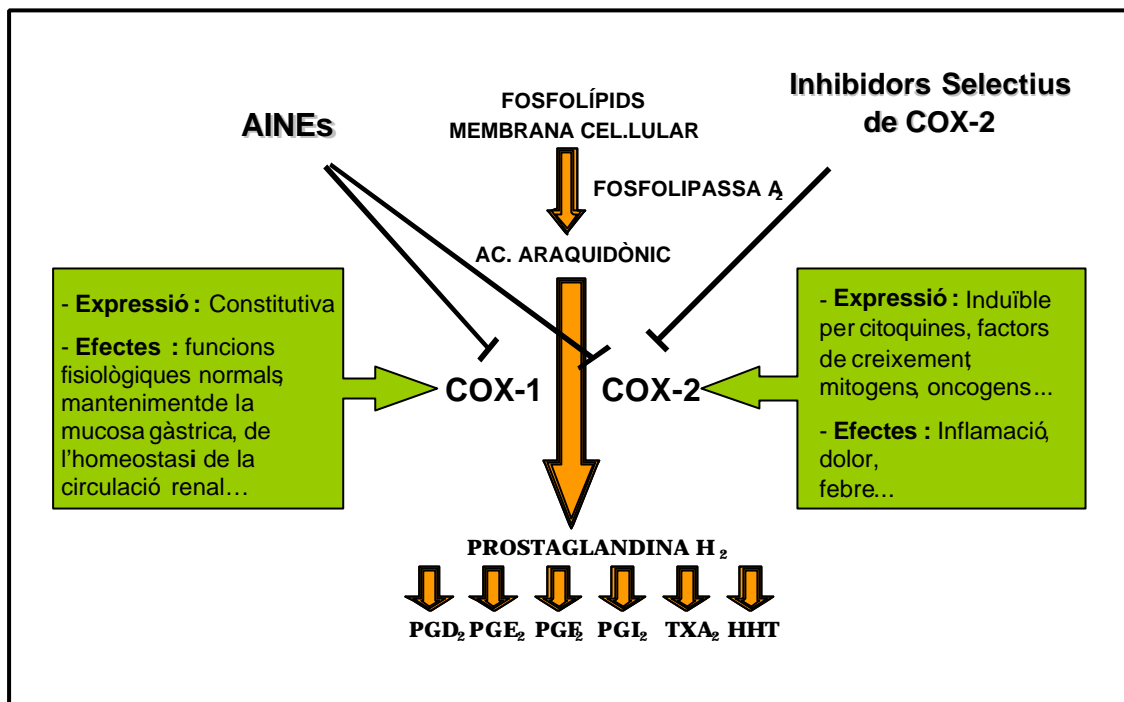
El substrat de les ciclooxigenasses és l'àcid araquidònic, un àcid gras poliinsaturat de 20 Carbonis distribuït per la bicapa lipídica de la membrana cel·lular que normalment es troba esterificat en la posició SN-2 dels fosfolípids. Les fosfolipasses alliberen l'àcid araquidònic de la membrana fent que quedi disponible per la seva conversió a lípids bioactius. Un cop alliberat, l'àcid araquidònic pot ser metabolitzat a través de tres vies principals :

- *Via de les ciclooxigenasses.*
- *Via de les lipooxigenases*
- *Via del citocrom p450*

### Via de les ciclooxigenasses :

La ciclooxigenassa catalitza la conversió de l'àcid araquidònic a prostaglandina  $H_2$  ( $PGH_2$ ). Es tracta d'un procés en dos passos. Primer, mitjançant l'activitat ciclooxigenassa de l'enzim, s'introdueixen dues molècules d'oxigen al C11 i C15 formant-se la prostaglandina  $G_2$  ( $PGG_2$ ) que, per l'activitat peroxidassa de COX, pateix una reducció i el grup 15-hidroperòxid es converteix en un alcohol donant lloc a  $PGH_2$ . La  $PGH_2$  serà convertida aleshores en d'altres prostaglandines ( $PGD_2$ ,  $PGE_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGI_2$ ) o tromboxans ( $TXA_2$ ) per sintases específiques (Mifflin RC and Powell DW, 2001), podent donar també una altre producte de COX, l'àcid hydroxiheptadecatrienoic (HHT) (Pace-Asciak and Smith, 1983)(**Figura 9**).

Les prostaglandines juguen papers crítics en processos fisiològics. Les  $PGE_2$  i  $PGI$  són reguladors importants del flux sanguini renal. També són importants en processos de la biologia reproductiva incloent l'ovulació, la fertilització i el desenvolupament fetal. La formació dels ossos així com la diferenciació dels macròfags són processos regulats per les prostaglandines. Les PGs són també vitals pel manteniment de la integritat de la mucosa del tracte gastrointestinal i juguen un paper important en la regulació de la motilitat i la secreció.



**Figura 9.** Via de les ciclooxigenases i acció dels AINEs i dels inhibidors selectius de COX-2.

### 5.3 ELS INHIBIDORS DE CICLOOXIGENASSES

Hi ha dos tipus de compostos que inhibeixen les ciclooxigenases, els antiinflamatoris no esteroidals (AINEs), que inhibeixen les dues isoformes de COX, i els inhibidors selectius de COX-2, compostos desenvolupats més recentment.

#### 5.3.1 Els Antiinflamatoris no esteroidals (AINEs)

L'any 1971 es va demostrar per primera vegada que l'aspirina i la indometacina inhibien la producció de prostaglandines en bloquejar l'activitat enzimàtica de la ciclooxigenasa (Vane JR, 1971). Des d'aleshores, s'ha demostrat que els AINEs alteren directament l'activitat de COX modificant covalentment l'enzim (ex: l'aspirina) o competint amb el substrat pel centre actiu (majoria d'AINEs).

Els AINEs s'utilitzen en clínica per inhibir la inflamació, calmar el dolor i la febre i per prevenir la trombosi. El fet que inhibeixen alhora COX-1 i COX-2 fa que produeixin una sèrie d'efectes adversos sobretot relacionats amb el tracte gastrointestinal com ulceració o perforació. Alguns estudis han estimat que els usuaris habituals d'AINEs tenen un risc

molt més elevat de patir complicacions gastrointestinals que els que no els utilitzen (Gabriel et al., 1991). Per aquest motiu, el descobriment de COX-2 va tenir gran importància en el desenvolupament de nous antiinflamatoris. Es va establir un model segons el qual, COX-1 sintetitzaria prostaglandines necessàries pel manteniment de les funcions fisiològiques normals com la protecció gàstrica (Robert A, 1983) o el fluxe sanguini renal (Whelton A, 1999). D'altra banda, COX-2 s'encarregaria de sintetitzar les prostaglandines relacionades amb el dolor, la febre i la inflamació. Així, el desenvolupament de fàrmacs que inhibissin selectivament COX-2 permetria evitar els efectes perjudicials produïts per les prostaglandines sense donar lloc a efectes adversos causats per la inhibició de COX-1.

### **5.3.2 Els Inhibidors selectius de COX-2**

L'ús regular d'AINEs com agents antiinflamatoris en la pràctica clínica és problemàtic degut als seus efectes adversos. La necessitat d'una administració a llarg termini causa una elevada morbiditat i mortalitat com a conseqüència d'aquests efectes secundaris (Chan et al., 2002; Bus et al., 2000). Per tal de resoldre aquest problema s'han desenvolupat al llarg dels darrers anys nous fàrmacs inhibidors específics de COX-2 (**Taula 3**). Els inhibidors de COX-2 de primera generació són el Celecoxib i el Rofecoxib, ambdós han demostrat tenir també activitat antitumoral. Més recentment s'han desenvolupat els inhibidors de COX-2 de segona generació: Valdecoxib, Parecoxib i Etoricoxib que actualment s'estan avaluant com antiartrítics i analgèsics (McMurray and Hardy, 2002; Stichtenoth and Frolich, 2003) però encara no s'ha explorat la seva possible activitat antitumoral. D'altres inhibidors de COX-2 estan també actualment en desenvolupament com: Lumircoxib, Deracoxib i Tiracoxib però encara no estan registrats pel seu ús clínic.



**Taula 3.** Inhibidors específics de COX-2 actualment disponibles per ús clínic

FÀRMAC	Nom comercial	Companyia Farmacèutica	Formula (p.m.)	Vida mitja	Utilitat clínica
<i>Celecoxib</i>	Celebrex®	Pharmacia/Pfizer	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S (381.4)	11.2 h	Acceptat per prevenció de polips a FAP als USA
<i>Rofecoxib</i>	Vioxx®	Merck Sharp&Dohme	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> S (314.4)	17 h	Estudis clínics fase III en càncer colorectal III
<i>Etoricoxib</i>	Arcoxia®	Merck Sharp&Dohme	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S (358.8)	22 h	No hi ha estudis com antitumoral
<i>Parecoxib</i>	Dynastat®	Pharmacia/Pfizer	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> NaO <sub>4</sub> S (392.4)	5.4-9.9 h	Acceptat com analgèsic postoperatori Profàrmac de Valdecoxib
<i>Valdecoxib</i>	Bextra®	Pharmacia/Pfizer	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S (314.4)	8.1	No hi ha estudis com antitumoral

## 5.4 RELACIÓ ENTRE CICLOOXIGENASSES I CÀNCER

Estudis en tres àrees diferents indiquen que COX-2 té un paper important en el càncer colorectal i que la seva inhibició podria tenir efectes antitumorals:

1. **Epidemiologia**
2. **Models animals**
3. **Farmacologia in vitro**

**1. Epidemiologia:** Diversos estudis han demostrat que individus que prenen antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs) regularment durant un període llarg de temps redueixen el risc de desenvolupar càncer colorectal :

- Fa més de 20 anys es va observar per primera vegada una associació entre l'ús dels AINEs i la reducció de pòlips en la mucosa colorectal (Waddel and Loughry, 1983).
- El seguiment de 600.000 individus que prenen aspirina regularment (16 o més comprimits al mes) va demostrar que reduïa significativament el risc de patir càncer de còlon (Thun et al.,1991). D'altres estudis han determinat que l'aspirina també redueix el risc de patir càncer d'esòfag, gàstric i de recte (Thun et al., 1993).

- El tractament amb sulindac (AINE) produeix una reducció significativa del nombre i tamany dels pòlips en pacients amb PCF (Labayle et al., 1991; Giardiello et al., 1993).
  - Les cèl·lules dels tumors colorectals expressen alts nivells de COX-2 mentre que les de la mucosa intestinal normal expressen nivells molt baixos o indetectables d'aquest enzim (Eberhart CE et al., 1994; Sano H et al., 1995)
- 2. Models animals:** Diversos estudis utilitzant models animals amb tumors colorectals induïts per carcinogènesi química o alteracions genètiques també han evidenciat el paper de COX-2 en càncer :
- Un dels estudis que més va reforçar el paper de COX-2 en el càncer colorectal fou realitzat per Oshima i col·laboradors (1996). En aquest treball es creuava una soca de ratolins amb un al·lel d'APC mutat, que els conferia major risc de patir tumors de còlon, amb una altra que era knock out per COX-2. Els resultats mostraven que la supressió genètica de COX-2 conferia protecció contra el càncer de còlon.
  - Diversos AINEs convencionals com aspirina, sulindac, piroxicam i ibuprofè han mostrat activitat antitumoral en models animals (Thun et al., 2002; Beazer-Barclay Y et al., 1996; Barnes and Lee, 1998).
  - El tractament amb celecoxib de ratolins atímics amb tumors humans xenotrasplantats té un efecte dosi-depenent en la inhibició del creixement tumoral (Masferrer JL et al., 2000).
  - S'ha observat un augment molt marcat en els nivells d'mRNA de COX-2 en adenomes de ratolins Min i en tumors intestinals de rates tractades amb carcinògens (Williams CS et al., 1996; Dubois RN et al., 1996).
- 3. Farmacologia in vitro:** Experiments realitzats in vitro amb línies cel·lulars també han donat evidències del possible paper de COX-2 en càncer :
- Cèl·lules epitelials intestinals transfectades amb COX-2 desenvolupaven canvis fenotípics com un augment de l'adhesió a les proteïnes de la matriu extracel·lular i resistència a l'apoptosi (Tsuujii and Dubois, 1995).
  - El creixement de línies cel·lulars derivades de tumors colorectals humans és inhibit per inhibidors selectius de COX-2 només en cèl·lules que sobreexpressen COX-2 (Sheng et al., 1997).

## 5.5 EFECTE ANTITUMORAL DELS INHIBIDORS SELECTIUS DE COX-2

Diversos assajos clínics han demostrat l'efecte quimiopreventiu de diversos inhibidors selectius de COX-2 principalment en pacients amb PCF (Steinbach et al., 2000; Phillips et al., 2002; Higuchi et al., 2003).

El primer estudi que demostrà l'activitat quimiopreventiva del celecoxib fou realitzat per Steinbach i col.laboradors (2000). En un grup de 77 pacients de PCF s'administraren dosis de 100 mg o 400 mg de celecoxib o placebo dues vegades al dia durant 6 mesos. Al final del tractament s'observà una reducció significativa del nombre i tamany dels pòlips en els pacients que havien rebut la dosi més alta de celecoxib. Com a conseqüència d'aquest estudi, l'FDA (Food and Drug Administration) aprovà l'ús del celecoxib per la reducció i regressió dels pòlips adenomatosos colorectals en pacients amb PCF. En un altre estudi s'ha demostrat que l'administració de 400 mg de celecoxib és efectiva per la prevenció de poliposi duodenal (Phillips et al., 2002). El rofecoxib també disminueix el nombre i tamany de pòlips al recte en pacients amb PCF (Higuchi et al., 2003).

Per ara, l'ús del celecoxib està restringit als pacients amb PCF però s'estan duent a terme diversos assajos clínics per a determinar la seva efectivitat com a quimiopreventiu en CCHNP (Annie Yu et al., 2003).

D'altra banda, s'està avaluant l'efecte del celecoxib i rofecoxib pel tractament del càncer colorectal esporàdic en combinació amb d'altres fàrmacs quimioteràpics. Dades preliminars d'un assaig clínic en fase II, mostren major efecte antitumoral en combinar el celecoxib amb 5-FU/Irinotecan/Leuovorin en pacients amb càncer colorectal metastàtic o localment avançat no ressecable (Blanke et al., 2002).

Finalment, també s'estan realitzant assajos clínics per avaluar l'efecte dels inhibidors selectius de COX-2 en d'altres tipus de càncers com el de mama, pulmó, esòfag, pàncreas o cervell en combinació amb quimioteràpia o radioteràpia (Gasparini et al., 2003).

## **5.6 MECANISME D'ACCIÓ ANTITUMORAL DELS INHIBIDORS DE COX-2**

Actualment, el mecanisme d'acció antitumoral dels inhibidors de COX-2 és controvertit i en gran part desconegut. Malgrat els nombrosos estudis que s'han fet, encara hi ha molta controvèrsia en determinar si aquests compostos tindrien efecte antitumoral a través d'un mecanisme dependent o independent de la inhibició de COX-2. Així, hi ha actualment alguns autors que defensen que, en la seva acció antitumoral, aquests inhibidors actuarien sobre dianes independents de COX-2, mentre que d'altres segueixen mantenint que els efectes observats d'aquests fàrmacs serien conseqüència de la inhibició de COX-2.

### **5.6.1 Evidències a favor de la dependència de COX-2**

Hi ha diversos treballs que recolzen la idea que els fàrmacs inhibidors de COX-2 actuarien selectivament sobre la seva diana. El 80% dels carcinomes de còlon tenen nivells elevats de COX-2 i de producció de prostaglandines, en particular de PGE<sub>2</sub> (Eberhart et al., 1994) que està relacionada amb la inhibició de l'apoptosi, increment de l'angiogènesi i invasivitat (Dempke et al., 2001). A més, la inactivació genètica de COX-2 inhibeix la tumorigènesi de còlon en un model de ratolins transgènics knock out per APC (Oshima et al., 1996). Sheng i col·laboradors (1998), van demostrar que els efectes apoptòtics produïts per un inhibidor selectiu de COX-2 (SC-58125) podrien ser revertits in vitro per l'addició de PGE<sub>2</sub> en cèl·lules tumorals de còlon. En afegir PGE<sub>2</sub> al medi de cultiu es restablien els nivells de la proteïna antiapoptòtica Bcl-2. D'altra banda, Chan i col·laboradors (1998), van proposar que l'efecte d'aquests fàrmacs seria causat per l'acumulació l'àcid araquidònic, substrat de la ciclooxigenassa, que provocaria un augment del nivell de ceramida, un inductor d'apoptosi.

### **5.6.2 Evidències a favor de la independència de COX-2**

Hi ha també evidències que indiquen que els efectes antitumorals dels inhibidors de COX-2 són independents de la inhibició de COX-2 (Rigas and Shiff, 2000; Tegeder et al., 2001). La inhibició de pòlips en pacients amb poliposi còlica familiar només es dona a dosis de celecoxib majors que les necessàries per la inhibició de COX-2 (Steinbach et al.,

2000). D'altra banda, en un treball realitzat en fibroblasts COX-2(+/+), COX-2(+/-), COX-2(-/-) , no es va trobar correlació entre l'activitat COX-2 de les cèl·lules i l'efecte citotòxic del celecoxib (Williams et al., 2000). Metabolits del Sulindac (AINE) que no inhibeixen COX-2 retenen la capacitat d'induir apoptosi (Lim et al., 1999; Hanif et al., 1996). Finalment, s'ha demostrat, en carcinoma de pròstata, que els grups químics en la molècula de celecoxib responsables de la inhibició de COX-2 no són necessaris per la inducció apoptòtica (Song et al., 2002).

### **5.6.3 Vies implicades en el mecanisme d'acció dels inhibidors de COX-2**

La hipòtesi que els inhibidors de COX-2 exercirien la seva acció antitumoral a través d'un mecanisme d'acció independent de COX-2 ha fet que s'estudiessin possibles vies alternatives d'acció d'aquests compostos. S'ha demostrat que els inhibidors de COX-2 indueixen apoptosi en diversos tipus cel·lulars (Lu et al., 1995, Ding et al., 2000; Hsu et al., 2000, Marnett & Dubois, 2000) malgrat que la resposta és molt dependent del fàrmac i la línia cel·lular estudiada. L'apoptosi s'ha relacionat principalment a fragmentació de PARP i activació de Caspasa-3 i/o sobreexpressió de FAS (Giardina et al., 1999) i amb inactivació d'Akt (Hsu et al., 2000), PDK1 (Arico et al. 2002) o NFκB (Plummer et al., 1999) . També s'han implicat diverses proteïnes de la via Wnt en la inhibició del creixement tumoral per inhibidors de COX-2 (Hawcroft et al., 2002). Un altre estudi indica que el Sulindac pot unir-se a PPARδ i inhibir la seva unió a l'ADN i la seva acció com a factor de transcripció (He et al., 1999),. Finalment, una altre possible via d'acció dels inhibidors de COX-2 és la inhibició de la migració cel·lular i l'angiogènesi (Rozic et al., 2001).

En resum, l'estudi realitzat en aquest camp és extens però en el moment actual no hi ha consens sobre quin podria ser el mecanisme d'acció antitumoral dels inhibidors de COX-2 doncs els resultats obtinguts són diversos i varien molt segons el compost estudiat i el model utilitzat.

## **6. MECANISMES D'ACCIÓ DELS FÀRMACS ANTITUMORALS**

L'activitat dels fàrmacs antitumorals està associada principalment a l'activació de programes de resposta cel·lulars que condueixen a l'aturada de la proliferació o bé a la inducció de mort. Els principals mecanismes activats pels fàrmacs antitumorals són la mort cel·lular per apoptosi i l'aturada irreversible del cicle cel·lular o senescència. L'estudi dels mecanismes moleculars implicats en aquests processos és molt important per a comprendre l'efecte dels fàrmacs antitumorals ja que mutacions en proteïnes implicades en ells poden ser causants de resistència al tractament.

### **6.1 L'APOPTOSI**

#### **6.1.1 Definició**

L'apoptosi és un procés de mort cel·lular programada que implica l'activació de mecanismes específics que condueixen a la mort de les cèl·lules sense resposta inflamatòria. Aquest tipus de mort es produeix de manera natural durant el desenvolupament embrionari i postnatal temprà en múltiples teixits. En aquest cas, la seva funció és eliminar les cèl·lules supèrflues en un lloc determinat. Durant tota la vida dels vertebrats, l'apoptosi continua tenint un paper important eliminant, d'una banda, aquelles cèl·lules que no són necessàries i, d'altra banda, en el control del cicle cel·lular. Durant el cicle cel·lular es produeix apoptosi quan l'ADN que s'està replicant presenta alteracions com aparellaments incorrectes entre bases o estructures anòmals. Finalment, múltiples estímuls que produeixen estrès cel·lular com els fàrmacs antitumorals, també induïen l'apoptosi.

L'apoptosi és un procés de mort altament conservat al llarg de l'evolució, des de nemàtodes fins als mamífers. La primera referència a aquest tipus de mort es va fer el 1972 quan s'anomenà "suïcidi cel·lular" al procés mitjançant el qual algunes cèl·lules induïen un programa intracel·lular per a matar-se elles mateixes de manera controlada (Kerr et al., 1972).

Gairebé vint anys més tard, estudis en el nemàtode *Caenorhabditis elegans* van permetre identificar els primers gens implicats en la regulació de l'apoptosi (Ellis et al., 1991) que posteriorment també foren descoberts per homologia en humans (Yuan et al., 1993; Hengartner et al., 1994).

### **6.1.2 Característiques morfològiques**

Les cèl·lules apoptòtiques es poden reconèixer per canvis morfològics molt ben caracteritzats. Les cèl·lules apoptòtiques s'encongeixen i perden el contacte amb les cèl·lules veïnes i l'ancoratge a la matriu extracel·lular. La cromatina es condensa i es localitza als marges de la membrana nuclear, els nuclèols es desintegren i disminueix el tamany nuclear. Durant l'apoptosi hi ha també alteracions en el citoesquelet, el citoplasma es condensa i la membrana plasmàtica forma invaginacions. En la fase final del procés es fragmenta l'ADN, a causa d'una ruptura internucleosomal, i es formen unes estructures compactes envoltades de membrana anomenades cossos apoptòtics que contenen citosol, cromatina condensada i orgànuls. Els macròfags reconeixen els cossos apoptòtics perquè expressen fosfatidilserina en la part externa de la membrana plasmàtica. Els cossos apoptòtics són fagocitats i no causen resposta inflamatòria (Fadok et al., 1992).

### **6.1.3 Fases funcionals de l'apoptosi:**

El procés apoptòtic es pot dividir en dues fases funcionals: fase d'iniciació i fase executora (Kroemer et al., 1997).

- **Fase d'iniciació:** La fase d'iniciació es caracteritza per ser molt heterogènia. Hi ha una gran diversitat de factors extracel·lulars (hipòxia, radiacions, pèrdua d'interacció cèl·lula-matriu, receptors de mort, depleció de factors de creixement...) i intracel·lulars (dany al ADN) que poden activar el programa d'apoptosi (Jaattela, 1999; Li et al., 1999). A nivell molecular, s'han descrit dues vies principals d'iniciació de l'apoptosi: la via dels receptors de mort (TNF i Fas) i la via mitocondrial (**Figura 10**).

**1. Via dels receptors de mort o apoptosi extrínseca:** És mediada per l'activació d'uns receptors de membrana anomenats receptors de mort després de la unió a lligands

específics. Els receptors de mort pertanyen a la superfamília del gen del TNFR (receptor del factor de necrosi tumoral) que inclou TNFR-1, Fas/CD95 i els receptors TRAIL DR-4 i DR-5 (Saikumar et al., 1999). Els receptors de mort tenen un domini citosòlic conservat anomenat domini de mort (Death Domain, DD) capaç d'interaccionar amb la maquinària apoptòtica intracel·lular. Quan els receptors de mort són activats per la unió del seu lligand específic (FASL, TNF $\alpha$ , TRAIL/Apo2) interaccionen, a través del domini de mort, amb molècules adaptadores (FADD o TRADD) que contenen un domini de mort i un altre per la inducció de mort cel·lular anomenat domini efector de mort (Death Effector Domain, DED) (Berglund et al., 2000). La unió dels receptors a les proteïnes adaptadores forma un complexe anomenat DISC (death inducing signalling complex). El domini DED de les proteïnes adaptadores pot interaccionar amb determinades caspases que contenen dominis DED homòlegs en els seus prodominis, com les caspases 8 i 10, unint-les al complexe DISC (Muzio et al., 1998). L'oligomerització de caspases en el complexe fa que s'activin per autoprocessament eliminant-se el prodomini DED i alliberant-se la forma activa de la caspasa al citosol on podrà processar i activar d'altres caspases (Slee et al., 1999).

**2. Via mitocondrial:** Diferents estímuls poden induir aquesta via apoptòtica que és iniciada per la sortida de citocrom c de la mitocòndria (Liu et al., 1996). El citocrom c es troba normalment localitzat en la part externa de la membrana mitocondrial interna i en la zona intermembrana (Hirsch et al., 1997). Durant l'apoptosi, el citocrom c és alliberat al citosol on s'uneix a Apaf-1, una proteïna citosòlica que conté un domini CARD (domini de reclutament de caspasa), un domini d'unió a nucleòtids i múltiples repeticions WD-40 (Zou et al., 1997). La unió del citocrom c a Apaf-1 augmenta la seva afinitat per dATP/ATP, que s'unirà al complexe induint la seva oligomerització per formar l'apoptosoma (Zou et al., 1999). En aquest complexe, queden exposats els dominis CARD que reclutaran múltiples molècules de procaspasa-9 facilitant la seva autoactivació. Només les molècules de procaspasa-9 unides a l'apoptosoma tenen capacitat de tallar eficientment i activar les caspases executores com la caspasa-3 (Rodriguez and Lazebnik, 1999).

La sortida del citocrom c de la mitocòndria està regulada per les proteïnes de la família bcl-2. En aquesta família hi ha proteïnes antiapoptòtiques (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl1, Bclw...) i proapoptòtiques (Bax, Bad, Bcl-x<sub>S</sub>, Bak, Bid, Bik...). Les proteïnes antiapoptòtiques contenen dominis BH1, BH2, BH3 i BH4. Les proteïnes proapoptòtiques es divideixen en



dos subgrups: la subfamília de Bax que està formada per Bax, Bak i Bok que contenen dominis BH1, BH2 i BH3 i les proteïnes amb només domini BH3 (Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Puma...) (Cory and Adams, 2002). L'equilibri entre els nivells de proteïnes pro- i anti-apoptòtiques influenciarà la susceptibilitat de les cèl·lules al senyal apoptòtic. El mecanisme de regulació de les proteïnes Bcl-2 és complex i inclou: regulació transcripcional, dimerització, fosforilació, proteolisi i translocació (Burlacu A, 2003). El mecanisme pel qual aquestes proteïnes regulen la integritat de la mitocòndria encara no està del tot establert. El paper de Bax i Bak en aquest procés és molt important. Aquestes proteïnes es troben en el citosol en forma de monòmers en les cèl·lules viables però durant l'apoptosi, canvis en la seva conformació fan que s'integrin en la membrana externa de la mitocòndria i oligomeritzin (Nechushtan et al., 2001). Per un mecanisme encara poc clar, els oligòmers de Bax i Bak provocarien o contribuirien a la permeabilització de la membrana externa de la mitocòndria formant canals (Antonsson et al., 2000) o bé interaccionant amb altres components dels porus de la membrana mitocondrial (Tsujiimoto and Shimizu, 2000). El paper de les proteïnes antiapoptòtiques seria segrestar les proteïnes proapoptòtiques inhibint així la seva oligomerització. Finalment, les proteïnes amb només domini BH3 podrien actuar directament l'oligomerització de Bax/Bak o bé unint-se a les proteïnes antiapoptòtiques, alliberant així les altres proteïnes proapoptòtiques que són necessàries per la permeabilització de la membrana mitocondrial (Letai et al., 2002).

La via mitocondrial i la via de receptors de mort no actuen per vies completament independents. La Caspasa-8, que és activada per la via de receptors de mort, pot activar la proteïna Bid, un membre de la família bcl-2 que es localitza a la membrana mitocondrial externa. L'activació de Bid, per proteolisi, indueix la sortida de citocrom c de la mitocòndria i la posterior activació de caspasa-9 (Li et al., 1998).

- **Fase executora:** En aquesta fase es produeix una disminució de l'adhesió cel·lular i dels contactes intercel·lulars, canvis en la superfície cel·lular, reducció del volum cel·lular, condensació de la cromatina i fragmentació de l'ADN. Aquestes alteracions són en gran part degudes a l'activació de proteases i nucleases. La fase d'execució comença amb l'acció d'una família de proteases relacionades amb la ICE (Interleukin-1 $\beta$  Converting Enzyme) o caspasa 3, originalment identificades per la seva homologia amb el gen CED-3 del nemàtode *C.elegans*. Fins al moment s'han descrit 14 molècules homòlogues

conegudes amb el nom genèric de caspases (cisteinil proteases específiques d'aspartat) (Thornberry and Lazebnik, 1998) que són cisteín-proteases que tallen els seus substrats de forma gairebé exclusiva en residus aspàrtic (Alnemri et al., 1996). Les caspases són sintetitzades en la cèl·lula com a precursors inactius formats per quatre dominis: un domini amino-terminal de tamany variable (prodomini), una subunitat gran, una subunitat petita i una regió d'unió entre les dues subunitats rodejada per residus aspàrtic. L'activació de les caspases és causada pel tall proteolític entre els dominis i dóna lloc a l'eliminació del prodomini i la regió d'unió. Finalment, les subunitats s'uneixen formant complexos enzimàtics actius. El processament de les caspases es pot dur a terme per l'acció d'altres proteases o per processament autocatalític (Nicholson et al., 1997). Les caspases activades poden alhora activar d'altres caspases iniciant-se així una cascada proteolítica que amplifica el senyal apoptòtic.

Les caspases es divideixen en dos tipus, iniciadores i efectores, depenent del seu lloc d'acció dins la cascada proteolítica del procés apoptòtic. Les caspases iniciadores descrites fins ara són : caspassa-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12, i -13. Les caspases executores són : caspassa -3, -6, -7 i -14.

Les caspases executores són les responsables de la majoria de canvis bioquímics i morfològics típics de l'apoptosi. Per exemple, les lamines nuclears, constituents estructurals de la membrana nuclear interna, són processades per les caspases durant l'apoptosi (Lazebnik et al., 1995). L'actina, proteïna del citoesquelet, així com d'altres proteïnes reguladores de l'actina ( $\alpha$ -fodrin,  $\alpha$ II- i  $\beta$ II-spectrin i gelsolin), són també processades per caspases durant l'apoptosi (Mashima et al., 1997; Brocksted et al., 1998). Moltes proteïnes implicades en la síntesi i reparació de l'ADN, com el factor de replicació nuclear MCM3, l'enzim Poli(ADP-Ribosa) Polimerasa (PARP), la subunitat gran del factor C de replicació de l'ADN i Rad51 són també substrats de les caspases efectores (Rhéaume et al., 1997; Ubeda and Haberner, 1997; Schwab et al., 1998; Flygare et al., 1998). Finalment, la nucleassa DFF40/CAD, que talla l'ADN en fragments internucleossomals, és també activada per les caspases (Widlak P, 2000).

Malgrat que l'activació de les caspases dóna lloc a la morfologia típica del procés apoptòtic, no totes les vies de mort programada són dependents de caspases. Cèl·lules que pateixen un dany traumàtic o són privades de factors de creixement poden morir fins i tot en presència d'inhibidors de caspases (Rathmell and Thompson, 1999). Tot i així, la morfologia d'aquestes cèl·lules apoptòtiques no té moltes de les característiques

morfològiques del procés de mort programada com ara els típics canvis nuclears (Hirsch et al., 1997).

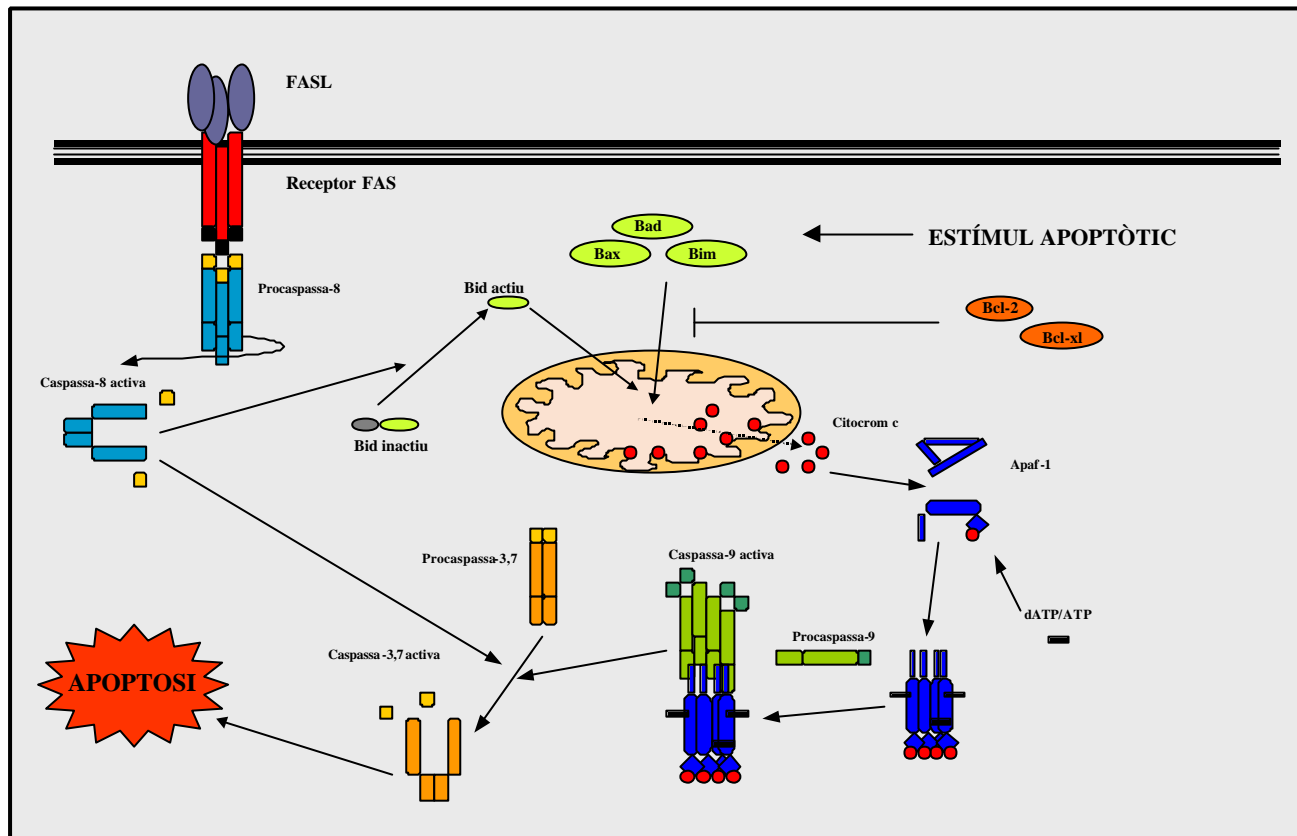


Figura 10. Regulació de l'apoptosi per la via mitocondrial i dels receptors de mort (FAS)

#### 6.1.4 Diferències entre Necrosi i Apoptosi

La necrosi és un tipus de mort cel·lular molt diferent a l'apoptosi. Durant la necrosi, la cèl·lula perd la integritat de la membrana, s'infla i es trenca alliberant el contingut cel·lular i induint una resposta inflamatòria que produeix la migració de macròfags i neutròfils (Leist and Jaatela, 2001). Aquests mediadors cel·lulars contribueixen a la resolució del procés inflamatori però, l'alliberament pels neutròfils de substàncies enzimàtiques i radicals lliures en forma indiscriminada, pot també lesionar el teixit normal adjacent.

La necrosi és un procés "passiu" que, a diferència de l'apoptosi, no requereix síntesi proteica i és causat per la pèrdua de l'homeostàsia (Raff MC, 1992).

Tradicionalment, s'ha considerat l'apoptosi i la necrosi com a dues formes diferents de mort cel·lular, però actualment aquesta distinció no està tan clara i alguns autors suggereixen una manera diferent per a classificar els processos de mort cel·lular (Van Cruchten and Van de Broek, 2002).

Les cèl·lules apoptòtiques no sempre són reconegudes per macròfags i poden patir un procés de "necrosi secundària" (Sanders and Wride, 1995) o "necrosi apoptòtica" (Majno and Joris, 1995). Així, es podria considerar la necrosi no com una forma de mort cel·lular sinó com la fase final de qualsevol procés de mort. La mort cel·lular caracteritzada per "l'inflament cel·lular" s'anomenaria oncosi (Majno and Joris, 1995). Segons aquesta classificació, hi hauria dos tipus de mort: l'apoptosi i l'oncosi. La necrosi seria el procés final o "post-mortal" d'ambdós tipus de mort (Van Cruchten and Van de Broeck, 2002).

### **6.1.5 Apoptosi i càncer**

L'alteració de les vies apoptòtiques està implicada en la formació de tumors, la progressió tumoral i la metastasi així com també en l'adquisició de resistència al tractament amb fàrmacs antitumorals (Johnstone, 2002). La tumorigènesi no implica només una excessiva proliferació sinó també la inactivació de les vies d'inducció d'apoptosi (Hanahan and Weinberg, 2000). Les cèl·lules transformades poden adquirir resistència a l'apoptosi a causa de l'activació o sobreexpressió de proteïnes antiapoptòtiques o bé per la inactivació de factors proapoptòtics.

Bcl-2 fou el primer gen implicat en l'apoptosi que es va relacionar amb la tumorigènesi i està sobreexpressat en molts tipus de càncers contribuint a la supervivència de les cèl·lules tumorals en inhibir l'apoptosi (Hockenbery et al., 1990; Reed JC, 1999). D'altra banda, els gens bax i bak, que codifiquen per proteïnes proapoptòtiques, estan mutats o downregulats en molts càncers colorectals (Kondo et al., 2000; Rampino et al., 1997). La proteïna proapoptòtica Bad i la procaspasa-9 estan regulades negativament per Akt, proteïna oncogènica que està, amb freqüència, constitutivament activada en molts tipus de càncers (Nicholson and Anderson, 2002).

Finalment, la mutació de p53, molt freqüent en càncer colorectal, també insensibilitza la cèl·lula a l'apoptosi ja que una de les seves funcions és l'activació d'aquest procés induint l'expressió de gens proapoptòtics (Bax, Apaf-1, Fas...) (Vousden and Lu, 2002) o inhibint proteïnes antiapoptòtiques (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>...) (Wu et al., 2001).

## 6.2 EL CICLE CEL·LULAR

La divisió cel·lular és el procés que permet a la cèl·lula duplicar-se separant-se en dues cèl·lules filles genèticament idèntiques. El conjunt de processos que esdevenen en una cèl·lula i tenen com a finalitat la divisió cel·lular rep el nom de cicle cel·lular .

El cicle cel·lular es divideix en quatre fases (Vermeulen et al., 2003) (**Figura 11**):

- **Fase G1:** La cèl·lula augmenta el seu tamany i la seva massa a causa de que hi ha una elevada síntesi de proteïnes. En aquesta fase hi ha el **punt de control de Restricció R** en el que la cèl·lula comprova que tot és correcte per a començar la replicació d'ADN, aquest és el punt de control i decisió més important. En determinades circumstàncies, les cèl·lules en G1 poden passar a un estat de repòs, anomenat fase G0 o de quiescència, on poden romandre molt de temps.
- **Fase S:** Té lloc la replicació de l'ADN.
- **Fase G2:** La cèl·lula comprova que la síntesi d'ADN ha estat correcta i es prepara per la mitosi. En aquesta fase hi ha el **punt de control G2-M** en el que la cèl·lula ha de comprovar que s'ha duplicat la massa de manera que pot donar lloc a dues cèl·lules filles i que s'ha completat la replicació de l'ADN.
- **Fase M:** Es dona la mitosi amb la segregació del material genètic. **El punt de control M** només permet seguir endavant si en la profase tots els cromosomes estan alineats sobre el fus. El final d'aquesta fase coincideix amb la citocinesi, procés pel qual la cèl·lula es divideix en dos.

El cicle cel·lular està regulat per diferents ciclines (A, B, D, E) i per quinasses dependents de ciclines (CDKs). Les ciclines són proteïnes que uneixen les CDKs formant complexos actius ciclina-CDK. Durant les diferents fases del cicle cel·lular es formen i destrueixen diferents complexos actius de ciclines-CDKs l'activitat dels quals dirigeix l'avanç del cicle. La regulació de l'activitat dels complexos ciclina-CDK es dona per diferents mecanismes. D'una banda, al llarg del cicle hi ha oscil·lacions en la concentració de les diferents ciclines causades per canvis a nivell de síntesi i degradació (Evans et al., 1983; Pines 1991). L'activitat de les CDKs també és regulada per fosforilacions activadores i inhibidores (Jeffrey et al., 1995; Paulovich and Hartwell, 1995). Finalment, un mecanisme de regulació molt important és la unió de proteïnes inhibidores de CDKs,

les CKIs o inhibidors dels complexos ciclina-CDK. Hi ha dues classes de CKIs que difereixen en la seva estructura, mecanisme d'inhibició i especificitat (Sherr and Roberts, 1995):

- **Família Cip/Kip** : inclou les proteïnes p21<sup>Cip1</sup> (Gu et al., 1993), p27<sup>Kip1</sup> (Polyak et al., 1994) i p57<sup>Kip2</sup> (Lee et al., 1995). S'associen als complexos ciclina-CDK i actuen principalment en la fase G1 i S .
- **Família INK4** : inclou les proteïnes p16<sup>INK4a</sup> (Serrano et al., 1993), p15<sup>INK4b</sup> (Hannon and Beach et al., 1994), p18<sup>INK4c</sup> (Gaun et al., 1994) i p19<sup>INK4d</sup> (Chan et al., 1995). S'uneixen i inhibeixen les quinasses CDK4 i CDK6 però no s'uneixen als complexos ciclina-CDK. La seva sobreexpressió atura el cicle en G1 (Hunter and Pines, 1994)

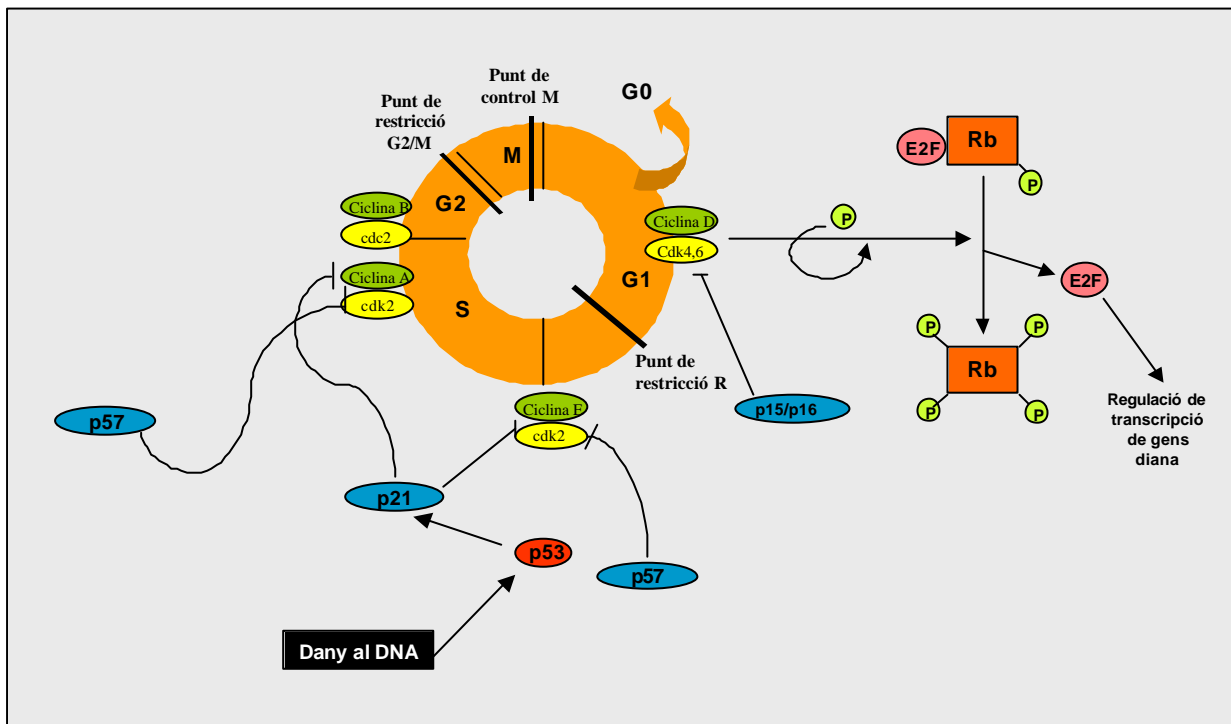


Figura 11. Regulació del cicle cel·lular.

### 6.3 SENESCÈNCIA

El concepte de senescència cel·lular fou descrit per Hayflick i Moorhead (Hayflick and Moorhead, 1961) en demostrar que les cèl·lules normals en cultiu, després d'un nombre limitat de divisions cel·lulars, aturen el seu creixement permanentment. Aquest procés,

anomenat senescència cel·lular o replicativa, es dona també *in vivo* al llarg de la vida dels organismes. La senescència és causada per un escurçament gradual dels telòmers en els extrems dels cromosomes que condueix a una aturada irreversible del cicle cel·lular en la fase G1. El significat biològic d'aquest procés és subjecte de controvèrsia però podria funcionar com un mecanisme supressor de tumors limitant la capacitat proliferativa de les cèl·lules i suposant una barrera que han de superar les cèl·lules per esdevenir immortals (Campisi J, 2000; Wyndford-Thomas, 1999).

Una de les principals característiques de les cèl·lules senescentes és la incapacitat d'activar la replicació de l'ADN malgrat que poden romandre viables per llargs períodes de temps (Pignolo et al., 1994). A nivell morfològic adopten una forma allargada i aixafada i augmenten la granularitat del citoplasma, acumulant també nombroses anormalitats cariotípiques (Smith and Pereira-Smith, 1996). Les cèl·lules senescentes tenen activitat SA- $\beta$ -galactosidasa a pH 6.0, característica que s'utilitza freqüentment com a marcador de senescència ja que generalment no es detecta ni en cèl·lules quiescents ni diferenciades (Dimri et al, 1995).

S'ha descrit un procés molt semblant a la senescència replicativa causat per fàrmacs que danyen l'ADN, per radiacions  $\gamma$  (Chen and Ames, 1994; DiLeonardo et al., 1994) i per la introducció d'oncogens com ras o raf en cèl·lules normals (Serrano et al., 1997). Aquest procés té les mateixes característiques que la senescència replicativa però es dona molt més ràpid, motiu pel qual també s'anomena senescència accelerada.

A nivell molecular, ambdós tipus de senescència, es caracteritzen per una sobreexpressió de p53, p21<sup>CIP1</sup>, p16<sup>INKA4</sup> i p14<sup>ARF</sup>. El procés és iniciat per l'activació de p53 i p21<sup>CIP1</sup> que produirien l'aturada inicial del cicle cel·lular. La inducció de p21<sup>CIP1</sup> és transitòria i alhora que disminueixen els nivells d'aquest inhibidor de CDKs, augmenten els de p16<sup>INKA4</sup> que esdevé permanentment sobreexpressat mantenint així el fenotip senescent (Roninson IB, 2002). p14<sup>ARF</sup> també s'ha vist implicat en la senescència ja que s'acumula en les cèl·lules senescentes i la seva expressió ectòpica indueix senescència (McConnell et al., 1998).

En molts tipus tumorals, p53 i el locus INK4a/ARF (p16<sup>INKA4</sup> i p14<sup>ARF</sup> són codificats pel mateix gen) es troben freqüentment mutats (Hall and Peters, 1996). Aquest fet els podria conferir insensibilitat a la senescència així com resistència a determinats fàrmacs antitumorals que actuen induint aquest procés.

## **7. MODELS ANIMALS PER L'AVALUACIÓ D'ACTIVITAT ANTITUMORAL**

Per a l'estudi de l'activitat antitumoral de nous compostos quimiopreventius o pel tractament de tumors establerts, s'han desenvolupat diferents tipus de models animals que tracten de reproduir en el possible els tumors humans. Així mateix, aquests models també han servit per a un millor coneixement del procés tumorogènic i dels gens implicats en ell.

### **7.1 MODELS ANIMALS DE CARCINOGENÈSI QUÍMICA**

En aquests models, s'indueix la carcinogènesi mitjançant l'administració de compostos químics a animals de laboratori que indueixin l'aparició del procés tumoral. Els compostos químics utilitzats depenen principalment del tipus de tumor que es vol estudiar i del model animal utilitzat. Per a l'estudi dels carcinomes colorectals els carcinògens més utilitzats en rosegadors són els derivats de dimetilhidracina que són metabolitzats a AOM (Azoximetà) en ratolins i metilazoximetanol en rates (Shamsuddin et al., 1981; D'Agostina et al., 1995). Els tumors induïts per AOM comparteixen moltes similituds histopatològiques amb els tumors humans. Presenten freqüentment mutacions en K-ras i  $\beta$ -catenina (Dashwood et al., 1998) i inestabilitat de microsatèl.lits, però molt pocs (15%) tenen mutacions en Apc i cap mutacions de p53 (DeFilippo et al., 1998) a més, tenen poca tendència a metastatitzar. Altres carcinògens utilitzats, tot i que menys freqüentment, per induir carcinomes colorectals són les nitrossamines i les amines heterocícliques com PhIP. Aquests compostos indueixen mutacions d'Apc amb més freqüència que l'AOM (40-60%) (Kakiuchi et al., 1995) i inestabilitat de microsatèl.lits però no indueixen mutacions en K-ras ni en p53 (Kakiuchi et al., 1993; Makino et al., 1994).



## 7.2 RATOLINS GENÈTICAMENT MODIFICATS

La utilització de ratolins genèticament modificats ha estat una eina fonamental per l'estudi del paper dels oncogens i supressors de tumors en el procés tumoral. D'una banda, s'han fet ratolins transgènics en els que es sobreexpressa un gen determinat, sovint sota control d'un promotor específic de teixit, podent-se avaluar les repercussions d'aquest gen en el procés tumoral. D'altra banda, també s'han utilitzat models animals genèticament modificats en els que s'inactiva l'expressió de gens supressors de tumors generant així ratolins Knock-out. Per exemple, en el càncer colorectal s'han desenvolupat models amb la inactivació del gen APC (Su et al., 1992), MSH2 (de Wind et al., 1995), Smad4 (Sirard et al., 1998) i DCC (Velcich et al., 1999). Aquests knock outs han permès definir el paper causal d'aquests gens en el càncer colorectal.

Tots aquests models han sigut molt útils per a l'estudi del paper de determinats gens en el procés tumoral però, el seu ús per a l'avaluació d'activitat antitumoral encara és limitat perquè no reproduïxen amb fidelitat el que succeeix en el desenvolupament dels tumors. Malgrat això, és un bon model pel desenvolupament de fàrmacs inhibidors de dianes terapèutiques definides.

El procés de tumorigènesi es dona en diferents etapes en les que es van acumulant successivament diferents alteracions genètiques. En els models animals s'ha vist que, en molts casos, les mutacions secundàries que apareixen no corresponen a les que s'han vist en tumors humans. Aquest fet indica que seria possible que la carcinogènesi en ratolins i humans s'activi, en alguns casos, per vies diferents. Actualment, s'ha intentat millorar aquest model fent models seqüencials amb gens d'expressió condicionals en els que es reproduïxen les diferents mutacions que s'han vist en humans (Wu et al., 2001).

## 7.3 MODELS DE XENOTRASPLANTAMENT EN RATOLINS ATÍMICS

En aquest model, s'implanta material tumoral humà en un ratolí. Per tal que el trasplantament d'un teixit d'una altra espècie no provoqui rebuig cal que l'animal estigui immunodeprimit. Per això, s'utilitzen ratolins atímics (Swiss/Nu/Nu) que tenen una mutació autosòmica recessiva (nu) amb efectes pleiotròpics (Pantelouris et al., 1968) entre els que destaca la immunodepressió. L'estat d'immunodepressió és causat per una

disminució en el nombre de limfòcits T i la manca de resposta immune secundària mediada per anticossos. Una de les avantatges d'aquest model és que el tumor amb el que es treballa és humà i conté totes les mutacions que es veuen en clínica.

### **7.3.1 Implantació subcutània**

És el primer tipus d'implantació que es va realitzar en ratolins atòmics. En aquest model, s'injecta una suspensió de cèl·lules tumorals o s'implanta un fragment sòlid d'un tumor humà en l'espai que hi ha entre la pell i el dors muscular de l'animal. Els tumors obtinguts reproduïxen l'arquitectura del tumor del pacient del qual provenen però tenen alguns comportaments diferents. D'una banda, presenten uns nivells de necrosi elevats degut a la manca de vascularització (Pocart et al., 1996). A més, no reproduïxen el mateix patró d'infiltració i no tenen capacitat de metastatitzar (Liotta et al., 1986, Fodstad et al., 1991). Totes aquestes diferències són causades perquè el tumor creix en un entorn cel·lular molt diferent a l'original. Malgrat això, és un model de cribatge preclínic in vivo acceptat per la FDA (Food and Drug Administration), la indústria farmacèutica i el National Cancer Institute pel desenvolupament de fàrmacs. Tot i així, el seu grau de fiabilitat no sembla suficient i diversos autors discuteixen la seva utilitat en base a la seva escassa correlació amb la resposta clínica (Staquet et al., 1983). La majoria dels fàrmacs seleccionats utilitzant aquest model són actius en leucèmia però no en tumors sòlids (Grindey G.B., 1990) i són pocs els fàrmacs que tenint activitat en aquest model arriben a utilitzar-se en clínica (Gura et al., 1997).

### **7.3.2 Implantació ortotòpica**

Per tal de millorar el model subcutani es va desenvolupar aquest altre tipus d'implantació en el que s'injecta la suspensió de cèl·lules tumorals o es xenotrasplanta el fragment tumoral en el mateix òrgan del qual prové (Fidler IJ, 1991; Fu et al., 1991; Hoffman RM, 1994). Aquest model permet l'obtenció ràpida de tumors vascularitzats i viables (Fu et al., 1992) amb capacitat de formar metàstasi espontàniament i reproduir els patrons de disseminació originals (Fu et al., 1991). El model d'implantació ortotòpica de fragments sòlids és un bon model per l'estudi de la tumorogènesi ja que inclou el creixement del tumor primari, la invasió dels teixits normals i dels vasos sanguinis i limfàtics, la circulació

de les cèl·lules tumorals a través del torrent circulatori, l'extravasació, l'assentament i el creixement a l'òrgan on metastatitzarà. El principal problema d'aquest model és la complexitat tècnica que suposa la implantació del tumor i el temps necessari per a realitzar-la. Per aquest motiu, en l'actualitat s'utilitza menys que el model d'implantació subcutània. Alguns estudis evidencien que el comportament tumoral divergeix segons la localització de la implantació del tumor, entre aquestes diferències també s'inclou la resposta a fàrmacs antitumorals (Pocard et al., 1996; Wilmanns et al., 1992; Starosellsky et al., 1990).

