



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Medicina

Programa de Doctorat: Medicina interna

**Estudi farmacogenòmic per a la
identificació de gens implicats en la
resposta i l'adquisició de resistència a
oxaliplatí en el càncer colorrectal**

Tesi Doctoral presentada per

Anna Martínez Cardús

Director: **Dr. Albert Abad Esteve**
Co-directors: **Dra. Eva Martínez Balibrea**
Dr. Rafael Rosell Costa

Any 2008

Albert Abad Esteve, Cap de Secció del Servei d'Oncologia Mèdica de l'Institut Català d'Oncologia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, **Eva Martínez Balibrea**, coordinadora de l'àrea de tumors digestius del Laboratori de Biologia Molecular del Càncer del Servei d'Oncologia Mèdica de l'Institut Català d'Oncologia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, i **Rafael Rosell Costa**, professor associat del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i Cap del Servei d'Oncologia Mèdica de l'Institut Català d'Oncologia de l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, certifiquen que la tesi titulada:

Estudi farmacogenòmic per a la identificació de gens implicats en la resposta i l'adquisició de resistència a oxaliplatí en el càncer colorrectal

Ha estat realitzada per **Anna Martínez Cardús** sota la seva direcció i és apta per a ser defensada davant d'un tribunal per a optar al grau de Doctora.

Albert Abad Esteve
(Director)

Eva Martínez Balibrea
(Co-directora)

Rafael Rosell Costa
(Co-director)

Badalona, 3 de desembre de 2008

Agraïments

Al Dr. Albert Abad per la gran oportunitat que m'ha donat, per tot el que m'ha ensenyat i per la seva confiança, comprensió, preocupació i encoratjament.

A l'Eva Martinez Balibrea per apostar per mi, pels seus consells i la seva amistat en els bons i mals moments, per la seva confiança i per tot el que m'ha ensenyat durant aquests anys.

A la Cristina Queralt, per pensar en mi i donar-me suport en el seu moment i per la seva amistat.

A la Maribel, la Sònia i la Fer, pels grans moments que hem compartit durant aquests anys, els seus consells i la seva amistat. Ànims amb la tesi, que ja esteu al final!

Als clàssics del CIS, la Marian i l'Adolfo... i a la Laura, la Mireia, l'Alba, l'Aïda i la Vanessa, les noves adquisicions del nou laboratori, pel seu companyerisme i amistat i per fer-me tan agradable el dia a dia.

Als meus companys del Laboratori de Biologia Molecular del Càncer pel seu ajut sempre que ho he necessitat i el seu acolliment.

A les antigues companyes del CIS, Anna Soler i Inma, pels vells temps i els bons records...

Al Dr. Jesús García Foncillas, a l'Eva Bandrés i als companys del Laboratori de Farmacogenòmica del CIMA per tot el que em van ensenyar i per fer-me sentir com a casa durant el temps que vaig passar a Pamplona.

Als companys del Servei d'Oncologia Mèdica per la seva amabilitat i acollida des del principi.

A la resta de companys de l'edifici de recerca, pel seu companyerisme.

Al Marcel...pel seu recolzament incondicional, la seva insistència perquè tirés endavant, pels ànims que m'ha transmès i....per ser com és!

A la meva família, perquè sense ells no ho hagués aconseguit i pel seu recolzament i confiança en tot el que he fet.

*Després d'escalar una muntanya molt alta, descobrim
que hi ha moltes altres muntanyes per escalar.
(Nelson Mandela)*

1. INTRODUCCIÓ: GENERALITATS DEL CÀNCER COLORRECTAL	7
1.1 EPIDEMIOLOGIA	7
1.2 CAUSES I FACTORS DE RISC	7
1.2.1- EL CÀNCER COLORRECTAL HEREDITARI	8
1.3 PATOGÈNESI	10
1.4 DIAGNÒSTIC I ESTADIFICACIÓ	12
1.5 FACTORS PRONÒSTIC	14
1.6 TRACTAMENT DEL CÀNCER COLORRECTAL.....	15
1.6.1- MALALTIA LOCALITZADA	15
1.6.1.1- Cirurgia	15
1.6.1.2- La radioteràpia	16
1.6.2- LA QUIMIOTERÀPIA.....	16
1.6.2.1- Teràpia neoadjuvant i adjuvant.....	17
1.6.2.2- Malaltia disseminada o recurrent.....	19
1.6.2.3- Resistència al tractament amb quimioteràpia.....	23
1.6.2.4- Selecció del tractament amb quimioteràpia	24
2. INTRODUCCIÓ: CONCEPTES ESPECÍFICS	27
2.1 AGENTS PLATINATS: L'OXALIPLATÍ.....	27
2.1.1- DESCRIPCIÓ	27
2.1.1.1- Biotransformació i farmacocinètica	28
2.1.1.2- Activitat i toxicitat	29
2.1.2- MECANISME D'ACCIÓ	30
2.1.2.1- Lesions a la molècula d'ADN	30
2.1.2.2- Detoxificació.....	31
2.1.2.3- Reconeixement i parada del cicle cel.lular	32
2.1.2.4- Reparació del dany causat a l'ADN	33
2.1.2.5- Vies de transducció de senyals i apoptosi	35
2.1.3- MECANISMES DE RESISTÈNCIA	37
2.1.3.1- Acumulació del fàrmac a la cèl·lula	37
2.1.3.2- Bloqueig de la replicació i reparació de l'ADN.....	39
2.1.3.3- Alteracions en els mecanismes apoptòtics	41
2.2 ELS PERFILS D'EXPRESSIÓ GÈNICA	42
2.2.1- REVISIÓ I ESTAT ACTUAL	42
2.2.2- METODOLOGIA I LIMITACIONS DE LA TÈCNICA.....	45
3. HIPÒTESI I OBJECTIUS	51

4. MATERIAL I MÈTODES	57
4.1 ESTUDI IN VITRO	57
4.1.1- MODELS CEL.LULARS	57
4.1.1.1- Resistència adquirida a oxaliplatí.....	58
4.1.1.1.1- <i>Línies tumorals de CCR parentals</i>	58
4.1.1.1.2- <i>Generació de les sublínies resistents</i>	59
4.1.1.1.3- <i>Resistència creuada amb altres fàrmacs</i>	63
4.1.1.2- Sensibilitat i capacitat de resposta a oxaliplatí	63
4.1.1.2.1- <i>Tractament amb oxaliplatí de les línies tumorals</i>	63
4.1.2- DETERMINACIÓ DE LA CITOTOXICITAT	65
4.1.3- OBTENCIÓ DELS PELLETS CEL.LULARS	66
4.1.4- EXTRACCIÓ, QUANTIFICACIÓ I PRECIPITACIÓ DE L'ARN	67
4.1.5- ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ PER TECNOLOGIA MICROARRAY	68
4.1.5.1- Processament dels slides.....	70
4.1.5.1.1- <i>Preparació dels slides</i>	70
4.1.5.1.2- <i>Hibridació dels slides</i>	71
4.1.5.2- Processament de la imatge.....	74
4.1.5.2.1- <i>Escaneig dels slides</i>	74
4.1.5.2.2- <i>Quantificació de la imatge</i>	74
4.1.5.3- Processament de les dades.....	75
4.1.5.3.1- <i>Filtratge de les dades</i>	75
4.1.5.3.2- <i>Normalització de les dades (Arraynorm 1.7.2)</i>	75
4.1.5.3.3- <i>Anàlisi de dades normalitzades (Genesis 1.5.0)</i>	76
4.1.6- IDENTIFICACIÓ I SELECCIÓ DE GENS	77
4.1.6.1- Identificació dels gens obtinguts	77
4.1.6.2- Criteris de selecció de gens	77
4.1.7- VALIDACIÓ DE L'EXPRESSIÓ PER qRT-PCR.....	78
4.1.7.1- Retrotranscripció.....	79
4.1.7.2- Anàlisi de l'expressió (tècnica qRT-PCR).....	79
4.1.7.2.1- <i>Test i validació dels gens endògens</i>	84
4.1.7.3- Anàlisi estadística.....	86
4.2- ESTUDI IN VIVO.....	87
4.2.1- PACIENTS	87
4.2.2- ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ	88
4.2.2.1- Preparació dels talls en el portaobjectes.....	88
4.2.2.2- Desparafinització i digestió	88
4.2.2.3- Extracció de l'ARN	89
4.2.2.4- Retrotranscripció.....	90
4.2.2.5- Anàlisi de l'expressió per qRT-PCR.....	90

4.2.2.6- Correlació amb els paràmetres clínics	90
4.2.2.6.1- Resposta al tractament	91
4.2.2.6.2- Anàlisi del temps a la progressió	92
5. RESULTATS	95
5.1 OBJECTIU 1	95
5.1.1- Adquisició de resistència a oxaliplatí.....	95
5.1.2- Anàlisi d'expressió gènica per tecnologia microarray	97
5.1.3- Identificació i selecció de gens.....	100
5.1.4- Validació de l'expressió gènica per qRT-PCR.....	102
5.2 OBJECTIU 2	104
5.2.1- Sensibilitat i capacitat de resposta a oxaliplatí	104
5.2.2- Anàlisi d'expressió gènica per tecnologia microarray	105
5.2.3- Identificació i selecció de gens.....	107
5.2.4- Validació de l'expressió per qRT-PCR	108
5.3 OBJECTIU 3	111
5.3.1- Característiques clíniques dels pacients amb CCRm	111
5.3.2- Estadística descriptiva de les dades d'expressió	112
5.3.3- Anàlisi estadística de la resposta a oxaliplatí.....	112
5.3.4- Anàlisi estadística del temps de la progressió	114
6. DISCUSSIÓ	119
7. CONCLUSIONS	133
8. BIBLIOGRAFIA	139



Introducció

1. INTRODUCCIÓ: GENERALITATS DEL CÀNCER COLORRECTAL

1.1 EPIDEMIOLOGIA

El càncer colorrectal (CCR) és el tumor més freqüent sumant ambdós sexes en el món occidental i la quarta causa més comuna de mort per càncer mundial. Cada any, més de 945000 persones el desenvolupen i 500000 pacients moren a causa d'aquest tumor arreu del món. Es dona amb més freqüència en els països desenvolupats (1). Els resultats de supervivència obtinguts, són proporcionals a l'accés als especialistes i la disponibilitat de les teràpies modernes de la regió (més del 60% de supervivència global en 5 anys als Estats Units però menys del 40% en regions menys desenvolupades). Aproximadament en un quart dels pacients, la malaltia és diagnosticada com a incurable i la meitat dels casos que poden sotmetre's a cirurgia curativa acabaran desenvolupant malaltia metastàsica. A més a més, aproximadament un 50% de pacients desenvoluparan metàstasis al fetge.

1.2 CAUSES I FACTORS DE RISC

La majoria dels casos de càncer colorrectal es produeixen de forma esporàdica (88-94%), en els quals són importants factors genètics (sexe, factors hormonals, història de pòlips colorrectals,...) i ambientals (dieta rica en carn i grasses, sedentarisme, tabaquisme, obesitat, irradiació prèvia,...). S'estima que un 20% de tots els pacients amb aquesta malaltia, tenen algun component de risc familiar però no compleixen estrictament els criteris del càncer colorrectal hereditari (aquest casos són avaluable pels criteris de Bethesda).

Trobem incidència de càncer colorrectal en malalties inflamatòries del còlon (colitis ulcerosa, malaltia de Crohn) en una freqüència del 1-2% del total d'aquest tumor. En la taula 1.1, es mostren les causes i factors de risc associats amb el desenvolupament del CCR.

CÀNCER COLORRECTAL ESPORÀDIC

- Edat avançada (majors de 50 anys)
- Sexe masculí
- Colectectomia
- Anastomosi ureterocòlica
- Factors hormonals
 - edat avançada en el 1er part
 - menopausa prematura
 - nuliparitat

Factors Ambientals

- Dieta
 - rica en carn i grasses
 - pobra en fibra, folats i calci
- Sedentarisme
- Obesitat
- Diabetis mellitus
- Tabaquisme
- Irradiació prèvia

Història de tumors esporàdics

- Pòlips colorrectals
- Càncer colorrectal (1,5-3% risc en 5 anys d'un 2^{on} CCR)
- Càncer d'intestí prim, endometri, mama o ovari

Càncer colorrectal familiar (20%)

- Primer o segon nivell de parentesc amb pacients de CCR
- No es compleixen del tot els criteris per CCR hereditari

Malaltia inflamatòria intestinal (1-2%)

- Colitis ulcerosa
- Malaltia de Crohn

Taula 1.1: Llistat dels factors de risc associats amb el càncer colorrectal que es desenvolupa de forma esporàdica o associat a les malalties inflamatòries intestinals.

1.2.1- EL CàNCER COLORRECTAL HEREDITARI

Definim com a càncer colorrectal hereditari un 5-10% dels casos diagnosticats. La incidència és més alta en familiars de primer grau de

pacients amb càncer colorrectal. Les dues formes principals són HNPCC (*Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer*) i FAP (*Familial Adenomatous Polyposis*), encara que se n'han definit d'altres, descrites a la taula 1.2.

Síndrome	Gen mutat	Locus	Herència	Funció
FAP	APC	5q	AD	Inhibició de la via Wnt
HNPCC	MLH1	3p	AD	MMR (via de reparació de l'ADN)
	MSH2	2p	AD	MMR
	MSH6	2p	AD	MMR
	PMS2	7p	AD	MMR
MAP	MYH	1p	AR	Reparació per escissió de bases
Peutz-Jegher	LKB1	19p	AD	Serina-treonina quinasa
Poliposi juvenil	SMAD4	18q	AD	Senyalització TGF- β
	ALK3	10q	AD	Senyalització TGF- β i BMPA
Cowden	PTEN	10q	AD	Inhibició senyalització AKT

Taula 1.2: Llistat de síndromes hereditaris definits per al càncer colorrectal. La majoria dels gens són heretats de forma autosòmica dominant (AD), essent només MAP adquirit de manera autosòmica recessiva (AR).

La **poliposi adenomatosa familiar (FAP)** és una malaltia autosòmica dominant que, en el 80% dels casos, és causada per mutacions germinals en el gen *APC* (*Adenomatous polyposis coli*). Els individus afectats desenvolupen més de 100 pòlips entre la segona i la tercera dècada de vida, progressant cap a càncer en aproximadament el 100% dels casos sense tractament (1, 2). Un subgrup d'afectats, tenen mutacions bial·lèliques en el gen *MYH*, que codifica per una ADN glicosilasa involucrada en la reparació de l'ADN. Aquesta variant és anomenada MAP (*MYH-associated polyposis*) i representa un 1% dels casos de CRC (2).

El **càncer de còlon hereditari no polipòsic (HNPCC)** o **Síndrome de Lynch** és una alteració autosòmica dominant que representa entre un 1 i un 5% dels casos de CRC. Es caracteritza per l'aparició de tumors al còlon dret en individus amb una mitjana d'edat de 42 anys, sense relació amb pòlips, amb una alta incidència familiar de tumors de còlon sincrònics i metacrònics. El càncer de còlon no és la única manifestació fenotípica

d'aquesta malaltia, sinó que és freqüent l'aparició de càncer d'endometri, ovari, renal i urogenital. Es genera a partir de mutacions germinals en els gens de la via de reparació de l'ADN per aparellament de bases o *Mismatch Repair* (MMR), principalment en els gens MSH2 i MLH1, que provoquen el mal funcionament del sistema de reparació i una característica molecular anomenada *inestabilitat de microsatèl·lits*, que consisteix en l'acumulació de mutacions en les seqüències microsatèl·lits (repeticions curtes) de l'ADN (2).

1.3 PATOGÈNESI

El càncer colorrectal esporàdic és el resultat de l'acumulació de mutacions somàtiques en una cèl·lula (3). Els gens normalment mutats, pertanyen al grup dels oncogens (responsables de la proliferació cel·lular, controlada en condicions normals), gens supressors tumorals (controlen el creixement cel·lular) i gens de la via MMR. Segons la hipòtesi *two-hit* (figura 1.1), el càncer esporàdic apareix quan es produeix una mutació en cada un dels al·lels del gen supressor tumoral. D'aquesta manera s'explica perquè els tumors esporàdics apareixen en edat més tardana que els hereditaris, que ja tenen una còpia del gen mutada.

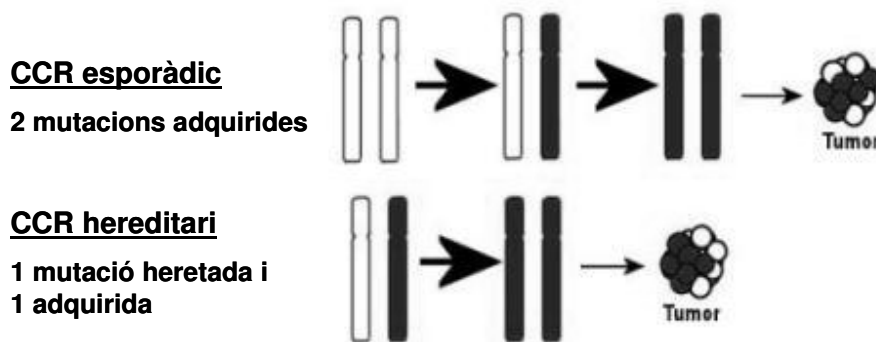


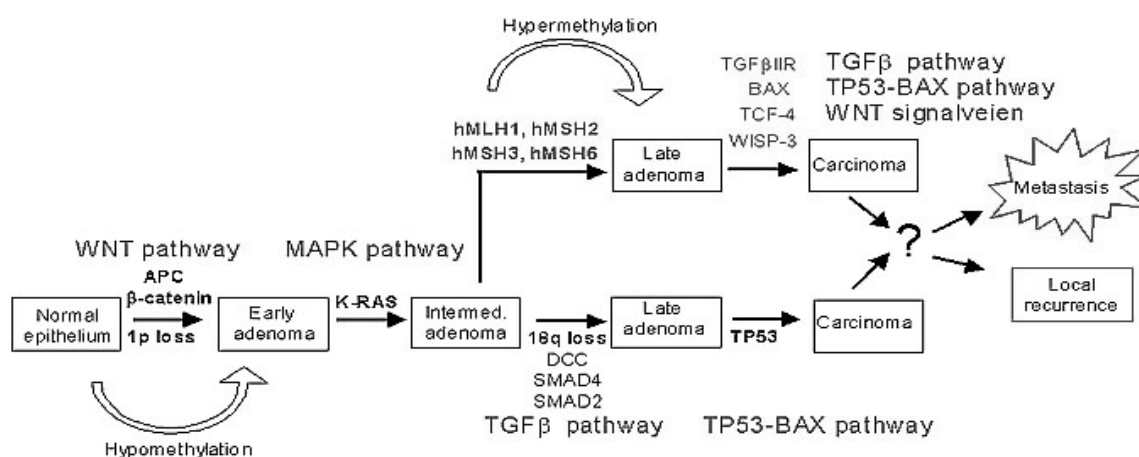
Figura 1.1: Esquema representatiu de la hipòtesi *two-hit*. En blanc es representen els cromosomes normals i en negre els que contenen mutacions.

Aproximadament entre un 70% i un 90% dels càncers colorrectals (CCRs) sorgeixen a partir de pòlips adenomatosos. Entre un 15% i un 30% de persones desenvolupen pòlips i al voltant d'un 30% d'aquests són

hiperplàtics. Els pòlips més grans de 2 cm de diàmetre es convertiran en malignes amb una probabilitat del 50% (4).

La seqüència **adenoma-carcinoma** (figura 1.2) és la base per al desenvolupament del càncer colorrectal, amb l'acumulació dels canvis genètics corresponents (1). La carcinogènesi colorrectal s'explica per dues vies diferents: via *gatekeeper* i via *caretaker* (5).

Caretaker pathway (HNPCC)



Gatekeeper pathway (APC)

Figura 1.2: Esquema de la via adenoma-carcinoma. En el dibuix es mostra la via *caretaker* (superior) i la *gatekeeper* (inferior), amb els gens involucrats.

La via *gatekeeper* o via supressora és la responsable del 85% dels càncers colorrectals esporàdics i és el mecanisme que es dona en els pacients amb FAP. *Gatekeepers* són els gens que regulen el creixement. Un dels passos clau d'aquesta via són les mutacions en el gen APC, que provoca la no modulació de la proteïna β-catenina, la qual controla la proliferació cel.lular (3). Altres gens supressors tumorals (DCC, DPC4/Smad4, p53) i oncogens (k-ras, c-myc, c-neu, c-erb-2, c-src) també estan involucrats en el procés. La mutació en el gen k-ras és present en més d'un 50% dels CCRs esporàdics i produeix l'activitat constitutiva de la proteïna (estimulació continua del creixement). Les mutacions en el gen DDC en el cromosoma 18, són presents en un 50% dels adenomes avançats. El mal funcionament de la proteïna p53 per la presència de mutacions és l'últim pas per al

desencadenament del carcinoma. La pèrdua d'aquesta proteïna, que juga un paper clau en l'aturada del cicle cel·lular i la reparació de l'ADN quan la cèl·lula és danyada, es produeix en aproximadament un 75% dels CCRs esporàdics. La seqüència de tots aquests canvis moleculars no és lineal sinó un conjunt d'esdeveniments que es van produint al llarg del temps.

La via *caretaker* o via mutadora es caracteritza per la presència de mutacions o canvis epigenètics en gens que mantenen l'estabilitat genètica en condicions normals. És la via que es produeix en els pacients amb HNPCC i apareix en un 15% dels càncers colorrectals esporàdics. Els gens responsables són els que formen part del sistema de reparació per aparellament de bases o *mismatch repair*. El gen hMLH1 és el que es troba més freqüentment alterat en el CCR esporàdic. Els defectes en aquests gens, provoquen l'anomenat fenotip mutador (gens que acumulen errors replicatius, donant lloc a mutacions). Quan aquestes mutacions es donen en gens com TGFβRII, IGF2R i Bax, es desencadena el carcinoma (3).

1.4 DIAGNÒSTIC I ESTADIFICACIÓ

La principal simptomatologia relacionada amb el càncer colorrectal és l'aparició d'alteracions del ritme de defecació, restrenyiment persistent, rectorràgies, anèmia ferropènica crònica i oclusió intestinal.

El diagnòstic es realitza mitjançant un enema opac i una colonoscòpia amb biòpsia de la lesió neoplàsica. És important que la colonoscòpia sigui completa, amb la finalitat de descartar tumors sincrònics. Si no és possible, a causa de la presència d'una estenosi tumoral infranquejable, aquesta es realitzarà durant o després de la intervenció.

L'avaluació diagnòstica d'un pacient amb CCR abans de la cirurgia ha d'incloure:

- Anamnesi, destacant els antecedents familiars.
- Examen físic complet, que inclogui un tacte rectal.
- Hemograma i bioquímica hemàtica amb tests de funció hepàtica i renal.
- Nivells sèrics de l'antigen carcinoembrionari (CEA).
- Radiografia simple de tòrax PA i lateral.

- TAC (Tomografia axial computeritzada) abdominal.

Pel que fa al càncer de recte, una ressonància magnètica de la pelvis és una prova obligada en el diagnòstic de l'extensió local, ja que defineix la vora circumferencial amb major sensibilitat que l'ecografia transrectal. Aquesta última, ajuda a determinar l'afectació transmural i la presència de metàstasis ganglionars.

Juntament amb l'avaluació clínica, es realitza l'avaluació patològica de la malaltia. la metodologia de classificació usada en l'actualitat per al diagnòstic del CCR és el sistema TNM (6) de la UICC (*International Union Against Cancer*) i posteriorment adaptada per la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) (7). Les característiques de cada estadi definit mitjançant aquest sistema i la correspondència amb altres mètodes d'estadificació més antics, com el Dukes i Astler-Coller modificat (ACM) es mostren a la figura 1.3.


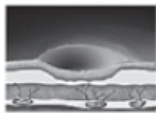
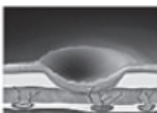

Criteris d'estadiatge per CCR segons la AJCC (American Joint Commitee on Cancer)				
	Estadi I	Estadi II	Estadi III	Estadi IV
Desenvolupament malatia				
Estadificació TNM	T1 N0 M0 T2 N0 M0	A: T3 N0 M0 B: T4 N0 M0	A: T1-2 N1 M0 B: T3-4 N1 M0 C: Tn N2 M0	Tn Nn M1
Descripció	Invasió de la submucosa (T1) / muscular pròpia (T2) No hi ha metàstasi als ganglis limfàtics regionals (N0) ni metàstasis distants (M0)	Invasió de la subserosa o teixits pericòlics o perirectals no peritonealitzats (T3) Invasió altres òrgans o estructures; perforació del peritoneu (T4)	Metàstasi en de 1 a 3 (N1) o més (N2) ganglis limfàtics.	Qualsevol estadiatge de tumor primari (Tn) i nòduls (Nn). Metàstasis distants (M1)
Tractament usual	Cirurgia	Cirurgia ± quimioteràpia	Cirurgia + quimioteràpia	Quimioteràpia ± cirurgia
OS als 5 anys	80-95%	A: 72-75% B: 65-66%	A: 55-60% B: 35-42% C: 25-27%	0-7%
Altres estadificacions				
<u>Dukes</u>	A	B	C	—
<u>ACM</u>	A B1	B2 B3	C1 C1, C2 C1, C2, C3	D

Figura 1.3: Esquema de l'estadificació descrita per al CCR basant-se en la classificació pel sistema TNM. Característiques de tractament i supervivència (OS) associades amb cadascun dels estadis i correspondència amb altres mètodes de classificació.

1.5 FACTORS PRONÒSTIC

La prognosi del CCR està influenciada per una sèrie de factors presents en el moment del diagnòstic: l'edat, el sexe, la presència de símptomes, la localització del tumor, la presència d'obstrucció, la necessitat d'una transfusió i la qualitat de la intervenció quirúrgica (8). La recerca de factors pronòstic va dirigida a establir una sèrie de paràmetres que permetin predir l'evolució dels pacients. En el moment actual, la decisió de tractament per a la malaltia locorregional es basa en l'estadi patològic, però l'evolució d'alguns pacients pot ser diferent malgrat pertanyin al mateix estadi (9). Amb tot això, juntament amb els factors clínicopatològics clàssics com l'estadificació, el grau histològic, els nivells plasmàtics de CEA preoperatoris, la invasió limfàtica i perineural i el nombre de ganglis afectats, s'han incorporat els factors aportats per la biologia molecular (taula 1.3) dels quals els més significatius són les mutacions del gen k-ras, la inestabilitat de microsatèl·lits i la pèrdua d'heterozigositat dels cromosomes 8p i 18q. Aquests factors moleculars han estat relacionats amb l'agressivitat del tumor, la capacitat de proliferació i la diferenciació tumoral, la migració, l'adhesió i la capacitat d'invasió, la capacitat apoptòtica i les funcions immunitàries (10). Recentment, s'ha demostrat el possible paper que podrien tenir les cèl·lules tumorals circulants com a factors pronòstic de la malaltia, obrint noves vies d'estudi. Per altra banda, la informació pronòstica és completada amb el coneixement dels factors predictius de resposta al tractament, que són gens relacionats amb l'activitat dels agents quimioteràpics actius en aquest tumor.

Factors moleculars:

- Oncogens: mutacions k-ras, LOH* 18q, TGF β , c-erbB2, EGFR, c-myc
- TSG*: p53, APC, DCC, MCC, p27, Allelic Imbalance
- Gens reparadors de l'ADN: gens del sistema "Mismatch"
- Vies d'apoptosi: Bcl-2, Bax, p53
- Angiogènesi/ metàstasi/ proliferació: TP, VEGF, MMPs, Upa, E-cadherina, CD44
- Dianes terapèutiques. TS, DPD, DHFR, GARFT, Topo I ...

Taula 1.3: Llistat dels factors moleculars que influeixen en el pronòstic del càncer colorrectal. TSG*: gens supressors tumorals; LOH*:pèrdua heterozigositat

1.6 TRACTAMENT DEL CÀNCER COLORRECTAL

1.6.1- MALALTIA LOCALITZADA

1.6.1.1- Cirurgia

Els tumors de còlon i de recte difereixen en la manera de plantejar tant el seu estudi preoperatori com en les opcions de tractament quirúrgic i teràpies coadjuvants.

TRACTAMENT QUIRÚRGIC DEL CÀNCER DE CÒLON

El tractament estàndard per als pacients amb càncer de còlon localitzat és l'extirpació quirúrgica del tumor i dels ganglis limfàtics primaris i regionals. Els avenços en la imaginologia preoperatoria han permès millorar la selecció dels pacients aptes per a l'extirpació.

Els principis tècnics d'una cirurgia curativa del càncer de còlon són l'extirpació en bloc del tumor primari amb qualsevol altre teixit que pogués estar infiltrat pel mateix, l'àrea que comprèn el seu drenatge limfàtic i vascular i uns adequats marges longitudinals de seguretat (11). Les tècniques quirúrgiques clàssiques segueixen vigents: hemicolectomia per al còlon dret, transvers, esquerre i l'angle esplènic; sigmoidectomia per al còlon sigmoide; extirpació anterior alta del recte per la zona d'unió còlon-recte. Tanmateix, les tècniques laparoscòpiques han estat comparades amb les tècniques convencionals i han donat resultats similars pel que fa a l'eficàcia essent la laparoscòpia una tècnica menys invasiva (1).

TRACTAMENT QUIRÚRGIC DEL CÀNCER DE RECTE

En el càncer de recte, la cirurgia també és el tractament primari i dona com a resultat la curació en al voltant del 45% dels pacients. El grau de penetració del tumor a la paret intestinal i l'afectació ganglionar, ajuden a determinar quins són els pacients candidats a l'escissió local enlloc d'una cirurgia més àmplia i quins poden ser candidats a la quimioteràpia i radioteràpia preoperatoria. Una de les principals limitacions de la cirurgia rectal és la incapacitat d'obtenir marges radials amplis a causa de la presència de la pelvis òssia, i això pot predir també la recaiguda local.

La utilització de tècniques com l'extirpació transanal, la microcirurgia endoscòpica transanal (TEM) i la laparoscòpia, disminueixen l'agressió quirúrgica i milloren la recuperació dels pacients. La incorporació de la tècnica de l'escissió mesorrectal total ha permès una millora espectacular en els percentatges de recurrència local de la malaltia (1).

1.6.1.2- La radioteràpia

La funció de la radioteràpia (RT) en el tractament del càncer de còlon no està ben definida. Contràriament, la RT té un paper important en la reducció de la recurrència local del tumor i la millora de la supervivència dels pacients amb càncer rectal (1). S'han realitzat diversos estudis clínics en els quals es pretenia valorar el benefici de la radioteràpia preoperatòria i/o postoperatòria en el tractament local dels tumors de recte. En l'estudi CKVO 95-04 (12) es va demostrar que la radioteràpia preoperatòria a curt termini (5x5 Gy) millora la recurrència, però només en tumors rectals inferiors a 10 cm que no presenten marges positius. Per altra banda, en l'estudi alemany CAO/ARO/AIO-94 es va comparar la radioquimioteràpia a llarg termini (50.4 Gy/ 5-fluorouracil) preoperatòria amb la postoperatòria. Es va observar que la primera és més eficaç que la segona pel que fa a la recurrència local (6% vs 13%) i també presenta menys toxicitat (13).

Els aparells actuals de radioteràpia són de gran potència i d'una acció molt localitzada i selectiva sobre la zona que es vol irradiar, per la qual cosa permeten aplicacions breus i d'efectes habitualment ben tolerats.

1.6.2- LA QUIMIOTERÀPIA

En els últims 10 anys, el nombre i la importància del tractament no quirúrgic del CCR ha incrementat espectacularment, tant en el camp de l'adjuvència com en la malaltia metastàsica. Les opcions de tractament basades en el 5-fluorouracil (5FU) administrat en monoteràpia, han estat substituïdes per la poliquimioteràpia amb la incorporació d'altres agents antineoplàsics (capecitabina, irinotecan i oxaliplatí) i els fàrmacs biològics antidiària (bevacizumab, cetuximab i panitumumab) en el tractament estàndard d'aquesta malaltia.

1.6.2.1- Teràpia neoadjuvant i adjuvant

El tractament d'adjuvància estàndard en el càncer de recte és el 5FU més radioteràpia. En canvi, en el càncer de còlon, tant el tractament adjuvant com el neoadjuvant està basat en la quimioteràpia, ja que no s'ha demostrat una eficàcia de la RT en aquest tumor.

TRACTAMENT NEOADJUVANT

En els últims anys, la quimioteràpia neoadjuvant, administrada abans d'una cirurgia amb intenció curativa en la malaltia localitzada, ha significat un canvi de plantejament del tractament de la malaltia en pacients amb càncer colorrectal avançat, ja que ha permès la possibilitat d'operar metàstasis hepàtiques inicialment inextirpables. Al voltant d'un 50% de pacients diagnosticats per CCR desenvoluparan metàstasis hepàtiques, essent només entre un 10 i un 25% operables d'entrada. No obstant, un 15% dels pacients de mal pronòstic tindran metàstasis hepàtiques extirpables després de sotmetre's a aquests tractaments, augmentant la seva mitjana de supervivència de 6-18 mesos a un 30-40% de supervivència als 5 anys.

Els règims quimioteràpics usats es basen en una fluoropirimidina en combinació amb oxaliplatí (L-OHP). També s'ha descrit la combinació de tres fàrmacs (5FU, L-OHP i CPT11) en el tractament de les metàstasis, donant uns resultats molt favorables. En un estudi d'Abad et al. (14) un 40% dels malalts amb metàstasis hepàtiques no operables van poder ser operats després de sotmetre's al triplet de quimioteràpia, assolint una supervivència mitjana (SM) de quasi 20 mesos i uns nivells de toxicitat manejables.

Recentment, s'ha descrit el paper beneficiós del bevacizumab (15) i del cetuximab combinat amb FOLFIRI (estudi fase II CRYSTAL) en el tractament neoadjuvant.

TRACTAMENT ADJUVANT

La introducció de la quimioteràpia adjuvant com a tractament complementari a la cirurgia curativa ha permès incrementar el temps lliure de malaltia (ILM) i la supervivència global (SG) dels pacients amb tumors de còlon. La malaltia microscòpica residual o micrometastàsica no acostuma a ser perceptible i aquest tractament postoperatori ajuda a prevenir la

recurrència del tumor. Encara que en estudis clínics s'ha observat l'avantatge del tractament adjuvant en pacients amb CCR d'estadi III (16), el seu valor potencial en l'estadi II és encara polèmic (17).

La quimioteràpia en adjuvència basada en el 5FU, seguint principalment l'esquema de la clínica Mayo (5FU 450mg/m²/dia + àcid folínic 20mg/m²/dia durant 5 dies en cicles cada 28 dies), ha estat la utilitzada de forma estandaritzada. Aquest esquema va ser acceptat després de diversos estudis que demostraven el seu benefici (un 6%) davant el braç control. A partir de l'any 2000, la introducció de nous fàrmacs va obrir les portes en el camp de la malaltia disseminada i també en el tractament adjuvant. En l'estudi multicèntric en adjuvència MOSAIC (18), van ser estudiats els efectes tòxics i l'eficàcia del tractament amb FOLFOX4 (oxaliplatí, 5FU i leucovorin) davant la infusió continua de 5FU-leucovorin (5FU-LV) en 2246 pacients amb CCR en estadi II o III ja operats. Els resultats mostraren una millora significativa de ILM als 3 anys en els pacients tractats amb FOLFOX4 (78,2% vs 72,9%) reduint el risc de recaiguda un 23% respecte al grup de 5FU-LV. Pel que fa a la toxicitat, el braç de L-OHP va presentar índexs més elevats. A partir d'aquest estudi, el FOLFOX4 es va convertir en una opció terapèutica estàndard en el tractament adjuvant. Per altra banda, es va realitzar un estudi similar per al CPT11, el PETACC3/V-307, però es va aturar per les grans toxicitats que causava la branca d'irinotecan (1). També s'ha valorat el paper de la capecitabina (CAPE) en aquests règims de tractament per a la comoditat que comporta al pacient la seva forma d'administració (oral). Cassidy et al. van realitzar un estudi en el que comparaven la CAPE amb un braç que rebia 5FU-LV en pacients amb CCR d'estadi III, conclouent que la CAPE presentava la mateixa eficàcia que el 5FU (19).

Davant la necessitat de trobar marcadors que permetin seleccionar aquells pacients als quals el tractament adjuvant els és segur beneficiós, Ribic et al. van realitzar un estudi amb 287 pacients dels quals un 17% presentaven *inestabilitat de microsatèl·lits d'alt grau* (MSI-H). Els autors van observar que, davant el tractament amb 5FU-LV, els pacients no MSI-H presentaven un avantatge en la SG respecte els que sí que ho eren i proposaren aquest fenotip com a marcador (20). No obstant, en un estudi de 542 pacients

publicat l'any 2007, Kim et al. van presentar uns resultats que no recolzaven aquesta hipòtesi (21).

La introducció dels anticossos monoclonals en el tractament de la malaltia disseminada ha plantejat el paper que aquests poden jugar en l'adjuvència, tenint en compte que en aquests règims de tractament la relació cost/eficàcia té una gran importància. En els últims anys, s'han iniciat diversos estudis clínics per a valorar l'eficàcia i la tolerabilitat dels agents antidiana, com per exemple els estudis AVANT (suspès per presentar massa toxicitat) i NSABP C-08, que testaven l'aportació del bevacizumab en combinació amb quimioteràpia basada en L-OHP en el tractament adjuvant del CCR (22).

1.6.2.2- Malaltia disseminada o recurrent

El tractament amb quimioteràpia en la malaltia avançada intenta millorar la supervivència i la qualitat de vida dels pacients. Per als pacients amb malaltia recurrent local o metastàsica localitzada només en el fetge o només en el pulmó, la cirurgia, si és possible, és l'únic tractament curatiu. En els pacients amb metàstasis hepàtiques que es consideren operables (en base a el número limitat de lesions, ubicació intrahepàtica de la lesió, carència d'implicació vascular major, malaltia extrahepàtica absent o limitada, suficient reserva hepàtica funcional), l'extirpació de marges negatius ha estat relacionada amb taxes de supervivència als 5 anys d'un 30-40%. És important destacar que al voltant d'un 15% de les metàstasis hepàtiques inicialment no operables, esdevindran operables després de tractar al pacient amb quimioteràpia sistèmica (veure apartat 1.6.2.1).

Els esquemes de tractament del càncer colorrectal disseminat o metastàsic (CCRm) amb quimioteràpia es basen en el 5FU com a fàrmac estàndard que, inicialment, s'administrava en monoteràpia. Gràcies a la introducció de la modulació bioquímica amb àcid folínic (AF) i posteriorment la infusió continua (IC) com a noves vies d'administració del fàrmac, es va fer un gran avenç en el tractament de la malaltia (23, 24). Les taxes de resposta (RO), de temps a la progressió (TP), supervivència mitja (SM) i toxicitat hematològica (H) i no hematològica (NH) que s'assoliren són les mostrades a la taula 1.4. L'aparició de les bombes d'infusió portàtils va facilitar l'establiment de la IC com a via d'administració estàndard. Els esquemes de

tractament més utilitzats han estat els de la Clínica Mayo i de Roswell Park en la modulació bioquímica i el règim TTD, de Gramont i AIO per a la IC (taula 1.5) (25).

A partir de l'any 2000 es van incorporar l'irinotecan i l'oxaliplatí en els esquemes de tractament, substituint la monoteràpia per la combinació de fàrmacs i millorant la taxa de resposta (>50%), el TP i la SM (taula 1.4). Aquestes millores van ser descrites en diversos estudis clínics tant per irinotecan (26, 27) com per L-OHP (28).

	ACTIVITAT			TOXICITAT	
	%RO	TP (mesos)	SM (mesos)	%H	%NH
5FU bolus *IV	14-33	3-5	9-12	1-14	2-30
*IC 5FU	22-37	6-7	11-15	0-13	4-9
*IC 5FU + Combinació	>50	6-9	16-17	0-46	3-44

*IV: intravenós; IC: infusió continua

Taula 1.4: Resum dels diferents esquemes de tractament pel CCRm basats en 5FU i utilitzats en 1^a línia abans de la introducció dels fàrmacs biològics.

En base a tots aquests resultats, els règims quimioteràpics acceptats en primera línia de tractament són els basats en 5FU-irinotecan i en 5FU-oxaliplatí, tal i com es mostra a la taula 1.5. Es van realitzar diversos estudis per avaluar quina combinació, FOLFOX o FOLFIRI, era més eficaç i quin era el millor esquema d'administració en primera i segona línia (FOLFIRI+FOLFOX o FOLFOX+FOLFIRI). No es van trobar diferències significatives entre les dues combinacions, encara que FOLFOX va semblar ser més efectiu en 2^a línia després de l'administració de FOLFIRI. Actualment, s'usen indiferentment en primera i segona línia (29, 30). Per altra banda, ha estat avaluada l'activitat i la toxicitat dels triplets de 5FU, oxaliplatí i CPT11, donant resultats molt encoratjadors (31, 32). L'any 2005 va ser aprovada la capecitabina en el tractament d'aquest tumor. Amb la introducció d'aquest fàrmac van aparèixer nous esquemes d'administració (taula 1.5) que han demostrat ser tant eficaços com els basats en 5FU (33). Pel que fa a la segona i la tercera línia de tractament, aquestes depenen de quins van ser els règims emprats en les línies anteriors, ja que s'ha observat que el fet de rebre tots els fàrmacs disponibles, augmenta la supervivència dels pacients amb CCRm.

5FU monoteràpia
<ul style="list-style-type: none"> • Clínica Mayo: bolus 425mg/m² 5FU-20mg/m² AF; 1-5 dies consecutius/ cada 4 setmanes (6 cicles) • Roswell Park: bolus 500mg/m² 5FU-500mg/m² AF; setmanalment (6 setmanes consecutives). Cada 8 setmanes • règim TTD: 3,5g/m² 5FU IC 48h setmanalment; En combinació: 2,25g/m² • règim de Gramont: 400mg/m² AF infusió 2h;400mg/m² 5FU en bolus; 2-3g/m² 5FU infusió 46h • AIO: 2600mg/m² infusió 24h/setmanalment; modulació amb 500mg/m² AF
POLIQUIMIOTERÀPIA
Primera línia
<ul style="list-style-type: none"> • FOLFOX4: 200mg/m² AF IV i 85mg/m² L-OHP IV 2h+5FU 400mg/m² bolus IV+5FU 600mg/m² 5FU IC 22h. Repetir 5FU+AF el dia 2. Cada 2 setmanes. • FOLFOX6 modificat: 400mg/m² AF 2h+85mg/m² L-OHP 2h+5FU 400mg/m² bolus IV seguit de 5FU 2400mg/m² IC 46h. Cada 14 dies (12 cicles) • FUOX TTD: L-OHP 85mg/m² IV 2h;2250mg/m² 5FU IC 48h. Setmanal (cada 2 setmanes) durant 7 mesos. • FOLFIRI: 200mg/m² AF IV 2h; 5FU 2,4-3g/m² IC 46h; CPT11 180mg/m² IV 30' cada 2 setmanes. • FUIRI: 5FU 2250mg/m² IC 48h; CPT11 80mg/m² 30'. Setmanalment. • IFL o de Saltz: CPT11 125mg/m², bolus 5FU 500mg/m²+bolus AF 20mg/m². Setmanalment. Cada 4 de 6 setmanes. • AIO: 100mg/m² CPT11+AF 500mg/m² 2h; 5FU 2000mg/m² bolus IC 24h setmanalment;4 vegades l'any (52 setmanes). • XELOX: 1000mg/m² CAPE 12hx14/21 dies; L-OHP 130mg/m² cada 21 dies • XELIRI: 1000mg/m² CAPE 12hx14/21 dies; CPT11 240mg/m² cada 21 dies. • Bevacizumab: 5mg/kg cada 2 setmanes combinat amb 5FU+CPT11/L-OHP.
Segona línia
<ul style="list-style-type: none"> • Tractament anterior no usat a la 1^a línia. • CPT11 300-350mg/m² cada 21 dies+cetuximab dosi inicial 400mg/m² seguit de 250mg/m² setmanal.

Taula 1.5: Esquemes de tractament del càncer colorrectal disseminat. Els esquemes majoritàriament utilitzats són els marcats en negreta. Els règims de segona i tercera línia són els mateixos que els descrits en la 1^a línia.

Tots aquest esquemes han servit com a plataforma sobre la qual s'han creat noves combinacions amb fàrmacs selectius com els inhibidors dels receptors de factors de creixement epidèrmic (cetuximab, panitumumab) i factors de

creixement endotelial vascular (bevacizumab). La recent introducció d'aquests fàrmacs biològics en els règims de tractament ha significat un gran avenç pels pacients amb malaltia disseminada, tant a nivell de resposta, com de TP i supervivència (la SM ha augmentat de 17 mesos a més de 2 anys) (25), a més d'augmentar el ventall de tractaments possibles i emfatitzar la necessitat de l'obtenció de marcadors que permetin fer una selecció de tractament més acurada.

S'han realitzat gran quantitat d'estudis clínics per a valorar l'eficàcia i la toxicitat d'aquests fàrmacs de nova generació en el tractament d'aquest tumor (25). El bevacizumab (Bv) va ser aprovat en 1^a línia de tractament a partir d'estudis com el de Hurwitz et al. (34), en el que observaren un augment de la SG en el grup de pacients que van rebre IFL+Bv (20,6 mesos) respecte el que va rebre només IFL (15,6 mesos). En l'estudi NO16968, es va comparar l'activitat de XELOX I FOLFOX amb o sense Bv, observant-se un augment del TP de 8 a 9,4 mesos a l'afegir l'anticòs monoclonal (35) i corroborant l'acció sinèrgica d'aquest fàrmac amb els règims de quimioteràpia ja establerts, tant en primera com en segona línia de tractament (36). Pel contrari, el Bv sembla tenir una activitat limitada en tercera línia, tal i com observaren Chen et al. en el seu estudi (37).

Pel que fa als anticossos monoclonals anti-EGFR (receptor del factor de creixement epidèrmic), el cetuximab (Cx) i el panitumumab (Pa), diversos estudis han demostrat la seva eficàcia en el tractament del CCRm, observant una toxicitat ben manejable basada principalment en una erupció cutània o *rash* que apareix en un 80% dels pacients (25). En el cas del Cx, gràcies a l'estudi BOND I en el que es comparava l'esquema CPT11+Cx amb Cx sol en pacients que havien progressat davant el tractament de 1^a línia basat en CPT11, el Cx va ser aprovat en combinació amb l'irinotecan com a règim estàndard en pacients resistents a aquest últim en 2^a línia de tractament. Aquest estudi va mostrar un augment de la taxa de resposta (23% vs 11%) i del TP (4,5 vs 1,5 mesos) en el braç Cx+CPT11, encara que no existien diferències en la SG (38). Actualment, s'està valorant el paper del Cx en 1^a línia i els resultats semblen prometedors (39-41). Interessantment, s'ha observat una relació entre el grau de *rash* cutani que el malalt presenta i la resposta al tractament (42) i es va iniciar l'estudi EVEREST, en el qual s'escalava la dosi inicial de Cx (de

50mg/m² a màxim 500mg/m²) fins que apareixia el *rash* cutani. Les dades provisionals han mostrat un augment de la taxa de resposta d'un 13 a un 30% en el grup d'escalada de dosi (25).

La introducció del panitumumab en el tractament del CCRm ha estat posterior. Va ser aprovat en 3^a línia a partir d'estudis com el realitzat per Van Cutsem et al., en el qual valoraren l'efecte del panitumumab (6mg/kg cada 2 setmanes) a l'afegir-lo al tractament bàsic de suport en pacients que havien desenvolupat resistència a irinotecan, oxaliplatí i fluoropirimidines. Observaren que el fet d'administrar panitumumab augmentava un 8% les respostes parcials i un 28% les estabilitzacions i que el TP augmentava d'un 30 a un 48% a la vuitena setmana (43). Posteriorment, es van començar a realitzar estudis de l'aplicació d'aquest anticòs en 1^a i 2^a línia però encara estan en marxa.

El paper sinèrgic dels fàrmacs biològics sobre la quimioteràpia convencional ha estat totalment demostrat. No obstant, cal més informació de com actuen aquests anticòs combinats entre ells. En estudis recents s'ha observat que la combinació entre Bv i Cx sumats als règims de quimioteràpia actuals presenten sinergisme (estudi BOND II). Pel contrari, sembla que el Pa no actua de la mateixa manera que el Cx, ja que els resultats preliminars de l'estudi PACCE, demostren una baixa eficàcia i una alta toxicitat de la combinació Bv+Pa.

1.6.2.3- Resistència al tractament amb quimioteràpia

Malgrat els grans avenços en l'oncologia clínica i la genètica molecular, un dels principals obstacles en l'èxit del tractament del malalt oncològic segueix sent la resistència a la quimioteràpia. D'aquesta manera, davant un mateix tractament, malalts que pateixen una mateixa neoplàsia responen al tractament de manera diferent, el que sens dubte emfatitza la importància del coneixement tant dels perfils genètics individuals, com de les lesions genètiques i/o epigenètiques que han induït el desenvolupament del tumor, tant primari com a distància. La resistència al tractament pot ser deguda a característiques pròpies del tumor i/o de l'hoste (intrínseca) i són aquells tumors que no responen des d'un inici a un determinat fàrmac. La introducció de la poliquimioteràpia va servir per pal·liar en cert grau aquest fenomen i augmentar el nombre de respostes als tractaments en 1^a línia.

De tota manera, en un gran nombre de pacients la resistència apareix al llarg del tractament (adquirida) provocant la necessitat d'un canvi d'estratègia per a lluitar contra la progressió tumoral.

Per a entendre els mecanismes pels quals es desenvolupen els processos de resistència, ja sigui intrínseca o adquirida, és important conèixer els mecanismes d'acció dels fàrmacs utilitzats, ja que són les alteracions en aquestes vies les que donen lloc a aquest fenomen (44). Els mecanismes de resistència han estat àmpliament relacionats amb alteracions en l'acumulació del fàrmac, en la seva diana terapèutica o en la interacció amb aquesta, en els mecanismes de reconeixement i reparació del dany causat a la cèl·lula, en el cicle cel·lular i vies de proliferació, i en les vies apoptòtiques (45). La proteïna p53 ha estat una de les molècules més estudiades ja que juga un paper molt important en el control del balanç entre la proliferació i la mort cel·lular i es troba mutada en un 50% dels tumors. No obstant, els processos de resistència no depenen d'una sola alteració sinó del conjunt de vàries que es complementen i permeten que la cèl·lula segueixi sent viable davant el tractament amb un fàrmac concret. A més a més, les cèl·lules tumorals poden desenvolupar resistència a múltiples fàrmacs alhora (fenotip MDR). Aquest fenomen apareix com a conseqüència de la sobreexpressió de proteïnes transportadores de la família ABC (*Adenosine-triphosphate binding cassette*), principalment de la proteïna MRP (*Multidrug resistance protein*) i la Glicoproteïna P, que són responsables de l'extrusió de la cèl·lula de gran quantitat de substàncies de diferent naturalesa química (46, 47).

1.6.2.4- Selecció del tractament amb quimioteràpia

La resistència a agents antineoplàsics és un procés multifactorial i dependent de tumor. Per tant, una bona opció per a combatre-la seria un tractament personalitzat, mitjançant l'anàlisi de l'ADN del pacient (polimorfismes, mutacions, metilació), dels canvis en els gens diana a nivell d'expressió d'ARN (PCR quantitativa a temps real, tecnologia microarray) i a nivell de proteïna (immunohistoquímica, tècniques de proteòmica). La utilització de tècniques no invasives i de fàcil i ràpida aplicació són vitals per a traslladar la teràpia individualitzada a la rutina clínica diària. Per aquesta

raó, l'anàlisi de l'ADN, tant a nivell de polimorfismes genètics i mutacions com de metilació, han estat els protagonistes en aquests tipus d'estudis.

En la selecció del tractament en el CCR, la timidilat sintasa (TS) ha estat la molècula més àmpliament estudiada, ja que és la diana terapèutica de les fluoropirimidines, fàrmacs clau en el tractament d'aquest tumor. S'han descrit 3 polimorfismes (5'TRP, 5'SNP, 1494del6bp) presents en el gen que codifica per a aquesta proteïna i s'ha estudiat la influència que poden tenir en l'acció d'aquests fàrmacs (48-52). Tanmateix, els resultats obtinguts presenten certa controvèrsia. Per altra banda, s'ha observat que una elevada expressió de TS a la cèl·lula tumoral es tradueix en una pitjor resposta al tractament (53).

En diversos estudis clínics s'ha comparat el 5FU i la CAPE i no s'han observat diferències significatives en la seva eficàcia (33). Tanmateix, Martínez-Balibrea et al. (54) han descrit recentment la relació entre el tractament selectiu amb FUOX o XELOX i la combinació de 2 polimorfismes, un present al gen de la TS (deleció 6pb) i l'altre en el gen que codifica per a la proteïna ERCC1, involucrada en la reparació de l'ADN (Lys→Gln). Els resultats d'aquest treball han mostrat un millor pronòstic pels malalts tractats amb 5FU que tenen tots els al·lels salvatges, plantejant dubtes sobre si aquests dos fàrmacs actuen de la mateixa manera en tots els pacients i demostrant, altre cop, la importància d'un tractament personalitzat basat en la biologia molecular.

És important mencionar que també han estat estudiats altres enzims que intervenen en la metabolització de les fluoropirimidines, com la TP (*Timidin fosforilasa*), la MTHFR (*5,10 metilenetetrahidrofolato reductasa*) i la DPD (*Dihydropyrimidine dehydrogenase*). Encara que els resultats han estat controvertits per als dos primers, sembla existir una relació entre una mutació a l'exó 14 del gen de la DPD i el fet de presentar més toxicitat al tractament amb fluoropirimidines (53).

L'oxaliplatí (veure secció 2) i l'irinotecan han estat també importants focus d'estudi de la biologia molecular per a determinar marcadors que permetin la selecció de tractament. De fet, ja s'està utilitzant un kit comercial que identifica un polimorfisme present en el gen de la UGT1A1 (el UGT1A1*28) per a ajustar la dosi d'irinotecan que ha de ser administrada. La UGT1A1 o uridin-difosfat glucuronosil transferasa és un enzim que intervé en la

detoxificació del CPT11 i, encara que la seva relació amb la resposta al tractament ha estat controvertida, ha esdevingut un bon marcador de toxicitat (53, 55). A més a més, altres enzims d'aquesta família, com la UGT1A7 i la UGT1A9, i altres proteïnes com la carboxilesterasa 2, el transportador ABCG2 i el citocrom P450 3A també han estat relacionats amb l'activitat d'aquest fàrmac (53, 56-58).

En el camp dels fàrmacs biològics, la troballa de marcadors predictius de resposta ha estat un tema pendent des de la seva aprovació degut, en part, al seu alt cost. En els últims anys, no s'han trobat biomarcadors de potencial utilitat en la predicció de resposta al tractament amb bevacizumab (53). En canvi, s'han fet avenços en el camp dels anticossos monoclonals anti-EGFR. S'ha detectat l'existència de correlació entre el número de còpies del gen que codifica per a EGFR i la predicció de resposta (59). Tanmateix, les mutacions a EGFR, correlacionades amb altres fàrmacs que actuen sobre aquest receptor, no han estat associades amb l'activitat de Cx ni Pa. Interessantment, la mutació en els codons 12/13 del gen de la proteïna K-Ras, que es tradueix en un canvi aminoacídic (Gly¹²Val) ha mostrat una clara relació amb l'eficàcia de Cx i Pa (60-63). L'efecte d'aquesta mutació sobre l'activitat de Cx va ser valorada en l'estudi de fase III CRYSTAL, l'objectiu principal del qual era valorar l'efecte beneficiós de l'administració de Cx en combinació amb FOLFIRI en 1^a línia de tractament en pacients amb CCRm. Un 35,6% dels 540 pacients estudiats presentaven la mutació i es va concloure que el Cx tenia un efecte beneficiós només en els pacients que no tenien la mutació (40). A més a més, en l'estudi de fase II OPUS en el que es valorava el benefici aportat pel Cx al ser administrat en combinació amb FOLFOX en 1^a línia de tractament en pacients amb CCRm, es va estudiar aquesta mutació en 233 pacients i es van obtenir resultats similars, arribant a concloure el mateix (41). Per altra banda, en un treball presentat en el *Gastrointestinal Cancer Symposium* el gener de 2008, es van obtenir els mateixos resultats per a Pa. Per tant i d'acord amb els resultats obtinguts sobre la implicació de les mutacions del k-ras en l'activitat dels fàrmacs anti-EGFR, es va plantejar el potencial ús d'aquesta proteïna com a nou marcador de resposta a Cx i Pa i la seva aplicació, en breu, a la pràctica clínica diària.

2. INTRODUCCIÓ: CONCEPTES ESPECÍFICS

2.1 AGENTS PLATINATS: L'OXALIPLATÍ

2.1.1- DESCRIPCIÓ

L'oxaliplatí (1,2-diaminociclohexà-oxalat-platí II) és un derivat platinat de tercera generació, que ha demostrat activitat en tumors intrínsecament resistents a cisplatí (CDDP) o carboplatí, entre ells el càncer colorrectal, en el qual és eficaç en primera línia de tractament, en tumors refractaris a 5FU i en adjuvència (veure secció 1.6.2). També ha mostrat eficàcia en tumors d'endometri, de mama i melanomes en estudis de fase I, i de pulmó de cèl·lula no petita, de pròstata, carcinoma d'ovari, limfomes no-Hodkings i mesoteliomes en estudis de fase II (64). La seva administració es produeix en combinació amb altres fàrmacs com el 5FU, la gemcitabina, els inhibidors de la topoisomerasa I i els taxans. Cal destacar la seva capacitat d'induir respostes en combinació amb 5FU en tumors amb resistència adquirida a aquest últim, ja que produeix una disminució dels nivells d'expressió de la timidilat sintasa, una de les causes de l'aparició de resistència (65).

L'oxaliplatí (L-OHP) va ser desenvolupat l'any 1976 al Japó pel professor Yoshinori Kidani, qui el va patentar l'any 1979. Sanofi-Aventis va adquirir la seva llicència al 1994 i va ser anomenat Eloxatin®. Va ser aprovat l'any 1999 a Europa i posteriorment als Estats Units.

Aquest fàrmac deriva del carboplatí, que alhora prové de la modificació del cisplatí. D'aquesta manera, s'obté un fàrmac que presenta una menor toxicitat que els seus anàlegs i una efectivitat en tumors en que els altres no tenen acció (66). L'oxaliplatí està format per un grup oxalat, una molècula de platí (Pt) i un anell DACH (diaminociclohexà). La presència d'aquest anell, provoca l'engrandiment de la molècula respecte la de CDDP (figura 2.1) i li confereix una estructura lleugerament diferent a la del seu anàleg. Sembla que aquest fet afecta al reconeixement del dany i permet l'activació de mecanismes cel·lulars diferents entre les dues molècules (67). La fórmula química del L-OHP és $C_8H_{14}N_2O_4Pt$ i el seu pes molecular és de 397,28 g/mol. El complex DACH-Pt pot presentar tres conformacions

isomèriques que interaccionen amb l'ADN de manera diferent. Kidani et al. van demostrar que l'isòmer TRANS-L(R,R) era la conformació més efectiva (68).

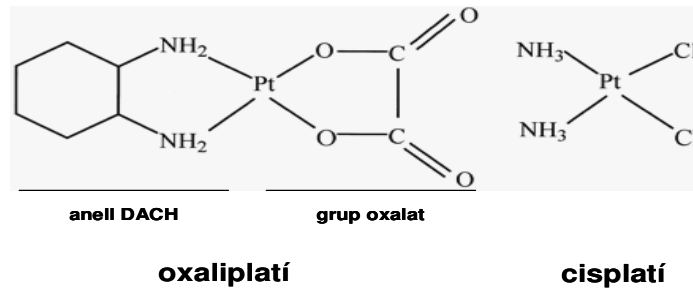


Figura 2.1: Esquema de l'estructura de la molècula d'oxaliplatí i la de cisplatí.

2.1.1.1- Biotransformació i farmacocinètica

La molècula de L-OHP s'administra per via intravenosa i a l'entrar en contacte amb la sang (concentració de clor elevada), perd el grup oxalat i incorpora dues molècules de clor (DACH-Pt-Cl₂). La molècula entra a la cèl·lula principalment per difusió i degut a la baixa concentració de clor intracel·lular, es transforma en DACH-Pt-diaqua, que té afinitat amb les molècules d'ADN. Tot aquest procés (figura 2.2) es produeix de forma no enzimàtica (69, 70).

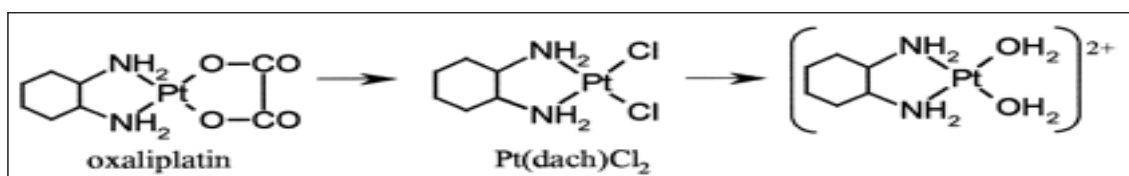


Figura 2.2: Biotransformació de l'oxaliplatí. La molècula canvia la seva composició a l'entrar en contacte amb la sang i posteriorment amb el citoplasma cel·lular convertint-se, finalment, en oxaliplatí-diaqua.

La farmacocinètica de l'oxaliplatí es caracteritza per presentar una curta fase inicial de distribució i una llarga fase final d'eliminació del fàrmac. Aquest no s'acumula al plasma, ja que més del 60% es troba unit irreversiblement a proteïnes plasmàtiques (majoritàriament amb l'albumina sèrica) i eritròcits. L'eliminació es produeix principalment per via renal, per

filtració glomerular, a les 48 h de l'administració. El 50% s'elimina per orina i el 5% per les femtes. També es produeix en un alt percentatge per unió covalent amb teixits corporals (70, 71).

2.1.1.2- Activitat i toxicitat

L'acció de l'oxaliplatí depèn del temps d'exposició al fàrmac i de la dosi administrada. La formació d'adductes DACH-ADN té lloc a les 4 hores de la seva administració i a les 24 hores es produeix l'activació de l'apoptosi cel.lular (72). *In vitro*, l'eficiència de l'oxaliplatí, en molts casos, és major que la del cisplatí perquè amb menys concentració del fàrmac, aconseguim la mateixa eficàcia (73). Això és degut a la diferència estructural que presenten les dues molècules.

La principal toxicitat limitant de dosi causada per l'administració de l'oxaliplatí és la neuropatia sensorial perifèrica que apareix en més d'un 95% dels pacients (71). Aquesta neurotoxicitat és d'ampli espectre, anant des d'una neuropatia sensorial aguda, a una crònica en el següent tractament, encara que és parcialment reversible. La neurotoxicitat aguda causa entumiment i dolor a les extremitats, que empitjora a l'exposar-se al fred. Això és conseqüència de la inhibició de les bombes d'ions sodi i de l'acció com a quelants de calci dels ions oxalat que produeix aquest fàrmac a nivell cel.lular (74). El tractament que s'administra per a controlar aquesta simptomatologia es basa en l'administració de gluconat de calci o sulfat de magnesi abans del següent tractament (64).

Aquesta neurotoxicitat també apareix davant el tractament amb cisplatí i, en molt baixa freqüència amb el carboplatí, que presenta la mielosupressió com a efecte secundari majoritari. A part de l'efecte descrit, el L-OHP també pot produir nàusees i vòmits, diarrea i supressió hematològica (64, 71). Tanmateix, la toxicitat generada per aquest fàrmac és menor a la dels seus anàlegs (75).

La nefropatia és característica de l'efecte del cisplatí i rarament apareix en tractaments basats en L-OHP o carboplatí. A més a més, el L-OHP tampoc acostuma a generar ototoxicitat (64).

2.1.2- MECANISME D'ACCIÓ

Els agents platinats entren dins la cèl·lula mitjançant sistemes de transport principalment passius, encara que també ho fan a través de proteïnes transportadores provocant una despesa d'ATP. Dins la cèl·lula es troben en forma diaqua i carregats positivament, fet que els permet interaccionar amb molècules nucleofíliques com l'ADN, l'ARN i les proteïnes. És acceptat que, generalment, l'ADN és la diana terapèutica preferent d'aquesta família d'agents antineoplàsics, que actuen formant estructures aberrants que provoquen la ruptura de la molècula i desencadenen el bloqueig de la replicació i la transcripció de l'ADN i, finalment, la mort cel·lular (figura 2.3). Els mecanismes cel·lulars activats pel dany causat a l'ADN per part del cisplatí han estat ben caracteritzats i difereixen, almenys en part, als desencadenats per l'acció de l'oxaliplatí, els quals no són ben coneguts (69, 76). Per aquest motiu, tumors que són refractaris a l'acció del primer, com és el cas del CCR, responen al tractament amb el segon.

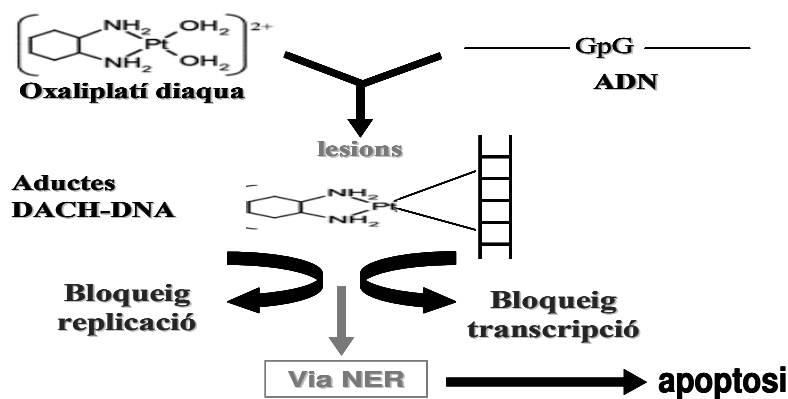


Figura 2.3: Esquema del mecanisme d'acció i la resposta cel·lular que desencadena el L-OHP a l'entrar dins la cèl·lula.

2.1.2.1- Lesions a la molècula d'ADN

La unió de l'agent platinat es produeix mitjançant enllaços covalents amb els nitrògens en posició 7 dels anells imidazol de les guanines (G) i adenines (A), bases nitrogenades puríniques que formen part de la molècula d'ADN. Les estructures aberrants que es formen poden ser intracatenàries, intercatenàries i en forma de monoadductes. El 90% dels monoadductes reaccionen convertint-se en adductes intracatenaris, que són les estructures

que majoritàriament es formen per l'acció d'aquests fàrmacs, principalment en zones GpG i ,en ocasions, ApG de la seqüència de l'ADN (64).

Pel que fa a l'oxaliplatí, encara que aquest forma menys adductes que el cisplatí al ser administrats a la mateixa concentració, té la mateixa eficiència i indueix la mateixa quantitat de trencaments de la cadena de l'ADN que el seu anàleg (73, 77, 78). Tanmateix, a causa de la presència de l'anell DACH, els adductes formats per l'oxaliplatí són més voluminosos i més hidrofòbics i per aquesta raó desencadena l'activació de vies de reconeixement i reparació diferents a la resta d'agents platinats (72, 79).

2.1.2.2- Detoxificació

La detoxificació cel.lular dels agents platinats es produeix principalment a través del sistema glutatió (GSH). En el citoplasma cel.lular, l'oxaliplatí es troba en forma diaqua i això li permet interaccionar amb molècules que contenen grups tiol (SH), com és el cas del GSH (80-82). En aquest procés, els grups SH del glutatió són transferits a la molècula platinada a través de l'enzim glutatió-S-transferasa n (GSTn) i així la molècula pot ser eliminada. (figura 2.4).

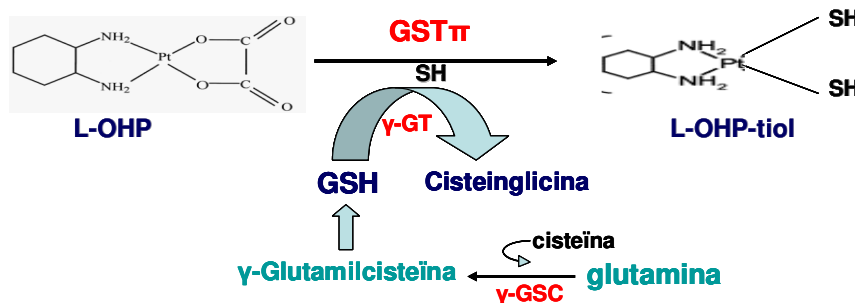


Figura 2.4: Esquema del sistema de detoxificació glutatió. El GSH s'obté a partir del glutamat i es converteix en cisteïnglicina al transferir el grup SH. Els principals enzims que participen en la via són GSTn, Y-GT (γ-glutamilttransferasa) i Y-GCS (γ-glutamilcisteïna sintetasa).

Una part de la detoxificació del fàrmac es produeix a través de les metal·lotioneïnes i d'altres agents antioxidants com la tioredoxina, però semblen ser vies secundàries (64, 76). Les metal·lotioneïnes són proteïnes de baix pes molecular que estan involucrades també en el control dels nivells de coure i zinc, protegint la cèl·lula de l'estrès oxidatiu causat pels metalls pesats.

2.1.2.3- Reconeixement i parada del cycle cel.lular

Les diferències entre l'oxaliplatí i el seu anàleg cisplatí apareixen en la fase de reconeixement del dany cel.lular, ja que les proteïnes que intervenen en aquest procés tenen més afinitat a les unions formades pel cisplatí que per les unions DACH-ADN, degut a diferències existents entre aquestes estructures (67). Tant el sistema d'aparellament de bases errònies o *Mismatch Repair* (MMR) com les proteïnes de la família HMG (*High mobility group*) són els responsables de detectar les estructures aberrants formades pel cisplatí, però el seu paper té molta menys importància en el cas del L-OHP, del qual no es coneixen els mecanismes que hi intervenen. Per aquest motiu, els tumors que tenen el sistema MMR mutat, presenten resistència intrínseca a cisplatí però responen a oxaliplatí, com és el cas del CCR (64). A conseqüència de la detecció de dany a l'ADN, es desencadena la parada del cycle cel.lular mitjançant principalment la proteïna p53. Aquesta proteïna, anomenada *gatekeeper*, s'encarrega d'organitzar la resposta cel.lular per combatre una situació d'estrès (figura 2.5). A través de l'activació de proteïnes com p21, Gadd45 i 14-3-3σ i la inactivació d'altres com la ciclina D, provoca l'aturada de la replicació de l'ADN i de les vies de proliferació, i l'activació dels mecanismes de reparació (45). En el cas del L-OHP, sembla que la parada del cycle es produeix principalment en la fase G2-M, a través del decrement dels nivells de cdc2 (83).

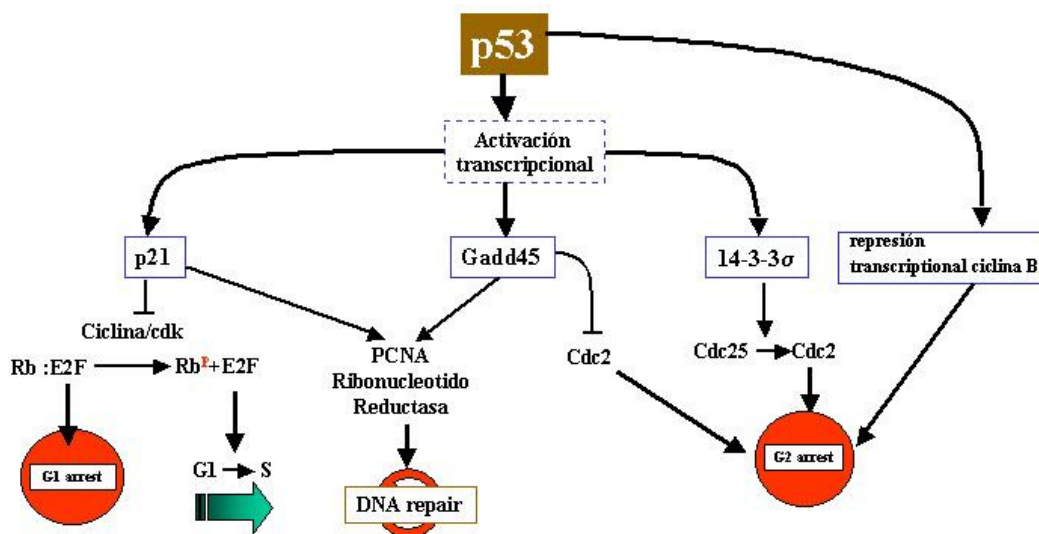


Figura 2.5: Esquema simplificat de la resposta cel.lular mitjançant l'acció de la proteïna p53 davant un dany causat a la cèl.lula.

2.1.2.4- Reparació del dany causat a l'ADN

El següent pas portat a terme per la resposta cel.lular és l'activació de les vies de reparació de l'ADN (figura 2.6). Els mecanismes activats de forma majoritària per l'acció dels agents platinats són els que s'encarreguen de la reparació de danys intracatenaris distorsionadors de la doble hèlix d'ADN: principalment la via de reparació per escissió de nucleòtids o NER i, secundàriament, la via de reparació per escissió de bases o BER. Altres vies de reparació, com el sistema MMR i la reparació per Recombinació Homòloga (HR/NHEJ), han estat relacionades amb l'activitat del cisplatí, però semblen jugar un paper minoritari en la reparació del dany causat per L-OHP (64, 67).

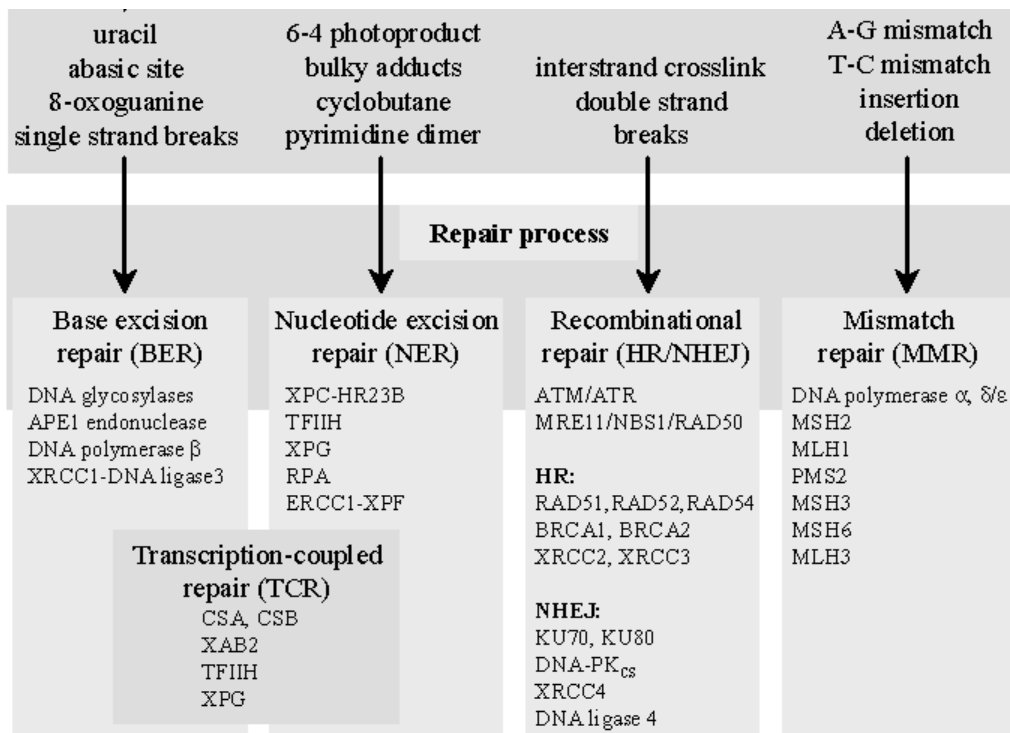


Figura 2.6: Sistemes cel.lulars de reparació de l'ADN activats davant la presència d'un dany cel.lular.

En la via NER participen entre 30 i 40 proteïnes que s'encarreguen de la reparació del material genètic mitjançant l'escissió d'un fragment d'entre 22 i 32 nucleòtids en una de les cadenes de la doble hèlix d'ADN, sintetitzant-los de nou usant l'altra cadena com a motlle. Les principals proteïnes que hi intervenen són les de la família *Xerorema Pigmentosum* (XP) i les del *Síndrome Cockayne* (CS), denominacions que provenen dels síndromes

causats per les mutacions en els gens que les codifiquen. El procés de reparació en el que es basa aquesta via es divideix bàsicament en 5 fases (figura 2.7):

1. Reconeixement del dany: hi intervenen les proteïnes XPC, XPA, CSA, CSB i Rad23B entre d'altres.
2. Desenrotllament local de la cadena: formació del complex TFIIH (XPB, XPD,...) amb activitat helicasa.
3. Escissió de la lesió: les endonucleases XPG i XPF-ERCC1 (*Excision repair cross-complementation group 1*) provoquen una incisió en l'extrem 3' i 5' del fragment respectivament en una sola cadena.
4. Síntesis del nou fragment: la DNA polimerasa resintetitza els nucleòtids del fragment usant l'altra cadena com a motlle, amb l'ajut de la proteïna PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) i RPA (*Replication Protein A*).
5. Relligament: la DNA lligasa uneix el nou fragment a la cadena.

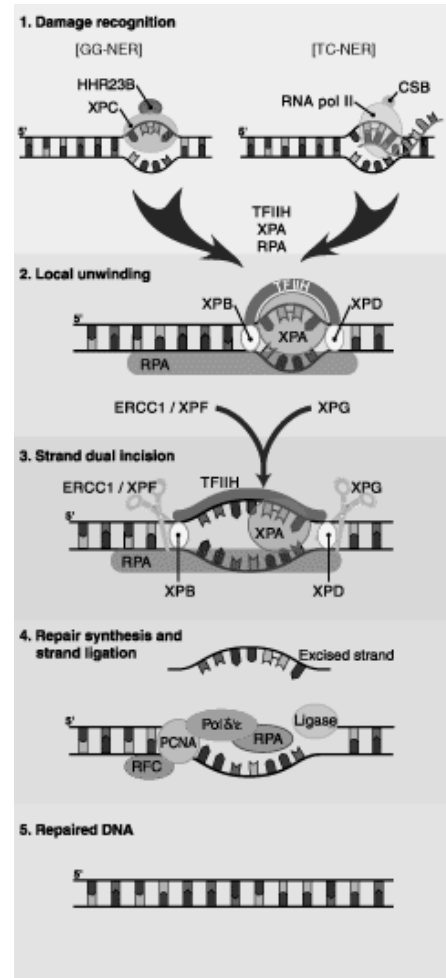


Figura 2.7: Esquema representatiu de les diferents fases que es produeixen durant el procés de reparació de l'ADN mitjançant la via NER.

Aquest mecanisme de reparació pot ser categoritzat en dos classes: GG-NER (*Global Genome NER*) i TC-NER (*Transcription Coupled NER*). GG-NER s'encarrega de reparar el dany a l'ADN de gens tant en estat actiu com inactiu. En canvi, el sistema TC-NER només actua sobre l'ADN que s'està transcrivint i té la capacitat de reconèixer directament el dany provocant la parada del cicle cel.lular i, si cal, activar l'apoptosi. Les dues classes descrites es diferencien també per les proteïnes que intervenen en el reconeixement del dany (XPC-Rad23B en GG-NER i CSA-CSB en TC-NER) (84, 85).

Interessantment, s'ha vist que el sistema NER, que principalment s'encarrega de la reparació dels adductes intracatenaris, actua amb la mateixa eficàcia contra l'acció tant del cisplatí com de l'oxaliplatí (67, 86).

Mentre que la via NER reconeix distorsions voluminoses a l'ADN, la via de reparació per escissió de bases (BER) reconeix lesions específiques i, mitjançant aquest mecanisme, les bases nitrogenades danyades són corregides mitjançant l'acció de glicosilases específiques (84). La relació entre la via BER i l'acció dels platins és menys coneguda. Ha estat descrit el paper de la proteïna XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing group 1*) en la reparació del dany produït per l'oxaliplatí (48, 87, 88), Aquesta proteïna s'associa amb PARP (*Poly ADP-ribose polymerase*), l'ADN polimerasa β i l'ADN lligasa III, actuant com a nexa d'unió, i intervé en la síntesi de la nova base i el relligament amb la cadena d'ADN (89, 90).

2.1.2.5- Vies de transducció de senyals i apoptosi

L'acumulació de lesions a l'ADN causades pels adductes, superen la capacitat de reparació de la cèl·lula i aquesta entra en apoptosi. El procés que desencadena el cisplatí, ben definit a la bibliografia (76), no és el mateix que el que desencadena l'oxaliplatí, el qual ha estat menys estudiat. A causa de la falta de reconeixement dels adductes DACH-Pt per part del sistema MMR, no és destacada l'activació del procés apoptòtic per la via de les Jnk (Jun N-terminal Kinase) i c-Abl quinases com passa amb el cisplatí, sinó que sembla que el L-OHP actua principalment a través de la via de la quinasa p38 (91).

La mort cel·lular desencadenada pels agents quimioteràpics es produeix mitjançant l'apoptosi. No obstant i com és el cas de l'oxaliplatí, una bona part d'aquesta mortalitat és deguda també a processos de necrosi cel·lular. S'han descrit dues vies apoptòtiques principals: la via intrínseca i la via extrínseca (figura 2.8).

La via preferentment activada per l'oxaliplatí sembla ser la intrínseca (92-94), que està regulada per la família de proteïnes pro- i antiapoptòtiques Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2). El balanç entre Bax (proapoptòtica) i Bcl-2 (antiapoptòtica) provoca un canvi de permeabilitat a la membrana mitocondrial que permet l'alliberament de proteïnes per a formar l'apoptosoma i la conseqüent activació de les caspases efectores (95).

Tanmateix l'oxaliplatí, mitjançant Fas-caspasa 8, pot actuar també a través de la via extrínseca (91). S'ha observat *in vitro* que la presència de mutacions en el receptor no tirosin-quinasa c-Src (mutat en un 70% de tumors) provoca l'activació d'aquesta via davant la presència d'aquest platí (96). Per altra banda, s'ha descrit l'habilitat que té aquest fàrmac d'activar aquestes vies de forma independent a p53 quan aquesta està mutada (97) i l'acció inhibidòria que el fàrmac té sobre la proteïna inhibidora d'apoptosi survivina, mitjançant el decrement de cdc2 (83). Tot això fa pensar en la complexitat dels processos desencadenats per aquest fàrmac i la falta de coneixement sobre el seu mecanisme d'acció, ja que queden molts interrogants per resoldre.

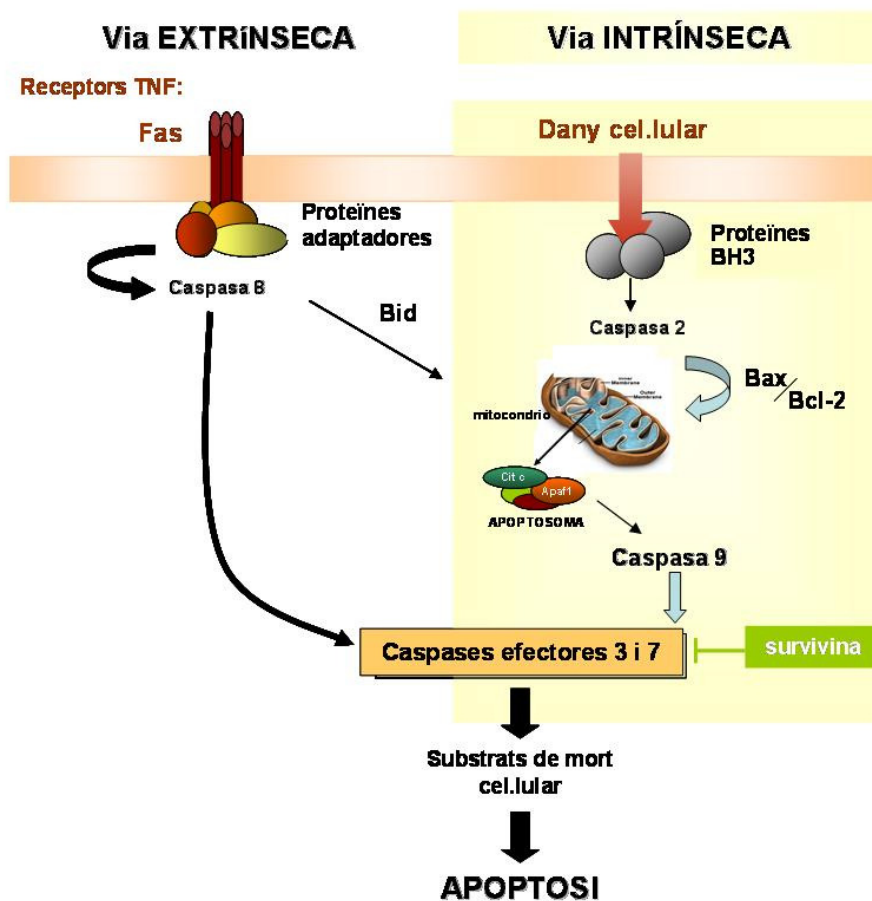


Figura 2.8: Esquema de les principals vies apoptòtiques activades per l'acció de l'oxaliplatí. La via intrínseca depèn de l'acció de la caspasa 9 i l'extrínseca de la caspasa 8, que activaran la cascada de caspases efectores (caspasa 3, 7,...).

2.1.3- MECANISMES DE RESISTÈNCIA

L'adquisició de resistència a fàrmacs platinats és un procés complex, basat en l'alteració de gens que formen part de les diferents vies relacionades amb el seu metabolisme i mecanisme d'acció (figura 2.9).

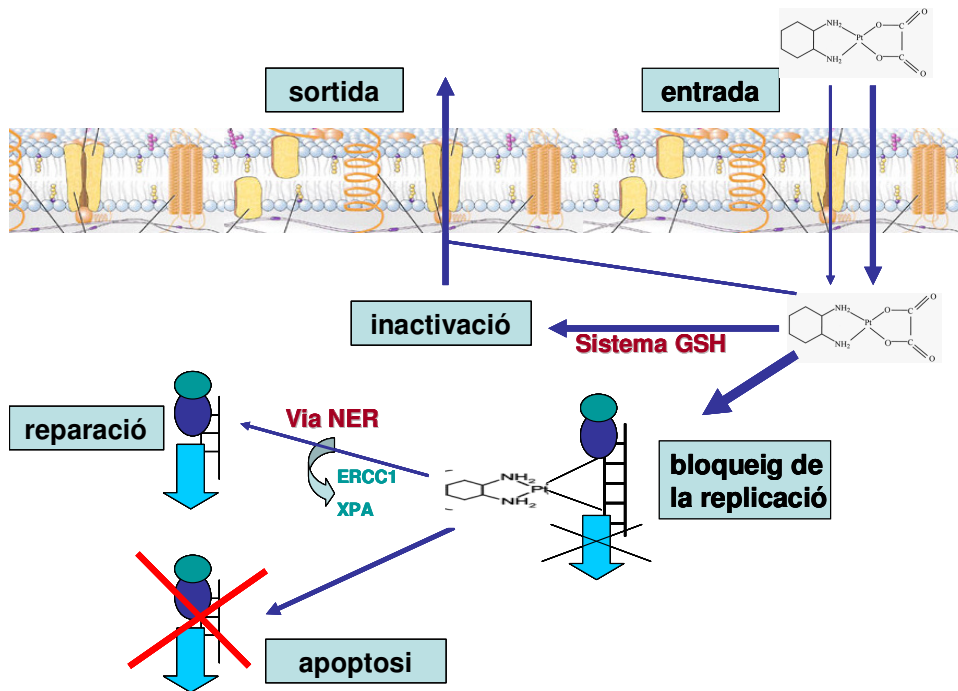


Figura 2.9: Esquema representatiu dels processos cel·lulars (enquadrats en blau) on es produeixen els fenòmens de resistència a oxaliplatí.

Els mecanismes de resistència a cisplatí han estat ben estudiats, al contrari que en el cas de l'oxaliplatí. Com s'ha descrit en l'apartat 2.1.2, el mecanisme d'acció d'ambdós fàrmacs difereix en diversos aspectes i, per aquest motiu, hi ha manca de resistència creuada entre ells, almenys parcialment.

Es coneix que la resistència a agents platinats en general, es relaciona amb una disminució en l'acumulació del fàrmac a la cèl·lula, una major capacitat de les cèl·lules a tolerar el dany en l'ADN i/o de reparar-lo i un decrement de l'activitat en les vies proapoptòtiques (64).

2.1.3.1- Acumulació del fàrmac a la cèl·lula

Aquest fenomen depèn bàsicament de l'entrada, la sortida i la detoxificació del fàrmac. Com s'ha comentat a l'apartat 2.1.2, els agents platinats poden

entrar a la cèl·lula a través de transportadors de membrana. S'ha descrit la relació entre l'acumulació de platins a la cèl·lula i la homeostasi del coure (figura 2.10).

Les proteïnes transportadores de coure hCTR1 (*Human copper transporter 1*), ATP7A (*ATPase Cu transporting alpha polypeptide*) i ATP7B (*ATPase Cu transporting beta polypeptide*) han estat relacionades amb la resistència a cisplatí principalment, però també a carboplatí i oxaliplatí *in vitro* (98, 99). Aquesta resistència podria anar lligada a una disminució de l'expressió de la proteïna hCTR1 (100) i/o un increment de l'expressió dels transportadors ATP7B (mutat en la malaltia de Wilson) i/o ATP7A (mutat en la malaltia de Menkes) (101, 102). Martinez-Balibrea et al. van observar que els pacients amb CCR tractats amb quimioteràpia basada en L-OHP que presentaven alts nivells d'expressió d'ATP7B, tenien un pitjor temps a la progressió de la malaltia (103).

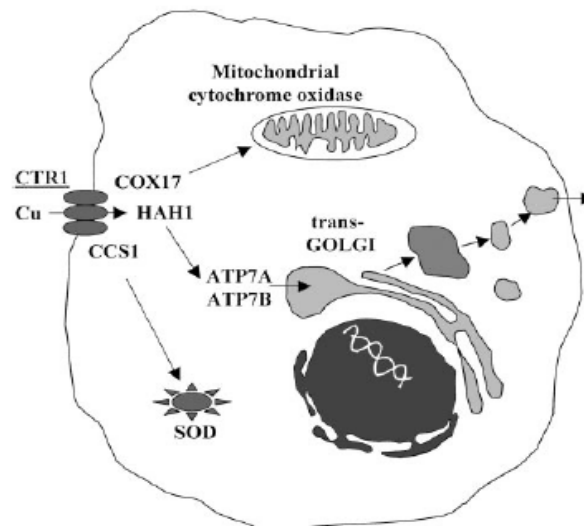


Figura 2.10: Descripció esquemàtica de la distribució del coure (Cu) a la cèl·lula. L'entrada del Cu es produeix via hCTR1 i és transferit a les xaperones HAH1, CCS1 i COX17, les quals el reparteixen a ATP7A/ATP7B, Cu-Zn superòxid dismutasa i citocrom c oxidasa respectivament. Les ATPases ATP7A/ATP7B es troben a la membrana del reticle endoplasmàtic i són les responsables de l'extrusió del Cu a través de vesícules del transgolgi.

Pel que fa a la detoxificació, la resistència a agents platinats ha estat relacionada amb altes concentracions de GSH i de γ -GT, que forma part de la via de biosíntesi del primer (80, 104). En canvi, no han estat consistents els resultats obtinguts al correlacionar l'enzim glutatió-S-transferasa π (GST π) amb la resistència a platins (64). En diversos tumors sòlids, s'ha

descriu que alts nivells de l'enzim GSTn provoquen resistència a aquests fàrmacs, ja sigui per la seva funció detoxificadora, com per la d'inhibir la via de la MAP quinasa (81, 105, 106). S'ha descrit un polimorfisme a la posició 313 de l'exó 5 d'aquest gen consistent en un canvi de base nitrogenada (A→G) que es tradueix en un canvi d'aminoàcid (Ile105→Val). La forma variant sembla ser menys efectiva en la detoxificació de carcinògens i va mostrar un benefici en la supervivència davant tractaments basats en oxaliplatí (107), encara que una pitjor toxicitat (108). Tanmateix, altres estudis no van mostrar una correlació evident entre aquest enzim i l'eficàcia del tractament amb aquest fàrmac (109, 110). Per altra banda, també s'ha descrit la relació entre la resistència a oxaliplatí i la deleció en els dos al·lels de GSTT1 i GSTM1 (108).

2.1.3.2- Bloqueig de la replicació i reparació de l'ADN

Les estructures aberrants formades pels complexos platinats, bloquegen el pas de la polimerasa i s'atura la replicació i la transcripció de l'ADN. Existeix però, un fenomen anomenat *Bypass replicatiu*, que consisteix en l'habilitat que té el complex reparador per a sobrepassar la lesió provocada a l'ADN, de manera que la replicació no s'atura i l'acció del fàrmac queda anul·lada. Les ADN polimerases clàssiques (α , θ i ϵ) no poden portar a terme aquest fenomen. Tanmateix, diverses polimerases (β , η , ζ , ι) han demostrat la capacitat de sobrepassar les unions intracatenàries produïdes per aquests fàrmacs (64). En el cas del CDDP, sembla que la principal causant d'aquest fenomen és l'ADN polimerasa β (111). Posteriorment, s'ha descrit a l'ADN polimerasa ζ com a màxima responsable del *bypass replicatiu* en les cèl·lules MMR-deficients i s'ha suggerit com a causant d'aquest procés després del tractament amb L-OHP (112, 113).

La diferent afinitat que presenten les proteïnes de reconeixement del sistema MMR amb els adductes de cisplatí i d'oxaliplatí, sembla ser el factor que provoca la manca de resistència creuada entre els dos fàrmacs, almenys parcialment. Les cèl·lules sensibles a CDDP, es veuen més afectades pel *bypass replicatiu* que les que tenen el sistema MMR no funcional de forma intrínseca, com és el cas de les cèl·lules tumorals colorrectals (64).

Pel que fa a la reparació de l'ADN, s'ha relacionat la resistència als dos fàrmacs amb proteïnes de la via NER (escissió per aparellament de nucleòtids), principalment amb ERCC1 (*Escission repair cross complementing group 1*), XPA (*Xeroderma pigmentosum complementation group A*) i XPD (*Xeroderma pigmentosum complementation group D*) i la proteïna XRCC1 (*X-ray cross-complementing group 1*) del sistema BER (escissió per aparellament de bases). Encara que s'ha observat el paper de les proteïnes del sistema MMR i de la família HMG (*High mobility group*) en la resistència a cisplatí, no sembla que aquestes estiguin gaire relacionades amb l'oxaliplatí (64).

Existeix una correlació negativa entre els nivells de ERCC1 i l'activitat del L-OHP i del CDDP en estudis realitzats *in vitro* (75). Apareix també una relació entre alts nivells de ERCC1 i sobreexpressió de la proteïna H-Ras, relacionant a aquesta última amb la resistència a platins (114). A nivell *in vivo*, s'ha descrit una diferència significativa de millor resposta i supervivència en pacients amb CCR tractats amb oxaliplatí-5FU, pel fet de tenir nivells més baixos de ERCC1 (115). A més a més, en treballs en els que s'estudiaren pacients amb càncer d'ovari, es va observar que els nivells de XPA i ERCC1 estaven augmentats en els tumors que presentaven resistència a platins (64). També s'ha vist aquesta correlació en estudis realitzats en pacients amb NSCLC (càncer de pulmó de cèl·lula no petita) tractats amb cisplatí i gemcitabina (116) i en estudis prospectius posteriors (estudi GILT).

En els últims anys, l'estudi de polimorfismes presents en els gens que formen part dels sistemes reparadors de l'ADN ha estat un punt important en el coneixement de la resistència a agents platinats (108, 117). Per exemple, existeix una variant (canvi de base C→T) a la posició 118 de l'exó 4 del gen que codifica per a ERCC1 que s'ha relacionat amb resistència a oxaliplatí i a platins (54, 118, 119). Pel que fa a XPD, també coneguda com ERCC2, s'ha descrit un polimorfisme en l'exó 23 que causa un canvi aminoacídic (Lys751→Gln) degut a un canvi de base (A→C) (120). Es va observar en pacients amb CCRm tractats amb 5FU-oxaliplatí, que la forma variant (Gln) es relacionava amb una pitjor resposta (121). Per altra banda, la proteïna XRCC1 presenta una variant polimòrfica en el codó 399

(Arg→Gln) de l'exó 10 del gen que sembla estar relacionada amb una pitjor eficàcia del tractament amb oxaliplatí (risc superior a no respondre al tractament) en pacients amb CCR (48, 87, 88) i amb altres tumors com el gàstric (122). Tanmateix, són necessaris estudis complementaris per confirmar el valor predictiu d'aquestes proteïnes.

2.1.3.3- Alteracions en els mecanismes apoptòtics

Alteracions en la via d'apoptosi influeixen en el procés d'adquisició de resistència a platins, ja que la cèl·lula no es capaç d'activar aquest procés en presència del fàrmac. S'ha associat l'activació de l'apoptosi per oxaliplatí amb alts nivells de la proteïna p53, tot i que en treballs recents s'ha mostrat que no incrementa la resistència al fàrmac en situacions d'inactivació de la proteïna, suggerint que el paper de p53 en la resistència podria ser tumor dependent (97). S'ha relacionat la resistència a platins amb una alta activitat en vies que activen la transcripció de gens de proliferació i de supervivència com la via Wnt (123) i la via PI3K-AKT (124-126), i alts nivells de factors de transcripció que activen l'expressió de gens amb acció antiapoptòtica, com el factor nuclear (NF)- κ B (91).

Bax (*Bcl-2 associated X*) és una proteïna clau en l'apoptosi desencadenada per l'oxaliplatí. S'han relacionat, *in vitro*, els baixos nivells d'aquesta amb l'adquisició de resistència al fàrmac (45, 95). En la línia tumoral humana de CCR HCT116 amb resistència adquirida a L-OHP, es va veure una mutació a la zona G8 del gen Bax, que semblava la responsable del decrement de la seva expressió (93). S'ha descrit també la relació de l'activitat de la proteïna caspasa 3 en el desencadenament del procés (baixa activitat implica una baixa acció apoptòtica).

Per altra banda, s'ha parlat de la influència de proteïnes com s-Src (receptor no-tirosina quinasa) i SRPK1 en l'adquisició de resistència a fàrmacs platinats. L'acció de la proteïna s-Src estimula la supervivència cel·lular a través de la via PI3K/AKT i per vies dependents de Ras. S'ha vist que, en cèl·lules metastàsiques de CCR amb c-Src mutat augmenta l'apoptosi en presència d'oxaliplatí, però aquesta és activada via Fas-caspasa 8, que ja s'havia descrit anteriorment com a via secundària d'acció d'aquest fàrmac (91, 96). Per tant, l'augment de l'activitat de c-Src provocaria un augment de la proliferació cel·lular i resistència al fàrmac.

La proteïna quinasa rica en serines SRPK1, ha estat relacionada amb la sensibilitat a cisplatí i oxaliplatí. La disminució en l'expressió d'aquest gen *in vitro*, es relaciona amb un augment de la resistència als fàrmacs (99, 127). En els últims anys, s'ha descrit el paper d'una proteïna glicolítica, la PKM2 (*Pyruvate kinase M2*), en el creixement tumoral i s'ha descobert que pot realitzar també una funció proapoptòtica (128-130). En treballs recents, s'ha observat, tant *in vitro* com *in vivo*, la correlació de nivells baixos de PKM2 amb la resistència a cisplatí i oxaliplatí, donant suport a les observacions de la funció proapoptòtica d'aquesta proteïna (131, 132).

2.2 ELS PERFILS D'EXPRESSIÓ GÈNICA

2.2.1- REVISIÓ I ESTAT ACTUAL

L'anàlisi de microarrays d'ADN còpia (ADNc) va ser descrit per primera vegada a mitjans dels anys 90, com a eina d'anàlisi de l'expressió de milers de gens simultàniament (133, 134) i va ser ràpidament adoptada per la comunitat científica per a l'estudi d'un ampli ventall de processos biològics. Poc temps després de la seva introducció, es va descobrir el seu potencial com a tècnica de discriminació entre diferents estadis (135) d'una malaltia i d'identificació de biomarcadors associats, i es va plantejar com una eina molt important en l'estudi del càncer (136). A partir d'aquí, es van realitzar un gran nombre d'estudis en els que es van establir perfils d'expressió amb potencial ús en la classificació de tipus de tumors, predicció de l'evolució de la malaltia (137, 138) i de la resposta a la quimioteràpia (139, 140).

Les noves tecnologies d'obtenció de perfils d'expressió gènica, han permès definir el comportament tumoral en funció del conjunt global dels diferents gens que s'expressen en les diferents situacions del desenvolupament del procés neoplàsic (141). Aquestes dades d'expressió gènica, constitueixen el que avui en dia és denominat "imatge molecular d'un procés de malaltia", ja que expressen patrons d'expressió que són únics i reconeixibles.

Els anàlisis d'expressió gènica a través de la tecnologia microarray d'ADNc, juntament amb potents eines estadístiques, han permès classificacions basades en l'expressió per molts tipus de càncer, com en els cas del de

mama (142), cervell (138), ovari (143), pulmó (144), còlon (145), ronyó (146), pròstata (147), gàstric (148), leucèmies (149) i limfomes (150). Algunes classes funcionals de gens es troben invariablement alterades quan les cèl·lules normals es transformen en malignes, inclosos aquells gens que estan relacionats amb el control del cicle cel·lular, l'adhesió, la motilitat, l'apoptosi i l'angiogènesi. Per tant, tot i la heterogeneïtat morfològica i molecular dels diferents tipus de càncer, existeixen línies comunes.

L'heterogeneïtat és present entre i dins dels tumors. Mitjançant la tecnologia molecular dels microarrays, moltes d'aquestes diferències i semblances poden resoldre's a través dels patrons dominants de la expressió gènica que representen l'origen i la funció dels diferents tipus cel·lulars.

La tecnologia microarray ha estat àmpliament usada principalment en l'estudi del càncer de mama, en el que s'han obtingut diferents perfils d'expressió (taula 2.1) i resultats molt prometedors (151). El treball més rellevant va ser portat a terme per Laura Van't veer et al. (137), que van analitzar una cohort de pacients amb càncer de mama en estadi primerenc que van ser intervingudes quirúrgicament i a les que se'ls hi havia d'administrar quimioteràpia adjuvant. Les dades obtingudes a partir del seguiment anual d'aquesta cohort van donar una clara informació de la història natural dels tumors i les pacients van ser separades en dos grups: les que van desenvolupar metàstasis en menys de 5 anys i les que no. Mitjançant l'anàlisi de microarrays es van identificar 231 gens que van ser significativament correlacionats amb la determinació d'ambdós grups. Finalment, el fet de pertànyer al grup de bon o mal pronòstic era predit, amb un 81% dels casos, per un patró de 70 gens. Aquests resultats van ser corroborats en un treball posterior del mateix grup (152). Posteriorment, es van realitzar altres treballs similars en mama i, actualment, ja s'estan realitzant estudis clínics prospectius amb la finalitat de determinar la necessitat del tractament adjuvant utilitzant aquests perfils, mitjançant *chips* comercials (151).

En el camp del càncer colorrectal, s'han realitzat també gran nombre d'estudis utilitzant aquesta tecnologia però els resultats no han estat tan espectaculars com en el cas del càncer de mama (153). Bertucci et al. (145) van realitzar un estudi mitjançant l'anàlisi de microarrays i van

determinar una sèrie de gens que discriminaven entre diferents subgrups: teixit normal vs tumoral, presència o no de metàstasis, infiltració ganglionar, inestabilitat de microsatèl·lits, localització del tumor (còlon dret o esquerre) i supervivència als 5 anys (100% en un grup vs 40% en l'altre). Aquests resultats col·locaven a aquesta tecnologia com una potencial eina de millora de la classificació, de la determinació de la prognosi i de la determinació de nous marcadors d'aquest tumor. En un estudi més recent, Del Rio et al. (139) van determinar un grup de 14 gens l'expressió dels quals discriminava entre els pacients amb CCRm que responien al tractament amb FOLFIRI i els que no, tornant a demostrar el potencial d'aquesta tècnica en la predicció de resposta i el seu paper clau en la l'aplicació de la teràpia individualitzada mitjançant una selecció del tractament. També s'ha fet ús d'aquesta tècnica per determinar gens i vies relacionades amb el mecanisme d'acció, la resposta al tractament i la resistència de fàrmacs com l'oxaliplatí, contribuint en l'ampliació del coneixement sobre aquest fàrmac (95, 113, 154).

Aquestes dades demostren que la tecnologia microarray és útil per classificar els diferents tipus de tumors i, dins d'un mateix tipus tumoral, té la capacitat de discriminar entre aquells pacients que respondran a un determinat tractament o, per contra, progressaran o desenvoluparan resistència.

Gene-expression signatures	Biological hypothesis	Microarray platform	Number of genes in the signature	Independent validation	Prospective clinical validation
Amsterdam signature	Clinical outcome	Agilent (oligonucleotides)	70	Yes	Yes (MINDACT trial)
Rotterdam signature	Clinical outcome	Affymetrix (oligonucleotides)	76	Yes	No
Recurrence score	Clinical outcome	RT-PCR	21	Yes	Yes (TAILORX trial)
Wound-response signature	Wound healing and tumour progression	cDNA (custom made)	512	Yes	No
Genomic grade	Histologic grade and tumour progression	Affymetrix (oligonucleotides)	97	Yes	No
p53 signature	Functional status of p53	Affymetrix (oligonucleotides)	32	Yes	No
Death-from-cancer signature	BMI1 oncogenic pathway self renewal	Affymetrix (oligonucleotides)	11	Yes	No
Invasiveness gene signature	Tumorigenic cancer cells CD44 ⁺ ;CD24 ^{-low}	Affymetrix (oligonucleotides)	186	Yes	No

(Sortiriou et al., Nature 2007)

Taula 2.1: Perfils d'expressió gènica relacionats amb el pronòstic del càncer de mama en estadis primerencs. El perfil d'Amsterdam i el de recurrència (*Recurrence Score*) s'estan testant en els estudis clínics prospectius MINDACT i TAILORX, respectivament.

2.2.2- METODOLOGIA I LIMITACIONS DE LA TÈCNICA

Es tracta d'una tècnica amb una gran sensibilitat, ja que permet detectar canvis d'expressió molt petits i permet l'anàlisi simultània d'un gran nombre de gens, establint un vincle entre ells. Pot ser utilitzada en gran quantitat de mostres biològiques, sempre tenint en compte l'estat d'integritat i la quantitat d'ARN que aquestes continguin. Per aquesta raó, l'ús de la citada tècnica és arriscat en mostres de mala qualitat, com és el cas del teixit tumoral inclòs en parafina. No obstant això, en alguns estudis han optimitzat la metodologia i han obtingut, en aquest tipus de mostra, resultat similars als obtinguts en teixit congelat (155).

La metodologia microarray d'ADNcòpia consta dels següents passos: hibridació i marcatge dels cristalls, escaneig i anàlisi de la imatge, i anàlisi de dades (figura 2.11).

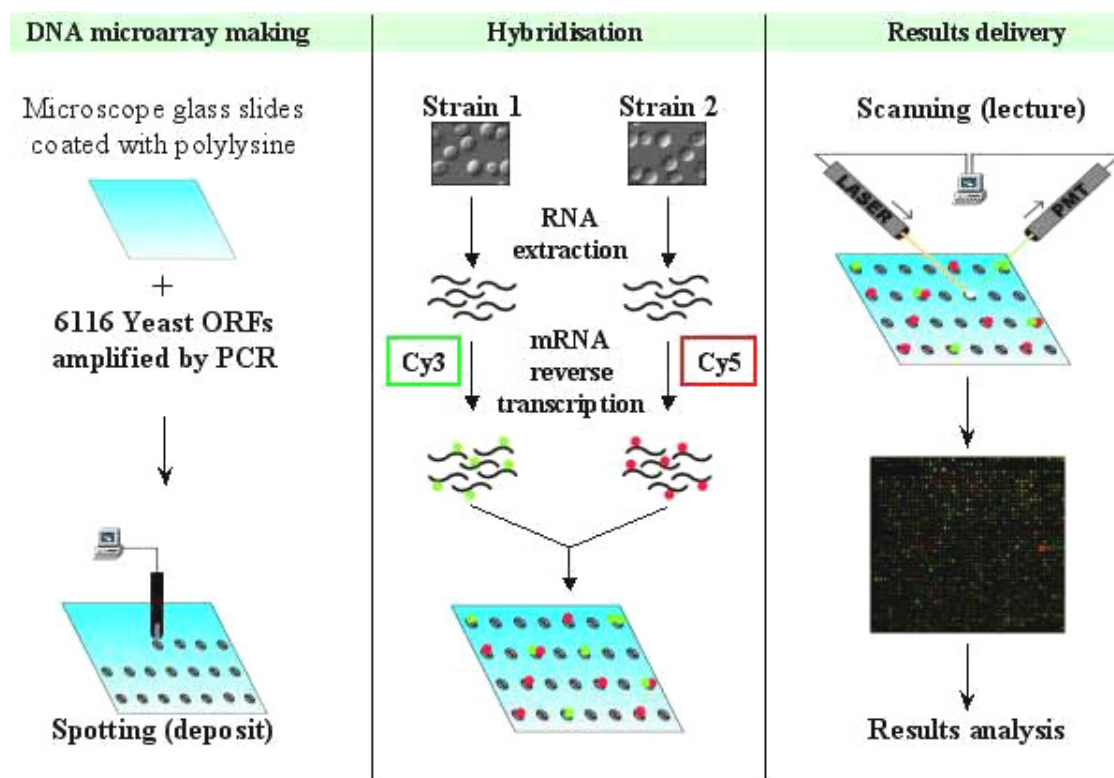


Figura 2.11: Esquema de la metodologia emprada en l'anàlisi de microarrays d'ADNc. Esquema esquerre: preparació de la plataforma d'hibridació mitjançant la introducció de les sondes. Esquema central: hibridació i marcatge de les mostres a analitzar. Esquema dret: processament de la imatge i de les dades.

Existeixen diferents mètodes de marcatge i per a realitzar la hibridació que són dependents, almenys en part, de la plataforma d'hibridació utilitzada (156). Per altra banda, també existeix una gran variació en la metodologia emprada per a analitzar les dades, tant a nivell de filtratge i de normalització, com a nivell d'obtenció del perfil d'expressió. Amb l'objectiu de facilitar les comparacions entre estudis, la societat MGED (*Microarray Gene Expression Data*) va desenvolupar uns criteris estandaritzats anomenats MIAME (*Minimal Information About a Microarray Experiment*) (157) amb l'objectiu d'homogeneïtzar la informació obtinguda a través d'aquestes anàlisis, la qual recomanen que hauria de ser publicada en una base de dades pública (GEO o ArrayExpress).

Per tal de disminuir la complexitat de les dades i aconseguir extreure similituds o diferències entre mostres d'una forma més intuïtiva, es tendeix a utilitzar l'anàlisi d'agrupacions (*Cluster Analysis*), que consisteix en classificar les mostres en un nombre petit de grups basant-se en relacions de similitud. L'objectiu principal és definir els grups de manera que es minimitzi la variació dins de cada un d'ells al mateix temps que s'intenta maximitzar la variació entre grups diferents (158). Es poden trobar dues situacions diferents a l'hora de portar a terme aquesta classificació:

1. Anàlisi supervisada: classifica la major part de les mostres basant-se en informació prèvia coneguda, que sol ser un conjunt de dades d'entrenament o calibratge i, una vegada s'aconsegueix la creació d'un bon model, s'utilitza per a predir noves mostres (159).
2. Anàlisi no supervisada: la formació dels grups es farà únicament en base a similituds entre les mostres o els gens de la matriu de dades. Els més utilitzats són (159):
 - a. Jeràrquic (*hierarchical clustering*) (160, 161)- transforma les distàncies multidimensionals entre objectes d'una matriu de dades en un conjunt de particions jerarquitzades, que es poden representar gràficament mitjançant un dendograma en forma d'arbre (figura 2.12).
 - b. No jeràrquic- es necessita un coneixement previ del nombre de grups presents a les dades, encara que, a diferència de l'anàlisi supervisada, no existeix l'assignació d'una mostra concreta a un grup en particular.

El tipus d'anàlisi aplicada s'escull segons el disseny experimental plantejat i les necessitats de l'estudi (136), i es poden aplicar diversos mètodes en una mateixa anàlisi.

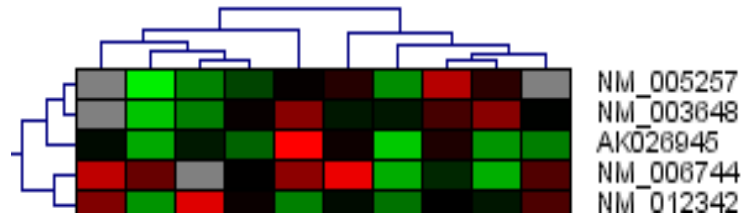


Figura 2.12: Exemple de la representació gràfica per dendograma d'una anàlisi de microarrays d'agrupació no supervisada jeràrquic o *hierarchical clustering* (HCL).

Les limitacions de la tecnologia microarray són principalment la seva inespecificitat i la falta de potencial de reproducció experimental (151, 162). La inespecificitat és pal·liada amb un bon filtratge de les dades, introduint controls endògens (gens constitutius) i externs (mostra de referència), i correccions del marcatge (*Dye Swap*) en el procés d'hibridació. S'ha de realitzar una validació dels resultats obtinguts mitjançant una sèrie nova de pacients i/o una altra tècnica altament específica, com és el cas de la PCR quantitativa a temps real, per tal d'eliminar els falsos positius. En referència a la falta de reproducció experimental, es va realitzar un estudi anomenat MAQC (*MicroArray Quality Control*), en el qual es valorava la robustesa de la tècnica microarray (163). Van intervenir-hi 137 participants de 57 centres diferents i es van utilitzar diferents plataformes d'hibridació per a realitzar els experiments. Els resultats van ser favorables, ja que van demostrar que si s'aplicava un bon disseny experimental i es seguien uns criteris estrictes i uniformitzats d'anàlisi, la variació era ínfima (5-15% entre plataformes i 10-20% entre laboratoris).

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

Amb tot això, en aquest treball es pretén realitzar una anàlisi de l'expressió gènica a través de tècniques de detecció a gran escala, com és la tecnologia

microarray, i tècniques més específiques usades habitualment per a validar els resultats, com és la tècnica de PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR). La tecnologia microarray serà aplicada a l'estudi de models *in vitro* de CCR amb la finalitat de determinar gens relacionats, per una banda, amb l'adquisició de resistència a oxaliplatí i, per una altra, amb la capacitat de resposta al tractament amb el fàrmac. La validació dels resultats per qRT-PCR es realitzarà en els mateixos models cel·lulars i en teixit tumoral inclòs en parafina de pacients amb CCR que han estat o seran tractats amb el fàrmac en primera línia. L'objectiu d'aquest estudi és ampliar el coneixement existent sobre el mecanisme d'acció i l'adquisició de resistència a oxaliplatí en el càncer colorrectal, a partir de la determinació de gens implicats en aquests processos.



Hipòtesi i Objectius

3. HIPÒTESI I OBJECTIUS

En el present estudi experimental s'ha seleccionat el model de tumor colorrectal per a estudiar gens relacionats amb l'adquisició de resistència i la resposta al tractament amb oxaliplatí. Aquest model ha estat escollit per tal d'avaluar els mecanismes moleculars implicats en l'activitat d'aquest fàrmac i en el desencadenament d'aquests processos.

Aquest treball es fonamenta en els següents punts:

1. La introducció de l'oxaliplatí al tractament del CCR ha suposat un gran avenç. Aquest platí de tercera generació mostra una gran eficàcia en aquest tipus de tumor, intrínsecament resistent a altres agents platinats (cisplatí i carboplatí).
2. La pràctica clínica així com diversos estudis *in vitro*, demostren que l'administració continuada d'oxaliplatí condueix a l'aparició d'una població refractària al fàrmac, fet que provoca la pèrdua d'eficàcia del tractament.
3. L'aparició de resistència a oxaliplatí representa un dels principals obstacles en l'èxit del tractament del CCR.
4. La resistència a oxaliplatí és un procés multifactorial en el que hi intervenen gens que pertanyen a diferents vies relacionades amb el mecanisme d'acció del fàrmac.
5. L'oxaliplatí actua provocant un dany a la molècula d'ADN, fet que desencadena la inhibició de la replicació i la transcripció, generant senyals que activen els processos d'apoptosi.
6. L'oxaliplatí difereix del cisplatí i del carboplatí bàsicament en l'etapa de reconeixement del dany a l'ADN: al contrari que els seus anàlegs, l'acció de l'oxaliplatí provoca l'activació de mecanismes cel.lulars no dependents del sistema d'aparellament de bases errònies o MMR. Per aquesta raó no presenta resistència creuada, almenys parcialment, als seus anàlegs i és efectiu en tumors amb deficiències en aquest sistema de reparació, com és el cas del CCR.
7. La tecnologia microarray permet l'anàlisi de gran quantitat de gens i té una gran potencialitat com a eina de determinació de nous marcadors per a detectar i intentar evitar l'aparició d'aquests fenòmens.

A partir d'aquestes premisses, es va dissenyar un estudi, l'objectiu primordial del qual era ampliar el coneixement existent sobre el mecanisme d'acció i els processos de resistència/sensibilitat a oxaliplatí, mitjançant l'estudi de l'expressió gènica en models cel·lulars *in vitro* de càncer colorrectal, a partir de les tècniques d'anàlisi de microarrays i PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR) i, la translació dels resultats en teixit tumoral, permetent millorar la selecció dels pacients amb CCR disseminat als quals no se'ls ha d'administrar oxaliplatí com a primera línia de tractament.

Partint d'aquestes premisses, es van establir les següents **hipòtesis de treball**:

1. L'exposició continuada a oxaliplatí condueix a la selecció de clons resistents a aquest agent a causa de canvis genotípics respecte el tumor sensible d'origen.
2. Es pot dissenyar un model *in vitro* d'adquisició de resistència a oxaliplatí per a demostrar l'existència de gens l'expressió dels quals està relacionada amb aquest fenomen.
3. Tenint en compte el seu mecanisme d'acció, l'oxaliplatí no presenta resistència creuada amb SN38 i, almenys parcialment, amb el cisplatí.
4. A partir d'un conjunt de línies cel·lulars de CCR es pot constituir un model *in vitro* de sensibilitat a oxaliplatí que permet demostrar la relació entre l'expressió d'una sèrie de gens i la capacitat de resposta al tractament amb el fàrmac segons la sensibilitat a aquest.
5. Utilitzant tècniques d'anàlisi de l'expressió a gran escala, com la tecnologia microarray, es podrà detectar l'expressió diferencial dels gens en els models estudiats. Aquests resultats podran ser reproduïts i validats mitjançant tècniques altament específiques com la qRT-PCR.
6. Els gens detectats com a implicats en la resistència adquirida a oxaliplatí poden coincidir o tenir el mateix origen ontològic que els implicats en la capacitat de resposta al tractament. Aquest fet demostraria que els fenòmens d'adquisició de resistència són deguts a l'alteració de gens que intervenen en la resposta al fàrmac i un origen comú amb la resistència intrínseca a aquest.

7. A partir de la tècnica de qRT-PCR, els gens relacionats amb l'adquisició de resistència podran ser detectats i validats en teixit tumoral parafinat verge de tractament d'una sèrie de pacients amb CCRm que han rebut quimioteràpia basada en l'oxaliplatí.
8. La validació d'aquests gens en el model *in vivo* permetrà demostrar l'origen comú dels processos de resistència intrínseca al tractament i adquirida al llarg d'aquest, recolzant la idea de l'adquisició de resistència a partir d'una selecció clonal de cèl·lules tumorals amb alteracions presents des de l'inici del tractament i destacant el potencial paper d'aquests com a marcadors de resistència a oxaliplatí en la selecció de tractament.

Tenint en compte les citades hipòtesis de treball, el present projecte es divideix en els següents apartats:

OBJECTIU 1- *Anàlisi i determinació de gens responsables de l'adquisició de resistència a oxaliplatí:*

- 1.1- Aconseguir un model *in vitro* de resistència adquirida a oxaliplatí, a partir de quatre línies cel·lulars de CCR inicialment sensibles al fàrmac i 4 sublínies derivades resistents obtingudes a partir de les línies parentals.
- 1.2- Obtenir un perfil d'expressió gènica, comú per totes les línies tumorals estudiades (a partir de l'anàlisi de 19200 gens), que discrimini entre el grup de línies sensibles i el grup de línies resistents a oxaliplatí.
- 1.3- Validar els gens que formen el perfil d'expressió de resistència adquirida a oxaliplatí, després d'un procés de selecció, mitjançant l'anàlisi de l'expressió per qRT-PCR en aquestes línies cel·lulars.

OBJECTIU 2- *Anàlisi i determinació de gens relacionats amb la sensibilitat i la capacitat de resposta a oxaliplatí:*

- 2.1- Determinar la concentració inhibidora 50 (IC50) a oxaliplatí de cadascuna de les 14 línies tumorals de CCR i establir dos grups experimentals segons la sensibilitat (alta o baixa) que presenten al fàrmac. Determinar la capacitat de resposta a oxaliplatí de les 14 línies mitjançant el tractament d'aquestes a la seva IC50 respectiva.
- 2.2- Obtenir un perfil d'expressió gènica relacionat amb la capacitat de resposta al tractament segons la sensibilitat a oxaliplatí, que discrimini entre el grup d'alta i de baixa sensibilitat al fàrmac.
- 2.3- Validar els gens que formen el perfil d'expressió relacionat amb la capacitat de resposta segons sensibilitat a oxaliplatí, després d'un procés de selecció, mitjançant l'anàlisi de l'expressió per qRT-PCR en les línies cel.lulars estudiades.

OBJECTIU 3- *Validació in vivo de l'expressió dels gens relacionats in vitro amb la resistència adquirida a oxaliplatí (obtinguts en l'objectiu 1) per a determinar el seu potencial com a marcadors de resistència a oxaliplatí:*

- 3.1- Recollida de dades clíniques i de peces tumorals obtingudes al diagnòstic (incloses en parafina) d'entre 40 i 50 pacients amb CCRm tractats amb fluoropirimidina-oxaliplatí.
- 3.2- Analitzar per qRT-PCR l'expressió dels gens seleccionats en l'objectiu 1 en el teixit tumoral parafinat dels pacients.
- 3.3- Correlació entre els resultats d'expressió obtinguts i les dades clíniques (resposta al tractament i temps a la progressió) recollides al llarg del seguiment dels pacients seleccionats, per a determinar el potencial d'aquests gens com a marcadors de resistència a oxaliplatí.



Material i Mètodes

4. MATERIAL I MÈTODES

4.1 ESTUDI *IN VITRO*

En aquesta part del projecte es van utilitzar diferents línies tumorals de càncer colorrectal obtingudes de la *American Type Culture Collection* o ATCC (Manassas, VA, USA) i d'altres cedides per l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica de Barcelona (IMIM). Amb aquestes línies es van dissenyar dos models cel·lulars que van ser utilitzats per a realitzar l'anàlisi d'expressió de gens mitjançant la tecnologia microarray i la PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR).

4.1.1- MODELS CEL·LULARS

Es van utilitzar dos models *in vitro* diferents: un de resistència adquirida a oxaliplatí i l'altre de capacitat de resposta i sensibilitat al fàrmac. Totes les línies cel·lulars van ser testades regularment per a la presència de contaminació per micoplasma, utilitzant el següent protocol:

- Es recull 1mL de medi de cultiu de cada una de les cèl·lules a testar: el flascó de cultiu ha d'estar força confluent i el medi no ha d'haver estat canviat, com a mínim, en 3 dies.

- *Primers* usats per a la detecció:

MICO-1: 5' – GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG – 3'

MICO-2: 5' – CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G – 3'

- Preparació de la barreja de *primers* o Mico-Mix:

10µL *primer* MICO-1 + 10µL *primer* MICO-2 + 80µL H₂O

- Preparació de la mix:

Tampó de reacció	1X
MgCl ₂	1,5mM
dNTPs	0,2mM
Mico-Mix	10X
Taq polimerasa	0,5u

- S'afegeixen a la mix de PCR 2 μ L de mostra i el volum d'H₂O necessaris fins assolir els 20 μ L de reacció.
- Les condicions de PCR són:

Desnaturalització inicial motlle	96°C x 2'	} x 35 cicles
Desnaturalització motlle	96°C x 30''	
Unió dels primers	58°C x 1'	
Extensió de la cadena	72°C x 1'	
Manteniment	4°C	

El producte de PCR es visualitza en un gel d'agarosa estàndard al 2% en tampó TBE (Tris-Borat-EDTA) 1X tenyit amb bromur d'etidi. L'amplificació d'una banda de 464pb representa la infecció de micoplasma a la mostra i, en condicions normals, només ha d'aparèixer en el control positiu.

4.1.1.1- Resistència adquirida a oxaliplatí

4.1.1.1.1- LÍNIES TUMORALS DE CCR PARENTALS

Les 4 línies cel.lulars humanes de càncer colorrectal utilitzades són línies epitelials adherents, que creixen en monocapa a 37°C i 5% de CO₂ en atmosfera humida. Totes elles produeixen CEA en cultiu i procedeixen d'individus diferents. Van ser sotmeses periòdicament al test del micoplasma, amb resultat negatiu de presència del microorganisme. S'han caracteritzat les línies segons el fenotip de la proteïna p53 i el fenotip RER (inestabilitat de microsatèl.lits). Les sublínies resistents a oxaliplatí no han estat caracteritzades.

LoVo: línia cel.lular humana procedent d'un adenocarcinoma avançat de còlon. Les cèl.lules tumorals van ser aïllades d'un nòdul metastàtic, localitzat a la regió subclavicular esquerra. Creixen en medi de cultiu HAM'S F-12 (Invitrogen), suplementat amb un 20% de sèrum boví fetal (Reactiva), 200u/mL de penicil.lina i 20 μ g/mL de gentamicina. El seu temps de doblatge en aquestes condicions de creixement és de 26 hores, el mateix

que el de la seva sublínia resistent LoVOXAR3. LoVo presenta fenotip RER positiu (deleció de l'exó 5 al 8 en els dos al·lels del gen hMSH2) i té la proteïna p53 normal.

DLD1: va ser aïllada d'un adenocarcinoma primari humà de còlon d'estadi C. Creix en medi de cultiu RPMI 1640 (Reactiva, Invitrogen), suplementat amb 2mM de L-glutamina, 10mM d'Hepes, 10% de sèrum boví fetal (Reactiva), 400u/mL de penicil.lina i 40µg/mL de gemtamicina. El seu temps de doblatge en aquestes condicions de creixement és de 21 hores i el de la seva sublínia resistent DLDOXAR3 és de 23 hores. DLD1 presenta una mutació en la posició 241 de la proteïna p53 (canvi de base C→T que provoca el canvi d'aminoàcid Ser→Phe) i el fenotip RER positiu (deleció en el gen hMSH6).

LS513: procedeix d'un carcinoma primari humà de cec d'estadi C. És cultivada en medi RPMI 1640 (Reactiva, Invitrogen), suplementat amb 2mM de L-glutamina, 10mM d'Hepes, 10% de sèrum boví fetal (Reactiva), 400u/mL de penicil.lina i 40µg/mL de gemtamicina. El seu temps de doblatge en aquestes condicions de creixement és de 30 hores i el de la seva sublínia resistent LSOXAR3 és de 29 hores. Presenta la proteïna p53 inalterada i el fenotip RER negatiu.

HT29: aïllada d'un tumor primari humà de còlon (adenocarcinoma de grau II). És cultivada en medi DMEM (Invitrogen), suplementat amb 2mM de L-glutamina, 10mM d'Hepes, 10% de sèrum boví fetal (Reactiva), 400u/mL de penicil.lina i 40µg/mL de gemtamicina. El seu temps de doblatge en aquestes condicions de creixement és de 24 hores, el mateix que el de la seva sublínia resistent HTOXAR3. Té el fenotip RER negatiu i presenta un canvi d'aminoàcid Arg→His en el codó 273 de la proteïna p53, degut al canvi de base G→A en la seqüència del gen. La proteïna p21 no és funcional en aquesta línia.

4.1.1.1.2- GENERACIÓ DE LES SUBLÍNIES RESISTENTS

Les línies tumorals derivades de càncer colorrectal HT29, LoVo, DLD1 i LS513 (ATCC, Manassas, VA, USA) van ser usades com a línies parentals sensibles a oxaliplatí per a obtenir les sublínies derivades resistents HTOXAR3, LoVOXAR3, DLDOXAR3 i LSOXAR3. La resistència va ser establerta mitjançant l'exposició durant 24h a concentracions creixents

d'oxaliplatí setmanalment durant 10 mesos, partint de la concentració inhibidora 50 (IC50) de cada línia parental, que va ser determinada a través del test colorimètric MTT (apartat 4.1.2).

Les sublínies resistents creixien també en monocapa, en les mateixes condicions que les seves línies parentals respectives. El creixement cel.lular era valorat cada 7 dies, amb canvis de medi realitzats cada 2 dies, mitjançant la tècnica de comptatge del blau tripà amb la que es comparava la viabilitat de la cèl.lula parental respecte la seva línia derivada resistent, seguint el següent protocol:

DIA 1 - Sembrar entre 50000 i 100000 cèl.lules (segons el temps de doblatge de la línia cel.lular) en flascons de cultiu cel.lular T-25cm²: 2 flascons per línia parental i 2 per sublínia resistent. Per a evitar la confluència cel.lular (aproximadament 8 milions de cèl.lules en un flascó T-25 cm²) als 7 dies, es calcula el nombre de cèl.lules a sembrar mitjançant la fórmula:

$$C_f = C_0 * e^{\lambda \cdot t}$$

- on
- C_f= concentració final de cèl.lules al flascó
 - C₀= concentració inicial de cèl.lules a sembrar
 - λ= ln(2)/(temps de doblatge (h)/24h)
 - t= temps transcorregut entre les sembres (dies)

DIA 2 (Exposició a oxaliplatí 24 hores) - Afegir el fàrmac en el medi de cultiu dels 2 flascons destinats a la sublínia resistent a la IC50 corresponent per a cada línia cel.lular (mostrades a la taula 5.1 de la secció *Resultats*). L'oxaliplatí (Sanofi-Aventis) és preparat en aigua a una solució stock de 10mM i a partir d'aquesta es fan les dilucions pertinents en medi de cultiu.

DIA 3 - Retirar el medi de cultiu que conté el fàrmac i afegir-ne de nou. Aquest canvi també es realitza en els flascons que no han estat tractats (control) per a no introduir variabilitat experimental en les condicions de creixement.

DIA 5 - Renovació del medi de cultiu a tots els flascons.

DIA 7 (Determinació de la viabilitat cel.lular) – El recompte de les cèl.lules, tant control com tractades, es realitza mitjançant els processos de TRIPSINITZACIÓ I COMPTATGE CEL.LULAR, segons el protocol:

- Retirar el medi de cultiu i rentar amb sèrum fisiològic o PBS.
- Afegir a cada flascó 1mL de Tripsina-EDTA 1x i incubar a 37°C i 5%CO₂. Passats 5-6 minuts, les cèl.lules ja s'han desenganxat i suren en el sobrenedant.
- Afegir 10mL de medi de cultiu, per a inactivar la tripsina, i recollir el sobrenedant (trispina+medi+cèl.lules) en un tub. Finalment, per a cada línia cel.lular s'obtenen 2 tubs amb cèl.lules control i 2 tubs amb cèl.lules tractades.
- Centrifugar els tubs 5' a 1200 rpm. Les cèl.lules formen un pellet al fons del tub i el sobrenedant és descartat.
- Resuspendre el pellet de cèl.lules en 1-2mL de medi de cultiu, depenent de la mida del pellet.
- COMPTATGE CEL.LULAR: barrejar 10µL de mostra i 10µL de Blau Tripà. Afegir la barreja en una cambra de Newbauer i comptar les cèl.lules seguint els següents criteris:

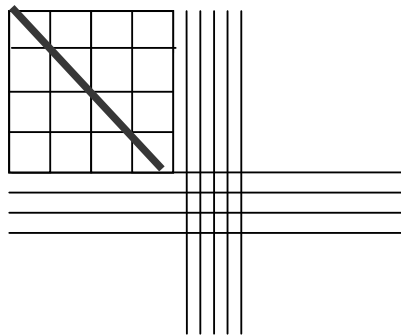


Figura 4.1: Esquema d'una cambra de Newbauer. La cambra consta de dues meitats, cadascuna formada per 4 quadrats, cadascun dels quals conté 16 quadrats petits.

Comptar les cèl.lules que hi ha dins els 4 quadrats petits centrals (senyalats amb una línia negra en la figura 4.1) dels 8 quadrats grans. D'acord amb això, el número de cèl.lules que contenia el flascó es calcula:

$$[(N/8)*4] * 10000 * 2 * \text{XmL usats per dissoldre el pellet}$$

}
}
}

Factor de dilució al mesclar amb el blau tripà
 Factor de correcció de la cambra de Newbauer

Mitja del número de cèl.lules recomptades als 8 quadrats de la cambra a partir dels 4 quadrats centrals i extrapolat als 16 totals.

Per a calcular la el percentatge de viabilitat cel.lular s'aplica la següent fórmula:

$$\% \text{ viabilitat} = (\text{n}^{\circ} \text{ cèl.lules tractades} / \text{n}^{\circ} \text{ cèl.lules control}) * 100$$

- Sembrar novament 50000-100000 cèl.lules en els flascons: 2 flascons per a les cèl.lules no tractades (flascons control) i 2 flascons per a les cèl.lules tractades que han sobreviscut al primer tractament (flascons d'inducció de resistència).

Aquest procediment es va repetint al llarg del temps fins que la viabilitat cel.lular en els flascons d'inducció de resistència és d'un 65-70% respecte els control. Llavors, es realitzarà un test de citotoxicitat i es determinarà la nova IC50 de les cèl.lules dels esmentats flascons (veure apartat 4.1.2), per a ser usada com a nova dosi inductora de resistència al fàrmac. Per a determinar el grau de resistència, es compararan les concentracions inhibidores (IC's) obtingudes per a les cèl.lules resistents amb les IC's de les seves respectives control.

Aquest protocol es va portar a terme, augmentant la dosi d'oxaliplatí segons els criteris descrits, fins que les línies assoliren el grau de resistència desitjat (per sobre de 3 vegades), en un màxim de temps de 10 mesos i de forma estable (manteniment del grau de resistència al llarg de mínim 2 mesos de cultiu sense exposició al fàrmac).

4.1.1.1.3- RESISTÈNCIA CREUADA AMB ALTRES FÀRMACS

Per tal de comprovar que el model cel·lular utilitzat era específic de resistència a oxaliplatí, es va determinar si aquestes cèl·lules mostraven també resistència a cisplatí (fàrmac de la mateixa família) i SN38 (metabolit actiu del CPT11, fàrmac que pertany a una família diferent però que és també usat en el tractament del CCR). El mètode d'anàlisi utilitzat va ser el test colorimètric MTT, seguint el protocol descrit en l'apartat 4.1.2. El cisplatí i el SN38 van ser preparats en sèrum fisiològic i DMSO (dimetil sulfòxid) respectivament, a una solució stock de 10mM, a partir de la qual es van portar a terme les pertinents dilucions en medi de cultiu. Els tractaments es van realitzar en exposicions al fàrmac de 24h, comparant, finalment, la IC50 obtinguda per a les cèl·lules resistents i les respectives parentals.

4.1.1.2- Sensibilitat i capacitat de resposta a oxaliplatí

Es van utilitzar 14 línies tumorals de CCR que van ser cultivades a 37°C en una atmosfera humida amb un 5% de CO₂, amb el medi de cultiu adequat (veure taula 4.1), suplementat amb 2mM de L-glutamina, 10mM d'Hepes, 10% de sèrum boví fetal (Reactiva), 400u/mL de penicil·lina i 40µg/mL de gentamicina. Totes elles creixen en monocapa i el seu temps de doblatge es mostra a la taula 4.1.

Després de determinar la IC50 a oxaliplatí per a cada una de les línies mitjançant un test de citotoxicitat (veure apartat 4.1.2), aquestes van ser classificades en 2 grups, segons si la seva IC50 al fàrmac era inferior a 1µM (grup d'ALTA sensibilitat a L-OHP) o superior (grup de BAIXA sensibilitat a L-OHP).

4.1.1.2.1- TRACTAMENT AMB OXALIPLATÍ DE LES LÍNIES TUMORALS

Cada una de les línies va ser sembrada en flascons T-75cm² (2 flascons control i 2 tractament). Al dia següent, els flascons tractament de cada línia van ser tractats a la seva IC50 a oxaliplatí durant 24 hores (veure apartat 4.1.1.1.2). Passat aquest temps, el fàrmac va ser retirat i es va afegir medi de cultiu nou, fins al moment de tripsinització i recollida del pellet cel·lular, 48 h més tard. Finalment, s'obtingué un pellet de cèl·lules control i un de cèl·lules tractades per a cada línia tumoral estudiada.

Línia cel.lular	Medi cultiu	T1/2 (h)	Nº ATCC	AP
CaCo2	DMEM	24	HTB-37	adenocarcinoma
DLD1	RPMI-1640	21	CCL-221	adenocarcinoma
HCT116	RPMI-1640	23	CCL-247	carcinoma còlon
HCT15	RPMI-1640	21	CCL-225	adenocarcinoma
HT29	DMEM	24	HTB-38	adenocarcinoma
LoVo	HAM'S F12	26	CCL-229	adenocarcinoma
LS174T	DMEM	27	CL-188	adenocarcinoma
LS513	RPMI-1640	30	CRL-2134	carcinoma cec
LS411N	RPMI 1640	31	CRL-2159	carcinoma cec
SW1116	DMEM	39	CCL-233	adenocarcinoma
SW1417	RPMI 1640	25	CCL-238	adenocarcinoma
SW48	RPMI 1640	33	CCL-231	adenocarcinoma
SW480	DMEM	26	CCL-228	adenocarcinoma
SW948	DMEM	38	CCL-237	adenocarcinoma

Taula 4.1: Llistat de línies tumorals de CCR que van formar part del model *in vitro* de capacitat de resposta i sensibilitat a oxaliplatí. El número de cèl.lules sembrades en els flascons depenia del seu temps de doblatge, tenint en compte que la concentració cel.lular en el flascó, transcorreguts els dies de creixement, no havia d'arribar a la confluència (entre 8 i 10 milions de cèl.lules). AP= anatomia patològica del tumor del que provenen les cèl.lules.

Per a determinar aquestes condicions com a les més idònies per a portar a terme l'experiment, es va realitzar una anàlisi en la que es compararen els perfils d'expressió de 4 condicions experimentals: 1) IC50 i IC80 tractant amb oxaliplatí 24h i recollint el cultiu immediatament; 2) IC50 i IC80 tractant amb oxaliplatí 24h i recollint el cultiu a les 48h. A la figura 4.2 es representen els canvis d'expressió entre les cèl.lules tractades i control, detectats per a cada condició experimental. D'acord amb els resultats obtinguts, es va escollir la condició de tractament a la IC50 del fàrmac durant 24h i recollida a les 48h pels següents motius: 1) la IC80 plantejava un problema d'obtenció de cèl.lules de partida que no apareixia a l'usar la IC50; 2) la condició IC50 i recollida a les 48h va mostrar un menor nombre de gens desregulats però que mostraven un major equilibri entre els gens amb increment i decrement d'expressió.

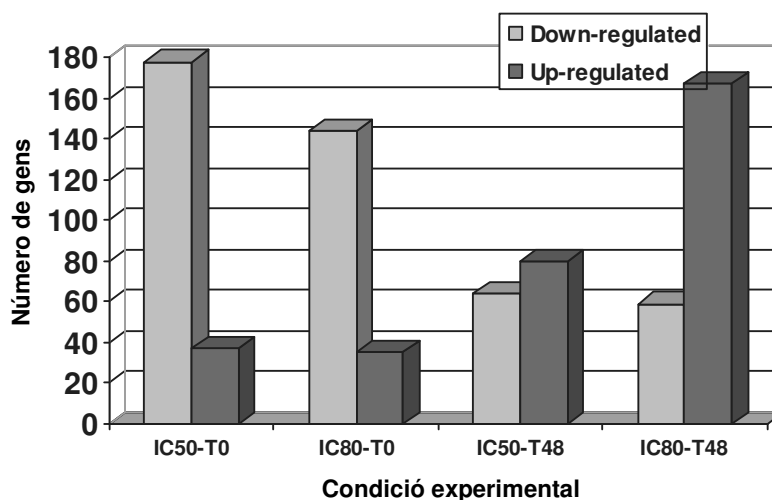


Figura 4.2: Gràfic representatiu del número de gens que incrementen (gris fosc) o decreixen (gris clar) la seva expressió entre les línies tractades amb oxaliplatí 24h i les control en les diferents condicions experimentals plantejades: IC50-T0 (tractament a la IC50 24h i recollida immediata); IC80-T0 (tractament a la IC80 24h i recollida immediata); IC50-T48 (tractament a la IC50 24h i recollida a les 48h); IC80-T48 (tractament a la IC80 24h i recollida a les 48h). La condició IC50-T48 és la que va presentar uns resultats més òptims per a portar a terme l'experiment.

4.1.2- DETERMINACIÓ DE LA CITOTOXICITAT

El test de citotoxicitat utilitzat va ser el basat en el mètode colorimètric de detecció de viabilitat cel·lular MTT (Roche), que medeix la capacitat de les cèl·lules viables per a metabolitzar la sal de tetrazoli (3-(4,5-dimetiltiazol-2-)-2,5-difenil tetrazolium bromide o MTT) de color groc, donant lloc a la sal de formazan de color violeta. Aquesta sal es solubilitza en una solució que conté 0.1% SDS en 0.01M HCl. El color de la solució resultant és quantificable mitjançant l'ús d'un lector ELISA convencional automatitzat. El pic màxim d'absorbància de la sal de formazan correspon a una longitud d'ona d'entre 550 i 600 nm i, per tant, la lectura va ser realitzada a 570nm. La densitat òptica (OD) obtinguda, és proporcional al número de cèl·lules viables.

Els experiments de citotoxicitat van ser realitzats al llarg de 5 dies. Les cèl·lules tumorals van ser sembrades a una densitat equivalent al seu temps de doblatge (veure apartat 4.1.1.1.2), assumint com a concentració final al voltant de 60000 cèl·lules per pou (s'ha d'evitar la saturació colorimètrica del pou per a fer una bona valoració), en plaques de 96 pous (multidishes

Nunclon™ Δ Surface, NUNC). Al dia següent, eren tractades amb diferents dilucions del fàrmac durant 24h. Transcorregut el temps, el tractament era retirat i substituït per medi de cultiu. A les 72h el MTT va ser afegit, seguint el protocol del fabricant (en cada pou: 10μL MTT + 10μL FBS + 80μL medi RPMI no complementat), i passades 4h d'incubació, les cèl.lules van ser resuspeses en 100μL/pou de la solució solubilitzadora, incubant-se tota la nit a 37°C i 5% CO₂ en atmosfera humida, fins a la lectura a 570nm al dia següent.

En cada experiment, es va calcular la **fracció de supervivència (f)** com el quocient entre la OD de les cèl.lules tractades a les diferents dosis i la OD de les cèl.lules control sense tractar.

Les dades obtingudes s'analitzaren mitjançant el **mètode de l'efecte mig (median-effect lines)**. Aquest mètode consisteix en la representació gràfica del $\log_{10} ((1/f)-1)$ enfront al $\log_{10} (\text{dosi droga})$. Es calcula la recta de regressió pel **mètode dels mínims quadrats** (en tots els casos es van acceptar rectes que presentaven un coeficient de regressió R² superior a 0,95). A partir de les rectes resultants, denominades *median effect lines*, es calcula el pendent (*m*) i la dosi IC50 (dosi que inhibeix el 50% del creixement cel.lular). Amb aquests paràmetres, s'avaluen les concentracions del fàrmac necessàries per a inhibir una fracció cel.lular determinada (en rang del 10% al 90%), segons l'equació :

$$\text{Dosi}_f = \text{Dosi}_{IC50} (1/f-1)^{1/m}$$

Mitjançant aquesta fórmula, es va calcular el valor de la concentració inhibidora (IC) per a diferents proporcions de viabilitat cel.lular (de 10 a 90%) i, en el cas de determinar el grau de resistència, es va establir una comparació entre la línia resistent i la sensible, mitjançant el quocient IC resistent/IC sensible.

4.1.3- OBTENCIÓ DELS PELLETS CEL.LULARS

Els extractes cel.lulars dels 2 models estudiats van ser recollits en forma de pellet per ser posteriorment analitzats. En el model de resistència adquirida a L-OHP, les sublínees resistents van ser recollides en condicions basals (absència del fàrmac).

Les cèl.lules van ser tripsinitzades i es va portar a terme el comptatge, seguint el protocol descrit en l'apartat 4.1.1.1.2. Seguidament, els pellets van ser recollits afegint 4-5 milions de cèl.lules en un tub eppendorf i centrifugant 5' a 1200 rpm. Es retirà el sobrenedant (el pellet es trobava en el fons del tub), es va resuspendre el pellet amb 100µL de PBS 1X i se centrifugà a 1200 rpm 5'. Finalment, es retirà el PBS de rentat i el pellet va ser guardat en sec a -20°C fins al seu posterior ús.

4.1.4- EXTRACCIÓ, QUANTIFICACIÓ I PRECIPITACIÓ DE L'ARN

L'ARN es va obtenir a partir dels pellets cel.lulars mitjançant un kit comercial (Qiaamp RNAeasy Mini kit, Qiagen) basat en la retenció dels àcids nucleics en matrius de sílice. Al final s'obtingué una solució aquosa que va ser guardada a -80°C fins al seu ús.

Es va utilitzar el protocol descrit en el kit d'extracció, que és el mostrat a continuació:

1. Preparar solució de lisi: (600µL buffer RLT + 6µL de β-Mercaptoetanol) x mostra
2. Afegir al tub eppendorf de 1,5mL, un volum d'etanol al 70% preparat amb H₂O lliure de RNAses o DEPC.
3. Afegir 700µL a la columna d'extracció i centrifugar 15-30" a 14000 rpm. Repetir el procés amb els µL restants al tub. Decantar el contingut del tub col.lector.
4. Afegir 350µL de buffer RW1 i centrifugar 15-30" a 14000 rpm.
5. Incubar en la dilució de DNAsa 15' a T^o ambient:
10µL DNAsa + 70µL buffer RDD per mostra
6. Afegir 350µL de buffer RW1 i centrifugar 15-30" a 14000 rpm. Decantar el contingut en el tub col.lector.
7. Afegir 500µL buffer RPE i centrifugar 15-30" a 14000 rpm. Decantar el contingut del tub col.lector.
8. Afegir altre cop 500µL buffer RPE i centrifugar 2' a 14000 rpm. Decantar el contingut del tub col.lector.
9. Centrifugar 1' a 14000 rpm per assecar-ho del tot.
10. Passar la columna a un tub eppendorf de 1,5mL i afegir 20µL de H₂O lliure de RNAses o DEPC. Centrifugar 1' a 14000 rpm.
11. Tornar a afegir 20µL de H₂O lliure de RNAses. Centrifugar 1' a 14000 rpm.
12. Descartar la columna, incubar el tub 3' a 65°C i congelar a -80°C.

La quantificació de l'ARN es va realitzar mitjançant l'espectrofotòmetre Nanodrop (Nucliber), que mesura l'absorbància de la mostra a 260nm (la franja dels àcids nucleics) per a determinar la concentració d'ARN en nanograms/ μL i la qualitat de la mostra (A_{260}/A_{280}).

Per a treballar amb microarrays d'expressió és imprescindible obtenir mostres d'alta qualitat ($1,7 < \text{RATI}_{A_{260}/A_{280}} < 2,1$), ben purificada (no presència d'ADN) i en quantitat suficient per a obtenir finalment $5\mu\text{g}$ d'ARN en $10\mu\text{L}$ de volum, com a màxim. La presència d'ADN pot ser detectada a través d'un gel d'agarosa a l'1%, en el que haurem d'observar només dues bandes corresponents a les subunitats de l'ARN ribosòmic (figura 4.3).

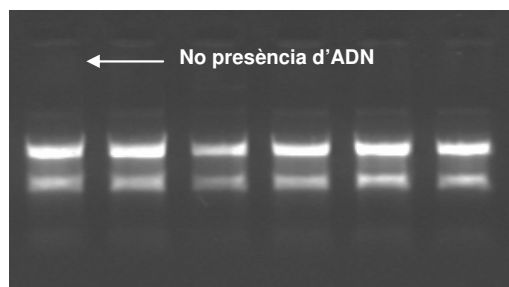


Figura 4.3: Imatge d'un gel d'agarosa a l'1% on s'ha analitzat l'estat de l'ARN. Es visualitza l'ARN ribosòmic, que es troba en bon estat si les bandes són nítides i la inferior és més tènue que la superior. No es detecta presència d'ADN (no hi ha una banda gruixuda sota els pous).

Si l'ARN no està suficientment concentrat s'ha de realitzar una precipitació de la mostra, usant el mètode de l'Acetat-Etanol. Segons aquest, s'afegeix a la mostra 1/10 3M d'acetat sòdic (fred) i 2,5 volums d'etanol absolut (fred). L'ARN precipita durant mínim 1h d'incubació a -80°C , és centrifugat a 14000 rpm 10' a 4°C i el sobrenedant és descartat. Es fa un rentat amb $100\mu\text{L}$ d'etanol al 70% (fred) i es torna a centrifugar. Es descarta el sobrenedant i s'asseca el pellet 5' a 65°C . Finalment, és solubilitzat amb el volum adequat d'aigua lliure de RNAses i es torna a quantificar.

4.1.5- ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ PER TECNOLOGIA MICROARRAY

Cada una de les mostres va ser hibridada amb un ARN comercial (Human Reference RNA, Stratagene) usat com a control extern, que consisteix en un *pool* d'ARN de cèl.lules tumorals. La mostra de referència va ser la mateixa per a totes les línies cel.lulars estudiades i d'aquesta manera, els experiments van ser comparables entre ells. Per a cada hibridació, es va

realitzar un marcatge invers (Dye Swap), que va ser usat com a control del marcatge i rèplica de l'experiment (figura 4.4). Els fluorocroms usats van ser Cy5/Alexa Fluor 647 (vermell) i Cy3/Alexa Fluor 546 (verd). Cada plataforma o *slide* contenia 339 punts o *spots* com a control negatiu.

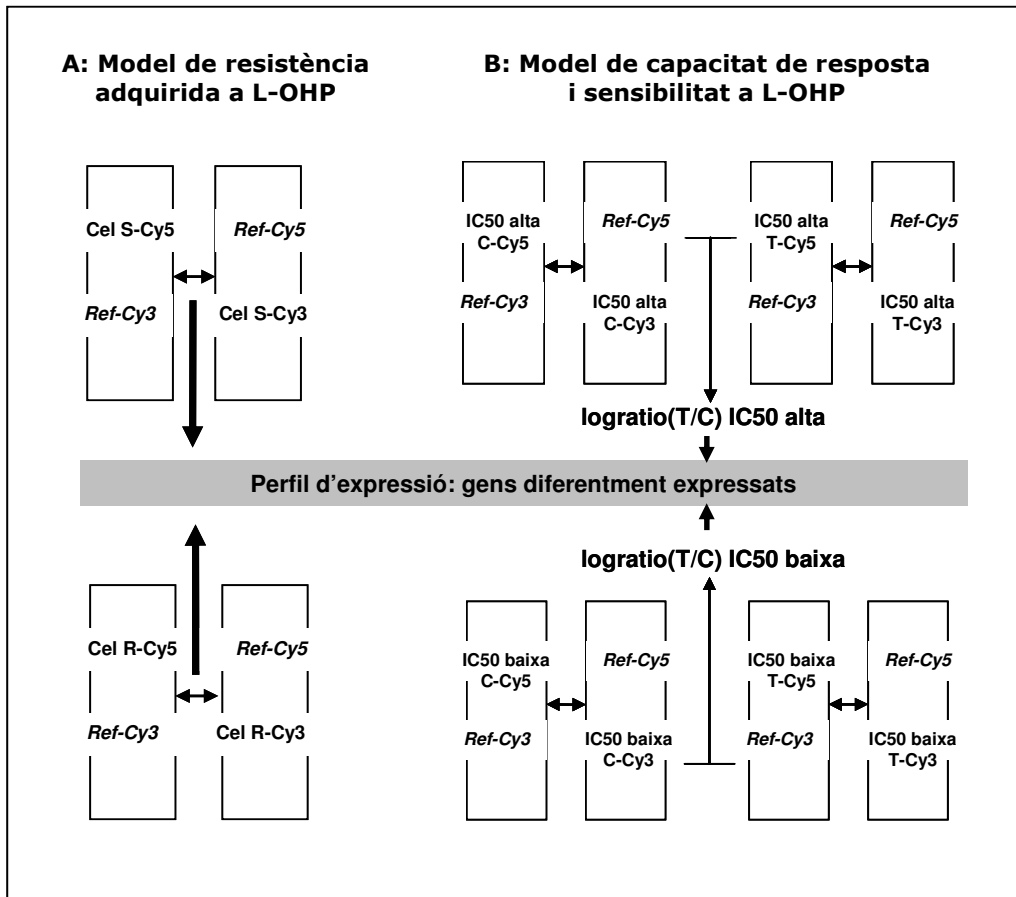


Figura 4.4: Disseny experimental per a l'anàlisi de l'expressió per microarrays. Cada mostra va ser hibridada amb la mostra de referència (Ref) i marcada amb ambdós fluorocroms Cy5 i Cy3 (2 rèpliques per mostra).

A: Les línies sensibles (Cel S) i les línies resistents (Cel R) no van ser comparades de forma independent (per parelles), sinó com a 2 grups (grup S i grup R).

B: En aquest model, cada línia cel.lular va ser sotmesa a tractament i es va establir la comparació cel.lular control (C) vs tractada (T) mitjançant la funció $\log\text{Rati}(T/C)$. Finalment, va ser el valor d'aquest quocient el que es va utilitzar per comparar els 2 grups (IC50 alta i baixa).

Per a processar els *slides*, es va utilitzar un kit comercial (Genisphere 3DNA Array350), el qual realitza un tipus de marcatge anomenat **dendrític**. El marcatge dendrític consisteix en l'agrupació de diverses molècules del mateix fluorocrom (Cy5 o Cy3) en una estructura anomenada *dendrimer*, la qual té una zona d'unió al ADNc (figura 4.5). Per tant, cada molècula de ADNc serà

marcada per varies molècules de fluorocrom i així tenim una amplificació del senyal i no necessitem tanta quantitat d'ARN inicial i, per tant, el marcatge és més eficient (156). El *dendrimer* s'incorpora a la molècula d'ADNc durant la retrotranscripció de l'ARN. Els *primers* contenen una zona d'unió al *dendrimer* específic (el *dendrimer* Cy5 s'uneix al *primer* Cy5) en aquest mètode de marcatge.

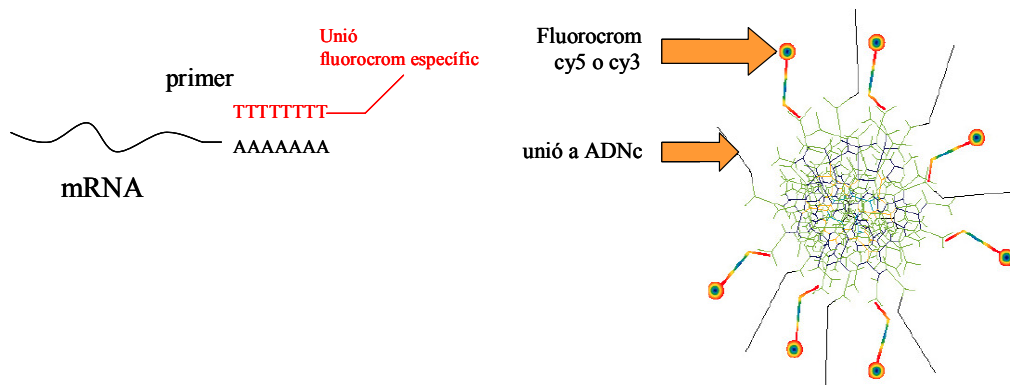


Figura 4.5: Esquema il·lustratiu del *dendrimer*, amb la representació dels fluorocroms i la zona d'unió a l'ADNc. També es mostra la manera com el *primer* específic de fluorocrom s'uneix a ARN missatger (mRNA) durant la retrotranscripció.

D'acord amb això, per a cada una de les mostres es van realitzar 4 retrotranscripcions:

- Mostra marcada amb el fluorocrom Cy5
- ARN de referència marcat amb Cy3
- Mostra marcada amb Cy3
- ARN de referència marcat amb Cy5

I dues hibridacions per mostra:

- Mostra-Cy5 amb ARN referència-Cy3
- Mostra-Cy3 amb ARN referència-Cy5 (Dye Swap)

4.1.5.1- Processament dels *slides*

4.1.5.1.1- PREPARACIÓ DELS *SLIDES*

Es van utilitzar els *slides* Human 19K oligo Array (Center of Applied Genomics, University of Medicine of New Jersey; <http://www.cag.icph.org>)

en els que cada un conté 19200 gens (oligonucleòtids). Les sondes, procedents de la col·lecció de Compugen, van ser afegides (*espotejades*) amb l'aparell *Genemachines OmniriGrid Microarrayers* de Genomic Solution en *slides* tractats amb polilisina. La plantilla de l'array incloïa 48 subarrays (4 x 12) i cada subarray estava format per 20 columnes x 20 files.

Els *slides* van ser tractats abans de ser sotmesos al procés d'hibridació. El procés consistia en introduir-los en la solució de prehibridació (250µL de formamida, 250µL de SSC 20X, 5mL de SDS 20X i 4,5mL d'H₂O destil·lada) durant 45' a 42°C.

4.1.5.1.2- HIBRIDACIÓ DELS SLIDES

El procés d'hibridació va ser portat a terme seguint el protocol del kit *3DNA Array-350* de Genisphere (figura 4.6) i consta dels següents passos:

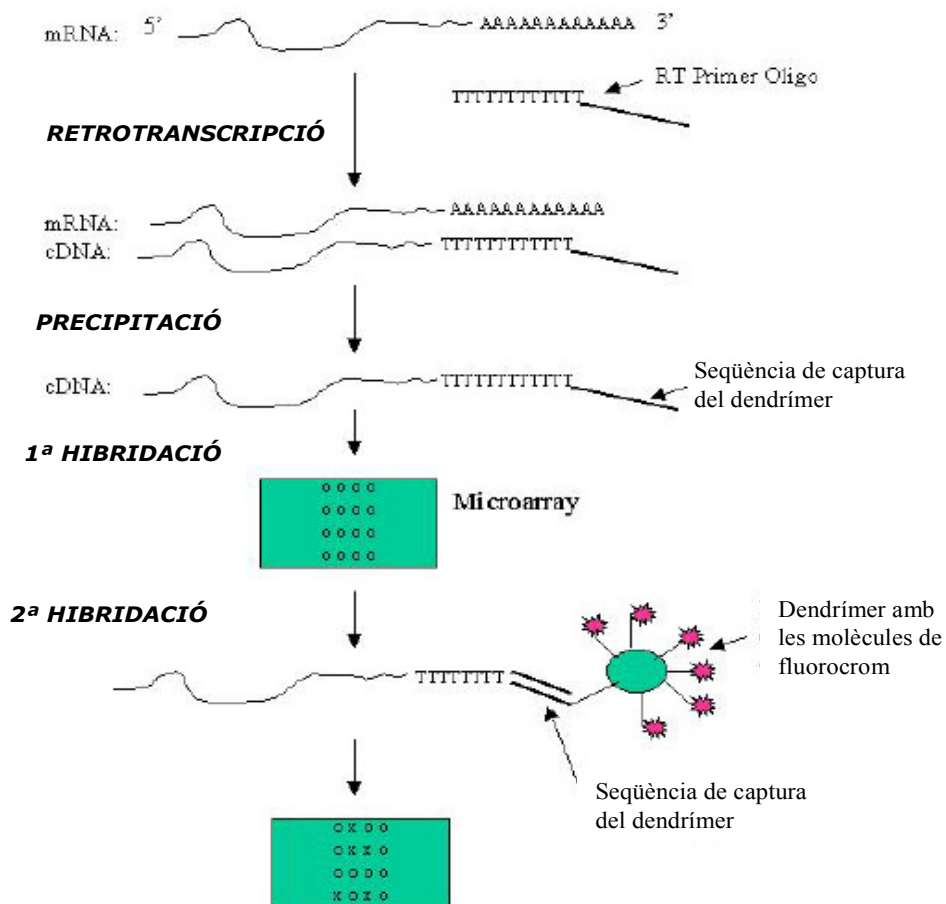


Figura 4.6: Procés d'hibridació dels *slides* segons el protocol del kit *3DNA Array-350* de Genisphere (<http://www.genisphere.com>).

RETROTRANSCRIPCIÓ (RT):

Consisteix en la transformació de l'ARN inicial en ADNc, ja que aquest últim és més estable i això optimitza el procés d'anàlisi de l'expressió.

- **Mix de la mostra (per tub):**
 - Xµl mostra on X són els µL de mostra que contenen 5µg d'ARN
 - (10-X)µl d'aigua lliure de RNAses
 - 1µl *primer* oligo dT específic de fluorocrom (Cy5 o Cy3)
- Incubar a 80°C durant 10'.
- Afegir a la mix de la mostra la **mix de retrotranscripció:**
 - 4µl de *SuperScript II First Strand Buffer 5X*
 - 2µl de 0,1M *dithiothreitol* (DTT)
 - 1µl de mix de dNTPs 10mM
 - 1µl d'inhibidor de RNAsa *Superase-In™*
 - 1µl d'enzim *Superscript II reverse retrotranscriptase* 200u (Invitrogen)
- Incubació de 2h a 42°C.
- Parada de la reacció: afegir 3,5µl de 0,5M NaOH/50mM EDTA.
- Desnaturalització dels híbrids ADNc/ARN i degradació de la cadena d'ARN per incubació a 65°C 10'.
- Neutralització: afegir 5µl de 1M Tris-HCl pH 7,5.
- Ajuntar la mostra amb la mostra de referència (marcat amb l'altre fluorocrom) i afegir 73µl de TE 2X (Tris-EDTA).

PRECIPITACIÓ DE L'ADNc

- Afegir a la mescla 15µg d'acrilamida (coprecipita amb l'ADNc), 250µL d'acetat d'amoni 3M i 875µL d'etanol absolut (fred).
- Deixar a -20°C durant 1 hora.
- Centrifugar a 14000 rpm 15' a 4°C i retirar el sobrenedant.
- Afegir etanol al 70% (fred) i centrifugar a 14000 rpm 10' a 4°C.
- Descartar el sobrenedant i assecar el pellet a 65°C 10-30'.

PRIMERA HIBRIDACIÓ

En aquest pas es produeix la cohibridació de la mostra i l'ARN referència amb els oligonucleòtids del *slide*:

- Resuspendre el pellet en 29µL d'H₂O lliure de RNAses. Incubar 10' a 65-70°C.
- Afegir 29µL de buffer d'hibridació 2X, vortejar i incubar a 80°C 10'.
- Pre-escalfar els *slides* a la T^o d'hibridació (55°C).
- Vortejar i fer un spin de la mix d'hibridació.

- Afegir la mix sobre el *slide* pre-escalfat i tapar-ho amb un cubreobjectes de vidre.
- Introduir el slide a la cambra d'hibridació humida (figura 4.7).
- Incubar a 55°C tota la nit en un bany d'hibridació en condicions de foscor.



Figura 4.7

RENTAT POST- HIBRIDACIÓ

- Pre-escalfar el buffer de rentat (SSC 2X i 0,2% SDS) a 42°C.
- Introduir el *slide* en el buffer de rentat 5' (fins que el cubreobjectes suri).
- 1er rentat: 15' en el buffer de rentat pre-escalfat.
- 2on rentat: 15' en SSC 2X a T^o ambient i en agitació.
- 3er rentat: 15' en SSC 0,2X a T^o ambient en agitació.
- Passar el *slide* per H₂O destil.lada i assecar-lo amb aire a pressió.
- Deixar al forn 15-20' a 60°C.

SEGONA HIBRIDACIÓ: marcatge

La hibridació de marcatge consisteix en afegir els fluorocroms al *slide* ja hibridat i així cada un d'ells, s'uneix l'ADNc que conté el seu *primer* específic.

- Deixar els reactius de marcatge per Cy5 i Cy3 (*3DNA Array 350 Capture Reagents*) 20' a T^o ambient en la foscor. Vortejar lleugerament i incubar a 55°C 10'.
- Resuspèndre el buffer d'hibridació 2X a 85°C 10'. Preparar una mix amb 125µL de buffer i 1,2µL del preservant de fluorescència (*Anti-Fade Reagent*).
- Preparar la **mix d'hibridació** per a cada *slide*:
 - 2,5µL de reactiu de marcatge amb Cy5.
 - 2,5µL de reactiu de marcatge amb Cy3.
 - 25µL de mix de buffer d'hibridació i *Anti-fade*.
 - 20µL d'H₂O lliure de nucleases.
- Afegir la mix sobre el *slide* hibridat, tapar amb el cubreobjectes, introduir en la cambra d'hibridació i incubar 4h a 60°C en el bany d'hibridació en la foscor.
- Repetir els rentats anteriors però tapant els *slides* de la llum (ja han incorporat els fluorocroms).

- Assecar amb aire a pressió i guardar a T⁰ ambient i en la foscor fins al moment de ser escanejats (l'escaneig s'ha de realitzar en el menor temps possible per no perdre intensitat del senyal).

4.1.5.2- Processament de la imatge

4.1.5.2.1- ESCANEIG DELS *SLIDES*

Per a realitzar l'escaneig es va utilitzar l'escàner *Affymetrix Genetic Microsystems GMS418 Array*, el qual escaneja per a cada un dels *slides*, la imatge produïda pel fluorocrom Cy5 i la produïda pel Cy3 per separat (obtenim dues imatges independents). D'aquesta manera, es genera una imatge TIFF 16bit per a cada canal de fluorocrom, com es mostra a la figura 4.8 (imatges en tonalitats blaves). Es van establir uns paràmetres estàndard (proposats per *Genisphere*) de la intensitat del làser i la resolució de la imatge, que van ser 80/70 per Cy5 i 80/75 per Cy3. Aquests paràmetres poden ser ajustats segons el resultat obtingut.

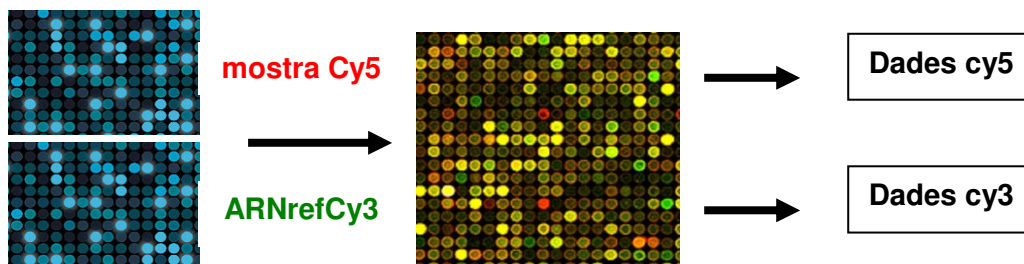


Figura 4.8: Esquema del procés d'escaneig i quantificació. Les imatges obtingudes per l'escaneig (tonalitats blaves), donen lloc a la imatge mostrada al centre de l'esquema, que serà quantificada i de la qual s'obtenen dades numèriques.

4.1.5.2.2- QUANTIFICACIÓ DE LA IMATGE

Mitjançant el programa *Image 4.1* (BioDiscovery), les dues imatges obtingudes, procedents del mateix *slide*, van ser solapades i analitzades conjuntament (figura 4.8). S'obtingueren punts de diferent color segons si hi havia sobreexpressió de l'ADNc-Cy5 respecte el marcat amb Cy3 (vermell), a la inversa (verd), l'expressió era equivalent (groc) o no hi havia expressió en cap dels dos (negre). El programa quantifica colorimètricament i elimina aquells punts que són irregulars, són massa petits o no tenen un

color uniforme (punts que tenen el valor *flag* diferent a 0). Finalment, s'obtenen dades numèriques a partir de la imatge, independents per a Cy5 i Cy3 per a cada *slide*.

4.1.5.3- Processament de les dades

4.1.5.3.1- FILTRATGE DE LES DADES

Els arxius de dades van ser importats al programa de processament de dades *Microsoft Excel* per a poder analitzar la qualitat d'aquestes. Partint de dues taules de dades per a cada *slide*, una procedent de l'escaneig de la imatge marcada amb Cy5 i l'altra de Cy3, es va calcular la mitja i la mediana per a cada *spot*, la mitja del *background* i la desviació estàndard (SD) en cada taula de dades. S'eliminaren tots aquells *spots* que no complien les següents condicions:

- La diferència entre la mediana i la mitja del *spot* era més gran del 20% (només que es complís en una de les dues taules de dades, el *spot* quedava eliminat de les dues).
- La mitjana del *spot* era més gran que la mitja del *background* més dues vegades la SD (per eliminar aquells punts que tenien una intensitat massa semblant al *background* i podien destorbar els resultats).

Amb aquest filtratge van ser eliminats *spots* que eren correctes segons *Imagene 4.1 (flag=0)* però que, en realitat, eren dades enganyoses.

4.1.5.3.2- NORMALITZACIÓ DE LES DADES (ArrayNorm 1.7.2)

Amb aquest programa van ser analitzades totes les dades experimentals, per a fer-les comparables entre elles. Es van importar les dades filtrades de tots els *slides* a comparar (línies resistents vs sensibles; línies control vs tractades). En primer lloc, s'havia de comprovar, en cada taula de dades, que el percentatge de punts eliminats (*flag* ≠ 0) fos inferior al 50% (en cas contrari, aquest *slide* no era vàlid).

Després de provar diferents mètodes de normalització, es va utilitzar el mètode **Lowess** perquè va ser el que millor es va adaptar a les nostres dades. Per descartar els falsos positius produïts per unions inespecífiques

dels fluorocroms, es va utilitzar el mètode **Dye Swap Sym Fix Filter**, el qual compara els *spots* d'un *slide* amb la seva rèplica marcada a la inversa (*Dye Swap*) i elimina aquells punts que tenen el mateix color en els dos (control d'hibridació òptima). Finalment, es va obtenir una taula de dades definitives per a cada línia cel.lular. Si durant el procés de normalització s'havia perdut més del 50% dels *spots*, l'experiment d'hibridació no era considerat vàlid i havia de ser repetit.

4.1.5.3.3- ANÀLISI DE DADES NORMALITZADES (*Genesis 1.5.0*)

En primer lloc, es realitzà un filtratge de les dades normalitzades, en el que s'eliminaren:

- En el model de resistència adquirida a L-OHP: totes aquelles dades que no estaven presents en les 8 línies cel.lulars (*missing values=0*).
- En el model de capacitat de resposta a L-OHP: totes aquelles dades que estaven presents almenys en 12 línies de les 14 analitzades (*missing values ≤ 2*).
- En els 2 models: aquelles dades que no tenien una desviació estàndard interlínia superior a 0,8 (es considerà que els *spots* que tenien valors amb una SD més petita, no presentaven variació i no eren valorables).

Després del filtratge inicial, es va realitzar una anàlisi de dades no supervisada (no jeràrquica), mitjançant la funció ANOVA entre els dos grups a comparar: sensibles vs resistents; IC50 alta vs IC50 baixa (en aquesta comparació, s'havia calculat prèviament la logRati (Tractament/Control)). Aquesta anàlisi va permetre determinar els gens que presentaven més diferències intergrup que intragrup. Considerarem com a resultats estadísticament significatius, aquells que presentaven un p-valor inferior a 0,01.

Posteriorment, es va portar a terme una anàlisi no supervisada jeràrquica per **hierarchical clustering** dels gens obtinguts en l'anàlisi no jeràrquica per ANOVA. D'aquesta manera, van poder ser determinats grups o *clusters* de gens que es comportaven d'igual manera i que podrien correlacionar-se amb l'adquisició de resistència o la capacitat de resposta a oxaliplatí formant un patró d'expressió gènica.

4.1.6- IDENTIFICACIÓ I SELECCIÓ DE GENS

4.1.6.1- Identificació dels gens obtinguts

El gens obtinguts amb el programa *Genesis 1.5.0*, es trobaven codificats en forma de *ID Genebank* i van haver de ser identificats per determinar si es tractava d'un gen, d'un pseudogen o d'un transcrit no codificant. A més a més, es va determinar a quina via pertanyia cada gen, quina era la seva funció i la seva possible implicació en càncer i resistència a fàrmacs. Per a portar-ho a terme, es van utilitzar els següents cercadors d'internet:

<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>,

<http://cgap.nci.nih.gov>,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

4.1.6.2- Criteris de selecció de gens

Es va realitzar una selecció d'aquells gens que havien estat correctament identificats, tenint en compte els següents criteris:

1. Es va realitzar una hibridació per BLAT (<http://genome.ucsc.edu>) entre la seqüència del gen identificat mitjançant els esmentats cercadors i la seqüència de la sonda *espotejada* en el microarray (que teòricament corresponia a aquest gen). Aquells gens que van presentar un 100% d'hibridació amb la sonda (aquesta no hibridava amb cap altra seqüència gènica) van ser seleccionats (figura 4.9).

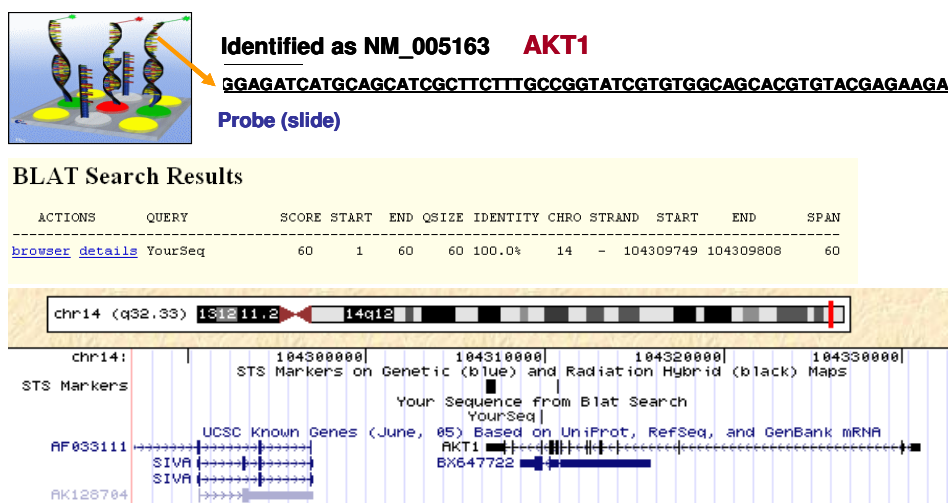


Figura 4.9: Resum esquematitzat del procés de selecció per hibridació per BLAT del gen AKT1. Existeix un 100% d'homologia entre el gen i la sonda (*score=gen size=60*) i la sonda no hibrida amb cap altre gen.

- Se seleccionaren els gens que presentaven homogeneïtat d'expressió (figura 4.10) en els diferents membres del mateix grup (p.ex: gen homogeni en les 4 línies sensibles en el model de resistència adquirida a oxaliplatí) per a evitar falsos positius, artefactes del càlcul que havia estat portat a terme mitjançant la funció ANOVA.

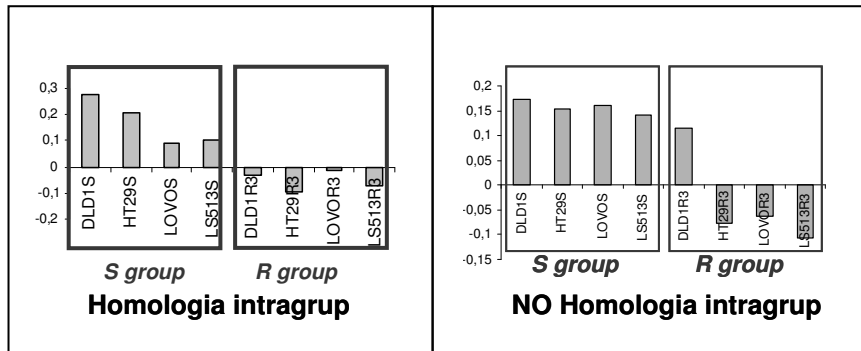


Figura 4.10: Representació gràfica dels valors d'expressió de dos gens obtinguts per l'anàlisi de microarrays. El gen del gràfic esquerre, presenta una expressió semblant en totes les línies cel·lulars d'un mateix grup (gen seleccionat). En canvi, en el gràfic de la dreta no existeix aquesta homologia (gen descartat).

- Es realitzà una recerca bibliogràfica per a estudiar la potencial relació de la funció de les proteïnes per a les que codifiquen aquests gens amb el mecanisme d'acció i la resistència a oxaliplatí i platins.
- Finalment, van ser seleccionats per a la seva validació per qRT-PCR aquells gens per als quals existia un disseny de *primers* i sonda ja testats per la casa comercial (*Taqman® Gene expression Assays*; Applied Biosystems). També, es va tenir en compte que la mida de l'amplicó que resultava de l'amplificació amb un determinat *assay* fos inferior a 90pb, per a la seva posterior utilització en l'anàlisi en teixit parafinat (l'ARN està molt degradat i l'amplificació de petits amplicons és més efectiva).

4.1.7- VALIDACIÓ DE L'EXPRESSIÓ PER qRT-PCR

Els gens escollits mitjançant l'aplicació dels criteris de selecció esmentats, van ser analitzats per PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR). El material de partida va ser el mateix ARN que havia estat utilitzat per a realitzar l'anàlisi de l'expressió mitjançant la tecnologia microarray.

4.1.7.1- Retrotranscripció

La obtenció de l'ADNc es va realitzar utilitzant la retrotranscriptasa MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus retrotranscriptase*; Invitrogen) ja que, encara que és menys eficient que l'enzim *Superscript II* (usat en l'anàlisi de microarrays), la quantitat i la qualitat d'ADNc resultant és suficient per portar a terme l'anàlisi per qRT-PCR. La retrotranscripció es va dur a terme a partir d'una concentració d'ARN de 3µg en un volum màxim de 10µL i el protocol seguit va ser el mostrat a continuació:

- Preparació de la **mix de la mostra** per tub:
 - XµL mostra (on X són els µL de mostra que contenen 3µg d'ARN)
 - (10-X)µL d'aigua lliure de RNAses
 - 1µL de *primer Random Hexadeoxinucleòtid* 250ng/mL (Invitrogen).
 - 1µL mix de dNTPs 10mM (Ecogen).
- Incubar a 65°C durant 5' i deixar en gel 5'.
- Afegir la **mix de retrotranscripció**:
 - 4µl de buffer de reacció 5X
 - 2µl de 0.1M dithiothreitol (DTT)
 - 1µl de *RNAsa OUT* (Invitrogen), inhibidor de RNAses
 - 1µl d'enzim *MMLV reverse retrotranscriptase* 200u (Invitrogen)
- **Condicions de la retrotranscripció:**

Unió dels <i>primers</i>	25°C x 10'
Obtenció d'ADNc	37°C x 45'
Inactivació de l'enzim	70°C x 10'
- Dilució del producte de retrotranscripció: obtenim 3µg d'ADNc en 20µL (0,15µg/µL). Per a realitzar l'anàlisi per qRT-PCR es necessiten com a mínim 30-50ng d'ADNc en 2,5µl. Per a tenir 50ng en aquest volum, s'ha de diluir el producte de retrotranscripció en 130µL d'H₂O lliure de nucleases.

4.1.7.2- Anàlisi de l'expressió (tècnica qRT-PCR)

La plataforma *ABI Prism 7900* (Applied Biosystems) va ser utilitzada per a portar a terme l'anàlisi per qRT-PCR relativa, a partir de la utilització de sondes *Taqman®*. Aquests tipus de sondes consisteixen en oligonucleòtids de 18-22 pb els quals estan marcats amb un fluorocrom efector o *reporter*

(usualment de longitud d'ona curta) a l'extrem 5' i un agent quelant o *quencher* (un fluoròfor de longitud d'ona llarga o un agent no fluoròfor) al 3', que redueix la fluorescència emetida per l'efector. El seu funcionament es basa en l'activitat 5' exonucleasa de l'enzim Taq (*Thermus aquaticus*) Polimerasa, que permet l'alliberament de l'efector i, en conseqüència, l'emissió de fluorescència, que és quantificada i enregistrada per la plataforma en cada un dels cicles de la PCR (figura 4.11).

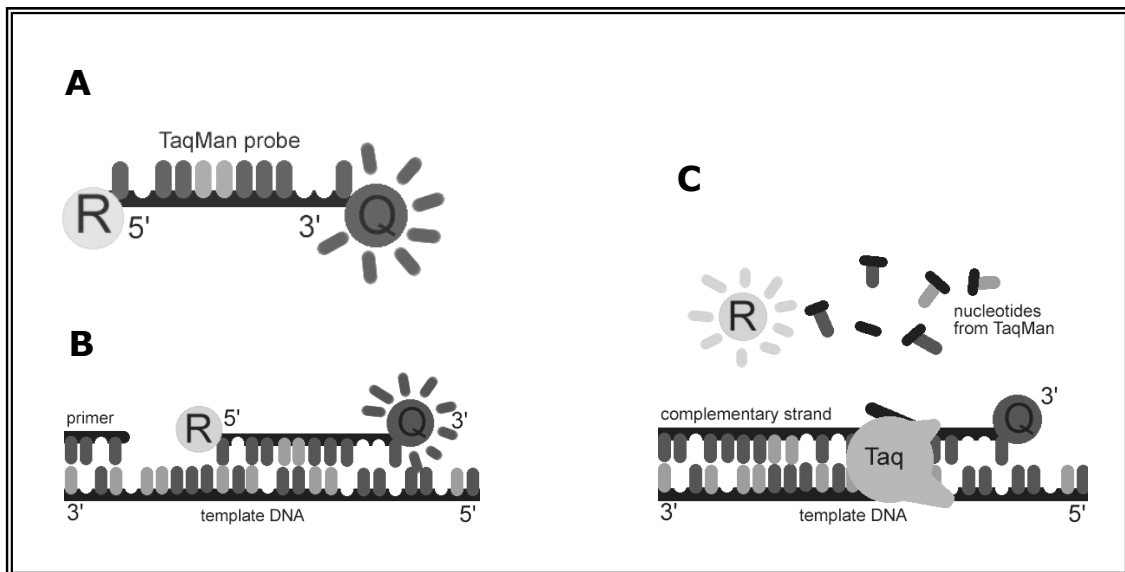


Figura 4.11: Esquema de l'estructura d'una sonda *Taqman*[®] i del seu funcionament al llarg del procés de qRT-PCR. A: Es tracta d'una seqüència de 18-22 pb que té units un fluorocrom efector (cercle gris clar) a l'extrem 5' i un fluorocrom quelant (cercle gris fosc) al 3' que neutralitza l'emissió de fluorescència de l'efector quan existeix poca distància entre ells. B: La sonda s'uneix, sense emetre fluorescència, en una zona de l'ADN diana que es troba entre els dos primers d'amplificació. C: Durant el procés d'amplificació, l'acció exonucleasa de la Taq polimerasa permet l'alliberació per hidròlisi del fluorocrom efector i aquest emet fluorescència, ja que ja no queda neutralitzat per l'acció del quelant.

Els experiments es van realitzar en plaques de 384 pous, introduint:

- 3 rèpliques per mostra
- 2 rèpliques de control negatiu per a cada mix
- 2 rèpliques de control negatiu de RT
- 3 rèpliques per a cada mostra de *RTMINUS*, que consisteix en introduir ARN no retrotranscrit per a comprovar l'absència d'ADN a la mostra de partida (aquest fenomen també es visualitza en un gel d'agarosa després de l'extracció de l'ARN).

Els gens escollits d'acord amb els criteris de selecció, van ser analitzats mitjançant *Taqman*[®] *Gene expression Assays*, cadascun dels quals consisteix en una mix que inclou els primers i la sonda per a detectar un determinat gen, que ja han estat testats i validats per a ser utilitzats en qRT-PCR per *ABIPrism* (<https://products.appliedbiosystems.com>). Els assays utilitzats van dependre dels gens seleccionats i són els descrits a la secció *Resultats*, a l'apartat 5.1.4 (gens de resistència adquirida) i 5.2.4 (gens de capacitat de resposta i sensibilitat al fàrmac).

Es van utilitzar dos controls endògens, el gen de la **β -actina** i el del **18S ribosòmic**, per a donar més robustesa a l'anàlisi. En les anàlisis de qRT-PCR relativa ha estat descrit l'ús de 2 o més gens endògens amb l'objectiu de contrarrestar els errors que poden venir donats per la variabilitat intermostra a l'usar només un gen control i la utilització de la mitja geomètrica d'aquests com a valor endogen de referència per a relativitzar l'expressió (164).

Per a realitzar l'anàlisi d'aquests gens no es van utilitzar *Taqman*[®] *expression assays* ja que no hi havia disponibilitat d'assays amb amplicons inferiors a 90pb per a aquests gens, i aquest és una factor important a tenir en compte per a la posterior anàlisi en teixit parafinat. Es van sintetitzar els següents *primers* i sondes per a cada un d'ells:

β -actina *Primer forward*: 5' TGAGCGCGGCTACGCTT 3'
 Primer reverse: 5' TCCTTAATGTCACGCACGATTT 3'
 Sonda *TaqMan*[®] *TAMRA*: 5' ACCACCACGGCCGAGCGG 3'

18S *Primer forward*: 5' ACGCACGGCCGGTACA 3'
 Primer reverse: 5' CCAAAGGAACCATAACTGATTTAATG 3'
 Sonda *Taqman*[®] *MGB*: 5' AACTGCGAATGGC 3'

Les sondes incloses en els *Taqman*[®] *expression assays* i la del 18S eren de tipus *MGB*. En el cas del gen de la β -actina, es va usar una sonda tipus *TAMRA* ja que es tractava d'un disseny de *primers* i sonda previ que ja havia estat validat i utilitzat en altres treballs del laboratori i mostrava una eficiència pròxima al 100%, tant en línies cel.lulars com en teixit inclòs en

parafina. En tots els casos, el fluorocrom efector incorporat en les sondes era de tipus *FAM*.

Les sondes *TAMRA* i *MGB* es diferencien bàsicament per:

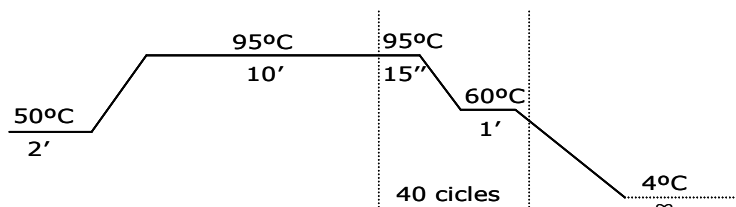
- La zona d'unió a l'ADN: les sondes tipus *MGB* s'uneixen a la curvatura menor de l'ADN, fet que permet que tinguin la mateixa especificitat que *TAMRA* amb una quantitat menor de nucleòtids. Això és important alhora de dissenyar sondes destinades a la detecció de material genètic de mala qualitat, com és el cas del teixit parafinat.
- El tipus d'agent quelant o *quencher*: al contrari que les *TAMRA*, les sondes *MGB* incorporen un quelant no fluoròfor que inhibeix completament la fluorescència de l'efector, fet que redueix el soroll de fons o *background* de l'anàlisi.

Els primers i les sondes dissenyades per als gens endògens o gens *housekeeping*, van haver de ser testats i validats (veure apartat 4.1.7.2.1).

Mix de qRT-PCR (per reacció):

Taqman® Universal Mix 10X	6,25 µ L	<u>MIX per Taqman® expression assays:</u>
H ₂ O lliure nucleases	2,92 µ L	Taqman® Universal Mix 10X
Primer Forward 10µM	0,375 µ L	6,25 µ L
Primer Reverse 10µM	0,375 µ L	H ₂ O lliure nucleases
Sonda 15 µ M	0,08 µ L	2,92 µ L
		Taqman® Assay
		0,625 µ L

La PCR es va portar a terme segons les condicions descrites en el programa *SDS 2.1* inclòs en *ABI Prism 7900*:



La quantificació relativa de l'expressió gènica va ser calculada d'acord amb el **mètode comparatiu del cicle llindar** o $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (165), que consisteix en establir un valor llindar o *threshold* (que es troba en la zona d'amplificació

exponencial) finalitzada l'anàlisi i adoptar, per a cada una de les mostres analitzades, el cicle de PCR que talli amb aquest llindar (**Ct**) com a valor d'expressió (figura 4.12).

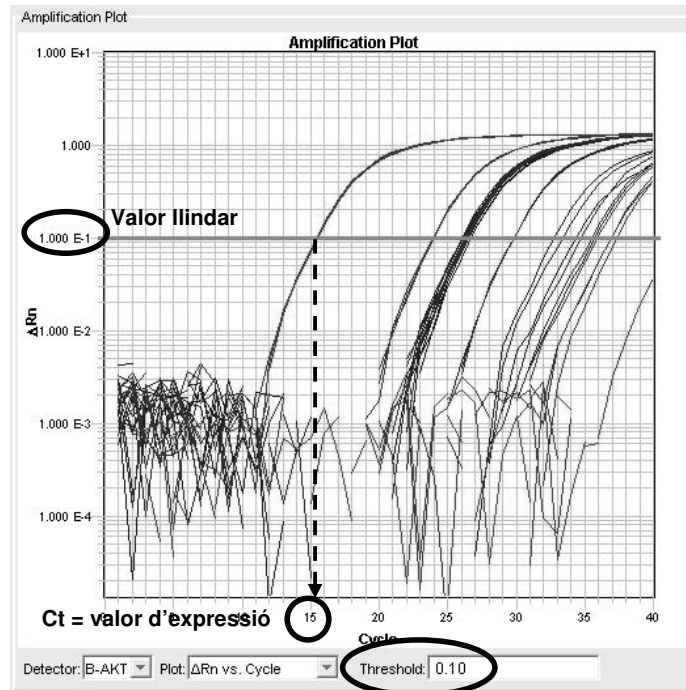


Figura 4.12: Gràfic d'amplificació d'un dels gens analitzats finalitzat el procés. Les corbes representen l'amplificació del gen per a cada una de les mostres. El valor llindar és dependent de gen (normalment es troba entre 0,1 i 0,2) i talla en la part superior de la zona d'amplificació exponencial.

El Ct del gen problema en cada una de les mostres analitzades va ser relativitzat amb el Ct del control endogen (vam utilitzar la mitja geomètrica entre els Ct's dels 2 gens housekeeping). Per tant, la **diferència de Ct** o **ΔCt** va ser calculada a partir de la fórmula:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen problema}} - Ct_{\text{mitja gens endògens}}$$

Per a que totes les mostres fossin comparables entre elles, els valors d'expressió van ser normalitzats essent tots relacionats amb una mateixa mostra de referència o **calibrador** (es va utilitzar la mateixa que en l'anàlisi de microarrays: *Human Reference RNA* de Stratagene), segons el càlcul:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{mostra problema}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}}$$

Finalment, el valor d'expressió (referenciat al calibrador, que és $\Delta\Delta Ct=0$) va ser calculat com a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ i mostrava quantes vegades per sobre o per sota el calibrador expressava un determinat gen en una mostra concreta (ja que $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calibrador = 1).

Per a cada mostra es van realitzar 3 experiments independents (procedents de 3 RT independents) per a cada gen. Per a ser acceptats com a vàlids, el coeficient de variació entre almenys 2 d'ells havia de ser inferior al 20%. En cada experiment, la desviació estàndard entre les 3 rèpliques de cada gen per mostra havia de ser inferior a 0,25.

Per altra banda, per a considerar una mostra com a no contaminada per ADN genòmic, el valor del *RTMINUS* havia de ser inferior a 5 i aquest es calculava de la següent manera:

Partim de la mateixa dilució que s'havia aplicat al producte de RT:

3 μ L RNA + 20 μ L d'H₂O lliure de nucleases

Després de l'anàlisi per qRT-PCR, calculem:

$$2^{\Delta\Delta Ct_{RTMINUS}} = 2^{Ct_{RTMINUS} \text{ gen endogen} - Ct_{\text{gen endogen}}}$$

i finalment

$$100 / 2^{\Delta\Delta Ct_{RTMINUS}} \quad \text{que ha de ser } <5$$

4.1.7.2.1- TEST I VALIDACIÓ DELS GENS ENDÒGENS

Els gens endògens o *housekeeping* són els gens de referència en la qRT-PCR relativa. Per a considerar que un gen és un bon control endogen, la seva expressió ha de ser similar en totes les mostres a analitzar (si partim de la mateixa quantitat d'ARN). La utilització de 2 gens *housekeeping* ens va permetre homogeneïtzar les variacions intermostra que poguessin existir i donar més robustesa a l'anàlisi (164). Per a comprovar la seva bona funcionalitat, es va calcular la diferència de Ct entre els 2 gens per a cada mostra i es va avaluar la variabilitat mitjançant una recta de regressió (figura 4.13), considerant que la variació entre mostres era acceptable si el pendent *m* de la recta era inferior a 0,2 (paràmetre establert per la casa comercial).

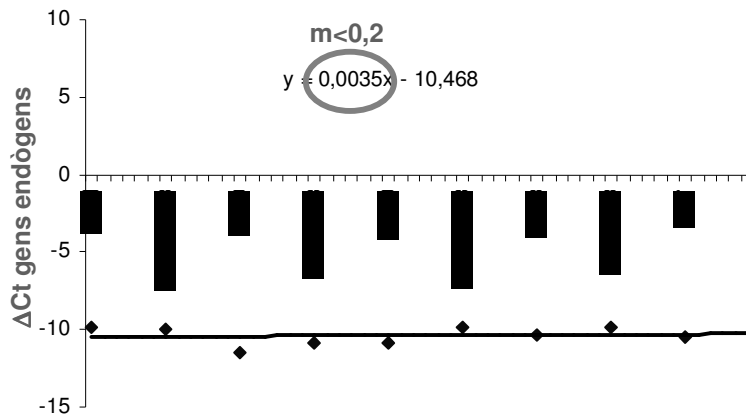


Figura 4.13: Gràfic representatiu de la variabilitat intermostra dels gens endògens. La recta de regressió té una m acceptable i, per tant, els gens són adequats com a controls de l'experiment.

El bon funcionament dels *primers* i la sonda utilitzats per a cada gen endogen van haver de ser testats prèviament a la quantificació relativa, mitjançant una recta patró de diferents concentracions de mostra (8 dilucions de $\frac{1}{2}$). Es consideraren validats si complien (figura 4.14):

- Proporcionalitat dels Ct's en cada punt de dilució: per cada dilució $\frac{1}{2}$, la mostra s'expressa 1 cicle més tard (recta patró $R^2 \geq 0,98$).
- Linealitat entre el gen endogen i el gen problema en cada Ct d'expressió: la ΔCt en cada punt de dilució ha de ser constant ($m < 0,2$).

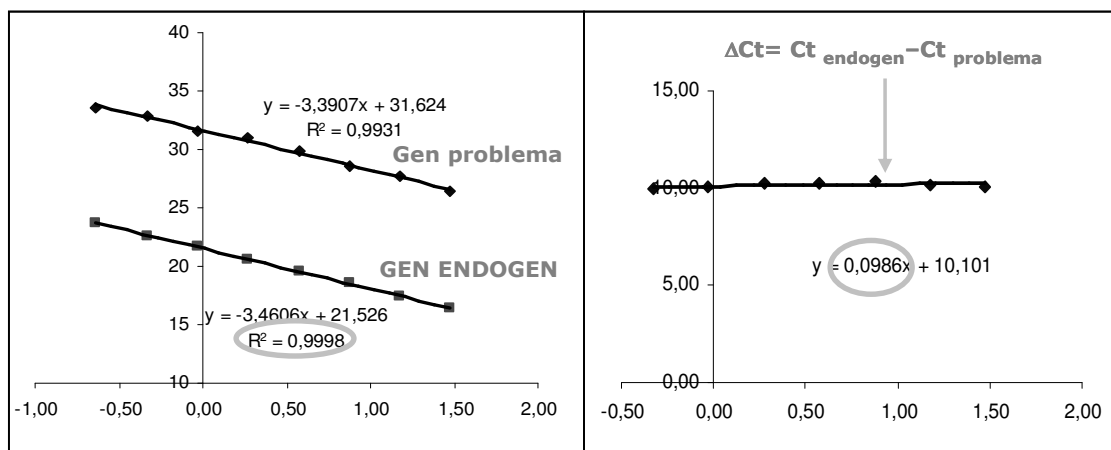


Figura 4.14: Gràfics representatius de la validació dels *primers* i sondes dels gens endògens. Al gràfic de l'esquerra és representada la proporcionalitat dels Ct's en cada punt de dilució ($R^2=0,99$); a la dreta és mostrada la linealitat del gen endogen amb el gen problema ($m=0,09$) en cada punt de dilució. Aquest experiment es va realitzar per a cada gen *housekeeping* i es va comparar amb cadascun dels gens problema. Es va comprovar que les mostres expressessin els diferents gens dins del rang de cicles d'expressió establert en la recta patró.

Es va utilitzar la mostra de referència per realitzar el test: a partir de la concentració de 50ng d'ARN es va realitzar el banc de dilucions i cada una de les dilucions va ser retrotranscrita i analitzada per qRT-PCR .

4.1.7.3- Anàlisi estadística

Una vegada determinats els valors d'expressió (relativitzats al mateix calibrador), es van establir les comparacions entre grups i entre tècniques utilitzades per a estudiar l'expressió (microarray vs qRT-PCR) per a poder realitzar la validació dels gens problema. Es va usar el paquet estadístic *SPSS 12.0*, mitjançant els següents tests.

- Test Rho-Spearman: va ser calculat per a correlacionar les dades obtingudes per a aquests gens en l'anàlisi per qRT-PCR i per microarrays. Es van considerar com a validats positivament pel test, aquells gens que presentaven un coeficient de correlació (R) superior a 0,5 (amb un p-valor<0,05).
- Test dels signes de Wilcoxon o test de la U de Mann-Whitney: van ser utilitzats per a calcular les diferències entre els mateixos grups que van ser comparats per tecnologia microarray. Es van considerar com a gens validats positivament pel test, aquells que mostraren diferències d'expressió significatives entre grups (p-valor<0,05). Es tracta de 2 tests no paramètrics que van ser aplicats segons les dades a comparar:
 - *MODEL DE RESISTÈNCIA ADQUIRIDA*: Es va aplicar la prova dels signes de Wilcoxon perquè les dades a comparar eren dependents entre elles (la línia resistent provenia de la sensible). Aquest test comparava cada línia cel.lular parental amb la seva sublínia resistent i, segons els resultats, calculava les diferències entre el grup R i el grup S donant un p-valor general.
 - *MODEL DE CAPACITAT DE RESPOSTA I SENSIBILITAT*: En primer lloc, es va calcular la logRati entre els valors d'expressió de cada línia en les dos condicions experimentals (T i C). Llavors, es va aplicar el test U de Mann-Whitney ja que les dades a comparar eren independents entre elles (logRati(T/C) de diferents línies cel.lulars). Aquest test comparava els grups IC50 alta i baixa (dades independents), determinant les diferències entre ells (reflexades en el p-valor). En una anàlisi addicional es van calcular les diferències entre les condicions experimentals tractament-control i es va utilitzar el test dels signes de Wilcoxon perquè eren variables dependents.

Un cop analitzades estadísticament les dades procedents de qRT-PCR i correlacionades amb les obtingudes en l'anàlisi per microarrays, es van determinar com a gens vàlids aquells que van ser validats positivament per almenys un dels 2 tests estadístics descrits (Rho-Spearman: $R > 0,5$; Wilcoxon o U de Mann-Whitney: $p < 0,05$).

4.2- ESTUDI IN VIVO

En aquesta part del projecte es van analitzar els gens determinats a partir del model cel.lular de resistència adquirida a oxaliplatí (considerats com a validats després de realitzar l'estudi *in vitro*) en teixits tumorals inclosos en parafina, procedents de les biòpsies de pacients amb CCR avançat, mitjançant la tècnica de qRT-PCR.

4.2.1- PACIENTS

Van ser reclutats 50 pacients amb CCR metastàtic (CCRM) de forma prospectiva. Els blocs de parafina que contenen les biòpsies tumorals es van obtenir mitjançant el Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Germans Trias i Pujol.

Els criteris d'inclusió i d'exclusió de l'estudi i la base de dades dissenyada van ser els descrits a continuació:

Criteris d'inclusió:

- Consentiment informat del pacient.
- Edat major o igual a 18 anys.
- Pacients diagnosticats de CCR disseminat confirmat histològicament, que vagin a ser tractats amb oxaliplatí en 1^a línia de tractament.
- Disponibilitat de teixit tumoral.
- Estat general ECOG entre 0-2 (esperança de vida superior a 12 mesos).
- Masses tumorals mesurables per a la valoració de la resposta (s'usaran els criteris RECIST).
- Adequada funció hematològica, hepàtica i renal per a rebre quimioteràpia.

Criteris d'exclusió:

- No complir algun dels criteris d'inclusió.

- Patologia associada greu en actiu.
- Procés infecció actiu.

Base de dades clínica:

- Edat i sexe
- Localització del tumor primari
- Combinació de quimioteràpia administrada
- Resposta al tractament
- Temps a la progressió

4.2.2- ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ

4.2.2.1- Preparació dels talls en el portaobjectes

El teixit tumoral es trobava inclòs en blocs de parafina i per a poder ser analitzat, va ser tallat amb un micròtom de rotació. Per a cada mostra es van necessitar 3 talls de 5 micres inclosos en tres portaobjectes, que havien estat pretractats per a evitar la presència de RNAses (*RNAseZAP* 10', 2 rentats de 5' en H₂O lliure de nucleases) i un tall addicional en el que es va realitzar una tinció amb Hematoxilina-Eosina, per a discriminar el teixit tumoral del normal (realitzat pel Servei d'Anatomia Patològica).

4.2.2.2- Desparafinització i digestió

En primer lloc, es va retirar el teixit no tumoral de cada tall amb l'ajut d'una fulla de bisturí. El procés de desparafinització consistia en:

- Introduir els portaobjectes en xilol 10'
- Rentar en H₂O 10'
- Deixar assecar a T⁰ ambient mínim 20'.

Els 3 talls desparafinats procedents d'una mateixa mostra, van ser rascats amb un bisturí i introduïts en un mateix tub eppendorf que contenia 200µL de **solució de digestió**:

- Tris-HCl pH=8 10mM
- EDTA pH=8 0,1mM

- SDS 2%
- H₂O lliure de RNases fins a obtenir el volum desitjat

La digestió es produïa *overnight* (deixar unes 16-18h) a 65°C i en agitació (850 rpm).

4.2.2.3- Extracció de l'ARN

A causa de la poca quantitat i el mal estat de l'ARN que procedeix del teixit parafinat, l'extracció d'ARN es va portar a terme mitjançant el **mètode del fenol-cloroform**, tal i com es descriu a continuació:

- Preparar la solució de fenol - cloroform/isoamiloalcohol
Per mostra: 500µL fenol + 200µL cloroform/isoamiloalcohol
- Afegir 300µL de solució en cada un dels tubs amb el producte digerit (en gel), vortejar i deixar 10' en gel.
- Centrifugar a 14000 rpm 30' a 4°C.
- Recollir la fase aquosa (on es troba l'ARN) en un altre tub (en gel).
- Afegir 300µL d'isopropanol, 20µL d'acetat sòdic 3M i 2,5µL de glicogen (coprecipita amb l'ARN) i deixar precipitar mínim 30' a -20°C.
- Centrifugar a 14000 rpm 10' a 4°C.
- Retirar el sobrenedant i afegir 150µL d'etanol al 70% (fred). Centrifugar a 14000 rpm 5' a 4°C.
- Retirar el sobrenedant i assecar el pellet 3-5' a 65°C per a eliminar tot l'etanol.
- Resuspendre el pellet d'ARN en 50µL d'H₂O lliure de nucleases i incubar a 65°C durant 5'
- Congelar l'ARN a -80°C fins al seu ús.

TRACTAMENT AMB DNAsa:

- Afegir a l'ARN 1,5µL de DNAsa (*DNase Free*; Ambion) i 6µL de DNasa buffer 10X (Ambion). Incubar 30' a 37°C.
- Parada de la reacció: resuspendre l'inhibidor de DNasa (*DNase inactivation reagent*; Ambion) i afegir-ne 6µL a cada tub. Deixar a T^o ambient 2'.
- Centrifugar a 10000 rpm 1' (es forma un pellet blanc en el fons del tub).
- Recollir el sobrenedant (on hi ha l'ARN) en un tub nou i congelar a -80°C.

4.2.2.4- Retrotranscripció

El procés de retrotranscripció va ser realitzat segons el protocol descrit per a la retrotranscriptasa MMLV (veure apartat 4.1.7.1). No obstant, a causa de la poca quantitat i l'estat de degradació de l'ARN procedent de mostres parafinades, aquest no va ser quantificat i es va assumir que s'havia d'afegir el màxim possible permès en la RT (10 μ L d'ARN per a cada mostra). El producte de PCR va ser diluït de forma homogènia en 100 μ L d'H₂O lliure en RNases i es van usar 2,5 μ L de dilució en l'anàlisi per qRT-PCR.

Pel contrari, el calibrador (*Human Reference RNA*; Stratagene) va ser quantificat i afegit de la mateixa manera que es va fer en l'apartat 4.1.7.1,

4.2.2.5- Anàlisi de l'expressió per qRT-PCR

L'anàlisi es va realitzar seguint la mateixa metodologia que s'ha descrit en l'apartat 4.1.7.2. utilitzant, de la mateixa manera, la β -actina i el 18S com a controls endògens o *housekeeping* i el calibrador *Human Reference RNA* (Stratagene).

A causa de la necessitat que totes les mostres fossin comparables entre elles i la impossibilitat que fossin analitzades en una mateixa placa, es va calcular per al calibrador (del qual sempre s'afegia la mateixa quantitat perquè aquesta havia pogut ser determinada) la recta de regressió de la ΔC_t ($C_{t_{\text{gen problema}}} - C_{t_{\text{endògens}}}$) per a cada un dels gens analitzats i es va comprovar que la variació interplaca d'aquest era acceptable ($m < 0,2$).

4.2.2.6- Correlació amb els paràmetres clínics

Per a portar a terme aquesta anàlisi, es va utilitzar el paquet estadístic *SPSS 12.0*.

Per a cada una de les variables qualitatives es van calcular les freqüències en la cohort d'individus estudiats i els estadístics descriptius (mitja, mediana i percentils) per a les quantitatives. Els gens van ser analitzats com a marcadors independents i de forma individual. L'expressió en els pacients de cada un dels gens va ser classificada en dos grups (alta i baixa expressió), realitzant diferents anàlisis utilitzant diferents punts de tall:

1. Mediana \rightarrow punt de tall = percentil 50
 - on < 50 = grup de baixa expressió
 - > 50 = grup d'alta expressió

2. Tercils: 1er vs 2on i 3er tercil → punt de tall = percentil 33
 on <33 = grup de baixa expressió
 >33 = grup d'alta expressió
- 1er i 2on vs 3er tercil → punt de tall = percentil 66
 on <66 = grup de baixa expressió
 >66 = grup d'alta expressió

4.2.2.6.1- RESPOSTA AL TRACTAMENT

Es va estudiar la relació entre la resposta a la quimioteràpia en primera línia i l'expressió de cada un dels gens. La valoració d'aquest paràmetre es va realitzar seguint els criteris RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumours*) (166). Les respostes es van agrupar en **Resposta** quan el pacient experimentava una resposta completa o parcial i en **No Resposta** en el cas que fos una estabilització o una progressió de la malaltia. L'anàlisi multivariada es va realitzar mitjançant la creació d'una taula de contingència (taula 4.2) que posteriorment es va sotmetre al test d'hipòtesi Txi-quadrat (significació estadística: p-valor<0,05).

En el cas que s'obtinguin resultats estadísticament significatius en l'anàlisi univariada i amb la finalitat d'aïllar grups de variables (edat, sexe,...) que poguessin també influir en la resposta, es realitzarà una anàlisi multivariada segons el model de regressió logística per a la resposta.

			Resposta a 5FU/L-OHP		Total
			Resposta (R)	No Resposta (NR)	
Expressió del gen	<mediana	Nº pacients	13	9	22
		% nº pacients	52,0%	48,0%	100,0%
	>mediana	Nº pacients	12	10	22
		% nº pacients	47,4%	52,6%	100,0%
Total		Nº pacients	25	19	44
		% nº pacients	56,8%	43,2%	100,0%

Taula 4.2: Exemple d'una taula de contingència per a analitzar la resposta al tractament amb oxaliplatí en relació amb l'expressió d'un gen, utilitzant com a punt de tall el valor de la mediana. El grup de resposta (R) engloba les respostes completes i parcials i el grup de no resposta (NR), les progressions i estabilitzacions. En el grup de baixa expressió (<mediana), 13 pacients (52%) responen al tractament respecte 9 (48%) que no responen. En el grup d'expressió alta (>mediana), 12 i 10 pacients responen i no responen respectivament. Les diferències entre les freqüències observada i esperada són calculades mitjançant la funció Txi-Quadrat.

4.2.2.6.2- ANÀLISI DEL TEMPS A LA PROGRESSIÓ

El temps a la progressió (TP) és el temps transcorregut entre l'inici del tractament i la progressió de la malaltia. Va ser la variable de supervivència analitzada en aquest estudi ja que l'interès era veure com afectava l'expressió d'aquests gens al tractament en 1^a línia amb oxaliplatí, i no a la supervivència global de la població. Per a estudiar aquesta variable en relació amb l'expressió dels gens analitzats, es va realitzar una anàlisi univariada seguint el model de les corbes de supervivència de Kaplan-Meier (figura 4.15). Per a la comparació de les corbes de supervivència es va utilitzar la prova LogRank (significació estadística: $p < 0,05$).

En el cas que s'obtinguin resultats estadísticament significatius en l'anàlisi univariada i amb la finalitat d'aïllar grups de variables (edat, sexe,...) que poguessin també influir en el temps a la progressió, es realitzarà una anàlisi multivariada segons el model de regressió múltiple de Cox.

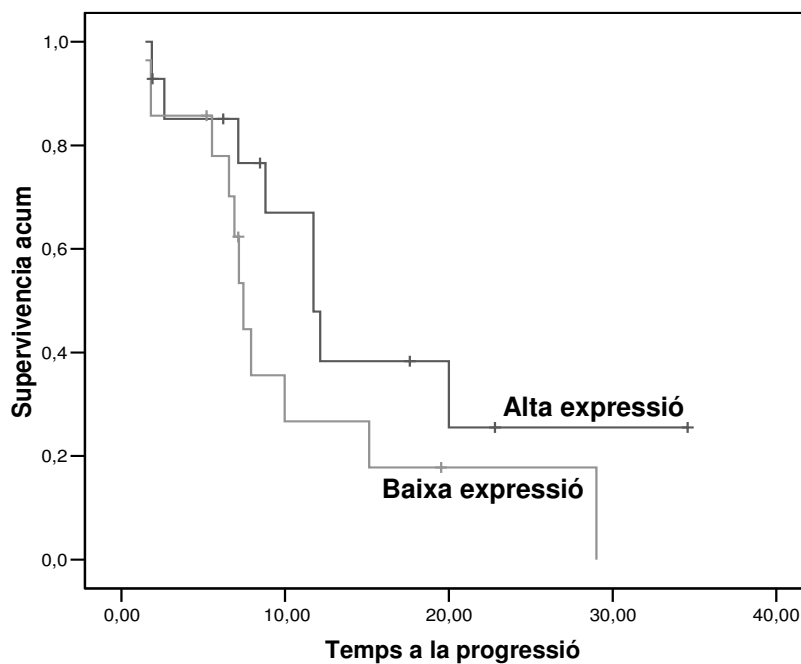


Figura 4.15: Exemple de la representació gràfica del temps a la progressió associat a l'expressió d'un gen, segons el model de Kaplan Meyer. En aquest cas, el grup de pacients amb alta expressió del gen tindria una millor mediana per al TP (en mesos) que el grup amb baixa expressió del gen. La diferència es mesura amb el test LogRank ($p < 0,05$).



Resultats

5. RESULTATS

5.1 OBJECTIU 1

Anàlisi i determinació de gens responsables de l'adquisició de resistència a oxaliplatí.

5.1.1- Adquisició de resistència a oxaliplatí

Les línies resistents a oxaliplatí HTOXAR3, LoVOXAR3, DLDOXAR3 i LSOXAR3 van ser aïllades després de 10 mesos d'exposició continuada de les seves línies parentals sensibles HT29, LoVo, DLD1 i LS513 a l'oxaliplatí. Les sublínies resistents eren estables, ja que mantenen el grau de resistència al ser testades després d'estar un mes en cultiu en medi lliure de fàrmac. A la figura 5.1, es mostra la representació gràfica del grau de resistència assolit. El llistat de IC's obtingudes per cada línia cel.lular i els graus de resistència adquirida a oxaliplatí es mostren a la taula 5.1.

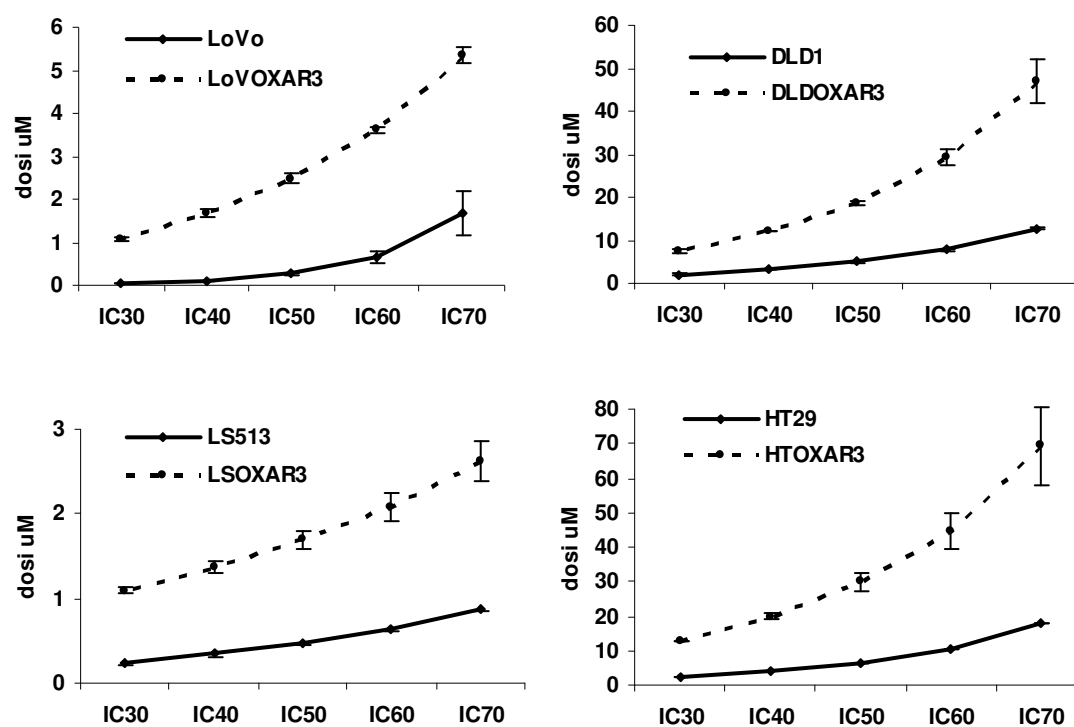


Figura 5.1: Representació gràfica del grau de resistència a l'oxaliplatí adquirit per part de les sublínies resistents respecte les línies parentals (sensibles). En el gràfic, són representades de la IC30 a la IC70 i les seves desviacions estàndard (les IC's dels extrems presenten massa dispersió i han estat obviades).

	Dosi (μM) LoVo	Dosi (μM) LoVOXAR3	GRAU RESISTÈNCIA
IC90	21,59 \pm 3,46	22,74 \pm 3,46	1,05
IC80	4,43 \pm 0,81	10,79 \pm 0,81	2,44
IC70	1,69 \pm 0,51	5,35 \pm 0,20	3,17
IC60	0,65 \pm 0,12	3,62 \pm 0,06	5,55
IC50	0,26 \pm 0,02	2,48 \pm 0,12	9,39
IC40	0,09 \pm 0,02	1,68 \pm 0,09	17,59
IC30	0,04 \pm 0,01	1,07 \pm 0,03	24,79
IC20	0,02 \pm 0,006	0,57 \pm 0,06	36,77
IC10	0,01 \pm 0,001	0,26 \pm 0,04	26,92
	Dosi (μM) DLD1	Dosi (μM) DLDOXAR3	GRAU RESISTÈNCIA
IC90	54,44 \pm 2,13	204,17 \pm 48,78	3,75
IC80	22,64 \pm 0,18	84,42 \pm 13,60	3,73
IC70	12,63 \pm 0,15	47,02 \pm 5,12	3,72
IC60	7,83 \pm 0,23	29,13 \pm 1,91	3,72
IC50	5,05 \pm 0,22	18,79 \pm 0,49	3,72
IC40	3,26 \pm 0,19	12,12 \pm 0,17	3,72
IC30	2,02 \pm 0,15	7,53 \pm 0,43	3,72
IC20	1,13 \pm 0,11	4,22 \pm 0,46	3,73
IC10	0,47 \pm 0,06	1,77 \pm 0,33	3,75
	Dosi (μM) LS513	Dosi (μM) LSOXAR3	GRAU RESISTÈNCIA
IC90	2,46 \pm 0,38	5,25 \pm 0,73	2,13
IC80	1,33 \pm 0,10	3,46 \pm 0,38	2,60
IC70	0,88 \pm 0,02	2,62 \pm 0,24	2,96
IC60	0,63 \pm 0,01	2,08 \pm 0,16	3,29
IC50	0,46 \pm 0,03	1,69 \pm 0,10	3,63
IC40	0,34 \pm 0,03	1,37 \pm 0,06	4,00
IC30	0,25 \pm 0,03	1,09 \pm 0,03	4,43
IC20	0,16 \pm 0,03	0,83 \pm 0,01	5,03
IC10	0,09 \pm 0,02	0,55 \pm 0,01	6,07
	Dosi (μM) HT29	Dosi (μM) HTOXAR3	GRAU RESISTÈNCIA
IC90	96,43 \pm 4,78	267,82 \pm 79,23	2,88
IC80	34,77 \pm 0,87	118,85 \pm 25,74	3,42
IC70	18,07 \pm 0,14	69,38 \pm 11,31	3,84
IC60	10,57 \pm 0,07	44,68 \pm 5,31	4,22
IC50	6,46 \pm 0,13	29,86 \pm 2,33	4,62
IC40	3,95 \pm 0,13	19,97 \pm 0,74	5,05
IC30	2,31 \pm 0,11	12,90 \pm 0,10	5,57
IC20	1,20 \pm 0,07	7,58 \pm 0,47	6,29
IC10	0,45 \pm 0,04	3,41 \pm 0,49	7,57

Taula 5.1: Taula representativa de les dosis inhibidores (IC) i el grau de resistència obtingut per a cada línia cel.lular sensible respecte la seva sublínia resistent, mitjançant l'anàlisi de citotoxicitat per MTT. Aquestes dosis (expressades en unitats $\mu\text{M} \pm$ desviació estàndard entre 3 experiments independents) corresponien a una exposició a oxaliplatí de 24h. El grau de resistència L'índex de resistència a la IC50 ($\text{IC50}_{\text{resistent}}/\text{IC50}_{\text{sensible}}$) va ser de quasi 10 vegades superior en LoVOXAR3 respecte LoVo, d'aproximadament 4 vegades en les línies DLDOXAR3 i LSOXAR3 i de 5 vegades en la línia HTOXAR3 respecte la seva línia parental.

El grau de resistència obtingut era dependent de línia i va oscil.lar entre 4 i 10 vegades de resistència a oxaliplatí en les línies resistents respecte les seves respectives línies parentals sensibles.

Per a comprovar la possible resistència creuada amb altres agents antineoplàsics, les línies sensibles i les resistents van ser sotmeses al tractament durant 24 hores amb cisplatí i SN38 (metabolit actiu del CPT11). Tal i com es descriu a la taula 5.2, les línies resistents a oxaliplatí no van mostrar resistència creuada a cap d'aquests dos fàrmacs i, per tant, podien ser usades com a model *in vitro* de resistència adquirida a oxaliplatí.

Línies cel.lulars	L-OHP (μM)		CDDP (μM)		SN38 (nM)	
	IC ₅₀ \pm SD*	IR**	IC ₅₀ \pm SD*	IR**	IC ₅₀ \pm SD*	IR**
HT29	6,46 \pm 0,13		4,70 \pm 0,60		9,68 \pm 0,07	
HTOXAR3	29,86 \pm 2,33	4,61 \pm 0,27	2,70 \pm 0,23	0,56 \pm 0,04	10,31 \pm 0,52	1,07 \pm 0,04
DLD1	5,05 \pm 0,22		2,87 \pm 0,09		6,62 \pm 0,26	
DLDOXAR3	18,79 \pm 0,49	3,72 \pm 0,26	3,27 \pm 0,06	1,14 \pm 0,06	8,15 \pm 1,67	1,23 \pm 0,20
LoVo	0,25 \pm 0,09		2,01 \pm 0,09		4,17 \pm 0,21	
LoVOXAR3	2,45 \pm 0,27	9,40 \pm 0,31	2,78 \pm 0,18	1,37 \pm 0,03	5,09 \pm 0,82	1,22 \pm 0,13
LS513	0,46 \pm 0,03		1,46 \pm 0,36		5,88 \pm 0,33	
LSOXAR3	1,69 \pm 0,10	3,63 \pm 0,42	0,82 \pm 0,14	0,57 \pm 0,04	5,09 \pm 0,82	0,58 \pm 0,04

Taula 5.2: Citotoxicitat i grau de resistència creuada a cisplatí i SN38 de les línies resistents a oxaliplatí respecte les sensibles, mitjançant el test colorimètric MTT. SD*: desviació estàndard entre 3 experiments independents. IR*: índex de resistència. Va ser calculat com el rati entre la IC50 de les línies resistents i les seves respectives sensibles.

5.1.2- Anàlisi d'expressió gènica per tecnologia microarray

Per a analitzar els nivells basals d'expressió de gens relacionats amb la resistència adquirida a oxaliplatí, les línies cel.lulars van ser classificades en 2 grups: línies parentals sensibles o **grup S** (HT29, LoVo, DLD1 i LS513) i sublínies derivades resistents o **grup R** (HTOXAR3, LoVOXAR3, DLDOXAR3 i LSOXAR3).

Després dels processos de quantificació de la imatge i de filtratge i normalització de les dades, 14244 gens dels 19200 que contenia el *slide* van ser analitzats mitjançant *Genesis 1.5.0*. Les diferències d'expressió gènica entre el grup S i el R van ser determinades mitjançant la funció ANOVA i 49 gens van mostrar canvis significatius entre grups ($p < 0,01$).

Al realitzar l'anàlisi per formació de *clusters* (grups de gens amb similitud d'expressió) aquests 49 gens s'agruparen en 4 grups o *clusters* dels quals 2 estaven relacionats amb un decrement de l'expressió en les línies resistents respecte les sensibles i 2 amb un increment d'expressió (figura 5.2). Per tant, aquests discriminaven perfectament entre els 2 grups (es va observar una agrupació de les línies sensibles entre elles i el mateix en el cas de les resistents) com es mostra en la figura 5.3.

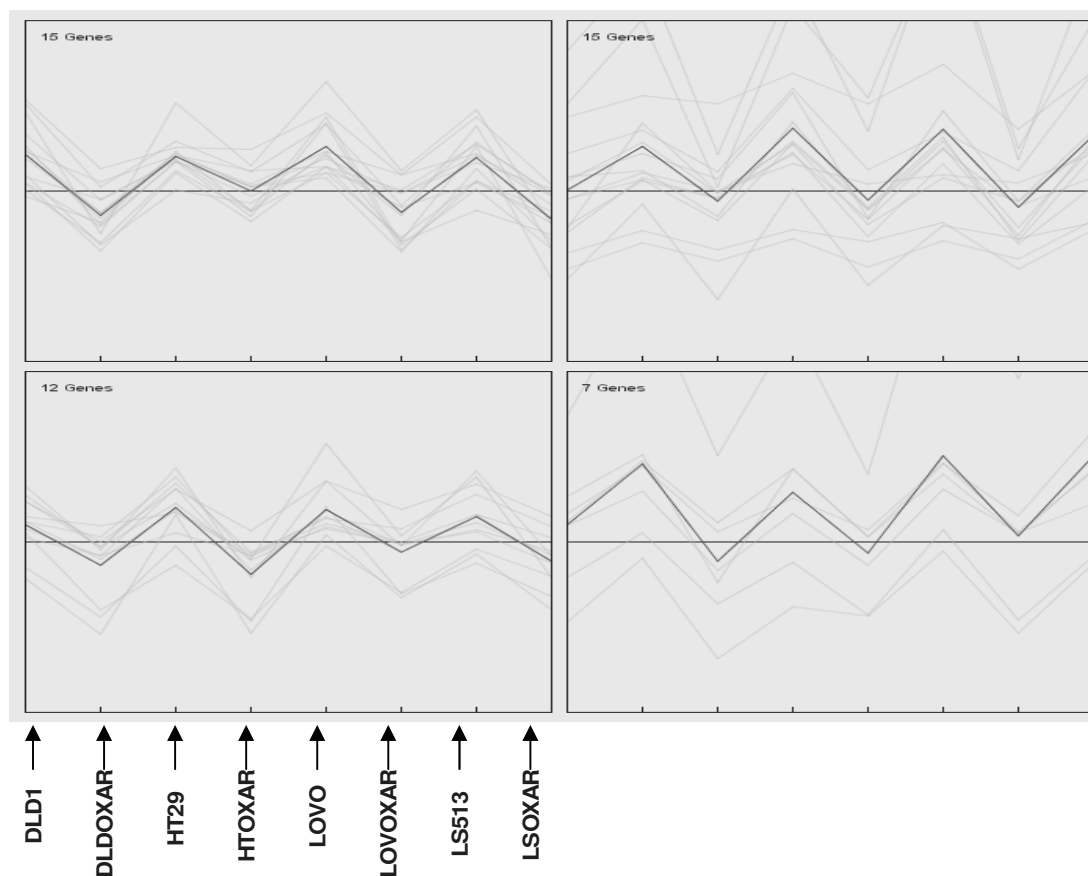


Figura 5.2: Representació gràfica de *clusters* segons la distància de Pearsons. Tenint en compte la distribució de les línies, es detecta que l'expressió dels gens, en tots els *clusters*, depèn de la condició de ser o no resistent, no de la línia. En els dos *clusters* de l'esquerra, es mostra un decrement de l'expressió en les línies resistents, al contrari que als de la dreta, on les línies sensibles presenten menys expressió.

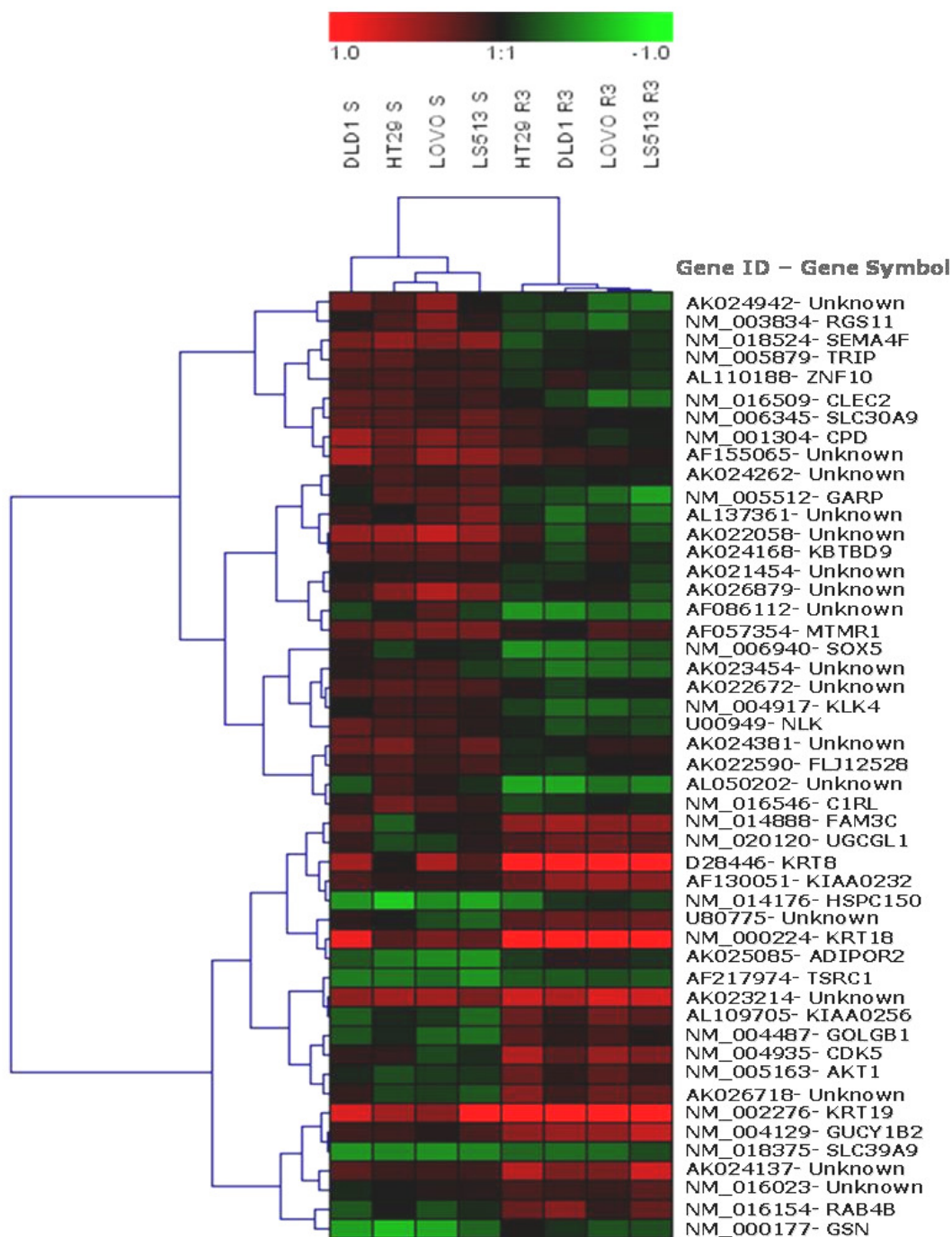


Figura 5.3: Representació del patró d'expressió gènica obtingut a través de l'anàlisi per *clustering* (*Genesis 1.5.0*: ANOVA $p < 0,01$; no *missing values*). Els 27 gens de la part superior del llistat, presentaren una expressió disminuïda en les línies resistents (verd), respecte les sensibles (vermell). Els 22 gens de la part inferior del llistat, en canvi, estaven sobreexpressats en les resistents. Les línies cel·lulars (part superior) van ser classificades pels gens segons resistència/sensibilitat a oxaliplatí. Per tant, aquests gens discriminaven entre els grups S i R.

A la part esquerra de l'imatge, apareix una representació de la proximitat de cada gen amb tots els altres gens del llistat, establint-se una relació jeràrquica entre ells (els gens estan ordenats per proximitat entre ells).

5.1.3- Identificació i selecció de gens

Després del procés d'identificació gènica, realitzat a partir de diferents cercadors de gens de la xarxa, 32 dels 49 gens van ser determinats (figura 5.3) mentre que 17 gens no van poder ser identificats i van ser descartats. D'aquests 32 gens, 15 presentaven una disminució i 17 un augment de l'expressió en el grup R respecte el S. La majoria d'aquests van poder ser classificats segons la seva ontologia, tal i com es mostra en la figura 5.4.

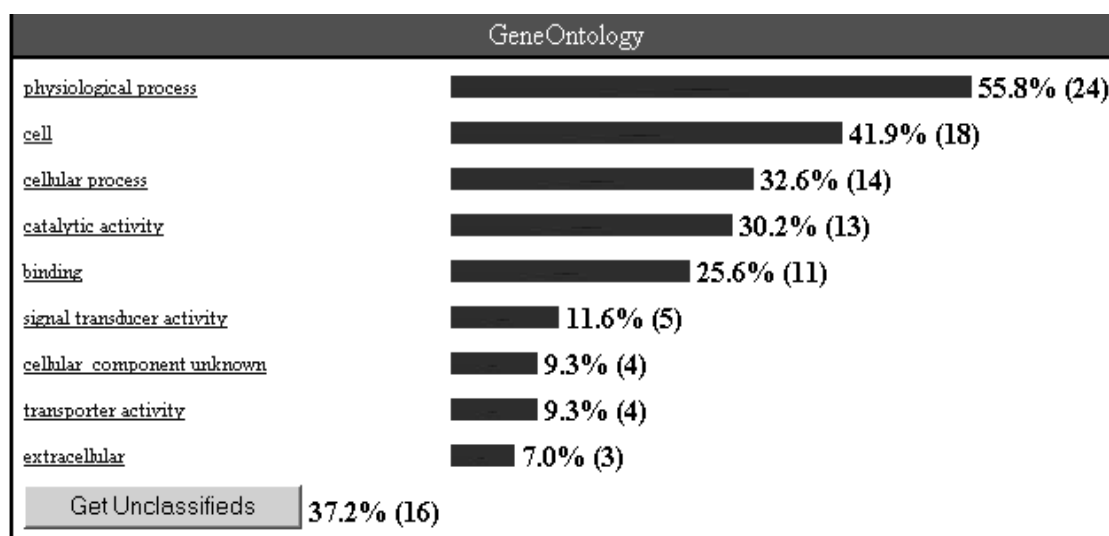


Figura 5.4: Classificació ontològica dels 32 gens identificats, mitjançant l'adreça d'internet <http://apps1.niaid.nih.gov/david/>. Cada gen va ser agrupat en una o més de les categories definides a la figura. La majoria d'aquests gens relacionats amb l'adquisició de resistència a oxaliplatí, estaven involucrats en processos fisiològics (55,8%) i d'integritat (41,9%) de la cèl.lula. Un 37% dels gens no van poder ser classificats.

Les sondes corresponents als 32 gens identificats van ser localitzades en el *slide* procedent del procés d'hibridació. Per a evitar els gens falsos positius identificats, es va portar a terme la hibridació per BLAT entre la seqüència del gen i de la seva corresponent sonda. Com a resultat, 26 gens van ser validats positivament (llistats a la taula 5.3) i 6 seqüències van ser reconegudes com a falses identificacions, les quals van ser descartades.

Nº accés GeneBank	Símbol del gen	Locus	Descripció
Decrement d'expressió en el grup resistent respecte el sensible			
NM_003834	RGS11	16p13.3	Activitat catalítica GTPasa
NM_018524	SEMA4F	2p13.3	Integritat cel.lular
NM_005879	TRIP	3p21.31	Inhidor NF- κ B TRAF2-depenent
AL110188	ZNF10	12q24.33	Supressor transcripcional
NM_001304	CPD	17p11.1	Activitat enzimàtica
NM_006345	SLC30A9	4p13-p12	Transportador d'ions metàl·lics
NM_005512	GARP	11q13.5	Proteïna membrana tipus I
AF057354	MTMR1	Xq28	Defosforilació aminoacídica
NM_006940	SOX5	12p12.1	Factor de transcripció
NM_004917	KLK4	19q13.41	Activitat catalítica
NM_016509	CLEC2	12p13.31	Regulació de citoquines
NM_016546	C1RL	12p13.31	Activitat catalítica
Increment d'expressió en el grup resistent respecte el sensible			
NM_020120	UGCL1	2q14.3	Activitat glucosiltransferasa
D28446	KRT8	12q13	Integritat cel.lular. Via JNK i p38
NM_014176	HSPC150	1q32.1	Activitat lligasa. Ubiquitinització
NM_000224	KRT18	12q13	Integritat cel.lular. Via JNK i p38
AF217974	TSRC1	1q21.2	Activitat metalopeptidasa
NM_004487	GOLGB1	3q13	Actua a l'aparell de Golgi
NM_004935	CDK5	7q36	Quinasa de cicle cel.lular
NM_005163	AKT1	14q32.32	Via PI3K. Proliferació cel.lular
NM_002276	KRT19	17q21.2	Integritat cel.lular
NM_004129	GUCY1B2	13q14.2	Enzim. Metabolisme purines
NM_018375	SLC39A9	14q24.1	Transport d'ions metàl·lics
NM_016154	RAB4B	19q13.2	Transport de proteïnes
NM_000177	GSN	9q33	Actua sobre el citoesquelet
AK025055	ADIPOR2	12q13.31	Actua en metabolisme lipídic

Taula 5.3: Llistat dels 26 gens seleccionats després del procés d'identificació i de validació mitjançant hibridació per BLAT. El decrement de l'expressió dels 12 primers gens i l'increment de l'expressió dels 14 segons es relacionaria amb l'adquisició de resistència a oxaliplatí.

Aquests 26 gens van ser sotmesos a la resta de criteris de selecció (definitos a l'apartat 4.1.6.2 de la secció *Material i Mètodes*): homologia d'expressió intragrup, nivell d'implicació coneguda en l'acció dels platins i la resistència a fàrmacs, accessibilitat de *Taqman*[®] *expression assays* adequats per a la posterior validació per qRT-PCR, tant *in vitro* com *in vivo* (en teixit parafinat). Segons l'aplicació d'aquests criteris, 12 d'aquests 26 gens van ser seleccionats per a ser analitzats mitjançant qRT-PCR, ja que van ser els que es van ajustar millor a tots els criteris de selecció descrits. El pannel de gens estava format per 6 gens amb expressió augmentada (AKT1, CDK5, GOLGB1, GUCY1B2, RAB4B i UGCGL1) i 6 amb decrement d'expressió (CPD, GARP, RGS11, SEMA4F, SOX5 i TRIP) en el grup resistent respecte el sensible.

5.1.4- Validació de l'expressió gènica per qRT-PCR

L'expressió del pannel de 12 gens escollits va ser analitzada a les 8 línies cel.lulars per qRT-PCR. Els *Taqman*[®] *gene expression assays* escollits per a aquests gens van ser:

CDP - Hs00154566_m1	RGS11 - Hs00358686_m1
GUCY1B2 - Hs00188041_m1	GOLGB1 - Hs00189566_m1
CDK5 - Hs00358991_g1	AKT1 - Hs00178289_m1
GARP - Hs00194136_m1	TRIP - HS00183394_m1
SOX5 - Hs00753050_s1	RAB4B - Hs00535053_m1
SEMA4F - Hs00188642_m1	UGCGL1 - Hs00219941_m1

Onze dels gens van poder ser avaluats: SOX5 va haver de ser descartat a causa de la impossibilitat de detectar la seva expressió amb fiabilitat mitjançant aquesta tècnica per problemes metodològics (detecció de l'expressió no reproduïble, ja que apareixia en cicles molt elevats).

Finalitzat l'anàlisi estadística i seguint els criteris de validació descrits en l'apartat 4.1.7.3 de la secció *Material i Mètodes*, 6 dels 11 gens analitzats van ser validats positivament (taula 5.4).

Segons els criteris de validació establerts, els gens seleccionats havien de ser validats positivament almenys per un dels 2 tests:

- Segons el test dels signes de Wilcoxon: 4 gens (AKT1, CDK5, RGS11 i GARP) van mostrar canvis d'expressió significatius entre el grup R i el S. TRIP va mostrar canvis però no assolien la significació.
- Segons la correlació per Rho-Spearman: 5 gens (AKT1, CDK5, RGS11, TRIP i UGCGL1) van mostrar una bona correlació entre els resultats obtinguts per qRT-PCR i per microarrays d'ADNc. GARP també va mostrar correlació ($R > 0,5$), encara que el p-valor no arribava a la significació estadística.
- Els altres gens (CDP, GOLGB1, GUCY1B2, RAB4B i SEMA4F) no van complir cap dels 2 tests utilitzats i van ser descartats.

Anàlisi estadística dels resultats de qRT-PCR			
Gens	Test dels signes de Wilcoxon	Correlació Rho-Spearman	
	p-valor	R	p-valor
AKT1	0,01	0,83	0,04
CDK5	0,02	0,89	0,007
CPD	0,43	-0,33	0,42
GARP	0,01	0,68	0,14
GOLGB1	0,76	-0,38	0,35
GUCY1B2	0,23	0,44	0,27
RAB4B	0,10	-0,47	0,24
RGS11	0,006	0,73	0,04
SEMA4F	0,23	0,29	0,47
SOX5	no dades	no dades	no dades
TRIP	0,09	0,89	0,02
UGCGL1	0,23	0,89	0,02

Taula 5.4: Anàlisi estadística dels 12 gens seleccionats. Els resultats obtinguts en l'anàlisi per qRT-PCR van ser analitzats mitjançant el test dels signes de Wilcoxon (validació positiva: $p < 0,05$) i correlacionats amb els resultats obtinguts en l'anàlisi per microarrays per Rho-Spearman (validació positiva: $R > 0,5$ amb $p < 0,05$).

Resumint els resultats obtinguts, el decrement de l'expressió de GARP (*Glycoprotein A repetitions predominant*), RGS11 (*Regulator G-protein signal 11*) i TRIP (*TRAF interacting protein*), i l'augment de l'expressió de CDK5 (*Cyclin-dependent kinase 5*), AKT1 (*v-Akt murine thymoma viral oncogene*) i UGCGL1 (*UDP-glucose ceramide glucosyltransferase like 1*) es relacionen amb l'adquisició de resistència a oxaliplatí en el model *in vitro* de resistència adquirida al fàrmac.

5.2 OBJECTIU 2

Anàlisi i determinació de gens relacionats amb la sensibilitat i la resposta a oxaliplatí.

5.2.1- Sensibilitat i capacitat de resposta a oxaliplatí

Mitjançant l'assaig de citotoxicitat MTT es van determinar les IC's a 24h d'oxaliplatí per a cada una de les 14 línies cel.lulars de CCR estudiades (taula 5.5). A partir del valor de IC50, es van establir els 2 grups experimentals que formaven el model *in vitro* de sensibilitat al fàrmac, tal i com es mostra en la figura 5.5. Es va triar 1µM com a punt de tall entre el grup de BAIXA (alta IC50) i d'ALTA (baixa IC50) sensibilitat a oxaliplatí, ja que separava els grups de forma coherent i homogènia (6 i 8 línies respectivament).

IC (±sd)	LÍNIA CEL.LULAR						
	HT29	CACO2	DLD1	HCT5	HCT116	LS411N	SW948
IC90	96,43 ± 4,78	49,46±33,69	54,44 ± 2,13	14,96±0,71	9,28±3,24	29,16±9,35	74,51±30,81
IC80	34,77 ± 0,87	15,79±7,19	22,64 ± 0,18	7,01±0,35	4,21±0,84	9,89±2,18	18,02±3,79
IC70	18,07 ± 0,14	7,52±2,17	12,63 ± 0,15	4,23±0,22	2,51±0,24	4,85±0,71	7,10±0,5
IC60	10,57 ± 0,07	4,15±0,60	7,83 ± 0,23	2,80±0,15	1,65±0,02	2,71±0,23	3,33±0,15
IC50	6,46 ± 0,13	2,42±0,02	5,05 ± 0,22	1,92±0,10	1,12±0,07	1,59±0,05	1,68±0,26
IC40	3,95 ± 0,13	1,43±0,18	3,26 ± 0,19	1,31±0,07	0,77±0,11	0,94±0,05	0,85±0,22
IC30	2,31 ± 0,11	0,81±0,22	2,02 ± 0,15	0,87±0,05	0,51±0,12	0,53±0,06	0,41±0,15
IC20	1,20 ± 0,07	0,41±0,18	1,13 ± 0,11	0,52±0,03	0,31±0,10	0,26±0,05	0,17±0,08
IC10	0,45 ± 0,04	0,15±0,10	0,47 ± 0,06	0,25±0,02	0,15±0,07	0,09±0,03	0,04±0,03
	SW480	LOVO	LS513	LS174T	SW48	SW1116	SW1417
IC90	18,52±0,48	21,59 ± 3,46	2,46±0,38	3,49±0,18	2,48±0,99	1,54±0,11	0,96±0,03
IC80	8,64±0,43	4,43 ± 0,81	1,33±0,10	1,43±0,06	1,11±0,45	0,81±0,07	0,61±0,03
IC70	5,21±0,34	1,69 ± 0,51	0,88±0,02	0,79±0,02	0,65±0,27	0,53±0,05	0,45±0,02
IC60	3,44±0,27	0,65 ± 0,12	0,63±0,01	0,49±0,02	0,42±0,18	0,37±0,04	0,35±0,02
IC50	2,35±0,21	0,26 ± 0,02	0,46±0,03	0,31±0,01	0,28±0,12	0,27±0,03	0,28±0,02
IC40	1,61±0,16	0,09 ± 0,02	0,34±0,03	0,20±0,00	0,19±0,08	0,19±0,02	0,22±0,02
IC30	1,06±0,12	0,04 ± 0,01	0,25±0,03	0,12±0,00	0,12±0,05	0,14±0,02	0,17±0,01
IC20	0,64±0,08	0,02 ± 0,006	0,16±0,03	0,07±0,00	0,07±0,03	0,09±0,01	0,13±0,01
IC10	0,30±0,05	0,01 ± 0,001	0,09±0,02	0,03±0,00	0,03±0,01	0,05±0,01	0,08±0,01

Taula 5.5: Valors de les dosis inhibidores (IC's) en les diferents línies estudiades. Les exposicions a oxaliplatí van ser de 24h i, després d'un temps de recuperació de 72h, les IC's van ser determinades pel test colorimètric MTT. Les dosis estan expressades en IC (µM) ± SD (desviació estàndard de 3 experiments independents).

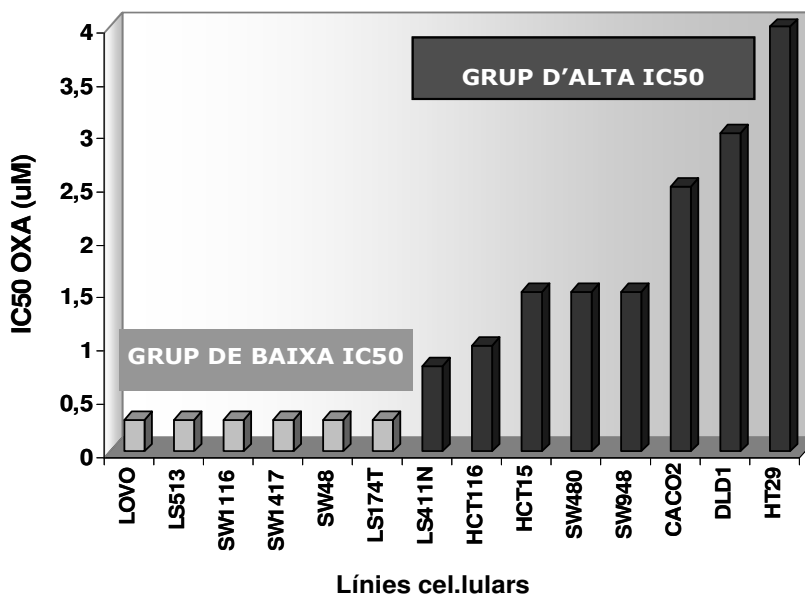


Figura 5.5: Gràfic representatiu de cada línia cel.lular i la seva IC50 (expressada en unitats μM) a oxaliplatí. Les 14 línies cel.lulars van ser classificades en funció de la seva IC50 al fàrmac: grup de BAIXA IC50 o ALTA sensibilitat (IC50 inferior a $1\mu\text{M}$; representat en gris clar) i grup d'ALTA IC50 o BAIXA sensibilitat (IC50 igual o superior a $1\mu\text{M}$; representat en gris fosc).

Posteriorment, cada una de les línies va ser tractada amb el fàrmac a la seva IC50 a 24h per a poder determinar la capacitat de resposta a oxaliplatí en l'anàlisi per microarrays d'ADNc. Les 6 línies cel.lulars que formaven el grup d'ALTA sensibilitat al fàrmac presentaven valors de IC50 similars (d'entre 0,2 i $0,5\mu\text{M}$). En canvi, en el grup de BAIXA sensibilitat els valors eren més dispersos (entre 1 i $7\mu\text{M}$).

5.2.2- Anàlisi d'expressió gènica per tecnologia microarray

Es va establir una relació entre els valors d'expressió obtinguts per a cada línia cel.lular en condicions de tractament amb oxaliplatí i condicions basals a partir del $\log\text{Rati}$ (tractada/control). Les dades van ser introduïdes i analitzades en aquest format amb el programa *Genesis 1.5.0*. Mitjançant l'anàlisi per ANOVA i per *clustering*, es van determinar 71 gens que discriminaven entre els grups experimentals $\log\text{Rati}(T/C)$ ALTA i $\log\text{Rati}(T/C)$ BAIXA sensibilitat al fàrmac (figura 5.6).

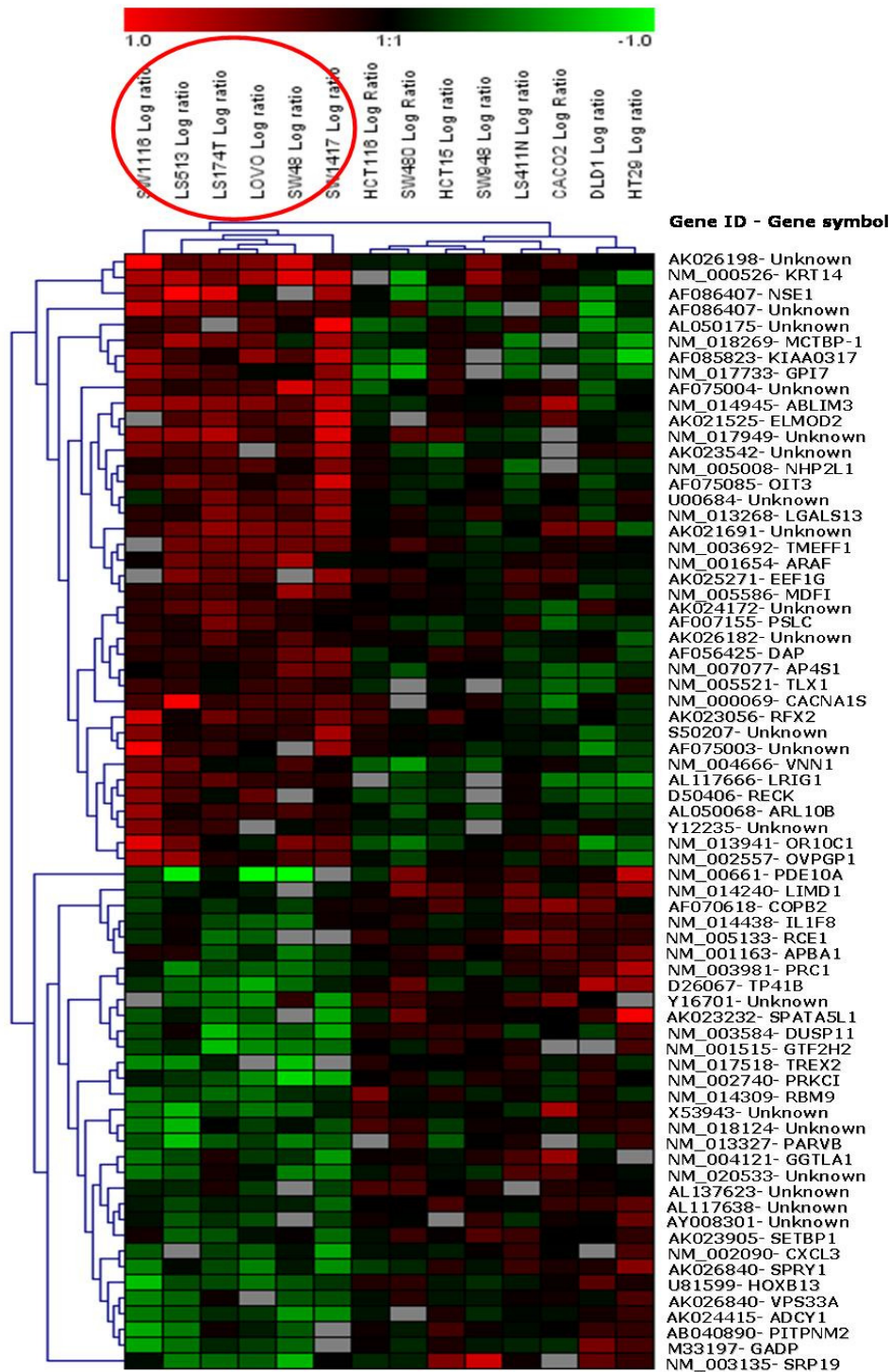


Figura 5.6: Representació del patró d'expressió gènica (71 gens) obtingut a partir de l'anàlisi per microarrays d'expressió per ADNc (*Genesis 1.5.0*: ANOVA $p < 0,01$; missing values ≤ 2). A la part superior, es representa, per a cada línia cel.lular, la funció logRati entre la línia en la condició de tractament amb oxaliplatí i la condició basal, i es comparen les línies d'ALTA sensibilitat al fàrmac (o IC50baixa; marcades amb un cercle vermell) amb les de BAIXA sensibilitat (o IC50alta). Els 39 primers gens del llistat presentaren una expressió disminuïda (en verd) en les línies de BAIXA respecte les d'ALTA sensibilitat al ser tractades amb oxaliplatí i els 32 gens restants, es comportaven de manera contrària.

5.2.3- Identificació i selecció de gens

Mitjançant diferents cercadors d'internet (apartat 4.1.6.1 de la secció *Material i Mètodes*), 51 dels 71 gens van poder ser identificats (figura 5.6) i la resta van ser descartats. Aquests 51 gens van ser classificats per ontologia: la majoria estaven relacionats amb vies de transducció de senyals i no coincidien amb els gens determinats a partir del model de resistència adquirida, que majoritàriament es relacionaven amb processos fisiològics i d'integritat cel.lular (figura 5.7). Tenint en compte aquests resultats, es podria considerar que l'adquisició de resistència a oxaliplatí estaria provocada per l'alteració de gens que difereixen dels responsables de la capacitat de resposta cel.lular davant el tractament amb el fàrmac.

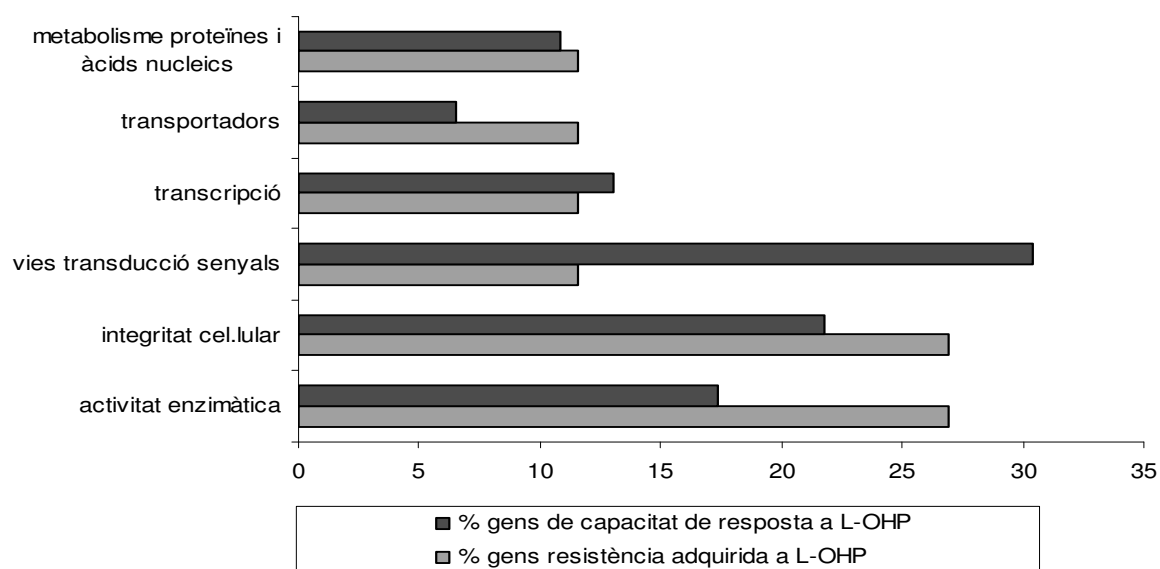


Figura 5.7: Representació gràfica de la classificació ontològica dels 51 gens relacionats amb la capacitat de resposta a oxaliplatí (en gris fosc) i comparació amb la dels gens obtinguts en el perfil d'expressió de resistència adquirida (en gris clar).

Les seqüències de les sondes corresponents als gens identificats van ser localitzades al *slide* i, després de portar a terme la hibridació per BLAT, es van seleccionar com a vàlids 37 gens, que van ser sotmesos a la resta de criteris de selecció (apartat 4.1.6.2, secció *Material i mètodes*). Finalment, 12 gens van ser seleccionats per ser validats mitjançant qRT-PCR (taula 5.6).

Nº accés GeneBank	Símbol del gen	Locus	Descripció
Decrement logRati(T/C) en el grup d'ALTA respecte el de BAIXA sensibilitat a L-OHP			
NM_006661	PDE10A	6q27	Metabolisme de les purines
NM_003981	PRC1	15q26.1	Procés de citocinesi
NM_003584	DUSP11	2p13.1	Inhibició via MAPK
NM_004121	GGTLA1	22q11.23	Metabolisme del glutatió
AK026840	VPS33A	12q24.31	Transport proteïnes i exocitosi
AK024415	ADCY1	7p13	Metabolisme de purines i calci
Increment logRati(T/C) en el grup d'ALTA respecte el de BAIXA sensibilitat a L-OHP			
NM_014945	ABLIM3	5q32	Integritat cel.lular
NM_001654	ARAF	Xp11.3	vies MAPK i fosfatidilinositol
NM_001515	GTF2H2	5q13.2	Factors de transcripció
NM_005521	TLX1	10q24.31	Regulació procés de transcripció
NM_000069	CACNA1S	1q32.1	Transducció senyals calci
NM_004666	VNN1	6q23.2	Activitat metabòlica

Taula 5.6: Gens relacionats amb la capacitat de resposta al tractament amb L-OHP, seleccionats per a ser validats per qRT-PCR. L'expressió gènica en relació amb la capacitat de resposta al fàrmac ha estat valorada segons el decrement o l'increment dels valors de la logRati (T/C) d'un grup respecte l'altre.

5.2.4- Validació de l'expressió per qRT-PCR

L'expressió del pannel dels 12 gens escollits va ser analitzada a les 14 línies cel.lulars, tant en condicions de tractament amb L-OHP 24h com en estat basal (control). Sis d'aquests gens (PDE10A, GGTLA1, ADCY1, CACNA1S, TLX1 i VNN1) no van poder ser analitzats per problemes metodològics (la seva expressió era indetectable o la seva detecció no era reproducible, ja que apareixia en cicles molt elevats). Per als 6 gens analitzats correctament (VPS33A, PRC1, DUSP11, ARAF, ABLIM3 i GTF2H2), es va calcular el valor d'expressió $2^{-\Delta\Delta Ct}$ per a cada línia cel.lular, establint una relació entre les dues condicions experimentals (logRati tractada/control). Els *Taqman*[®] *expression assays* usats per a cada un d'aquests gens van ser:

ADCY1 - Hs00299832_m1	PRC1 - Hs00187740_m1
VPS33A - Hs00224777_m1	GGTLA1 - Hs00269779_m1
CACNA1S - Hs00163885_m1	VNN1 - Hs00190582_m1
GTF2H2 - Hs00230979_m1	TLX1 - Hs00271457_m1
ARAF - Hs00176427_m1	PDE10A - Hs00198456_m1
DUSP11 - Hs00186058_m1	ABLIM3 - Hs00208949_m1

Els resultats obtinguts en l'anàlisi estadística d'aquests valors (apartat 4.1.7.3 de la secció *Material i Mètodes*) van ser els mostrats a continuació (taula 5.7):

Anàlisi estadística dels resultats de qRT-PCR (logRati T/C)				
Gens	Test U Mann-Whitney		Correlació Rho-Spearman	
	p-valor		R**	p-valor
PDE10A*	no dades		no dades	no dades
PRC1	0,09		0,57	0,043
DUSP11	0,23		0,74	0,004
GGTLA1*	no dades		no dades	no dades
VPS33A	0,001		0,82	0,013
ADCY1*	no dades		no dades	no dades
ABLIM3	0,41		-0,24	0,415
ARAF	0,94		0,82	0,023
GTF2H2	0,04		-0,76	0,007
TLX1	no dades		no dades	no dades
CACNA1S*	no dades		no dades	no dades
VNN1*	no dades		no dades	no dades

Taula 5.7: Anàlisi estadística dels 12 gens seleccionats. Els resultats obtinguts en l'anàlisi per qRT-PCR i transformats per a cada línia en logRati(T/C), van ser analitzats mitjançant el test U Mann-Whitney (validació positiva: $p < 0,05$) i correlacionats amb els resultats obtinguts en l'anàlisi per microarrays mitjançant el test Rho-Spearman (validació positiva: $R > 0,5$ amb $p < 0,05$). Només VPS33A i GTF2H2 van ser estadísticament significatius d'acord amb els 2 tests estadístics utilitzats (sombreat gris).

* Gens descartats per no poder ser analitzats de forma òptima.

** Coeficient de correlació de la funció Rho-Spearman.

- Segons el test U de Mann-Whitney: 2 gens (VPS33A i GTF2H2) van mostrar canvis d'expressió significatius entre el grup d'ALTA i BAIXA sensibilitat al fàrmac ($p < 0,05$). PRC1 va mostrar canvis però no assolien la significació.
- Segons la correlació per Rho-Spearman: 5 gens (VPS33A, PRC1, DUSP11, ARAF i GTF2H2) van mostrar una bona correlació entre els resultats obtinguts per qRT-PCR i per microarrays d'ADNc.
- Els gen ABLIM3 no va complir cap dels 2 tests utilitzats i va ser descartat.

Resumint els resultats obtinguts, 5 gens van ser validats positivament, ja que complien almenys un dels 2 tests de validació. No obstant això, VPS33A i GTF2H2 complien els 2 tests i van mostrar unes diferències molt evidents entre els 2 grups de sensibilitat i una correlació amb els resultats obtinguts per microarrays molt elevada.

Es va realitzar un anàlisi estadística addicional per a calcular les diferències entre la cèl.lula tractada i la control per a cada línia cel.lular en cada un dels 2 grups (ALTA i BAIXA sensibilitat), mitjançant el test dels signes de Wilcoxon per a dades dependents. Segons aquest test:

- **VPS33A** va mostrar un augment d'expressió significatiu a les cèl.lules tractades amb L-OHP respecte les control en els 2 grups de sensibilitat al fàrmac. Aquest augment era més evident en el grup de BAIXA (IC50 alta) que en el d'ALTA sensibilitat ($p = 0,02$ vs $p = 0,05$).
- **GTF2H2** disminuïa la seva expressió significativament davant el tractament amb L-OHP només en el grup de BAIXA sensibilitat (IC50 alta) al fàrmac ($p = 0,0001$). En l'altre grup, no hi havia diferències ($p = 0,9$).

Es van obtenir resultats similars en l'anàlisi del gen **DUSP11**: augment d'expressió significatiu davant el tractament en el grup de BAIXA sensibilitat ($p = 0,04$); no diferències en el d'ALTA sensibilitat ($p = 0,08$). Aquestes diferències no havien arribat a ser significatives en l'anàlisi per U Mann-Whitney per a discriminar entre els 2 grups de sensibilitat.

- **PRC1** i **ARAF** no van mostrar diferències entre les cèl.lules tractades i les control en cap dels 2 grups de sensibilitat a L-OHP.

En resum, davant el tractament amb oxaliplatí, es va produir un augment d'expressió dels gens VPS33A i DUSP11 i una decrement del gen GTF2H2 en el grup de cèl.lules de BAIXA sensibilitat. En el grup d'ALTA sensibilitat,

l'augment de VPS33A va ser marginalment significatiu ($p=0,05$), en menor grau que a l'altre grup. No es van detectar variacions en els gens PRC1 i ARAF.

5.3 **OBJECTIU 3**

Validació in vivo de l'expressió dels gens relacionats in vitro amb la resistència adquirida a oxaliplatí (obtinguts en l'objectiu 1) per a determinar el seu potencial com a marcadors de resistència a oxaliplatí.

5.3.1- Característiques clíniques dels pacients amb CCRm

Quaranta-quatre pacients dels 50 recollits van poder ser valorats segons els diferents paràmetres clínics descrits (resposta i temps a la progressió) i són els que van ser analitzats. Els altres 6 pacients van haver de ser descartats. Les característiques d'aquests, des del punt de vista clínic, són les mostrades a la taula 5.8.

Característiques dels pacients	
Factor	Nº pacients (%)
Edat (anys)	
<50	4 (9,1%)
(50-65)	23 (52,3%)
>65	17 (38,6%)
Sexe	
Home	24 (54,5%)
Dona	20 (45,5%)
Tumor primari	
Còlon	29 (65,9%)
Recte	13 (29,5%)
Còlon-recte	2 (4,5%)
Quimioteràpia de 1ª línia	
5FU+oxaliplatí	34 (77,3%)
Capecitabina+oxaliplatí	10 (22,7%)
Respostes	
Completa	10 (22,7%)
Parcial	15 (34,1%)
Estabilització	15 (34,1%)
Progressió	4 (9,1%)

Taula 5.8: Informació sobre els pacients amb CCRm recollits en la base de dades clínica per al posterior anàlisi d'expressió gènica per qRT-PCR. La població complia l'equilibri de Hardy-Weinberg.

5.3.2- Estadística descriptiva de les dades d'expressió

A partir de les dades d'expressió dels 6 gens seleccionats en l'apartat 5.1.4 (AKT1, TRIP, RGS11, CDK5, UGCGL1 i GARP) obtingudes en l'anàlisi per qRT-PCR en els 44 teixits parafinats, es van establir els punts de tall per a cada gen, amb l'objectiu de poder establir els grups necessaris per a portar a terme l'anàlisi estadística. Els pacients van ser dividits els 2 grups: ALTA o BAIXA expressió del gen. Els valors per a cada un dels punts de tall segons els quals es van separar els grups, van ser els mostrats a la taula 5.9.

Gens analitzats		AKT1	TRIP	RGS11	CDK5	UGCGL1	GARP
Nº pacients	Vàlids	44	44	44	44	44	44
	Perduts	0	0	0	0	0	0
Mitja		2,3830	3,2948	2,5889	1,6168	3,0532	42,7984
Mediana		2,3450	2,6500	1,8650	1,3200	2,2400	36,5450
Percentils (tercils)	33,33	1,8998	1,7900	1,0999	1,1399	1,6100	27,5694
	66,66	2,7599	3,9989	3,2700	1,8096	2,6797	47,3846

Taula 5.9: Estadístics descriptius de les dades d'expressió obtingudes per a cada gen en l'anàlisi per qRT-PCR de 44 teixits tumorals de CCRm. L'anàlisi estadística es va portar a terme de tres maneres diferents, utilitzant 3 punts de tall diferents: la mediana, el percentil 33 i el 66.

5.3.3- Anàlisi estadística de la resposta a oxaliplatí

Es va estudiar la relació entre l'expressió de cada gen i la resposta a la quimioteràpia basada en oxaliplatí. La variable categòrica *resposta* es va dividir en **Resposta**, quan els pacients van experimentar una resposta completa o parcial al tractament i **No resposta** quan es van estabilitzar o progressar.

La relació entre la resposta i l'expressió dels gens va ser analitzada mitjançant una taula de contingència i es van calcular les diferències entre grups utilitzant la funció Txi-quadrat, considerant que eren significatives quan el p-valor era inferior a 0,05. L'anàlisi es va portar a terme a partir de 3 punts de tall diferents : mediana (taula 5.10), 1er vs 2on i 3er tercil (taula 5.11), 1er i 2on vs 3er tercil (taula 5.12).

Anàlisi segons la mediana				
		%		Txi-quadrat p-valor
		RESPOSTA	NO RESPOSTA	
AKT1	Baixa expressió	59,1	40,9	0,76
	Alta expressió	54,5	45,5	
CDK5	Baixa expressió	63,6	36,4	0,36
	Alta expressió	50,0	50	
UGCGL1	Baixa expressió	59,1	40,9	0,76
	Alta expressió	54,5	45,5	
RGS11	Baixa expressió	73,7	26,3	0,09
	Alta expressió	47,4	52,6	
TRIP	Baixa expressió	59,1	40,9	0,76
	Alta expressió	54,5	45,5	
GARP	Baixa expressió	68,2	31,8	0,12
	Alta expressió	45,5	54,5	

Taula 5.10: Resultats de l'anàlisi estadística de la relació de cada un dels gens amb la resposta a la quimioteràpia basada en L-OHP. Els grups d'alta i baixa expressió estaven formats per 22 pacients cadascun, ja que el punt de tall va ser la mediana. Per a cada gen, el grup sombrejat en gris és el que s'esperaria que fos més resistent al tractament segons els resultats *in vitro*.

Anàlisi segons la comparació entre el 1er vs 2on i 3er tercil				
		%		Txi-quadrat p-valor
		RESPOSTA	NO RESPOSTA	
AKT1	Baixa expressió	66,7	33,3	0,34
	Alta expressió	51,7	48,3	
CDK5	Baixa expressió	66,7	33,3	0,34
	Alta expressió	51,7	48,3	
UGCGL1	Baixa expressió	60,0	40	0,75
	Alta expressió	55,2	44,8	
RGS11	Baixa expressió	61,5	38,5	0,92
	Alta expressió	60,0	40,0	
TRIP	Baixa expressió	68,8	31,3	0,22
	Alta expressió	50,0	50,0	
GARP	Baixa expressió	53,3	46,7	0,73
	Alta expressió	58,6	41,4	

Taula 5.11: Resultats de l'anàlisi estadística de la relació de cada un dels gens amb la resposta a la quimioteràpia basada en L-OHP. El grup de baixa expressió estava integrat per un 33% dels pacients (1er tercil), ja que el punt de tall va ser el percentil 33 de cada gen. Per a cada gen, el grup sombrejat en gris és el que s'esperaria que fos més resistent al tractament segons els resultats *in vitro*.

Anàlisi segons la comparació entre el 1er i 2on vs 3er tercil				
		%		Txi-quadrat p-valor
		RESPOSTA	NO RESPOSTA	
AKT1	Baixa expressió	56,7	43,3	0,97
	Alta expressió	57,1	42,9	
CDK5	Baixa expressió	53,3	46,7	0,49
	Alta expressió	64,3	35,7	
UGCGL1	Baixa expressió	51,6	48,4	0,28
	Alta expressió	69,2	30,8	
RGS11	Baixa expressió	69,2	30,8	0,10
	Alta expressió	41,7	58,3	
TRIP	Baixa expressió	50,0	50,0	0,18
	Alta expressió	71,4	28,6	
GARP	Baixa expressió	62,1	37,9	0,32
	Alta expressió	46,7	53,3	

Taula 5.12: Resultats de l'anàlisi estadística de la relació de cada un dels gens amb la resposta a la quimioteràpia basada en L-OHP. El grup d'alta expressió estava integrat per un 33% dels pacients (3er tercil), ja que el punt de tall va ser el percentil 66 de cada gen. Per a cada gen, el grup sombrejat en gris és el que s'esperaria que fos més resistent al tractament segons els resultats *in vitro*.

D'acord amb els resultats obtinguts *in vitro* (apartat 5.1.4), s'esperaria que una pitjor resposta al tractament basat en oxaliplatí estigués associada a:

- Baixa expressió de RGS11, TRIP i/o GARP
- Alta expressió de CDK5, AKT1 i/o UGCGL1

En l'anàlisi *in vivo* no es va trobar correlació entre els grups d'alta i baixa expressió en relació amb la resposta o no resposta al tractament en els gens estudiats (Txi-quadrat: $p > 0,05$ en tots els casos).

L'anàlisi per quartils (percentil 25, 50 i 75) i tercils per separat (<33, 33-66, >66) també va ser realitzat però no es va obtenir significació estadística i, a més, el número d'individus per grup que s'obtenien era molt reduït.

5.3.4- Anàlisi estadística del temps a la progressió

El temps transcorregut entre l'inici de tractament amb quimioteràpia basada en oxaliplatí i la progressió tumoral va ser calculat en mesos i es va establir la seva relació amb l'expressió de cada un dels gens estudiats mitjançant el model de corbes de supervivència de Kaplan-Meyer i la funció estadística logRank (diferències significatives entre grup d'alta i baixa expressió: $p < 0,05$). Els punts de tall utilitzats per dividir els grups d'expressió van ser

els mateixos que els utilitzats en l'anàlisi de la resposta i els resultats obtinguts es mostren en les taules 5.13 (mediana), 5.14 (1er vs 2on i 3er tercil) i 5.15 (1er i 2on vs 3er tercil).

Anàlisi segons la mediana				
		Temps a la progressió (TP)		
		MEDIANA (mesos)	IC 95%	LogRank p-valor
AKT1	Baixa expressió	11,73	4,95 - 18,52	0,97
	Alta expressió	10,34	7,91 - 12,77	
CDK5	Baixa expressió	8,10	0 - 18,72	0,80
	Alta expressió	10,34	8,08 - 12,60	
UGCGL1	Baixa expressió	8,81	1,52 - 16,10	0,83
	Alta expressió	10,34	7,54 - 13,14	
RGS11	Baixa expressió	7,93	6,02 - 9,83	0,87
	Alta expressió	10,44	8,93 - 11,96	
TRIP	Baixa expressió	14,66	0,17 - 29,15	0,26
	Alta expressió	9,97	6,39 - 13,54	
GARP	Baixa expressió	8,10	4,79 - 11,40	0,60
	Alta expressió	11,73	8,00 - 15,47	

Taula 5.13: Resultats obtinguts a partir de l'anàlisi de la relació entre el temps a la progressió (TP) i l'expressió gènica, utilitzant la mediana com a criteri d'agrupació. A la taula es mostra la mediana del TP en mesos, l'interval de confiança (IC) i el p-valor del test LogRank ($p < 0,05$). Per a cada gen, el grup sombrejat en gris és el que s'esperaria que fos més resistent al tractament segons els resultats *in vitro*.

Anàlisi segons la comparació entre el 1er vs 2on i 3er tercil				
		Temps a la progressió (TP)		
		MEDIANA (mesos)	IC 95%	LogRank p-valor
AKT1	Baixa expressió	11,13	3,41 - 20,06	0,29
	Alta expressió	8,81	5,96 - 11,66	
CDK5	Baixa expressió	14,66	0 - 29,39	0,72
	Alta expressió	9,97	7,22 - 12,71	
UGCGL1	Baixa expressió	8,81	0 - 18,55	0,51
	Alta expressió	10,34	7,03 - 13,65	
RGS11	Baixa expressió	7,45	6,27 - 8,63	0,73
	Alta expressió	10,44	8,92 - 11,97	
TRIP	Baixa expressió	18,23	4,51 - 31,95	0,13
	Alta expressió	8,81	5,76 - 11,86	
GARP	Baixa expressió	7,45	6,21 - 8,69	0,44
	Alta expressió	11,73	9,83 - 13,64	

Taula 5.14: Resultats de l'anàlisi de la relació entre el TP i l'expressió gènica, utilitzant el tercil 33 com a criteri d'agrupació. A la taula es mostra la mediana del TP en mesos, l'interval de confiança (IC) i el p-valor del test LogRank ($p < 0,05$). Per a cada gen, el grup sombrejat en gris és el que s'esperaria que fos més resistent al tractament segons els resultats *in vitro*.

Anàlisi segons la comparació entre el 1er i 2on vs 3er tercil				
		Temps a la progressió (TP)		
		MEDIANA (mesos)	IC 95%	LogRank p-valor
AKT1	Baixa expressió	10,44	6,13 - 14,75	0,69
	Alta expressió	9,97	5,54 - 14-39	
CDK5	Baixa expressió	8,81	5,19 - 12,43	0,80
	Alta expressió	10,44	8,88 - 12,00	
UGCGL1	Baixa expressió	8,10	2,87 - 13,32	0,62
	Alta expressió	10,44	9,76 - 11,12	
RGS11	Baixa expressió	8,81	0,58 - 17,04	0,13
	Alta expressió	9,97	6,16 - 13,78	
TRIP	Baixa expressió	10,44	5,60 - 15,29	0,77
	Alta expressió	9,97	5,54 - 14,39	
GARP	Baixa expressió	8,10	4,95- 11,24	0,13
	Alta expressió	11,73	9,64 - 13,83	

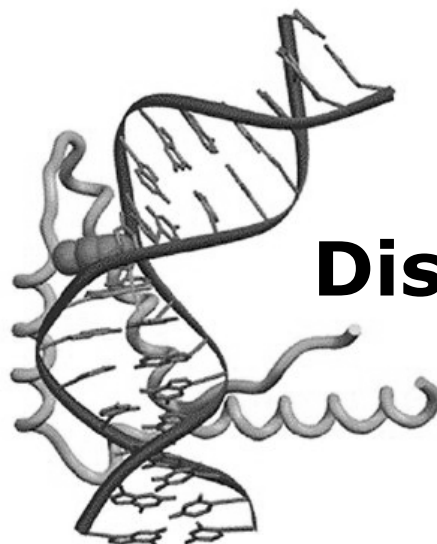
Taula 5.15: Resultats de l'anàlisi de la relació entre el TP i l'expressió gènica, utilitzant el tercil 66 com a criteri d'agrupació. A la taula es mostra la mediana del TP en mesos, l'interval de confiança (IC) i el p-valor del test LogRank ($p < 0,05$). Per a cada gen, el grup sombrejat en gris és el que s'esperaria que fos més resistent al tractament segons els resultats *in vitro*.

D'acord amb els resultats obtinguts *in vitro* (apartat 5.1.4), s'esperaria que un pitjor TP (més curt) de la malaltia estigués associat a:

- Baixa expressió de RGS11, TRIP i/o GARP
- Alta expressió de CDK5, AKT1 i/o UGCGL1

Resumint aquests resultats, en l'anàlisi *in vivo* no es van trobar correlació entre els grups d'alta i baixa expressió en relació amb el temps a la progressió en els gens estudiats (LogRank: $p > 0,05$ en tots els casos).

De la mateixa manera que en l'anàlisi de la resposta, l'anàlisi per quartils i terçils no agrupats també va ser portat a terme però no es va obtenir significació estadística.



Discussió

6. DISCUSSIÓ

L'adquisició de resistència a agents quimioteràpics és un dels principals problemes que apareixen al llarg del tractament de tots els tipus de tumors. Actualment, els mecanismes de resistència a oxaliplatí són poc coneguts ja que la majoria de treballs sobre mecanismes d'acció i resistència a agents platinats han estat dirigits a l'estudi del cisplatí (64, 76). Per aquesta raó, el present treball pretén ampliar el coneixement sobre el mecanisme d'acció i el desenvolupament de resistència a oxaliplatí en models cel·lulars *in vitro* de càncer colorrectal i una posterior validació en una sèrie de pacients diagnosticats per a aquesta malaltia i que han estat tractats amb quimioteràpia basada en oxaliplatí, amb l' d'establir el seu paper com a potencials marcadors de resistència al fàrmac, tenint en compte que el CCR és la segona causa de mort per càncer en els països desenvolupats (1).

La primera part d'aquest apartat pretén justificar la metodologia emprada en l'estudi i la segona part va dirigida a la discussió dels resultats obtinguts per a cada objectiu i una discussió general.

JUSTIFICACIÓ DE LA METODOLOGIA EMPRADA

Models cel·lulars

Els models cel·lulars utilitzats no han estat clonats , de la mateixa manera que en la majoria de treballs publicats basats en l'estudi de models *in vitro* mitjançant la tecnologia microarray (95, 113, 154). Encara que al no clonar les cèl·lules els canvis entre les diferents condicions experimentals puguin atenuar-se, els cultius cel·lulars mantenen la seva heterogeneïtat i s'obté un model més semblant a l'estat de les cèl·lules tumorals *in vivo*. En el model *in vitro* de resistència adquirida a oxaliplatí, les línies cel·lulars de CCR parentals, les quals presentaven diferències genotípiques entre elles, com ara l'estatus de p53 i el fenotip RER, van ser analitzades conjuntament, establint una comparació amb el conjunt de sublínies derivades resistents. D'aquesta manera, el citat model permetia emfatitzar la vinculació dels gens seleccionats en mecanismes generals d'adquisició de resistència a oxaliplatí i descartar els processos desencadenats per les característiques individuals d'una línia cel·lular concreta. Per altra banda, és important destacar que el

present treball és un dels pocs estudis sobre resistència a fàrmacs que inclou més d'una línia cel.lular resistent (154) i que totes elles pertanyen al mateix tipus tumoral (113).

Estudi de l'expressió gènica

Aquest estudi s'ha realitzat mitjançant l'anàlisi de l'expressió gènica a través de la tècnica de detecció a gran escala, com és la tecnologia microarray i, tècniques més específiques per validar els resultats, com és la tècnica de PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR).

La tecnologia de microarrays d'expressió d'ADN còpia ha estat extensament usada per a estudiar diversos aspectes relacionats amb el càncer, tal i com la determinació de perfils d'expressió gènica vinculats amb el pronòstic de la malaltia (137, 138), la resposta al tractament (139), els mecanismes d'acció de diferents fàrmacs (95) o l'adquisició de resistència a agents antineoplàsics (113, 154). En les anàlisis mitjançant microarrays els dissenys experimentals més freqüentment usats són el disseny usant una mostra de referència (*disseny referència*) i el *disseny directe*, principalment per ser els tècnicament més factibles (167). En el present projecte s'ha utilitzat el *disseny referència* ja que, encara que requereix el doble d'hibridacions per mostra que l'altre disseny, permet realitzar comparacions entre experiments separats en el temps o en l'espai i una major diversitat de comparacions i d'anàlisis. La mostra de referència proporciona una mesura de l'expressió relativa per als gens i les mostres problema que presenta menys variabilitat que una mesura absoluta (168, 169). A més a més, el *disseny directe* només pot ser usat en anàlisis de comparacions de classes de tipus simple (buscar gens que estiguin alterats entre dues mostres) i no en els de tipus múltiple com és el cas de l'anàlisi portada a terme en aquest estudi.

L'objectiu principal del present projecte era seleccionar un grup de gens relacionats amb els mecanismes d'acció i resistència a l'oxaliplatí partint dels resultats procedents d'un *screening* genètic previ mitjançant la tecnologia microarray. El grup de gens determinats a partir d'aquesta metodologia no van ser considerats com a candidats si la seva expressió no era validada posteriorment per la tècnica de qRT-PCR. Tenint en compte això, en l'anàlisi de microarrays no és van aplicar mètodes de correcció de

falsos positius (FDR, Bonferroni,...) i es va optar per aplicar un p-valor altament restrictiu (0,01) per al conjunt de comparacions, amb l'objectiu de seleccionar aquells gens que presentessin les majors diferències d'expressió entre els dos grups a comparar, esperant que aquestes diferències poguessin ser corroborades posteriorment per la tècnica de PCR.

Encara que els microarrays d'ADNc proporcionen una capacitat sense precedents de desenvolupar perfils d'expressió del genoma sencer, la qualitat de les dades d'expressió gènica obtingudes poden variar àmpliament entre plataformes i protocols usats (162). La tècnica de qRT-PCR és habitualment usada com a eina de validació per a confirmar els resultats obtinguts a partir de l'anàlisi per microarrays i sovint és considerada tècnica de referència per a mesures d'expressió, a causa dels seus avantatges a nivell de sensibilitat, especificitat, alta precisió i reproducibilitat comparada amb altres metodologies (138, 154). A més a més, la seva facilitat d'aplicació ha permès la utilització extensiva d'aquesta tecnologia com a mètode preferent per a la quantificació de l'expressió gènica i la validació independent de resultats procedents d'experiments de microarrays.

DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

Mitjançant la metodologia descrita anteriorment, en aquest projecte s'han pogut determinar gens relacionats amb l'adquisició de resistència a oxaliplatí a nivell *in vitro* que finalment, han estat estudiats en peces tumorals de pacients de CCR amb la finalitat de conèixer millor els processos de desenvolupament de resistència al fàrmac i el paper dels gens seleccionats com a marcadors de l'aparició d'aquesta. A més a més, s'han estudiat els mecanismes d'acció de l'oxaliplatí mitjançant la detecció de gens relacionats amb la capacitat de resposta davant el tractament amb el fàrmac en un model *in vitro* de sensibilitat a l'esmentat platí.

En aquest apartat es porta a terme la interpretació dels resultats obtinguts i la seva aportació en el coneixement del comportament d'aquest fàrmac en models de CCR.

Objectiu 1: Estudi *in vitro* de l'adquisició de resistència a oxaliplatí

Pel que fa a la resistència adquirida a oxaliplatí, 6 gens han estat seleccionats després de la validació per qRT-PCR en el model cel·lular descrit: AKT1, CDK5, RGS11, GARP, TRIP i UGCGL1.

La serina-treonina quinasa AKT1 (*v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) juga un paper clau en la supervivència cel·lular. És activada per la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) i transfereix senyals de supervivència a través de la supressió per fosforilació de factors proapoptòtics intracel·lulars (44). És ben coneguda la seva implicació en l'activació de mecanismes antiapoptòtics com ara la via del factor nuclear kappa-beta (NF- κ B) (44). A més a més, té un paper destacat en els estadis primerencs de carcinogènesi colorrectal, interactuant amb la via de Wnt/ β -catenina (170). De fet, la via de senyalització de la quinasa AKT1 té l'activitat incrementada en càncer, és crítica per a la tumorogènesi i la quimioresistència i és, per tant, una important diana pel tractament del càncer i la resistència a fàrmacs (124, 125). S'ha descrit l'associació entre l'activitat d'AKT1 i la resistència a cisplatí en línies tumorals d'ovari, pulmó i mama (171). En cèl·lules de càncer de pulmó resistents a cisplatí es va veure un increment dels nivells d'ARNm d'aquest gen comparat amb els nivells presents a les línies parentals (126). Interessantment, els citats resultats es correspondrien amb els obtinguts en el present projecte però, en aquest cas, utilitzant oxaliplatí i models cel·lulars de CCR i és important destacar-ho a causa de la citada manca d'informació sobre l'actuació de l'oxaliplatí en aquest tumor a nivell cel·lular.

CDK5 (*Cyclin dependent kinase 5*) és l'única petita serina-treonina quinasa que forma part de la família de les quinases dependents de cicle (cdk's). De forma diferent a les altres cdk's, les quals intervenen en la regulació del cicle cel·lular, CDK5 és essencial per al desenvolupament neuronal i està majoritàriament expressada en el sistema nerviós. Tanmateix, la presència de CDK5 en diversos tipus tumorals ha estat descrita (172, 173). Kim et al. van observar majors nivells d'expressió d'aquest gen en cèl·lules HT29 i teixits tumorals de CCR respecte a la mucosa normal colònica i van descriure un possible paper de CDK5 en la proliferació de les cèl·lules de CCR (173). Interessantment, van suggerir un efecte antiapoptòtic d'aquest gen a través de la inhibició indirecta de PPAR γ (*Peroxisome proliferator-*

activated receptor gamma). Aquest fenomen es produiria per l'acció inhibidora de CDK5 sobre MEK1 (174), quinasa implicada en l'activació de PPAR γ (175). A més a més, ha estat demostrada l'activitat proapoptòtica de PPAR γ en la reducció de la proliferació dels tumors colorrectals, tant a nivell *in vitro* com *in vivo* (176). Per altra banda, Eichele et al. van estudiar l'efecte de la inhibició de PPAR γ en la quimioresistència (177) i van establir una relació entre el decrement de la regulació de PPAR γ i la resistència a cisplatí, demostrant la intervenció d'aquest receptor en l'apoptosi desencadenada per l'activitat d'aquest fàrmac. Altres autors han descrit l'efecte inhibitor de l'activació de PPAR γ sobre el factor de transcripció NF- $\kappa\beta$ (178), prèviament relacionat amb la resistència a platins (91, 179). D'acord amb això, els resultats mostrats en el present projecte coincidirien amb els reportats en els esmentats estudis ja que un augment de l'expressió de CDK5 es traduiria en una disminució de l'activació de PPAR γ i, consegüentment, en l'adquisició de resistència al fàrmac.

TRIP (*TRAF interacting protein*) és un component del complex de senyalització TNFR/TRAFs. Encara que la seva funció *in vivo* no està encara massa clara, alguns estudis *in vitro* han demostrat la implicació de TRIP en la inhibició de l'activació TRAF2 dependent de NF- $\kappa\beta$ (180-182). És conegut que NF- $\kappa\beta$ és responsable d'induir l'expressió de diversos gens antiapoptòtics (183) i aquest fenomen ha estat relacionat amb la disminució de l'activitat de fàrmacs tals com l'oxaliplatí (91). Certament, els resultats del present treball recolzen aquestes dades ja que baixos nivells d'expressió de TRIP promourien l'activitat de NF- $\kappa\beta$ i, com a conseqüència, la resistència al fàrmac.

Els altres tres gens caracteritzats en aquest estudi han estat UGCGL1 (*UDP-glucose ceramide glucosyltransferase like 1*), GARP (*Glycoprotein A repetitions predominant*) i RGS11 (*Regulator G-protein signal 11*). El primer gen està implicat en el metabolisme de les proteïnes (184), el segon en una gran varietat de funcions com la interacció cèl.lula-cèl.lula (185) i, el tercer pertany a una família de proteïnes que actuen com a reguladors de l'activitat de les proteïnes G (186). A part de la presència d'amplificacions d'ADN en el locus de GARP (11q13.5-14) en el càncer de mama (187), no s'ha descrit la possible participació d'algun d'aquests gens en el metabolisme o la resistència a agents citostàtics. De fet, la poca informació

existent sobre aquests els situa com a noves dianes per a estudis relacionats amb l'oxaliplatí.

Recentment, Cui et al. (188) han constituït un mapa de senyalització sobre càncer. Interessantment, la majoria dels gens relacionats amb la resistència adquirida a oxaliplatí que s'han determinat en el present projecte estan situats a prop de la subregió de Ras, proteïna amb gran rellevància en el CCR i estan directament o indirectament lligats amb p38, quinasa prèviament relacionada amb els mecanismes apoptòtics desencadenats per l'acció d'aquest fàrmac (91). Aquesta informació complementa la prèviament descrita i dóna robustesa al fet que els gens detectats en el projecte pertanyin a vies que participen en la resistència i en l'activitat del fàrmac en el CCR.

Finalment, és important destacar la participació d'AKT1, CDK5 i TRIP en la regulació de la via NF- κ B (figura 6.1).

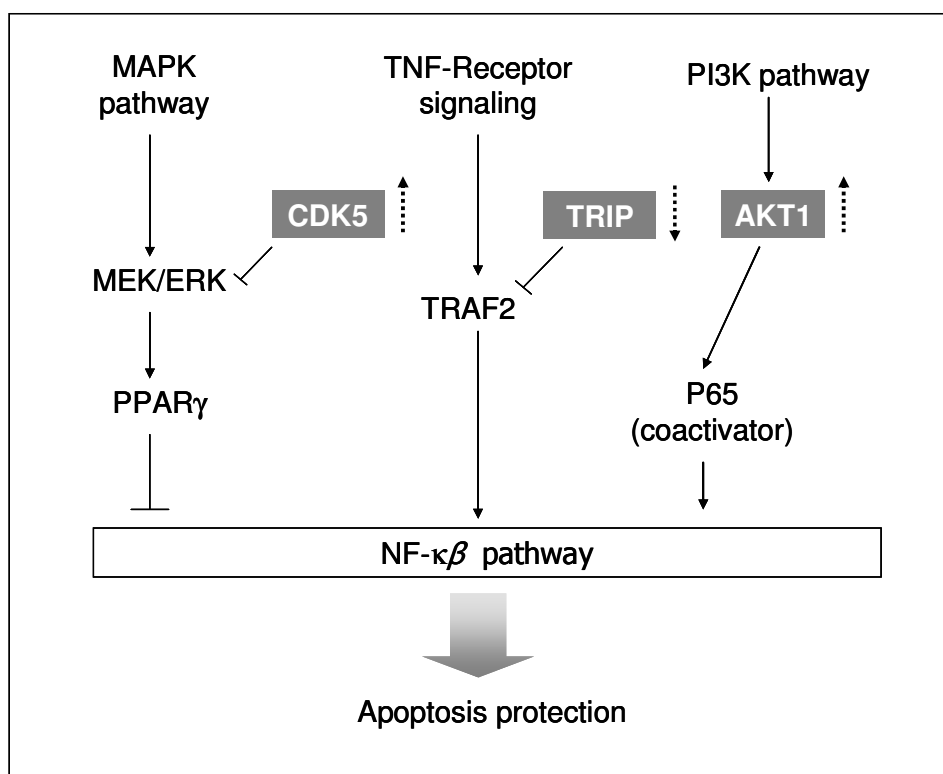


Figura 6.1: Esquema representatiu de la participació d'AKT1, CDK5 i TRIP en la regulació de la via de NF- κ B. L'activitat antiapoptòtica d'aquest factor de transcripció seria induïda per l'acció dels dos primers gens i per la inhibició del tercer. A la figura, els gens diana estan emmarcats en gris i les fletxes puntejades representen l'estat de l'expressió d'aquests en el grup de cèl·lules resistents a oxaliplatí respecte les sensibles.

Tenint en compte això, es podria postular un model basat en l'activitat de NF- κ B en el qual, en concordància amb els resultats descrits anteriorment, baixos nivells de TRIP i alts nivells d'AKT1 i CDK5 contribuirien en l'activació de NF- κ B i conseqüentment, es potenciaria l'activitat antiapoptòtica i l'adquisició de resistència al fàrmac. D'acord amb aquesta hipòtesi, la via de senyalització de NF- κ B podria ser considerada com a un bon punt de partida per a futurs projectes dirigits a l'estudi de mecanismes d'adquisició de resistència a oxaliplatí.

Per a resumir aquest apartat i en referència als resultats obtinguts, en el present treball s'han identificat un grup de gens, l'expressió dels quals està relacionada amb l'adquisició de resistència a oxaliplatí a partir d'un model cel·lular de CCR. És important fer menció de la importància d'aquestes troballes per a ampliar el coneixement i obrir noves vies d'estudi sobre la resistència que les cèl·lules tumorals desenvolupen a aquest fàrmac. A més a més, aquesta informació podria contribuir en futurs estudis per trobar noves dianes terapèutiques per a combatre els fenòmens de resistència a fàrmacs.

Objectiu 2: Estudi *in vitro* de la capacitat de resposta al fàrmac

En aquest estudi, 5 gens van ser seleccionats després de la validació per qRT-PCR, encara que només VPS33A i GTF2H2 van mostrar canvis d'expressió significatius entre els 2 grups (ALTA i BAIXA sensibilitat al fàrmac) en el model cel·lular de sensibilitat a oxaliplatí. A més a més, el fet que aquests canvis es produïssin bàsicament en el grup de baixa sensibilitat al fàrmac (on DUSP11 també va mostrar diferències d'expressió significatives), fa pensar en la possibilitat que els canvis d'expressió d'aquests 3 gens (VPS33A, GTF2H2 i DUSP11), ja sigui per augment o disminució, es relacionin negativament amb el mecanisme d'acció del fàrmac i, per tant, les cèl·lules presentin una menor sensibilitat a aquest. Amb tot això, podríem suggerir que l'acció de VPS33A i DUSP11 (augment de l'expressió) i el decrement de GTF2H2 perjudicarien l'activitat de l'oxaliplatí, fet que es podria traduir en una major resistència davant la presència de l'oxaliplatí.

GTF2H2 (*General transcription factor IIH*) forma part del complex TIIH de l'ARN polimerasa II, que intervé en la síntesi d'àcids nucleics durant la

transcripció i la reparació per la via NER (189, 190). Encara que s'ha descrit la seva capacitat d'unió amb la proteïna XPD durant la reparació per NER, no s'ha demostrat que l'augment de la seva expressió estigui relacionat amb la resistència a fàrmacs, al contrari que XPD i altres proteïnes d'aquesta via (191). Segons els resultats obtinguts en el present treball, el decrement de l'expressió d'aquest gen es podria relacionar amb una menor sensibilitat a l'oxaliplatí, ja que només les cèl·lules d'aquest grup presenten una davallada en els nivells d'aquest gen al ser tractades amb el fàrmac. A causa del poc coneixement existent sobre la seva actuació, es podria tenir en compte GTF2H2 com a nova diana d'estudi del mecanisme d'acció de l'oxaliplatí a nivell cel·lular.

VPS33A (*Vacuolar protein sorting 33A*) pertany a una família de proteïnes que participen en la biogènesi de vesícules encarregades del transport cel·lular (figura 6.2) (192).

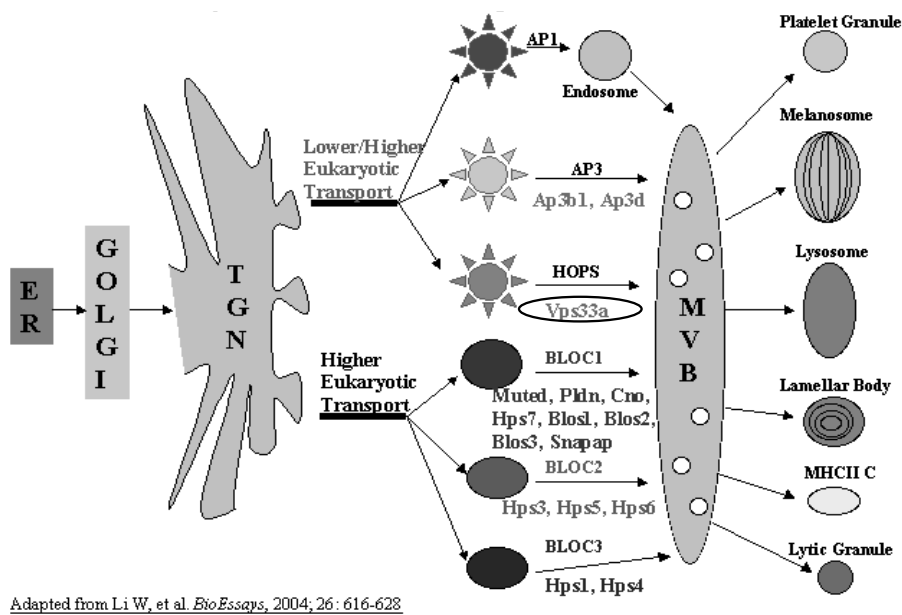


Figura 6.2: Esquema representatiu de la biogènesi de vesícules encarregades del transport cel·lular i la formació d'òrgans, on hi intervé la proteïna VPS33A (encerclada en negre) a partir del complex HOPS.

Suzuki et al. van descriure que mutacions inactivadores en el gen VPS33A eren la causa d'alguns casos del síndrome humà *Hermansky-Pudlak* (HPS), que consisteix en una disfunció en la formació d'òrgans (193). Segons els

resultats reportats en el present estudi, el tractament amb oxaliplatí provocaria un augment en l'expressió d'aquest gen, principalment en el grup de baixa sensibilitat al fàrmac i es podria hipotetitzar una relació amb un augment del transport vesicular que es podria traduir en una menor acumulació del fàrmac dins la cèl·lula. Tanmateix, existeix poca informació sobre l'activitat d'aquest gen i la seva relació amb l'exocitosi.

DUSP11 (*Dual specificity phosphatase 11*) forma part d'una família de proteïnes que regulen negativament a membres de la família MAP quinases (*Mitogen-activated kinases*), entre les que es troba p38, proteïna implicada en l'activació de l'apoptosi desencadenada per l'oxaliplatí (91). Per tant i en base als resultats obtinguts, es podria hipotetitzar que davant el tractament amb oxaliplatí, l'augment de l'expressió de DUSP11 provocaria un decrement de l'activació de p38 i, per tant, una disminució de l'activitat apoptòtica, que es podria traduir en una menor sensibilitat cel·lular al fàrmac.

Finalment, PRC1 (*Protein regulator of cytokinesis 1*) i ARAF (*v-Raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog*) van mostrar correlació entre les dades obtingudes en l'anàlisi de microarrays i de qRT-PCR, però no van detectar-se diferències entre els 2 grups de sensibilitat en aquest últim. Tanmateix, no han de ser descartats ja que ambdós tenen un paper important en la proliferació cel·lular i podrien ser possibles dianes d'estudi del mecanisme d'acció de l'oxaliplatí. PRC1 intervé en el procés de citocinesi durant la divisió cel·lular (194). Yun et al. van descriure el paper regulador de p53 sobre aquesta proteïna, inhibint la seva transcripció i van observar la seva sobreexpressió en cèl·lules que tenien p53 mutada (195). A més a més, s'ha trobat sobreexpressada en línies tumorals de càncer de mama (196). En el model cel·lular emprat en aquest treball, l'augment d'expressió d'aquest gen es relacionaria amb una menor sensibilitat a l'oxaliplatí i, amb tot això, es podria suggerir una major activitat proliferativa d'aquestes cèl·lules respecte les de l'altre grup davant el tractament amb el fàrmac. Pel que fa a ARAF, es tracta d'un integrant de la via de la proteïna Raf que intervé en la regulació de les MAP quinases (197, 198). S'ha estudiat la relació entre la presència de mutacions en aquest gen i la carcinogènesi colorrectal, donant resultats negatius (198, 199). Segons els resultats obtinguts en l'anàlisi de microarrays, reportats en aquest treball, les

cèl.lules més sensibles al tractament amb oxaliplatí mostrarien un major augment d'expressió d'ARAF que les cèl.lules més resistents.

Objectiu 3: Estudi *in vivo* de la resistència a oxaliplatí

Segons l'anàlisi per qRT-PCR en pacients amb CCR, l'expressió dels gens seleccionats (AKT1, CDK5, GARP, RGS11, TRIP i UGCGL1) relacionats amb l'adquisició de resistència a oxaliplatí no va correlacionar amb la resposta al tractament amb el fàrmac ni amb el temps a la progressió de la malaltia.

L'objectiu d'aquest estudi era determinar si aquests gens de resistència adquirida estaven relacionats *in vivo* amb la resistència intrínseca al fàrmac o, pel contrari, la seva alteració no podia ser detectada en teixit tumoral que no havia estat sotmès al tractament amb oxaliplatí. D'aquesta manera, es pot comprovar si l'adquisició de resistència a oxaliplatí es desencadena a partir de la selecció al llarg de l'exposició al fàrmac d'aquelles cèl.lules tumorals que inicialment ja posseïen certes característiques que són perjudicials per l'acció del fàrmac o si majoritàriament aquest fenomen té lloc a partir d'alteracions genètiques que es produeixen durant el tractament. Els resultats obtinguts en aquest estudi no demostrarien l'associació d'aquests gens amb els fenòmens de resistència intrínseca al tractament amb oxaliplatí i, per altra banda, a partir d'aquests es defensaria la hipòtesi que les alteracions en l'expressió d'aquests no existien des d'un inici, sinó que s'han produït al llarg de l'exposició a l'oxaliplatí.

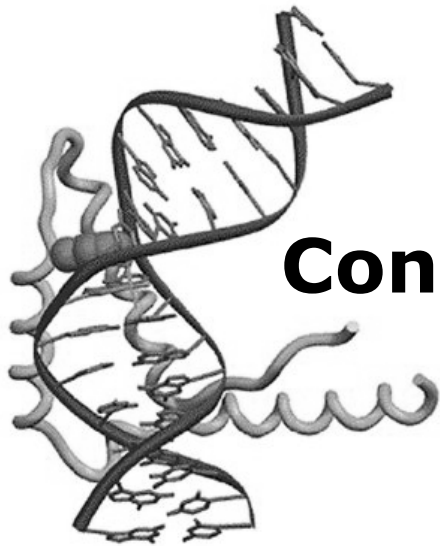
Tanmateix, és important tenir en compte que l'anàlisi d'expressió s'ha realitzat en teixit tumoral inclòs en parafina, a causa de la falta de disponibilitat de teixit congelat dels pacients. Encara que la realització d'aquesta anàlisi en aquest tipus de teixit és possible i s'ha portat a terme en diversos estudis d'expressió gènica (155, 200, 201), la qualitat del material genètic en aquests teixits és bastant precària i aquest fet obstaculitza la sensibilitat de l'anàlisi podent emmascarar canvis en l'expressió que havien sigut detectables en el model *in vitro*. Per altra banda, la gran dificultat d'obtenir teixit tumoral ja sotmès a tractament provoca que el model *in vitro* de resistència adquirida només es pugui reproduir *in vivo* en teixits tumorals verges de tractament. Per tant, en una situació ideal, aquests gens haurien de ser analitzats en teixit tumoral fresc o congelat de pacients amb CCRm abans i després de ser tractats durant un

temps amb l'oxaliplatí per a validar *in vivo* aquests resultats i determinar el paper d'aquests gens com a potencials marcadors d'adquisició de resistència al fàrmac.

Discussió general dels resultats

Mitjançant l'estudi de l'expressió per microarrays d'ADNc i PCR quantitativa a temps real, en aquest treball s'han pogut determinar, en models *in vitro* de CCR, 6 gens (AKT1, CDK5, RGS11, UGCGL1, TRIP i GARP) que intervenen en l'adquisició de resistència a oxaliplatí i 5 gens, dels quals principalment 2 (VPS33A i GTF2H2) han estat relacionats amb la capacitat de resposta de les cèl·lules davant el tractament amb el fàrmac. El fet que els dos processos estudiats (resistència adquirida i capacitat de resposta a oxaliplatí) es desenvolupin per vies independents, ja que la majoria de gens obtinguts no semblen pertànyer als mateixos grups ontològics, portaria a pensar que aquests dos fenòmens es desencadenen per mecanismes diferents. En base a la hipòtesis de JH Coldie y AJ Coldman segons la qual l'adquisició de resistència és deguda a l'acumulació de mutacions espontànies (a l'atzar) dins la cèl·lula tumoral, els resultats exposats recolzarien la idea que l'adquisició de resistència a fàrmacs es produeix majoritàriament per la incorporació d'alteracions genètiques que afavoreixen la supervivència cel·lular al llarg del tractament i no tant per la selecció de característiques ja existents inicialment a la cèl·lula tumoral, que serien majoritàriament responsables de la resistència intrínseca. Aquesta hipòtesi seria recolzada també pels resultats obtinguts *in vivo*, segons els quals la resistència adquirida no es desenvoluparia mitjançant les mateixes vies que la resistència que presenten els tumors intrínsecament i, per tant i almenys de moment, no podríem utilitzar aquests gens com a marcadors de resistència a oxaliplatí en la selecció de tractament per al càncer colorrectal a partir d'una teràpia personalitzada. No obstant això, aquests resultats obren noves vies d'estudi tant a nivell del millor enteniment dels mecanismes que desencadena l'oxaliplatí com al descobriment de noves dianes terapèutiques per a combatre la malaltia. A més a més, les dades extretes d'aquest projecte han servit de base per a un nou plantejament centrat en la resistència intrínseca a oxaliplatí, basat en un perfil d'expressió gènica que discrimini entre línies cel·lulars de CCR amb diferent

sensibilitat a oxaliplatí en estat basal, obtingut a través de l'anàlisi per microarrays, que podria ser una aproximació més propera als canvis d'expressió responsables de la resistència intrínseca en els tumors dels pacients amb CCR i una millor aproximació per a la determinació de marcadors per a la selecció del tractament amb oxaliplatí.



Conclusions

7. CONCLUSIONS

Les conclusions d'aquesta tesi doctoral són les que es mostren a continuació i es poden resumir de la següent manera:

OBJECTIU 1- Anàlisi i determinació de gens responsables de l'adquisició de resistència a oxaliplatí durant l'exposició continuada al fàrmac en línies cel.lulars derivades de tumors colorrectals, mitjançant l'anàlisi de variacions en l'expressió gènica:

A partir de línies cel.lulars de càncer colorrectal sensibles a oxaliplatí, és possible obtenir sublínies amb resistència adquirida al fàrmac. Mitjançant aquest model i d'acord amb les anàlisis per tecnologia microarray d'ADNc i qRT-PCR, l'adquisició de resistència *in vitro* a oxaliplatí està relacionada amb l'expressió augmentada d'AKT1, CDK5 i UGCGL1 i el decrement de l'expressió de RGS11, TRIP i GARP. Tres d'aquests gens (AKT1, TRIP i CDK5) intervenen en la regulació de NF- κ B, factor de transcripció de gens antiapoptòtics relacionat amb la resistència a fàrmacs. Aquests resultats obren noves vies d'estudi sobre l'oxaliplatí i situen a aquests gens com a potencials marcadors de resistència en estudis *in vivo* amb pacients amb CCR tractats amb el fàrmac.

OBJECTIU 2- Anàlisi i determinació de gens relacionats amb la sensibilitat i la capacitat de resposta a oxaliplatí, mitjançant l'anàlisi de les variacions d'expressió gènica en 14 línies cel.lulars derivades de tumors colorrectals que presenten, intrínsecament, diferent sensibilitat al fàrmac:

Per mitjà de la determinació de la IC50 a oxaliplatí, s'han establert 2 grups cel.lulars de sensibilitat al fàrmac. Les anàlisis per microarray i qRT-PCR dels gens diferencialment expressats permeten discriminar entre el grup d'alta i de baixa sensibilitat a oxaliplatí. Encara que 5 gens van ser validats segons els criteris establerts, els canvis d'expressió més evidents entre els 2 grups de sensibilitat a oxaliplatí s'han observat als gens VPS33A i GTF2H2, permetent discriminar segons la capacitat de resposta al fàrmac. En el grup de baixa sensibilitat, l'augment de l'expressió de VPS33A i DUSP11 i la disminució GTF2H2 correlacionen amb una major resistència al tractament, pel que es pot concloure que els 2 primers afectarien l'acció de l'oxaliplatí i el darrer afavoriria el seu efecte.

OBJECTIU 3- Validació *in vivo* de l'expressió dels gens relacionats *in vitro* amb la resistència adquirida a oxaliplatí (obtinguts en l'objectiu 1) a les biòpsies d'una sèrie de pacients amb càncer colorrectal disseminat, tractats en 1^a línia amb fluoropirimidina-oxaliplatí i correlació amb diferents paràmetres clínics per a determinar el seu potencial com a marcadors de resistència a oxaliplatí:

Els resultats d'expressió dels gens analitzats en les peces tumorals no han mostrat correlació amb la resposta ni amb el temps a la progressió mitjançant les diferents anàlisis estadístiques que s'han realitzat. Encara que s'ha demostrat *in vitro* el paper d'aquests gens en els processos d'adquisició de resistència a oxaliplatí, no han mostrat ser marcadors *in vivo* de la resistència intrínseca en aquesta sèrie de mostres parafinades de pacients de CCRm. Es podria concloure que aquests gens no coincideixen amb els que serien responsables de la resistència que apareix d'entrada en alguns tumors però, serien necessaris futurs experiments en peces tumorals ja tractades amb el fàrmac per a poder valorar *in vivo* el seu paper com a marcadors de resistència adquirida a oxaliplatí.

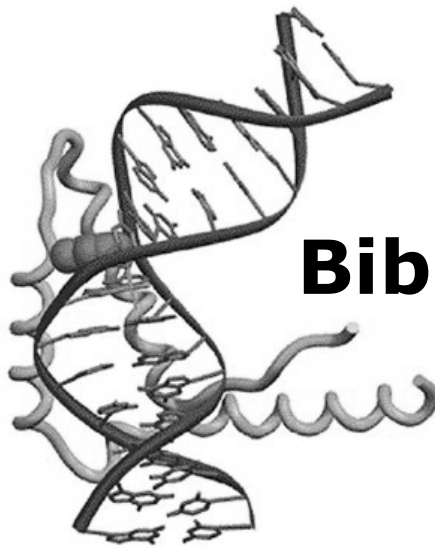
CONCLUSIONS GENERALS DE LA TESI DOCTORAL

D'acord amb els resultats obtinguts en aquest projecte a partir de l'estudi de l'expressió gènica mitjançant microarrays d'ADNcòpia i PCR quantitativa a temps real, es pot concloure que:

- S'han determinat 6 gens (AKT1, CDK5, RGS11, UGCGL1, TRIP i GARP) que intervenen en l'adquisició de resistència a oxaliplatí en el model *in vitro* de CCR.
- S'han detectat 5 gens, dels quals principalment 2 (VPS33A i GTF2H2) han estat relacionats amb la capacitat de resposta de les cèl·lules davant el tractament amb oxaliplatí en el model *in vitro* format per línies cel·lulars de CCR amb diferent sensibilitat al fàrmac.
- Els dos processos estudiats (resistència adquirida i capacitat de resposta a oxaliplatí) es desenvolupen per vies cel·lulars

independents, ja que la majoria de gens obtinguts per a cada procés no semblen pertànyer als mateixos grups ontològics.

- D'acord amb l'estudi *in vivo* realitzat en aquest projecte, la resistència adquirida no es desenvoluparia mitjançant les mateixes vies que la resistència que presenten els tumors intrínsecament i, per tant i almenys segons aquests resultats, aquests gens no podrien ser utilitzats com a marcadors de resistència a oxaliplatí en la selecció de tractament del càncer colorrectal a partir d'una teràpia personalitzada.
- Els resultats obtinguts *in vitro* obren noves vies d'estudi tant a nivell d'ampliar el coneixement existent sobre els mecanismes que desencadena l'oxaliplatí com al descobriment de noves dianes terapèutiques per a combatre la malaltia.



Bibliografia

8. BIBLIOGRAFIA

1. Weitz J, Koch M, Debus J, Hohler T, Galle PR, Buchler MW. Colorectal cancer. *Lancet* 2005;365:153-65.
2. Kemp Z, Thirlwell C, Sieber O, Silver A, Tomlinson I. An update on the genetics of colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 2004;13 Spec No 2:R177-85.
3. Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2002;137:603-12.
4. Benson AB, 3rd. Epidemiology, disease progression, and economic burden of colorectal cancer. *J Manag Care Pharm* 2007;13:S5-18.
5. Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997;386:761, 3.
6. Greene FL, Sobin LH. The TNM system: our language for cancer care. *J Surg Oncol* 2002;80:119-20.
7. Compton CC, Greene FL. The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond. *CA Cancer J Clin* 2004;54:295-308.
8. Rosell R, Abad A. Tumour site, sex, and survival in colorectal cancer. *Lancet* 2000;356:857; author reply 8.
9. Abad A, Manzano JL, Catot S, Martinez-Balibrea E. Factores pronósticos del cáncer de colon y recto. *Rev Cancer* 2004;18:153-60.
10. McLeod HL, Murray GI. Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999;79:191-203.
11. Eckhauser FE, Knol JA. Surgery for primary and metastatic colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1997;26:103-28.
12. Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 2001;345:638-46.
13. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351:1731-40.
14. Abad A, Massuti B, Anton A, et al. Colorectal cancer metastasis resectability after treatment with the combination of oxaliplatin, irinotecan and 5-fluorouracil. Final results of a phase II study. *Acta Oncol* 2007;1-7.
15. Yoo PS, Lopez-Soler RI, Longo WE, Cha CH. Liver resection for metastatic colorectal cancer in the age of neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab. *Clin Colorectal Cancer* 2006;6:202-7.
16. Gill S, Loprinzi CL, Sargent DJ, et al. Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol* 2004;22:1797-806.
17. Figueredo A, Charette ML, Maroun J, Brouwers MC, Zuraw L. Adjuvant therapy for stage II colon cancer: a systematic review from the Cancer Care Ontario Program in evidence-based care's gastrointestinal cancer disease site group. *J Clin Oncol* 2004;22:3395-407.
18. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2343-51.

19. Cassidy J, Douillard JY, Twelves C, et al. Pharmacoeconomic analysis of adjuvant oral capecitabine vs intravenous 5-FU/LV in Dukes' C colon cancer: the X-ACT trial. *Br J Cancer* 2006;94:1122-9.
20. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349:247-57.
21. Kim GP, Colangelo LH, Wieand HS, et al. Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: a National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *J Clin Oncol* 2007;25:767-72.
22. Diaz-Rubio E, Schmoll HJ. The future development of bevacizumab in colorectal cancer. *Oncology* 2005;69 Suppl 3:34-45.
23. Ragnhammar P, Hafstrom L, Nygren P, Glimelius B. A systematic overview of chemotherapy effects in colorectal cancer. *Acta Oncol* 2001;40:282-308.
24. Meyerhardt JA, Mayer RJ. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005;352:476-87.
25. Pfeiffer P, Qvortrup C, Eriksen JG. Current role of antibody therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Oncogene* 2007;26:3661-78.
26. Saltz LB, Cox JV, Blanke C, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 2000;343:905-14.
27. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 2000;355:1041-7.
28. de Gramont A, Figuer A, Seymour M, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:2938-47.
29. Tournigand C, Andre T, Achille E, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004;22:229-37.
30. Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, et al. Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *J Clin Oncol* 2005;23:4866-75.
31. Abad A, Massuti B, Gallego J, et al. Phase I study of the combination of oxaliplatin, irinotecan and continuous infusion 5-fluorouracil in digestive tumors. *Anticancer Drugs* 2004;15:469-71.
32. Masi G, Vasile E, Loupakis F, et al. Triplet combination of fluoropyrimidines, oxaliplatin, and irinotecan in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2008;7:7-14.
33. Diaz-Rubio E, Tabernero J, Gomez-Espana A, et al. Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with continuous-infusion fluorouracil plus oxaliplatin as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: final report of the Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors Trial. *J Clin Oncol* 2007;25:4224-30.
34. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-42.

35. Cassidy J, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R. First efficacy and safety results from XELOX-1/NO16968 , a randomized 2 x 2 factorial phase III trial of XELOX vs FOLFOX + bevacizumab or placebo in first-line metastatic colorectal cancer (MCRC). *Ann Oncol* 2006;17:abstract LBA3.
36. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 2007;25:1539-44.
37. Chen HX, Mooney M, Boron M, et al. Phase II multicenter trial of bevacizumab plus fluorouracil and leucovorin in patients with advanced refractory colorectal cancer: an NCI Treatment Referral Center Trial TRC-0301. *J Clin Oncol* 2006;24:3354-60.
38. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;351:337-45.
39. Tabernero J, Van Cutsem E, Diaz-Rubio E, et al. Phase II trial of cetuximab in combination with fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:5225-32.
40. Van Cutsem E, Lang I, D'haens G, et al. KRAS status and efficacy in the first line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *J Clin Oncol* 2008;Abs. Num 2.
41. Bokemeyer C, Bondarenko I, Hartmann JT, et al. KRAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J Clin Oncol* 2008;Abs. Num 4000.
42. Rowinsky EK, Schwartz GH, Gollob JA, et al. Safety, pharmacokinetics, and activity of ABX-EGF, a fully human anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in patients with metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:3003-15.
43. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:1658-64.
44. Perona R, Sanchez-Perez I. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Br J Cancer* 2004;90:573-7.
45. Longley DB, Allen WL, Johnston PG. Drug resistance, predictive markers and pharmacogenomics in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2006;1766:184-96.
46. Ozben T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Lett* 2006.
47. Katragadda S, Budda B, Anand BS, Mitra AK. Role of efflux pumps and metabolising enzymes in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2005;2:683-705.
48. Martinez-Balibrea E, Manzano JL, Martinez-Cardus A, et al. Combined analysis of genetic polymorphisms in thymidylate synthase, uridine diphosphate glucuronosyltransferase and X-ray cross complementing factor 1 genes as a prognostic factor in advanced colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil plus oxaliplatin or irinotecan. *Oncol Rep* 2007;17:637-45.

49. Park DJ, Stoehmacher J, Zhang W, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ. Thymidylate synthase gene polymorphism predicts response to capecitabine in advanced colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2002;17:46-9.
50. Pullarkat ST, Stoehmacher J, Ghaderi V, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2001;1:65-70.
51. Dotor E, Cuatrecasas M, Martinez-Iniesta M, et al. Tumor thymidylate synthase 1494del6 genotype as a prognostic factor in colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based adjuvant treatment. *J Clin Oncol* 2006;24:1603-11.
52. Marcuello E, Altes A, del Rio E, Cesar A, Menoyo A, Baiget M. Single nucleotide polymorphism in the 5' tandem repeat sequences of thymidylate synthase gene predicts for response to fluorouracil-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2004;112:733-7.
53. Bandres E, Zarate R, Ramirez N, Abajo A, Bitarte N, Garcia-Foncillas J. Pharmacogenomics in colorectal cancer: the first step for individualized-therapy. *World J Gastroenterol* 2007;13:5888-901.
54. Martinez-Balibrea E, Abad A, Aranda E, et al. Pharmacogenetic approach for capecitabine or 5-fluorouracil selection to be combined with oxaliplatin as first-line chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2008;44:1229-37.
55. Marcuello E, Altes A, Menoyo A, Del Rio E, Gomez-Pardo M, Baiget M. UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004;91:678-82.
56. Maruo Y, Iwai M, Mori A, Sato H, Takeuchi Y. Polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase and drug metabolism. *Curr Drug Metab* 2005;6:91-9.
57. Bates SE, Medina-Perez WY, Kohlhagen G, et al. ABCG2 mediates differential resistance to SN-38 (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) and homocamptothecins. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310:836-42.
58. Wierdl M, Wall A, Morton CL, et al. Carboxylesterase-mediated sensitization of human tumor cells to CPT-11 cannot override ABCG2-mediated drug resistance. *Mol Pharmacol* 2003;64:279-88.
59. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol* 2005;6:279-86.
60. Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res* 2007;67:2643-8.
61. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 2006;66:3992-5.
62. Lievre A, Bachet JB, Boige V, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008;26:374-9.
63. Freeman DJ, Juan T, Reiner M, et al. Association of K-ras mutational status and clinical outcomes in patients with metastatic colorectal cancer receiving panitumumab alone. *Clin Colorectal Cancer* 2008;7:184-90.
64. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007;33:9-23.

65. Raymond E, Buquet-Fagot C, Djelloul S, et al. Antitumor activity of oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor AG337 in human colon, breast and ovarian cancers. *Anticancer Drugs* 1997;8:876-85.
66. Cvitkovic E. A historical perspective on oxaliplatin: rethinking the role of platinum compounds and learning from near misses. *Semin Oncol* 1998;25:1-3.
67. Chaney SG, Campbell SL, Bassett E, Wu Y. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;53:3-11.
68. Kidani Y, Inagaki K, Iigo M, Hoshi A, Kuretani K. Antitumor activity of 1,2-diaminocyclohexane--platinum complexes against sarcoma-180 ascites form. *J Med Chem* 1978;21:1315-8.
69. Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol* 1998;25:4-12.
70. Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res* 2000;6:1205-18.
71. Levi F, Metzger G, Massari C, Milano G. Oxaliplatin: pharmacokinetics and chronopharmacological aspects. *Clin Pharmacokinet* 2000;38:1-21.
72. Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther* 2002;1:227-35.
73. Pendyala L, Kidani Y, Perez R, Wilkes J, Bernacki RJ, Creaven PJ. Cytotoxicity, cellular accumulation and DNA binding of oxaliplatin isomers. *Cancer Lett* 1995;97:177-84.
74. Donzelli E, Carfi M, Miloso M, et al. Neurotoxicity of platinum compounds: comparison of the effects of cisplatin and oxaliplatin on the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *J Neurooncol* 2004;67:65-73.
75. Vekris A, Meynard D, Haaz MC, Bayssas M, Bonnet J, Robert J. Molecular determinants of the cytotoxicity of platinum compounds: the contribution of in silico research. *Cancer Res* 2004;64:356-62.
76. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003;22:7265-79.
77. Faivre S, Chan D, Salinas R, Woynarowska B, Woynarowski JM. DNA strand breaks and apoptosis induced by oxaliplatin in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2003;66:225-37.
78. Woynarowski JM, Faivre S, Herzig MC, et al. Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA. *Mol Pharmacol* 2000;58:920-7.
79. Misset JL, Bleiberg H, Sutherland W, Bekradda M, Cvitkovic E. Oxaliplatin clinical activity: a review. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000;35:75-93.
80. el-akawi Z, Abu-hadid M, Perez R, et al. Altered glutathione metabolism in oxaliplatin resistant ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett* 1996;105:5-14.
81. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene* 2003;22:7369-75.
82. Rudin CM, Yang Z, Schumaker LM, et al. Inhibition of glutathione synthesis reverses Bcl-2-mediated cisplatin resistance. *Cancer Res* 2003;63:312-8.
83. Fujie Y, Yamamoto H, Ngan CY, et al. Oxaliplatin, a potent inhibitor of survivin, enhances paclitaxel-induced apoptosis and mitotic catastrophe in colon cancer cells. *Jpn J Clin Oncol* 2005;35:453-63.

84. Friedberg EC, Walker GC, Siede W. DNA Repair and Mutagenesis. 2nd edition ed: ASM Press; 2006.
85. Satoh MS, Hanawalt PC. TFIIH-mediated nucleotide excision repair and initiation of mRNA transcription in an optimized cell-free DNA repair and RNA transcription assay. *Nucleic Acids Res* 1996;24:3576-82.
86. Reardon JT, Vaisman A, Chaney SG, Sancar A. Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-aceto-ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts. *Cancer Res* 1999;59:3968-71.
87. Suh KW, Kim JH, Kim do Y, Kim YB, Lee C, Choi S. Which gene is a dominant predictor of response during FOLFOX chemotherapy for the treatment of metastatic colorectal cancer, the MTHFR or XRCC1 gene? *Ann Surg Oncol* 2006;13:1379-85.
88. Stoeilmacher J, Ghaderi V, Iobal S, et al. A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2001;21:3075-9.
89. Caldecott KW. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 2003;2:955-69.
90. Horton JK, Watson M, Stefanick DF, Shaughnessy DT, Taylor JA, Wilson SH. XRCC1 and DNA polymerase beta in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks. *Cell Res* 2008;18:48-63.
91. Rakitina TV, Vasilevskaya IA, O'Dwyer PJ. Additive interaction of oxaliplatin and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in colon cancer cell lines results from inhibition of nuclear factor kappaB signaling. *Cancer Res* 2003;63:8600-5.
92. Gourdiere I, Crabbe L, Andreau K, Pau B, Kroemer G. Oxaliplatin-induced mitochondrial apoptotic response of colon carcinoma cells does not require nuclear DNA. *Oncogene* 2004;23:7449-57.
93. Gourdiere I, Del Rio M, Crabbe L, et al. Drug specific resistance to oxaliplatin is associated with apoptosis defect in a cellular model of colon carcinoma. *FEBS Lett* 2002;529:232-6.
94. Fumarola C, Guidotti GG. Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death. *Apoptosis* 2004;9:77-82.
95. Arango D, Wilson AJ, Shi Q, et al. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 2004;91:1931-46.
96. Griffiths GJ, Koh MY, Brunton VG, et al. Expression of kinase-defective mutants of c-Src in human metastatic colon cancer cells decreases Bcl-xL and increases oxaliplatin- and Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279:46113-21.
97. Petit T, Bearss DJ, Troyer DA, Munoz RM, Windle JJ. p53-independent response to cisplatin and oxaliplatin in MMTV-ras mouse salivary tumors. *Mol Cancer Ther* 2003;2:165-71.
98. Samimi G, Safaei R, Katano K, et al. Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004;10:4661-9.
99. Plasencia C, Martinez-Balibrea E, Martinez-Cardus A, Quinn DI, Abad A, Neamati N. Expression analysis of genes involved in oxaliplatin response and development of oxaliplatin-resistant HT29 colon cancer cells. *Int J Oncol* 2006;29:225-35.

100. Holzer AK, Samimi G, Katano K, et al. The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 2004;66:817-23.
101. Samimi G, Varki NM, Wilczynski S, Safaei R, Alberts DS, Howell SB. Increase in expression of the copper transporter ATP7A during platinum drug-based treatment is associated with poor survival in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003;9:5853-9.
102. Samimi G, Katano K, Holzer AK, Safaei R, Howell SB. Modulation of the cellular pharmacology of cisplatin and its analogs by the copper exporters ATP7A and ATP7B. *Mol Pharmacol* 2004;66:25-32.
103. Martinez-Balibrea E, Plasencia C, Martinez-Cardus A, et al. Copper (Cu) transporter ATP7B mRNA levels as a prognostic factor in advanced colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil (5fu) plus oxaliplatin combination. *J Clin Oncol* 2005;23 (16s):862 abs.9603.
104. Byun SS, Kim SW, Choi H, Lee C, Lee E. Augmentation of cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant human bladder cancer cells by modulating glutathione concentrations and glutathione-related enzyme activities. *BJU Int* 2005;95:1086-90.
105. Townsend D, Tew K. Cancer drugs, genetic variation and the glutathione-S-transferase gene family. *Am J Pharmacogenomics* 2003;3:157-72.
106. Goto S, Kamada K, Soh Y, Ihara Y, Kondo T. Significance of nuclear glutathione S-transferase pi in resistance to anti-cancer drugs. *Jpn J Cancer Res* 2002;93:1047-56.
107. Stoecklacher J, Park DJ, Zhang W, et al. Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:936-42.
108. Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, et al. Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol* 2007;25:1247-54.
109. Ikeda K, Sakai K, Yamamoto R, et al. Multivariate analysis for prognostic significance of histologic subtype, GST-pi, MDR-1, and p53 in stages II-IV ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13:776-84.
110. Miyatake K, Gemba K, Ueoka H, et al. Prognostic significance of mutant p53 protein, P-glycoprotein and glutathione S-transferase-pi in patients with unresectable non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2003;23:2829-36.
111. Bassett E, Vaisman A, Havener JM, Masutani C, Hanaoka F, Chaney SG. Efficiency of extension of mismatched primer termini across from cisplatin and oxaliplatin adducts by human DNA polymerases beta and eta in vitro. *Biochemistry* 2003;42:14197-206.
112. Wu F, Lin X, Okuda T, Howell SB. DNA polymerase zeta regulates cisplatin cytotoxicity, mutagenicity, and the rate of development of cisplatin resistance. *Cancer Res* 2004;64:8029-35.
113. Samimi G, Manorek G, Castel R, et al. cDNA microarray-based identification of genes and pathways associated with oxaliplatin resistance. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;55:1-11.
114. Youn CK, Kim MH, Cho HJ, et al. Oncogenic H-Ras up-regulates expression of ERCC1 to protect cells from platinum-based anticancer agents. *Cancer Res* 2004;64:4849-57.
115. Shirota Y, Stoecklacher J, Brabender J, et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving

- combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001;19:4298-304.
116. Rosell R, Scagliotti G, Danenberg KD, et al. Transcripts in pretreatment biopsies from a three-arm randomized trial in metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2003;22:3548-53.
 117. Kweekel DM, Gelderblom H, Guchelaar HJ. Pharmacology of oxaliplatin and the use of pharmacogenomics to individualize therapy. *Cancer Treat Rev* 2005;31:90-105.
 118. Park DJ, Zhang W, Stoehmacher J, et al. ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin Adv Hematol Oncol* 2003;1:162-6.
 119. Stoehmacher J, Park DJ, Zhang W, et al. A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004;91:344-54.
 120. Spitz MR, Wu X, Wang Y, et al. Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res* 2001;61:1354-7.
 121. Park DJ, Stoehmacher J, Zhang W, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lenz HJ. A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 2001;61:8654-8.
 122. Liu B, Wei J, Zou Z, et al. Polymorphism of XRCC1 predicts overall survival of gastric cancer patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy in Chinese population. *Eur J Hum Genet* 2007;15:1049-53.
 123. Uematsu K, Seki N, Seto T, et al. Targeting the Wnt signaling pathway with dishevelled and cisplatin synergistically suppresses mesothelioma cell growth. *Anticancer Res* 2007;27:4239-42.
 124. Kim D, Dan HC, Park S, et al. AKT/PKB signaling mechanisms in cancer and chemoresistance. *Front Biosci* 2005;10:975-87.
 125. Luo Y, Shoemaker AR, Liu X, et al. Potent and selective inhibitors of Akt kinases slow the progress of tumors in vivo. *Mol Cancer Ther* 2005;4:977-86.
 126. Liu LZ, Zhou XD, Qian G, Shi X, Fang J, Jiang BH. AKT1 amplification regulates cisplatin resistance in human lung cancer cells through the mammalian target of rapamycin/p70S6K1 pathway. *Cancer Res* 2007;67:6325-32.
 127. Schenk PW, Boersma AW, Brandsma JA, et al. SKY1 is involved in cisplatin-induced cell kill in *Saccharomyces cerevisiae*, and inactivation of its human homologue, SRPK1, induces cisplatin resistance in a human ovarian carcinoma cell line. *Cancer Res* 2001;61:6982-6.
 128. Christofk HR, Vander Heiden MG, Wu N, Asara JM, Cantley LC. Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein. *Nature* 2008;452:181-6.
 129. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 2008;452:230-3.
 130. Stetak A, Veress R, Ovadi J, Csermely P, Keri G, Ullrich A. Nuclear translocation of the tumor marker pyruvate kinase M2 induces programmed cell death. *Cancer Res* 2007;67:1602-8.
 131. Yoo BC, Ku JL, Hong SH, et al. Decreased pyruvate kinase M2 activity linked to cisplatin resistance in human gastric carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2004;108:532-9.

132. Gines A, Martinez-Balibrea E, Plasencia C, et al. A proteomic approach links decreased Pyruvate Kinase M2 expression to Oxaliplatin resistance in colorectal cancer patients and human cell lines. *J Clin Oncol* 2008;Abs. Num 4121.
133. Lipshutz RJ, Morris D, Chee M, et al. Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *Biotechniques* 1995;19:442-7.
134. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-70.
135. Alon U, Barkai N, Notterman DA, et al. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6745-50.
136. Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med* 2006;354:2463-72.
137. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-6.
138. Faury D, Nantel A, Dunn SE, et al. Molecular profiling identifies prognostic subgroups of pediatric glioblastoma and shows increased YB-1 expression in tumors. *J Clin Oncol* 2007;25:1196-208.
139. Del Rio M, Molina F, Bascoul-Molleivi C, et al. Gene expression signature in advanced colorectal cancer patients select drugs and response for the use of leucovorin, fluorouracil, and irinotecan. *J Clin Oncol* 2007;25:773-80.
140. Kihara C, Tsunoda T, Tanaka T, et al. Prediction of sensitivity of esophageal tumors to adjuvant chemotherapy by cDNA microarray analysis of gene-expression profiles. *Cancer Res* 2001;61:6474-9.
141. Liu ET. Expression genomics and cancer biology. *Pharmacogenomics* 2004;5:1117-28.
142. Sorlie T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer* 2004;40:2667-75.
143. Tone AA, Begley H, Sharma M, et al. Gene expression profiles of luteal phase fallopian tube epithelium from BRCA mutation carriers resemble high-grade serous carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:4067-78.
144. Huber RM, Stratakis DF. Molecular oncology--perspectives in lung cancer. *Lung Cancer* 2004;45 Suppl 2:S209-13.
145. Bertucci F, Salas S, Eysteris S, et al. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* 2004;23:1377-91.
146. Higgins JP. Gene array studies in renal neoplasia. *ScientificWorldJournal* 2006;6:502-11.
147. Golias C, Charalabopoulos A, Stagikas D, et al. Molecular profiling and genomic microarrays in prostate cancer. *Exp Oncol* 2007;29:82-4.
148. El-Rifai W, Frierson HF, Jr., Harper JC, Powell SM, Knuutila S. Expression profiling of gastric adenocarcinoma using cDNA array. *Int J Cancer* 2001;92:832-8.
149. Oyan AM, Bo TH, Jonassen I, et al. Global gene expression in classification, pathogenetic understanding and identification of therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Curr Pharm Biotechnol* 2007;8:344-54.

150. Henrickson SE, Hartmann EM, Ott G, Rosenwald A. Gene expression profiling in malignant lymphomas. *Adv Exp Med Biol* 2007;593:134-46.
151. Sotiriou C, Piccart MJ. Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care? *Nat Rev Cancer* 2007;7:545-53.
152. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347:1999-2009.
153. Shih W, Chetty R, Tsao MS. Expression profiling by microarrays in colorectal cancer (Review). *Oncol Rep* 2005;13:517-24.
154. Boyer J, Allen WL, McLean EG, et al. Pharmacogenomic identification of novel determinants of response to chemotherapy in colon cancer. *Cancer Res* 2006;66:2765-77.
155. Haque T, Faury D, Albrecht S, et al. Gene expression profiling from formalin-fixed paraffin-embedded tumors of pediatric glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:6284-92.
156. Manduchi E, Scearce LM, Brestelli JE, Grant GR, Kaestner KH, Stoeckert CJ, Jr. Comparison of different labeling methods for two-channel high-density microarray experiments. *Physiol Genomics* 2002;10:169-79.
157. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 2001;29:365-71.
158. Causton HC, Quackenbush J, Brazma A. *Microarray. Gene expression data analysis*. 1st ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing; 2003.
159. Massart D, Buydens L, Vandegiste B. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. 1st ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier; 1997.
160. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet* 2000;24:227-35.
161. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-7.
162. Dupuy A, Simon RM. Critical review of published microarray studies for cancer outcome and guidelines on statistical analysis and reporting. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:147-57.
163. Shi L, Reid LH, Jones WD, et al. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol* 2006;24:1151-61.
164. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.
165. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001;25:386-401.
166. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:205-16.
167. Churchill GA. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet* 2002;32 Suppl:490-5.

168. Dobbin K, Shih JH, Simon R. Statistical design of reverse dye microarrays. *Bioinformatics* 2003;19:803-10.
169. Dobbin K, Shih JH, Simon R. Questions and answers on design of dual-label microarrays for identifying differentially expressed genes. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1362-9.
170. Dihlmann S, Kloor M, Fallsehr C, von Knebel Doeberitz M. Regulation of AKT1 expression by beta-catenin/Tcf/Lef signaling in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 2005;26:1503-12.
171. Piccolo E, Vignati S, Maffucci T, et al. Inositol pentakisphosphate promotes apoptosis through the PI 3-K/Akt pathway. *Oncogene* 2004;23:1754-65.
172. Lin H, Juang JL, Wang PS. Involvement of Cdk5/p25 in digoxin-triggered prostate cancer cell apoptosis. *J Biol Chem* 2004;279:29302-7.
173. Kim E, Chen F, Wang CC, Harrison LE. CDK5 is a novel regulatory protein in PPARgamma ligand-induced antiproliferation. *Int J Oncol* 2006;28:191-4.
174. Sharma P, Veeranna, Sharma M, et al. Phosphorylation of MEK1 by cdk5/p35 down-regulates the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2002;277:528-34.
175. Burgermeister E, Chuderland D, Hanoch T, Meyer M, Liscovitch M, Seger R. Interaction with MEK causes nuclear export and downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol* 2007;27:803-17.
176. Gupta RA, Dubois RN. Controversy: PPARgamma as a target for treatment of colorectal cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G266-9.
177. Eichele K, Ramer R, Hinz B. Decisive role of cyclooxygenase-2 and lipocalin-type prostaglandin D synthase in chemotherapeutics-induced apoptosis of human cervical carcinoma cells. *Oncogene* 2007.
178. Wang LH, Yang XY, Zhang X, Farrar WL. Inhibition of adhesive interaction between multiple myeloma and bone marrow stromal cells by PPAR{gamma} cross talk with NF- κ B and C/EBP. *Blood* 2007;110:4373-84.
179. Biliran H, Jr., Banerjee S, Thakur A, et al. c-Myc-induced chemosensitization is mediated by suppression of cyclin D1 expression and nuclear factor-kappa B activity in pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2007;13:2811-21.
180. Park ES, Choi S, Kim JM, et al. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the TRAF-interacting protein (TRIP) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;363:971-7.
181. Regamey A, Hohl D, Liu JW, et al. The tumor suppressor CYLD interacts with TRIP and regulates negatively nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 2003;198:1959-64.
182. Lee SY, Lee SY, Choi Y. TRAF-interacting protein (TRIP): a novel component of the tumor necrosis factor receptor (TNFR)- and CD30-TRAF signaling complexes that inhibits TRAF2-mediated NF-kappaB activation. *J Exp Med* 1997;185:1275-85.
183. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS, Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 1996;274:784-7.
184. Arnold SM, Fessler LI, Fessler JH, Kaufman RJ. Two homologues encoding human UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase differ in mRNA expression and enzymatic activity. *Biochemistry* 2000;39:2149-63.
185. Ollendorff V, Noguchi T, deLapeyriere O, Birnbaum D. The GARP gene encodes a new member of the family of leucine-rich repeat-containing proteins. *Cell Growth Differ* 1994;5:213-9.

186. Snow BE, Krumins AM, Brothers GM, et al. A G protein gamma subunit-like domain shared between RGS11 and other RGS proteins specifies binding to Gbeta5 subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13307-12.
187. Szepietowski P, Ollendorff V, Grosgeorge J, et al. DNA amplification at 11q13.5-q14 in human breast cancer. *Oncogene* 1992;7:2513-7.
188. Cui Q, Ma Y, Jaramillo M, et al. A map of human cancer signaling. *Mol Syst Biol* 2007;3:152.
189. Humbert S, van Vuuren H, Lutz Y, Hoeijmakers JH, Egly JM, Moncollin V. p44 and p34 subunits of the BTF2/TFIIH transcription factor have homologies with SSL1, a yeast protein involved in DNA repair. *Embo J* 1994;13:2393-8.
190. Vonarx EJ, Tabone EK, Osmond MJ, Anderson HJ, Kunz BA. Arabidopsis homologue of human transcription factor IIH/nucleotide excision repair factor p44 can function in transcription and DNA repair and interacts with AtXPD. *Plant J* 2006;46:512-21.
191. Weaver DA, Crawford EL, Warner KA, Elkhairi F, Khuder SA, Willey JC. ABCC5, ERCC2, XPA and XRCC1 transcript abundance levels correlate with cisplatin chemoresistance in non-small cell lung cancer cell lines. *Mol Cancer* 2005;4:18.
192. Li W, Rusiniak ME, Chintala S, Gautam R, Novak EK, Swank RT. Murine Hermansky-Pudlak syndrome genes: regulators of lysosome-related organelles. *Bioessays* 2004;26:616-28.
193. Suzuki T, Oiso N, Gautam R, et al. The mouse organellar biogenesis mutant buff results from a mutation in *Vps33a*, a homologue of yeast *vps33* and *Drosophila carnation*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:1146-50.
194. Mollinari C, Kleman JP, Jiang W, Schoehn G, Hunter T, Margolis RL. PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J Cell Biol* 2002;157:1175-86.
195. Li C, Lin M, Liu J. Identification of PRC1 as the p53 target gene uncovers a novel function of p53 in the regulation of cytokinesis. *Oncogene* 2004;23:9336-47.
196. Yun HJ, Cho YH, Moon Y, et al. Transcriptional targeting of gene expression in breast cancer by the promoters of protein regulator of cytokinesis 1 and ribonuclease reductase 2. *Exp Mol Med* 2008;40:345-53.
197. Huebner K, ar-Rushdi A, Griffin CA, et al. Actively transcribed genes in the raf oncogene group, located on the X chromosome in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:3934-8.
198. Fransen K, Klintenas M, Osterstrom A, Dimberg J, Monstein HJ, Soderkvist P. Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 2004;25:527-33.
199. Lee JW, Soung YH, Kim SY, et al. Mutational analysis of the ARAF gene in human cancers. *Apmis* 2005;113:54-7.
200. Cobo M, Isla D, Massuti B, et al. Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:2747-54.
201. Taron M, Rosell R, Felip E, et al. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum Mol Genet* 2004;13:2443-9.

*Diuen que sóc heroi, jo dèbil, tímid, quasi insignificant,
si essent com sóc vaig fer el que vaig fer, imagineu-vos
el que podeu fer tots vosaltres junts.
(Mahatma Gadhi)*