



# Anàlisi de la resposta als tractaments combinats amb cisplatí en el càncer d'ovari: Factors implicats en la quimioresistència

Roser Mir Cantos

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

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

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Facultat de Medicina**  
**Departament de Ciències Fisiològiques II**  
Programa de Doctorat: Biomedicina

**Anàlisi de la resposta als tractaments  
combinats amb cisplatí  
en el càncer d'ovari:  
Factors implicats en la quimioresistència**

**ROSER MIR CANTOS**





UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Facultat de Medicina**  
**Departament de Ciències Fisiològiques II**  
Programa de Doctorat: Biomedicina

**Anàlisi de la resposta als tractaments combinats amb cisplatí  
en el càncer d'ovari:  
Factors implicats en la quimioresistència**

Memòria presentada per Roser Mir Cantos  
Per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Aquesta tesi ha estat realitzada sota la direcció de la Dra. Pepita Giménez-Bonafé  
i la Dra. Avelina Tortosa i Moreno, a la Unitat de Fisiologia del Departament de  
Ciències Fisiològiques II, Campus Ciències de la Salut de Bellvitge, de la  
Universitat de Barcelona

Roser Mir Cantos

Dra. Pepita Giménez-Bonafé

Dra. Avelina Tortosa



*“La vida és una obra de teatre que no permet assajos...  
Per això canta, riu, balla, plora i viu intensament  
cada moment de la teva vida...  
abans que el teló baixi i l’obra acabi sense aplaudiments”*  
C.Chaplin



# AGRAÏMENTS

Tot a la naturalesa té un cicle de vida: un inici, un desenvolupament i un final. Res en aquest món escapa d'un cicle de vida! Ja fa uns anys que vaig iniciar aquesta etapa de la tesi doctoral. Ara que estic al final, miro enrere i me n'adono de tot el què he viscut, compartit i après, rodejada d'un gran nombre de gent, de la qual voldria donar els meus agraïments.

Primer de tot, a la meva família: als meus pares Francesc i Isabel, i a la meva germana Laia. Ells m'han acompanyat i recolzat en totes les meves decisions, i en aquesta gran aventura! Les úniques persones del món que sempre estan de forma incondicional: Si els refuso, em perdonen; si m'equivoco, m'acullen; si em veig atrapada, m'obren la porta i em fan veure al més enllà; si estic feliç, ho cel·lebren amb mi; si estic trista, no somriuen fins que em fan riure; Gràcies per ser els meus amics incondicionals!!!

També agrair als meus avis tot el suport que sempre em van donar. A l'àvia Júlia, a l'àvia Carmeta i a l'Avi Cisco. Ells desgraciadament ja no hi són, però estic segura que des d'on es trobin ara, es sentiran molt orgullosos de veure la seva néta doctorada! I a l'avi que em queda, per tot el carinyo i afecte que sempre m'ha brindat!!!

A les meves directores de tesi, la Dra. Pepita Giménez-Bonafé i la Dra. Avelina Tortosa i Moreno, per la seva generositat al brindar-me l'oportunitat de recórrer a les seves capacitats i experiències científiques, en un marc de confiança, afecte i amistat, fonamental per la realització d'aquest treball.

Agrair en general a tota la gent del Departament de Ciències Fisiològiques II, amb la qual he compartit molts moments, tant en el passat com en el present...! En primer lloc, a la gent del meu laboratori: a la Ruth, per ser la meva companya durant tant de temps, amb la que he compartit poiata, experiments, festes, viatges, èxits, fracassos... una relació que es podria definir com a matrimonial. A la Patricia, la meva "Mamasita"!!! Gran amiga, companya, germana! Amb qui tinc tanta complicitat,



carinyo i afecte; malgrat el temps i la distància, la sento molt a prop meu!!! A l'Albeta, per ser encantadora, sempre optimista i oferir un somriure excepcional en tot moment! Que bé ens ho vam passar plagades en el curs de doctorat! Sempre ho recordaré! A la Fineta, que ha estat com una germana gran: dolça, tendra, amable... disposada sempre a ajudar en tot i per tot! A la meva Betta, una gran amiga amb la que també he compartit moltes coses, tant a dins com a fora del laboratori! Gran companya de feina i excel·lent persona! A la Meritxell, a l'Ane i a la Verònica, malgrat que han estat poc temps en el laboratori, m'han ajudat moltíssim, i han estat la meva mà dreta sent unes persones encantadores! I per últim, a l'únic mascle del laboratori i "mexa": l'Edu, amb el que he tingut grans converses de la cultura mexicana...!

Gràcies pels moments que hem compartit dins del laboratori i fora d'ell, com a la sala de cafè de la cinquena planta. Gràcies a la Vane (la gran marassa!), a l'Alberto, al Nuno, a l'Amy (en un passat), a la Marta, a la Greti...amb els que he compartit molts dinars, somriures, festes i més...!

Als veïns del laboratori del davant, en un passat: a la Kathryn i al Manel. El Manel, una de les persones més sàvies que he conegut i a qui més he admirat; amant de la naturalesa, de la música, de la investigació; un gran amant de la vida! Ja no estàs entre nosaltres físicament, però sempre estaràs als nostres pensaments, sempre!!!

Als nous "inquilins" del laboratori del davant, ara "laboratori del Raül": A la Marisol (per les estones de "fumadeiro" a la terrasseta), a la Tània, a l'Alejandro, a la Tanit, al Xavi a la Sònia...per tot l'espai i material compartit. Gràcies a tots!

Al Jordi Bermúdez i al Ramón Batrons per estar sempre disposats a ajudar i donar un cop de mà. A l'Esther Adanero, per les grans converses al passadís i per tenir un caràcter únic que la caracteritza. A l'Anna Manzano, sempre amb comentaris encantadors! A la Laura i a l'Andy, parella feliç i sempre disposada a ajudar! Al Miguelito, per ser "el mexa" sempre de "muy buena onda". A la meva Sandra: gràcies pels grans moments viscuts! "Mi nena linda", companya de viatges, de festes, amb qui he tingut grans converses, confessions...una gran amiga!!! A tota la gent del laboratori del Joan: a la Diana, al Dani, a l'Anna Maria, a la Cristina, a l'Alba, a la Camila (muchas

conversaciones y confesiones!!!). Gràcies per l'ajuda, carinyo i moments compartits amb tots!

Al Joan Gil, per sempre estar disposat a ajudar, i sempre amb un somriure a la cara. Gràcies per sempre ser optimista i donar-me forces i energies amb els articles i experiments! Ets un gran investigador, ets una gran persona...! A l'August Vidal pel temps i treball que ha dedicat per l'obtenció de mostres del Hospital de Bellvitge, sempre amb una gran amabilitat i amb un sentit de l'humor insuperable. Agrair especialment al meu gran amic i col·laborador Alberto Villanueva, a qui vull donar les gràcies per iniciar-me en el món dels "animals", ajudant-me en tot i per tot, amb una predisposició única, compartint moments excepcionals i sempre endolçats amb "bona vibra". Milions de gràcies per tot Alberto!!!!

Als tècnics dels Serveis Científicotècnics per passar gran moments "experimentals" junts: A l'Eva, a l'Esther Castaño: per instruir-me en moltes tècniques i acompanyar-me al citòmetre! Al Benja: persona optimista i feliç que sempre sap despertar somriures! Gràcies per fer tant amenes i divertides les estones al confocal!

Durant tota la vida he tingut l'ajuda i companyia de molta gent, amics amb els que he compartit moltíssim; ja sigui amics de l'escola, de l'institut o de la Universitat.

Voldria agrair a una persona que fa anys em va aproximar a la biologia i ho va fer d'una manera ben encantadora, acompanyada de tocs de guitarra i poemes de Serrat! Un gran amant de la biologia i de la vida: al meu professor i amic, Antoni Parra.

Agrair als meus millors amics i confessors, la Sandra i el Fidel. Ells em coneixen tal com sóc, m'acompanyen amb els èxits i fracassos, cel·lebren les meves alegries, i comparteixen el meu dolor sense jutjar mai els errors que cometo. Gràcies per ser com sou!

Especialment voldria agrair a una de les persones que més m'han recolzat en aquesta aventura, sobretot a l'etapa final. Rodrigo, gràcies per compartir amb mi un moment tant difícil, gràcies per donar-me la força, energia, ànims, carinyo i amor que tant m'han ajudat en aquest moment! Gràcies per acollir-me a casa teva, un espai

meravellós a la gran ciutat de Mèxic, i per haver realitzat viatges transatlàntics per poder estar al meu costat. Ara a continuar amb el nostre camí, a seguir madurant aquesta relació tant bonica i vertadera que tenim en alguna part del món, ja sigui a la teva o a la meva terra, però sempre junts!

I per últim, a una persona pròxima a mi que en aquests moments està lluitant per combatre el càncer, i ho està fent amb el fàrmac amb el que jo he treballat en aquesta tesi: el cisplatí. Esteve, tinc la certesa que et curaràs, tiraràs endavant, i seguiràs sent la persona energètica i feliç que sempre has estat!

Dedico aquest treball a totes les persones que han lluitat i que lluitaran contra aquesta malaltia tant imponent: el càncer. Em sento orgullosa d'haver realitzat aquest treball perquè sé que investigacions com aquesta algun dia ajudaran a moltes persones a combatre aquesta devastadora malaltia. A tots vosaltres!

# ÍNDIX

<b>RESUM</b> .....	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>5</b>
1 Càncer d'ovari: generalitats .....	5
1.1 Definició i epidemiologia.....	5
1.2 Etiologia.....	6
1.3 Classificació dels tumors d'ovari .....	8
1.4 Alteracions genètiques i epigenètiques del CaOV .....	12
1.5 Biomarcadors moleculars del CaOV epitelial .....	14
2 Tractament del CaOV .....	20
2.1 La cirurgia en CaOV .....	20
2.2 La quimioteràpia en CaOV .....	20
2.2.1 Els taxans (paclitaxel) .....	21
2.2.2 Els platins (cisplatí).....	22
2.2.2.1 Formació d'adductes.....	23
2.2.2.2 Reconeixement del dany del DNA .....	25
2.2.2.3 Cisplatí i cicle cel·lular .....	26
2.2.2.4 Cisplatí i mort cel·lular .....	30
2.2.2.5 Cisplatí i dany: Paper de H2AX .....	33
2.3 Resistència al tractament amb cisplatí .....	35
3 Mecanismes d'activació de l'apoptosi .....	41
3.1 Les caspases .....	43
3.1.1 Vies d'activació de les caspases .....	44
3.1.2 Inhibició de les caspases: Família de les IAP .....	50
3.1.2.1 La Survivina .....	51
Regulació de la Survivina.....	52
Funcions de la Survivina.....	53
Survivina i resistència al tractament.....	55
3.1.3 Paper de p53 en la regulació de l'apoptosi.....	57
3.1.3.1 Estructura i funció de p53 .....	58
3.1.3.2 Regulació de p53 a través de la interacció amb Mdm2.....	59
3.1.3.3 Mecanismes d'estabilització i activació de p53 .....	61
3.1.3.4 Dianes moleculars de p53 .....	61
4 Estratègies per sensibilitzar les cèl·lules tumorals: tractaments combinats .....	62
4.1 Inhibició de la interacció entre p53 i Mdm2: Nutlines .....	62
4.1.1 Mecanisme d'acció de les nutlines .....	64
4.1.2 Nutlines i cisplatí .....	66
4.2 Molècules inhibidores de la Survivina: YM155 .....	67
4.2.1 Mecanisme d'acció de l'YM155 .....	69
4.2.2 YM155 i cisplatí .....	72
<b>OBJECTIUS</b> .....	<b>73</b>

<b>MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>75</b>
1 Cultius cel·lulars .....	75
1.1 Recollida de mostres de pacients .....	75
1.2 Establiment de cultius primaris de CaOV.....	76
1.2.1 Tumors sòlids .....	76
1.2.2 Líquid ascític (LASC).....	77
1.3 Manteniment dels cultius primaris de CaOV .....	78
1.4 Enriquiment dels cultius primaris de CaOV amb cèl·lules epitelials.....	79
1.4.1 Anticòs 1B10 ( <i>Anti-Fibroblast Surface Protein</i> ).....	79
1.4.2 Tripsinització selectiva .....	81
1.5 Ús de línies cel·lulars de CaOV .....	82
1.6 Criopreservació i descongelació de línies i cultius primaris de CaOV.....	83
1.7 Seguretat .....	83
2 Obtenció de mostres congelades.....	84
3 Biologia cel·lular .....	84
3.1 Anàlisi de la viabilitat cel·lular i apoptosi.....	84
3.1.1 Anàlisi de la viabilitat per MTT.....	84
3.1.2 Anàlisi de la viabilitat per citometria de flux .....	85
3.2 Anàlisi de cicle cel·lular i pic subdiploid per citometria de flux.....	89
3.3 Anàlisi de l'apoptosi, dany al DNA i proliferació cel·lular mitjançant citometria de flux.....	90
3.4 Anàlisi de senescència cel·lular .....	92
4 Biologia molecular.....	93
4.1 Anàlisi de DNA.....	93
4.1.1 Extracció de DNA.....	93
4.1.2 Quantificació de DNA.....	94
4.1.3 Mètode de MLPA ( <i>Multiplex Ligase-dependent Probe Amplification</i> ) ..	94
4.2 Anàlisi del RNA .....	96
4.2.1 Extracció de RNA .....	96
4.2.2 Quantificació de RNA .....	97
4.2.3 PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR).....	97
4.2.4 <i>TaqMan Low Density Array</i> (TLDA) .....	98
4.2.5 Mètode de RT-MLPA ( <i>Multiplex Ligase-dependent Probe Amplification</i> ) .....	99
4.2.6 Seqüenciació de TP53 .....	100
4.3 Anàlisi de proteïnes.....	101
4.3.1 Extracció de proteïnes.....	101
4.3.2 Quantificació de proteïnes.....	101
4.3.3 Anàlisi de proteïnes mitjançant <i>Western blot</i> .....	102
4.3.4 Anàlisi de proteïnes mitjançant Immunofluorescència .....	105
4.3.5 Anàlisi de proteïnes mitjançant immunohistoquímica de teixit parafinat.....	108
5 Vectors d'expressió gènica.....	110
5.1 Transfecció cel·lular .....	110
5.1.1 Sobreexpressió de Survivina .....	110
5.1.2 Transfecció amb siRNA.....	112

5.2 Transformació bacteriana .....	114
5.2.1 Inoculació de colònies bacterianes recombinades a un medi de cultiu líquid.....	115
5.2.2 Extracció i purificació del plasmidi amb l'insert d'interès: <i>Maxi-prep</i> .....	115
6 Estudis <i>in vivo</i> .....	115
6.1 Animals .....	116
6.2 Recepció, readaptació i distribució per grups.....	116
6.3 Condicions de manteniment .....	116
6.4 Inoculació de línies cel·lulars als <i>nude mice</i> .....	116
6.5 Tractament .....	117
6.6 Determinacions realitzades.....	119
6.6.1 Observacions clíniques.....	119
6.6.2 Mesures del tumor.....	119
6.6.3 Exàmens de patologia .....	120
7 Anàlisi de dades i estadística.....	120

## **RESULTATS.....124**

Objectiu 1. Establiment de cultius primaris de càncer d'ovari a partir de mostres tumorals humanes .....	124
1.1 Introducció als cultius primaris .....	124
1.2 Característiques histològiques i estadis dels cultius primaris establerts	125
1.2.1 Obtenció de diferents tipus histològics a partir de mostres de tumor sòlid i LASC. ....	125
1.2.2 Obtenció de mostres de CaOV de diferent estadi tumoral .....	126
1.3 Factors limitants per l'establiment de cultius primaris de CaOV .....	127
1.3.1 Factors limitants dependents de la mostra .....	128
1.3.2 Factors limitants independents de la mostra .....	132
1.4 Establiment de cultius primaris de CaOV a partir de mostres tumorals sòlides i LASCs .....	132
1.4.1 Protocol per l'establiment dels cultius primaris de CaOV .....	132
1.4.2 Morfologia dels cultius primaris .....	136
1.4.3 Manteniment i criopreservació dels cultius primaris .....	137
1.4.4 Caracterització dels cultius primaris .....	144
Objectiu 2. Efecte de la Nutlina-3a (Nut3a) en línies cel·lulars i cultius primaris de CaOV .....	149
2.1 Introducció .....	149
2.2 Efecte de la Nut3a en línies cel·lulars .....	149
2.2.1 Disminució de viabilitat i aturada de cicle cel·lular a G2/M .....	149
2.2.2 Potenciació de l'efecte del cisplatí.....	155
2.2.3 Efecte de la Nutlina-3b (Nut3b) en les línies cel·lulars .....	159
2.2.4 Anàlisi dels gens pro- i anti-apoptòtics després dels tractaments simples i doble tractament .....	160
2.2.5 Anàlisi de les proteïnes induïdes després dels tractaments simples i doble tractament .....	162

2.2.6	Silenciació de p53 amb els tractaments simples i doble tractament ....	163
2.2.7	Expressió ectòpica de Survivina amb els tractaments simples i doble tractament .....	166
2.2.8	Silenciació de Survivina amb el tractament amb cisplatí.....	170
2.2.9	Anàlisi de la senescència després dels tractaments simples i doble tractament .....	173
2.3	Efecte de la Nut3a en cultius primaris .....	176
2.3.1	Sensibilització dels cultius primaris al cisplatí.....	176
2.3.2	Inducció de senescència després dels tractaments simples i doble tractament .....	178
2.3.3	Anàlisi dels gens pro- i anti-apoptòtics en els cultius primaris després dels tractaments simples i doble tractament .....	183
2.3.4	Expressió proteica dels cultius primaris després dels tractaments simples i doble tractament .....	184
Objectiu 3.	Efecte de l'inhibidor de la Survivina YM155 en línies cel·lulars, cultius primaris i xenoinjerts de CaOV.....	185
3.1	Introducció .....	185
3.2	Efecte de l'YM155 en línies cel·lulars.....	186
3.2.1	Disminució de la viabilitat cel·lular de forma dosi/temps dependent ..	186
3.2.2	Inducció d'apoptosi.....	187
3.2.3	Canvis en el patró del cicle cel·lular .....	189
3.2.4	Disminució de l'expressió de Survivina temps-dependent.....	191
3.2.5	Inhibició específica en l'expressió proteica de Survivina.....	193
3.2.6	Potenciació de l'efecte del cisplatí.....	195
3.2.7	Estudi del cicle cel·lular després dels tractaments simples i doble tractament .....	201
3.2.8	Anàlisi dels gens pro- i anti-apoptòtics després dels tractaments simples i doble tractament .....	203
3.2.9	Anàlisi de les proteïnes induïdes després dels tractaments simples i doble tractament .....	205
3.2.10	Reversió de l'apoptosi induïda per l'YM155 i doble tractament .....	207
3.2.11	Anàlisi de la senescència després dels tractaments simples i doble tractament .....	210
3.2.12	Efecte del doble tractament cisplatí i YM155 en la reparació del DNA. ....	213
3.2.13	Expressió de gens de detecció de dany i de reparació amb el tractament amb l'YM155 .....	218
3.2.14	Estudi conjunt de l'apoptosi, dany i proliferació cel·lular amb el tractament amb l'YM155 .....	220
3.3	Efecte de l'YM155 en cultius primaris .....	222
3.3.1	Sensibilització dels cultius primaris al cisplatí.....	222
3.3.2	Inducció de senescència després dels tractaments simples i doble tractament .....	224

3.3.3	Anàlisi dels gens pro-apoptòtics i anti-apoptòtics després dels tractaments simples i doble tractament.....	229
3.3.4	Expressió proteica dels cultius primaris després dels tractaments simples i doble tractament .....	231
3.4	Efecte de l'YM155 en xenoinjerts .....	232
3.4.1	Efecte dels tractaments simples i doble tractament en els ratolins amb xenoinjerts.....	233
3.4.2	MLPA dels xenoinjerts dels ratolins després dels tractaments simples i doble tractament.....	237
3.4.3	Expressió proteica dels xenoinjerts després dels tractaments simples i doble tractament.....	239
3.4.4	Anàlisi per immunohistoquímica dels xenoinjerts després dels tractaments simples i doble tractament.....	241
<b>DISCUSSIÓ .....</b>		<b>247</b>
1	Establiment de cultius primaris de CaOV a partir de mostres tumorals humanes .....	247
2	Efecte de la Nutlina-3a (Nut3a) en línies cel·lulars i cultius primaris de CaOV ....	258
3	Determinar l'efecte de l'inhibidor de Survivina YM155 en línies cel·lulars, cultius primaris i xenoinjerts de CaOV.....	267
<b>CONCLUSIONS.....</b>		<b>283</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>		<b>285</b>
<b>ABREVIACIONS.....</b>		<b>319</b>
<b>ARTICLE.....</b>		<b>322</b>





# ÍNDIX DE FIGURES I TAULES

## INTRODUCCIÓ:

Figura 1.	Localització dels ovaris a l'aparell genital femení.....	6
Figura 2.	Representació esquemàtica de l'anatomia de l'ovari.....	8
Figura 3.	Tipus histològics més freqüents dels carcinomes d'ovari.....	10
Figura 4.	Via de senyalització de RAS-RAF-MEK-ERK..	15
Figura 5.	Il·lustració esquemàtica de la senyalització de PI3K/PTEN.....	16
Figura 6.	Via de senyalització de p53.....	18
Figura 7.	Tractaments alternatius als derivats del platí pel CaOV refractari.....	21
Figura 8.	Vies de senyalització del paclitaxel (Tx).....	22
Figura 9.	Estructura molecular de molècules anticancerígenes derivades del platí	23
Figura 10.	Transport cel·lular del CDDP.....	24
Figura 11.	Formació d'adductes per part del CDDP.....	25
Figura 12.	Reconeixement dels adductes de DNA-platí.....	26
Figura 13.	Components dels punts de control de dany al DNA ..	27
Figura 14.	Efectes del CDDP en el cicle cel·lular ..	28
Figura 15.	Regulació de la fase G2/M. ....	29
Figura 16.	Regulació de la fase G1/S.....	30
Figura 17.	Vies de mort induïdes pel CDDP. ....	31
Figura 18.	Efectes del CDDP i vies cel·lulars implicades. ....	32
Figura 19.	Via de senyalització de H2AX .....	34
Figura 20.	Mecanismes de resistència al CDDP. ....	36
Figura 21.	Mecanismes involucrats en la inhibició de la via apoptòtica en cèl·lules resistents al CDDP. ....	39
Figura 22.	Ruptura de la via d'apoptosi p53 dependent en cèl·lules resistents al CDDP.....	39
Figura 23.	Canvis morfològics i bioquímics produïts durant l'apoptosi.....	42
Figura 24.	Processament de la pro-caspasa a caspasa madura,.....	43
Figura 25.	Activació de la via extrínseca de l'apoptosi. ....	45
Figura 26.	Esquema de la via intrínseca o mitocondrial de l'apoptosi. ....	47
Figura 27.	Model de les vies de senyalització que efectuen l'apoptosi - .....	47
Figura 28.	Membres de la família de Bcl-2. ....	49
Figura 29.	Diferents perfils d'unió i de potència apoptòtica de les proteïnes Bh3- <i>only</i> .....	49
Figura 30.	Membres de la família de les IAP i els seus dominis característics. ....	50
Figura 31.	Regulació de Survivina a nivell transcripcional i post-traducciona.....	53
Figura 32.	Survivina en la mitosi .....	54
Figura 33.	Survivina en l'apoptosi.....	55
Figura 34.	Dominis de la proteïna p53.....	59
Figura 35.	Regulació de p53 per Mdm2.....	60
Figura 36.	Aspectes estructurals de la interacció p53-Mdm2. ....	60
Figura 37.	Diversitat de senyals que porten a l'activació de p53 .....	61
Figura 38.	Via de p53.....	62
Figura 39.	Estructura molecular de la Nutlina-1,-2,-3.....	63

Figura 40.	Mecanisme d'acció de la Nutlina. ....	64
Figura 41.	Estructura química de l'YM155 .....	68
Figura 42.	Paper del complex ILF3/p54 <sup>NRB</sup> en la transcripció de la Survivina regulada per l'YM155 .....	70

Taula 1.	Freqüències relatives dels tipus de carcinoma d'ovari .....	10
Taula 2.	Estadis del CaOV segons la Federació Internacional de Ginecologia i Obstetria (FIGO).....	11
Taula 3.	Distribució dels estadis dels tipus histològics de carcinoma d'ovari. ....	11
Taula 4.	Anomalies genètiques i epigenètiques del CaOV .....	13
Taula 5.	Perfil de mutacions dels diferents subtipus histològics de CaOV .....	19
Taula 6.	Survivina i càncer. Expressió de la Survivina en càncers humans .....	56

## **MATERIALS I MÈTODES**

Figura M1.	Establiment de cultius primaris de CaOV a partir de mostra sòlida. ....	77
Figura M2.	Esquema del funcionament del FACSCalibur .....	86
Figura M3.	Esquema representatiu de l'anàlisi d'inducció d'apoptosi per marcatge cel·lular amb Annexina V.....	87
Figura M4.	Anàlisi per citometria de flux. ....	88
Figura M5.	Representació de les fases del cicle cel·lular. ....	89
Figura M6.	Esquema dels passos que es realitzen en la tècnica del RT-MLPA. ....	95
Figura M7.	Esquema de la placaTLDA., assaig TaqMan .....	99
Figura M8.	Esquema del <i>cassete</i> del <i>western blot</i> . ....	105
Figura M9.	Imatge de la immunofluorescència analitzada per citometria de flux	108
Figura M10.	Esquema del plasmidi pcDNA3 .....	112
Figura M11.	Bombes Alzet de 7 dies. ....	118
Figura M12.	Esquema del tractament amb CDDP i YM155 durant 7 dies. ....	118
Figura M13.	Mida de tumor al moment d'iniciar tractament.....	119

Taula M1.	Relació dels gens analitzats amb els <i>kits</i> de MLPA P037 i P038.. ....	96
Taula M2.	Anticossos utilitzats per la immunohistoquímica de teixit parafinat. .	110
Taula M3.	Anticossos primaris utilitzats per <i>western blot</i> .....	121
Taula M4.	Anticossos secundaris utilitzats per <i>western blot</i> .....	121
Taula M5.	Anticossos utilitzats per immunofluorescència .....	121
Taula M6.	Principals tampons i solucions utilitzats. ....	122
Taula M7.	Productes .....	123

## **RESULTATS**

### **OBJECTIU 1:**

Figura R1.1.	Cultius primaris de CaOV establerts a partir de tumor sòlid i de líquid ascític (LASC). ....	126
Figura R1.2.	Percentatge dels estadis FIGO de les mostres obtingudes a partir de tumor sòlid de CaOV epitelial. ....	127
Figura R1.3.	Percentatge dels estadis FIGO segons el tipus histològic de les mostres obtingudes a partir de mostres tumorals de CaOV. ....	127
Figura R1.4.	Èxit dels cultius primaris. ....	128
Figura R1.5.	Pesos de les mostres tumorals.....	129
Figura R1.6.	Imatges representatives de cultius primaris de CaOV.....	130
Figura R1.7.	Imatges representatives de senescència cel·lular dels cultius primaris de CaOV.....	131
Figura R1.8.	Cultius primaris establerts a partir de mostra tumoral sòlida.....	134
Figura R1.9.	Cultius primaris establerts a partir.....	135
Figura R1.10.	Formació de petits botons ( <i>clusters</i> ) .....	136
Figura R1.11.	Morfologies típiques dels cultius primaris de CaOV .....	137
Figura R1.12.	Tractament amb l'anticòs 1B10. ....	140
Figura R1.13.	Enriquiment de cèl·lules epitelials dels cultius primaris mitjançant la tripsinització selectiva. ....	142
Figura R1.14.	Immunofluorescència amb l'anticòs Calretinina .....	143
Figura R1.15.	Èxit del procés de congelació.....	144
Figura R1.16.	Caracterització dels cultius primaris amb CAM 5.2 .....	145
Figura R1.17.	Caracterització dels cultius primaris .....	146
Figura R1.18.	Doble immunofluorescència amb CAM 5.2 i Vimentina.....	147
Figura R1.19.	Caracterització gènica dels cultius primaris.....	148

### **OBJECTIU 2**

Figura R2.1.	Anàlisi de la viabilitat cel·lular per assaig de MTT de les línies cel·lulars de CaOV .....	151
Figura R2.2.	Esquema dels tractaments simples i doble tractament .....	152
Figura R2.3.	Viabilitat i cicle cel·lular de les línies cel·lulars després dels tractaments simples i doble tractament a diferents temps. ....	154
Figura R2.4.	Estudi del sinergisme. ....	155
Figura R2.5.	Inducció d'apoptosi de les línies cel·lulars després dels tractaments simples i doble tractament .....	156
Figura R2.6.	Morfologia cel·lular de les línies cel·lulars després dels tractaments simples i doble tractament. ....	157
Figura R2.7.	Anàlisi del cicle cel·lular de les línies cel·lulars després dels tractaments simples i doble tractament.....	158

Figura R2.8.	Contatge cel·lular i inducció d'apoptosi de les línies cel·lulars després dels tractaments simples i doble tractament amb Nut3b. ....	160
Figura R2.9.	Anàlisi dels nivells d'expressió del mRNA dels gens implicats en el mecanisme d'apoptosi .....	161
Figura R2.10.	Efecte dels tractaments simples i doble tractament a les línies cel·lulars. ....	163
Figura R2.11.	<i>Western blot</i> i anàlisi de l'apoptosi de les línies cel·lulars transfectades amb siRNA de p53 i posteriors tractaments. ....	165
Figura R2.12.	Morfologia cel·lular de les línies transfectades amb siRNA de p53 i tractades amb tractaments simples i doble tractament .....	166
Figura R2.13.	Transfecció de les línies cel·lulars amb el gen reporter GFP. ....	167
Figura R2.14.	<i>Western blot</i> i anàlisi de l'apoptosi de les línies amb expressió ectòpica de Survivina i posteriors tractaments. ....	169
Figura R2.15.	Morfologia cel·lular de les línies cel·lulars transfectades amb Survivina ectòpica i tractades amb els tractaments simples i doble tractament. ....	170
Figura R2.16.	Expressió de Survivina a les línies cel·lulars transfectades amb diferents siRNA de Survivina .....	171
Figura R2.17.	Apoptosi de les línies cel·lulars transfectades amb siRNA de Survivina i posterior tractament amb CDDP.....	172
Figura R2.18.	Morfologia cel·lular de les línies transfectades amb siRNA de Survivina i tractades amb CDDP.....	173
Figura R2.19.	Anàlisi de la senescència cel·lular de les línies de CaOV.....	175
Figura R2.20.	Cultius primaris usats pels tractaments amb Nut3a.....	176
Figura R2.21.	Canvis morfològics dels cultius primaris amb els tractaments simples i doble tractament.....	177
Figura R2.22.	Contatge cel·lular i inducció d'apoptosi dels cultius primaris després dels tractaments simples i doble tractament. ....	178
Figura R2.23.	Anàlisi de la senescència cel·lular dels cultius primaris després dels tractaments simples i doble tractament.....	180
Figura R2.24.	Senescència cel·lular dels cultius primaris després dels tractaments simples i doble tractament a les 72 hores .....	181
Figura R2.25.	Senescència cel·lular dels cultius primaris després dels tractaments simples i doble tractament a 72 hores + 4 dies de rentat. ....	182
Figura R2.26.	MLPA dels cultius primaris després dels tractaments simples i doble tractament. ....	183
Figura R2.27.	Efecte dels tractaments simples i doble tractament a cultius primaris de CaOV. ....	184

### **OBJECTIU 3**

Figura R3.1.	Viabilitat cel·lular per assaig de MTT en línies cel·lulars de CaOV tractades amb YM155.. ....	186
Figura R3.2.	Canvis morfològics de les A2780p i A2780cis després de 48 hores d'exposició amb dosis creixents d'YM155 .....	187

Figura R3.3.	Contatge cel·lular després del tractament amb YM155 de les línies cel·lulars de CaOV .....	188
Figura R3.4.	Inducció d'apoptosi després del tractament amb YM155 en línies cel·lulars de CaOV. ....	189
Figura R3.5.	Cicle cel·lular després del tractament amb YM155. ....	190
Figura R3.6.	Efecte de l'YM155 en l'expressió del RNA i dels nivells proteics de Survivina a les línies A2780p i A2780cis.....	192
Figura R3.7.	Efecte de l'YM155 en l'expressió proteica de Survivina a les línies.	194
Figura R3.8.	Estudi del sinergisme entre el CDDP i l'YM155 mitjançant l'Índex de Combinació (CI).. ....	197
Figura R3.9.	Esquema dels tractaments simples i doble tractament. ....	198
Figura R3.10.	Contatge cel·lular de les línies de CaOV després de ser tractades amb CDDP i YM155. ....	199
Figura R3.11.	Morfologia de les línies de CaOV després de ser tractades amb CDDP i YM155. ....	200
Figura R3.12.	Inducció d'apoptosi en línies cel·lulars de CaOV després de ser tractades amb CDDP i YM155 .....	200
Figura R3.13.	Cicle cel·lular de les línies de CaOV després de ser tractades amb CDDP i YM155. ....	202
Figura R3.14.	Anàlisi dels nivells d'expressió del mRNA d'alguns dels gens implicats en el mecanisme d'apoptosi. ....	204
Figura R3.15.	Efecte dels tractaments simples i doble tractament a les línies.....	207
Figura R3.16.	Morfologia de les línies pre-incubades amb QVD i tractades amb CDDP i YM155 .....	208
Figura R3.17.	Apoptosi de les línies sense o pre-incubades amb QVD i tractades amb CDDP i YM155.. ....	209
Figura R3.18.	Efecte de l'inhibidor QVD amb els tractaments simples i doble tractament .....	210
Figura R3.19.	Anàlisi de la senescència cel·lular de les línies de CaOV després de ser tractades amb CDDP i YM155.. ....	212
Figura R3.20.	Efecte del CDDP en la formació de focis $\gamma$ H2AX a les línies de CaOV ....	214
Figura R3.21.	Efecte dels tractaments simples i doble tractament en la reparació del DNA. ....	215
Figura R3.22.	Efecte dels tractaments simples i doble tractament en la reparació del DNA mitjançant el contatge de focis $\gamma$ H2AX.....	216
Figura R3.23.	Efecte dels tractaments simples i doble tractament en la formació de focis $\gamma$ H2AX a les línies de CaOV.. ....	217
Figura R3.24.	Efecte de l'YM155 en l'expressió dels gens de reparació de DSB a les línies .....	219
Figura R3.25.	Efecte de YM155 en la proliferació cel·lular, el dany al DNA i l'apoptosi a les línies cel·lulars de CaOV.....	221
Figura R3.26.	Canvis morfològics dels cultius primaris de CaOV després de ser incubats amb CDDP i YM155.....	223
Figura R3.27.	Efecte del CDDP, YM155 i doble tractament en cultius primaris de CaOV. ....	224

Figura R3.28.	Anàlisi de la senescència cel·lular dels cultius primaris de CaOV després de ser tractats amb CDDP i YM155..	226
Figura R3.29.	Anàlisi de la senescència cel·lular dels cultius primaris de CaOV....	227
Figura R3.30.	Contatge cel·lular, apoptosi i senescència dels cultius primaris després de ser tractats amb CDDP i YM155..	228
Figura R3.31.	Anàlisi dels nivells d'expressió del mRNA dels gens implicats en el mecanisme d'apoptosi mitjançant RT-MLPA.....	230
Figura R3.32.	Efecte dels tractaments simples i doble tractament en els cultius primaris de CaOV..	232
Figura R3.33.	Esquema del tractament amb CDDP i YM155 durant 7 dies..	234
Figura R3.34.	Pes dels ratolins després dels tractaments simples i doble tractament	235
Figura R3.35.	Mida dels tumors de CaOV després dels tractaments simples i doble tractament	236
Figura R3.36.	Mida dels tumors dels ratolins A2780cis després dels tractaments simples i doble tractament..	237
Figura R3.37.	MLPA dels tumors dels ratolins després dels tractaments simples i doble tractament.	239
Figura R3.38.	Expressió proteica dels tumors dels ratolins després dels tractaments simples i doble tractament...	240
Figura R3.39.	Marcatge de Survivina dels tumors dels ratolins després dels tractaments simples i doble tractament.....	242
Figura R3.40.	Marcatge de caspasa 3 dels tumors dels ratolins després dels tractaments simples i doble tractament.....	244
Figura R3.41.	<i>Immunoreactivity Score</i> (IRS) de Survivina i caspasa 3 .....	246

## DISCUSSIÓ

Figura D3.1: Models del mecanisme d'acció de l'YM155 en el doble tractament a les línies de CaOV.....	276
---	-----

RESUM





## RESUM

El càncer d'ovari (CaOV) és el quart càncer ginecològic més comú després del càncer de mama, endometri i cèrvix i representa la cinquena causa de mort per càncer en la població femenina. El CaOV epitelial (EOC) representa el 90% de tots els tumors ovàrics i és el més letal, amb una mort anual mundial de 115.000 dones, aproximadament. La majoria de les pacients amb CaOV es diagnostiquen quan la malaltia està molt avançada. El tractament es basa en citorreducció quirúrgica seguit de quimioteràpia basada en platí i taxans, però la majoria de les pacients presenten recurrència i acaben morint a conseqüència de la metastasi. El cisplatí (CDDP) és l'agent citotòxic utilitzat en la teràpia del CaOV, però genera quimioresistència, l'obstacle més gran per tractar les pacients amb la malaltia recurrent. Les proteïnes de resistència MDR (*Multidrug resistant proteins*), els processos de reparació NER o *Mismatch Repair* i les alteracions de la via de p53, són exemples de mecanismes que poden adquirir les cèl·lules tumorals resistents al CDDP.

L'objectiu del present estudi ha estat comprendre els mecanismes de quimioresistència al CDDP del CaOV humà. L'estudi s'ha centrat en la combinació de nous fàrmacs amb el CDDP per sensibilitzar les cèl·lules resistents al CDDP.

Es van establir cultius primaris de CaOV com a model *ex vivo* per analitzar la resposta als nous tractaments, amb origen tant de tumors sòlids com de líquid ascític (LASC). La majoria de mostres processades van ser viables, van créixer amb èxit i es van poder congelar per l'ús experimental.

El CDDP és un fàrmac genotòxic que dirigeix a les cèl·lules cap a apoptosi a través de l'activació de la via de p53. Una senyalització defectuosa en aquesta via, compromet la funció de p53, i com a conseqüència el CDDP no indueix apoptosi. Un nou grup de molècules petites no genotòxiques, les Nutlines (Nut3a) han estat desenvolupades per inhibir la unió de p53-Mdm2, induint apoptosi en tumors quimiorresistents a través de l'activació de la via de p53. En el present estudi, Nut3a es va usar per sensibilitzar la línia cel·lular resistent A2780cis al CDDP. Els resultats van mostrar que Nut3a actuava de forma sinèrgica amb el CDDP, induint aturada a la fase

G2/M del cicle cel·lular i potenciant la mort cel·lular per apoptosi de la línia resistent A2780cis. A més, la combinació de CDDP+Nut3a també va induir apoptosi i senescència als cultius primaris amb p53 salvatge. Com a conclusió, la Nut3a sensibilitzava a les cèl·lules de CaOV quimiorresistents al CDDP, augmentant l'apoptosi a les línies cel·lulars i als cultius primaris de CaOV. Juntament amb la inducció d'apoptosi es va trobar una disminució del gen Survivina.

Survivina, membre de la família de proteïnes anti-apoptòtiques (IAP) es troba altament expressada en tots tipus de tumors i absent en teixits adults diferenciats normals, i és responsable de la progressió del càncer i resistència a fàrmacs en molts tipus de càncer. L'YM155, és un petit compost que inhibeix selectivament l'expressió del promotor de la Survivina induint apoptosi a cèl·lules tumorals *in vitro* i *in vivo*. Estudis suggereixen que l'YM155 també és un agent que genera dany al DNA. En el present treball, es va determinar l'eficàcia de l'YM155 en combinació amb el CDDP *in vitro* i *in vivo*. Els resultats van mostrar que l'YM155 combinat amb el CDDP va induir aturada en G2/M del cicle cel·lular, apoptosi i augment del dany al DNA a la línia A2780cis, sensibilitzant les cèl·lules al CDDP. De la mateixa manera, la combinació de l'YM155 amb el CDDP va sensibilitzar als cultius primaris de CaOV al CDDP induint també apoptosi i senescència. Treballs *in vivo* mostren com la combinació de CDDP i YM155 va disminuir significativament la mida tumoral dels xenoinjerts de CaOV, i va ser ben tolerat pels ratolins.

Els nostres resultats suggereixen que les combinacions de Nut3a i/o YM155 amb el CDDP podrien ser una bona opció per la teràpia de CaOV resistent al CDDP, éssent la combinació amb la Nut3a exclusiva pels tumors amb p53 salvatge, i amb l'YM155 independent de l'estat de p53.

## **SUMMARY**

Ovarian cancer (OVCa) is the fourth most common gynecological cancer followed by breast, endometrial and cervical cancer, representing the fifth cause of death for cancer in female population. Epithelial OVCa (EOC) represents 90% of all ovarian tumors and is the most lethal, killing approximately 115.000 women annually world-wide. The majority of patients with EOC are diagnosed with advanced disease, and managed with surgical cytoreduction followed by platinum and taxane-based chemotherapy, but the majority of them will eventually suffer from recurrence of disease and death as a consequence of metastasis. Cisplatin (CDDP) is the cytotoxic agent used in OVCa as therapy, but it leads to chemoresistance, the largest obstacle in treating patients with recurrent disease. Multidrug Resistance Proteins (MDR), Mismatch Repair processes and alterations in the p53 pathway are examples of properties within tumor cells that may lead to CDDP resistance.

The aim of the present study has been to understand the mechanisms of human epithelial OVCa chemoresistance to CDDP. The study was focused in the combination of novel drugs with CDDP to sensitize OVCa resistant cells to the chemotherapeutic agent.

OVCa primary cell culture was established as an *ex vivo* model for analyzing the response to new treatments. Primary cell cultures were obtained from both solid tumors and ascites (LASC). The majorities of samples processed were viable, growth successfully and could be frozen for experimental use.

CDDP is a genotoxic drug that leads cells to apoptosi through the activation of the p53 pathway. Defective signaling in this pathway compromises p53 function, and thus CDDP does not induce apoptosi. A new group of non-genotoxic small molecules called Nutlins (Nut3a) have been developed to inhibit p53-Mdm2 binding, inducing apoptosi in chemoresistant tumors through the activation of the p53 pathway. In the present study, Nut3a was used to sensitize the resistant OVCA cell line A2780cis to CDDP. The results showed that Nut3a synergized with CDDP, inducing cell cycle arrest in G2/M and potentiating apoptotic cell death in the A2780cis resistant cell line. In

addition, the combination CDDP+Nut3a also induced apoptosis and senescence in wild type *TP53* primary cell cultures. Nut3a sensitized chemoresistant OVCa cells to CDDP, increasing apoptosis both in cell lines and in primary tumor cell lines. Together with the induction of apoptosis, there was a decrease of the Survivin gene.

Survivin, a member of the anti-apoptotic protein family (IAP), is highly expressed in all types of tumor and is missing in normal differentiated adult tissues, and it is responsible for cancer progression and drug resistance in many types of cancer. YM155 is a small chemical compound that selectively suppresses the Survivin promoter, inducing apoptosis in cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. Studies also suggest that YM155 is a DNA damaging agent. In the present study, the efficacy of YM155 in combination with CDDP was determined both *in vitro* and *in vivo*. The results showed that YM155 combined with CDDP induced G2/M cell cycle arrest, apoptosis and increased DNA damage in the A2780cis resistant cell line sensitizing these cells to CDDP. Additionally, YM155 in combination with CDDP sensitized primary cell cultures to CDDP inducing apoptosis and senescence. Studies *in vivo* show how the CDDP+YM155 combination significantly decreased the tumor size of the OVCa xenografts, being well tolerated by mice.

Our results suggested that the combination of Nut3a and/or YM155 with CDDP could be a good option for the therapy of CDDP resistant OVCa, being the Nut3a combination exclusive for wild type p53 tumors, and YM155 combination independently of p53 status.

# INTRODUCCIÓ



# INTRODUCCIÓ

## 1 Càncer d'ovari: generalitats

### 1.1 Definició i epidemiologia

El càncer d'ovari (CaOV) abarca tots aquells tumors malignes ubicats a l'ovari o bé amb origen en aquest. És el quart càncer ginecològic més freqüent (precedit del càncer de mama, endometri i cèrvix), i el que causa més mortalitat en càncers ginecològics en dones a Europa i Estats Units degut al mal pronòstic de la malaltia. Representa la cinquena causa de mort per càncer a la població femenina (Siegel *et al.* 2012). La seva incidència és de 12-17 casos per cada 100.000 dones per any, sent superior al nord d'Europa i Estats Units que a Àsia o Àfrica. Cada any es diagnostiquen 225.000 nous casos i es produeixen 140.000 morts a tot el món (Globocan 2008). A Espanya es diagnostiquen uns 3.300 casos anuals, el que representa el 5,1% dels càncers entre les dones (AECC). La incidència a Espanya es pot considerar elevada, amb una taxa de 8 nous casos/100.000 habitants/any (Globocan 2008). Només un 44% de les pacients diagnosticades amb CaOV a Espanya, sobreviuen més enllà dels 5 anys (AECC).

La baixa supervivència associada al CaOV és deguda a que les pacients es diagnostiquen en un estadi avançat de la malaltia donat que és un tumor intraabdominal que creix silenciosament i a més, fins al moment no hi ha un mètode de diagnòstic que pugui ser utilitzat com a *screening* per detectar estadis precoços. En aquest sentit, en el moment del diagnòstic aproximadament un 75-80% de les pacients presenten el tumor en estadi avançat (amb metàstasi més enllà dels ovaris) i presenten una supervivència als 5 anys del 30%. Tan sols 20% de les pacients són diagnosticades en fases inicials de la malaltia (tumor localitzat a l'ovari) i les possibilitats de curació i supervivència als 5 anys poden arribar a ser del 90% (Cho & Shih *le* 2009).

És una malaltia predominant en dones perimenopàusiques i postmenopàusiques, amb el 80-90% diagnosticades entre els 45 i 75 anys, sent l'edat



de més incidència els 60 anys. S'estima que una de cada 70 dones en països desenvolupats tindrà la malaltia al llarg de la seva vida (Cannistra 2004).



**Figura 1.** Localització dels ovaris a l'aparell genital femení.

## 1.2 Etiologia

Els factors de risc en el CaOV són la història familiar i els síndromes hereditaris associats. La història familiar, especialment si hi ha dos o més familiars de primer grau amb antecedents de CaOV, és el factor que més augmenta el risc pel carcinoma d'ovari. No obstant, els casos familiars constitueixen el 5-10% de totes les neoplàsies d'ovari, i es caracteritzen per presentar-se en edats més baixes que l'espòradic. Hi ha tres síndromes hereditaris associats que predisposen a l'aparició del CaOV:

- Síndrome del càncer d'ovari-mama hereditari: les mutacions als gens BRCA1 i BRCA2 estan associades a la predisposició a la malaltia. S'estima que les mutacions a BRCA1 són responsables del 5,7% dels CaOV a pacients menors de 40 anys, el 4,6% entre edats de 40 i 50, i el 1,1% per sobre dels 50 anys. A més, individus de famílies d'alt risc amb mutacions BRCA1 tenen un risc acumulatiu superior al 87% de tenir càncer de mama a l'edat dels 70, a més d'un risc quatre vegades major de càncer de colon i pròstata. El risc pel càncer de mama i CaOV a portadores de mutacions de BRCA2 és del 84% i 27%, respectivament. Donat que només una fracció de les dones portadores de dites mutacions desenvoluparan CaOV, es pensa que és degut a una combinació de factors com la mutació específica, una altra modificació de gens, fenòmens epigenètics i interaccions gen-mediambientals (Holschneider & Berek 2000).

- Càncer de colon hereditari no polipós (HNPCC) (síndrome de Lynch Tipus II): El HNPCC o síndrome de Lynch és un síndrome hereditari que es caracteritza per augmentar el risc de tenir càncer de colon, i està associat a mutacions dels gens reparadors del DNA o *Mismatch Repair genes* (MMR) (MSH2, MLH1, MSH6 i PMS2) que causen inestabilitat genòmica general, i com a conseqüència, un estat d'hipermutabilitat que facilita que les mutacions s'acumulin de manera accelerada. És una malaltia autosòmica dominant que incrementa el risc de tenir altres càncers com endometri, mama i ovari (Prat *et al.* 2005).
- Càncer d'ovari "*site-specific*": és el menys freqüent de tots tres síndromes hereditaris, i es caracteritza per tenir un risc més elevat de desenvolupar CaOV. La majoria de les famílies que presenten aquest síndrome tenen mutacions al gen BRCA1.

El CaOV familiar apareix a una edat més baixa que l'espòrdic. Els càncers associats a mutacions dels gens BRCA apareixen al voltant dels 50 anys, i els associats al síndrome de Lynch, als 40 anys. Estudis moleculars suggereixen sobreexpressió de HER2/neu en una proporció més elevada de l'esperat.

Altres factors de risc que augmenten la freqüència a desenvolupar CaOV són: menarquia primerenca, endometriosi, teràpia hormonal substitutòria a la menopausa, no haver tingut fills (quants més embarassos, la probabilitat de desenvolupar càncer disminueix), maternitat tardana (tenir fills en edat avançada), baix nombre de parts, menopausa tardana, dieta rica en grasses, entre d'altres. Pel que fa a les races, les dones de raça blanca tenen 50% més de probabilitat de tenir CaOV que les afro-americanes. Ser descendent jueu Ashkenazi augmenta la probabilitat de tenir síndrome de càncer mama-ovari. L'edat també és un factor de risc important, ja que a partir dels 50 anys el risc de contraure la malaltia és major (Roett & Evans 2009).

### 1.3 Classificació dels tumors d'ovari

Són tots els tumors que es desenvolupen en aquest òrgan. Depenent del tipus cel·lular a partir del qual es creu que s'origina el CaOV es classifiquen en: tumors de l'epiteli-estroma, tumors de cèl·lules germinals i tumors dels cordons sexuals-estroma (Fig.2) (Karst & Drapkin 2010).

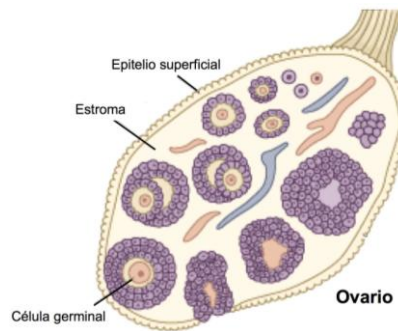


Figura 2. Representació esquemàtica de l'anatomia de l'ovari. A la figura es poden identificar els diferents teixits i tipus cel·lulars dels que s'originen els diferents tipus de tumor d'ovari.

Els tumors de l'epiteli-estroma, depenent del grau d'agressivitat, es poden subdividir en:

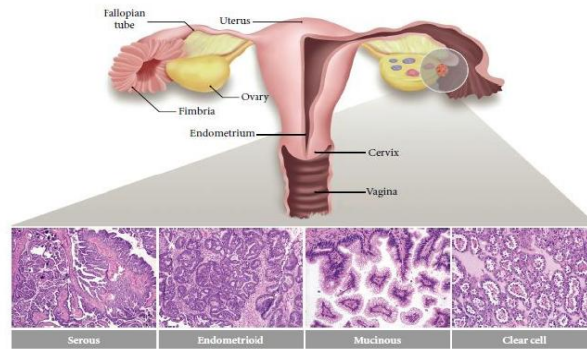
- **Tumors benignes o adenomes:** no invaeixen ni destrueixen teixits i òrgans pròxims, ni es disseminen a altres parts del cos. Solen créixer lentament i en general no són perjudicials.
- **Tumors malignes (càncer):** cèl·lules amb capacitat d'invaïr l'estroma danyant teixits i òrgans pròxims al tumor. Més del 70% són bilaterals i entre el 70-80% apareixen en estadis avançats de la malaltia, sent l'adenocarcinoma (ADK) serós el més freqüent (60-80%).
- **Tumors *Borderline* (Low Malignant Potencial (LMP) tumors):** són tumors amb potencial maligne baix. Biòlogicament són diferents als carcinomes i la majoria de les vegades no són precursors d'aquests. Tenen característiques cel·lulars de malignitat (atípies, mitosi) i presenten major o menor grau de proliferació i estratificació sense invaïr l'estroma. La majoria de les dones amb tumors *borderline* es diagnostiquen en una etapa tempra i es solen curar amb cirurgia sola (<http://www.cancerresearchuk.org/>).

El grau de diferenciació histològica es basa en l'índex de l'activitat mitòtica, grau d'anaplàsia cel·lular i estructura histològica. Els tumors malignes poden tenir des de grau 1 a grau 3. Els tumors de grau 1 tenen una aparença quasi normal, anomenats tumors ben diferenciats; els de grau 2 semblen menys normals, anomenats tumors moderament ben diferenciats; i els de grau 3 tenen una aparença atípica i s'anomenen tumors pobrement diferenciats o indiferenciats (Nucci MR 2009).

Els tumors malignes epitelials (carcinomes) representen el 90% dels CaOV i són els més letals. És un grup heterogeni de neoplàsies que exhibeixen una gran varietat de morfologies, manifestacions clíniques i alteracions genètiques. Els tumors malignes epitelials es classifiquen en diferents tipus histològics, els quals es basen en el tipus cel·lular que els constitueix:

- Serosos
- Endometrioides
- Mucinosos
- De Cèl·lula clara
- De Cèl·lules transicionals
- Mixtes
- Indiferenciats

Els tipus histològics serós, endometrioide i mucinós tenen una morfologia similar a diversos teixits del tracte genital femení, els quals exhibeixen diferenciació Müllleriana. Els tumors serosos s'assemblen a l'epiteli de la trompa de Fal·lopi, els tumors endometrioides s'assemblen a l'epiteli de l'endometri proliferatiu, i els mucinosos presenten similituds morfològiques amb l'epiteli endocervical o entèric. Els tumors de cèl·lules clares tenen una morfologia similar a l'endometri gestacional, i els tumors de Brenner a l'epiteli del tracte urinari (Fig.3).



**Figura 3.** Tipus histològics més freqüents dels carcinomes d'ovari. El carcinoma serós s'assembla a l'epiteli de les trompes de Fal·lopi, el carcinoma endometrioid té l'aparença de les glàndules endometrials, el carcinoma mucinosos a l'epiteli endocervical i el carcinoma de cèl·lules clares, a l'endometri gestacional (Karst & Drapkin 2010).

Entre els diferents tipus histològics hi ha diferències en el comportament del tumor (potencial de malignitat alt o baix), comportament clínic, en la incidència i les alteracions genètiques, entre d'altres. En termes de comportament, els carcinomes serosos solen ser molt agressius, són neoplàsies d'alt grau que es disseminen ràpidament a la cavitat peritoneal; els carcinomes mucinosos i endometrioides són típicament lesions de baix grau, i confinades a l'ovari. La histologia del tumor també té un impacte en el pronòstic: els carcinomes serosos d'estadi avançat i els carcinomes de cèl·lules clares tenen una supervivència als 5 anys del 20-30%, i difereixen a la seva resposta a la quimioteràpia: els tumors serosos (inicialment) responen molt a la quimioteràpia, mentre que els tumors de cèl·lules clares en són molt resistents (Karst & Drapkin 2010). En quant a la incidència, les freqüències relatives dels tipus principals de carcinoma d'ovari es presenten a la Taula 1, on es pot observar que el carcinoma serós és el més comú, seguit del carcinoma de cèl·lules clares i endometrioides, amb incidències similars. Els carcinomes mucinosos són els menys comuns (McCluggage WG 2011).

68-70%	Serós
3%	Mucinosos
9-11%	Endometrioides
12-13%	Cèl·lula Clara
1%	Tumor de Brenner
6%	Tumor Mixte

**Taula 1.** Freqüències relatives dels tipus de carcinoma d'ovari. Basat en dos estudis poblacionals recents (McCluggage WG 2011).

L'estadificació del CaOV es basa en la classificació internacional de la Federació Internacional de Ginecologia i Obstetria (classificació FIGO) (Taula 2).

<p><b>Estadi I:</b> Creixement limitat als ovaris.</p> <p><i>Estadi IA:</i> Creixement limitat a un ovari; no hi ha cèl·lules malignes a l'ascitis. No hi ha tumor a les superfícies externes; càpsules intactes.</p> <p><i>Estadi IB:</i> Creixement limitat a ambdós ovaris; no hi ha cèl·lules malignes a l'ascitis. No hi ha tumor a les superfícies externes; càpsules intactes.</p> <p><i>Estadi IC:</i> El tumor es troba en estadi IA o IB, però es troba tumor a la superfície d'un o ambdós ovaris, o la(les) càpsula(es) perforada(es), o ascitis o rentats peritoneals positius per cèl·lules malignes.</p> <p><b>Estadi II:</b> Creixement que implica un o ambdós ovaris amb extensió pèlvica.</p> <p>Estadi IIA: Extensió i/o metastasi a l'úter i/o trompes de Fal·lopi.</p> <p>Estadi IIB: Extensió a altres teixits pèlvics.</p> <p>Estadi IIC: El tumor es troba en estadi IIA i IIB però es troba tumor a la superfície d'un o ambdós ovaris, o la(les) càpsula(es) perforada(es), o ascitis o rentats peritoneals positius per cèl·lules malignes.</p> <p><b>Estadi III:</b> Tumor que afecta un o ambdós ovaris amb metastasis peritoneals fora de la pelvis i/o ganglis retroperitoneals o inguinals. La metastasi superficial hepàtica equival a l'estadi III. El tumor es limita a la pelvis però amb extensió maligna histològicament comprovada a l'intestí prim o a l'omentum.</p> <p><i>Estadi IIIA:</i> Tumor amb ganglis negatius però amb sembra microscòpica histològicament confirmada de les superfícies peritoneals extrapèlviques.</p> <p><i>Estadi IIIB:</i> Tumor d'un o ambdós ovaris amb metastasis histològicament confirmades de les superfícies extrapèlviques; cap excedeix a 2 cm de diàmetre. Ganglis negatius.</p> <p><i>Estadi IIIC:</i> metastasis abdominals extrapèlviques de més de 2 cm de diàmetre i/o ganglis positius retroperitoneals o inguinals.</p> <p><b>Estadi IV:</b> Creixement que afecta a un o ambdós ovaris amb metastasi a distància. Si existeix vessament pleural, haurà de tenir citologia positiva. Les metastasis a parènquima hepàtic equivalen a estadi IV.</p>
--

Taula 2. Estadis del CaOV segons la Federació Internacional de Ginecologia i Obstetria (FIGO).

En quant a freqüències d'estadi segons el tipus histològic, els carcinomes serosos són els que es troben en estadi més avançat (III i IV), mentre que els endometrioides, de cèl·lules clares i mucinosos es troben normalment confinats a l'ovari, en un estadi primerenc (I i II) en el moment del diagnòstic (Taula 3) (McLuggage WG 2011).

	Estadi I/II	Estadi III/IV
Serós	36%	88%
Cèl·lula Clara	26%	5%
Endometrioide	27%	3%
Mucinos	8%	1%

Taula 3. Distribució dels estadis dels tipus histològics de carcinoma d'ovari. Basat en dos estudis poblacionals recents (McLuggage WG 2011).

En l'actualitat, amb l'estadiatge clínic i quirúrgic correcte i els tractaments quimioterapèutics disponibles, s'estima que la supervivència als 5 anys està als voltants del 93% pels estadis I, 70% pels estadis II, 37% pels estadis III, i 25% pels estadis IV.

## 1.4 Alteracions genètiques i epigenètiques del CaOV

Múltiples anomalies genètiques i epigenètiques s'han detectat en CaOV de pacients diferents (Taula 4A). L'activació dels gens es produeix a través de l'amplificació, la hipometil·lació i mutació, mentre que els resultats de la inactivació genètica és per l'eliminació de grans regions cromosòmiques, la pèrdua d'heterogozitat (LOH) en locis determinats i la metil·lació del promotor. Només el 10-15% dels CaOV s'associen amb mutacions de la línia germinal, com mutacions a BRCA1, BRCA2 o els MMR del càncer colorrectal no-polipós hereditari, pèrdua de la qual predisposa a la transformació i inestabilitat genètica (Bast *et al.* 2009).

**Gens supressors de tumors:** Molts gens supressors de tumors estan implicats en l'oncogènesi del CaOV. Si bé els oncògens necessiten d'un sol esdeveniment genètic, en els gens supressors de tumors generalment es necessita la pèrdua dels dos al·lels. Hi ha excepcions, on no es necessita la pèrdua dels dos al·lels, com és el cas de TP53, que només amb un esdeveniment genètic pot perdre la seva funció. Alguns dels gens supressors tumorals que perden la funció en CaOV són TP53 (60-80% càncer esporàdic i familiar), PTEN, (3-8% càncer esporàdic), BRCA1 (6-8% mutacions o LOH) i BRCA2 (3-6% mutacions o LOH) (Bast *et al.* 2009).

**Oncògens:** Almenys 15 oncògens estan implicats en CaOV (Taula 4B) 11 d'aquests oncògens mostren amplificació genòmica. També s'han trobat anomalies en el nombre de còpies de DNA en el 37% de 283 loci que se sap que contenen microRNA no codificant. En contrast amb les anomalies del nombre de còpies, l'activació de mutacions en els oncògens no són comuns en CaOV (Bast *et al.* 2009).

**A**

Event	Effect	Chromosome	Gene
Gene amplification <sup>‡</sup>	Activation	1q22 3q26 5q31 8q24 19q 20p 20q13.2	<i>RAB25</i> <i>PRKCI</i> , <i>EVI1</i> and <i>PIK3CA</i> <i>FGF1</i> <i>MYC</i> <i>PIK3R1</i> and <i>AKT2</i> ND <i>AURKA</i>
Gene deletion <sup>‡</sup>	Inactivation	4q, 5q, 16q, 17p, 17q, Xp and Xq	ND
Mutation <sup>§</sup>	Activation	NA	<i>KRAS</i> (15%), <i>BRAF</i> (12%), <i>CTNNB1</i> (12%), <i>CDKN2A</i> (10%), <i>APC</i> (9%), <i>PIK3CA</i> (8%), <i>KIT</i> (7%) and <i>SMAD4</i> (7%)
Hypomethylation	Activation	NA	<i>IGF2</i> and <i>SAT2</i>
Loss of heterozygosity	Inactivation	17p13 and 17q21 (in 50% of cases or more) 1p, 3p, 5q, 5q, 6q, 7q and 8q (in fewer than 30% of cases)	<i>ARHI</i> , <i>PEG3</i> , <i>PLAGL1</i> , <i>RPS6KA2</i> , <i>TP53</i> , <i>BRC1</i> , <i>BRC2</i> , <i>PTE</i> , <i>OPCML</i> and <i>WV</i>
Mutation	Inactivation	NA	<i>TP53</i> (62%), <i>BRC1</i> (5%), <i>BRC2</i> (<5%) and <i>PTE</i> (3–8%)
Promoter methylation <sup>#</sup>	Inactivation	NA	<i>ARHI</i> , <i>DAPK1</i> , <i>CDH13</i> , <i>MLH1</i> , <i>ICAM1</i> , <i>PLAGL1</i> , <i>DNAJC15</i> , <i>MUC2</i> , <i>OPCML</i> , <i>PCSK6</i> , <i>PEF3</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>CDKN1A</i> , <i>RASSF1</i> , <i>SOCS1</i> , <i>SOCS2</i> , <i>PYCARD</i> and <i>SFN</i>

**B**

Gene	Chromosome	Percentage of cancers in which amplified	Percentage of cancers in which overexpressed
<i>RAB25</i>	1q22	54%	80–89%
<i>EVI1</i>	3q26	ND	ND
<i>EIF5A2</i>	3q26	ND	ND
<i>PRKCI</i>	3q26	44%	78%
<i>PIK3CA</i>	3q26	9–11%	32%
<i>FGF1</i>	5q31	ND	51%
<i>MYC</i>	8q24	20%	41–66%
<i>ECFR</i>	7q12	11–20%	9–28%
<i>NOTCH3</i>	9p13	20–21%	62%
<i>KRAS</i>	12P11–12	5%	30–52%
<i>ERBB2</i>	17q12–21	6–11%	4–12%
<i>PIK3R1</i>	19q	ND	ND
<i>CCNE1</i>	19q12	12–36%	42–63%
<i>AKT2</i>	19q13.2	12–27%	12%
<i>AURKA</i>	20q13	10–15%	48%

Taula 4. Anomalies genètiques i epigenètiques del CaOV (A). Oncògens associats al CaOV epitelial (B) (Bast *et al.* 2009).



## 1.5 Biomarcadors moleculars del CaOV epitelial

Donat que els carcinomes d'ovari són un grup heterogeni de neoplàsies, hi ha proposades diferents vies de tumorigènesi, amb diferent comportament biològic, pronòstic i resposta al tractament. Els recents avenços han conduït als autors a proposar una classificació innovadora que combina les característiques anatòmiques i clíniques amb anormalitats moleculars d'aquests tumors (Taula 5). Aquesta nova classificació proporciona una informació pronòstica predictiva de resposta al tractament basada en els mecanismes patogenètics, proposant un model dualístic de carcinogènesi que engloba el CaOV epitelial de Tipus 1 i Tipus 2.

**Tumors tipus 1:** S'inclouen els tumors serosos de baix grau, l'ADK endometriode de baix grau, l'ADK mucinós, el tumor de Brenner maligne i alguns carcinomes de cèl·lules clares. Lesions precursors genèticament estables (usualment tumors *borderline*), que es manifesten en un estadi primerenc de la malaltia (tumor confinat a l'ovari), amb indolent curs clínic i amb bon pronòstic (Kurman & Shih 2010). Són tumors que creixen lentament i la majoria tenen mutacions a KRAS, BRAF, PTEN i  $\beta$ -Catenina (CTNNB1) i perfil de MSI-H (alta inestabilitat de microsatèl·lits). Són el 25% de tots els CaOV epitelials (Bast *et al.* 2009).

- **Mutacions de KRAS i BRAF:** KRAS i el seu efector BRAF són part de la família d'oncògens Ras i actuen com a iniciadors de la senyal extracel·lular RAS/RAF/MEK regulada per *ERK/Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), el qual regula les respostes cel·lulars com la proliferació, la diferenciació i la supervivència cel·lular (Fig.4). La majoria de les mutacions activadores de KRAS es troben presents als codons 12,13 o 61, donant lloc a l'activació constitutiva de la GTPasa que condueix a l'estimulació del creixement (Kalamathan *et al.* 2011). Mutacions de KRAS i el seu efector BRAF es presenten en el 5-15% de tots els CaOV. Es troben presents a tumors de baix grau i estadis primerencs de la FIGO (I i II). KRAS és més comú a tumors mucinosos (50-68%), BRAF a tumors serosos (30-35%). Aquestes mutacions es troben 60% a tumors *borderline* (Ferte *et al.* 2010).

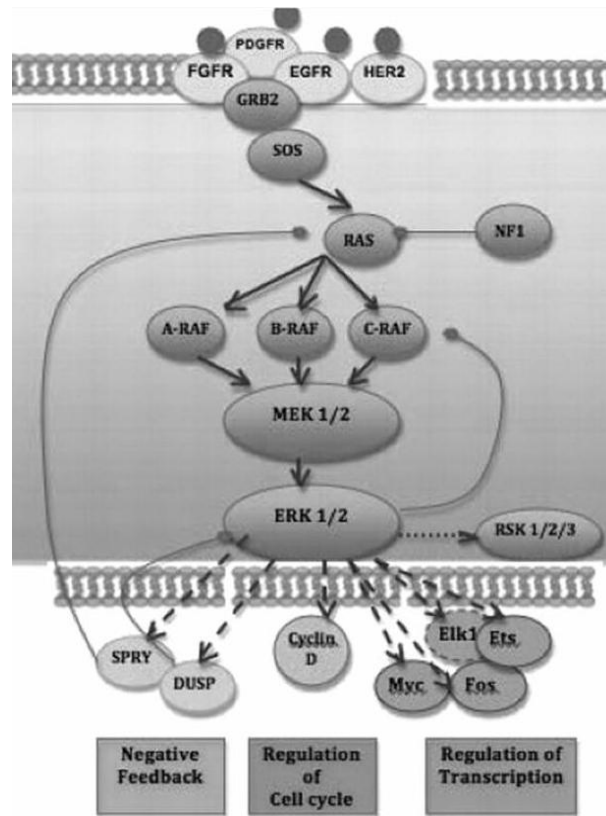


Figura 4. Via de senyalització de RAS-RAF-MEK-ERK. Via activada en tumors humans incluint mutacions a RAS, BRAF i MEK1 (Kalamathan *et al.* 2011).

- **Mutacions de  $\beta$ -Catenina (CTNNB1):** CTNNB1 codifica per la  $\beta$ -catenina, una proteïna reguladora important implicada en l'adhesió cel·lular i la transducció de senyals a través de la via Wnt, i juga un paper important en el desenvolupament, la proliferació cel·lular i la diferenciació. Les mutacions de  $\beta$ -catenina en CaOV es solen trobar en un 17-60% dels carcinomes endometrioides de grau 1, i s'associen a un bon pronòstic (Ferte *et al.* 2010).
- **Mutacions a PTEN (Phosphatase and TENsin homology):** És un important gen supressor de tumors, la funció del qual és controlar la migració i proliferació cel·lular mitjançant la regulació negativa de la quinasa serina/treonina AKT. Presenta activitat 3'fosfoinositol, regulant de forma negativa PI3K a través de la desfosforilació de fosfatidilinositols-2,4,5 trifosfats (PIP3) i fosfatidilinositols-3,4 difosfat (PIP2) (Fig.5). La inactivació de PTEN per mutació succeeix en un 3-8% dels CaOV esporàdics (Bast *et al.* 2009). La pèrdua d'aquest gen supressor PTEN per mutació o pèrdua d'heterozigotitat succeeix 20-43% en càncers endometrioides i 28% en càncers serosos (ambdós, de baix grau). L'expressió

baixa redueix el risc de mortalitat en pacients amb p53 mutada (Lalwani *et al.* 2011).

- **Mutacions a PIK3CA:** gen que codifica per la subunitat catalítica (p110 $\alpha$ ) de la proteïna PI3K, proteïna oncogènica que fosforila a PIP2 i PIP3, activant a AKT, el qual indueix proliferació i inhibició de l'apoptosi (Fig.5). L'activació de la via PI3K/AKT genera resistència al tractament amb platí i taxans, mitjançant la supressió de l'apoptosi (Kalamathan *et al.* 2011). Pot haver amplifacació del gen (4% de tots els CaOV) o bé mutacions (35% de tots els CaOV), sobretot en carcinomes de cèl·lula clara i endometrioides. Es correlacionen amb un estadi primerenc de la FIGO i la detecció del tumor és en edat primerenca (Ferte *et al.* 2010).

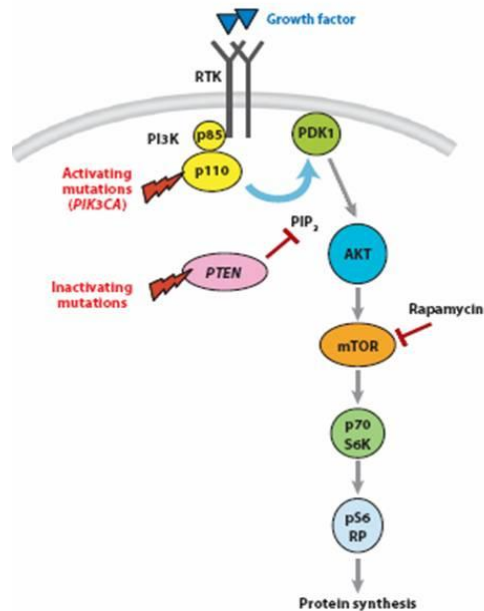


Figura 5. Il·lustració esquemàtica de la senyalització de PI3K/PTEN. Mutacions activadores de PIK3CA o mutacions d'inactivació de PTEN activen la senyalització d'AKT, la qual activarà la síntesi proteica i creixement cel·lular. Abreviacions: GF, el factor de creixement; PDK1, fosfoinosítids dependents de 3-quinasa 1; PIP3, fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat; PI3K, fosfoinosítids-3-quinasa; PIK3CA, fosfoinosítids-3-quinasa (PI3K); polipèptid catalitzador, alfa; PTEN, homòleg de fosfatasa i tensina; RTK, receptor tirosin quinasa (Cho & Shih *le* 2009).

- **MSI-H (Alta Inestabilitat de Microsatèl·lits):** associat al síndrome de Lynch II (síndrome de càncer de colon hereditari no polipós, HNPCC), caracteritzat per mutacions als gens de MMR hMLH1 i hMLH2, les mutacions dels quals porten a inestabilitat dels microsatèl·lits i inactivació dels gens que regulen el cicle cel·lular i la reparació de DNA. Les pacients amb HNPCC tenen un risc del

12% de desenvolupar CaOV (Ialwani et al, 2011). Està associat a tumors endometrioides i serosos (menys freqüent) de baix grau. Tenen bon pronòstic quan se'ls aplica el tractament (Ferte *et al.* 2010).

**Tumors tipus 2:** són els tumors de creixement agressiu i es presenten en un estadi avançat de la malaltia. S'inclouen: ADK serós i endometrioides d'alt grau, i el tumor maligne Mullerià mixt. Representen el 75% dels CaOV epitelials. S'originen de nou a l'epiteli annexial, presentant inestabilitat cromosòmica i comportament altament agressiu. Aquests tumors presenten freqüents mutacions a TP53, BRCA1 o BRCA2 i/o amplificacions a HER2.

- **Mutacions a TP53:** El gen supressor de tumors TP53 codifica la proteïna p53 supressora de tumors, factor de transcripció que juga un paper vital en la regulació del cicle cel·lular, reparació del DNA i la mort cel·lular per apoptosi (Fig.6). Es considera el gen més freqüentment alterat en càncers humans, i la pèrdua de proteïna p53 funcional s'ha observat en la majoria dels CaOV. La funció de TP53 es pot perdre en un sol esdeveniment (Bast *et al.* 2009). Mutacions i pèrdua de la funció de TP53 és una de les anormalitats genètiques en CaOV i s'observa en un 60-80% dels CaOV esporàdics i està altament correlacionat amb tumors d'alt grau de malignitat. Mutacions a TP53 i la consegüent sobreexpressió es troba en 4% de la malaltia pre-invasiva, 10-20% dels càncers d'etapa inicial i 40-60% del càncer avançat i es correlaciona amb metastasi potencial (Bast *et al.* 2009). Recentment, s'ha descrit que el 96% dels tumors serosos d'alt grau (HGSC) tenen TP53 mutat (*The Cancer Genome Atlas Research Network* 2011, Durinck *et al.* 2011). Mutacions i/o pèrdua d'heterozigotitat del gen TP53 s'han identificat en els carcinomes primàries i inclusions epitelials d'ovari (Pothuri *et al.* 2010), el que suggereix que la mutació de TP53 pot ser un esdeveniment primàrie a la patogènesi dels carcinomes serosos d'alt grau (HGSC). Les mutacions a p53 són menys comuns a altres tipus histològics de CaOV, sent 45% als endometrioides, 19% als mucinosos i 8% dels de cèl·lula clara (Corney *et al.* 2008).

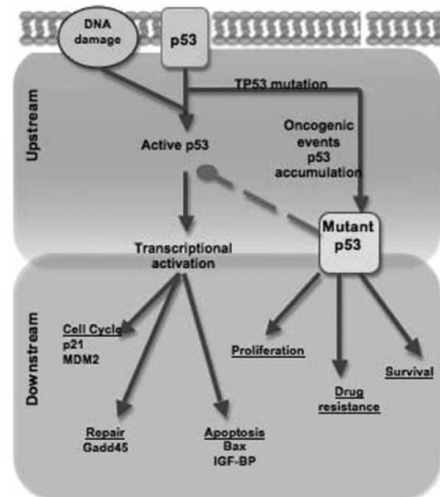
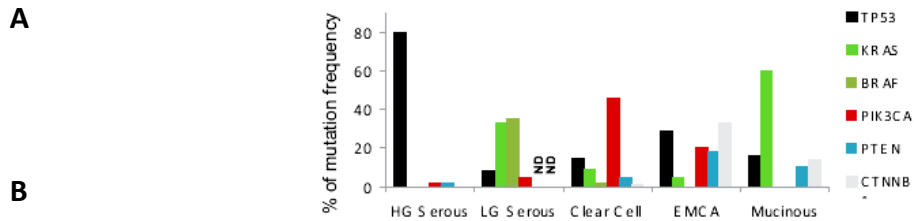


Figura 6. Via de senyalització de p53. Efectes de les mutacions de p53 en la progressió del cicle cel·lular, reparació de DNA i apoptosi (Kalamathan *et al.* 2011).

- **Mutacions BRCA 1 o BRCA2:** gens necessaris per la reparació homòloga de DNA quan hi ha trencament de doble cadena (*Double Strand Break* o DSB). La pèrdua de la seva funció genera error en la reparació, reordenament cromosòmic i inestabilitat genòmica. Els CaOV amb menys expressió de BRCA1 o BRCA2 són menys capaços de reparar el dany generat pel cisplatí, i per tant, presenten més sensibilitat a la teràpia. També són sensibles a la teràpia amb inhibidors de PARP (Ferte *et al.* 2010). Rarament es troben mutats en càncers esporàdics, les mutacions somàtiques són del 5-15% aproximadament. L'expressió de BRCA1 o BRCA2 pot ser silenciada per metilació. El risc de desenvolupar CaOV en portadores de mutacions varia segons el defecte genètic (BRCA1 30-60%, i per BRCA2 15-30%). Recentment s'ha denominat "*BRCAness syndrome*" i es correlaciona amb els tumors HGSC, i està associat a un bon pronòstic. També es troba en carcinomes endometrioides d'alt grau.
  
- **Amplificacions de HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*):** el nombre de còpies del gen generalment és superior a 4 i es correlaciona amb tumors d'alt grau potenciant la seva progressió agressiva. La sobreexpressió de HER2 i l'amplificació són fenòmens estranys (11% i 7% respectivament, a tumors tipus 2 de CaOV epitelial), no es correlacionen a la resposta al tractament i tenen presència de líquid ascític (Ferte *et al.* 2010). Els carcinomes mucinosos (tipus 1) tenen amplificació de HER2 en un 20-30%,

amb una incompleta resposta al tractament i menys temps de supervivència (Lalwani *et al.* 2011).



Biomarcadors moleculars	Prevalència	Associació amb graus histològics	Associació amb altres biomarcadors	Associació amb situació particular	Impacte terapèutic
<b>KRAS</b> (mutacions als codons 12, 13, 61)	5–15% de tots els CaOV	Correlació amb baix grau (>20%)	Exclusiu a mutacions de BRAF	Estadis temprans de la FIGO: Carcinoma mucinos: 50–68%; Tumor serós de baix grau: 30–35%; Tumor serós borderline: 35% Carcinoma endometroide de baix grau: 11%	
<b>BRAF</b> (mutació)		Correlació amb baix grau (>30%)	Exclusiu a mutacions de KRAS	Estadis temprans de la FIGO: Carcinoma de baix grau: 30–35%; Tumor serós borderline: 28%	
<b>β-catenin</b> (CTNNB1 mutacions)		Correlació amb baix grau		Tipus endometroide: 17–60% Tipus serós: 2%	
<b>MSI-H</b> (HNPCC, esporàdica pèrdua de MMR)	12–24%	Correlació amb baix grau		Tipus endometroide i serós (aquest menys freqüent)	Bon pronòstic
<b>PTEN</b> (LOH, mutació,)	Pèrdua: 3–8%; Expressió reduïda: 68%	Mutacions en correlació amb baix grau		Mutacions o pèrdua d'heterozigositat PTEN: Tipus endometroide: 20-43% Tipus serós: 28%	Pèrdua de PTEN és millor pronòstic pel subtipus serós; Expressió reduïda de PTEN genera mal pronòstic.
<b>PIK3CA</b> (mutació, amplifcació)	Mutació: 4% Amplifcació: 35%		Exclusiu a BRAF, i mutacions de KRAS	Carcinoma de cèl.lula clara: 33% Carcinoma endometroide: 26–34%	
<b>TP53</b> (mutació, LOH)	Mutacions a TP53 60-80% dels CaOV esporàdics	Correlació amb alt grau	Associat amb BRCA1 LOH	Serosos d'alt grau: 96% Endometroide: 45% Mucinos: 19% Cèl.lula Clara: 8%	Mutació i sobreexpressió: mal pronòstic, resistència a la teràpia i menys temps de supervivència.
<b>BRCA1/BRCA2</b> "BRCAness" (mutació, LOH)	5–15% de tots els CaOV 40% de les dones Ashkenazi jueves amb CaOV	Correlació amb alt grau	Pèrdua epigenètica de BRCA1 es correlaciona amb amplifcació de PIK3CA Mutacions a BRCA1 es correlaciona amb baixada de mRNA de PTEN	Carcinoma serós d'alt grau; Carcinoma endometroide d'alt grau.	Bon pronòstic. Sensible a teràpia amb platins; sensible a inhibidors de PARP

Taula 5. Perfil de mutacions dels diferents subtipus histològics de CaOV. Abreviacions: *HG Serous*, Serós d'alt grau; *LG Serous*, Serós de baix grau; *Clear Cell*, Cèl.lula clara; *EMCA*, carcinoma endometrioide; *Mucinous*, Mucinos (Kuo *et al.* 2009). Biomarcadors moleculars del CaOV epitelial (B). Abreviacions: FIGO, *International Federation of Gynecologists and Obstetricians*; FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*; HNPCC; *Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer*; LOH, pèrdua d'heterozigositat; MMR, *Mismatch Repair*; MSI-H, Alta Inestabilitat de microsatèl·lits; PARP, *Poly (ADP-Ribose) Polymerase* (Ferté 2010; Lalwani *et al.*, 2011).

## 2 Tractament del CaOV

En la majoria de pacients amb CaOV, el primer pas del tractament és la cirurgia, per eliminar el màxim el teixit tumoral possible, seguit de la quimioteràpia.

### 2.1 La cirurgia en CaOV

El tractament quirúrgic es realitza amb la intenció d'extripar tot el tumor macroscòpic (citoreducció completa) o el màxim tumor possible. Quan menys volum de tumor residual quedi a la cirurgia inicial, major temps de supervivència i període lliure de malaltia tindrà la pacient. Es parla de "citoreducció òptima" quan el tumor residual post quirúrgic no supera els 2 cm de diàmetre (en cada localització) i "citoreducció no òptima", quan la resta tumoral supera els 2 cm (OncoGuia de Ovario 2004).

### 2.2 La quimioteràpia en CaOV

En el tractament de CaOV avançat (III i IV) la quimioteràpia es considera un complement fonamental a la cirurgia. La **quimioteràpia adjuvant** s'administra generalment després de la cirurgia per disminuir la incidència de disseminació a distància del càncer. El tractament sistèmic recomanat per la primera línia de quimioteràpia és una combinació de derivats platinats (carboplatí o cisplatí) i taxans (paclitaxel) administrat per via intravenosa durant 6 cicles cada 21-28 dies. Es prefereix la combinació carboplatí-paclitaxel que la de cisplatí-paclitaxel, donat que el carboplatí és menys tòxic que el cisplatí, no obstant, es considera com un règim alternatiu (Bookman *et al.* 2003).

Les pacients que responen inicialment a la teràpia amb derivats del platí i han tingut un interval lliure de malaltia > 6 mesos es consideren clínicament sensibles al platí i generalment tenen bona resposta (taxes de fins al 60%) a re-tractaments amb derivats del platí i taxol (paclitaxel). Tanmateix, les pacients que recidiven < 6 mesos després del final de la teràpia amb platins o que progressen durant la mateixa, es consideren platino-refractàries. Són pacients amb mal pronòstic i amb una taxa de resposta als derivats del platí inferior al 10% i se'ls ha d'administrar una segona línia de quimioteràpia: els taxans com agents únics (produeixen taxes globals de resposta

del 14-30%) (<http://www.sego.es>), o altres fàrmacs (Fig.7) (sent la taxa global de resposta a dits agents només del 10-25%) amb resposta de duració relativament curta, tornant a recaure a la malaltia.

Drug class	Drug
Anthracyclines	Doxorubicin Liposomal doxorubicin High-dose epirubicin
Topoisomerase inhibitors	Etoposide Topotecan
Nucleoside analogue	Gemcitabine
Taxane	Docetaxel
Vinca alkaloid	Vinorelbine
Platinum	Oxaliplatin
Alkylating agent	Hexamethylamine
Anti-oestrogen	Tamoxifen

Figura 7. Tractaments alternatius als derivats del platí pel CaOV refractari (Agarwal & Kaye 2003).

En alguns casos, quant la malaltia està tan avançada que no es pot realitzar una cirurgia citoreductora òptima, la quimioteràpia és el tractament inicial: és el que s'anomena **quimioteràpia neoadjuvant**. Després de 3 ó 4 cicles de quimioteràpia es pot tornar a valorar la possibilitat de resecció quirúrgica, i en cas de ser possible, completar el tractament quimioterapèutic després de la cirurgia. Aquesta estratègia és viable, ja que es pot aconseguir la citoreducció òptima en pacients que inicialment no eren quirúrgiques.

### 2.2.1 Els taxans (paclitaxel)

El paclitaxel és el taxà estàndar que s'usa en el CaOV. També el docetaxel és efectiu i menys tòxic (Vasey *et al.* 2001), podent-se augmentar el seu ús en el tractament de CaOV. El paclitaxel i docetaxel són agents antimetabòlics que actuen mitjançant la unió intracel·lular irreversible de la  $\beta$ -tubulina dels microtúbuls, els quals els estabilitza evitant la despolimerització dels polímers formats. Això genera detenció en fase G2/M del cicle cel·lular i apoptosi, a través de vies dependents i independents de p53 (Ganansia-Leymarie *et al.* 2003). Paclitaxel també és capaç de modular la via *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), generant desfosforilació de la proteïna proapoptòtica BAD, la fosforilació de BCL-2, i la inducció d'apoptosi (Haldar *et al.* 1997).



Les proteïnes associades als microtúbuls (MAP) també modulen la citotoxicitat del paclitaxel: MAP4 augmenta la polimerització dels microtúbuls, la unió de paclitaxel i la quimiosensibilitat a aquest. L'expressió de MAP4 també està regulada negativament per p53, i això podria explicar la major sensibilitat d'algunes línies cel·lulars mutades per p53 al paclitaxel (Wahl *et al.* 1996).

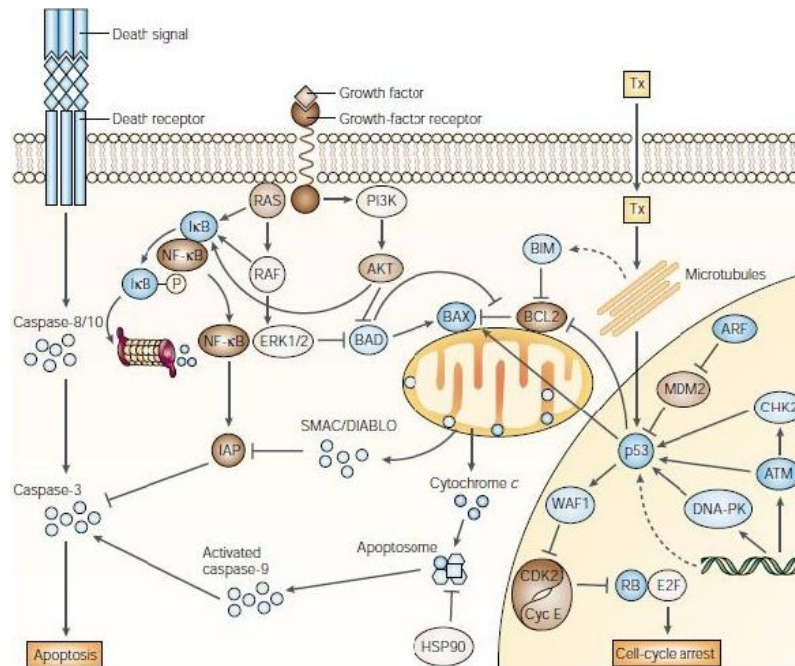


Figura 8. Vies de senyalització del paclitaxel (Tx). Vies que indueixen aturada de cicle cel·lular i/o apoptosi. Les proteïnes en blau promouen, les marró inhibeixen les vies mencionades (Agarwal & Kaye 2003).

## 2.2.2 Els platins (cisplatí)

El cisplatí (CDDP) és un agent alquilant que s'uneix covalentment a les cadenes de DNA modificant-ne l'estructura, fet que genera inhibició de síntesis i bloqueig de replicació. És eficaç en el tractament de càncer de testicle, d'ovari, i també s'utilitza àmpliament pel tractament de càncer de bufeta, càncer de cap i coll uterí, càncer de coll, càncer d'esòfag i càncer de pulmó de cèl·lules petites. El CDDP presenta un seguit de desavantatges que inclouen efectes secundaris greus, incluint nefrotoxicitat, neurotoxicitat i ototoxicitat, nàusees i vòmits. Aquests efectes limiten la dosi que pot ser aplicada en pacients. Malgrat que el CDDP s'usa àmpliament en clínica, la seva aplicació encara és limitada a determinats tipus de tumor. Alguns com el colorrectal i càncer de pulmó de cèl·lules grans tenen una resistència intrínseca al CDDP, mentre que d'altres com el càncer de pulmó de cèl·lules petites, i alguns CaOV desenvolupen

resistència adquirida després del primer tractament (Cepeda *et al.* 2007). El carboplatí te quasi el mateix espectre d'activitat que el cisplatí però presenta menys toxicitat (no és nefrotòxic, neurotòxic mielotòxic ni ototòxic). L'oxaliplatí és particularment efectiu en el tractament del càncer de colon colorrectal avançat i en CaOV resistents al CDDP (Ahmad 2010).

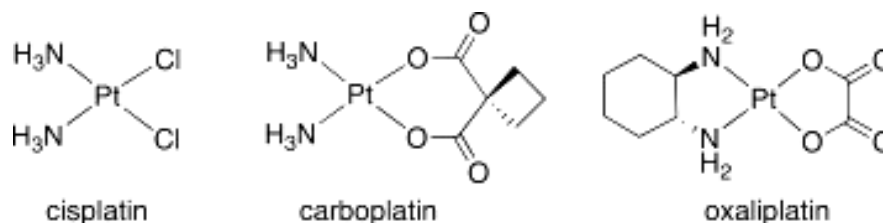
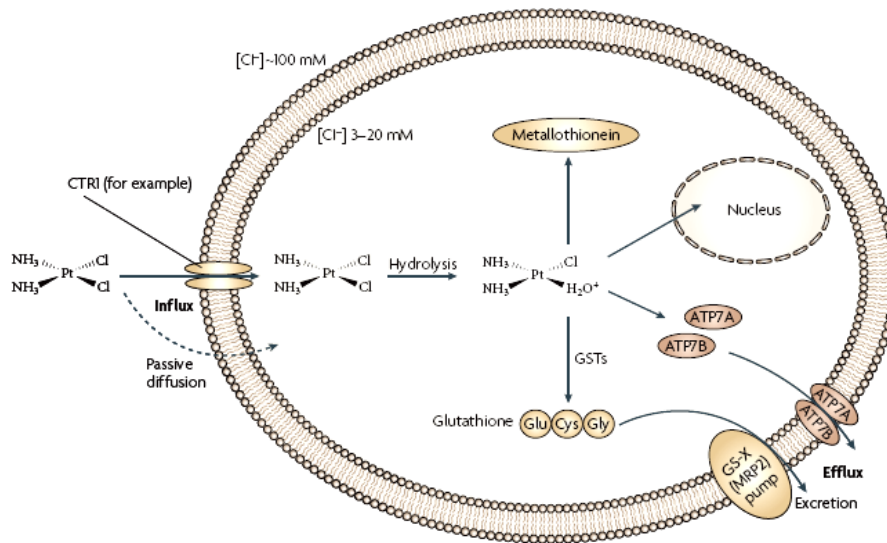


Figura 9. Estructura molecular de molècules anticancerígenes derivades del platí (Kellet A *et al.* 2012).

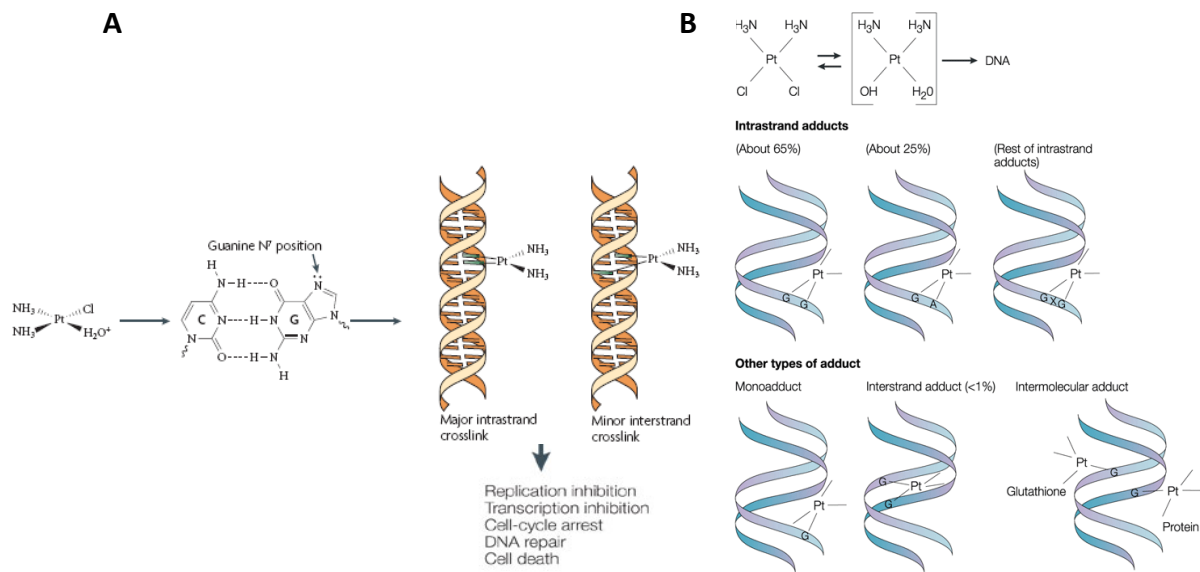
### 2.2.2.1 Formació d'adductes

El cisplatí és el prototip dels anàlegs del platí; també denominat *cis*-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP), degut a que la citotoxicitat de la molècula es relaciona amb l'orientació *cis* dels àtoms de clor. El CDDP s'administra a les pacients per via intravenosa en solució salina (solució de clorur sòdic) i entra a les cèl·lules per difusió passiva o activament importat pel transportador de coure CTR1 (transportador de coure 1) (Ishida *et al.* 2002). La concentració intracel·lular de CDDP és contrarestada per l'exportació realitzada per ATP7B (*Copper-transporting P-type adenosine triphosphate*) i ATP7A (*Copper-transporting ATPase 1*) que transporten el CDDP a l'exterior de la cèl·lula (eflux) (Safaei & Howell 2005); també per la inactivació del CDDP pel glutatió (Meijer *et al.* 1992) o metalotioneïna (Surowiak *et al.* 2007)(Fig.10).



**Figura 10. Transport cel·lular del CDDP.** A més de la difusió passiva, el CDDP està activament importat pel transportador de coure CTR1. El transportador de coure tipus p-trifosfat d'adenosina (ATP7B) té un paper important en l'eflux del CDDP. Tant el coure, com el CDDP, tenen la capacitat de reduir l'absorció de l'altre i poden provocar la degradació i deslocalització de CTR1 (Kelland 2007).

Una vegada dins del citoplasma, el CDDP se sotmet a una hidròlisi: els lligands clorur es substitueixen per una molècula d'aigua, produint una molècula carregada positivament. La hidròlisi es produeix preferentment dins de les cèl·lules, que tenen una concentració molt més baixa de ions clorur que el torrent sanguini. Una vegada la hidròlisi ha tingut lloc, el CDDP es pot unir al DNA. L'àtom de platí del CDDP s'uneix covalentment a la posició N7 de les purines per formar adductes 1,2- o 1,3-intra-catenaris i adductes inter-catenaris (Fig.11A). Els adductes més freqüentment observats són els intra-catenaris entre guanines adjacents (65%) o els adductes intra-catenaris entre adenina i guanina (25%). El CDDP pot estendre's a través d'una base per unir dues guanines (GxG) a la mateixa cadena de DNA (Fig.11B). Són menys freqüents els adductes inter-catenaris, que es formen quan el CDDP s'uneix a les bases a través de les dues cadenes de DNA (al voltant de 1% dels adductes) i es creu que són altament tòxics (Fig.11B) (Masters & Koberle 2003).



**Figura 11.** Formació d'adductes per part del CDDP. L'àtom de CDDP s'uneix covalentment a la posició N7 de les purines per formar adductes 1,2- or 1,3-intra-catenaris i adductes inter-catenaris causant diferents respostes cel·lulars com: l'aturada de replicació, aturada del cycle cel·lular, reparació de DNA i apoptosi (A) (Kelland 2007, Wang & Lippard 2005). Diferents tipus d'adductes formats entre DNA-CDDP i freqüència (B) (Masters & Koberle 2003).

Els adductes de CDDP deformen l'estructura del DNA i provoquen diverses respostes cel·lulars, així com la detenció de la replicació, la inhibició de la transcripció, la detenció del cycle cel·lular, la reparació de DNA i l'apoptosi.

El CDDP també pot interaccionar amb altres molècules que poseeixen llocs nucleofílics tal com pèptids, proteïnes que continguin grups tiol, enzims de replicació i RNA. Només un 5-10% de les unions covalents del CDDP es troben al DNA, mentre que el 75-80% s'uneix a proteïnes (Ahmad 2010).

### 2.2.2.2 Reconeixement del dany del DNA

Les modificacions dels CDDP distorsionen el DNA. Els adductes 1,2- intra-catenaris doblen la cadena de DNA de manera significativa cap al solc major, deixant al descobert una superfície ampla i poc profunda del solc menor en la que diverses classes de proteïnes reconeixen el dany i s'hi uneixen. Entre elles la caixa de proteïnes d'alta mobilitat 1 i 2 (HMG1 i HMG2), el factor de transcripció *TATA binding protein* (TBP), les proteïnes de reparació components del MMR com hMSH2 o hMutS $\alpha$ , el "upstream binding factor" RNA polimerasa 1 humà (hUBF) i altres proteïnes com la histona H1 que preferentment reconeixen els adductes 1,2- intra-catenaris. La caixa

de proteïnes HMGB1 reconeix el dany del DNA generat pel CDDP, s'hi uneix amb alta afinitat i estabilitza la cadena doblada superenrollada de DNA i contribueix a la citotoxicitat del fàrmac. Quan aquestes proteïnes s'uneixen als adductes 1,2-intra-catenaris protegeixen les lesions de Pt-DNA dels mecanismes de reparació; aquest mecanisme incrementa la sensibilitat de les cèl·lules tumorals al CDDP fent de barrera de les proteïnes de *Nucleotide Excision Repair* (NER) *in vitro*. La deficiència en reparació permet que els adductes s'acumulin i es bloquegin vies essencials com la transcripció i s'activi la mort cel·lular programada. Molts estudis indiquen que els nivells de proteïna HMGB es correlacionen amb la sensibilitat al CDDP, per exemple, la sobreexpressió de HMGB1 que és induïda per l'addició d'hormones esteroides, sensibilitza el càncer de mama al CDDP (He *et al.* 2000). Però la relació entre els inhibidors dels nivells de proteïna HMGB *in vivo* i la toxicitat al CDDP és contradictòria. Alguns estudis amb línies cel·lulars resistents al CDDP, sovint tenen sobreexpressió de HMGB (Nagatani *et al.* 2001). Aquestes discrepàncies són degudes a què l'habilitat de HMGB a impactar sobre la citotoxicitat al CDDP depèn del tipus cel·lular i les condicions de creixement (Jung & Lippard 2007).

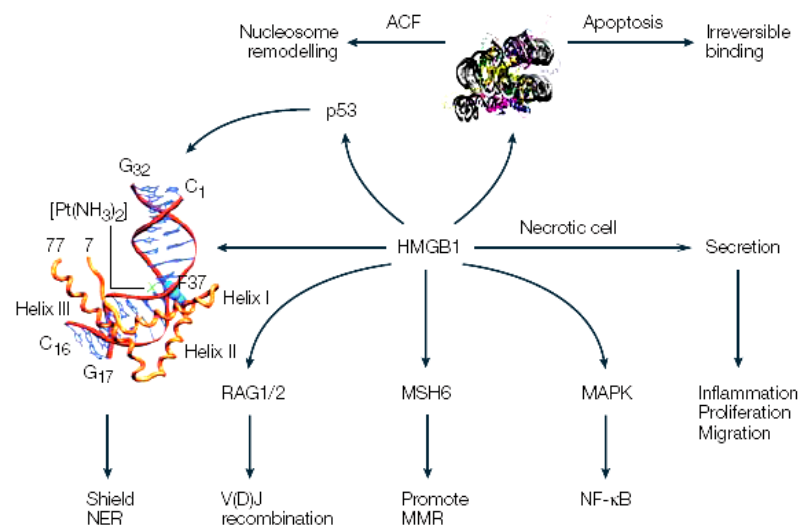


Figura 12. Reconeixement dels adductes de DNA-platí. Paper de HMGB1 (Wang & Lippard 2005).

### 2.2.2.3 Cisplatí i cicle cel·lular

Quan es produeix una lesió en el DNA, la cèl·lula requereix d'un temps per poder-la reparar. Per això és important que la cèl·lula deixi temporalment de

progressar, de manera que el dany al DNA va acompanyat d'una aturada del cicle cel·lular. Al llarg del cicle cel·lular hi ha uns punts de control (*checkpoints*) que s'activen quan hi ha dany al DNA (punts de control de dany al DNA) que tenen com a funció aturar la progressió del cicle cel·lular, la inducció de gens de reparació i la inducció d'apoptosi.

Els punts de control de dany al DNA usen proteïnes sensores de dany com ATM, ATR, per detectar dany al DNA i iniciar un seguit de senyals de transducció, que mitjançant proteïnes mediadores passaran a uns transductors. Aquests, són proteïnes Ser/Thr quinases Chk1 i Chk2 que tenen la funció de regular el cicle cel·lular mitjançant la fosforilació de proteïnes efectores, com p53 i les fosfatases Cdc25. La fosforilació de p53 l'estabilitzarà, amb una conseqüent activació de gens essencials per la regulació cicle cel·lular. La fosforilació de Cdc25 la inactivarà i s'exportarà del nucli així evitant la progressió de fases del cicle cel·lular (Fig. 13). Els punts de control del cicle cel·lular es troben a G1 a S (punt de control G1/S), a la replicació del DNA (punt de control intra-S), o en G2 de la mitosi (punt de control G2/M) (Sancar *et al.* 2004).

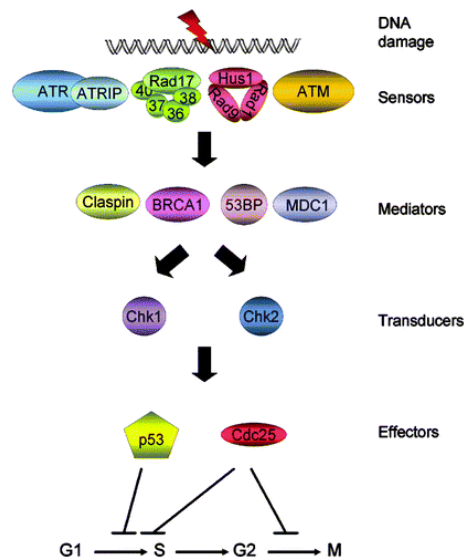


Figura 13. Components dels punts de control de dany al DNA en cèl·lules humanes. El dany és detectat per sensors, que mitjançant els mediadors, passen la senyal als transductors, els quals activaran o inactivaran altres proteïnes (efectors) que participaran directament a les fases del cicle cel·lular (Sancar *et al.* 2004).

El CDDP produeix primerament una aturada en fase S, després es manté a la fase G2/M i finalment a G1, que bloquejarà les cèl·lules en G2/M impedit que progressin i tornin a G1. La detenció a la fase S és transitòria i es produeix per la

inhibició del complex Cdk2/ciclina A a les 6-12h, mentre que l'aturada més duradera és en fase G2/M quan s'inhibeix el complex Cdc2-ciclina B a les 12-18 hores (Fig.14)(He *et al.* 2011).

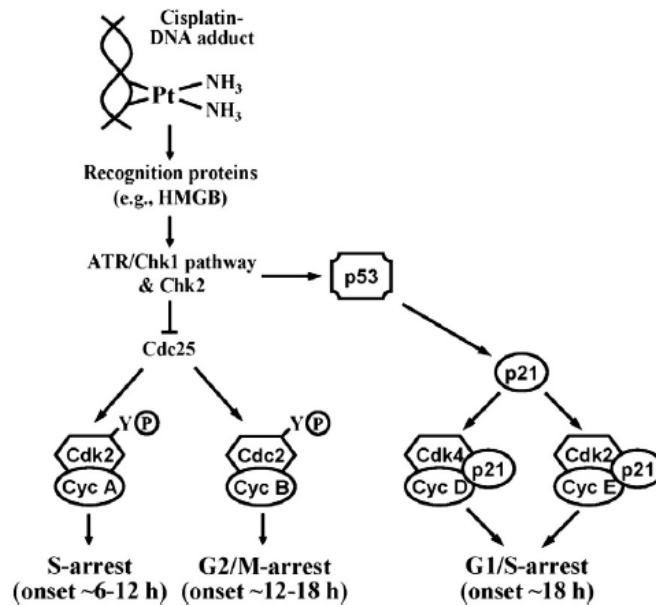


Figura 14. Efectes del CDDP en el cicle cel·lular (He *et al.* 2011).

**Regulació del punt de control de la fase G2/M:** El punt de control de la fase G2/M evita que les cèl·lules iniciïn la mitosi en cas de dany al DNA. L'activació de ATM/ATR (amb el CDDP, preferentment ATR), fosforila Chk1 i/o Chk2 i p53 (Ser15) i l'estabilitza. L'estabilització de p53 permet la transcripció de p21 i de 14-3-3σ i juntes poden iniciar el punt de control de G2/M, amb la inhibició de complexos Cdk/ciclina. A més, amb l'activació de Chk1 i Chk2 també es fosforilen els membres de la família Cdc25 (Cdc25a, Cdc25b i Cdc25c), encarregats de desfosforilar i activar Cdks. La fosforilació de Cdc25C (Serina 216) provoca que s'hi uneixi la proteïna adaptadora 14-3-3-σ, formant un complex inactiu incapaç de desfosforilar la tirosina 15 de les Cdks dels complexos Cdk2/ciclina A i Cdc2/ciclina B (Fig.15) (Sancar *et al.* 2004).

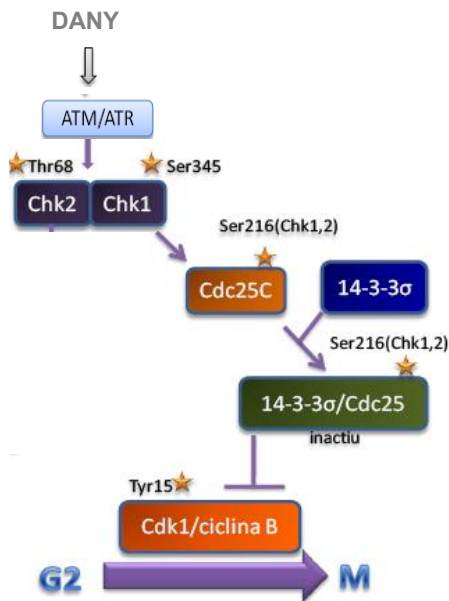


Figura 15. Regulació de la fase G2/M.

**Regulació del punt de control de la fase G1/S:** El punt de control G1/S assegura que la cèl·lula no es dupliqui amb el DNA danyat. L'aturada a la fase G1 del cicle té lloc a través de l'activació de p53 i la seva diana p21. La proteïna p53 és fosforilada per Chk1/2 (Serina 20) o bé per ATR (Serina 15). La fosforilació de p53 activa i estabilitza la proteïna, i promou la dissociació amb el seu inhibidor Mdm2. Una vegada p53 es troba activada, pot transcriure els gens que permetran l'aturada de cicle en fase G1/S, entre elles es troba la proteïna p21, la qual inhibeix el complex Cdk2/ciclina E que no deixarà progressar a la fase G2/M. A més, també s'uneix al complex Cdk4/ciclina D evitant així la formació de RB i ocasionant l'alliberació del factor de transcripció E2F, el qual participa en la transcripció dels gens necessaris per la progressió a la fase S (Fig.16) (Sancar *et al.* 2004; Sengupta & Harris 2005; Cann KL 2007).



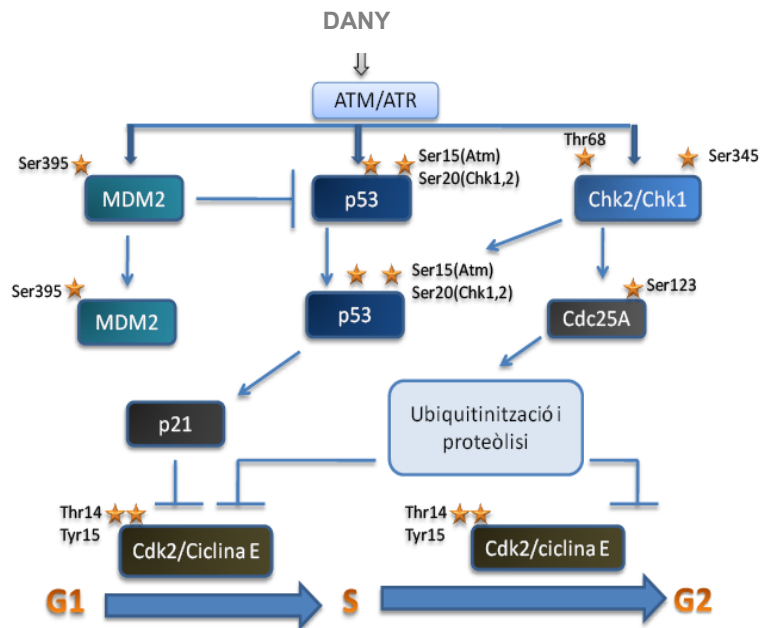
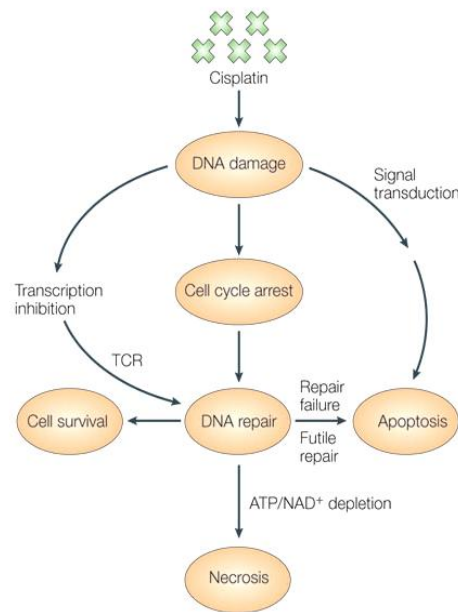


Figura 16. Regulació de la fase G1/S.

Si el dany produït per l CDDP no és reparat durant la fase G2/M, l'eliminació controlada dels compostos platinats es du a terme mitjançant la mort cel·lular, ja que així s'impedeix el pas de dany a les cèl·lules filles.

#### 2.2.2.4 Cisplatí i mort cel·lular

El CDDP indueix dos tipus de mort cel·lular diferent: la necrosi i l'apoptosi (Fig. 17). La necrosi es caracteritza per una inflor citosòlica i una pèrdua temprana de la integritat de la membrana. Pel contrari, les cèl·lules sotmeses a l'apoptosi es caracteritzen per tenir contracció cel·lular, condensació de la cromatina i fragmentació del DNA. El tipus de mort cel·lular produïda pel CDDP és dependent de la concentració i estat cel·lular. La necrosi es pot induir directament si el dany al DNA és molt elevat, o com a conseqüència d'un programa apoptòtic inacabat (Gonzalez *et al.* 2001).



**Figura 17. Vies de mort induïdes pel CDDP. El CDDP indueix apoptosi i necrosi, dos models diferents de mort cel·lular. El dany al DNA genera aturada del cicle cel·lular, inhibeix la transcripció i indueix l'apoptosi (Wang & Lippard 2005).**

L'apoptosi és la principal resposta de les cèl·lules als agents quimioterapèutics. Quan hi ha dany al DNA generat pel CDDP, es pot iniciar el procés d'apoptosi a través de la via ATM/ATR. El CDDP activa preferentment ATR (Damia *et al.* 2001; Zhao & Piwnicka-Worms 2001), la qual fosforila a p53 (Ser15) per activar-la (Appella & Anderson 2001). ATR també activa la quinasa Chk1 la qual també fosforilarà a p53 (Ser20) i l'activarà (Shih *et al.* 2005). El CDDP també pot activar a Chk2 (Damia *et al.* 2001). Quan p53 s'estabilitza i s'activa, indueix la transcripció de proteïnes proapoptòtiques com NOXA, PUMA o Bid, que funcionen com a inhibidors de Bcl-2 i Bcl-xL. La proteïna p53 també activa la transcripció de Bax, la qual participa en la formació de porus mitocondrial que permetrà la sortida de citocrom c, i per tant, l'activació de la via intrínseca o mitocondrial de l'apoptosi (Fig.18)(Cann & Hicks 2007).

El CDDP també pot induir apoptosi per la via extrínseca augmentant els nivells de proteïna de Fas i el seu lligand FasL (Fulda *et al.* 1998) els quals produiran senyals a l'interior de la cèl·lula, es formaran complexes provocant canvis a les molècules que el componen i desencadenaran l'activació de la caspasa 8, la qual provocarà la cascada d'activació d'altres caspases efectores 3 i 7 (Fig.18).

L'activació de l'apoptosi mitjançant el dany per CDDP no només té lloc amb p53. Amb absència de p53, la proteïna p73 també es pot activar amb la citotoxicitat del CDDP i induir apoptosi (Gong *et al.* 1999). L'activació de p73 es produïda per la quinasa tirosina c-Abl, la qual s'activa quan hi ha dany al DNA produït pel CDDP. C-Abl també activa a algun membre de la via de les MAPK, com p38, la qual també podrà activar p73 i l'apoptosi (Fig.18)(Ahmad 2010). La proteïna p73 pot induir apoptosi a través de la inducció de PUMA, la qual provoca la translocació de Bax al mitocondri i alliberació del citocrom c (Melino *et al.* 2004). També s'ha mostrat que activi el gen NOXA i BAX (Flinterman *et al.* 2005). És estrany que p73 estigui mutat als tumors, i normalment es troba sobreexpressat, això és la raó per la qual molts tumors que tenen mutada p53 siguin vulnerables als agents citotòxics.

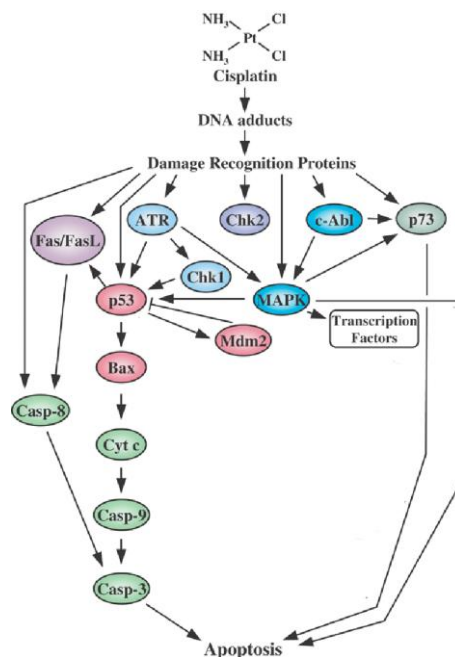


Figura 18. Efectes del CDDP i vies cel·lulars implicades. La mort cel·lular o la supervivència dependrà de la intensitat de senyals generades i la xarxa de vies implicades (Siddik ZH 2003).

La proteïna p53 també pot induir apoptosi independentment de l'activitat transcripcional. P53 és capaç d'unir-se físicament amb Bcl-2, Bcl-xL i Mcl-1 a la membrana mitocondrial, inhibint-ne la seva activitat anti-apoptòtica. A més, pot interactuar directament amb Bak facilitant la permeabilització de la membrana mitocondrial i l'alliberació del citocrom c (Chari *et al.* 2009).

Quan hi ha excés de dany al DNA produït pel CDDP, s'indueix la hiper-activació de PARP. Alts nivells de PARP trenquen  $\text{NAD}^+$  i transfereix ADP-ribose (ADPR) a grups carboxils de proteïns nuclears, generant esgotament de  $\text{NAD}^+/\text{ATP}$  i resultant necrosi (Herceg & Wang 2001).

#### 2.2.2.5 Cisplatí i dany: Paper de H2AX

Els adductes intra-catenaris generats pel CDDP són reparats mitjançant la reparació per escissió de nucleòtids (NER), mentre que els adductes inter-catenaris es reparen mitjançant un mecanisme més complex amb components de NER, DSB (*Double Strand Break*) i TLS (*Translesion DNA Synthesis*). Les cèl·lules defectuoses de NER, degut a mutacions a ERCC1 (proteïna de reparació per escissió del grup de complementació creuada 1), ERCC4 (XPF), ERCC2 (XPD) o ERCC3 (XPB) són extremadament sensibles al CDDP (Roos & Kaina 2012).

La via de reparació dels adductes inter-catenaris a les cèl·lules en divisió requereix de les endonucleases ERCC1-XPF per iniciar incisions dobles a cada costat dels braços de l'adducte, deixant una unió covalent entre les dues cadenes del DNA per dur-se a terme la reparació per recombinació homòloga. Els adductes inter-catenaris generen un obstacle en la forquilla de replicació en les cèl·lules que es divideixen, generant trencament de doble cadena (DSB). Els DSB creats per replicació requereixen de la reparació per recombinació homòloga per a ser reparats (De Silva *et al.* 2000). Cèl·lules defectuoses en ERCC-XPF o components de la reparació per recombinació homòloga, són més sensibles al CDDP, ja que no es reparen ni els adductes inter-catenaris ni els DSB del DNA. Els adductes inter-catenaris que no són reparats i els DSB són les majors lesions citotòxiques produïdes pel CDDP (Clingen *et al.* 2008).

Els DSB són lesions greus que poden iniciar inestabilitat genòmica i portar les cèl·lules a ser tumorals. La formació de DSB com a conseqüència del col·lapse de la forquilla de replicació, activa a ATM i a altres *PI-3 like kinases* (ATR i DNA-PK) que fosforilaran la proteïna histona H2AX. Aquesta és ràpidament fosforilada a una serina a quatre residus de l'extrem COOH (Ser C-4) formant  $\gamma\text{H2AX}$  als llocs naixents de DSB. La fosforilació a la Ser139 de l'extrem carboxi-terminal té lloc entre 1 i 3 minuts

després de la lesió al DNA, arribant al màxim als 30 minuts, on un gran nombre de molècules  $\gamma$ H2AX s'acumulen a la cromatina al voltant dels DSB, creant un focus (focis) per les proteïnes de reparació de DNA i remodelació de cromatina. Els anticossos que reconeixen  $\gamma$ H2AX permeten visualitzar els foci on es troba la proteïna, i per tant les lesions DSB del DNA. Per tant, mitjançant immunofluorescència per l'anticòs  $\gamma$ H2AX es poden visualitzar el danys al DNA. Usar la detecció de  $\gamma$ H2AX per determinar el grau d'inducció de DSB pot ajudar a detectar les cèl·lules precanceroses, els càncers per etapes, supervisar l'eficàcia de les teràpies contra el càncer, i desenvolupar nous medicaments (Bonner *et al.* 2008).

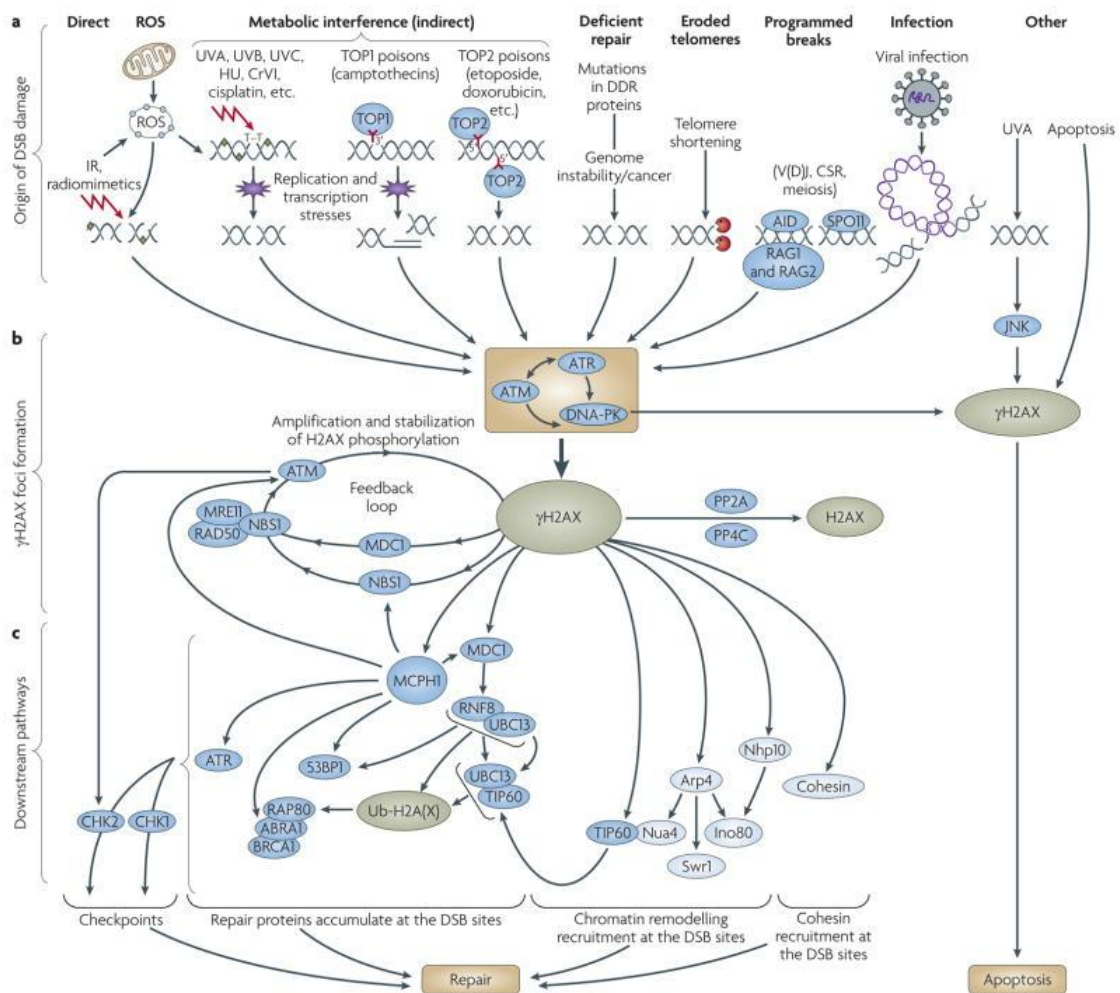


Figura 19. Via de senyalització de H2AX. H2AX és un component central a nombroses senyals en resposta al doble trencament de cadenes del DNA (DSB) (Bonner *et al.* 2008).

## 2.3 Resistència al tractament amb cisplatí

Una de les causes implicades en la baixa supervivència de les pacients amb CaOV és l'aparició a la resistència a la quimioteràpia, inicialment al CDDP i posteriorment als taxans, fenomen conegut com a **quimioresistència (QR)**. Les pacients es classifiquen com a quimioresistents quan recidiven (el càncer torna a aparèixer) durant els primers 6 mesos després de l'aplicació de la teràpia; mitjanament sensibles si recidiven entre els 6 i 12 mesos; i sensibles al CDDP si triguen en recidivar més de 12 mesos (Oncoguia d'Ovari 2004).

La biologia molecular i cel·lular dels tumors malignes epitelials d'ovari és complexa i caracteritzada per un fenotip agressiu que confereix resistència als tractaments actuals. La resistència al tractament pot ser intrínseca del propi tumor (resistència innata) o bé pot ser adquirida en el decurs de la malaltia (resistència adquirida) com a conseqüència de la selecció que exerceixen els tractaments antineoplàsics (Oncoguia d'Ovari 2004).

Els processos cel·lulars pels quals el CDDP entra i ataca a la cèl·lula inclouen: transport del fàrmac a l'interior de la cèl·lula; formació dels adductes i reconeixement per les proteïnes de resposta al dany; transducció de senyals que porten a la cèl·lula a aturada del cicle cel·lular, reparació i/o mort. Qualsevol factor que interfereixi en les esmentades vies, generarà a la cèl·lula el fenotip resistent al CDDP. Els majors mecanismes que inhibeixen el potencial anti-proliferatiu i citotòxic del CDDP, i que es troben en CaOV, es classifiquen en tres grups: mecanismes de resistència pre-diana, mecanismes de resistència diana i mecanismes de resistència post-diana (Fig.20) (Galluzzi *et al.* 2012).

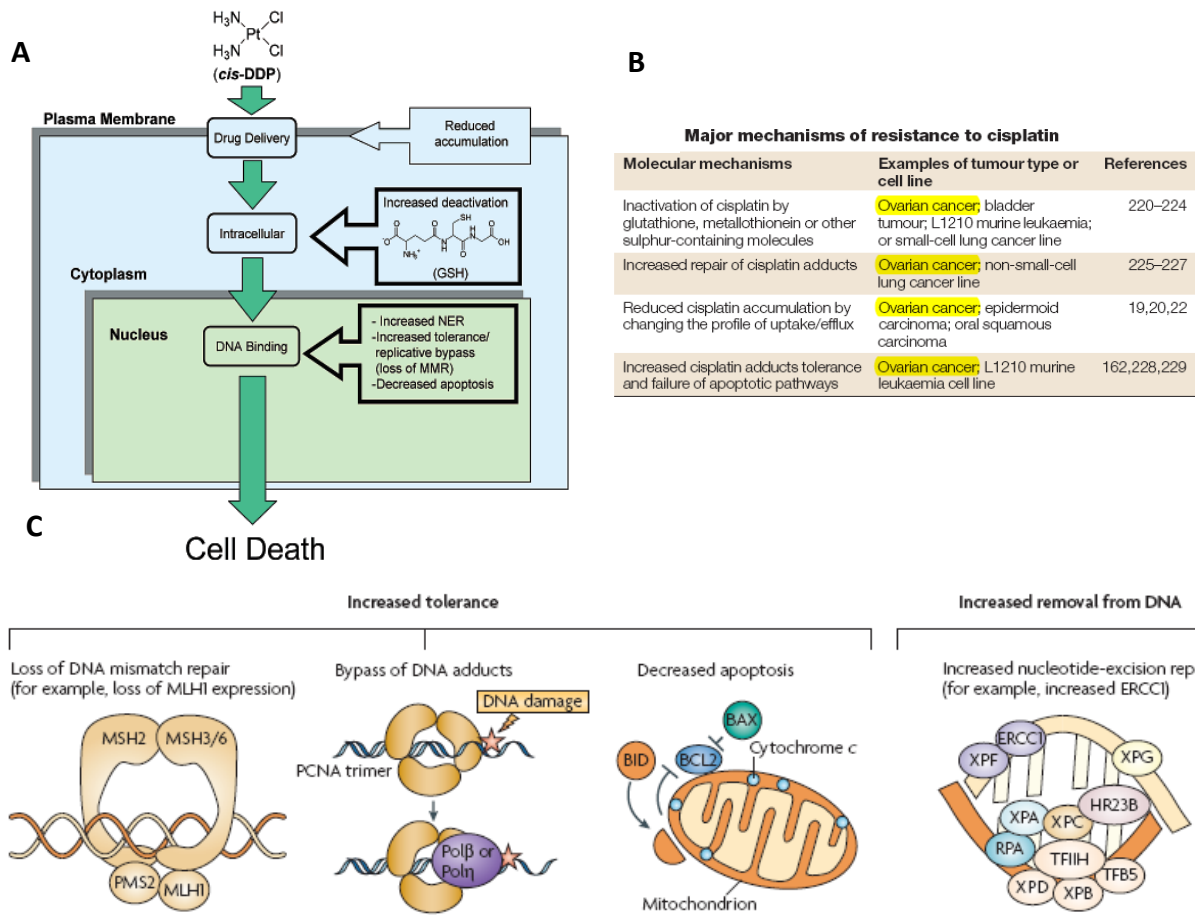


Figura 20. Mecanismes de resistència al CDDP. El CDDP no té efecte a la cèl·lula tumoral resistent degut a que no s'acumula, o quan entra dins la cèl·lula és inactivat per grups tiol; o bé perquè el dany al DNA generat pel CDDP és reparat, no tenint-se en compte alhora de que la cèl·lula repliqui; o bé perquè els mecanismes d'apoptosi estan inactivats (A) (Fuertes *et al.* 2003). Mecanismes moleculars de resistència al CDDP en diferents models (B) (Wang & Lippard 2005). Increment de la tolerància al dany i la reparació com a mecanismes de resistència al CDDP (C) (Kelland 2007).

**Mecanismes de resistència pre-diana:** acumulació reduïda de la droga a l'interior de la cèl·lula per defectes en el transport o per la inactivació del fàrmac a l'interior de la cèl·lula: La proteïna transmembrana involucrada a l'homeostasi del coure CTR1, té un paper important en l'entrada del CDDP a la cèl·lula. Les cèl·lules deficientes en dit transportador, presenten resistència al CDDP per la reduïda acumulació del fàrmac a l'interior. Els quelants de coure potencien l'entrada del CDDP dins les cèl·lules *in vitro* i *in vivo* sensibilitzant les cèl·lules al fàrmac (Katano *et al.* 2002; Holzer *et al.* 2006; Ishida *et al.* 2010). Hi ha unes proteïnes responsables de l'exportació del CDDP des de l'interior de la cèl·lula mitjançant ATP, són les *ATP Binding Cassette transporters* (ABC), com les proteïnes de resistència a multidrogues (MRP): MRP1, MRP2, MRP3 i MRP5. La proteïna MRP2 és la major responsable de la sortida del CDDP de les cèl·lules quimioresistents (Liedert *et al.* 2003). Les proteïnes

ATPases ATP7A i ATP7B involucrades a l'homeostasi de ions com el coure, també poden exportar el CDDP i es troben sobreexpressades a línies cel·lulars resistents al CDDP (Safaei *et al.* 2004). El CDDP pot unir-se a molècules nucleofíliques del citoplasma, incluint glutatió (GSH), metionina, metalotionines i altres proteïnes riques amb cisteïna, que inactiven el fàrmac a l'interior de la cèl·lula. Nivells elevats de GSH, de l'enzim que catalitza la síntesis de GSH (γ-GCS), de l'enzim que efectua la conjugació entre GSH i CDDP (GST) i l'expulsa a l'exterior de la cèl·lula, s'han observat en cèl·lules resistents al CDDP *in vitro* i *ex vivo*. Els fàrmacs conjugats amb S-glutatió són ràpidament expulsats de l'interior de la cèl·lula per bombes GS-X com són les MRP1 i MRP2. Proteïnes de baix pes molecular que contenen grups tiol com les metalotionines són capaces d'unir-se al CDDP i inactivar-lo a l'interior de la cèl·lula, incapacitant-lo per danyar el DNA. Elevats nivells d'aquestes proteïnes generen el fenotip quimioresistent (Galluzzi *et al.* 2012).

**Mecanismes de resistència diana:** Les cèl·lules resistents al CDDP adquireixen la capacitat de reparar els adductes augmentant el ritme de reparació o tolerant les lesions sense reparar-les. La majoria de lesions al DNA generades pel CDDP són eliminades pel sistema NER. Els nucleòtids danyats són eliminats mitjançant una incisió en ambdós llocs de la lesió, seguit de la síntesi del DNA per reconstituir la integritat genètica (Gillet & Scharer 2006). Almenys 20 proteïnes participen en la NER, incluint la reparació per escissió. L'alta expressió de proteïnes NER (com l'endonucleasa ERCC1) es correlaciona negativament amb la resposta clínica en molts càncers humans, entre ells el CaOV (Fig.20C) (Galluzzi *et al.* 2012). Les lesions del DNA induïdes pel CDDP també són detectades pel sistema MMR, que s'encarrega de les insercions errònies, supressions i incorporacions errònies de bases incorporades que apareixen durant la replicació del DNA i la recombinació. Les proteïnes del sistema MMR que estan relacionades amb el reconeixement dels adductes inter-catenaris GpG són les MSH2 i MLH1. La proteïna MLH1 repara els desajustos del DNA, i si falla, transmet la senyal cap a l'apoptosi. La deficiència d'aquesta proteïna genera resistència al CDDP (Fig.20C), i la hipermetil·lació del seu promotor prediu la baixa supervivència en pacients amb recaiguda de CaOV (Galluzzi *et al.* 2012). L'increment de la síntesi de translesió o derivació replicativa que permet a la cèl·lula tolerar sense



reparar les lesions del CDDP (Koberle B *et al* 2010) està efectuada per un grup específic de DNA polimerases com POLH, POLI, Polk, REV 1, REV3 i Rev7 (Shachar *et al.* 2009). POLH i l'heterodímer REV3-Rev7 estan involucrades a la derivació replicativa dels adductes GpG. Els defectes en POLH i REV3 s'han relacionat amb una major sensibilitat al CDDP en moltes línies de tumors *in vitro* (Fig.20C) (Galluzzi *et al.* 2012). L'increment de la reparació per recombinació homòloga (HR) també genera resistència al CDDP. Dos components crítics en la HR són les proteïnes BRCA1 i BRCA2. Els tumors deficients en BRCA1/2 responen millor a la quimioteràpia, les segones mutacions que reestableixen la funció de dits gens, adquireixen quimioresistència al CDDP. Hi ha proteïnes citoplasmàtiques capaces d'unir-se al CDDP i generar el fenotip resistent. El CDDP s'uneix al DNA mitocondrial, així com al canal aniònic dependent de voltatge VDAC, proteïna de la membrana exterior mitocondrial que controla funcions vitals i participa en el complex de porus de transició i permeabilitat. Les cèl·lules deficients o amb inhibició de VDAC són molt resistents al CDDP (Galluzzi *et al.* 2012).

**Mecanismes de resistència post-diana:** pot resultar d'un seguit d'alteracions, incluint defectes en les senyals de transducció que provoquen l'apoptosi en resposta al dany al DNA, o problemes a la maquinària de mort per apoptosi (Fig.20C). El dany generat pel CDDP no reparat, condueix a l'activació d'una cascada de senyalització pro-apoptòtica. Alteracions genètiques i epigenètiques dels components d'aquesta via complexa de senyalització, s'han associat amb nivells variables de resistència al CDDP (Fig.21).

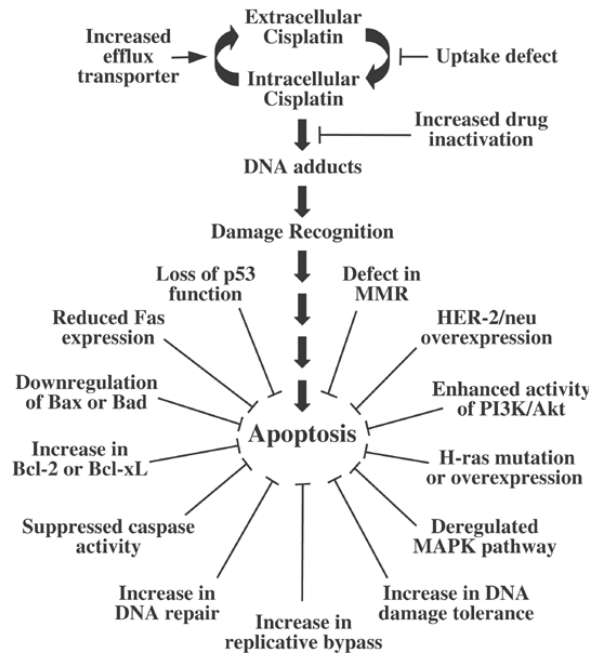


Figura 21. Mecanismes involucrats en la inhibició de la via apoptòtica en cèl·lules resistents al CDDP. Més d'un mecanisme inhibitor de l'apoptosi s'observa normalment en cèl·lules resistents, el que contribueix a la resistència multifactorial al fàrmac (Siddik ZH 2003).

Un dels majors mecanismes de resistència post-diana implica la inactivació del gen TP53. Les pacients amb CaOV que tenen p53 salvatge, tenen major probabilitat de beneficiar-se de la teràpia amb CDDP en comparació a les que tenen mutacions (Kigawa *et al.* 2001; Gadducci *et al.* 2002; Feldman *et al.* 2008).

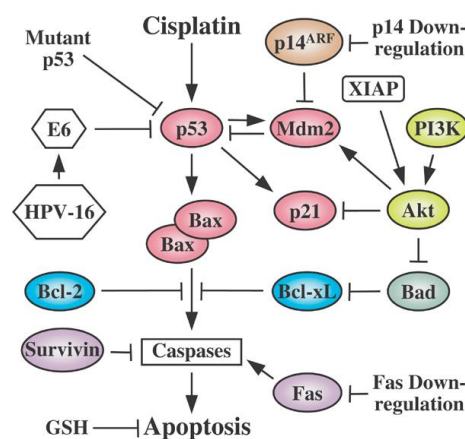


Figura 22. Ruptura de la via d'apoptosi p53 dependent en cèl·lules resistents al CDDP (Siddik ZH 2003).

Altres membres transductors pro-apoptòtics tals com els membres de la família MAPK poden contribuir al fenotip resistent al CDDP. Els membres de la família JNK,

ERK i SAPK transmeten senyals pro-apoptòtics en resposta al CDDP en una gran variabilitat de graus segons les condicions i tipus cel·lulars. Inhibició de la proteïna *N-terminal c-JUN Kinase* (JNK), de la proteïna *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) i la proteïna *Stress-Activated Kinase* (SAPK) s'ha associat amb increment i decreixement de la sensibilitat al CDDP depenent de les condicions experimentals (Mansouri *et al.* 2003; Galluzzi *et al.* 2012).

Les alteracions als factors que regulen i executen l'apoptosi, ja sigui provocada pel dany al DNA o estrés oxidant a través de la via mitocondrial (apoptosi intrínseca) o via extrínseca, són responsables de la sensibilitat al CDDP. Diverses proteïnes participen en aquestes cascades letals i moltes d'elles han demostrat modular la resposta al CDDP, tanmateix només algunes d'aquestes proteïnes preveuen la resposta al CDDP en l'àmbit clínic.

- *Bax like Proteins*: membres pro-apoptòtics de la família de proteïnes de Bcl-2. Proteïnes com Bax (*Bcl-2 Associated X protein*), Bak (*Bcl-2 Antagonist Killer 1*) ajuden a la permeabilització de la membrana mitocondrial i a la sortida del citocrom c, i la conseqüent activació de la caspasa 9 i 3 (apoptosi intrínseca). La deficiència de Bak/Bax confereix resistència al CDDP i a altres estressants cel·lulars *in vitro* (Galluzzi *et al.* 2012).
- *Bcl-2 like proteins*: membres anti-apoptòtics de la família de proteïnes de Bcl-2. Actuen prevenint la integritat de la membrana mitocondrial, inhibint directament els membres pro-apoptòtics. Els membres principals d'aquesta família són: Bcl-2 (*B Cell Leukemia/Lymphoma-2*), Bcl-X<sub>L</sub> (*B-Cell Lymphoma extra large*), Bcl-w i Mcl-1 (*Myeloid Cell Leukemia 1*). Sobreexpressió de Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> i Mcl-1 confereix resistència a molts estressants *in vitro*. En clínica, alts nivells de Bcl-2 generen resistència al CDDP i recidiva de la malaltia incluint càncer de cap, coll, ovari i pulmó. Inhibidors químics de *Bcl-2 like proteins* estan sent provats clínicament per evadir la quimioresistència (Galluzzi *et al.* 2012).

- BIRC5 (Survivina): la Survivina és una proteïna inhibidora de caspases de la família de les IAP (*Inhibitory Apoptosi Protein*). Forma part del component del *Chromosome Passenger Complex* (CPC) i té un paper en la regulació de la segregació cromosòmica. Per tant, és una proteïna reguladora de l'apoptosi i de la divisió cel·lular. Sobreexpressió de Survivina s'associa a la quimioresistència al CDDP i al mal pronòstic a molts tipus de càncer com el càncer gàstric, d'ovari i de pulmó (Kato *et al.* 2001; Nakamura *et al.* 2004; Karczmarek-Borowska *et al.* 2005). Inhibidors de Survivina com l'YM155 o LY2181308 estan sent avaluats com agents simples o en combinació amb el CDDP pel tractament de diversos càncers (Ryan *et al.* 2009) (<http://www.clinicaltrials.gov>).
- Caspases: les caspases iniciadores (caspasa 9 i caspasa 8) i les executores (caspasa 3 i caspasa 7) de l'apoptosi. *In vitro* s'ha observat que modificacions en la cascada de les caspases genera resistència al CDDP (Janson *et al.* 2010).

### 3 Mecanismes d'activació de l'apoptosi

Existeixen nombrosos mecanismes de control de l'apoptosi, la qual pot ser iniciada en resposta a condicions que poden trobar-se durant el desenvolupament tumoral: el dany al DNA, activació d'oncògens, hipòxia i desregulació de les senyals de creixement. L'apoptosi és un mecanisme inherent per reduir la possibilitat de persistir viables les cèl·lules anormals amb potencial per formar tumors. L'adquisició de resistència a l'apoptosi, amb la gradual acumulació de cèl·lules neoplàsiques com alternativa al procés de proliferació, és una característica de la majoria, o de tots els tipus de càncer (Spurgers *et al.* 2006). Així, la majoria dels agents quimioterapèutics actuals utilitzen mecanismes d'inducció de l'apoptosi per la seva acció antitumoral (Hu & Kavanagh 2003; Blagosklonny 2005).

Durant el procés apoptòtic la morfologia cel·lular s'altera (Fig.23). La cèl·lula s'arrodona, es formen *blebs* a la membrana citoplasmàtica i desensambla el citoesquelet. En el nucli, la cromatina es condensa i es redueix la mida del nucli, desintegrant-se. També es redueix el volum total de la cèl·lula, que es torna més

densa. Els orgànuls es condensen i el reticle endoplasmàtic es dilata, però els mitocondris es mantenen morfològicament intactes. En les etapes finals de l'apoptosi, el nucli i el citoplasma es fragmenten en petits cossos envoltats de membrana anomenats cossos apoptòtics. En el procés de l'apoptosi, a diferència de la necrosi, la membrana plasmàtica es manté íntegra durant el procés, fet que evita la pèrdua de material a l'espai intercel·lular i assegura un procés de mort cel·lular sense inflamació. El procés d'apoptosi acaba amb el reconeixement i fagocitosi dels cossos apoptòtics pels macròfags perifèrics. Aquests poseeixen receptors que interactuen específicament amb les cèl·lules apoptòtiques, com el CD14, vitronectina, el transportador ABC1, entre d'altres (Rodenburg *et al.* 2000).

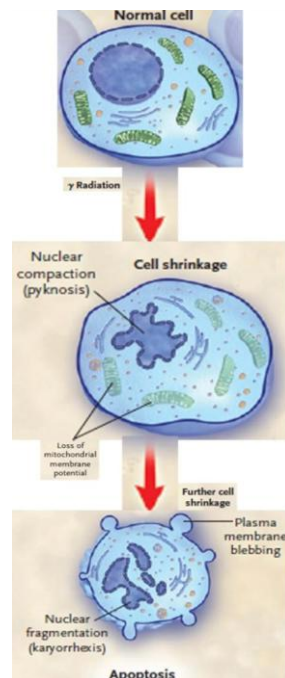


Figura 23. Canvis morfològics i bioquímics produïts durant l'apoptosi (Hotchkiss *et al.* 2009).

De forma paral·lela a aquests canvis morfològics, la cèl·lula apoptòtica experimenta una sèrie de canvis bioquímics. Moltes senyals provoquen canvis en el potencial de membrana mitocondrial i en la seva permeabilitat que donaran lloc a la sortida del citocrom c al citoplasma. També es perd l'assimetria en la composició de la membrana plasmàtica: els fosfolípids de fosfatidilserina que en condicions normals es troben exclusivament a la membrana lipídica interna de les cèl·lules, queden exposats també a la membrana externa. Aquest és un esdeveniment primerenc i forma part de

les senyals que permeten als macròfags reconèixer i fagocitar les cèl·lules apoptòtiques *in vivo* (Fadok *et al.* 1992). A més, s'activen unes endonucleases que tallen el DNA genòmic pels espais nucleosomals, generant fragments de DNA múltiples de 180 parells de bases (Wyllie *et al.* 1980; Montague & Cidlowski 1996). També s'observa una activació de proteïnes de la família de Bcl-2 com Bax o Bak com la degradació de la família de les IAPs per via proteosomal (Bader & Steller 2009). Aquests canvis bioquímics s'utilitzen com a marcadors de les diferents etapes de l'apoptosi.

### 3.1 Les caspases

La maquinària executora de l'apoptosi està constituïda per una família de aspartat-cisteïna proteases anomenades caspases. Són proteases ubiques altament específiques que proteolitzen els seus substrats per darrere d'un residu d'aspàrtic (Thornberry & Lazebnik 1998). L'activació de les caspases és un procés altament regulat per evitar que la cèl·lula entri en apoptosi de manera inespecífica. Dins de la cèl·lula totes les caspases es troben en forma inactiva com zimògens inerts o pro-caspases. Les caspases actives o madures es formen quan les pro-caspases es tallen pels llocs de tall (aspartat) donant lloc a tetràmers formats per la unió dels dos heterodímers, és a dir, amb dos centres actius (Chowdhury *et al.* 2008) (Fig.24).

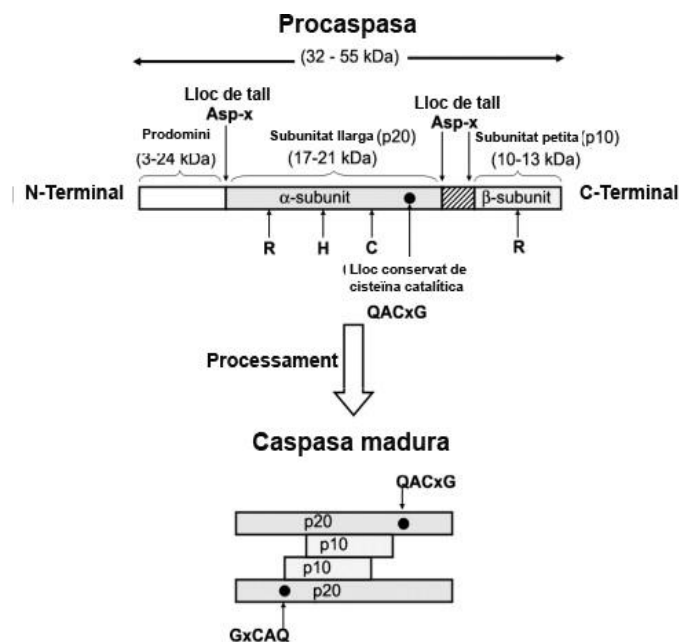


Figura 24. Processament de la pro-caspasa a caspasa madura, formació de la proteasa heterotetramèrica (Chowdhury *et al.* 2008).

En els vertebrats les caspases es poden classificar segons la seva funcionalitat, la qual està relacionada amb la seva estructura (Pop & Salvesen 2009):

- **Caspases iniciadores (Caspases 2, 8, 9 i 10):** són les primeres en activar-se després de l'estímul apoptòtic.
- **Caspases executores (Caspases 3, 6 i 7):** activació per ruptura. Són les responsables de la majoria de proteòlisi de la fase executora de l'apoptosi.
- **Caspases inflamatòries (Caspases 1, 4, 5 i 12):** la majoria d'elles s'activen per mecanismes de dimerització i no estan implicades en l'apoptosi.

Les caspases s'activen per cascades de proteòlisi entre elles mateixes, de manera que s'amplifica la senyal apoptòtica. Les caspases iniciadores s'activen de manera cooperativa per interacció amb proteïnes adaptadores. Per exemple, la caspasa 9 s'activa en la formació del complex apoptosoma, format per Apaf-1 i citocrom c, que indueix la dimerització de la caspasa 9 (Pop & Salvesen 2009). Una vegada activada, la caspasa 9 proteolitza i activa a les caspases 3 i 7, les quals degraden els substrats que portaran a l'apoptosi. Les caspases executores es troben formant dímers i són activades per les caspases iniciadores que les proteolitzen i pateixen un canvi conformacional. Les caspases executores són les responsables finals de la morfologia apoptòtica.

### 3.1.1 Vies d'activació de les caspases

Existeixen diferents mecanismes de senyalització a través dels quals es pot iniciar el mecanisme d'apoptosi mitjançant l'activació de les caspases: la via extrínseca i la via intrínseca o mitocondrial.

La **via extrínseca** s'inicia amb la unió de lligams extracel·lulars específics a receptors de la superfície cel·lular. Es tracta de lligands de la família del Factor de Necrosi Tumoral (TNF) com TNF $\alpha$ , FasL/CD95L, TWEAK i el *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) que s'uneixen a receptors de mort que comprenen la família de TNFR (TNF receptor 1 (TNFR1), TNF receptor 2 (TNFR2), CD95 (Fas/APO-1), TRAIL-R1, TRAIL-R, DR3 i DR6) induint canvis conformacionals que inicien una cascada de

senyalització (Chowdhury *et al.* 2008). A través dels dominis de mort (*Death Domain*, DD), aquests receptors recluten un seguit de proteïnes adaptadores no enzimàtiques com TRADD i FADD (Fig.25), que recluten a la pro-caspasa 8 per unió a dominis efectors de mort (DED) i formant un complex anomenat DISC. L'alta concentració de pro-caspasa 8 en el DISC estimula l'activació per autoproteòlisi per proximitat, i així la caspasa 8 actua sobre altres caspases i es desencadena la senyal apoptòtica (Hotchkiss *et al.* 2009). La caspasa 8 pot proteolitzar a Bid, sent la seva forma proteolitzada (tBid) capaç d'induir la sortida de factors mitocondrials pro-apoptòtics (Fig.27). La proteòlisi de Bid a tBid enllaça aquesta via extrínseca amb la via intrínseca o mitocondrial.

L'expressió dels receptors, del seu transport a membrana i l'expressió dels lligands són processos altament regulats. A més de la regulació per part de les proteïnes de la família de les XIAP, aquesta via de senyalització apoptòtica pot ser inhibida per proteïnes de la família de les FLIP (*FLICE-inhibitory proteins*) (Irmiler *et al.* 1997) que actuen desplaçant a la pro-caspasa 8 del DISC.

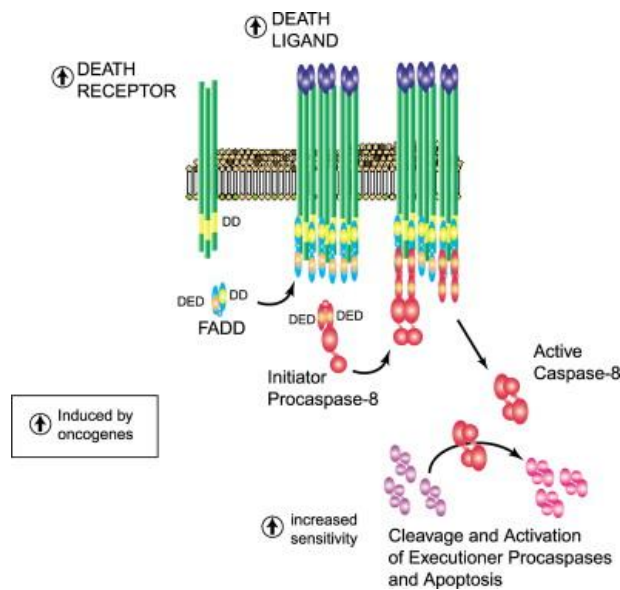


Figura 25. Activació de la via extrínseca de l'apoptosi. Els dominis de mort (DD) del receptor s'uneixen a un DD de la proteïna adaptadora FADD, deixant al descobert un domini efector de mort (DED), el qual s'unirà a un DED en el predomini de la pro-caspasa 8 formant el DISC. La unió d'ambdues molècules de pro-caspasa 8 juntes genera una autoactivació de la caspasa 8 que trenca i activa a les caspases executoras. Les senyals oncogèniques que promouen l'apoptosi, poden augmentar l'expressió dels lligands de mort i/o receptors de mort i augmentar la sensibilitat dels esdeveniments apoptòtics de senyalització (Green & Evan 2002).

La **via intrínseca** també anomenada via mitocondrial és la principal via d'activació de les caspases (Tait & Green 2010). Via que esdevé activa per múltiples estímuls externs o interns com: agents quimioterapèutics, hipòxia, radiació UV,



molècules d'estrès (espècies reactives d'oxigen i nitrogen) activació d'oncògens, virus i bacteris, falta d'unió a la matriu extracel·lular, o deprivació de citoquines, neutrofines o factors de creixement. Aquests estímuls pro-apoptòtics modifiquen diversos components cel·lulars que actuen com a sensors i transmeten el senyal d'inici de mort al mitocondri. La membrana externa del mitocondri conté canals aniònics dependents de voltatge, mentre que l'espai intermembranós conté diverses molècules com citocrom c, les proteïnes Smac/Diablo, Omi/Htr2a, endonucleasa G i el factor inductor d'apoptosi (AIF) (van Loo *et al.* 2002). Quan es permeabilitza la membrana mitocondrial externa (MOMP, *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*) s'alliberen una gran quantitat de substrats del mitocondri al citoplasma, un dels més importants és el citocrom c, el qual s'unirà als dominis autoinhibitoris de la proteïna APAF1 (*Apoptotic Protease Activating Factor*), activant-la, i permetent l'exposició del domini d'oligomerització. El domini CARD (*Caspase Recruiting Domain*) de l'oligòmer s'uneix als dominis CARD de la pro-caspasa 9. El citocrom c, APAF1 i la pro-caspasa 9 formaran l'apoptosoma, complex heptamètric format per varies molècules de citocrom c, APAF1 i pro-caspasa 9. L'apoptosoma indueix la reorganització del centre actiu i activació de la caspasa 9, que activarà les caspases efectores 3 i 7 (Fig.26). En aquest pas el procés de mort cel·lular és irreversible.

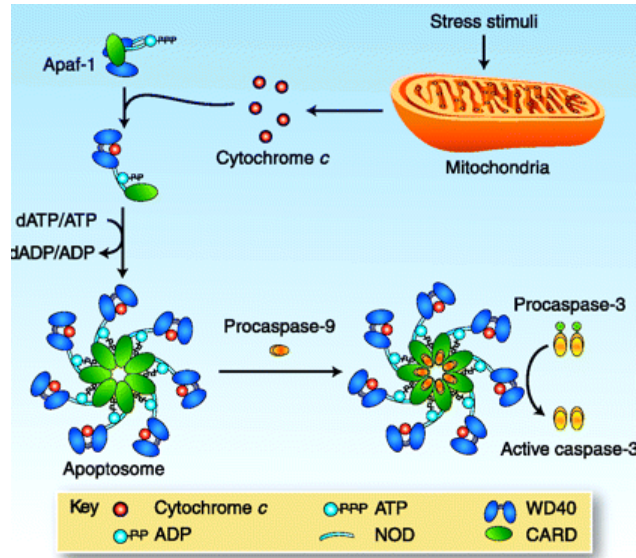


Figura 26. Esquema de la via intrínseca o mitocondrial de l'apoptosi. L'alliberació del citocrom c indueix la formació de l'apoptosoma i activació de les caspases (Ledgerwood & Morison 2009).

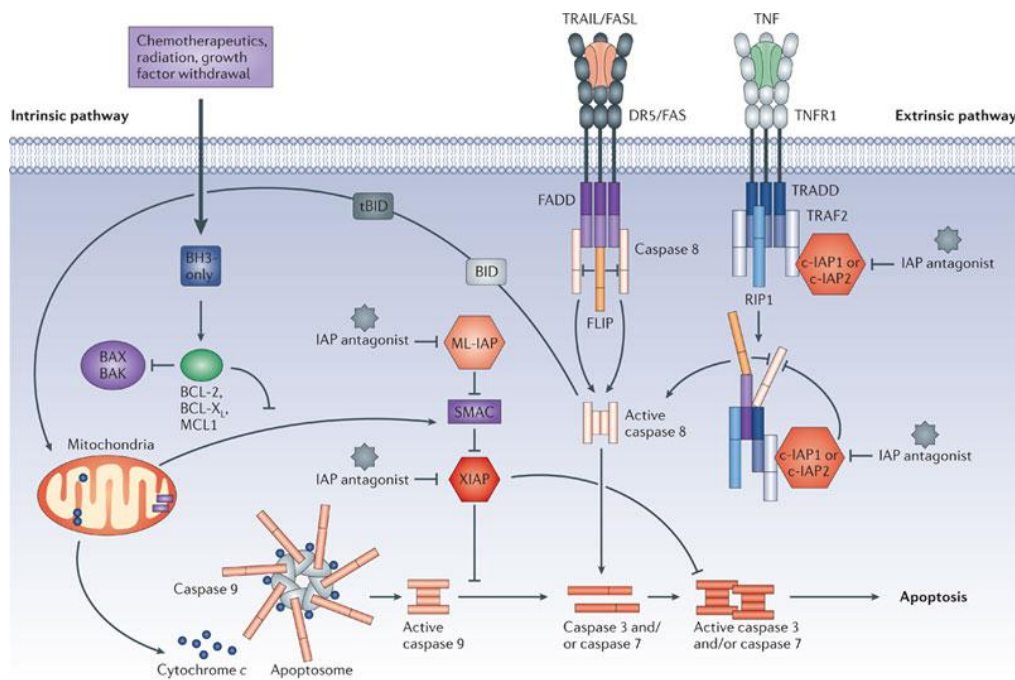


Figura 27. Model de les vies de senyalització que efectuen l'apoptosi (Fulda i Vucic 2012)-

La via intrínseca o mitocondrial està altament regulada pels membres de la família Bcl-2, proteïnes que s'associen entre sí a través dels seus dominis BH per formar homo- i/o hetero-complexes que juguen diferents papers en el procés de permeabilització de la membrana mitocondrial externa (MOMP) i la sortida del citocrom c. Es distingeixen membres amb funció pro-apoptòtica i membres amb

funció anti-apoptòtica. Les cèl·lules expressen membres pro-apoptòtics i anti-apoptòtics, i el balanç entre tots dictaminarà la supervivència i mort cel·lular. Tots els membres de la família de proteïnes de Bcl-2 comparteixen el domini d'homologia BH (*BCL-2 Homology*: BH1, BH2, BH3, BH4). Aquests dominis d'homologia són crítics per la funció d'aquestes proteïnes, incluint el seu impacte en la supervivència cel·lular i la seva capacitat d'interactuar amb altres membres de la família i de les proteïnes reguladores. Els membres d'aquesta família es poden subdividir en tres grups segons la seva estructura i funció:

- **Membres anti-apoptòtics (Bcl-2-like)** Tots ells tenen 4 dominis BH. Els dominis BH1, BH2 i BH3 formen un espai hidrofòbic que permet la interacció amb el domini BH3 de membres pro-apoptòtics. Si es sobreexpressen, protegeixen a les cèl·lules de diferents estímuls apoptòtics. Actuen prevenint la integritat de la membrana mitocondrial inhibint directament als membres pro-apoptòtics. (Danial & Korsmeyer 2004) (Fig.28).
- **Membres pro-apoptòtics multidomini (Bax-like):** Conserveu 2 ó 3 dominis BH. Quan s'activen, actuen perturbant les membranes intracel·lulars formant porus a la membrana mitocondrial externa, induint a MOMP i permetent la sortida dels factors mitocondrials (Danial & Korsmeyer 2004) (Fig.28). Bax i Bak són essencials per la formació del MOMP i apoptosi (Green & Evan 2002).
- **Membres pro-apoptòtics amb només el domini BH3 (BH3-only):** tenen una seqüència més divergent als altres membres de la família Bcl-2, excepte en que mantenen el domini BH3, indispensable per la seva funció pro-apoptòtica. Es subdivideixen basant-se amb la seva capacitat per interactuar només amb proteïnes pro-apoptòtiques o amb proteïnes pro-apoptòtiques i efectores (Fig.28) (Danial & Korsmeyer 2004). Entre els membres BH3-only que només s'uneixen a membres anti-apoptòtics trobem a Bad (*Bcl-2 Antagonist of cell Death*) i Noxa. Bim (*Bcl-2 Interacting Mediator of cell death*), Puma i tBid actuen amb proteïnes anti-apoptòtiques i proteïnes efectores induint l'oligomerització de Bax i Bak (Fig.29) (Chipuk *et al.* 2010).

a) Proteïnes antiapoptòtiques: BH1-4 –BCL-2, BCL-xL, MCL-1, A1, BCL-w



b) Proteïnes proapoptòtiques: BH1-3 –BAX, BAK, BOK



c) Proteïnes proapoptòtiques BH3-only: BIK, BID, BIM, BAD, PUMA, NOXA, HRK etc



Figura 28. Membres de la família de Bcl-2. Les proteïnes Bcl-2 *like* són anti-apoptòtiques i promouen la supervivència cel·lular; Bax-*like* i BH3-*only* promouen l'apoptosi. Es mostren els dominis BH i TM, que corresponen al domini d'homologia i al domini lipofílic transmembrana, respectivament (Lomonosova & Chinnadurai 2008).

Les proteïnes BH3-*only* tenen un paper anterior a Bax/Bak, i la sobreexpressió de Bcl-2 o Bcl-XL bloqueja al MOMP induït per l'expressió de proteïnes BH3-*only*. Així els membres de la família de Bcl-2 són crucials per determinar la resposta mitocondrial a diversos estímuls pro-apoptòtics (Garrido *et al.* 2006).

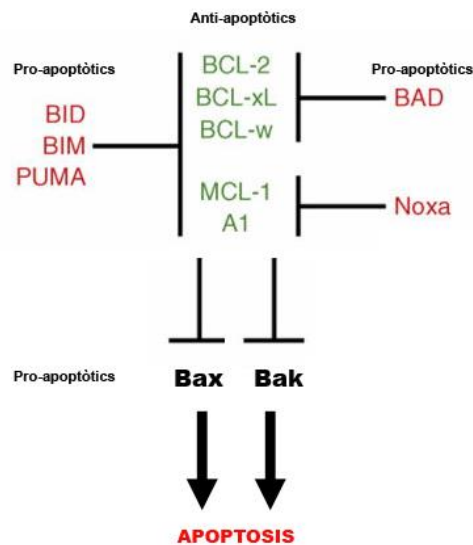


Figura 29. Diferents perfils d'unió i de potència apoptòtica de les proteïnes Bh3-*only*: l'habilitat de Bim, Puma i tBid per unir-se a totes les proteïnes anti-apoptòtiques contrasta amb la selectivitat de Bad i Noxa (Adams & Cory 2007).

### 3.1.2 Inhibició de les caspases: Família de les IAP

La família de les IAP (*Inhibitor of Apoptosi*) comprèn un grup de proteïnes inhibidores fisiològiques de les caspases. Els principals membres d'aquesta família són: Xiap, hiAP1 (c-IAP2), hiAP2 (c-IAP1) i Survivina. Les proteïnes IAP es van descriure inicialment en baculovirus capaces d'inhibir el procés d'apoptosi a cèl·lules d'insectes infectades per aquest patògen (Crook *et al.* 1993). Són proteïnes conservades al llarg de l'evolució i s'han trobat homòlegs a vertebrats i invertebrats (Giménez-Bonafé *et al.* 2009).

Les IAPs es caracteritzen per posseir tres motius d'unió a zinc d'aproximadament 70 residus, anomenats *Baculoviral IAP Repeat* (BIR), que permeten la interacció proteïna-proteïna i serveixen pel reconeixement de motius d'unió a IAP (motius IBM) situats a la regió N-terminal de la caspasa iniciadora 9 i les caspases efectores 3 i 7 (Altieri 2010). També contenen un domini a la posició C-terminal anomenat RING el qual participa en el marcatge de proteïnes per a la seva degradació per ubiquitinització, ja que actuen com a E3 ubiquitina ligases. A més, les IAP1 i IAP2 també tenen un domini CARD o domini d'interacció proteïna-proteïna el qual afavoreix el reclutament de caspases (Fig. 30) (Zangemeister-Wittke & Simon 2004).

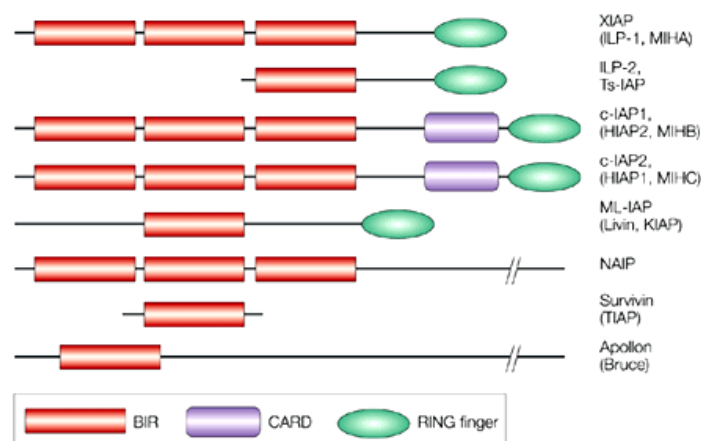


Figura 30. Membres de la família de les IAP i els seus dominis característics. Denominacions alternatives es mostren en parèntesis. La *X-linked IAP* (XIAP) és el membre millor caracteritzat d'aquesta família. Abreviacions: BIR, *Baculoviral IAP Repeat*; CARD, *CAspase-Recruitment Domain*; ILP, *IAP-Like Protein*; MIHA, *Mammalian IAP Homologue A*; NAIP, *Neuronal Apoptosi Inhibitory Protein* (Salvesen & Duckett 2002).

Les IAPs exerceixen una àmplia gama d'activitats biològiques que promouen la supervivència del càncer i la proliferació cel·lular. Actualment es considera que només la XIAP és inhibidora específica i directa de les caspases pro-apoptòtiques (3, 7 i 9) (Eckelman & Salvesen 2006). Les mutacions, translocacions, amplificacions dels gens IAPs estan associats amb diversos tumors malignes (Fulda & Vucic 2012).

L'activitat de les proteïnes IAP està regulada per un grup de proteïnes reguladores que s'uneixen a les IAP i inhibeixen el seu efecte anti-apoptòtic. Aquest grup de proteïnes es caracteritzen per la presència d'un residu conservat *IAP-Binding Motif* (IBM) en els seus extrems N-terminals que els permet unir-se al domini BIR de les IAP. Aquesta associació impedeix la unió de les IAP amb les caspases i en alguns casos estimula la seva auto-ubiquïtinització i degradació. Aquestes proteïnes són: Smac/ DIABLO, OMI/HTRA2 o GSPT1/eRF3 (Hegde *et al.* 2003), les quals es troben segregades al mitocondri i són alliberades quan es reben estímuls apoptòtics. Es creu que l'activitat anti-apoptòtica de XIAP1 i XIAP2, que són les IAPs amb més similituds a XIAP, seria la d'unir-se a Smac/ DIABLO o OMI/HTRA2 per evitar que aquestes proteïnes s'unixin a XIAP i s'activin les caspases (Eckelman & Salvesen 2006).

### 3.1.2.1 La Survivina

La Survivina és el membre més petit de la família de les IAP o inhibidors d'apoptosi. És una proteïna de 16,5 kDa de 142 aminoàcids codificada per una sola còpia del gen localitzat en el cromosoma humà 17q25. Estructuralment la Survivina té un únic domini BIR (*Baculoviral IAP Repeat*) a la part central, el qual és essencial per la funció inhibidora de les caspases, i li manca el domini *RING-finger* present en altres membres de la família (Mita *et al.* 2008). La Survivina existeix principalment com a homodímer, però estudis recents han demostrat que la Survivina monomèrica pot tenir alguna funció (Pavlyukov *et al.* 2011). El gen humà de la Survivina té *splicing* alternatiu generant 5 isoformes diferents: la forma salvatge de la Survivina o *full length Survivin*, Survivina-2B, Survivina $\Delta$ Ex3, Survivina-3B i Survivina 2 $\alpha$  (Jacob *et al.* 2012). La Survivina pot localitzar-se subcel·lularment al nucli i al citoplasma, i són regulades independentment durant la progressió del cicle cel·lular. En cèl·lules tumorals, Survivina també pot estar localitzada al mitocondri, i al produir-se l'estímul

que desencadena el procés d'apoptosi, pot ser alliberada al citoplasma conferint citoprotecció a través del bloqueig de la caspasa 9 (Dohi *et al.* 2004a).

### **Regulació de la Survivina**

L'activitat de la Survivina pot ser regulada per mecanismes transcripcionals i post-traduccionals. L'expressió de la Survivina és dependent del cicle cel·lular, incrementant durant la fase G1 i sent màxima a la fase G2/M. L'augment a G2/M s'hipotetitza que és per inhibir la cascada apoptòtica durant la mitosi (Kanwar *et al.* 2010). Tanmateix, s'ha suggerit que el gen SURVIVINA podria ser globalment desregulat a cèl·lules transformades, conduint a la seva sobreexpressió en totes les fases del cicle cel·lular, no només en fase G2/M.

Un dels mecanismes de regulació de la Survivina té lloc a nivell transcripcional. L'activitat del promotor de la Survivina és regulada a través de la  $\beta$ -catenina, el qual indueix al factor de cèl·lules T o TCF. A més, la transcripció també pot ser induïda per EGFR, NFkB, Myc, PI3K/AKT, Stat3 i Sp1. El mateix promotor conté dos llocs de reconeixement del factor de transcripció Sp1 (Li & Altieri 1999). P53 pot reprimir l'activació del promotor de la Survivina de forma indirecta mitjançant la inhibició de Sp1 (Esteve *et al.* 2007). Altres estudis pioners de Hoffman i col·laboradors van identificar la Survivina com un dels gens reprimits per p53 mitjançant la formació del complex E2F-Rb (Hoffman *et al.* 2002). Altres estudis de la repressió de Survivina mitjançant p53 són descrits per Mirza i col·laboradors (Mirza *et al.* 2002). S'ha demostrat que un dels repressors de la Survivina és BRCA (Wang *et al.* 2008), així com PTEN també juga un paper repressor de la Survivina (Guha *et al.* 2009). El factor de transcripció Stat3 juga un paper important en l'activació del promotor de la Survivina; s'ha observat que els inhibidors de Stat3 (SD-1029) disminueixen els nivells de Survivina i augmenten l'apoptosi en línies de CaOV (Duan *et al.* 2006). HIF-alfa-1 (HIF-1 $\alpha$ ) és un altre factor de transcripció implicat en la regulació de la Survivina, a través del qual, el factor EGF estimula la regulació de Survivina en línies cel·lulars de càncer de mama. La via de senyalització mitjançant Akt també està involucrada en l'expressió de la Survivina. Estudis demostren que els Inhibidors de la via PI3K/AKT com els

Geranylgeranyltransferasa I (GGTIs) induïen apoptosi en cèl·lules de CaOV mitjançant la inhibició de la via PI3K/AKT i l'expressió de Survivina (Dan *et al.* 2004).

A més de la regulació transcripcional, la Survivina obté modificacions post-traduccionals. Survivina és regulada per la proteïna de xoc tèrmic 90 (Hsp90), coneguda per la seva activitat xaperona. La interrupció de la interacció Survivina-Hsp90, resulta en la degradació de la proteïna mitjançant proteosoma, el que comporta defectes en la mitosi i apoptosi (Fortugno *et al.* 2003). Una altra modificació post-traduccional és la fosforilació de Survivina a la treonina 34 (Thr34) per Cdc2 (CDK1), que la manté estable i relantitza el procés de degradació pel proteosoma. Aquesta fosforilació pot augmentar l'afinitat de la Survivina per la caspasa 9, o alternativament estabilizar el complex Survivina-caspasa-9 durant la divisió cel·lular. Aquesta fosforilació serveix per mantenir viable a la cèl·lula durant la divisió cel·lular (O'Connor *et al.* 2000). S'ha observat que la inhibició de la fosforilació a la Thr34 regula a la baixa l'expressió de Survivina i millora l'apoptosi dependent de caspasa en línies cel·lulars de CaOV (Pennati *et al.* 2005).

La Survivina té una vida mitjana curta (30 minuts), sent regulada per mitjà de la degradació proteosomal després de ser poliubiquitinada (Yamamoto *et al.* 2008).

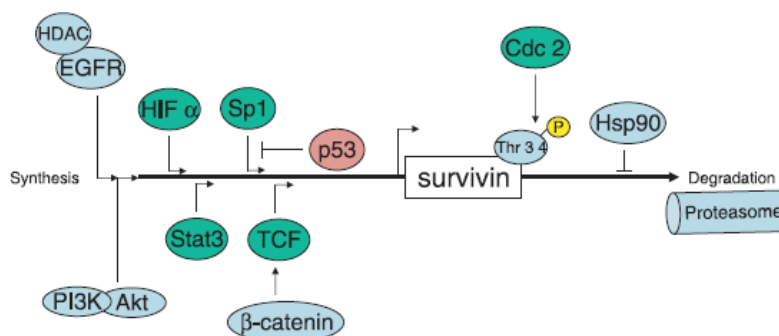


Figura 31. Regulació de Survivina a nivell transcripcional i post-traduccional (Yamamoto *et al.* 2008).

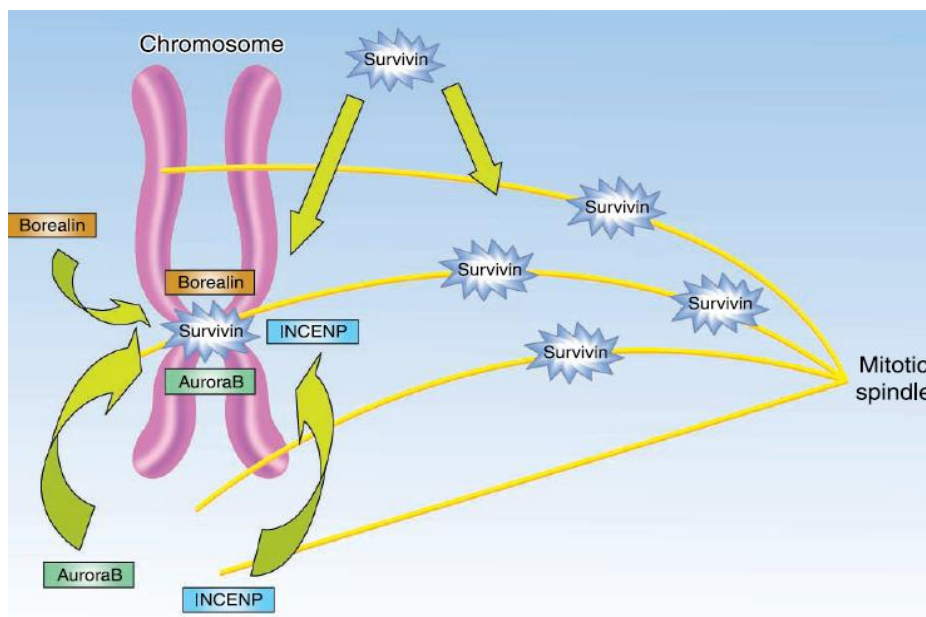
## Funcions de la Survivina

La Survivina juga un paper multifuncional dins la cèl·lula ja que pot actuar en diferents mecanismes fisiològics. A més de participar en la regulació de l'apoptosi,



també pot intervenir en múltiples funcions cel·lulars relacionades amb el cicle cel·lular com la divisió cel·lular, la resposta a l'estrés i la vigilància dels punts de control del cicle cel·lular, mitosi i reparació del DNA (Altieri 2008; Giménez-Bonafé *et al.* 2009).

Les principals funcions establertes per la Survivina són la regulació del cicle cel·lular i la inhibició de l'apoptosi (Fig.32 i 33). En la regulació del cicle cel·lular, Survivina actua durant la metafase i anafase on té dues localitzacions diferents: una associada a la polimerització de la tubulina (inclou centrosomes, microtúbuls de la metafase i fus mitòtic de l'anafase) participant en la regulació dels moviments dels microtúbuls; l'altra localització té lloc al cinetocor dels cromosomes a la metafase on juga un paper important en la segregació dels cromosomes. En aquest grup, la Survivina s'associa amb els reguladors de la citocinesi, tals com la quinasa Aurora B, INCENP i Borealin/Dasra, formant part del CPC. Per tant, la Survivina orienta adequadament els cromosomes en els cinetocors i contribueix a la formació del fus mitòtic bipolar (Mita *et al.* 2008) (Fig.32).



**Figura 32.** Survivina en la mitosi. Survivina forma part del *Chromosomal Passenger Complex* que és essencial per la correcta segregació cromosòmica i citocinesi. A més, la Survivina s'associa directament amb la polimerització de la tubulina i contribueix a la dinàmica dels microtúbuls (Mita *et al.* 2008).

El paper de la Survivina amb l'apoptosi ha estat objecte de controvèrsia. Inicialment la Survivina i altres IAP van ser postulades per unir-se selectivament a les

caspses 3, 7 i 9 i promoure la seva degradació (Altieri 2003b). Tanmateix, aquest model va ser qüestionat per les observacions que Survivina manca dels motius estructurals que efectuen la unió a caspses, els quals sí són presents en altres IAPs (XIAP; c-IAP1, c-IAP2). Banks i col·laboradors suggereixen que Survivina és incapaç de lligar a caspses ja que no té la seqüència enllaçador trobada riu amunt del segon BIR, usada per lligar a la caspasa 3 (Banks *et al.* 2000). S'ha demostrat que la Survivina inhibeix directament l'activació de la caspasa 9, però no la de les caspses 3 i 7 (Mita *et al.* 2008). Quan la cèl·lula tumoral rep estímuls apoptòtics, la Survivina que està al mitocondri surt al citoplasma inhibint l'activitat de la caspasa 9 (Dohi *et al.* 2004a). Per dur a terme la inhibició, Survivina requereix del cofactor *Hepatitis B virus X-Interaction Protein* (HBXIP), que conjuntament inhibeixen la caspasa 9 (Marusawa *et al.* 2003). A més, també s'uneix amb XIAP per inhibir conjuntament a la caspasa 3 i 9 (Dohi *et al.* 2004b). La inhibició de l'apoptosi mitjançant Survivina és un mecanisme més sofisticat que la inhibició de caspses directa i requereix de la cooperació d'altres molècules (Fig.33) (Mita *et al.* 2008).

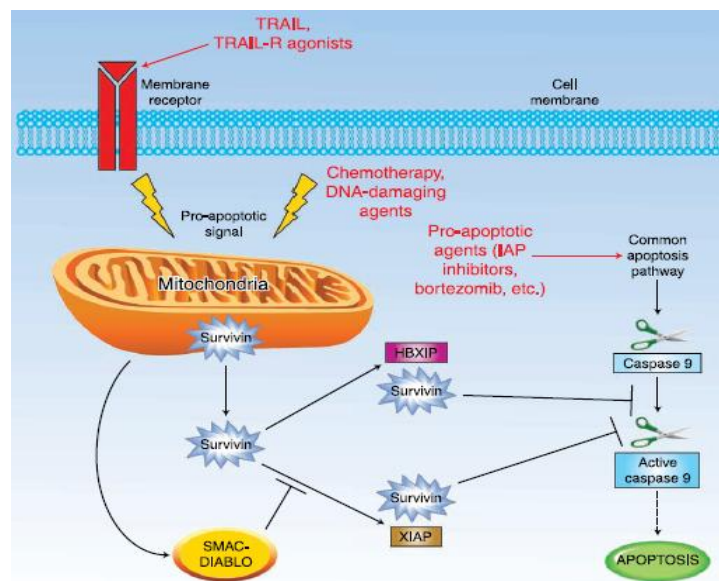


Figura 33. Survivina i apoptosi. Amb les senyals pro-apoptòtiques, Survivina s'allibera del mitocondri al citoplasma i inhibeix la caspasa 9 activa, requerint de la proteïna X del virus de l'hepatitis B (HBXIP) amb *X-linked IAP* (XIAP). Survivina és inhibida per Smac/Diablo (Mita *et al.* 2008).

## Survivina i resistència al tractament

Survivina s'expressa a nivells elevats durant el desenvolupament del teixit embrionari i fetal, mentre que en teixits adults la seva expressió és pràcticament

inapreciable excepte en placenta, tim, cèl·lules mare CD34+, i cèl·lules epitelials basals colòniques (Ambrosini *et al.* 1997; Gianani *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2001; Liu *et al.* 2010). Tanmateix, la sobreexpressió de Survivina s'ha observat en quasi tots els tumors malignes humans, incluint neuroblastoma, gliomes, càncer de pulmó, mama, estómag, esòfag, pàncrees, ovari, colon, melanoma (Church & Talbot 2012). En CaOV la sobreexpressió mitjana de Survivina és del 74% correlacionant-se amb un mal pronòstic de la malaltia (alt grau, tipus histològic, mutacions a p53) (Cohen *et al.* 2003). L'expressió de Survivina en CaOV augmenta durant la carcinogènesi: en ovari normal no hi ha expressió de mRNA de Survivina, mentre que es troba en un 73% en carcinomes d'ovari, 47% en tumors *borderline* i 19% en tumors benignes d'ovari. En els carcinomes d'ovari, els nivells d'expressió de mRNA de Survivina es correlaciona amb estadis clínics, el grau de diferenciació, els subtipus histològics i metàstasi. Per tant, la sobreexpressió de Survivina és important en la progressió dels tumors de CaOV i és un factor pronòstic (Liguang *et al.* 2007).

A		B			
Tumor type	Expression (%)	Sample	Number of patients	Positive survivin expression (%)	P-value
Breast cancer	70.7	Normal ovarian tissue	11	0 (0%)	
NSCLC	85.5	Benign ovarian tumor	21	4 (19%)	
Neuroblastoma	47	Borderline ovarian carcinoma	19	9 (47%)	
Glioma	NS	Ovarian carcinoma	63	46 (73%)	0.026
Colorectal	53.2	Grade:			
Melanoma	67	G1–G2	30	18 (60%)	
<b>Ovarian</b>	<b>73.5</b>	G3	33	28 (84%)	
Pancreatic	88	FIGO stage:			
Esophageal	80	I–II	28	17 (60%)	0.049
Gastric	34.5	III–IV	35	29 (82%)	
		Histological type:			
		serous	42	35 (76%)	0.008
		mucinous	12	8 (66%)	
		endometrioid	9	3 (33.3%)	
		Lymph node metastasis:			0.921
		Yes	34	25 (73%)	
		No	29	21 (72%)	

Taula 6. Survivina i càncer. Expressió de la Survivina en càncers humans (A) (Church & Talbot 2012). Nivells d'expressió de mRNA de Survivina a CaOV en els diferents graus de tumor, estadis, tipus histològics i metàstasi (B) (Liguang *et al.* 2007).

Es coneix que el promotor de la Survivina es troba silenciada en cèl·lules normals, però altament activada en cèl·lules tumorals. L'expressió diferencial de Survivina entre cèl·lules normals i tumorals sembla estar relacionada no tant sols amb una hiperactivitat de determinades vies oncogèniques com E2F, Ras mutat, Stat3, NFkB,

entre d'altres, sinó també per la pèrdua de gens supressors com PTEN, p53, Rb, BRCA i APC, que de forma constitutiva silencien el gen de la Survivina (Andersen *et al.* 2007).

La sobreexpressió de Survivina s'ha relacionat amb la resistència a un gran ventall d'agents quimioterapèutics i a la radioteràpia. La supressió de l'expressió de la proteïna podria conferir sensibilització als diferents tipus de tractament, així com el tractament amb CDDP. Una associació dels nivells de Survivina amb la resistència a l'apoptosi mediada pel CDDP s'ha reportat a línies de càncer de pròstata (Nomura *et al.* 2005), càncer de tiroides (Tirro *et al.* 2006) i mesotelioma (Zaffaroni *et al.* 2007). A més, l'expressió de la Survivina a teixits de càncer ha revelat una correlació inversa per la supervivència global dels pacients amb carcinoma gàstric, càncer d'esòfag i de pulmó tractats amb CDDP (Koberle *et al.* 2010).

S'han desenvolupat múltiples estratègies per inhibir l'expressió de la Survivina, així com oligonucleòtids anti-sentit, siRNA, ribozims, immunoteràpia i molècules inhibidores (YM155). Es pot inhibir la transcripció a través del bloqueig del promotor (petites molècules com YM155), inhibint la traducció proteica (ús de siRNA, oligonucleòtids, ribozims) o interferint la seva funció (mutants dobles negatius). Alguns d'ells han estat provats en estudis clínics de fase I i II (Church & Talbot 2012).

### **3.1.3 Paper de p53 en la regulació de l'apoptosi**

Un 60-80% dels CaOV presenta alteració molecular del gen TP53 (mutacions puntuals o delecions 17). La proteïna p53 també s'anomena "guardià del genoma" perquè és l'encarregada de coordinar la resposta cel·lular enfront un gran ventall d'estímuls tant diversos com: l'estrés produït pel trencament en una cadena de DNA, per radiacions UV, activitats oncogèniques, entre d'altres. Depenent del tipus i el nivell d'estímul, p53 pot actuar activant mecanismes d'apoptosi, senescència, aturada de cicle cel·lular, reparació del dany al DNA, metabolisme cel·lular o autofàgia (Vogelstein *et al.* 2000). Per portar a terme qualsevol d'aquestes accions, p53 actua com a factor de transcripció activant o reprimint la transcripció de gens essencials per cada resposta. La proteïna p53 es troba molt ben regulada per un seguit de modificacions post-traduccionals durant l'homeòstasi en cèl·lules normals i en resposta a un estímul d'estrés. L'activació de p53 consta de tres passos principals:

l'estabilització de la proteïna p53, l'antirepressió i l'activació del promotor específic. L'estabilització de p53 implica la seva fosforilació (per ATM, ATR, DNA-PK, Chk1/2) i els nivells de Mdm2; l'antirepressió per Mdm2 està regulada per l'acetil·lació i fosforilació de p53; i l'activació dels gens diana de p53 que impliquen modificacions post-traduccionals addicionals com l'acetil·lació (segons l'acetil·lació de p53 s'activaran uns gens o altres) i la concentració de cofactors (Kruse & Gu 2009).

### 3.1.3.1 Estructura i funció de p53

El gen TP53 es localitza al braç curt del cromosoma 17 i conté 11 exons amb dos llocs alternatius de transcripció, i diverses formes de *splicing* alternatiu. Hi ha fins a 9 isoformes diferents de p53, la funcionalitat de les quals està sent estudiada (<http://p53.bii.a-star.edu.sg/aboutp53/index.php>). Existeixen variants polimòrfiques de p53 que poden associar-se amb els nivells de mRNA de p53 i l'augment de càncer (Gemignani *et al.* 2004); aquests polimorfismes també poden modular la resposta a la quimioteràpia (Sullivan *et al.* 2004). La proteïna p53 consta de 393 aminoàcids, i mitja dotzena de dominis participen en la seva funció (Fig.34) (Olsson *et al.* 2007).

En la regió amino-terminal (aminoàcids 1-44) conté el domini de transactivació (TAD, *Transactivation Domain*) imprescindible per l'activació transcripcional dels gens diana de p53. Conté el domini àcidic de transactivació i el lloc d'unió a Mdm2, el qual inhibirà la funció transcripcional de p53. El domini ric en prolines (PR, *Proline-Rich domain*) (aminoàcids 58-101) facilita la interacció proteïna-proteïna i que condueix la resposta de p53 induïda pel dany al DNA, activant el procés d'apoptosi. El domini d'unió a DNA (aminoàcids 102-292) és on es troben la majoria de mutacions (<90%). El 28% de les quals succeeixen en sis residus (Fig.34) (Vousden & Lu 2002). El domini d'oligomerització (aminoàcids 325-356) consisteix en una cadena beta que interacciona amb l'altre monòmer de p53 per formar un dímer, seguida d'una hèlix alfa, la qual efectua la dimerització de dos dímers de p53 per formar un tetràmer. Una p53 funcional actua de forma tetramèrica, constituïda per dos homodímers de p53. En aquest domini també se situa una de les dues senyals d'exportació del nucli (NES, *Nuclear Export Signal*). En la regió carboxi terminal, hi ha 3 senyals de localització nuclear (NLS, *Nuclear Localization Signal*). La més N-terminal (aminoàcids 316-324) que consisteix en tres residus de lisina, és la més conservada (Fig.34).

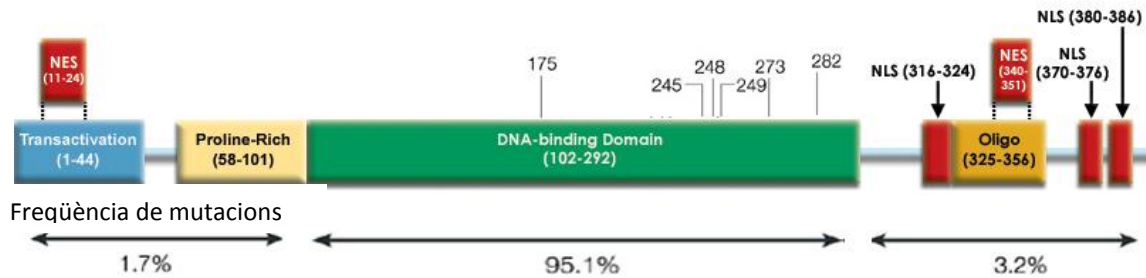


Figura 34. Dominis de la proteïna p53. El domini d'unió al DNA és la diana de més del 90% de les mutacions de p53 trobades en càncers humans (<http://p53.bii.a-star.edu.sg/aboutp53/index.php>; Vousden & Lu 2002).

### 3.1.3.2 Regulació de p53 a través de la interacció amb Mdm2

Podem definir l'activació de p53 com un increment en la concentració de la proteïna i un augment en la seva activitat transcripcional cap a gens amb resposta a p53. En cèl·lules normals amb absència d'estrés i de mutacions per TP53, la proteïna p53 presenta una vida mitjana molt curta (de 6 a 20 minuts), els nivells de la qual estan molt regulats principalment per l'activitat E3 ubiquitin lligasa de la proteïna Mdm2. Mdm2 i p53 es regulen mútuament a través d'un circuit de retroalimentació autoregadora (Wu *et al.* 1993). Quan p53 s'activa i els seus nivells són alts, p53 actua com a activador transcripcional del gen MDM2 (Barak *et al.* 1993). Mdm2 amb una vida mitjana molt curta degut a la seva activitat autoubiqüinitzadora, interacciona amb p53 i inhibeix la seva activitat mitjançant (Fig.35):

- Unió al domini de transactivació de p53 (posició N-terminal) i inhibició de la seva activitat transcripcional (Momand *et al.* 1992; Chen *et al.* 1993).
- Exportació de p53 del nucli al citoplasma promovent la seva degradació i la inhabilitat per accedir als gens diana.
- Mdm2 té activitat E3 lligasa, promou la conjugació de p53 a poliubiquitina. Aquesta conjugació a poliubiquitina marca a p53 per ser degradada via proteosoma (Kubbutat *et al.* 1997).

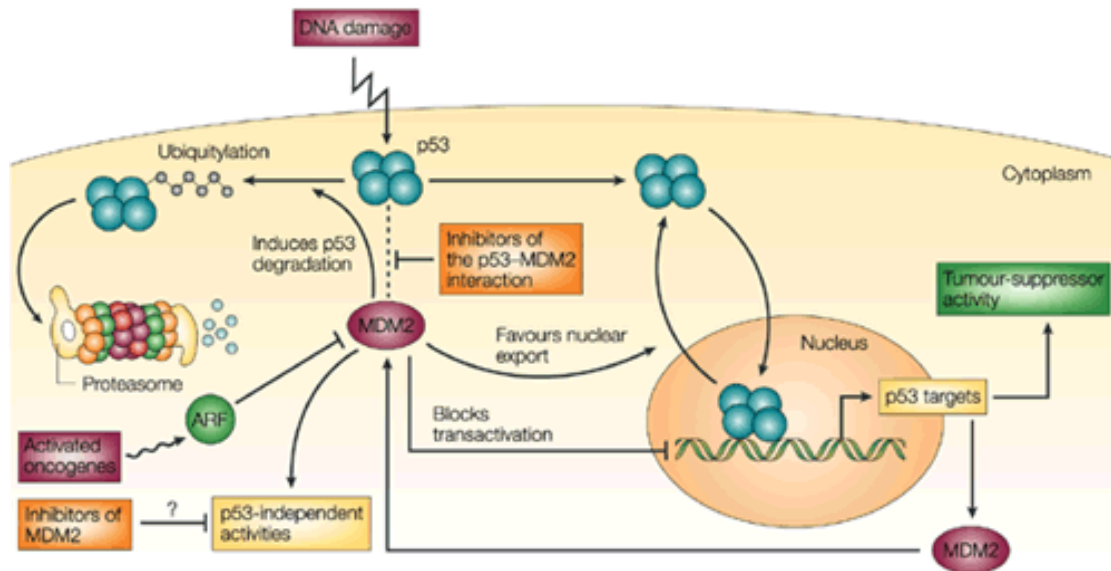


Figura 35. Regulació de p53 per Mdm2. p53 i Mdm2 formen un *loop* de retroalimentació autoregulatori. P53 estimula l'expressió de Mdm2. Mdm2 inhibeix l'activitat de p53 bloquejant la seva activitat transcripcional, afavorint la sortida de p53 del nucli i estimulant la seva degradació. El dany al DNA o l'activació d'oncògens indueixen l'activació de p53. Els oncògens regulen positivament a ARF, que evita la degradació de p53 mitjançant la inhibició de Mdm2. De forma similar, els inhibidors de la unió p53-Mdm2 haurien d'activar l'activitat supressora de tumors de p53 a cèl·lules que expressen p53 salvatge. Aquests compostos a l'unir-se amb Mdm2 podrien afectar també les activitats de Mdm2 independents de p53 (Chene 2003).

El lloc d'interacció entre ambdues proteïnes es troba en el domini N-terminal de p53, anomenat BOX1. En la interacció Mdm2-p53, s'ha observat que hi participen un nombre limitat de residus d'aminoàcids que són fonamentals per la interacció entre ambdues proteïnes. Únicament tres aminoàcids de p53 són essencials per la unió Mdm2-p53: Phe19, Trp23 i Leu26, els quals són inserits a una butxaca hidrofòbica que es troba a la superfície de la molècula de Mdm2 (Fig.36) (Klein & Vassilev 2004; Shangary & Wang 2008).

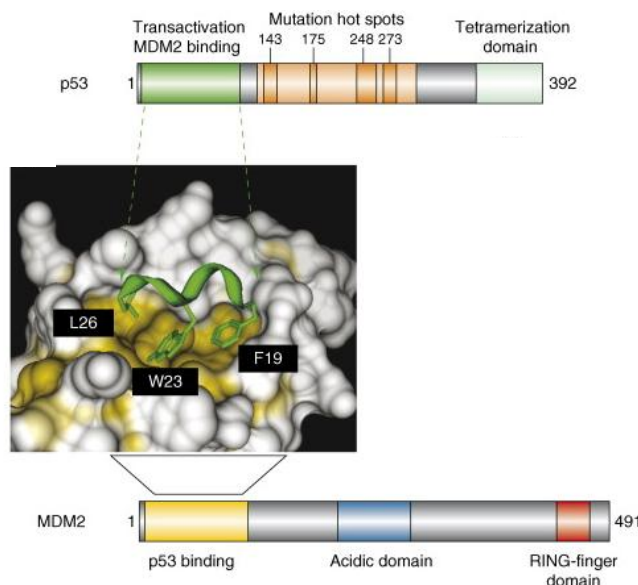


Figura 36. Aspectes estructurals de la interacció p53-Mdm2 (Vassilev 2007).

### 3.1.3.3 Mecanismes d'estabilització i activació de p53

L'activació de p53 depèn de senyals d'estrés, tant intrínsecs com extrínsecs (llum UV, hipòxia, dany al DNA, privació de nutrients, senyals oncogèniques, etc.). Aquests estímuls estan relacionats amb mecanismes que controlen la fidelitat de la replicació del DNA, la segregació dels cromosomes i la divisió cel·lular.

Les senyals d'estrés que rep la cèl·lula són detectades ràpidament (entre 1 minut i 1 hora) per unes proteïnes que transmetran la informació a p53, i regularan la seva concentració i activitat. La proteïna p53 rep unes modificacions post-traduccionals, les quals poden donar-se a diferents llocs i impliquen: fosforilacions, acetil·lacions, metil·lacions, ubiquïnitacions, sumolitzacions i neddilacions (Fig.37). A més, segons el tipus de dany al DNA, Mdm2 s'autopoliubiquïnitza degradant-se i incrementant els nivells de p53 (Harris & Levine 2005; Levine *et al.* 2006).

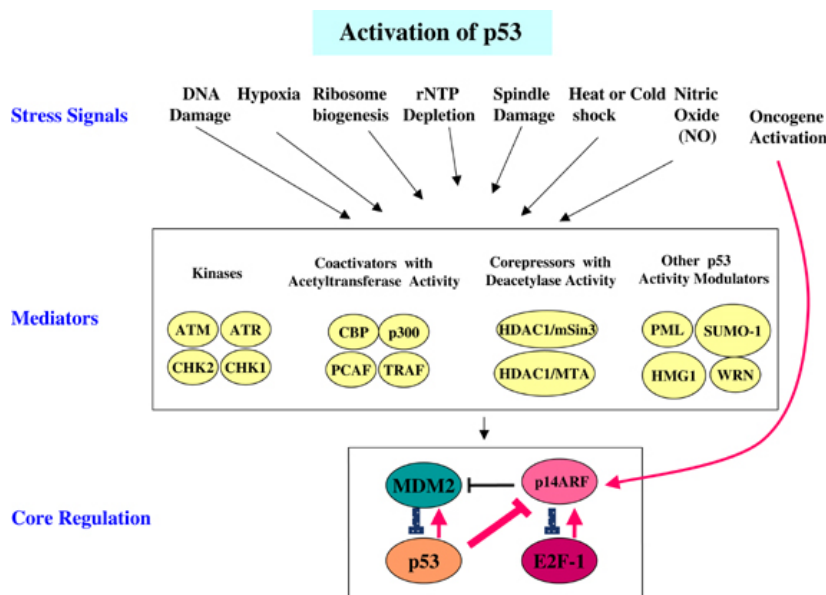


Figura 37. Diversitat de senyals que porten a l'activació de p53 (Harris & Levine 2005).

### 3.1.3.4 Dianes moleculars de p53

Existeixen gens diana de p53 implicats en l'aturada de cicle cel·lular com: CDKN1A, 14-3-3σ i GADD45. Altres estan implicats en l'apoptosi, ja sigui la via extrínseca (CD95/FAS/APO1, DR4,DR5) o la via intrínseca (BAX, NOXA,PUMA) i



altres que ajuden a l'apoptosi encara que per mecanismes desconeguts (PERP, SCOTIN, P53, AIP, i alguns PIG) (Levine *et al.* 2006). Existeixen altres gens diana de p53: p48 i p53R2, implicats en la reparació del DNA, que contraresten les espècies reactives d'oxigen; altres que estan implicats en la comunicació cel·lular i que donen lloc a proteïnes de secreció: IGF-BP3 (que evita que IGF-1 activi una resposta de creixement), PAI i maspin (inhibidors de proteases), trombospondina (anti-angiogènica), o TSAP-6 (augmenta la producció d'exosomes) (Fig.38).

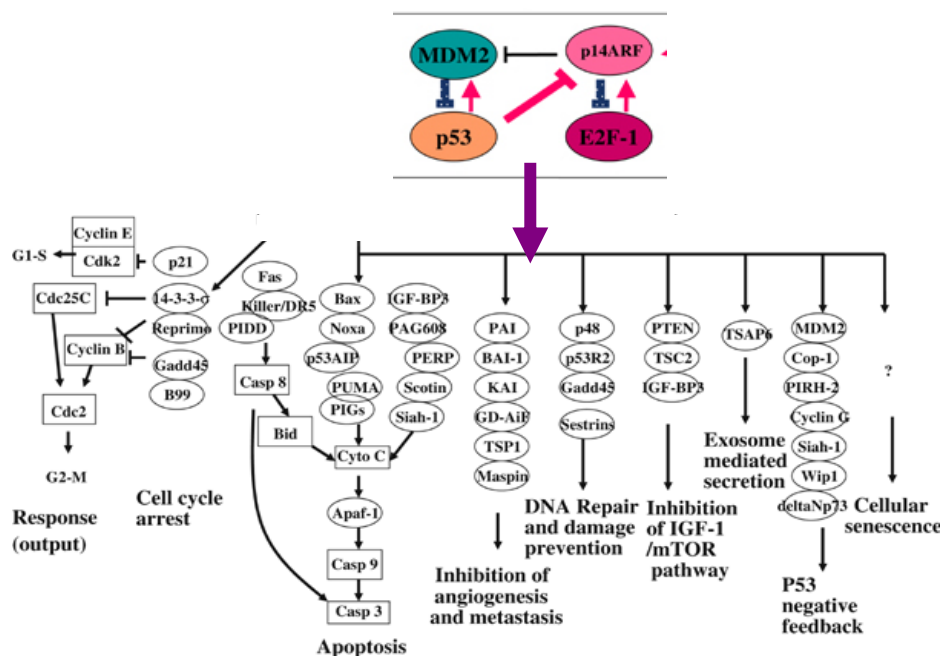


Figura 38. Via de p53. Gens regulats i respostes cel·lulars (Harris & Levine 2005; Levine *et al.* 2006).

## 4 Estratègies per sensibilitzar les cèl·lules tumorals: tractaments combinats

### 4.1 Inhibició de la interacció entre p53 i Mdm2: Nutlines

El gen MDM2 es troba amplificat o sobreexpressat en molts tipus tumorals. En un estudi es demostra que aproximadament el 48% dels tumors d'ovari tenen amplificació de MDM2, sent els tumors *borderline* i els carcinomes serosos els que presenten més amplificació (80% i 58%, respectivament), mentre que els mucinosos presenten un 33%, i els endometriodes no tenen amplificació (Mayr *et al.* 2006). La

majoria de tumors d'ovari *borderline* expressen més alts nivells de Mdm2 que els cistadenomes benignes i carcinomes (Palazzo *et al.* 2000). En presència d'alts nivells de Mdm2 disminueix la capacitat d'activar p53, i tot i ser funcional, es troba inhibida per aquesta interacció promovent el procés de carcinogènesi (Chene 2003). El disseny de compostos que inhibeixen la interacció entre p53 i Mdm2 és una bona estratègia per l'activació de p53 en els tumors. Diversos estudis mostren que la disrupció de la interacció entre proteïnes mitjançant oligodesoxinucleòtids de MDM2 antisentit (Wang *et al.* 1999; Tortora *et al.* 2000) o petits pèptids (Chene 2003), poden desencadenar l'activació de p53 que donarà lloc a una inhibició del creixement tumoral. Les primeres molècules petites selectives i inhibidores de Mdm2 són les Nutlines (anàlegs de la cis-imidazolina). Les Nutlines poden actuar en un rang de concentració nanomolar desplaçant a la proteïna p53 i evitant la interacció amb Mdm2, i han demostrat ser capaces d'activar la via de p53 tant *in vitro* com *in vivo* oferint una prova de la utilitat terapèutica de la inhibició de Mdm2 en tumors amb p53 salvatge (Vassilev 2004).

Les Nutlines es sintetitzen com a racèmics, on els enantiòmers poden ser separats a través de l'ús de columnes. Hi ha descrites tres classes de Nutlines: Nutlina-1, Nutlina-2 i Nutlina-3 (Fig.39), la qual es pot subdividir en 3a i 3b. S'ha demostrat que les Nutlines actuen en un rang entre 100-300 nM però amb diferències d'afinitats entre enantiòmers, de 150-200 vegades. La Nutlina-3b és 150 vegades menys potent que el seu enantiòmer Nutlina-3a respecte a la unió amb Mdm2. Per tant, la Nutlina-3b serveix com a control de l'activitat cel·lular no relacionada amb Mdm2 (Vassilev 2005).

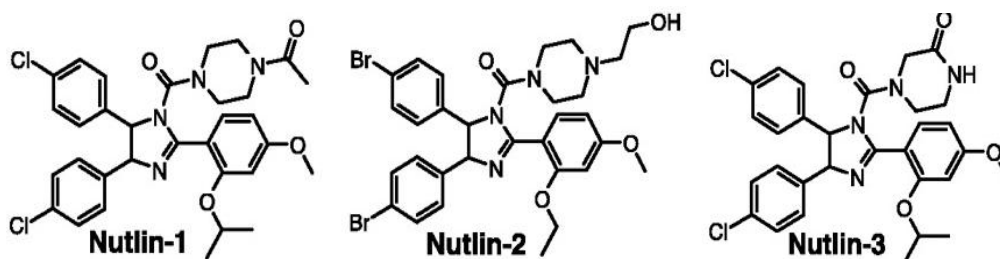


Figura 39. Estructura molecular de la Nutlina-1,-2,-3 (Vassilev 2004).

#### 4.1.1 Mecanisme d'acció de les nutlines

Les Nutlines penetren a la membrana cel·lular i actuen desplaçant la interacció de p53 amb Mdm2. La molècula de Nutlina imita els tres residus d'aminoàcids de p53 (Phe19, Trp23 i Leu26) fonamentals per la interacció entre Mdm2-p53, els quals s'insereixen a la butxaca hidrofòbica de la superfície de la molècula de Mdm2. La Nutlina s'uneix a la butxaca hidrofòbica de Mdm2, degut a que imita dits aminoàcids, així evitant la unió de p53 a Mdm2 (Vassilev 2007) (Fig.40).

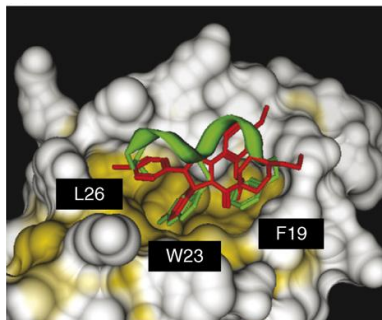


Figura 40. Mecanisme d'acció de la Nutlina. La molècula de Nutlina (vermell) imita els tres residus d'aminoàcids crucials de p53 (verd) per la interacció entre Mdm2-p53. S'uneix a la butxaca hidrofòbica de Mdm2 (blanc) inhibint la interacció Mdm2-p53 (Vassilev 2007).

Un dels primers mecanismes per l'activació de p53, com bé s'ha esmentat, són les modificacions post-traduccionals que experimenta la molècula, on les fosforilacions són les més estudiades. En un estudi de Thomson i col·laboradors on van tractar les cèl·lules de càncer de colon humà amb Nutlina i van analitzar 6 residus de serina claus per a la activació de p53, van demostrar que la Nut3a, a diferència d'altres compostos, no induïa fosforilacions. No obstant, la Nutlina és capaç d'induir la transactivació de gens diana de p53 i la inducció d'apoptosi, igual o millor que altres agents quimioterapèutics (Thompson *et al.* 2004).

El tractament *in vitro* amb Nutlina de cèl·lules tumorals amb p53 salvatge, pot induir -depenent del tipus cel·lular- diversos fenòmens, entre els que s'inclouen: aturada del cicle cel·lular, disminució de la proliferació cel·lular, inducció d'apoptosi i en alguns casos, senescència. La resposta ve donada a través de l'activació transcripcional dirigida per p53 (Vassilev 2007). Això s'ha demostrat en: osteosarcoma (Pishas *et al.* 2011), limfoma (Manfe *et al.* 2012), leucèmia limfoblàstica aguda (Gu *et al.* 2008), leucèmia limfocítica crònica (Coll-Mulet *et al.* 2006), leucèmia mielògena

aguda (McCormack *et al.* 2011), càncer de pulmó (Cao *et al.* 2006), càncer de pròstata (Logan *et al.* 2007), glioblastoma (Villalonga-Planells *et al.* 2011), i cèl·lules escamoses de cap i coll (Roh *et al.* 2011).

En la majoria dels estudis anteriors també s'ha observat que la combinació de Nutlina amb un altre agent antineoplàsic, potencia el seu efecte per un mecanisme sinèrgic (Coll-Mulet *et al.* 2006; Secchiero *et al.* 2007; Barbarotto *et al.* 2008; Carter *et al.* 2008; Kojima *et al.* 2008; Zhu *et al.* 2008; Drakos *et al.* 2009; Voltan *et al.* 2010) i també amb la radiació (Long *et al.* 2010).

La Nutlina indueix apoptosi a cèl·lules que tenen p53 salvatge, tot i que hi ha estudis indiquen que pot induir apoptosi a cèl·lules amb p53 mutada però parcialment funcional (Drakos *et al.* 2009). A les cèl·lules que no obtenen p53 funcional, Nutlina pot induir l'activació d'altres proteïnes associades a Mdm2, com p73 i E2F1 i activar l'apoptosi per un mecanisme independent de p53. p73 s'ha proposat ser un dels factors responsables de l'efecte observat amb la Nutlina a cèl·lules amb p53 mutada. S'ha demostrat que quan les cèl·lules tenen p53 disfuncional i s'exposen a altes concentracions de Nutlina (per exemple 20-30  $\mu$ M), p73 és desplaçada de la seva unió amb Mdm2, donant com a resultat la detenció del cicle cel·lular i l'apoptosi (Lau *et al.* 2008; Peirce & Findley 2009; Tabe *et al.* 2009). També s'ha demostrat que la Nutlina inhibeix la unió de E2F1 amb Mdm2, augmentant l'activitat transcripcional de E2F1 i augmentant la inducció d'apoptosi després de la quimioteràpia a través de l'augment de p73 i Noxa, a cèl·lules amb p53 mutada (Ambrosini *et al.* 2007). La Nutlina potencia l'efecte de la quimioteràpia convencional a cèl·lules de limfoma de cèl·lules T que tenen pèrdua de p53 (Manfe *et al.* 2012), així com sensibilitza a línies cel·lulars de sarcoma al CDDP i a la Doxorubicina amb p53 mutada (Ohnstad *et al.* 2011).

Han hagut avenços en el desenvolupament de molècules inhibidores de la interacció Mdm2-p53, com molècules terapèutiques potencials per tractar el càncer, amb èmfasi a la Nutlina (Secchiero *et al.* 2011; Shen & Maki 2011). Un dels inhibidors de Mdm2 emergents és RO5045337 (RG7112), que es tracta d'una formulació oral d'una molècula derivada de la Nutlina que es troba actualment en estudis clínics de fase I, per pacients amb tumors sòlids avançats (NCT00559533), leucèmia aguda

refractària i leucèmia linfofocítica crònica (NCT00623870). L'objectiu d'ambdós estudis és determinar la dosi màxima tolerada i la dosi òptima de RO5045337, administrat com a monoteràpia. Les dades preliminars han demostrat que els perfils de seguretat acceptables amb la resposta són els pacients amb liposarcoma, leucèmia mielògena aguda i la leucèmia linfofocítica crònica (Yuan *et al.* 2011). Un altre inhibidor de Mdm2 que s'ha provat en estudis clínics en fase I, és un nou derivat de la triptamina JNJ-26854165 (NCT00676910), el qual s'ha administrat a pacients amb tumors sòlids en estat avançat i/o refractaris per avaluar la seguretat, la dosi òptima i la dosi màxima tolerada, administrat com a monoteràpia (Yuan *et al.* 2011).

#### 4.1.2 Nutlines i cisplatí

Tal com s'ha comentat prèviament, moltes neoplàsies entre les que s'inclouen el CaOV, són resistents al tractament amb CDDP. Degut aquest fet, s'estan realitzant grans esforços en la recerca de noves molècules que permetin sensibilitzar aquests tumors enfront al tractament, i aconseguir millorar la supervivència de la pacient així com la seva qualitat de vida. Diversos estudis mostren que uns nivells baixos de p53 a la cèl·lula indueixen resistència després del tractament amb quimioteràpia o radioteràpia; la inhibició de p53 per part de Mdm2 pot ser unes de les causes que explicarien aquesta resistència (Chen *et al.* 1996).

Estudis previs han demostrat que el tractament amb Nutlina sensibilitza enfront al CDDP induint diferents mecanismes en funció del tipus cel·lular tractat. En un estudi realitzat amb cèl·lules de neuroblastoma, es va demostrar que la Nutlina estabilitzava a p53 i sensibilitava a les cèl·lules al CDDP induint apoptosi (Barbieri *et al.* 2006). Així mateix, estudis amb tumors testiculars malignes de cèl·lules germinals (Bauer *et al.* 2010), càncer testicular (Koster *et al.* 2011), i càncer gàstric (Endo *et al.* 2011) han demostrat que la Nut3a té un efecte additiu o sinèrgic amb el CDDP potenciant l'efecte apoptòtic.

Un important estudi ha descrit que la Nutlina inhibeix l'apoptosi del ronyó durant el tractament amb CDDP (Jiang *et al.* 2007). La Nutlina bloqueja l'activació de Bax i Bak i la sortida del citocrom c, així evitant l'apoptosi a les cèl·lules del ronyó. Donat que el CDDP és un agent que es caracteritza per presentar nefrotoxicitat (Arany

& Safirstein 2003; Taguchi *et al.* 2005), l'ús de la Nutlina combinada amb el CDDP podria ser útil per evitar la toxicitat generada per aquest agent.

## 4.2 Molècules inhibidores de la Survivina: YM155

La Survivina, membre crític de la família de proteïnes inhibidores de l'apoptosi (Deveraux & Reed 1999; Salvesen & Duckett 2002; Liston *et al.* 2003), es troba altament expressada en càncers humans i indetectable als teixits adults diferenciats normals (Li & Ling 2006). Survivina està implicada en la regulació de l'apoptosi i en el control del cicle cel·lular i mitosi (Altieri 2003a; Wheatley & McNeish 2005), així com en altres processos fisiopatològics (Li & Brattain 2006; Lechler *et al.* 2007), incluint la seva importància a l'inici del càncer (Dasgupta *et al.* 2006), l'angiogènesi (Conway *et al.* 2003; Iurlaro *et al.* 2004; Byun *et al.* 2007), la progressió del tumor, la resistència a fàrmacs i radiació (Virrey *et al.* 2008), i la recidiva tumoral (Li 2005). Donat que es troba altament expressada en càncer, té capacitat per inhibir l'apoptosi, la resistència als fàrmacs i la radiació, la promoció de proliferació de cèl·lules tumorals i la seva associació en diversos paràmetres clínicopatològics, Survivina és potencialment un dels objectius més prometedors pel tractament del càncer. A més, degut a la seva absència en teixit normal, té potencial per tenir una toxicitat molt limitada (Cheng *et al.* 2012).

La Survivina no és una proteïna de membrana i no té una activitat enzimàtica intrínseca, de manera que trobar tractaments que tinguin com a objectiu inactivar les funcions de Survivina és una tasca complexa. A més, estudis cristal·logràfics han demostrat la presència de pocs llocs potencials perquè els fàrmacs puguin actuar. Malgrat això, s'han descrit múltiples estratègies que tenen com a objectiu disminuir l'expressió o funció de Survivina, les quals inclouen: oligonucleòtids anti-sentit, siRNA, ribozims, la immunoteràpia, mutants dominants-negatius i petites molècules. L'ús dels antagonistes de Survivina en combinació amb les teràpies antitumorals convencionals, podria ser una opció òptima pel tractament del càncer (Ryan *et al.* 2009).

Una de les primeres molècules utilitzades per inhibir Survivina és *Sepantronium bromide*, també conegut com a YM155. És un petit compost amb una única estructura

química (Fig.41) que va ser seleccionat mitjançant un cribatge d'alt rendiment com a supressor específic de l'expressió de Survivina per inhibició del seu promotor. La inhibició del promotor ocasiona una inhibició del mRNA i la proteïna de forma temps i dosi-dependent, donant lloc a una activació de l'apoptosi, sense afectar els nivells d'expressió d'altres IAPs tant *in vitro* com *in vivo* (Nakahara *et al.* 2007; Nakahara *et al.* 2011a).

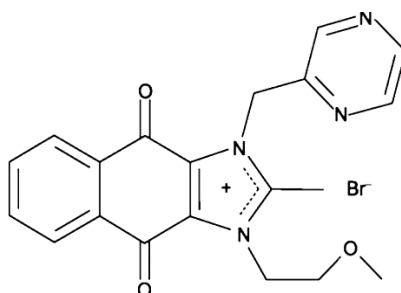


Figura 41. Estructura química de l'YM155 (Minematsu *et al.* 2008).

Els efectes antitumorals de l'YM155 s'han analitzat en una bateria de 119 línies tumorals humanes, observant-se una major activitat antitumoral a línies cel·lulars derivades de limfoma de no Hodgkin, càncer de pròstata hormono-dependent, càncer d'ovari, sarcoma, càncer de pulmó de cèl·lula gran, càncer de mama, leucèmia i melanoma (Nakahara *et al.* 2011a). El registre promig d'inhibició del creixement del 50% (IC<sub>50</sub>) avaluat per assaig de sulforhodamina B va ser de 15 nM. La mitjana de valors de IC<sub>50</sub> per a cèl·lules mutants per p53 va ser de 11 nM, mentre que per cèl·lules amb p53 salvatge va ser de 16 nM, el que suggereix que l'YM155 inhibeix el creixement independentment de l'estat de p53 (Nakahara *et al.* 2011a). En models de xenoinjert de mama, bufeta, càncer de pulmó de cèl·lula gran i melanoma, la infusió contínua de YM155 durant 3 ó 7 dies (1-10 mg/kg) va demostrar una activitat antitumoral significativa sense mostrar pèrdua del pes corporal dels ratolins. Regressions tumorals induïdes per l'YM155 es van associar a la reducció dels nivells intratumorals de l'expressió de Survivina, l'augment de l'apoptosi i la disminució dels índexs de mitosi (Nakahara *et al.* 2011a).

#### 4.2.1 Mecanisme d'acció de l'YM155

Estudis de farmacocinètica revelen que la distribució de l'YM155 als teixits tumorals és 20 vegades més alta que en plasma. Menor concentració d'YM155 en plasma reflexa una reduïda exposició a teixits normals, mentre que una major concentració en els tumors, reflexa una major exposició a teixits tumorals. Aquesta diferència entre ambdues localitzacions podria ser explicada per l'estructura de la molècula. Es coneix que diversos transportadors de cations orgànics es troben sobreexpressats en càncers humans, i tenint en compte que l'YM155 és una molècula petita, composta amb un resta de catió orgànic, existeix la possibilitat que s'incorpori a l'interior de les cèl·lules canceroses mitjançant aquests transportadors (Nakahara *et al.* 2007). Estudis han demostrat que l'YM155 en humans és absorbit de la sang als hepatòcits i a cèl·lules tubulars proximals via transportadors orgànics de cations 1 / 2 (OCT1 i OCT2). Per tant a les línies cel·lulars, l'YM155 és introduït al seu interior mitjançant els transportadors OCT1/2 (Minematsu *et al.* 2010).

Un estudi recent investigà la capacitat de l'YM155 per inhibir selectivament la transcripció de Survivina, i revelà que el nucli promotor de la Survivina (269pb) juga un paper important en els efectes inhibitoris de l'YM155, sent un esdeveniment selectiu sense l'associació de la detenció a fase G1 del cicle cel·lular. També es va demostrar que la inhibició del promotor de Survivina mitjançant YM155, és en part, a través de la inhibició de la transcripció mitjançant la interrupció de Sp1 amb la regió -149 a -71 del nucli promotor de la Survivina (Cheng *et al.* 2012). Recentment s'ha identificat que un dels objectius moleculars de l'YM155 és el factor de transcripció d'interleucina potenciador d'unió factor 3 (ILF3), que regula l'expressió de la Survivina. El complex (ILF3)/NF110 és objectiu directe de la unió de l'YM155. L'augment de l'activitat del promotor de la Survivina per la sobreexpressió de ILF3/NF110 és atenuada per l'YM155 d'una manera dependent a la concentració, el que suggereix que ILF3/NF110 és l'objectiu fisiològic a través del qual l'YM155 efectua la supressió de la Survivina. Els resultats també mostren que l'única regió C-terminal de la ILF3/NF110 és important per promoure l'expressió de la Survivina, ja que és important per l'alta afinitat d'unió amb l'YM155 (Nakamura *et al.* 2012). Un altre estudi demostra que p54<sup>NRB</sup> s'uneix al promotor de Survivina regulant-ne l'expressió. p54<sup>NRB</sup> forma un



complex amb ILF3 i activen la transcripció de Survivina. L'YM155 indueix la interrupció del complex ILF3/ p54<sup>NRB</sup>, transportant a ILF3 al nucleol separant-lo de p54<sup>NRB</sup> i per tant, inhibint la transcripció de Survivina. A més, la regulació de l'expressió de Survivina mitjançant el complex ILF3/ p54<sup>NRB</sup> actua coordinadament amb E2F1 i E2F2 (Fig.42) (Yamauchi *et al.* 2012).

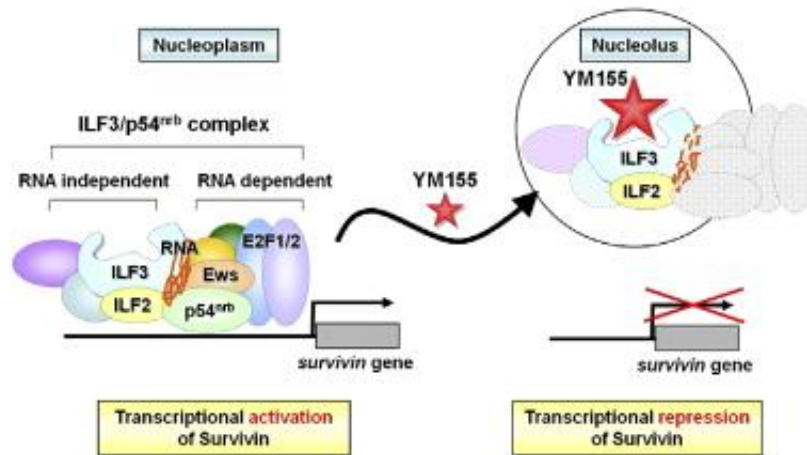


Figura 42. Paper del complex ILF3/ p54<sup>NRB</sup> en la transcripció de la Survivina, regulada per l'YM155 (Yamauchi *et al.* 2012).

Estudis recents han demostrat que un nou compost imidazolium naphtquinona anomenat NSC80467 presenta un aspecte d'activitat similar a l'YM155. Ambdós agents tenen símil estructural, un alt grau de coeficient de correlació i capacitat per inhibir l'expressió de Survivina. El tractament de línies cel·lulars PC3 amb cadascun dels agents, va mostrar una inducció dosi-dependent (a dosis nanomolars) dels marcadors de dany de DNA  $\gamma$ H2AX i KAP-1. La dosi necessària de cada agent per estimular  $\gamma$ H2AX va ser considerablement inferior a la dosi necessària per inhibir Survivina, demostrant que el dany al DNA és el primer esdeveniment generat per ambdós agents. La resposta al dany al DNA va ser confirmada amb un panel de línies cel·lulars tractades amb els dos agents, on es va demostrar que  $\gamma$ H2AX i KAP-1 s'expressaven en presència de les molècules. Aquest estudi va demostrar que NSC80467 i l'YM155 són agents de dany al DNA, on la supressió de Survivina seria un esdeveniment secundari (Glaros *et al.* 2012). NSC80467 i l'YM155 són quinones poliromàtiques que pertanyen funcionalment a un grup divers d'agents contra el càncer (incluint antraciclins, doxorubicina, daunorubicina, mitomicina C i mitoxantrones) que són principalment agents intercalants i perjudicials del DNA. Malgrat que NSC80467 i YM155 no obtenen el grup alquilant altament reactiu (per

exemple, l'aziridina en mitomicina C), tenen un alt potencial per intercalar-se al DNA i generar dany (Glaros *et al.* 2012).

Actualment l'YM155 es troba en estudis clínics de fase I i II per diferents tipus de càncer, administrat com a monoteràpia o en combinació amb altres agents quimioterapèutics (Church & Talbot 2012). En estudis clínics de fase I, l'YM155 ha estat provat en pacients amb tumors sòlids avançats i amb limfomes. Les conclusions de l'estudi permeten afirmar que l'YM155 pot ser administrat de forma segura, sense aparició d'una toxicitat severa. En alguns pacients es mostra reducció tumoral analitzada per tomografia computeritzada (Tolcher *et al.* 2008; Satoh *et al.* 2009).

Dels estudis en fase II alguns es troben encara en estat actiu (<http://www.clinicaltrials.gov>). Els resultats dels estudis amb càncer de pulmó de cèl·lula gran avançat, melanoma avançat, càncer de pròstata resistent a la teràpia amb taxans i limfoma refractari difós de cèl·lules B, demostren que l'YM155 com a monoteràpia té una modesta activitat antitumoral, però és probable que en combinació amb altres tractaments pugui tenir una acció quimio o radiosensibilitzant (Tolcher *et al.* 2008; Giaccone *et al.* 2009; Lewis *et al.* 2011; Cheson *et al.* 2012).

Estudis preclínics amb l'YM155 en combinació amb agents quimioterapèutics, demostren que el doble tractament indueix molta més apoptosi comparat als tractaments simples, tan *in vitro* com *in vivo*. En un model de xenoinjert humà de pulmó (NSCLC), la combinació de l'YM155 amb docetaxel indueix intensament l'apoptosi i millora l'activitat antitumoral, en comparació amb l'YM155 o el docetaxel com agents únic (Nakahara *et al.* 2011b). En melanoma, el tractament combinat d'YM155 amb docetaxel indueix una major apoptosi que la suma de les taxes individuals dels tractaments simples *in vitro* i amb regressió tumoral en el model de xenoinjert de melanoma, sense pèrdua de pes corporal (Yamanaka *et al.* 2011). YM155 combinat amb Rituximab genera millores significatives en la regressió del tumor i supervivència en models de xenoinjert de limfoma de no Hodking, demostrant que l'efecte antitumoral de la combinació de l'YM155 amb Rituximab s'acompanya d'una disminució en el metabolisme de la glucosa del tumor i la proliferació cel·lular (Kita *et al.* 2012). L'YM155 potencia la quimiosensibilitat a la gemcitabina a les

cèl·lules de càncer de pàncrees i potencia l'efecte antitumoral als xenoinjerts (Yoon *et al.* 2012).

#### 4.2.2 YM155 i cisplatí

Estudis previs han demostrat que el tractament amb l'YM155 sensibilitza enfront al CDDP a diferents tipus cel·lulars, mitjançant la inhibició de Survivina i consegüent inducció d'apoptosi i/o mitjançant la inhibició de la reparació del DNA. Estudis demostren que l'YM155 sensibilitza a les cèl·lules de càncer de pulmó als compostos del platí *in vitro* i *in vivo*; s'observa sinergisme entre ambdós compostos augmentant l'apoptosi i inhibint la reparació del DNA (Iwasa *et al.* 2010). El pretractament amb YM155 reverteix la resistència al CDDP a cèl·lules tumorals de cap i coll *in vitro* i *in vivo* sense produir toxicitat sistèmica i millorant l'eficàcia terapèutica del CDDP (Kumar *et al.* 2012).

L'inhibidor farmacològic YM155 ha demostrat una toxicitat acceptable i eficàcia terapèutica com agent únic a les primeres etapes d'assajos clínics. L'YM155 en combinació amb teràpies citotòxiques, també ha demostrat actuar amb sinèrgia sensibilitzant a les cèl·lules a la quimioteràpia convencional, així com la sensibilització de cèl·lules al CDDP, el que podria suposar una millora terapèutica a la teràpia actual del CaOV.

**OBJECTIUS**

---



## OBJECTIUS

El càncer d'ovari (CaOV) és el quart càncer ginecològic més freqüent després del càncer de mama, endometri i cèrvix, i representa la cinquena causa de mort per càncer a la població femenina. De tots els tipus de CaOV, l'epitelial representa el 90% de tots els tumors d'ovari i són els més letals. La baixa supervivència associada al CaOV és deguda, en la majoria de casos, al fet que les pacients es diagnostiquen en un estadi avançat de la malaltia, al no haver fins al moment un mètode de diagnòstic de detecció precoç. A més, són tumors poc sensibles als tractaments estàndars degut a múltiples factors, entre els quals s'inclouen característiques intrínseques primàries, i altres adquirides durant el decurs de la malaltia, fenomen conegut com a quimioresistència, al que comporta un mal pronòstic de la pacient. El tractament del CaOV es basa en la cirurgia citoreductora, i un cop extripat el tumor i determinat l'extensió de la malaltia, s'estableix el tractament amb quimioteràpia, basada en la combinació de platí (cisplatí, CDDP) i taxans (paclitaxel).

Malgrat als esforços en la innovació de noves tècniques quirúrgiques i la millora dels protocols quimioterapèutics, la majoria de les pacients presenten una supervivència als 5 anys del 30%.

L'objectiu global d'aquesta tesi ha estat avançar en el coneixement dels mecanismes de quimioresistència del CaOV epitelial humà al cisplatí. Aquest objectiu general es pot concretar en tres objectius específics:

1. Establir cultius primaris de CaOV epitelial a partir de mostres humanes utilitzant-se com a model *ex vivo* per l'estudi de la resposta al tractament del CaOV amb noves combinacions de molècules.
2. Estudiar l'efecte de l'inhibidor de Mdm2 Nutlina-3a, sol i en combinació amb CDDP en línies cel·lulars i cultius primaris de CaOV, per avaluar la capacitat sensibilitzadora al CDDP.

3. Determinar l'efecte de l'inhibidor de Survivina YM155, sol i en combinació amb CDDP, en línies cel·lulars i cultius primaris de CaOV per avaluar la seva capacitat de sensibilització al CDDP. Per corroborar els estudis *in vitro* i *ex vivo* s'ha usat un model xenoinjert de CaOV.

# MATERIALS I MÈTODES





# MATERIALS I MÈTODES

## 1 Cultius cel·lulars

### 1.1 Recollida de mostres de pacients

La recollida de mostres per l'establiment de cultius primaris va ser tant de tumors sòlids com de líquids ascítics (LASC).

Els tumors sòlids es van obtenir de biòpsies de pacients i es van recullir al Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari de Bellvitge (HUB). Les mostres van ser preservades i transportades des de l'hospital al laboratori en condicions estèrils amb medi MCDB105/M199 (Taula M7) (1:1) a temperatura ambient. Part de la mostra es va utilitzar per establir el cultiu primari i la resta es va guardar a -80°C pel seu posterior ús. Tota la informació de la mostra es va recopilar en una base de dades interna on es va anotar la data de recollida, el pes del tumor, el tipus i els vials de la mostra que es van poder congelar a -80°C. Per cada mostra es tenia el número corresponent de biòpsia assignat pel servei d'anatomia patològica i una codificació pròpia. En aquesta, s'hi indicava el número de tumor processat, seguit del passe. Exemple: #7p1 (mostra número 7, passe 1).

Els LASCs es van obtenir de les laparatomies o les paracentesis terapèutiques procedents del Servei de Ginecologia de l'HUB. Les mostres es van recullir al quiròfan en un recipient estèril i es van transportar al laboratori a temperatura ambient. Tota la informació de la mostra es va guardar en una base de dades interna on es va anotar la data de recollida, el volum de la mostra, el tipus i el número d'historial clínic de la pacient. Per cada mostra es tenia una codificació pròpia, seguint el model dels tumors sòlids. Exemple: LASC#8p2 (mostra número 8, passe 2).

En tots dos casos, la identitat de la pacient es va mantenir confidencial.

El diagnòstic de cada mostra va ser realitzat pel Servei d'Anatomia Patològica del HUB, seguint els criteris clínics, morfològics i moleculars de classificació proposada per l'OMS. Les pacients van ser informades i van donar el seu consentiment firmat per l'ús de les mostres en estudis d'investigació, a més dels projectes desenvolupats que es troben avalats pel Comitè Ètic de l'HUB, número de protocol 06/03.

## 1.2 Establiment de cultius primaris de CaOV

Segons si el tipus de mostra era tumor sòlid o LASC, es va procedir a realitzar un protocol determinat.

### 1.2.1 Tumors sòlids

El medi de transport es va retirar i la mostra es va decantar en una placa de Petri de 6 ó 10 cm, depenent de la mida de la mostra. Part del medi es va eliminar amb precaució de no perdre teixit. Quan la mida de la mostra va ser suficientment gran, amb ajuda del bisturí i pinces, es va tallar un tros i es va posar a un criovial per a ser congelat a  $-80^{\circ}\text{C}$ , rotulant el número de tumor, el número de biòpsia i la data de processament.

La resta de la mostra es va pesar i es va procedir a la disgregació mecànica: en una placa de Petri s'hi va afegir un volum de *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) (Taula M7) sense  $\text{Ca}^{2+}$  i sense  $\text{Mg}^{2+}$  fins a cobrir la mostra. Amb l'ajuda del bisturí i les pinces estèrils es va disgregar mecànicament fins a obtenir trossos de la mida de  $\sim 1\text{-}4\text{ mm}^3$  (Fig.M1). Posteriorment, es va realitzar la disgregació enzimàtica amb col.lagenasa II a una concentració final de 200 U/ml amb el volum corresponent de HBSS segons el pes de la mostra:  $< 100\text{ mg}$  (0,5 mL de col.lagenasa II + 4,5 mL de HBSS),  $100\text{-}500\text{ mg}$  (1 mL de col.lagenasa II + 9 mL de HBSS),  $> 500\text{ mg}$ : 2 mL de col.lagenasa II + 18 mL de HBSS). La mostra es va mantenir en agitació constant (80 U) a  $37^{\circ}\text{C}$  durant aproximadament 1 hora. El temps de disgregació va ser variable en funció de la mida, la textura i el tipus de tumor. Per facilitar el procés, els agregats es van acabar de disgregar suaument pipetejant diverses vegades amb la pipeta p1000. Un cop la mostra disgregada, es va centrifugar a 500 g durant 5 minuts per retirar el medi HBSS, resuspenent amb medi fresc MCDB105/M199 (1:1) amb presència de 10%

de sèrum boví fetal (FBS) (Taula M7) i 1% de penicil·lina-estreptomina (Taula M7). Es va centrifugar a 500 g durant 5 minuts i es va retirar el sobrenedant. A continuació el *pellet* de cèl·lules es va resuspendre amb medi fresc, en un volum adequat en funció del nombre de plaques que es sembraven (uns 200 mg de teixit a cada placa de 6 cm). Els cultius primaris es van mantenir en un incubador amb atmòsfera humida, pressió parcial de CO<sub>2</sub> del 5% a una temperatura constant de 37°C.



Figura M1. Establiment de cultius primaris de CaOV a partir de mostra sòlida.

### 1.2.2 Líquid ascític (LASC)

Un volum de 10 mL de LASC es va transferir directament a flascons de T-75 amb un volum equivalent de medi complet MCDB105/M199 (1:1), 10% de sèrum boví fetal (FBS) i 1% penicil·lina-estreptomina. El nombre de flascons T-75 usats per mostra va dependre del volum inicial d'aquesta. Amb volums grans, la mostra es va homogeneitzar, sembrant-se un màxim de 10 flascons de T-75, amb LASC directe i amb el volum equivalent de medi complet. Per l'obtenció de cultius primaris a partir de *pellet* de LASC, es va obtenir un volum de LASC de 50 mL, es va centrifugar a 300 g durant 5 minuts i el *pellet* es va resuspendre amb medi complet per plaquejar-lo en un flascó de T-75. Un volum de LASC de 25-50 mL es va centrifugar a 500 g durant 5 minuts i el *pellet* i el sobrenedant es van guardar a -80°C en tubs diferents, pel posterior ús. Els LASCs es van mantenir en un incubador amb atmòsfera humida, pressió parcial de CO<sub>2</sub> del 5% a una temperatura constant de 37°C (Shepherd *et al.* 2006).

### 1.3 Manteniment dels cultius primaris de CaOV

Al dia següent, els cultius primaris s'observaven al microscopi òptic, i normalment, després de 24 hores de plaqueig, algunes cèl·lules ja s'observaven adherides a la placa. Si el cultiu presentava molts eritròcits i detritus cel·lulars, es retirava el sobrenedant i s'afegia 100% de medi fresc, per evitar la dificultat d'observació i la possible reduïda viabilitat del cultiu primari. Tanmateix, si el cultiu primari presentava pocs eritròcits i detritus cel·lulars, s'afegia medi condicionat al 90%. El medi condicionat consisteix en afegir al medi fresc (MCDB105/M199) un volum de medi que ja ha estat en cultiu. Aquest es retira de la placa i es centrifuga a 300 g durant 5 minuts. Un volum determinat del sobrenedant es filtra amb una malla de 0,70 µM i es mescla amb un volum de medi fresc, el qual varia en funció del temps que té el cultiu i la confluència d'aquest. Quan els cultius primaris estan poc confluents, el medi condicionat es fa del 90% (90% sobrenedant en 10% de medi fresc), i a mesura que augmenta la confluència cel·lular disminueix el percentatge de medi condicionat, des del 70% al 10% (aquest últim quan la confluència del cultiu és del 90%). La renovació parcial es va fer cada 2-3 dies amb medi condicionat per evitar la pèrdua dels factors de creixement que les pròpies cèl·lules en cultiu sintetitzen i excreten al medi.

Per eliminar els hematies dels cultius primaris no es va usar cap tampó de lisi, ja que les cèl·lules epitelials d'ovari s'adhereixen ràpidament a la placa, mentre que els hematies queden flotant pel medi. A més, el medi usat per propagar les cèl·lules epitelials (MCDB105/M199) no permet el creixement de cèl·lules hematopoiètiques, eliminant-se els hematies a mesura que es van realitzant els canvis de medi (Shepherd *et al.* 2006).

Quan les cèl·lules van assolir una confluència del 80-90% es va retirar el medi, es van rentar amb PBS 1X i s'hi va afegir un volum de tripsina-EDTA al 0,25% (Taula M7), necessari per a cada placa. Es van incubar a 37°C durant un parell de minuts i amb l'ajuda d'un *scraper* es van desenganxar les cèl·lules adherides. Per bloquejar l'acció de la tripsina, es va afegir medi de cultiu complet precalentat i es va centrifugar a 300 g durant 5 minuts. El *pellet* es va resuspendre en medi fresc i es va plaquejar en una

placa de volum superior o diverses plaques si es volia expandir el cultiu. El *ratio* de sembra dels cultius primaris va ser de 1:2, monitoritzant-se cada 24-48 hores per observar l'eficiència de sembra i la morfologia general de les cèl·lules.

Els cultius primaris es van congelar a passe 0-4, depenent de la confluència. Congelar cultius primaris a passes més alts és possible, però a mesura que s'augmenta el número de plaquejos es perden les característiques originals del tumor (especialment cultius primaris amb passes iguals o superiors a 6), per això és important congelar els cultius primaris establerts a passes baixos.

En experiments que es van usar cultius primaris, es van usar aquells de passes 0-4, ja que la nostra experiència ens ha demostrat que en passes superiors, les mostres moren o entren en senescència.

## **1.4 Enriquiment dels cultius primaris de CaOV amb cèl·lules epitelials**

Una de les problemàtiques dels cultius primaris de CaOV és el creixement descontrolat de fibroblasts, els quals creixen de forma ràpida expandint-se per la placa, emmascarant les cèl·lules epitelials. La presència de fibroblasts en els cultius primaris es va avaluar diàriament, portant-se a terme diferents protocols per a solucionar l'esmentada problemàtica per obtenir cultius primaris rics en cèl·lules epitelials.

### **1.4.1 Anticòs 1B10 (*Anti-Fibroblast Surface Protein*)**

L'anticòs murí monoclonal IgM 1B10 (AbCam, ab11333) és específic, citotòxic i reconeix una proteïna de la superfície dels fibroblasts que es troba absent a cèl·lules epitelials i limfòcits humans (Esterre *et al.* 1992). L'anticòs reacciona amb molècules de la superfície de la membrana dels fibroblasts, teixit de macròfags i el 95% de monòcits de sang perifèrica (Singer *et al.* 1989). L'anticòs s'utilitza per eliminar els fibroblasts del cultiu inhibint-te l'adherència a la placa o bé per efecte citotòxic en presència de proteïnes de complement de conill. Quan l'anticòs s'uneix a la superfície dels fibroblasts humans amb presència de proteïnes de complement, les fixa i es desencadena la cascada bioquímica fins a formar el complex d'atac de membrana, que

acabarà matant el fibroblast. Així doncs, per eliminar els fibroblasts d'un cultiu epitelial és essencial incubar l'anticòs amb sèrum de conill, el qual posseeix les proteïnes de complement necessàries per lisar la cèl·lula. Estudis previs demostren que l'ús de l'anticòs 1B10 amb complement de conill redueix amb èxit els fibroblasts dels cultius epitelials humans de tim, enriquint-los amb cèl·lules epitelials (Singer *et al.* 1989). Altres estudis descriuen la distribució subcel·lular de l'antigen que reconeix l'anticòs 1B10, demostrant la seva localització a la superfície de la membrana cel·lular i a lisosomes dels fibroblasts. La immunoreactivitat de l'anticòs 1B10 és específic per fibroblasts diferenciats de la musculatura llisa en el context de cèl·lules vasculares de múscul llis (Ronnov-Jessen *et al.* 1992).

#### Procediment:

L'eliminació de fibroblasts en cultius epitelials de CaOV amb l'anticòs 1B10 es va realitzar amb cèl·lules adherides o en suspensió.

**Cèl·lules adherides:** Les cèl·lules adherides es van tripsinitzar amb EDTA al 0,02% per a retirar part dels fibroblasts, ja que es desenganxen amb més facilitat que les cèl·lules epitelials. A continuació es va procedir a tractar la placa amb l'anticòs (1:800 en DMEM/FBS al 10%) incubant a 37°C durant 40 minuts. Passat el temps, es va rentar amb DMEM sense FBS, es va afegir sèrum de conill (1:8 en DMEM/FBS al 10%) i es va incubar a 37°C durant 45 minuts. A continuació es va recollir el medi i es va fer un rentat amb PBS 1X (per recollir els fibroblasts morts) afegint medi complet FBS al 10%, penicil·lina-estreptomicina a l'1%, MCDB105/M199 (1:1).

**Cèl·lules en suspensió:** : La placa es va tripsinitzar amb EDTA al 0,02%, es va recollir el medi amb cèl·lules i es van centrifugar a 300 g durant 5 minuts. El *pellet* de cèl·lules es va resuspendre amb 2-3 mL d'anticòs 1B10 (1:800 en DMEM/FBS al 10%) i es va incubar a 37°C durant 40 minuts en agitació. Passat el temps, es va rentar amb DMEM sense FBS, resuspenent el *pellet* amb 2-3 mL de sèrum de conill i incubant a 37°C durant 45 minuts en agitació. A continuació es va centrifugar a 300 g durant 5 minuts i es va resuspendre amb medi complet FBS al 10%, penicil·lina-estreptomicina a l'1%, MCDB105/M199 (1:1).

Els cultius primaris tractats amb l'anticòs es van mantenir en un incubador amb atmosfera humida, pressió parcial de CO<sub>2</sub> del 5% a una temperatura constant de 37°C. A les 24 hores es va observar al microscopi la morfologia de les cèl·lules.

La riquesa de cèl·lules epitelials dels cultius primaris es va avaluar mitjançant immunofluorescència usant el marcador epitelial específic CAM 5.2 (Taula M5), el qual es va analitzar mitjançant immunofluorescència (veure apartat 4.3.4).

### **1.4.2 Tripsinització selectiva**

L'altre mètode utilitzat per eliminar els fibroblasts dels cultius primaris va ser la tripsinització selectiva, tècnica que es basa en l'ús de tripsina-EDTA al 0,25% amb incubacions a temps curt.

#### Procediment:

Es va afegir el volum necessari de tripsina a la placa i es va incubar a 37°C durant exactament 30". Seguidament es va retirar la placa de l'incubador i es va colpejar diverses vegades durant 30" més, a temperatura ambient. Les primeres cèl·lules que es van desenganxar de la placa van ser els fibroblasts, mentre que les cèl·lules epitelials hi van quedar adherides.

Després de la tripsinització selectiva tots els cultius primaris procedents de LASC es van analitzar mitjançant immunofluorescència amb l'anticòs Calretinina (específic de mesoteli) (Taula M5) per verificar absència de contaminació de cèl·lules mesotelials.

La riquesa de cèl·lules epitelials dels cultius primaris es va avaluar mitjançant immunofluorescència usant el marcador epitelial específic CAM 5.2 (Taula M5), el qual es va analitzar mitjançant immunofluorescència (veure apartat 4.3.4).

En tots els experiments es va treballar amb cultius primaris amb riquesa de cèl·lules epitelials superior al 80%.



## 1.5 Ús de línies cel·lulars de CaOV

Les línies cel·lulars de carcinoma humà A2780p i la seva derivada resistent al CDDP A2780cis, es van adquirir de la ECCAC (*European Collection of Cell Culture*). Són línies cel·lulars que obtenen un període de duplicació molt curt (aproximadament 24 hores), són adherents i amb una alta eficiència de clonació. Tenen 46 cromosomes, amb anormalitats citogenètiques comuns i pròpies: les comuns són la duplicació d'una porció específica del cromosoma 1q i un punt de ruptura del cromosoma 6; les pròpies són concretes de la línia resistent al CDDP, i abarquen des de delecions específiques de porcions dels cromosomes X, 6 i 20, addicions en el cromosoma 13p, fins a translocacions que impliquen els braços q dels cromosomes 4 i 7.

Les línies A2780p i A2780cis es van cultivar amb medi RPMI 1640 (Taula M7) amb presència de FBS al 10%, glutamina a l'1%, i penicil·lina-estreptomicina a l'1%. La resistència adquirida de la línia A2780cis es va mantenir suplementant el medi de cultiu amb 1 µM de CDDP (Taula M7) cada 2-3 passes.

La línia OV90 de carcinoma humà (serós papil·lar) es va adquirir a la ATCC (*American Type Culture Collection*). És una línia cel·lular procedent de LASC que obté un període de duplicació molt curt, és adherent i amb una alta eficiència de clonació. Té 46 cromosomes, amb delecio al cromosoma 3p24. Sobreexpressa el gen Her+/neu i presenta una mutació al gen de p53, al codó 215 de l'exó 6.

La línia OV90 es va cultivar amb medi MCDB105/M199 (1:1) amb presència de FBS al 10% i de penicil·lina-estreptomicina a l'1%.

Les línies cel·lulars usades es van mantenir en un incubador amb atmòsfera humida, pressió parcial de CO<sub>2</sub> del 5% a una temperatura constant de 37°C. Totes les manipulacions es van realitzar en condicions estèrils en una campana de flux laminar i tot el material va ser prèviament esterilitzat. Totes les línies cel·lulars van ser analitzades per ser lliures de Mycoplasma.

Quan les cèl·lules van assolir una confluència del 70-80%, es va retirar el medi de la placa i es va rentar amb PBS 1X. S'hi va afegir un volum de tripsina-EDTA al 0,25% necessari per a cada placa o flascó, i es va incubar a 37°C durant un parell de

minuts. Es va afegir medi de cultiu complet i es va centrifugar a 200 g durant 5 minuts. El *pellet* de cèl·lules es va resuspendre amb medi complet i es va plaquejar en una placa de volum superior o diverses plaques si es volia expandir el cultiu. El *ratio* de dilució de les cèl·lules per plaquejar-les de nou varia en funció de la línia: el *ratio* recomanat per la línia A2780p és de 1:3, per la línia A2780cis és de 1:5 i per la línia OV90 és de 1:10.

## 1.6 Criopreservació i descongelació de línies i cultius

### primaris de CaOV

La criopreservació de les cèl·lules epitelials de CaOV va permetre el seu emmagatzematge per la seva posterior utilització. Les cèl·lules es van congelar quan estaven confluents i en fase exponencial. Les cèl·lules es van tripsinitzar i centrifugar a 200 g durant 5 minuts. A continuació es va resuspendre el *pellet* de cèl·lules amb 1 mL de solució de criopreservació (FBS + DMSO al 10%) per a cada tub a congelar ( $2-3 \times 10^6$  cèl·lules/mL). La mostra es va aliquotar en criovials de 2 mL i es va mantenir a  $-80^{\circ}\text{C}$  durant 12-24 hores a un contenidor d'isopropanol o bé porexpan per així aconseguir una disminució progressiva de la temperatura (aproximadament  $1^{\circ}\text{C}$  cada minut). Posteriorment les mostres es van traslladar a un congelador de  $-150^{\circ}\text{C}$ .

Per la descongelació de cèl·lules es va afegir 1 mL de medi complet prèviament calentat a  $37^{\circ}\text{C}$ , el que facilitava la ràpida descongelació de les cèl·lules al mateix temps que disminuïa la concentració de DMSO en el medi. Després de pipetejar diverses vegades, les cèl·lules descongelades es van recollir amb 10 mL de medi precalentat. Les cèl·lules es van centrifugar a 200 g (línies cel·lulars) ó 300 g (cultius primaris) durant 5 minuts. El *pellet* de cèl·lules es va resuspendre amb medi de cultiu i es va sembrar a la placa corresponent.

## 1.7 Seguretat

La manipulació de les mostres primàries humanes i de línies cel·lulars es va realitzar a una cabina de flux laminar de bioseguretat IIA (<http://www.ub.edu/ossma/higiene/cabines.htm>). Pels cultius primaris humans, es van usar

incubadors d'ús exclusiu per cèl·lules primàries d'origen humà (<http://www.ub.es/ossma/higiene/cultiuscel.htm>).

## 2 Obtenció de mostres congelades

Les mostres de teixit fresc congelat van ser obtingudes en el Servei d'Anatomia Patològica de l'HUB i corresponien a mostres de teixit tumoral de càncer d'epiteli d'ovari i mostres de teixits normal d'ovari. Les mostres es van mantenir criopreservades a -80°C i la part disseccionada pel nostre estudi, va ser conservada amb RNAlater (Taula M7) per evitar la degradació del RNA abans i durant el processament.

Les mostres es van etiquetar i identificar amb el número de biòpsia assignat pel Servei d'Anatomia Patològica. Un cop realitzada l'extracció de DNA i RNA, es va assignar un número únic a cada extracció, el qual va ser registrar a una base de dades (LIMS). Les dades eren: edat de la pacient, diagnòstic, estadi del tumor i, en aquells casos que fos possible, la informació clínica de la pacient (recidiva, metàstasi, quimioteràpia rebuda, etc.). En tot moment la informació de la pacient es va mantenir confidencial, i sense incloure cap dada personal.

Totes les mostres analitzades en aquest estudi procedents de l'HUB van ser utilitzades amb el consentiment de les pacients i l'aprovació del Comitè Ètic de l'HUB.

## 3 Biologia cel·lular

### 3.1 Anàlisi de la viabilitat cel·lular i apoptosi

#### 3.1.1 Anàlisi de la viabilitat per MTT

Un dels mètodes més clàssics per a determinar la viabilitat cel·lular és l'assaig de MTT, el qual es basa en la reducció metabòlica del Bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltretrazol (MTT) de color groc en un compost amb coloració blavosa anomenat sal de formazan, portada a terme mitjançant l'enzim mitocondrial succinat-deshidrogenasa, permetent d'aquesta forma determinar la funcionalitat mitocondrial de les cèl·lules tractades. Aquest mètode és molt utilitzat en assajos de supervivència i

proliferació cel·lular. La quantitat de cèl·lules vives és proporcional a la quantitat de sals de formazan produïdes.

Procediment:

Les cèl·lules de CaOV es van cultivar a plaques de 96 pous amb una confluència de  $1-2 \times 10^4$  cèl·lules per pou, en un volum final de 100  $\mu$ L. Després del tractament amb el fàrmac, es van addicionar 10  $\mu$ L de MTT (Taula M7), i es va incubar a 37°C durant 2 hores. A continuació es va retirar el medi i es va resuspendre en 100  $\mu$ L de DMSO (Taula M7) pipetejant diverses vegades, de manera que el DMSO trenqués les cèl·lules, fent que les sals de formazan li donessin color porpra. Es va afegir DMSO a tres pous buits que van ser el blanc de l'experiment. A continuació es va determinar l'absorbància a 540 nm en un lector multiplaca. La viabilitat es va expressar en percentatge respecte la viabilitat de les cèl·lules que no van ser tractades (control). Cada condició de l'experiment es va realitzar per triplicat i els resultats es van expressar en forma de mitjana  $\pm$  desviació estàndard. Una disminució de la viabilitat mesurada per aquest sistema podia ser deguda a la mort cel·lular, a la disminució de la proliferació de les cèl·lules tractades respecte les cèl·lules no tractades, o a ambdós processos simultàniament.

### 3.1.2 Anàlisi de la viabilitat per citometria de flux

L'anàlisi de viabilitat cel·lular també es va realitzar per citometria de flux. El funcionament del citòmetre requereix d'una suspensió que bé pot ser cel·lular, de microorganismes o de nuclis. La mostra que conté les cèl·lules s'injecta a través d'una petita agulla en un fluid que ho envoltarà i anirà ascendent d'una en una fins la càmera de flux. És en aquest lloc on el làser incideix en les cèl·lules, produint-se una dispersió de la llum que serà captada per uns sensors que processaran les mides obtingudes. Quan el feix de llum del làser incideix sobre una cèl·lula la llum es dispersa de forma:

- Frontal (*Foward Scatter*, FSC): És el detector que correlaciona amb la mida de la cèl·lula.
- Lateral (*Side Scatter*, SSC): És el detector que correlaciona amb la rugositat i complexitat interna de la partícula.

Per discernir si una cèl·lula es troba en apoptosi s'usen marcadors de membrana que es poden marcar amb fluorescència. El citòmetre utilitzat, FACSCalibur (Beckton Dickinson, Mountain View, CA, USA) disposa de 2 làsers d'excitació: el primer a 488 nm, i el segon a 635 nm. Els fotodetectors són 4: FL1 (530/30), FL2 (585/42) i FL3 (670LP), que detecten els espectres d'emissió quan s'excita amb el primer làser (488) i el FL4 (661/10) quan s'excita amb el segon làser (635). Així es poden utilitzar diferents fluorocroms per la mateixa mostra, sempre i quan els fluorocroms siguin excitables per aquests làsers i l'espectre d'emissió sigui detectat pels diferents fotodetectors (Fig.M2).

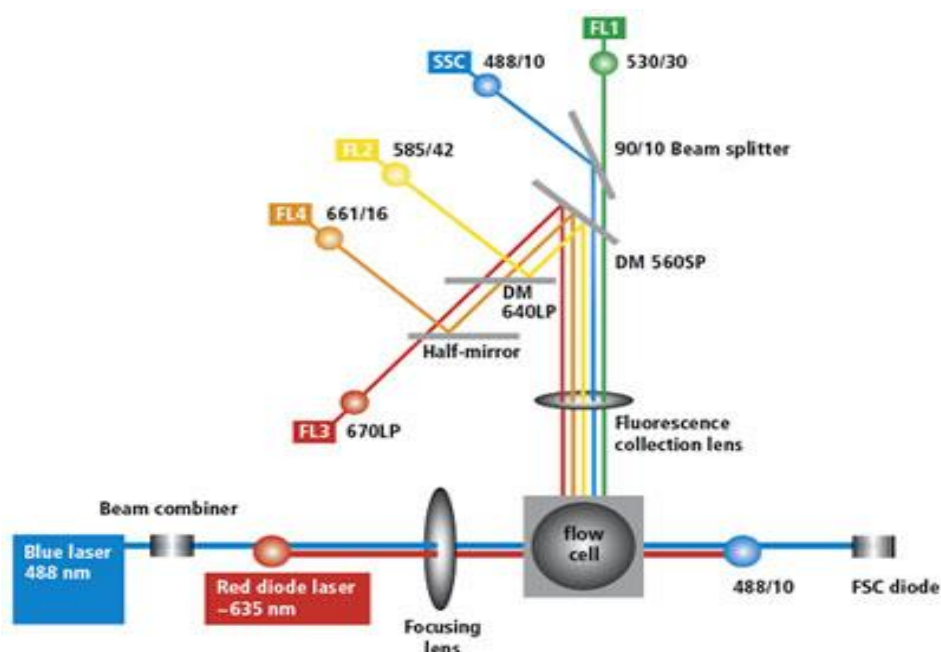
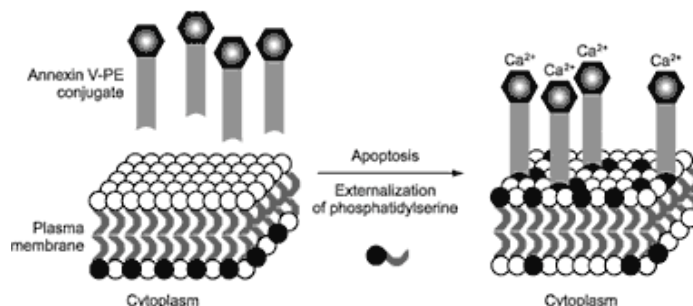


Figura M2. Esquema del funcionament del FACSCalibur. El citòmetre disposa de 2 làsers i 4 fotodetectors (FL). A més, detecta dues característiques cel·lulars: La mida (FSC) i la complexitat (SSC). A l'esquema es representa quin fotodetector s'ha d'utilitzar per la detecció de fluorocroms comuns ([www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com))

L'apoptosi es caracteritza per una sèrie de canvis morfològics com la pèrdua d'asimetria a la membrana, la condensació del citoplasma i nucli, i el trencament internucleosomal del DNA. Un dels primers indicis de l'activació de l'apoptosi és la translocació del fosfolípid fosfatidilserina situat a la cara interna de la membrana a la cara externa (Fig.M3). L'Anexina V és una proteïna que té una gran afinitat per la fosfatidilserina de manera dependent de calci ( $\text{Ca}^{2+}$ ), sempre que aquesta es trobi accessible, tal i com succeeix quan s'externalitza durant l'apoptosi. L'Anexina V és una proteïna de 35 kDa i es conjuga amb fluorocroms com el isotiocianat de fluoresceïna

(FITC) de manera que les cèl·lules apoptòtiques que exposen fosfatidilserina i són conjugades amb Annexina V-FITC, poden ser excitées a 488 nm i ser detectades pel citòmetre (FL1).



**Figura M3. Esquema representatiu de l'anàlisi d'inducció d'apoptosi per marcatge cel·lular amb Annexina V.** Quan les cèl·lules entren en apoptosi, es perd l'asimetria de la bicapa lipídica i els residus de fosfatidilserina queden exposats a la superfície extracel·lular. L'Annexina V és una molècula impermeable que s'uneix específicament en aquests residus de fosfatidilserina. Unida a fluorocroms, l'Annexina V permet analitzar la quantitat de cèl·lules que entren en apoptosi.

En l'apoptosi tardana, la membrana plasmàtica perd la seva integritat i es torna permeable a compostos com el iodur de propidi (IP). Aquests procés es produeix més tard que la translocació de la fosfatidilserina i també es dona en la mort per necrosi. Quan l'IP pot entrar a la cèl·lula s'intercala entre les cadenes d'àcids nucleics. L'IP a l'excitar-se a 488 nm, pot ser detectat tant per FL2 com per FL3.

Utilitzant aquests marcadors es poden distingir tres poblacions de cèl·lules durant el procés d'apoptosi (Fig.M4). Una primera població de cèl·lules que no emet cap fluorescència (cèl·lules vives), una altra positiva per Annexina V i negativa per marcatge IP (cèl·lules en un estat inicial d'apoptosi) i una altra amb el doble marcatge Annexina V-FITC i IP (cèl·lules en un estat més tardà del procés apoptòtic). L'aparició d'aquestes tres poblacions és un indicatiu d'una apoptosi típica. Existeix la possibilitat de l'aparició d'una quarta població que només marcaria IP, que seria senyal de la possible existència d'un procés necròtic.

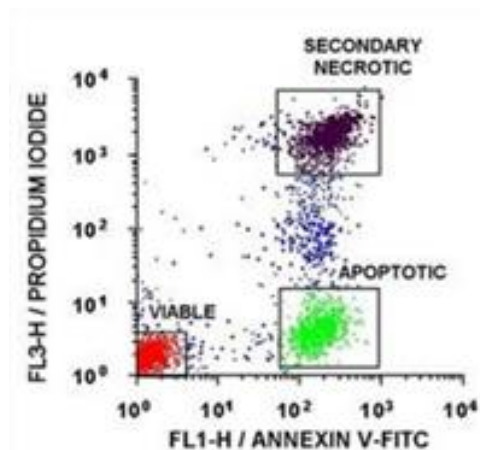


Figura M4. Anàlisi per citometria de flux. Imatge de les diferents poblacions durant el procés d'apoptosi analitzades per citometria de flux. Les cèl·lules tractades amb un agent apoptòtic o sense tractar (control), es van incubar amb Anexina V-FITC i IP i es van analitzar amb el citòmetre de flux. Les cèl·lules apoptòtiques exposen fosfatidilserina a la membrana i es marquen amb l'Anexina V (quadrant verd). Quan el procés d'apoptosi avança, la membrana cel·lular es torna permeable al IP i es tornen positives per aquest fluorocrom (quadrant morat). Les cèl·lules vives són Anexina V i IP negatives (quadrant vermell). Modificat de la web [abdserotec.com](http://abdserotec.com).

#### Procediment:

Es va recollir el medi d'incubació, les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS 1X i es van tripsinitzar. Es va inactivar la tripsina amb medi complet i es van ajuntar les cèl·lules tripsinitzades amb les flotants presents en el medi d'incubació. A continuació la mostra es va centrifugar a 200 g durant 5 minuts, resuspenent el *pellet* amb 1 mL de medi complet. Les cèl·lules es van contar i se'n van recollir 200.000 en tubs de citometria i es van centrifugar a 200 g durant 10 minuts. El *pellet* de les cèl·lules es va resuspendre amb 500  $\mu$ L de tampó d'unió 1X i es va centrifugar a 800 g durant 10 minuts, retirant el sobrenedant i incubant amb Anexina V (200  $\mu$ L de tampó d'unió 1X + 5  $\mu$ L Anexina V (Taula M7) per tub) a temperatura ambient durant 10 minuts, protegit de la llum. A continuació la mostra es va centrifugar a 800 g durant 10 minuts, resuspenent el *pellet* cel·lular amb IP (Taula M7) (400  $\mu$ L de tampó d'unió 1X + 4  $\mu$ L de IP per tub).

En el citòmetre es van adquirir 10.000 esdeveniments (cèl·lules) analitzats amb el programa CellQuest (de Beckton Dickinson). L'apoptosi es va calcular sumant les cèl·lules Anexina V<sup>+</sup>/IP<sup>-</sup> (estat inicial d'apoptosi) amb les cèl·lules Anexina V<sup>+</sup>/IP<sup>+</sup> (estat tardà del procés d'apoptosi).

### 3.2 Anàlisi de cicle cel·lular i pic subdiploid per citometria de flux

L'anàlisi d'una població cel·lular en estat replicatiu es pot seguir a través d'un marcatge nuclear de cèl·lules en suspensió i posterior anàlisi de les propietats fluorescents de cada cèl·lula a la població.

Les cèl·lules quiescents i les cèl·lules en fase G1 posseeixen únicament una còpia de DNA, doncs tenen una fluorescència equivalent a 1X. Per contra, les cèl·lules que es troben en la fase G2/M, tenen 2 còpies de DNA i el marcatge amb fluorescència equival a 2X. Les cèl·lules en fase S que es troben sintetitzant DNA, tenen valors compresos entre les poblacions 1X i 2X. Finalment, les cèl·lules apoptòtiques tenen el DNA fragmentat, i tenen baixa fluorescència trobant-se per davant del pic de G1 (no arriben a tenir 1X). Aquesta fase s'anomena pic subdiploid i representa les cèl·lules en fase apoptòtica (Fig.M5).

El gràfic es divideix en 3 subpoblacions: 1X correspon a la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, 2X correspon a la fase G<sub>2</sub>/M i la fase S es troba entre els dos pics.

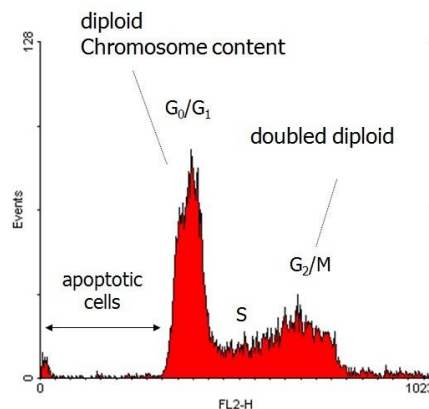


Figura M5. Representació de les fases del cicle cel·lular. Modificat de la web meduniwien.ac.at

#### Procediment:

Es va recollir el medi d'incubació, les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS 1X i es va tripsinitzar. Es va inactivar la tripsina amb medi complet i es van ajuntar les cèl·lules tripsinitzades amb les flotants presents en el medi d'incubació. Les cèl·lules es van contar i se'n van recollir  $1 \times 10^6$ , les quals es van centrifugar a 200 g



durant 5 minuts. Les mostres es van rentar dues vegades amb 1 mL de PBS-FBS a l'0,1% (Taula M6) i es van centrifugar a 500 g durant 1 minut. El *pellet* de cèl·lules es va resuspendre amb 0,5 mL de PBS 1X amb 1% de sèrum i amb una pipeta Pasteur es van afegir 2 mL d'etanol fred (prèviament refrigerat a -20°C) al 70% gota a gota, agitant amb el vòrtex suaument (les cèl·lules ben resuspeses i amb cura d'evitar la formació d'agregats). Es van fixar a -20°C (temps mínim de 2 hores i fins a 3 setmanes). El dia de l'anàlisi amb el citòmetre, les mostres es van centrifugar a 200 g durant 5 minuts per eliminar l'etanol. A continuació, es va fer un rentat amb PBS 1X amb 1% de FBS i es va centrifugar descartant la fase aquosa. Per la determinació del pic subdiploid, es va afegir 100 µL de tampó citrat-fosfat pH 7.8 (Na<sub>2</sub>HPO 0.2M: àcid cítric 0.1M (192:8)) incubant a temperatura ambient durant 45 minuts. A continuació les mostres es van centrifugar a 200 g durant 5 minuts per eliminar el tampó. Amb les mostres que es va treballar es va poder prescindir d'aquest pas, ja que el pic subdiploid apareixia amb o sense l'addició del tampó citrat-fosfat.

Les mostres es van resuspendre amb 400 µL de PBS 1X amb 1% de sèrum (FBS), 50 µL de IP (*stock* 0,5 mg/mL) i 5 µL de RNAsa A lliure de DNAsa (10 mg/mL). Es van incubar a 37°C durant 30-45 minuts, a les fosques. Les mostres es van analitzar per citometria de flux amb FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). L'anàlisi del cicle cel·lular es va dur a terme amb el *software* ModFit LT (*Verity Software, Inc, Topsham, ME*).

### **3.3 Anàlisi de l'apoptosi, dany al DNA i proliferació cel·lular mitjançant citometria de flux**

L'anàlisi de l'apoptosi, dany al DNA i proliferació cel·lular es va dur a terme amb el *kit* de la casa comercial BD Pharminogen (Ref.: 562253). És un *kit* dissenyat amb la inclusió d'anticossos fluorescents específics per la incorporació de BrdU, H2AX fosforilada (γH2AX) i PARP truncat. El *kit* obté unes sondes que permeten l'anàlisi per citometria de flux multicolor de la proliferació, el dany al DNA i l'apoptosi respectivament, de les cèl·lules individuals dins de les mostres. La tinció immunofluorescent de les cèl·lules que han incorporat *Bromodeoxyuridine* (BrdU, un anàleg del precursor de la timidina del DNA) i l'anàlisi per citometria de flux,

proporciona una tècnica d'alta resolució per determinar la freqüència i la naturalesa de les cèl·lules individuals que han sintetitzat DNA. L'exposició de les cèl·lules a BrdU permet la incorporació de BrdU activament en les fraccions del cicle cel·lular i per tant, es pot determinar la cinètica del cicle cel·lular. La funció de la proteïna H2AX fosforilada ( $\gamma$ H2AX) és el reclutament i localització de les proteïnes de reparació del DNA.  $\gamma$ H2AX promou la reparació del DNA i manté l'estabilitat genòmica. Ruptures del DNA de doble cadena (DSB) causades per errors de replicació, apoptosi o altres processos fisiològics, i el dany al DNA generat per radiacions ionitzants, llum ultravioleta o agents citotòxics, porten a la fosforilació de la proteïna, la qual promourà la reparació dels DSBs. PARP (poli[ADP-ribosa] Polimerasa) és un enzim associat a la cromatina nuclear que està implicat en la reparació del DNA. Durant l'apoptosi, la caspasa-3 s'uneix a PARP inactivant-la i incapacitant a les cèl·lules per reparar el dany al DNA. Per aquesta raó, la forma truncada de PARP serveix com a marcador de l'apoptosi cel·lular.

#### Procediment:

Un nombre de 500.000 cèl·lules es van plaquejar en plaques de 10 cm. Passades 24 hores es va afegir el fàrmac i es va incubar durant el temps desitjat. Passat el temps, es va realitzar la incubació amb 10  $\mu$ L de 1 mM de BrdU per cada 1mL de medi, durant 45 minuts. A continuació es van recollir les cèl·lules (medi i cèl·lules adherides), que es van contar, fixar i permeabilitzar amb els tampons que descriu el *kit* (Ref.: 562253, BD Pharminogen). A continuació, les mostres es van congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El dia que es feia l'anàlisi, les mostres es van descongelar i es van re-fixar. A continuació es van tractar amb DNase durant 1 hora. Passat el temps, les mostres es van incubar amb els anticossos *CP-Cy5.5 Mouse Anti-BrdU*, *Alexa Fluor 647 Mouse Anti-H2AX* (pS139), *PE Mouse Anti-Cleaved PARP* (Asp214), a la concentració indicada al *datasheet*, incubant-les a  $4^{\circ}\text{C}$  durant tota la nit. Al dia següent, les mostres es van passar pel citòmetre FACsCalibur usant el programa CellQuest (Beckton Dickinson). Es van usar controls per posar a punt els protocols d'apoptosi, dany i proliferació cel·lular de cada línia cel·lular. Per fer *settings* d'apoptosi, les línies es van tractar amb la dosi d'estaurosporina que generava apoptosi a cadascuna de les línies a les 24 hores. Pels *settings* de dany al DNA, les cèl·lules es van tractar amb la dosi de CDDP que se sabia

que generava dany a cadascuna de les línies, durant 24 hores. Per BrdU les cèl·lules havien d'estar proliferants i no es van tractar amb cap fàrmac.

### 3.4 Anàlisi de senescència cel·lular

La senescència es descriu per primera vegada per Hayflick i Moorhead en fibroblasts humans (Hayflick & Moorhead 1961). És un fenomen que s'observa quan les cèl·lules han arribat al límit de Hayflick (nombre finit de duplicacions) i deixen de dividir-se. Les cèl·lules humanes es tornen senescentes quan han arribat en aquest número de divisions o bé per un seguit d'estímuls oncogènics, ja sigui en cultiu o *in vivo*. La senescència cel·lular es caracteritza per l'aturada irreversible de creixement i l'obtenció d'unes certes funcions cel·lulars alterades. En cultiu s'identifiquen per la seva incapacitat de sintetitzar DNA, una propietat que també es comparteix amb la quiescència cel·lular. Són cèl·lules incapaces de proliferar en resposta a estímuls mitogènics, ja que es troben en fase G0/G1 i a diferència de la quiescència, és irreversible. També són resistents a estímuls que indueixen el mecanisme de mort cel·lular per apoptosi i presenten canvis fenotípics: morfològicament són grans i aplanades amb una gran quantitat de vacuoles.

Dimri i col·laboradors descriu un biomarcador associat amb el fenotip senescent, una senescència associada a la beta-galactosidasa (SA-beta-gal), la qual es detecta mitjançant un assaig colorimètric utilitzant un substrat de X-gal (Dimri *et al.* 1995). La presència del biomarcador SA-beta-gal és independent de la síntesi de DNA i generalment discrimina les cèl·lules senescentes de les quiescents. El mètode que detecta SA-beta-gal és un assaig molt útil i simple que permet identificar cèl·lules senescentes en poblacions cel·lulars heterogènies.

#### Procediment:

Es van utilitzar plaques de 6 pous. Després del tractament amb els fàrmacs, el medi es va aspirar i les cèl·lules es van rentar amb PBS 1X estèril. A continuació, es va procedir a la fixació cel·lular, mitjançant 1 mL de tampó de fixació 1X (diluint amb aigua destil·lada) durant 10-15 minuts, a temperatura ambient. A continuació es va procedir a preparar la solució *staining* en un tub de plàstic de polipropilè:

- a. 930  $\mu\text{L}$  de tampó *staining* 1X (diluït en aigua destil.lada)
- b. 10  $\mu\text{L}$  de suplement de *staining* A
- c. 10  $\mu\text{L}$  de suplement de *staining* B
- d. 50  $\mu\text{L}$  de X-gal diluït en dimetilformamida (20 mg de X-gal en 1 mL de dimetilformamida per preparar un *stock* 20X. L'excés de X-gal es pot guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$  tapat de llum durant 1 mes).

Un cop passat el temps de fixació, els pous es van rentar dues vegades amb PBS 1X i s'hi va afegir la solució *staining*, incubant tota la nit a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al dia següent, es va observar al microscopi invertit *LEICA* si les cèl·lules havien adquirit la coloració blava (indicador de senescència) i es van obtenir fotografies de diferents camps. De cada condició, es van contar les cèl·lules de mínim de 5 camps diferents i es va calcular el nombre de cèl·lules marcades respecte les totals. Es va utilitzar el microscopi Leica DM IRB i el *software* ProgRes®CapturePro 2.7. Per guardar les mostres es va retirar la solució *staining*, afegint glicerol al 70% i es van guardar a  $4^{\circ}\text{C}$ .

La senescència sempre es va analitzar després del temps d'incubació amb el fàrmac determinat. Per confirmar que la senescència era irreversible, es va deixar passar el temps d'incubació, es va retirar el medi i se'n va afegir de nou. Després de 3 ó 4 dies, es va tornar a determinar la senescència cel·lular.

## 4 Biologia molecular

### 4.1 Anàlisi de DNA

#### 4.1.1 Extracció de DNA

L'extracció de DNA es va realitzar a partir de *pellets* de línies cel·lulars i cultius primaris, i de mostres tumorals de teixit congelat.

#### Procediment:

En el cas de les mostres de teixit congelat, un màxim de 25 mg de teixit es van tallar usant un bisturí estèril en una placa de Petri. La placa i el bisturí van ser

reemplaçats després d'un sol ús, i tot el procediment es va dur a terme sobre gel sec per preservar la integritat del teixit. Per la homogeïnització de la mostra es van afegir 600 µL de tampó de lisi (Quiagen) i amb l'ajuda del politró es va disgregar la mostra.

Amb els *pellets* de les línies cel·lulars i dels cultius primaris, es va afegir el volum determinat de tampó de lisis (Quiagen) segons el nombre de cèl·lules de la mostra (350 µL per  $< 5 \times 10^6$ ; 600 µL per  $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ ). Amb l'ajuda d'una xeringa es va homogeïnitzar la mostra. Es va procedir a l'extracció de DNA seguint el protocol recomanat per l'extracció de DNA de Quiagen (DNA/RNA MiniHandbook. Cat.No.: 80204).

#### 4.1.2 Quantificació de DNA

Les mostres es van quantificar amb l'aparell NanoDrop model ND-1000, espectrofotòmetre usat per a la quantificació d'àcids nucleics sense la necessitat d'una dilució prèvia, amb 1 µL de mostra directa de DNA.

#### 4.1.3 Mètode de MLPA (*Multiplex Ligase-dependent Probe Amplification*)

La tècnica del MLPA és una tècnica que permet analitzar el nombre de còpies de fins a 40 seqüències de DNA o mRNA en un sol tub de reacció (Eldering *et al.* 2003). Es pot aplicar en l'anàlisi del número de còpies de seqüències de DNA genòmic, o del perfil d'expressió de mRNA (RT-MLPA)(veure apartat 4.2.5).

En la tècnica de MLPA, el DNA genòmic s'hibrida a una solució amb parells de sondes específiques (Fig.M6). Cada parell de sondes consisteix en una sonda amb una seqüència específica contra una seqüència diana (20-30 nucleòtids) unida a una seqüència per un dels *primers* (per la posterior PCR); i una sonda amb una altra seqüència específica en un extrem (25-43 nucleòtids) i una seqüència per a l'altre *primer* en l'altre extrem. A més, té un fragment de mida variable (19-370 nucleòtids) al mig, per a generar les diferències de mida que permetran la resolució electroforètica: ambdues sondes estan dissenyades per dirigir-se a zones adjacents al cDNA, de manera que poden ser lligades per una lligasa. Així es genera una sonda

flanquejada per seqüències per *primers*, que podrà ser amplificada per PCR, mentre que les sondes que no s'uneixin a la seva diana no es podran lligar ni tampoc amplificar per PCR. La quantitat de sonda lligada produïda és proporcional al nombre de còpies de la seqüència diana, i després de l'amplificació per PCR i de la separació per electroforesi capil·lar, les àrees i altures relatives dels pics indicaran la deleció o duplicació de la seqüència diana.

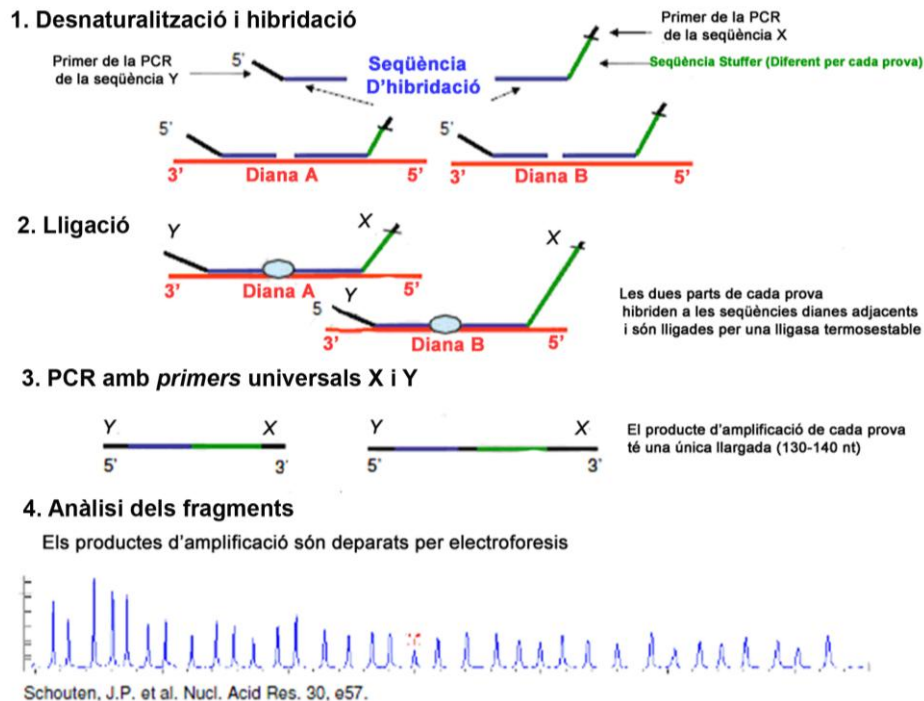


Figura M6. Esquema dels passos que es realitzen en la tècnica del RT-MLPA. Extret de la pàgina web del fabricant, MRC Holland.

Els kits utilitzats van ser MLPA *kit* P037 i P038 de MRC-Holland (Amsterdam, The Netherlands) per la detecció simultània de 55 seqüències alterades (Taula M1).

#### Procediment:

El DNA (200 ng) es va hibridar durant 16 hores a 60°C contra la solució amb la mescla de sondes de MLPA. Els oligonucleòtids hibridats van ser lligats mitjançant l'addició de *Ligase-65* (MRC-Holland, Amsterdam) i es van incubar a 54°C durant 15 minuts. Els productes de lligació es van amplificar per PCR (35 cicles de 30 segons a 95°C; 30 segons a 60°C i 1 minut a 72°C) amb un únic parell de *primers* (un d'ells marcat amb el fluorocrom FAM). Els fragments producte de la reacció de PCR van ser separats per electroforesi capil·lar en un *ABI-Prism 3730 Genetic Analyzer* de 48

capilars (Applied Biosystems/Hitachi, Foster City, CA). L'àrea i l'altura dels pics es van mesurar mitjançant el *software* GeneScan (Applied Biosystems). Les dades van ser analitzades amb el *software* Coffalyser (MCR-Holland) i es van calcular els valors de RCN (*relative copy number*).

GEN	Localització	KIT	Tamany del producte de PCR (pb)	GEN	Localització	KIT	Tamany del producte de PCR (pb)
MYCN	02p24.1	37	172	TP53	17p13.1	37	409
MYCN	02p24.1	37	436	TP53	17p13.1	38	193
MYCN	02p24.1	37	364	TP53	17p13.1	37	292
ESR1	06q25.1	37	301	TP53	17p13.1	37	247
IGF2R	06q26	37	142	TP53	17p13.1	38	254
PARK2	06q26	37	346	TP53	17p13.1	37	283
EIF3S3	08q24.11	37	427	TP53	17p13.1	38	391
MYC	08q24.12	37	238	TP53	17p13.1	38	346
MYC	08q24.12	37	154	CCND2	12p13	37	355
CDKN2A	09p21	37	202	TNFRSF7	12p13	38	445
CDKN2B	09p21	37	454	LRMP	12p12.3	37	319
PTEN	10q23.3	38	292	CDK4	12q14	37	274
PTEN	10q23.3	38	148	IFNG	12q14	37	211
ATM	11q23	38	136	APAF1	12q22	38	427
ATM	11q23	38	172	IGF1	12q23	38	310
ATM	11q23	38	202	PAH	12q23	38	178
ATM	11q23	37	328	PAH	12q23	38	229
ATM	11q23	37	373	CHFR	12q24.33	37	400
ATM	11q23	38	364	CDKN2D	19p13	38	265
RDX	11q23	38	283	LDLR	19p13.3	38	319
RB1	13q14.3	38	160	LDLR	19p13.3	37	265
RB1	13q14.2	37	382	CCNE1	19q12	38	166
KCNRG	13q14	38	220	BC-2	19q13.4	38	418
KCNRG	13q14	37	148				
MIR15	13q14.2	37	166				
DLEU2	13q14.3	37	193				
DLEU1	13q14.3	38	400				
DLEU1	13q14.3	38	373				
DLEU1	13q14.3	38	337				
DLEU7	13q14.3	37	463				
DLEU7	13q14.3	37	220				
ATP7B	13q14.2	38	238				

Taula M1. Relació dels gens analitzats amb els kits de MLPA P037 i P038. S'indica la localització de cada gen i la mida de cadascun dels productes de PCR, segons les dades de la casa comercial.

## 4.2 Anàlisi de RNA

### 4.2.1 Extracció de RNA

L'extracció de RNA es va realitzar a partir de *pellets* de línies cel·lulars i cultius primaris, i de mostres tumorals de teixit congelat.

#### Procediment:

En el cas de les mostres de teixit congelat, un màxim de 25 mg de teixit es van tallar usant un bisturí estèril en una placa de Petri. La placa i el bisturí van ser reemplaçats després d'un sol ús, i tot el procediment es va dur a terme sobre gel sec per preservar la integritat del teixit. Per la homogeneïtzació de la mostra es van afegir 600 µL de tampó de lisi (Quiagen) i amb l'ajuda del politró es va disgregar la mostra. Es

va usar el *kit* d'extracció DNA/RNA (MiniHandbook. Cat.No.: 80204) amb el qual es pot obtenir molècules de RNA més llargues de 200 nucleòtids. També permet aïllar simultàniament DNA.

Amb els *pellets* de les línies cel·lulars i els cultius primaris es van usar 2 *kits*, segons el nombre de cèl·lules del què es partia. Es va usar el *Kit RNeasy Micro Handbook* (Quiagen) quan la mostra contenia menys de  $5 \times 10^5$  cèl·lules; o *RNeasy Mini Handbook* (Quiagen) quan la mostra contenia  $5 \times 10^5$ -  $1 \times 10^7$  cèl·lules. En ambdós *kits* s'hi va afegir el tampó de lisi (volum dependent del nombre de cèl·lules) i amb l'ajuda d'una xeringa, es va homogeïtzar la mostra. Es va procedir a fer l'extracció de les mostres seguint les instruccions del fabricant mitjançant l'ús de columnes. El RNA es va eluir en un volum final de 60  $\mu\text{L}$  de tampó d'elució proporcionat pel *kit* i es va guardar a  $-80^\circ\text{C}$ . A diferència d'altres mètodes de purificació de RNA, aquests protocols sempre es realitzen a temperatura ambient.

Per obtenir i treballar amb solucions de RNA, tot el material utilitzat ha d'estar autoclavat, lliure de RNases. Es pot netejar la zona de treball amb RNaseZap (Taula M7) i l'ús de guants per evitar que les RNases degradin el RNA.

#### 4.2.2 Quantificació de RNA

Les mostres es van quantificar amb l'aparell NanoDrop model ND-1000, espectrofotòmetre usat per a la quantificació d'àcids nucleics sense la necessitat d'una dilució prèvia, amb 1  $\mu\text{L}$  de mostra directa de RNA.

#### 4.2.3 PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR)

Variant de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) utilitzada per amplificar i simultàniament quantificar de forma absoluta el producte de l'amplificació del DNA. Utilitza, de la mateixa manera que la PCR convencional, un motlle de DNA, almenys un parell de *primers* o cebadors específics, dNTPs, un tampó de reacció adequat i una DNA polimerasa termoestable. A la mescla se li afegeix una substància marcada amb un fluorocrom que, en un termociclador que obtingui sensors per a mesurar fluorescència, s'excitarà a la longitud d'ona apropiada que permetrà mesurar la taxa



de generació d'un o més productes específics. Aquesta mesura es realitza després de cada cicle d'amplificació i és per això que s'anomena PCR en temps real.

Procediment:

Prèviament a la realització de la PCR es va sintetitzar el cDNA codificant (cDNA) a partir de mRNA. Per la síntesi de la primera cadena de cDNA es va partir de 1000 ng de RNA en un volum final de 20 µL, usant el *kit* comercial de retrotranscripció *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Applied Biosystems, Part No.: 4390778). Les mostres es van posar en un termociclador, les condicions del qual van ser: 5 minuts a 25°C, 30 minuts a 42°C i 5 minuts a 85°C.

Per estudiar la modulació de l'expressió de mRNAs, els cDNAs obtinguts mitjançant retrotranscripció es van utilitzar com a motlle per l'amplificació mitjançant PCR quantitativa. Es van utilitzar els *kits* predissenyats de *Assay on Demand Gene* (Applied Biosystems) específics per a cadascun d'ells. Aquests *kits* contenen *primers* i sondes Taqman fluorescents específiques que permeten la monitorització de la PCR mitjançant l'aparell *ABI Prism 7700 Sequence Detection System* (PE Applied Biosystem). Les dades es van analitzar amb el programa *Sequence Detector Software* (SDS versió 2.3; Applied Biosystem). Es va analitzar el gen de la Survivina (BIRC5), amb l'assaig TaqMan® (Hs00977611\_g1, Applied Biosystem) i com a controls endògens de l'experiment es van usar el gens 18S (Hs99999901\_s1, Applied Biosystem) i GUSB (assaig Hs99999908\_M1, Applied Biosystem).

#### **4.2.4 TaqMan Low Density Array (TLDA)**

La TLDA és una placa que conté una matriu de reacció per l'etapa de la PCR (Fig.M7). Els pous de la matriu contenen assajos d'expressió gènica TaqMan que detecten l'amplificació en temps real dels gens escullits per l'usuari. Els nivells d'expressió gènica es determinen mitjançant la fluorescència generada durant la PCR utilitzant l'aparell *ABI Prism 7700 Sequence Detection System* (PE Applied Biosystem).

**Procediment:**

Es va usar una placa *TaqMan custom array* (ref.: 4346800, Applied Biosystems). Prèviament a la realització de la PCR de la TLDA, es va sintetitzar cDNA a 50 ng/ $\mu$ L mitjançant el *kit* comercial de retrotranscripció *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Applied Biosystems, Part No.: 4390778). Es van carregar 250 ng de cDNA/*reservoir*. Les dades es van analitzar amb el programa *Sequence Detector Software* (SDS versió 2.3; Applied Biosystem).

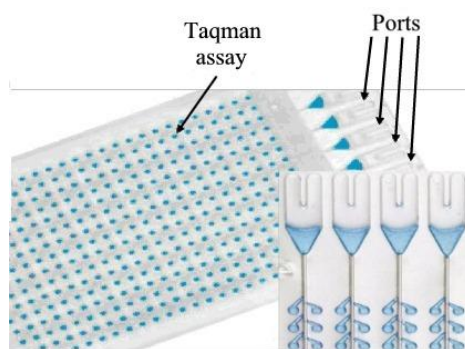


Figura M7. Esquema de la placa TLDA, assaig TaqMan.

#### 4.2.5 Mètode de RT-MLPA (*Multiplex Ligase-dependent Probe Amplification*)

El RT-MLPA és una adaptació del MLPA que permet analitzar el nombre de còpies de fins a 40 seqüències de mRNA en un sol tub de reacció. Permet l'anàlisi del perfil d'expressió de mRNA de les condicions d'interès.

El *kit* utilitzat va ser *RT-MLPA kit R011-Apoptosis* de (MRC-Holland), que permet analitzar el perfil d'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi (gens pro i anti-apoptòtics), entre els que es troben dianes directes de p53, que poden donar una certa idea d'estat de la via de p53. Les seqüències de mRNA a analitzar es van retrotranscriure amb *primers* específics per a cada seqüència. A continuació el procediment va ser l'equivalent al MLPA per DNA genòmic (veure apartat 4.1.3). Les dades obtingudes es van normalitzar amb el normalitzador adequat en cada tipus cel·lular per compensar errors en la càrrega inicial del RNA.

En el RT-MLPA les dades es poden representar de maneres diferents: Representant directament els valors dels pics d'electroforesi "expressió relativa", donant una idea de la quantitat de mRNA de cada gen, o bé normalitzant les dades amb un gen normalitzador adequat, obtenint uns valors que indiquen si el gen ha inhibit o activat la seva transcripció després d'un tractament. Aquests valors es poden referir al control de manera que s'obtingui "Expressió relativa al control" o "vegades d'inducció" (*Fold Induction*). En aquesta tesi s'han graficat els resultats del RT-MLPA com a "vegades inducció".

El protocol de RT-MLPA és similar al del MLPA descrit anteriorment (veure apartat 4.1.3). En aquest cas es parteix de RNA que es retrotranscriu usant *primers* específics dels gens, l'expressió dels quals es vol analitzar. Es continua el procés com en el MLPA i els resultats obtinguts en l'electroforesi capil·lar es processen normalitzant amb  $\beta$ -glucoronidasa (GUSB) o  $\beta$ -microglobulina (B2M).

#### 4.2.6 Seqüenciació de TP53

El terme seqüenciació del DNA es basa en la determinació de l'ordre de bases nucleotídiques en una molècula de DNA. El coneixement d'aquestes seqüències és bàsic per la investigació.

##### Procediment:

L'estat de p53 es va analitzar a les línies cel·lulars A2780p, A2780cis, OV90 i en alguns cultius primaris de CaOV. Es va partir de mostra de RNA, que es va obtenir mitjançant el *kit* d'extracció *AllPrep DNA/RNA Mini Kit* (Quiagen). Seguidament es va realitzar la retrotranscripció (RT-PCR) usant *Superscript III one-step PCR Platinum Polymerase* (Invitrogen, cat#12574-026) amb 200 ng de RNA total. El cDNA es va amplificar utilitzant *primers* p53-2 (p53-2F: CCCCTCTGAGTCAGGAAAC; p53-2R: AGAGGAGCTGGTGTGTTGG) resultant amb un fragment de 920bp de llargada, contenint els exons 3 a 8. Les condicions de la PCR van ser: 55°C 3 minuts, 94°C 2 minuts, (94°C 1 minut, 62°C 1 minut, 72°C 1 minut) x 40 cicles, 72°C 5 minuts. Seguidament, les mostres es van purificar amb *EZNA Cycle-Pure Kit* (Omega Biotek) i posteriorment es van seqüenciar amb *Big Dye 3.1*. La reacció de PCR i anàlisi es van

fer mitjançant electroforesi (Applied Biosystem/Hitachi, CA, USA). Les seqüències es van alinear amb MultiAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) i amb el programa Gene tool 1.0.0.

## 4.3 Anàlisi de proteïnes

### 4.3.1 Extracció de proteïnes

Es va recollir el medi d'incubació de les cèl·lules, es va rentar dues vegades amb PBS 1X i es va tripsinitzar. Es va inactivar la tripsina amb medi complet i es van ajuntar les cèl·lules tripsinitzades amb les flotants presents en el medi d'incubació. El contingut es va centrifugar a 200 g durant 5 minuts, resuspenent el *pellet* amb 1 mL de PBS 1X i passant-lo a un eppendorf de 1,5 mL. La mostra es va centrifugar a 15.000 g durant 5 minuts per acabar d'eliminar completament el PBS, i es va aspirar el sobrenedant.

Per lisar el *pellet* de cèl·lules es van afegir de 50-100 µL de tampó de *Laemli* (taula M6) i es va pipetejar fins a disgregar completament el *pellet*. Seguidament les mostres es van escalfar a 100°C durant 10 minuts per eliminar les restes de DNA de la mostra. Les mostres es van congelar a -20°C o es va procedir a la quantificació.

### 4.3.2 Quantificació de proteïnes

Per l'anàlisi de proteïnes mitjançant la tècnica de *Western blot*, prèviament s'ha de quantificar la concentració de proteïnes existents de la mostra per carregar la mateixa quantitat a cada pou del gel d'electroforesi.

La quantificació de proteïnes es va dur a terme amb el kit "*Micro BCA Protein Assay Reagent*" (Roche), utilitzant el lector de plaques a 540 nm. Aquest kit es basa en una detecció colorimètrica quantitativa amb l'àcid bicinrònic (BCA) que detecta la reducció de coure (Cu<sup>+</sup>) deguda l'entorn bàsic de les proteïnes. És un reactiu compatible amb la presència de diversos detergents, entre ells SDS a l'1%. Dues molècules de BCA quelen una molècula de Cu<sup>+</sup> i el complex resultant presenta color, de manera directament proporcional a la quantitat de proteïna existent a la mostra.

**Procediment:**

Es va usar una placa de 96 pous, en la qual s'hi van usar 2 pous per mostra (duplicat). Per preparar la patró es van afegir 25  $\mu\text{L}$  per pou d'una recta patró de BSA construïda a partir d'una sèrie de dilucions.

Les mostres es van preparar en un volum final de 60  $\mu\text{L}$  diluïdes amb aigua destil·lada 1:10. Un volum de 25  $\mu\text{L}$  de la mostra es va afegir al pou (per duplicat). A continuació, es va preparar el reactiu BCA amb les solucions A i B proporcionades pel *kit* (raó 50:1). Es va preparar un volum necessari de reactiu per afegir a cada pou un volum final de 200  $\mu\text{L}$ . La placa recoberta de film transparent es va vortejar suaument i es va deixar a 37°C durant 30 minuts. La quantificació de proteïnes es va realitzar utilitzant el lector de plaques a  $\lambda$  540 nm. Per l'anàlisi de dades, les quals es van exportar en un full d'excel, obtenint la recta patró d'albúmina i la concentració de la mostra d'interès.

**4.3.3 Anàlisi de proteïnes mitjançant *Western blot***

La tècnica del *Western blot* és un mètode utilitzat a biologia molecular per detectar proteïnes d'una mostra cel·lular o d'un teixit homogeneïtzat. La tècnica s'inicia amb una electroforesi desnaturalitzant on les mostres són separades en funció de la seva massa. A continuació, les proteïnes són transferides del gel a una membrana de PDVF o de nitrocel·lulosa mitjançant l'acció d'un camp elèctric. Les proteïnes es desnaturalitzen amb la presència del SDS, el qual les carrega negativament, de manera que quan migren cap a la membrana, hi queden retingudes. Un cop les proteïnes són exposades en aquestes membranes, es poden detectar mitjançant l'ús d'anticossos específics: s'utilitza un anticòs primari que s'uneix directament a la proteïna d'interès; i un anticòs secundari específic contra les immunoglobulines de l'espècie on s'ha produït l'anticòs primari, que el reconeix. L'anticòs secundari està conjugat amb l'enzim peroxidasa (HRP, *Horseradish peroxidase*) que produeix llum en presència d'un substrat quimioluminiscent.

Procediment:

Es van carregar de 20 a 50  $\mu\text{g}$  de proteïna per pou, dependent de la concentració inicial d'aquesta. Es van carregar en condicions desnaturalitzants i reductores, en presència de tampó *Laemli*, DTT (100 mM) i blau de bromofenol (s'utilitza per a visualitzar l'avanç del front de proteïnes en l'electroforesi) (Taula M7). Les mostres es van escalfar a 95°C durant 10 minuts abans de carregar-les al gel per desnaturalitzar-les completament.

El gel (SDS-PAGE) està format per una part concentradora (tampó apilador) (Taula M6), que es prepara a una concentració del 3% d'acrilamida (Taula M7) i d'una part separadora (tampó separador) (Taula M6) que en funció de les proteïnes que es volen analitzar, es prepara del 8 al 15% d'acrilamida. A menor mida de la proteïna a analitzar, major és el percentatge de gel a preparar, per permetre una millor resolució de les proteïnes per la seva mida. Es va preparar el gel al 12%, ja que és l'òptim per un rang de proteïnes entre 14-60 KDa, el qual conté:

**Gel separador:** 5 mL del tampó *lower* (Taula M6)

8 mL d'acrilamida 30%

7 mL d'aigua destil·lada

75  $\mu\text{L}$  d'APS (persulfat amònic) (Taula M7)

25  $\mu\text{L}$  de Temed (Taula M7)

**Gel concentrador (apilador):** 2,5 mL de tampó *upper* (Taula M6)

1 mL d'acrilamida 30%

6,5 mL d'aigua destil·lada

40  $\mu\text{L}$  d'APS

10  $\mu\text{L}$  de Temed

Un cop polimeritzat el gel, es va introduir dins la cubeta amb el tampó d'electroforesi 1X (Taula M6) i les mostres es van carregar en els pous generats a la part del gel concentrador. Es va aplicar un corrent elèctric amb voltatge constant de 125 mV. Una vegada finalitzada l'electroforesi, es va realitzar la transferència amb el tampó de transferència 1X, a una membrana PVDF activada prèviament (1 minut amb metanol i 4 minuts amb aigua).

**Tampó de transferència 1X** : 100 mL de tampó de transfèrència (Taula M6),

800 mL d'aigua destil·lada

100 mL de metanol

La transferència es va realitzar en un *cassette* (Fig.M8) i es va aplicar un corrent de 400 mA durant 1 hora en una cubeta amb el tampó de transferència, en fred i en agitació contínua per evitar el calentament excessiu. A continuació, la membrana es va rentar amb TBS-T (Taula M6) durant 5 minuts i en agitació, i a continuació, es va incubar durant 1 hora amb solució de bloqueig (Taula M6) per bloquejar les unions inespecífiques de l'anticòs primari. Seguidament, la membrana es va incubar amb presència de l'anticòs primari contra la proteïna d'interès en cada cas (Taula M3) a 4°C amb agitació, tota la nit. A continuació, la membrana es va rentar 3 vegades amb TBS-T (Taula M6) durant 5 minuts, en agitació i es va procedir a la incubació amb l'anticòs secundari durant 1 hora (Taula M4). Finalment, la membrana es va rentar 2 vegades amb TBS-T durant 5 minuts, i 1 última vegada amb TBS (Taula M6). Per a la detecció de l'anticòs secundari, es va utilitzar la solució de ECL (Taula M7), la qual quan entra en contacte amb l'enzim HRP de l'anticòs secundari, s'oxida i emet luminiscència. La membrana es va posar en un *cassette* amb solució de ECL Plus i una pel·lícula fotogràfica per a detectar la llum emesa per la membrana a la zona on l'anticòs secundari unit al primari, detectà la proteïna d'interès. La pel·lícula es va revelar pels mètodes tradicionals de revelador i fixadors, o bé de manera automàtica amb la màquina *Intelligent DarkBox Fujifilm*.

La densitometria del *western blot* es va realitzar mitjançant el *software ImageJ*, amb el qual es van quantificar les àrees de les bandes del gel. L'àrea de cada condició

es va referenciar a l' àrea de la seva actina (control de càrrega), i es es va comparar amb el control (no tractament), el marcatge del qual va ser considerat 1.

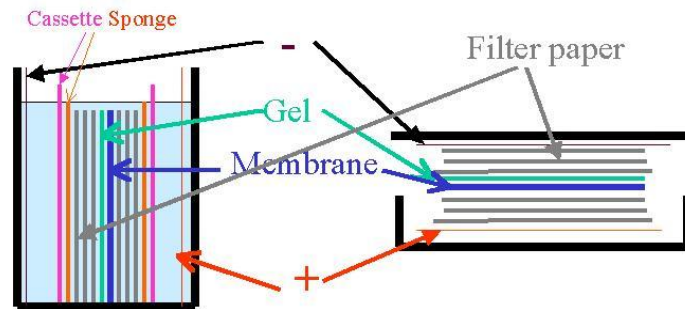


Figura M8. Esquema del *cassette* del *western blot*. Preparació del *cassette* per la transferència de proteïnes del gel d'acrilamida fins a la membrana. Modificat de la web [sciencegateway.com](http://sciencegateway.com).

#### 4.3.4 Anàlisi de proteïnes mitjançant Immunofluorescència

Tècnica que usa anticossos que reconeixen epítops específics de proteïnes. Es du a terme amb mostres de cèl·lules intactes que han perdut la matriu extracel·lular. Es basa en la unió directa de l'anticòs primari a la proteïna d'interès, i la unió d'un anticòs secundari específic contra les immunoglobulines de l'espècie on s'ha produït l'anticòs primari. L'anticòs secundari va unit a un fluorocrom el qual, quan és excitat per un làser emet fluorescència que pot ser detectada. Si l'anticòs secundari està unit al fluorocrom Alexa 488, les cèl·lules que obtinguin la proteïna, seran excitées a 488 nm i detectades mitjançant un làser. La població de cèl·lules positives per la proteïna, seran les que tindran el marcatge del nucli i fluorescència de 488. La població de cèl·lules negatives per la proteïna no emetran fluorescència i només es detectaran amb el marcador de nuclis. La tècnica de immunofluorescència es va realitzar tant amb cèl·lules adherides com en cèl·lules en suspensió.



Procediment:

**Cèl·lules adherides (anàlisi amb microscopia confocal):** Les cèl·lules es van sembrar a plaques de 24 pous amb cobreobjectes de vidre, rodons i estèrils. Es van deixar a l'incubador fins estar adherides als cobreobjectes i amb la confluència desitjada.

Fixació: Amb paraformaldehid al 4%, que es va obtenir dissolent la solució *stock* de paraformaldehid al 16% (Taula M6) amb PBS. Es va retirar el medi dels pous i es va afegir paraformaldehid al 4% durant 20 minuts. Es van fer 3 ó 4 rentats amb PBS 1X. L'últim rentat no es va descartar i es va guardar la placa a 4°C amb PBS 1X durant un període màxim de 15 dies.

El procés de la immunocitoquímica pròpiament dita, es va iniciar amb 2 rentats amb PBS-Tritó 0,2% (Taula M6) de 5 minuts. Es va fer el bloqueig de les unions inespecífiques amb una solució de sèrum normal de cavall (NHS) (Taula M7) 1:10 i PBS-Tritó al 0,2% a temperatura ambient, sense agitació durant dues hores. La incubació amb l'anticòs primari preparat amb NHS 1:100 i PBS-Tritó al 0,2% a la concentració adequada, es va deixar tota la nit a 4°C. La concentració dels anticossos que es van utilitzar en immunofluorescència es mostren a la Taula M5. Al dia següent, les mostres es van deixar atemperar durant 30-45 minuts i es van fer 4 rentats de PBS 1X de 5 minuts. Les mostres es van incubar amb l'anticòs secundari a temperatura ambient, tapat de la llum durant 1 hora. Es van rentats 3 vegades amb PBS 1X durant 5 minuts i es va procedir a la tinció de nuclis cel·lulars amb DRAQ5 (1:3000) (Taula M7) preparat amb PBS 1X durant 30 minuts. Per finalitzar, les mostres es van rentar 3 vegades amb PBS 1X durant 5 minuts i es va procedir a realitzar el muntatge: 5 µL de *Mowiol* (Taula M7) i el cobreobjectes.

Les mostres es van conservar durant una setmana aproximadament a 4°C a una cambra fosca. Per un millor anàlisi i per evitar la pèrdua de fluorescència, les mostres es van visualitzar al confocal el més aviat possible. Es va usar un confocal espectral (Leica TCS-SL amb dos detectors i el *software* de captació LCS (*Leica Confocal Software*)).

**Cèl·lules en suspensió (anàlisi per citometria de flux, FACS):** Les plaques es van tripsinitzar, es va recollir el medi i el contingut es va centrifugar a 300 g durant 5 minuts. Les cèl·lules es van contar i se'n van recollir  $5 \times 10^6$  resuspenent-les amb 1 mL de PBS. Es van centrifugar a 300 g, resuspenent-se amb 500  $\mu$ L de la solució de fixació (paraformaldehid al 4%) a temperatura ambient amb agitació suau (agitador orbital) durant 15 minuts. Les mostres es van centrifugar a 800 g i es va procedir a fer dos rentats amb PBS-FBS a l'1% a temperatura ambient durant 5 minuts. El bloqueig es va realitzar amb 500  $\mu$ L per mostra amb PBS-Tritó al 0,2% i FBS al 20%, a temperatura ambient amb l'agitador orbital durant 1 hora. Les mostres es van centrifugar a 800g i es van rentar 2 vegades amb PBS-FBS a l'1%, durant 5 minuts. Els *pellets* de cèl·lules es van resuspendre amb 1 mL de la solució d'incubació (PBS-Tritó al 0,2% i FBS a l'1%) i es van separar 100  $\mu$ L pel control (no anticòs primari ni secundari), 100  $\mu$ L pel control de la immuno (anticòs secundari), 100  $\mu$ L per l'experiment (anticòs primari i secundari) i 100  $\mu$ L pel control isotípic (IGg i l'anticòs secundari). Les mostres es van incubar amb agitació suau a 4°C tota la nit. Al dia següent, a les mostres se'ls va afegir 1 mL de solució de rentat (PBS-FBS a l'1%) i es van deixar en agitació suau durant 3 minuts. Es van centrifugar a 400 g a 4°C durant 3 minuts i es van resuspendre amb 50  $\mu$ L de solució d'incubació (PBS-Tritó al 0,2% i FBS a l'1%). El secundari es va incubar a temperatura ambient i en agitació durant 45 minuts. Passat el temps, es va afegir 1 mL de solució de rentat (PBS-FBS a l'1%) i es va centrifugar a 400 g a 4°C durant 3 minuts (dues vegades). Per últim, es va resuspendre amb 400  $\mu$ L i es va adquirir en el citòmetre de flux. La població de cèl·lules positives per la proteïna van ser les cèl·lules que van emetre més fluorescència (anticòs secundari unit a un fluorocrom Alexa488 excitable a 488 nm i detectat pel fotodetector del citòmetre (FACSCalibur, BD Bioscience,USA) (Fig.M9).

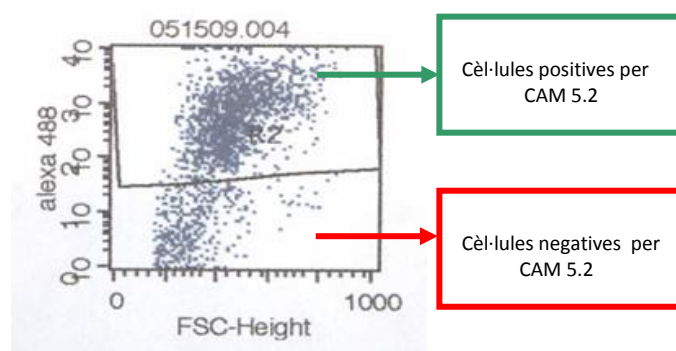


Figura M9. Imatge de la immunofluorescència analitzada per citometria de flux.

Pacient #34 tractat amb l'anticòs 1B10: Hi ha dues poblacions de cèl·lules: la població positiva per la proteïna, aquelles cèl·lules que emeten més fluorescència (anticòs secundari unit a un fluorocrom Alexa488 excitable a 488 nm i detectat pel fotodetector del citòmetre); les cèl·lules sense la proteïna, no se'ls unirà l'anticòs primari, tampoc el secundari, i no emetran fluorescència (població de cèl·lules negatives per la proteïna).

### 4.3.5 Anàlisi de proteïnes mitjançant immunohistoquímica de teixit parafinat

La immunohistoquímica també és un tècnica que usa anticossos que reconeixen epítops específics de proteïnes. Es basa en la unió directa de l'anticòs primari a la proteïna d'interès, i la unió d'un anticòs secundari específic contra les immunoglobulines de l'espècie on s'ha produït l'anticòs primari. L'anticòs secundari està unit a HRP, enzim que catalitza la conversió del substrat cromogènic 3,3-Diaminobenzidina (DAB) donant color a la mostra i per tant, localitzant la proteïna. A diferència de la immunofluorescència, que es realitza en cèl·lules que careixen de matriu extracel·lular, la immunohistoquímica es realitza amb mostres de teixit.

#### Procediment :

Les mostres de teixit encobertes amb parafina es van tallar amb el micròtom obtenint talls de 4 µm i es van adherir a portaobjectes polilisinats, els quals prèviament s'havien incubat amb 50 mL de lisina al 0,1% i 50 mL d'aigua destil·lada, durant una hora.

Els talls es van desparafinar amb xilol: 4 banys amb xilol de 4 minuts cadascun. A continuació es van hidratar: bateria d'etanols (3 de 100%; 3 de 96%; 1 del 70%, de 5 minuts cadascun), aigua destil·lada durant 10 minuts i en PBS 1X. Després es va bloquejar la peroxidasa endògena submergint els cobreobjectes amb el teixit a una

solució amb 2 mL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 140 mL de PBS i 60 mL de metanol durant 15 minuts, protegit de la llum. Seguidament es van fer 2 rentats amb PBS de 5 minuts cadascun. Pel desemascament de l'epítot, les mostres es van bullir amb tampó citrat 1X (pH=6) (Taula M6) durant 45 minuts, deixant-les atemperar 45 minuts més dins del tampó. Les mostres es van rentar 2 vegades amb PBS i 3 vegades amb PBS-Tritó al 0,2%, de 5 minuts cadascun. Pel bloqueig de les unions inespecífiques, es van afegir 100 µL de solució de NHS al 3% amb PBS-tritó al 0,2% a temperatura ambient durant 2 hores. A continuació les mostres es van incubar amb 50 µL de l'anticòs primari diluït amb 3% de NHS-PBS-tritó al 0,2% i tapades amb *parafilm*, i es van deixar a 4°C tota la nit dins la cambra humida.

Al dia següent, les mostres es van deixar atemperar durant 30-45 minuts. Les mostres es van rentar 3 vegades amb PBS-Tritó al 0,2% durant 5 minuts i es va procedir a incubar-les amb l'anticòs secundari durant 30 minuts, a temperatura ambient. Es va realitzar amb el *kit* de *DAKO Real Envision Detection System Peroxidase/DAB (Rabbit/Mouse)* (Ref.: K5007; DAKO).

Les mostres es van rentar 3 vegades amb PBS durant 5 minuts i es va procedir a fer el revelat amb DAB durant 5 minuts. El *kit* de DAKO (Ref.: K5007) conté el tampó substrat i el DAB+cromogen, els quals es van mesclar en una proporció de 50:1. A continuació, es van rentar amb aigua corrent durant 10 minuts i es va procedir a fer el contrast amb hematoxilina diluïda (1:4 amb aigua de l'aixeta) durant 15-30 segons. Les mostres es van rentar 2 vegades amb aigua de l'aixeta durant 5 minuts i es va procedir a deshidratar-les: etanols (3 de 70%; 3 de 96%; 3 de 100%, de 5 minuts cadascun), de xilol (4 rentats, de 5 minuts cadascun). Pel muntatge es va usar DPX i cobreobjectes.

Les zones tumorals de cada mostra es van analitzar amb el microscopi NIKON Eclipse E800 i el *software* ProgRes®CapturePro 2.7.7.

L'avaluació del marcatge de la immunohistoquímica es va realitzar a doble cec (*blind test*) per 2 investigadors independents. Per la reactivitat positiva de la Survivina i la caspasa 3, el marcatge va ser de color marró i es va localitzar a citoplasma i nucli

(Survivina), i a citoplasma (caspasa 3 total i truncada). Per la mesura semiquantitativa del *immunoreactivity score (IRS)* de la Survivina i la caspasa 3, es van observar de 5 a 10 camps adjacents per cada condició, amb augments de 10X, 20X i 40X i es va realitzar l'anàlisi segons el mètode descrit per Zhen (Zhen *et al.* 2005). IRS es va determinar multiplicant els valors dels percentatges de les cèl·lules positives (PP) per l'anticòs (PP: 0 : < 1%, 1: 1-25%, 2: 26-50%, 3: 51-75%, 4: >75%) amb els valors de la intensitat de marcatge (SI) (SI: 0: no marcatge; 1: dèbil; 2: moderat; 3: marcatge fort).

ANTICÒS	LOCALITZACIÓ CEL·LULAR	CONCENTRACIÓ	TAMPO	TEIXIT CONTROL	CASA COMERCIAL
Survivina	Nucli/Citoplasma	1:50	citrat 6	Tumor pulmó	Novus Biological
Caspasa 3	Citoplasma	1:20	citrat 6	Amigdala	Cell Signaling

Taula M2. Anticossos utilitzats per la immunohistoquímica de teixit parafinat.

## 5 Vectors d'expressió gènica

### 5.1 Transfecció cel·lular

Tècnica que permet introduir material genètic exogen a cèl·lules eucariotes mitjançant plasmidis o vectors vírics. La transfecció de cèl·lules animals generalment es du a terme obrint porus transitoris a la membrana plasmàtica de les cèl·lules mitjançant electroporació, per permetre el pas de material genètic. També es poden utilitzar altres tècniques per efectuar la transfecció, així com liposomes que es fusionen amb la membrana plasmàtica cel·lular dipositant el material genètic exogen.

#### 5.1.1 Sobreexpressió de Survivina

La sobreexpressió de Survivina de les línies cel·lulars de CaOV es va realitzar mitjançant el reactiu de transfecció Fugene®6 (Taula M7), sense formulació liposomal, format per una mescla de lípids variats que permeten la unió a molècules de DNA de gran mida (plasmidis) transfectant-les dins la cèl·lula d'una forma eficient sense generar toxicitat.

#### Procediment:

**Sobreexpressió de Survivina:** Les línies cel·lulars es van sembrar a plaques de 6 pous ( $1,5-2 \times 10^5$  cèl·lules per pou) en un volum final de 3 mL. Després de 24 hores, les cèl·lules es van transfectar amb una confluència del 30-35%. Els tubs amb els vectors diluïts en OPTIMEM (2 µg de DNA en un volum final de 400 µL) i Fugene®6 (4 µL de

Fugene®6 per 1 µg de DNA)\* diluït en OPTIMEM (volum final de 400 µL) es van preparar per separat. Els tubs es van vortejar durant un segon i es van deixar reposar 5 minuts. Els tubs amb el DNA (plasmidi) i el Fugene®6 es van mesclar i a continuació el contingut es va vortejar i es va incubar durant 20 minuts a temperatura ambient, tapat de la llum. Els pous de la placa es van rentar amb PBS i es van afegir 800 µL de la mescla DNA/ Fugene®6 que es van deixar incubant durant 4-6 hores. Passat el temps, es va afegir el medi complet.

\* La quantitat de Fugene®6 (*ratio* DNA: Fugene®6) a usar i el temps de transfecció depèn del tipus cel·lular i són factors bàsics per a obtenir una bona eficiència de transfecció. Per determinar el millor temps de transfecció i el *ratio* de DNA: Fugene®6 es va usar el gen reporter GFP (*Green Fluorescent Protein*) com a marcador de transfecció amb diferents proporcions de volum de DNA-GFP i Fugene®6 (1:2; 1:3; 1:4) durant 24 i 48 hores. La fluorescència de GFP es va analitzar amb microscopi. El millor *ratio* va ser de 1 µL DNA per 4 µL de Fugene a les 24 hores de transfecció. Això ens donava les condicions per transfectar el nostre plasmidi.

El tractament es va realitzar 24 hores post-transfecció, i l'anàlisi es va realitzar a les 48 hores d'incubació amb els fàrmacs.

Per induir l'expressió del gen de la Survivina, es va utilitzar el plasmidi pcDNA3 (Fig.M10). Aquest plasmidi que contenia el cDNA del gen de la Survivina va ser amablement cedit pel Dr. Altieri, de la *University of Massachusetts Medical School*. Com a control negatiu (*empty-vector*) es va usar el plasmidi sol (pcDNA3).



i es va deixar reposar 20-30 minuts, amb absència de llum. Els pous es van rentar amb PBS i es van afegir 400  $\mu$ L de siRNA/oligofectamina, resuspenent en 400  $\mu$ L de medi OPTIMEM per obtenir un volum final de 800  $\mu$ L, i es va incubar a 37°C durant 4-6 hores (procés de transfecció) i passat el temps es va afegir medi complet. El tractament es va realitzar després de 6 hores de transfecció, de manera que a l'afegir el fàrmac, induís la transcripció de p53, i que la silenciació amb el siRNA fos més efectiva degut als alts nivells de mRNA.

Els siRNA positiu usat va ser: *Human p53 siRNA* (TP53 UHS40367 siRNA, Invitrogen), i com a control (siRNA-) *Negative Universal Control siRNA*, Invitrogen).

Es va utilitzar una mescla de 2 siRNA de p53 validats per la casa Invitrogen, la seqüència dels quals va ser:

CCAGUGGUAUAUCUACUGGGACGGAA

UUCCGUCCCAGUAGAUUACCACUGG

**siRNA de Survivina:** Prèviament a la realització dels experiments, es va escullir el siRNA a utilitzar i el temps òptim d'incubació amb els fàrmacs. Les cèl·lules es van transfectar amb 3 siRNA diferents (F07, F09, F11) (validats per la casa Invitrogen) durant 24, 48 i 72 hores, i es va analitzar l'expressió proteica de Survivina. El siRNA que va silenciar ambdues línies cel·lulars en tots els temps va ser F07. Com a siRNA control es va usar un siRNA negatiu (*Negative Universal Control siRNA*, Invitrogen). El temps d'incubació dels fàrmacs va ser 48 hores, i el de transfecció 72 hores, temps en que Survivina es mantenia silenciada.

El protocol usat va ser el descrit al *datasheet* de l'oligofectamina de la casa comercial Invitrogen. La concentració de siRNA usat va ser de 200 nmol/L (concentració òptima recomanada: 50-200 nmol/L). Els tubs amb els siRNA diluït amb OPTIMEM (10  $\mu$ L de siRNA en 175  $\mu$ L d'OPTIMEM) i oligofectamina diluïda amb OPTIMEM (4  $\mu$ L d'oligofectamina en 15  $\mu$ L d'OPTIMEM) es van preparar per separat. Es van vortejar suaument i es van deixar reposar 5 minuts (sempre amb absència de llum). Es van ajuntar els continguts dels tubs: l'oligofectamina amb el siRNA (10  $\mu$ L del siRNA *stock* (20 nM) en 4  $\mu$ L d'oligofectamina). La mescla dels siRNAs amb oligofectamina es va vortejar suaument i es va deixar reposar 20-30 minuts, amb absència de llum. Els pous es van rentar amb PBS, i es van afegir 800  $\mu$ L d'OPTIMEM i



200 µL de la mescla de siRNA/oligofectamina, obtenint un volum final de 1 mL, i es va deixar incubant a 37°C durant 5 hores. Passat el temps, es va afegir 500 µL de medi al 30% de FBS.

Els fàrmacs es van afegir 24 hores després de la transfecció amb el siRNA de Survivina, i després de 48 hores de tractament es va realitzar l'anàlisi. Els siRNA positiu usat va ser: BIRC5HSS179403 siRNA (Invitrogen), i com a control, un siRNA negatiu (*Negative Universal Control* siRNA, Invitrogen).

Seqüència dels siRNAs de Survivina povats:

**F07:** CACCGCAUCUCUACAUUCAAGAACU

**F09:** AACGAGCCAGACUUGGCCAGUGUU

**F11:** GGCUGCACCACUCCAGGGUUAUU

## 5.2 Transformació bacteriana

És el procés pel qual els plasmidis d'interès són introduïts al bacteri *E.coli*, que creixeran i es reproduiran amb el plasmidi a l'interior, formant colònies a plaques i fent una selecció de les mateixes mitjançant antibiòtic que contenen les plaques. El plasmidi introduït conté el gen de resistència a l'antibiòtic, de manera que aquells bacteris que creixin a les plaques formant colònies seran els que continguin el plasmidi (resistents).

### Procediment:

Les cèl·lules *E.coli* DH5- $\alpha$  competents es van descongelar a temperatura ambient i es van mantenir durant 10 minuts agitant-les suaument, cada 2 minuts. A continuació s'hi va afegir la quantitat de DNA (1-10 ng) i es va mesclar suaument, mantenint-se en gel durant 30 minuts. Es va realitzar un xoc tèrmic a 42-45°C durant 90 segons i es va deixar en gel 2 minuts. S'hi van afegir 900 µL de medi LB (Taula M6) i es va incubar a 31°C en agitació, durant una hora. A continuació es va centrifugar a 15.000 g durant 1 minut i es va resuspendre amb 150-200 µL de LB. Seguidament es va plaquejar: en una placa d'agar amb ampililina (Taula M7) s'hi van afegir de 3 a 4 boletes de vidre i es va agitar la placa per així escampar els bacteris. Un cop sembrat, les boletes es van retirar i la placa es va incubar a 37°C.

### 5.2.1 Inoculació de colònies bacterianes recombinades a un medi de cultiu líquid

#### Procediment:

De la placa de cultiu, es va “picar” (seleccionar) amb una punta estèril una colònia resistent i es va posar a créixer en medi de cultiu LB (Taula M6): 250 mL de medi LB i 250 µL d'ampicil.lina, i es va deixar a l'incubador amb agitació 37°C durant tota la nit, per permetre la proliferació de la colònia bacteriana. Es va procedir a realitzar la *Maxi-Prep*.

### 5.2.2 Extracció i purificació del plasmidi amb l'insert d'interès:

#### ***Maxi-prep.***

La *Maxi-Prep* és una tècnica que permet aïllar el plasmidi d'interès dels bacteris.

#### Procediment:

Tot el contingut bacterià de la colònia picada el dia anterior es va transferir a una ampolla de centrifugació, i es va centrifugar a 4.500 g durant 15 minuts. Es va procedir a fer l'extracció i purificació del plasmidi seguint les instruccions del fabricant (*Quiagen Plasmid Maxi Prep*.Ref.: 121163).

## 6 Estudis *in vivo*

Els xenoinjerts subcutanis (model ectòpic) a ratolins *nude mice* (no obtenen limfòcits T), són molt usats pel desenvolupament de fàrmacs anticancerígens. El seu ús com a indicador predictiu de la probable activitat clínica, permet avaluar l'eficiència i la citotoxicitat dels fàrmacs en fases pre-clíniques.

Aquests models presenten l'avantatge sobre els models *in vitro* de reproduir l'arquitectura del tumor original.

## 6.1 Animals

Es van usar ratolins atímics (Hsd: *Athimic* Nude-Foxn1nu) femelles, nulíparas, joves (5 setmanes). Els animals eren clínicament sans i de categoria higiènic-sanitària lliures de gèrmens patògens específics (SFP).

Tots els estudis es van realitzar segons el procediment de treball (codi 3880) aprovat pel Comitè Ètic d'experimentació Animal C.E.E.A (Comitè Ètic d'Experimentació Animal). Cada experiment es va realitzar amb un total de 40 ratolins *nude mice* femella (4 ratolins per gàbia/grup). Les cèl·lules inoculades van ser les línies cel·lulars A2780p (20 ratolins) i A2780cis (20 ratolins).

## 6.2 Recepció, readaptació i distribució per grups

Els ratolins es van obtenir de la casa comercial Charles River i es van recepcionar a l'Institut Català d'Oncologia (ICO). Els ratolins es van inspeccionar clínicament pel veterinari de l'àrea de l'experimentació animal, verificant la informació del Certificat de Qualitat que els acompanyava. Els animals es van distribuir a l'atzar i van ser sotmesos a un període de readaptació de 7 dies per aconseguir l'homeostasi de tots els paràmetres fisiològics i l'adaptació al nou ambient.

## 6.3 Condicions de manteniment

Els experiments es van realitzar a l'ICO en sales protegides per barreres físiques, en condicions estèrils controlades, temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , humitat relativa del 65-80%, 12 canvis d'aire/hora i un fotoperíode de 12/24 hores.

Els animals es van allotjar en gàbies de plàstic de policarbonat, amb tapes de reixeta de metall inoxidable canviables. Les gàbies es van identificar mitjançant targetes. L'aigua es va subministrar amb biberons de policarbonat de 500 mL, amb pipeta d'acer inoxidable, i l'aliment va ser pinso. Tots els materials van ser esterilitzats mitjançant autoclau a  $121^\circ\text{C}$  durant 20 minuts i subministrats *ad libitum*.

## 6.4 Inoculació de línies cel·lulars als *nude mice*

Les línies cel·lulars utilitzades per inocular als ratolins i generar els tumors van ser A2780p i A2780cis. Les cèl·lules es van descongelar i es van mantenir en medi

RPMI 1640 suplmentat amb 10% FBS, 1% glutamina i 1% penicil.lina/estreptomicina. Es van mantenir en cultiu a 37°C en una atmosfera humida amb CO<sub>2</sub> al 5%.

Quan les cèl·lules van assolir una confluència del 80% es van rentar amb PBS 1X i tripsinitzar amb tripsina-EDTA al 0,25%. Es van pipetejar acuradament per evitar la formació d'agregats cel·lulars i es van centrifugar a 200 g durant 5 minuts. El *pellet* de cèl·lules es va resuspendre en un volum de PBS per assolir una concentració de 17,5 milions de cèl·lules/mL ( $3,5 \times 10^6$  cèl·lules en 200 µL de PBS). Es van aliquotar 200 µL per cada eppendorf i es van afegir 100 µL de PBS, obtenint un volum total d'inoculació de 300 µL. Les cèl·lules es van transportar amb gel fins l'estabulari i es va procedir a anestesiari als ratolins amb isoflurà, amb una dosis d'inducció de 2 Oxigen: 4 isoflurà per via inhalatòria. A continuació les cèl·lules es van injectar via subcutània a l'esquena dels ratolins ( $3 \times 10^6$  cèl·lules/ratolí). Un cop realitzada la inoculació, els ratolins es van deixar reposar.

## 6.5 Tractament

A l'inici de l'experiment es van fer grups de quatre ratolins per gàbia, escollits a l'atzar. Hi havia 5 gàbies amb 4 ratolins cadascuna, obtenint un nombre total de 20 ratolins (n=5) per experiment. Cada gàbia/grup contenia: ratolí control amb el vehicle del fàrmac (DMSO 1% en solució salina), el ratolí CDDP (només tractat amb CDDP), el ratolí YM155 (només tractat amb YM155), i el ratolí doble tractament (tractat amb CDDP i YM155) (Fig.M12).

La concentració de CDDP era de 1 mg/ mL (dissolt en solució salina). Els ratolins es van tractar amb una dosi de CDDP de 4 mg/Kg en un volum de 300 µL, injectat amb xeringa via intraperitoneal, els dies 0-4 del tractament. El fàrmac YM155 en pols es va dissoldre amb DMSO a l'1% fins obtenir una concentració final de 15 mg/mL. Els ratolins es van tractar amb una dosi de YM155 de 5 mg/Kg en un volum de 100 µL, introduït mitjançant bombes de perfusió microsmòtiques (Alzet 7D), que alliberen el fàrmac de forma contínua durant els 7 dies de tractament, alliberant 0,5 µL/h (Fig.M11). Aquestes van ser introduïdes a la cavitat intraperitoneal dels ratolins mitjançant cirurgia.



Figura M11. Bombes Alzet de 7 dies. Pàgina web [www.alzet.com](http://www.alzet.com)

Els ratolins amb el doble tractament (CDDP+YM155), se'ls va introduir la bomba de perfusió amb la dosi de 5 mg/Kg d'YM155 des del dia 0 al 7. El CDDP se'ls va injectar puntualment els dies 0 i 4 del tractament, via intraperitoneal a la dosi de 4 mg/Kg. Als ratolins control (DMSO a l'1% en solució salina) també se'ls va introduir la bomba de perfusió a la cavitat intraperitoneal (Fig.M12). El protocol descrit va ser una modificació de Iwasa i col·laboradors (Iwasa *et al.* 2010).

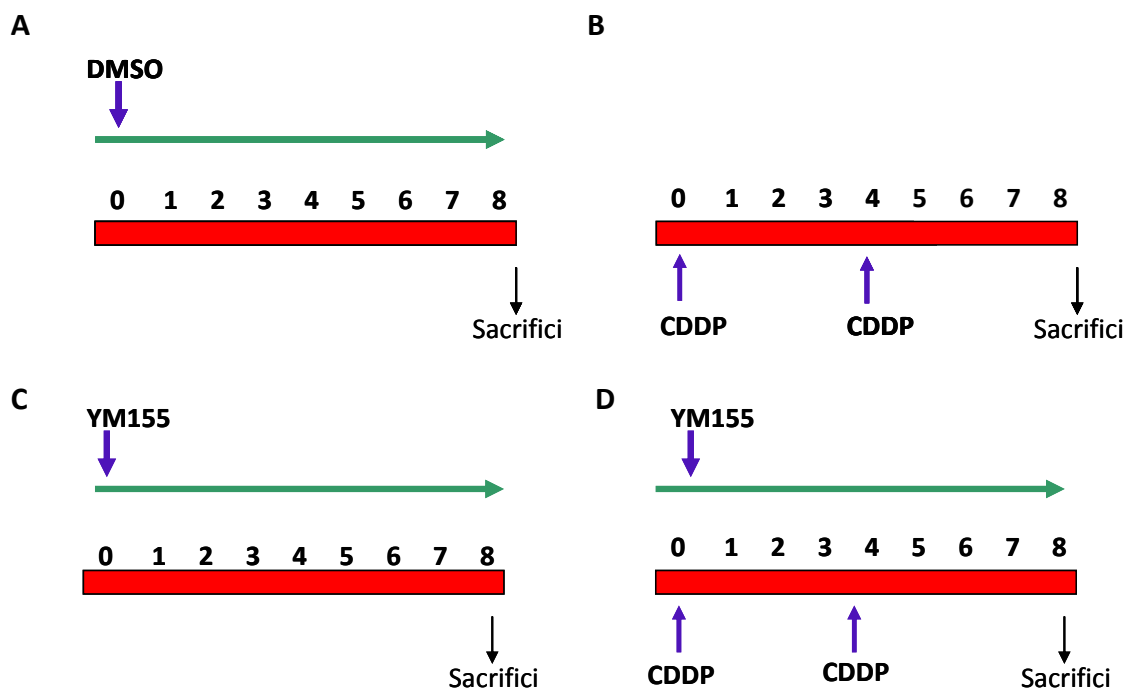


Figura M12. Esquema del tractament amb CDDP i YM155 durant 7 dies. Ratolins control (A): portaven la bomba de perfusió a la cavitat intraperitoneal, la qual alliberava de forma contínua el DMSO a l'1% en solució salina durant els 7 dies, amb un flux de 0.5  $\mu\text{L}/\text{h}$ . Ratolins amb CDDP (B): Se'ls va injectar un volum de 300 $\mu\text{L}$  de CDDP a una dosi de 4 mg/Kg amb xeringa via intraperitoneal els dies 0 i 4 del tractament. Ratolins amb YM155 (C): el fàrmac es va dissoldre amb DMSO a una concentració final de 15 mg/mL, es va introduir als ratolins mitjançant bombes de perfusió a la cavitat intraperitoneal, les quals alliberaven YM155 de forma contínua durant els 7 dies, amb un flux de 0.5  $\mu\text{L}/\text{h}$  (a dosi de 5 mg/Kg). Ratolins amb doble tractament (D): se'ls va introduir la bomba de perfusió a dosi de 5 mg/Kg de YM155 des del dia 0 al 7, i als dies 0 i 4 de tractament, se'ls va injectar el CDDP via intraperitoneal a la dosi de 4 mg/Kg.

## 6.6 Determinacions realitzades

### 6.6.1 Observacions clíniques

Després de l'administració de les cèl·lules tumorals, es van realitzar observacions dels ratolins per tal de registrar qualsevol signe clínic manifest i detectar les morts que es produïssin. Es van supervisar els paràmetres de dolor, els quals van ser: pèrdua de pes, aspecte físic, alteracions de la conducta i mida del tumor. Es van considerar signes de deteriorament quan l'animal presentava caquèxia, icterícia, pèrdua excessiva de pes i hipomobilitat. Si el tractament generava deshidratació, se'ls administrava suero glucosat (500 µL/dia). El pes corporal i mida dels tumors es va mesurar el dia de l'inici del tractament i dos dies a la setmana fins al final de l'estudi, usant una balança digital i un peu de rei.

### 6.6.2 Mesures del tumor

Cada dos dies després de l'inoculació de cèl·lules, es va efectuar palpació de la zona on es van inocular les cèl·lules per detectar la presència de masses atribuïbles al tumor injectat i establir el temps de latència en l'aparició de tumor de cada grup. Es va considerar massa tumoral viable creixent quan el tumor va assolir la mida que estava entre el rang 0,250-0,3 cm<sup>3</sup> tots homogenis, així ja es podia iniciar el tractament (Fig.M13). La mida del tumor es va mesurar amb el peu de rei, com el elipsoide generat a partir de la mesura del diàmetre major (L) i menor (W) aplicant la formula  $V=L^2W\pi/6$ . Es va procedir a sacrificar els animals passats els 8 dies de tractament.



Figura M13. Mida de tumor al moment d'iniciar el tractament.

### 6.6.3 Exàmens de patologia

Vuit dies després de la iniciació del tractament, es va practicar l'eutenàsia de tots els animals on es va aplicar la dislocació cervical.

Es va realitzar l'avaluació anamatopatològica dels ratolins examinant cuidadosament l'aspecte extern, així com totes les cavitats i òrgans.

Es van obtenir mostres del tumor d'ovari, els quals una part van ser preservats en formol neutre al 10% per a la seva posterior inclusió amb parafina i realització d'immunohistoquímica per marcadors pro-apoptòtics i anti-apoptòtics. L'altra part del tumor es va preservar a  $-80^{\circ}\text{C}$  pel seu processament per l'obtenció de RNA i proteïna.

## 7 Anàlisi de dades i estadística

Els resultats del present treball es van expressar com a mitjana  $\pm$  desviació estàndard (SD) dels valor obtinguts en un mínim de 3 experiments independents. En alguns casos es va expressar com a mitja  $\pm$  error estàndard (SEM).

Les dades es van analitzar amb el programa informàtic GraphPad Prism 5.01, realitzant test *t* de Student de dades no aparellades.

El nivell de significància *p* es va indicar en el text o en el peu de figura. Les diferències que van assolir un *p*-valor menor de 0,05 es van considerar significatives.

Els efectes sinèrgics de la combinació de dos fàrmacs es van analitzar utilitzant el *software Biosoft CalcuSyn* (Ferguson, MO), amb el mètode de l'Efecte de la Dosis Mitjana (*Median Dose Effect*). Segons aquest mètode, un valor de CI (*Combination Index*) de 1 indica efecte additiu; un valor per sobre de 1, efecte antagonista; i un valor per sota de 1, efecte sinèrgic. El *software CalcuSyn* calcula el CI mitjançant la fórmula:  $CI = (D_1)/(D_x)_1 + (D_2)/(D_x)_2 + (D_1)(D_2)/(D_x)_1(D_x)_2$ . On  $(D_x)_1$  i  $(D_x)_2$  és la dosi del fàrmac 1  $(D_x)_1$  o del fàrmac 2  $(D_x)_2$  que per sí sola genera "X%" d'inhibició. Mentre que  $(D_1)$  i  $(D_2)$  és la dosi del fàrmac 1  $(D_1)$  o del fàrmac 2  $(D_2)$  que en combinació amb l'altre fàrmac generen "X%" inhibició.

ANTICÒS	EPÍTOP	DILUCIÓ	ORIGEN*	PES MOLECULAR (KDa)	CLON	CASA COMERCIAL
p53	Aa.37-45	1/200	R	53	Ab-5; Clone DO-7	Neomarkers
Mdm2	Aa.294-330	1/500	R	85	Clone2A10; ab16895	AbCam
Mcl-1	Domini intern	1/1000	C	40	S-19; sc-819	Santa Cruz
p21	Extrem C-terminal	1/100	C	21	C-19; sc-397	Santa Cruz
Noxa	Proteïna de fusió	1/100	R	11	Clone114C307; ab13654	AbCam
Puma	Aa 2-16	1/500	C	18-23	Clon ab9645	AbCam
Survivina	No determinat	1/500	C	16,5	Cat No. NB 500-201	Novus Biologicals
Parp	Aa.764-1014	1/500	C	116	H-250; sc-7150	Santa Cruz
Bcl-2	Aa. 41-54	1/500	R	24-26	Clone124; Cod.No.M0887	Dako
Bax	Aa.43-61	1/1000	C	21	-	Cedit per J.Reed
Xiap	No determinat	1/500	R	55	Clone117320; Cat No.MAB822	R&D Systems
B-Actina	Extrem N-terminal	1/5.000	R	42	Clone AC-15; Cat No. A5441	Sigma
Tubulina	No determinat	1/1000	R	60	Ab-1; Cat#CP06	Oncogene

Taula M3. Anticossos primaris utilitzats per *western blot* (\*R=Ratolí; C= Conill)

ANTICOSSOS SECUNDARIS	DILUCIÓ	CASA COMERCIAL
Anti-rabbit IgG, HRP linked whole antibody (from donkey)	1/5000	GE Healthcare
Anti-mouse IgG, HRP linked whole antibody (from sheep)	1/5000	GE Healthcare

Taula M4. Anticossos secundaris utilitzats per *western blot*

ANTICÒS PRIMARI	CONCENTRACIÓ	ISOTIP	REFERÈNCIA	CASA COMERCIAL
CAM 5.2 (mouse)	1/5	IgG2a	345779	Biosciences
Anti-Vimentina (mouse)	1/2000	IgG1k	clon:V9,M0725	Dako
Anti-Calretinina (mouse)	100 µL directes	IgG1k	NP113	Dako
Phospho-H2AX (Ser139) (mouse)	1/500	IgG1	clon: JBW301	Millipore
ANTICÒS SECUNDARI	CONCENTRACIÓ	FLUOROCROM	REFERÈNCIA	CASA COMERCIAL
Goat Anti-mouse-IgG	1/500	Alexa Fluor® 488	A11001	Molecular Probes
Donkey Anti-mouse-IgG	1/500	Cy3	715-166-151	Jackson IR

Taula M5. Anticossos utilitzats per immunofluorescència



TAMPO	COMPOSICIO	CONCENTRACIO FINAL
Tampó de lisis proteica (Laemmli)	Tris-HCl pH=6,8 SDS Glicerol	80 mM 2% 10%
Tampó d'electroforesi (1x) pH=8,3	Tris Glicina SDS	25 mM 192 mM 0,10%
Tampó de transferència (1X) pH=8,3	Tris Glicina Metanol	25 mM 192 mM 10% per proteïnes PM>30kDa 20% per proteïnes PM<30kDa
Tampó apilador per l'electroforesi (upper) pH=6,8	Tris SDS	0,5 M 0,40%
Tampó separador per electroforesi (lower) pH= 8,8	Tris SDS	1,5 M 0,40%
TBS (Tris Buffered Saline) 1X pH=7,4	Tris-HCl NaCl	20 mM 137 mM
TBT-T pH=7,4	TBS 1X Tween-20	1X 0,10%
Solució de Bloqueig	TBS-T Llet desnatada en pols	1X 5%
Tampó Citrat pH= 6 ó pH=10 10mM	Àcid Cítric Citrat Sòdic	1,8 mM 8mM
Tampó Tris pH=10 EDTA pH=8	Tris EDTA	10 mM 1 mM
Tampó Citrat-fosfat pH= 7,8	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Àcid cítric	0,2 M 0,1 M
Paraformaldehid 16%	Paraformaldehid Tampó fosfat	16% 0,4 M
PBS (Tampó fosfat salí) pH=7,4	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	140 mM 0,27mM 0,81 mM 0,18 mM
PBS-T	PBS Tween	1X 0,20%
PBS-0.1% FBS	PBS FBS	1 X 0.1%
LB (1L)	NaCl Tryptona Estracte llevat	170mM 1% 0,50%
LB (plaques) (1L)	NaCl Tryptona Estracte llevat Agar	170mM 1% 0,50% 1,50%

Taula M6. Principals tampons i solucions utilitzats.

PRODUCTE	STOCK	PROVEIDOR
Acrilamida:Bisacrilamida	Solució 30% (37, 5.1)	Bio-Rad
Ampicil.lina	50 mg/mL	Sigma
Anexina V-FITC	-	Bender MedSystems
APS	10%	Sigma
Blau de Bromofenol	-	Flucka Chemica
b-mercaptoetanol	-	Merck
cis-diamminedichloroplatinum(II)	3,3 mM en aigua	Sigma
Colagenasa II	200 U/ml	Sigma
DMSO	-	Merck
DRAQ5	-	Cell Signaling
DPX	-	Fluka
DTT	50 mg/mL en aigua	Sigma
<i>Hanks' Balanced Salts Solution</i>		Biological Industries
ECL Plus	-	Amersham Biosciences
Etanol	-	Merck
FBS ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )	-	Biological Industries
Fugene®6	-	Roche Diagnostics
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	Sigma
Iodur de propidi (IP)	20 µg/mL	Sigma
Isopropanol	-	Panreac
L-Glutamina	200 mM	Biological Industries
Lisina	0,10%	Sigma
M199	-	Biological Industries
Marcador de pes molecular (proteïnes)	-	Bio-Rad
Membrana PVDF Hybond-P	-	Amersham Biosciences
MCDB105	-	Biological Industries
Metanol	-	Merck
Marcador de pes molecular (proteïnes)	-	Bio-Rad
<i>M-MLV Reverse Transcriptase</i>	200U/µL	Promega
<i>Mowiol</i>	-	Calbiochem
MTT	5mg/ml en PBS	Sigma
NHS ( <i>Normal Horse Serum</i> )	-	Vector
Nutlin-3a	10 mM amb DMSO	Cayman Chemical
Nutlin-3b	10 mM amb DMSO	Cayman Chemical
Oligofectamina	-	Invitrogen
OPTIMEM	-	GIBCO
Penicil.lina-Estreptomicina	1000U/mL //10mg/mL	Biological Industries
RNaseA	Variable	Sigma
<i>RNA later</i>	-	Invitrogen
RNaseZAP	-	Ambion
RPMI 1640	-	Biological Industries
SDS	-	Merck
Temed	-	Merck
Tripsina-EDTA al 0,25%	-	Biological Industries
Tritó®X-100	-	Bio-Rad
Tween-20	-	AppliChem
X-Gal	20X en dimetilformamida	Cell Signaling
Xilol	-	Merck
YM155	1mM amb DMSO	Astellas Pharma
Q-VD-Oph (Q-Val-Asp (non-omethylated)-Oph)	20 mM DMSO	R&B Systems

Taula M7.Productes



## RESULTATS



## RESULTATS

### Objectiu 1. Establiment de cultius primaris de càncer d'ovari a partir de mostres tumorals humanes

#### 1.1 Introducció als cultius primaris

Per la millor caracterització dels factors associats al desenvolupament de la quimioresistència, han estat de gran utilitat els estudis realitzats *in vitro* amb línies cel·lulars comercials. Aquestes permeten efectuar grans avenços en l'estudi del creixement i diferenciació cel·lular, en l'anàlisi dels mecanismes d'acció implicats en la resposta cel·lular davant d'un estímul determinat, així com en el desenvolupament de manipulacions gèniques per comprendre millor l'estructura i funció dels gens. Tanmateix, després d'un elevat nombre de passes *in vitro*, els patrons d'expressió gènica observats en les línies cel·lulars poden variar notablement en relació amb les alteracions moleculars observades en els tumors originals. Aquest fet justifica la discrepància observada en ocasions entre els resultats observats *in vitro* i els observats en els pacients. Una forma d'evitar aquesta limitació és l'ús de cultius primaris obtinguts a partir del tumor del pacient.

Els cultius primaris reproduïen amb elevada precisió les alteracions genètiques del tumor original del qual procedeixen, i per tant, tenen un comportament biològic molt similar. No obstant, a mesura que es relitzen més passes, les cèl·lules tumorals poden anar adquirint noves mutacions gèniques i allunyar-se del tumor inicial del qual procedeixen.

El nostre grup ha desenvolupat el protocol per establir cultius primaris de CaOV humans amb mostres de teixit fresc procedents del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari de Bellvitge (HUB). La present tesi ha permès establir el protocol de cultius primaris de CaOV tant a partir de tumor sòlids com de líquids ascítics (LASC). Una vegada establerts els cultius, aquests s'han pogut congelar a passes baixes (entre

passee 0 i 4) i descongelar-se amb èxit, conservant la viabilitat i les mateixes característiques genètiques que el tumor inicial.

Per treballar amb cultius primaris, és essencial fer-ho amb passes baixes (inferiors a 6-8 passes per a tenir resultats reproduïbles) (Dunfield *et al.* 2002). Una limitació dels cultius primaris és que, al ser cèl·lules que no estan immortalitzades com les línies cel·lulars, és freqüent observar senescència i mort cel·lular després d'un nombre limitat de divisions, i d'aquí la importància de treballar amb passes baixes.

## **1.2 Característiques histològiques i estadis dels cultius primaris establerts**

### **1.2.1 Obtenció de diferents tipus histològics a partir de mostres de tumor sòlid i LASC.**

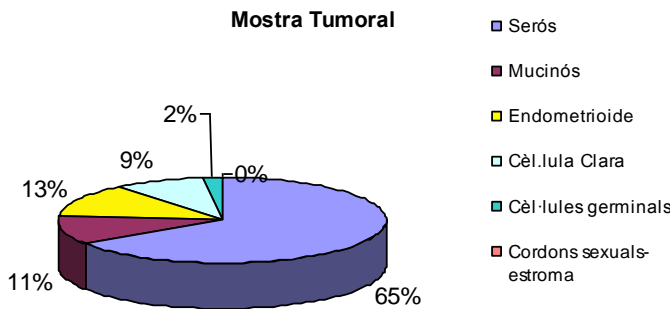
Durant la realització de la tesi doctoral es van processar un total de 102 cultius primaris de CaOV dels quals 79 es van obtenir a partir de tumor sòlid i 23 a partir de líquid ascític (LASC). Les mostres obtingudes van ser tumors epitelials d'ovari, i en menor proporció, tumors de cèl·lules germinals i de cordons sexuals-estroma. Es van rebre mostres de tumors malignes, *borderline* i benignes. La majoria dels tumors serosos van ser malignes (93%), les mostres dels tumors mucinosos van ser 50% malignes i 40% *borderline*. Dels subtipus endometriode i cèl·lula clara, tots van ser malignes (Fig.R1.1A).

Considerant només les mostres malignes d'ovari, es van obtenir els tipus histològics següents: carcinoma serós (65%), endometriode (13%), mucinos (11%), cèl·lula clara (9%); en menor percentatge tumors de cèl·lules germinals (2%) (Fig.R.1.1B). De les mostres de LASC, es va rebre un major percentatge de carcinomes serosos (73%) i mucinosos (17%), no es van obtenir casos de tipus endometriode i cèl·lula clara. Es van obtenir mostres de tumor de cèl·lules germinals i de cordons sexuals-estroma (4% en ambdós casos) (Fig.R.1.1C).

A

	Maligne	Borderline	Benigne
Serós	93	7	0
Mucinós	50	40	10
Endometrioide	100	0	0
Cèl.lula Clara	100	0	0

B



C

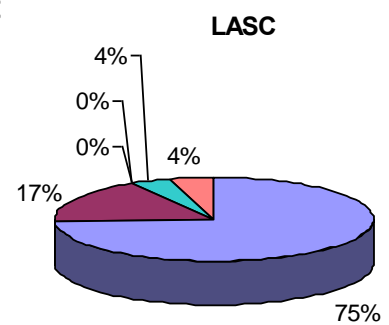


Figura R1.1. Cultius primaris de CaOV establerts a partir de tumor sòlid i de líquid ascític (LASC). Percentatge de mostres malignes (carcinoma), *borderline* i benignes dels diferents tipus histològics obtinguts (A). Percentatge de tipus histològics obtinguts a partir de mostres tumorals sòlides malignes (carcinomes) (B) i líquid ascític (LASC) de tumor maligne (C).

En aquesta tesi es van establir cultius primaris de totes les mostres rebudes, tanmateix pels experiments realitzats amb fàrmacs, es van utilitzar només els cultius primaris de tumors epitelials malignes (carcinomes).

### 1.2.2 Obtenció de mostres de CaOV de diferent estadi tumoral

L'estadi tumoral al moment del diagnòstic és un dels factors pronòstics més importants del CaOV. La classificació del CaOV es basa en la classificació internacional de la Federació Internacional de Ginecologia i Obstetrícia (classificació FIGO). De les mostres tumorals sòlides malignes epitelials, en general els estadis que més van predominar van ser el III (58%) i I (38%). L'estadi II va ser poc freqüent (4%) i no es va obtenir cap mostra en estadi IV, ja que en aquest, no està implicat el tractament quirúrgic d'entrada (Fig.R1.2).



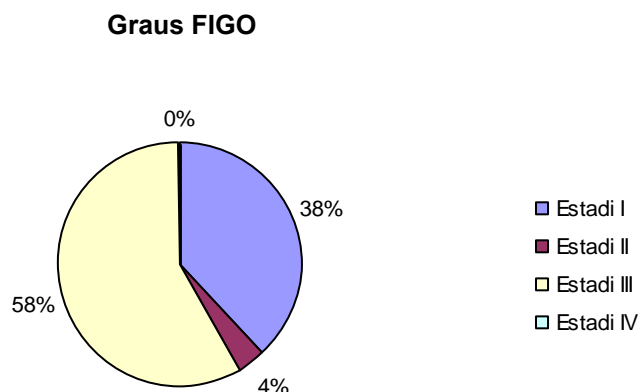


Figura R1.2. Percentatge dels estadis FIGO de les mostres obtingudes a partir de tumor sòlid de CaOV epitelial.

La majoria dels carcinomes serosos (els més abundants) van ser d'estadi III (76%). Dels mucinosos, el que més va abundar va ser l'estadi I (83%), en el tipus endometriode els estadis I i III (57% i 43%, respectivament), i en cèl·lula clara els estadis III i I (60% i 40%, respectivament)(Fig.R.1.3).

	Serós	Mucinos	Endometriode	Cèl·lula Clara
Estadi I	17	83	57	40
Estadi II	7	8	0	0
Estadi III	76	8	43	60
Estadi IV	0	0	0	0

Figura R1.3. Percentatge dels estadis FIGO segons el tipus histològic de les mostres obtingudes a partir de mostres tumorals sòlides de CaOV.

### 1.3 Factors limitants per l'establiment de cultius primaris de CaOV

Perquè un cultiu primari creixi amb èxit i la seva viabilitat es mantingui, és important un adequat processament inicial de la mostra, conèixer les característiques d'aquesta, el temps que roman en cultiu i un correcte manteniment per evitar possibles contaminacions.

De totes les mostres obtingudes a partir de tumor sòlids, un 76% van ser viables, van créixer amb èxit i es van poder congelar per usar en futurs experiments; un 16% no van créixer i un 8% es van contaminar (Fig.R1.4A). De les mostres obtingudes a partir de LASC: un 82% van ser viables i van créixer amb èxit; 9% no van

créixer i 9% es van contaminar (Fig.R1.4B). En conjunt, el creixement de primaris va ser exitós en un 80% dels casos.

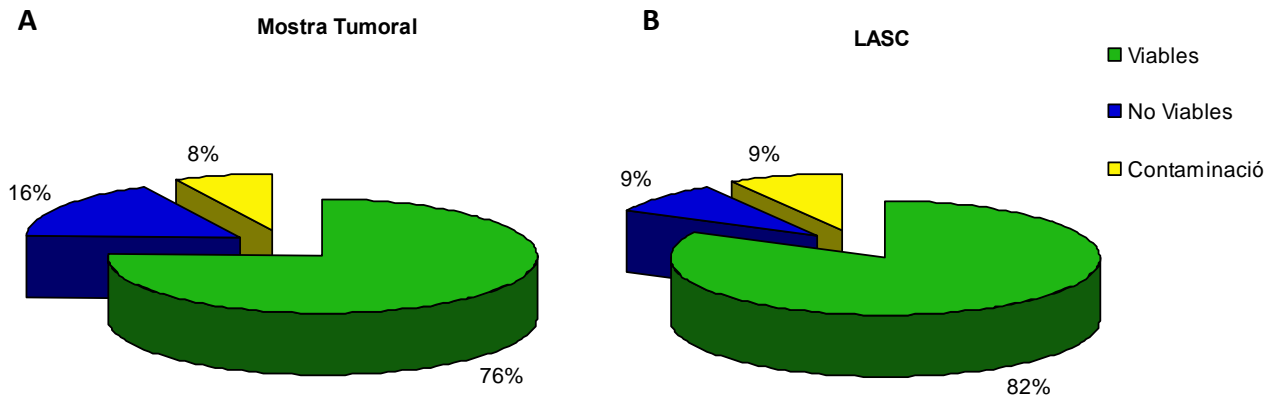


Figura R1.4. Èxit dels cultius primaris. Percentatge de viabilitat, no viabilitat i contaminació per bacteris i/o fongs en cultius primaris establerts a partir de tumor sòlids (A) o de LASC (B).

Els cultius primaris no viables, ho van ser per raons intrínseques de la mostra, o bé per factors externs.

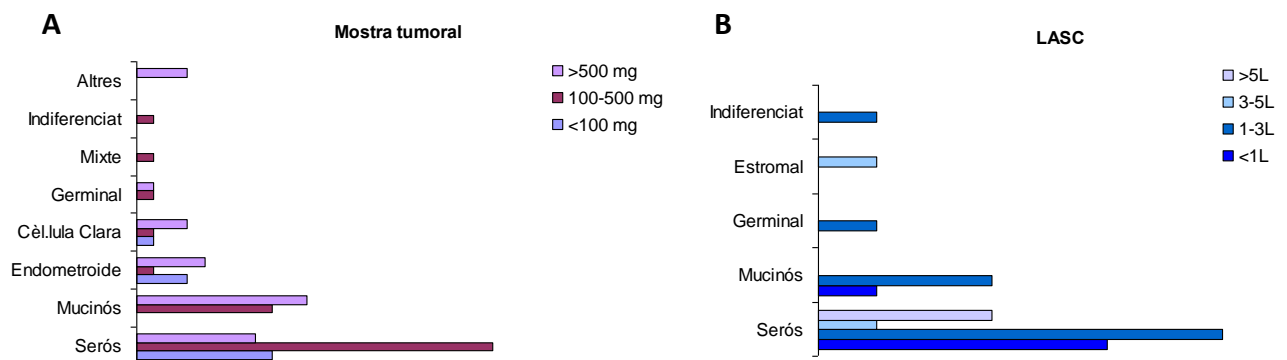
### 1.3.1 Factors limitants dependents de la mostra

#### 1.3.1.1 Mida de la mostra

Com a part de protocol, es va determinar el pes (mostra sòlida) i el volum (LASC) de les mostres abans d'iniciar el seu processament. En el cas de les mostres sòlides, la mesura del pes va permetre ajustar la quantitat de col·lagenasa I necessària per la disgregació mecànica del tumor, i va condicionar la viabilitat del cultiu. En el cas dels LASCs, el volum de la mostra no va condicionar el protocol ni la viabilitat del cultiu.

La mitjana dels pesos de les mostres tumorals que va cedir el Servei d'Anatomia Patològica de l'HUB va oscil·lar entre els 13 mg i 2500 mg (Fig.R1.5A). Les mostres inferiors a 20 mg van presentar dificultats a l'hora de garantir l'èxit en l'establiment del cultiu, ja que el nombre de cèl·lules tumorals que es van aconseguir aïllar va ser insuficient, independentment del tipus histològic. Mentre que les mostres amb pesos superiors a 100 mg van créixer molt bé i van ser viables en la majoria dels casos.

La mitjana dels volums de LASC que va cedir el Servei de Ginecologia de l'HUB va oscil·lar entre els 15 mL i 7 L (Fig.R1.5B). Independentment del volum de la mostra, el cultius van ser viables. La viabilitat dels cultius va dependre de l'estat de la mostra, mai del seu volum inicial. Per tant, la mida de la mostra va ser un factor limitant per la viabilitat del cultiu només en aquelles que provenien de mostra tumoral sòlida, no de LASC.



**Figura R1.5. Pesos de les mostres tumorals (A) i volum de LASC (B) de les mostres processades per l'establiment de cultius primaris de CaOV.**

### 1.3.1.2 Diagnòstic anatomopatològic

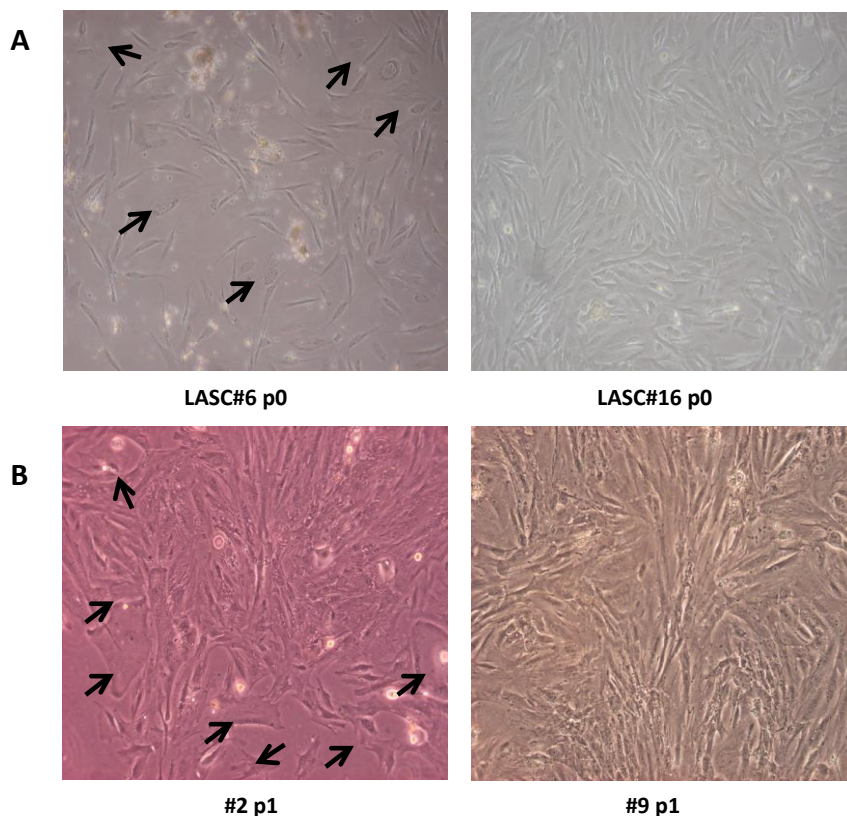
En alguns casos, es van rebre mostres que no corresponien a CaOV degut a que en el moment de prendre la mostra (amb la peça en fresc) encara no s'havia realitzat l'estudi histològic. Aquests tumors van resultar ser metàstasi d'ADK de colon, melanoma, càncer d'endometri, etc. Aquests teixits no van ser viables degut a que el medi i les condicions de cultius no van ser els adequats pel seu creixement. Això el que ratifica és que el medi de cultiu que es va usar era específic per CaOV, de manera que mostres procedents d'altres teixits no van ser viables.

### 1.3.1.3 Contaminació per cèl·lules mesenquimals: fibroblasts

Una de les problemàtiques més importants en l'establiment de cultius primaris de CaOV és la contaminació per fibroblasts. Tot i que els tumors són de cèl·lules epitelials, comunament contenen un component de cèl·lules de l'estroma (entre els quals hi ha els fibroblasts) que interactuen amb l'epiteli del tumor. En un gran nombre de mostres processades es va observar un alt percentatge de fibroblasts que contaminaven el cultiu; sobretot en mostres provinents del LASC, on hi havia cultius

amb 75% (LASC#6 p0) o fins a 100% (LASC#16 p0) de contaminació (Fig.R1.6A). En el conjunt de cèl·lules que es troben en els LASCs no només hi ha cèl·lules epitelials malignes, també hi abunden els limfòcits, macròfags, hematies, cèl·lules mesotelials i fibroblasts. En mostres tumorals, la presència de fibroblasts va ser menor que en mostres procedents de LASC, però també van haver mostres que van presentar alt percentatge: 75% (#2 p1) i 90 % (#9 p1) (Fig. R1.6B).

La presència de fibroblasts emascarava a les cèl·lules epitelials, el que dificultava l'experimentació amb dites mostres. Per tant, es va buscar un mètode d'eliminació de fibroblasts per enriquir els cultius primaris establerts i assegurar una bona experimentació amb cèl·lules epitelials del respectiu tumor.



**Figura R1.6.** Imatges representatives de cultius primaris de CaOV. Mostres provinents de LASC (A) i tumor sòlid (B) contaminats amb fibroblasts. Amb la flexa negra es mostren les cèl·lules epitelials: morfologia arrodonida i plana amb menor tendència a elongar-se i alinear-se formant matrius paral·leles; mentre que els fibroblasts presenten una morfologia allargada, amb polaritat anterior-posterior amb tendència a elongar-se i formar matrius paral·leles (10X).

### 1.3.1.4 Temps en cultiu: senescència i mort cel·lular

Algunes mostres tumorals, tant de tumor sòlid com de LASC, van presentar creixement molt lent, i van haver de romandre a l'incubador durant molts dies (fins a 30 dies). Les cèl·lules d'aquests cultius van acabar assolint una morfologia aplanada, típica de senescència, degut a que els cultius primaris no són línies cel·lulars immortalitzades, i després d'un nombre limitat de divisions acaben sent senescents (Fig.R1.7A). Altres cultius primaris que van romandre molt temps a l'incubador, les cèl·lules es desenganxaven de la placa i s'obtenia una morfologia rodona amb vacuolització citoplasmàtica, típica de mort cel·lular (Fig. R1.7B).

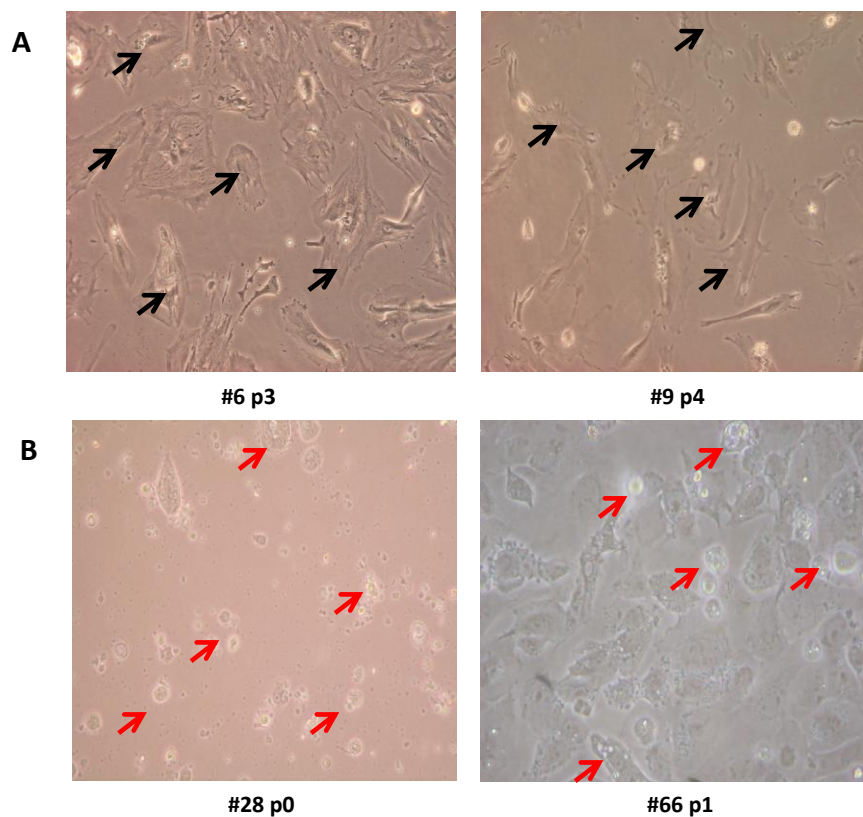


Figura R1.7. Imatges representatives de senescència cel·lular (A) i mort (B) dels cultius primaris de CaOV provinents de tumor sòlid. Amb la fletxa negra es mostren les cèl·lules senescents (A); amb la fletxa vermella, les cèl·lules mortes (B). A i B (imatges superiors i inferior esquerra) (10X); B (imatge inferior dreta) (20X).

### 1.3.1.5 Presència de teixit necròtic

En alguna ocasió les mostres de tumor sòlid van presentar necrosi macroscòpica. Per això, en aquells casos en què la mostra a processar presentava zones necròtiques, va ser necessari retirar aquestes zones abans de processar-la per

tal d'eliminar el màxim la presència de detritus cel·lulars i hematies que dificultaven la correcta progressió del cultiu.

### **1.3.2 Factors limitants independents de la mostra**

#### **1.3.2.1 Sobreinfecció del cultiu per bacteris o llevats**

Alguns cultius primaris van tenir un creixement molt lent (en algunes ocasions superior a 2 setmanes), pel què van requerir períodes molt llargs d'estada a l'incubador, fet que va augmentar la possibilitat de sobreinfecció.

#### **1.3.2.2 Problemes tècnics**

Els cultius primaris quan es van congelar es van emmagatzemar al congelador de -150°C. Es van tenir alguns problemes en aquest congelador degut a l'acabament de la bombona del CO<sub>2</sub>, que va generar augment de temperatura. Alguns primaris, degut als canvis de temperatura que van experimentar, van disminuir la viabilitat cel·lular.

## **1.4 Establiment de cultius primaris de CaOV a partir de mostres tumorals sòlides i LASCs**

### **1.4.1 Protocol per l'establiment dels cultius primaris de CaOV**

Els cultius primaris de CaOV es van establir a partir de mostra tumoral sòlida o de LASCs de pacients amb CaOV intervinguts en el Sevei de Ginecologia de l'HUB. Segons el tipus de mostra es va procedir a realitzar un protocol o altre.

#### **1.4.1.1 Protocol per l'establiment de cultius primaris de CaOV a partir de mostra tumoral sòlida**

Es va dur a terme un protocol de disgregació mecànica seguit d'un tractament enzimàtic per tal d'obtenir cèl·lules aïllades (veure apartat de Materials i Mètodes). El protocol que es va usar, es va anar modificant en relació als resultats obtinguts, amb l'objectiu d'optimitzar i millorar el rendiment dels cultius. Inicialment, es diposita la mostra en una placa de Petri i s'afegeix medi HSBB per a facilitar-ne la disgregació. Amb l'ajuda d'un bisturí i d'unes pinces i, amb molta cura, es disgrega el teixit de forma mecànica, intentant obtenir fragments d'una mida el més petita possible (~1-4

mm<sup>3</sup>). Es recull el medi amb els fragments i es dipositen en un falcon de 50 mL, on s'afegeix la col·lagenasa I (a una concentració final de 200 U/mL), per a procedir a la disgregació enzimàtica del teixit. En un primer moment, es va realitzar la disgregació enzimàtica amb col·lagenasa I i DNAsa, ambdues a la mateixa concentració; els resultats van demostrar que la DNAsa no era necessària per la disgregació enzimàtica, per la qual cosa es va deixar d'utilitzar. La mostra incubada amb col·lagenasa I, es deixa amb agitació suau durant 1 hora a 37°C. Al finalitzar el temps d'incubació, si es visualitza bona disgregació del teixit, es procedeix a centrifugar la mostra a 500 g durant 5 minuts, retirant el sobrenedant, i ressuspenent el *pellet* amb medi fresc MCDB/M199 (1:1) amb FBS al 10% i penicil·lina-estreptomicina a l'1%, seguit d'un nou rentat i centrifugació amb les mateixes condicions. Finalment, la mostra ja disgregada, es plaqueja amb medi fresc amb FBS al 10% i de penicil·lina-estreptomicina a l'1%, en un volum adequat en funció del nombre de plaques que es sembren (uns 200 mg de teixit per cada placa de 60 mm). La figura R1.8 mostra diverses imatges de l'aspecte dels cultius primaris establerts a partir de teixit tumoral sòlid. En tots ells s'hi observen cèl·lules epitelials, amb absència de fibroblasts. Les cèl·lules tenen tendència a formar botons o *clusters* (com en el cas dels cultius primaris #9 i #6); d'altres presenten una morfologia arrodonida amb tendència a formar una monocapa compacta (com és el cas dels cultius primaris #66 i #2); També hi ha cultius amb una morfologia cel·lular més allargada, amb polaritat anterior/posterior, similar a la morfologia dels fibroblasts (cultiu #49 i #35).

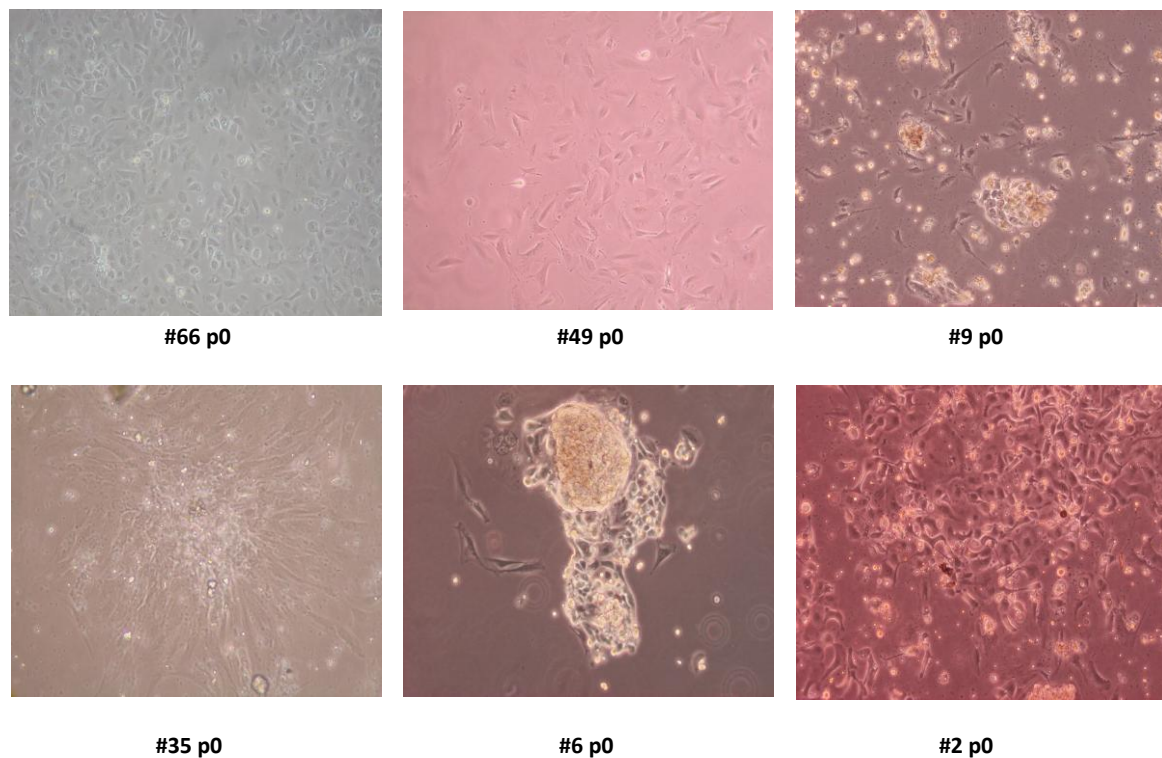


Figura R1.8. Cultius primaris establerts a partir de mostra tumoral sòlida (10X).

#### 1.4.1.2 Protocol per l'establiment de cultius primaris de CaOV a partir de LASC

A diferència de les mostres tumorals, el LASC es caracteritza perquè les cèl·lules de CaOV s'obtenen d'una suspensió, de forma aïllada o formant *clusters*, pel que no requereix d'una disgregació mecànica ni enzimàtica per a l'establiment del cultiu. La mostra de LASC es pot cultivar directament o a partir del *pellet*. Pel cultiu directe: es resuspen un volum de mostra amb el mateix volum de medi de cultiu fresc MCDB:M199 (1:1) amb FBS al 10% i penicil·lina-estreptomicina a l'1%. Un volum de 10 mL de LASC es transfereix directament a flascons de T-75 amb un volum equivalent (1:1) de medi complet. El nombre de flascons T-75 usats per mostra depèn del volum inicial d'aquesta. Els cultius primaris de LASC a partir de *pellet*: un volum de 50 mL es centrifuga a 300 g i el *pellet* es resuspen amb medi complet per plaquejar-lo en un flascó de T-75. No s'observen diferències en quan a creixement, viabilitat del cultiu i morfologia cel·lular entre els cultius establerts directament o a partir de *pellet*.

La figura R1.9 mostra diverses imatges de l'aspecte dels cultius primaris de mostra tumoral establerts a partir de LASC. En tots ells s'hi observen cèl·lules



epiteliais, amb absència de fibroblasts. Les cèl·lules presenten una morfologia arrodonida amb tendència a formar una monocapa compacta (com és el cas dels cultius primaris LASC#12, LASC#10, LASC#4 i LASC#3); Altres presenten una morfologia cel·lular més allargada, amb polaritat anterior/posterior, similar a la morfologia dels fibroblasts (com els cultius LASC#8 i LASC#15 ).

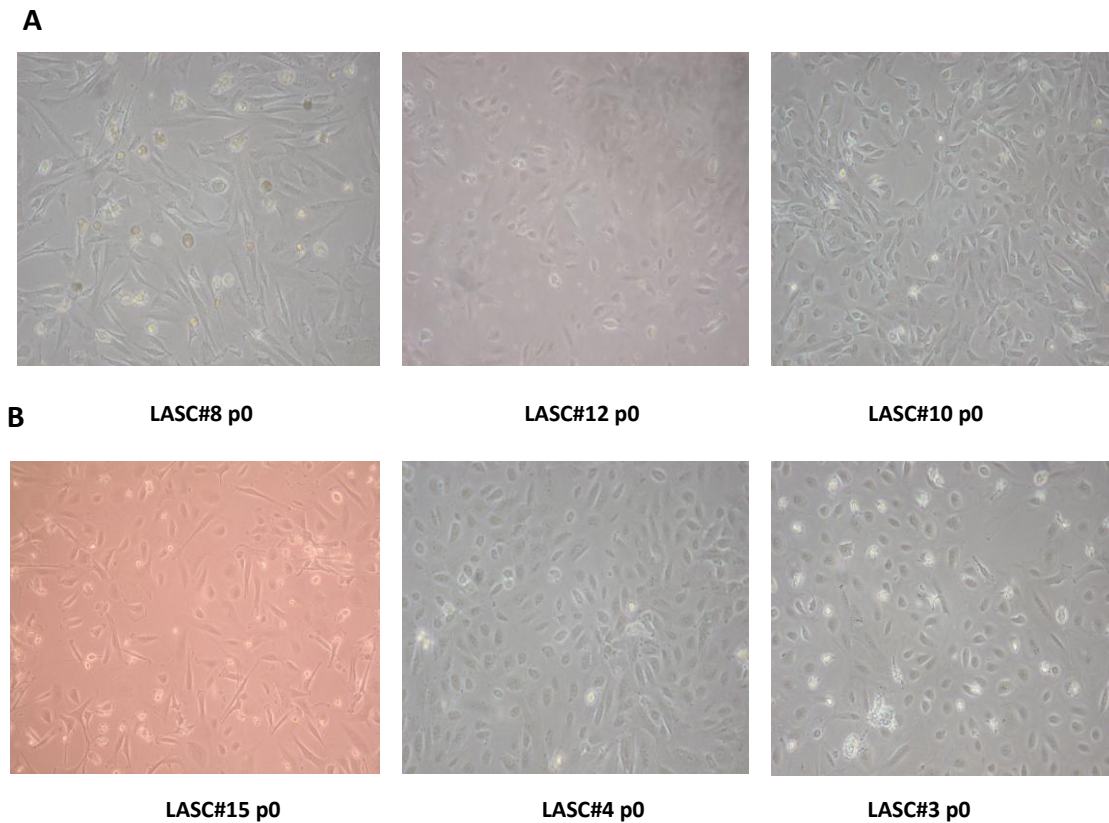


Figura R1.9. Cultius primaris establerts a partir de LASC : LASC directe (A) i a partir del *pellet* (B) (10X).

Tots els cultius primaris es van mantenir en un incubador amb atmòsfera humida, pressió parcial de CO<sub>2</sub> del 5% a una temperatura constant de 37°C.

Al dia següent, els primaris s'observaven al microscopi òptic, i normalment, després de 24 hores de plaqueig, algunes cèl·lules ja s'observaven adherides a la placa. Si el cultiu presentava molts eritròcits i detritus cel·lulars, es retirava el sobrenedant i s'afegia 100% de medi fresc, per evitar la dificultat d'observació i la possible reduïda viabilitat del cultiu primari. Tanmateix, si el cultiu primari presentava pocs eritròcits i detritus cel·lulars, s'afegia medi condicionat al 90%. A partir d'aquest

punt, la renovació parcial es va fer cada 2-3 dies amb medi condicionat (veure apartat 1.4.3.1).

Per eliminar els hematies dels cultius, no es va usar cap tampó de lisi, ja que les cèl·lules epitelials d'ovari de seguida s'adhereixen, mentre que els hematies queden flotant pel medi (Fig.R1.10). El medi MCDB/M199 usat per propagar les cèl·lules epitelials no permet el creixement de cèl·lules hematopoietiques i per tant, els hematies queden eliminats a mesura que es canvia de medi (Shepherd *et al.* 2006). La figura R1.10 mostra una imatge d'un cultiu primari als 4 dies després de la disgregació mecànica i enzimàtica del tumor, encara amb presència d'hematies. Es pot observar la formació de petits botons (*clusters*) de les cèl·lules als primers dies d'estar en cultiu.

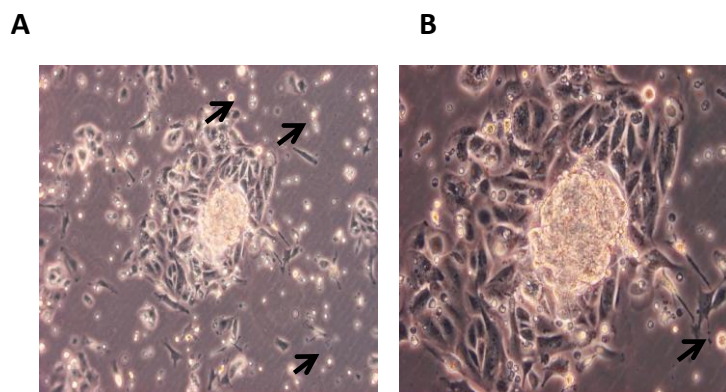


Figura R1.10. Formació de petits botons (*clusters*) 4 dies després de la disgregació mecànica i enzimàtica del cultiu primari #16p0 procedent de mostra tumoral sòlida. Presència d'hematies (marcats amb una fletxa) 10X (A) i 20X (B).

## 1.4.2 Morfologia dels cultius primaris

En els cultius primaris establerts es va observar que diferien uns dels altres en la morfologia cel·lular; es van observar cèl·lules de diferent mida, complexitat i morfologia. En alguns casos les cèl·lules recordaven els fibroblasts estromals, amb morfologia allargada i amb polaritat. Aquesta morfologia és típica dels cultius primaris de CaOV i és anomenada *fibroblast-like*: morfologia fibroblàstica, amb reduïda adhesió intercel·lular i polaritat anterior/posterior, però es diferencien dels fibroblasts estromals a que tenen menor tendència a elongar-se i alinear-se formant matrius paral·leles (Fig.R1.11A). Una altra morfologia típica dels cultius primaris de CaOV és la

que s'anomena monocapa epitelial de cèl·lules aplanades i grans (*epithelial monolayer of flattened large cells*) i té similituds al mesoteli extraovàric (Fig.R1.11B). Per últim, els cultius primaris de CaOV poden presentar una monocapa més compacta, la qual s'anomena monocapa epitelial compacta o *cobblestone*, la morfologia de la qual és més similar a la superfície de l'epiteli de l'ovari *in vivo* (Fig.R1.11C) (Auersperg *et al.* 1994).

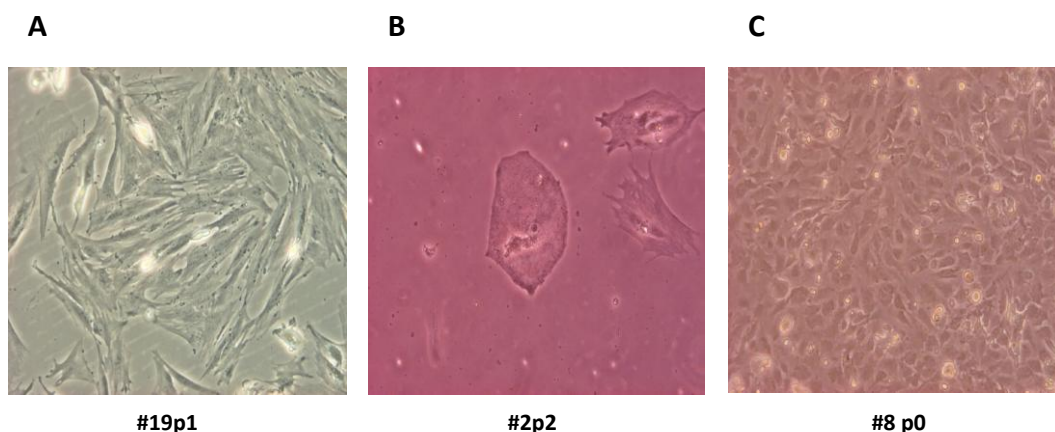


Figura R1.11. Morfologies típiques dels cultius primaris de CaOV: #19p1: *Fibroblast-like* (A) #2p2; Monocapa epitelial aplanada o *Flattened large cells* (B) ; LASC#16 p2: monocapa epitelial compacta o *cobblestone* (C). A i C (10X); B (20X).

### 1.4.3 Manteniment i criopreservació dels cultius primaris

#### 1.4.3.1 Renovació del medi de cultiu: Medi condicionat

L'adherència i el creixement de les cèl·lules es va monitoritzar periòdicament mitjançant el microscopi. Pel manteniment cel·lular es va renovar el medi cada 2- 3 dies amb medi condicionat. Aquest es va utilitzar per tal d'evitar la pèrdua dels factors de creixement i hormones que les pròpies cèl·lules en cultiu sintetitzen i excreten al medi, i que són necessaris pel bon creixement. El medi condicionat consisteix en afegir al medi fresc (MCDB105/M199) un volum de medi que ja ha estat en cultiu. Quan es fa un canvi de medi, aquest es retira de la placa, es centrifuga i el sobrenedant, que és el que conté les hormones i factors de creixement, es filtra amb una malla de 0,70  $\mu\text{M}$  i es mescla amb un volum de medi fresc (MCDB105/M199), el qual varia en funció del temps que té el cultiu i la confluència d'aquest. Quan els cultius primaris estan poc

confluents, el medi condicionat es fa del 90% (90% sobrenedant en 10% de medi fresc), i a mesura que augmenta la confluència cel·lular disminueix el percentatge de medi condicionat, anant del 70% al 10% (aquest últim quan la confluència del cultiu és del 90%).

#### **1.4.3.2 Eliminació dels fibroblasts en els cultius primaris de CaOV**

Com ja s'ha esmentat, una de les problemàtiques dels cultius primaris de CaOV és la presència dels fibroblasts a la mostra i el creixement d'aquests a la placa de cultiu emascarant les cèl·lules epitelials. La contaminació dels cultius primaris de CaOV amb fibroblasts és un factor limitant que perjudica l'estudi amb els cultius primaris. Pel bon manteniment dels cultius i perquè les cèl·lules epitelials creïessin sense presència de fibroblasts, es van portar a terme diferents protocols per eliminar-los del cultiu. A continuació, es mostren els protocols que es van realitzar i l'èxit que es va obtenir amb cadascun d'ells. El primer protocol es basa en l'eliminació dels fibroblasts mitjançant la incubació de les cèl·lules del cultiu amb un anticòs que reconeix els fibroblasts, el qual hi té un efecte citotòxic amb presència de proteïnes de complement. El segon protocol es basa en realitzar un seguit de tripsinitzacions a temps curts (tripsinització selectiva) que permeten específicament desenganxar els fibroblasts de la placa, mantenint-se adherides les cèl·lules epitelials.

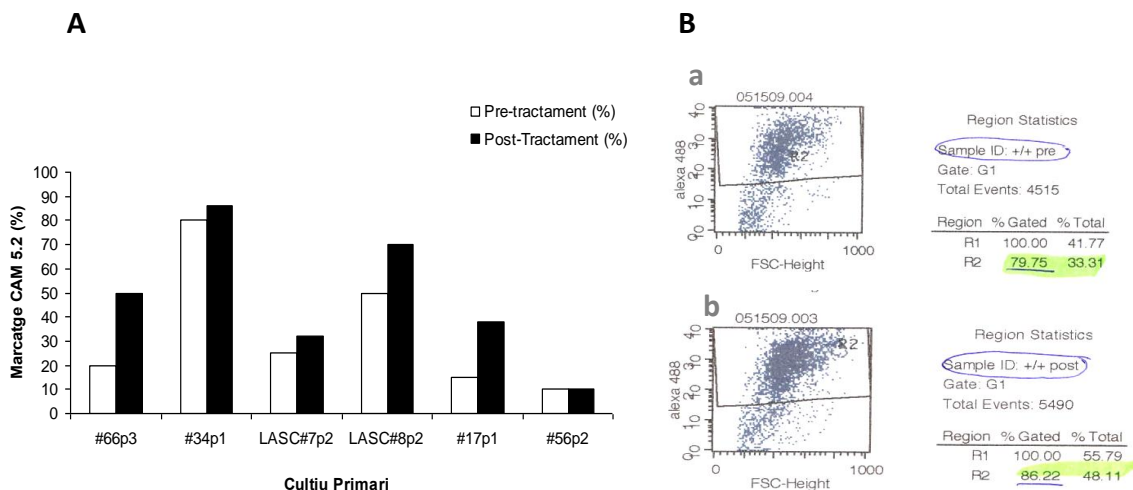
- **Ús de l'anticòs 1B10 (*Anti-Fibroblast Surface Protein*).**

Per l'eliminació dels fibroblasts dels cultius primaris de CaOV es va usar l'anticòs murí monoclonal IgM 1B10, específic i citotòxic que reconeix una proteïna de la superfície dels fibroblasts, absent a cèl·lules epitelials i limfòcits humans. L'anticòs s'uneix a la superfície dels fibroblasts humans i amb presència de proteïnes de complement, les fixa i es desencadena la cascada bioquímica fins a formar el complex d'atac de membrana, el qual acabarà matant als fibroblasts. Per l'eliminació dels fibroblasts d'un cultiu epitelial és essencial incubar l'anticòs amb sèrum de conill, el qual posseeix les proteïnes de complement necessàries per lisar el fibroblast. El protocol es pot realitzar amb cèl·lules adherides o en suspensió (veure apartat 1.4.1 de Materials i Mètodes).

Aquest protocol es va realitzar a cultius primaris de diferents passes cel·lulars provinents de mostres tumorals sòlides o de LASCs, amb diferent percentatge de partida de fibroblasts. Per comprovar que l'eliminació dels fibroblasts s'havia dut a terme exitosament, es va determinar el percentatge de cèl·lules epitelials en el cultiu abans (pre-tractament) i després (post-tractament) del tractament amb l'anticòs 1B10. La determinació de cèl·lules epitelials es va realitzar mitjançant l'anticòs CAM 5.2, anticòs que permet el reconeixement de cèl·lules epitelials dels cultius primaris de CaOV. Per a l'anàlisi del marcatge per CAM 5.2 es van realitzar dues metodologies: per les cèl·lules adherides es va realitzar immunofluorescència, amb l'observació i contatge de mostres mitjançant microscopia confocal; per les cèl·lules en suspensió es va realitzar immunofluorescència, la quantificació de la qual es va realitzar mitjançant citometria de flux. D'aquesta manera es va poder determinar la població de cèl·lules marcades per CAM5.2 de la mostra, coneixent el percentatge de cèl·lules epitelials del cultiu primari analitzat.

Es van escullir cultius primaris a l'atzar, cadascun d'ells amb una proporció determinada de cèl·lules epitelials abans del tractament amb l'anticòs. Abans de tractar-los amb l'anticòs, es va determinar el percentatge de cèl·lules epitelials de cadascun d'ell. Els que van presentar un major percentatge en cèl·lules epitelials van ser: #34p1 (80%) i LASC#8p0 (50%). Els de menor percentatge van ser: #56p2 (10%), #17p1 (15%), #66p3 i LASC#7p2 (20%) (Fig.R1.12A). La mitjana del percentatge de cèl·lules epitelials de tots els cultius primaris abans del tractament va ser del  $33\% \pm 26$ . Una vegada realitzat el protocol amb l'anticòs, es va tornar a determinar el percentatge de cèl·lules epitelials de tots els cultius en el post-tractament, la mitjana del qual va ser del  $48\% \pm 27$  (Fig.R1.12A). Els cultius que més es van enriquir en cèl·lules epitelials amb el protocol amb 1B10 van ser: #66 (30% enriquiment), #17p1 (23%) i LASC#8p2 (20%). Mentre que altres es van enriquir lleugerament: LASC#7p2 (7%) i #34p1 (6%) (Fig.R1.12A). Comparant les mitjanes de cèl·lules epitelials de tots els cultius en el pre i post- tractament amb l'anticòs, l'augment mitjà de cèl·lules epitelials va ser del 15%, el qual no va ser estadísticament significatiu ( $p=0,42$ ).

La figura R1.12B mostra el marcatge de CAM 5.2 mitjançant immunofluorescència i anàlisi per citometria de flux del primari #34p1 abans i després del tractament amb l'anticòs 1B10. La imatge mostra com en el pre-tractament la població de cèl·lules marcades amb CAM 5.2 (R2) és del 79,95%, i en el post-tractament del 86,22%. En aquest cultiu la incubació amb 1B10 només va enriquir-lo en cèl·lules epitelials un 6%.



**Figura R1.12. Tractament amb l'anticòs 1B10. Percentatge de cèl·lules epitelials segons el marcatge amb CAM 5.2 dels cultius primaris de CaOV abans i després de ser tractats amb l'anticòs 1B10, on l'anàlisi del marcatge es va determinar mitjançant microscopia confocal o bé citometria de flux (A). Exemple de la determinació del percentatge de cèl·lules epitelials mitjançant el marcatge amb CAM 5.2 i l'anàlisi per citòmetre de flux: percentatge de cèl·lules epitelials del cultiu primari #34p1 abans (a) i després (b) del tractament amb anticòs 1B10 (B).**

Observats els resultats, es va determinar que el protocol per a l'eliminació de fibroblasts mitjançant l'anticòs 1B10 no era exitós pels cultius primaris de CaOV.

- **Mitjançant tripsinització selectiva**

La tripsinització selectiva és una tècnica que permet eliminar la majoria dels fibroblasts del medi de cultiu. Aquests es desenganxen de la placa ràpidament, després de tripsinitzar durant un temps curt (< 2 minuts) amb tripsina-EDTA al 0,25%, sense que les cèl·lules epitelials es desenganxin de la placa. Per la realització d'aquesta tècnica, es va afegir el volum necessari de tripsina i es va incubar a 37°C durant exactament 30 segons. Seguidament, es va retirar la placa de l'incubador, i durant 30 segons més es va colpejar diverses vegades a temperatura ambient, de

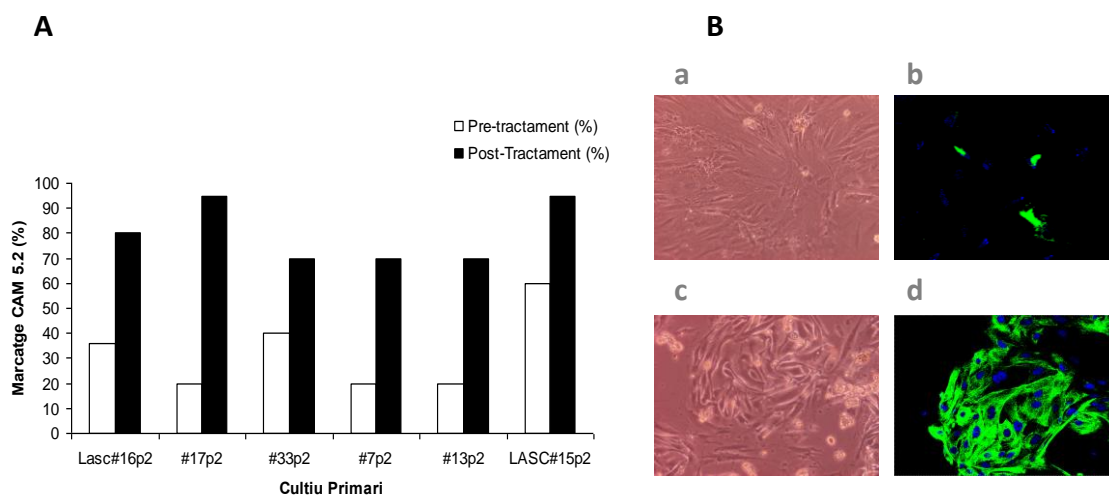
manera que les primeres cèl·lules que es desenganxaven de la placa eren els fibroblasts, mentre que les cèl·lules epitelials hi quedaven adherides.

Aquest protocol es va realitzar a cultius primaris diferents dels analitzats i tractats amb l'anticòs 1B10 (només va coincidir el cultiu primari #17, amb un passe més alt). Els cultius primaris eren provinents de mostres tumorals o de LASCs, i amb diferent percentatge de partida de fibroblasts. Per comprovar que l'eliminació dels fibroblasts s'havia dut a terme, es va determinar el percentatge de cèl·lules epitelials en el cultiu, abans (pre-tractament) i després (post-tractament) durant una setmana de tractament amb tripsinització selectiva, cada dos dies. La determinació de cèl·lules epitelials es va realitzar mitjançant immunofluorescència per cèl·lules adherides amb l'anticòs CAM 5.2, l'anàlisi del qual es va realitzar mitjançant microscopia confocal.

Dels cultius primaris analitzats, es va observar que cadascun d'ells presentava una proporció determinada de cèl·lules epitelials abans de la tripsinització selectiva. Els que van presentar un major percentatge en cèl·lules epitelials van ser: LASC#15p2 (60%), #33p2 (40%) i LASC#16p2 (36%). Els de menor percentatge van ser: #17p2 (20%), #7p2 (20%) i #13p2 (20%) (Fig.R1.13A). La mitjana del percentatge de cèl·lules epitelials de tots els cultius primaris abans del tractament va ser del  $30\% \pm 16$ , valor similar al percentatge de cèl·lules epitelials dels cultius primaris abans del tractament amb 1B10 (Fig.R1.12), el què indicava que en general, tots els cultius primaris obtenen una mitjana al voltant del 30% de cèl·lules epitelials de partida. Una vegada realitzat el protocol amb la tripsinització selectiva, es va tornar a determinar el percentatge de cèl·lules epitelials de tots els cultius en el post-tractament, la mitjana del qual va ser del  $80\% \pm 12$ . (Fig.R1.13A). Tots els cultius tractats amb tripsinització selectiva es van enriquir en cèl·lules epitelials: #17p2 (75% d'enriquiment), #7p2 i #13p2 (50%), LASC#16p2 (44%), LASC#15p2 (35%) i #33p2 (30%). Comparant les mitjanes de cèl·lules epitelials de tots els cultius en el pre i post-tractament amb el protocol, l'augment mitjà de cèl·lules epitelials va ser del 50%, el qual va ser estadísticament significatiu ( $p=0,0002$ ). Cal observar que el cultiu #17, amb poques cèl·lules epitelials de partida (15-20%), va enriquir-se un 23% amb l'anticòs 1B10, mentre que va enriquir-se un 75% amb la tripsinització selectiva.

Per tant, aquest protocol per a l'eliminació de fibroblasts mitjançant tripsinització selectiva va tenir èxit i va ser usat en tots els cultius primaris que posteriorment es van utilitzar per realitzar els posteriors experiments.

La figura R1.13B mostra el marcatge de CAM 5.2 mitjançant immunofluorescència i anàlisi per confocal del cultiu primari #7p2 abans i després de la tripsinització selectiva. Observant el cultiu en el microscopi òptic abans del tractament, es va observar una morfologia cel·lular allargada típica dels fibroblasts, i la imatge del confocal presentava poc marcatge verd (CAM 5.2) i molts nuclis, fet que indicava que hi havia molts fibroblasts i poques cèl·lules epitelials. Després de la tripsinització selectiva es va observar pel microscopi òptic una morfologia cel·lular epitelial, amb formació de *clusters*; i les imatges del confocal van confirmar que es tractava de cèl·lules epitelials (molt marcatge de CAM 5.2, verd). Per tant, la tripsinització selectiva estava eliminant els fibroblasts que es trobaven inicialment al cultiu primari.



**Figura R1.13.** Enriquiment de cèl·lules epitelials dels cultius primaris mitjançant la tripsinització selectiva. Percentatge de cèl·lules epitelials segons el marcatge amb CAM 5.2 dels cultius primaris de CaOV abans i després de ser tractats amb la tripsinització selectiva, l'anàlisi es va realitzar mitjançant microscopia confocal (A). Exemple de la determinació del percentatge de cèl·lules epitelials mitjançant el marcatge amb CAM 5.2 i l'anàlisi per confocal (B): Fotografies per microscopi òptic: a (10X) i c (20X); confocal: b i d (63X) del cultiu primari #7p2 on es mostra la riquesa de cèl·lules epitelials en el Pre- (a-b) i Post-Tractament (c-d) mitjançant l'observació de la morfologia cel·lular (a-c: microscopi òptic) i el marcatge amb CAM 5.2 (b-d: microscopi confocal). Les cèl·lules amb marcatge verd corresponen a les cèl·lules epitelials; en blau els nuclis cel·lulars (les cèl·lules o nuclis en blau no marcadats per CAM 5.2 es consideren fibroblasts del cultiu).

Després de la tripsinització selectiva, tots els primaris procedents de LASC es van analitzar mitjançant immunofluorescència amb l'anticòs Calretinina (específic de



mesoteli) per verificar que no hi hagués contaminació per part de cèl·lules mesotelials, ja que l'anticòs CAM 5.2 no distingeix entre cèl·lules de l'epiteli i mesotelials. Els resultats van demostrar que la majoria dels cultius procedents de LASC després de la tripsinització selectiva, donaven negatiu per Calretinina (Fig.R1.14). Es va concloure que per determinar la riquesa de cultius primaris, el marcatge amb CAM 5.2 ja era suficient.

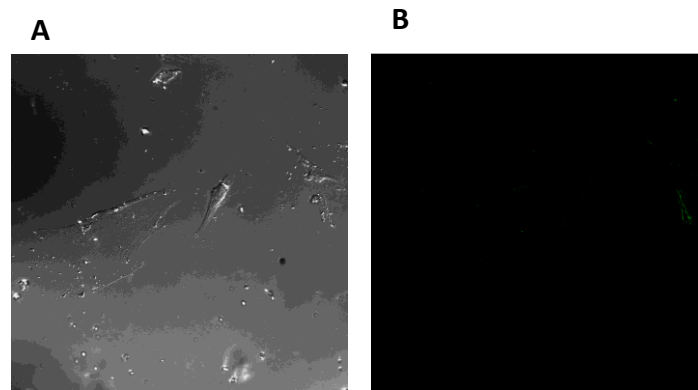


Figura R1.14. Immunofluorescència amb l'anticòs Calretinina. Determinació de la presència de cèl·lules mesotelials del cultiu primari LASC#6p0 després de la tripsinització selectiva. Fotografies per confocal (63X). Camp clar on s'observen les cèl·lules del camp (A); Marcatge de cèl·lules amb Calretinina (B) (verd).

#### 1.4.3.3 Criopreservació dels cultius primaris

Quan la confluència del cultiu primari va ser del 80-90% de densitat cel·lular, es van transferir les cèl·lules a plaques o flascons d'una mida superior amb l'ajuda de tripsina o *cell scraper*. Es contaven les cèl·lules viables amb una cambra de Neubauer i si el nombre era suficient (al voltant d'un milió) es passaven la meitat a una placa nova, i amb l'altra meitat es realitzava un *stock* per congelar (FBS al 90% i DMSO al 10%), que ens assegurava el poder treballar amb els cultius més endavant. Els cultius primaris eren congelats a passes baixes (0-4) amb l'objectiu d'evitar que la transferència cel·lular d'una placa a una altra induís l'adquisició de noves alteracions genètiques que modifiquessin el comportament del cultiu inicial.

La viabilitat cel·lular després de la descongelació va ser al voltant del 80-90%. El creixement dels cultius descongelats no es veia afectat en quan al ritme de divisió cel·lular i morfologia, que sempre va ser la mateixa que la prèvia congelació. La figura R1.15 mostra dues imatges del mateix cultiu abans i després del procés de congelació, on s'hi observa que la morfologia cel·lular no s'altera.

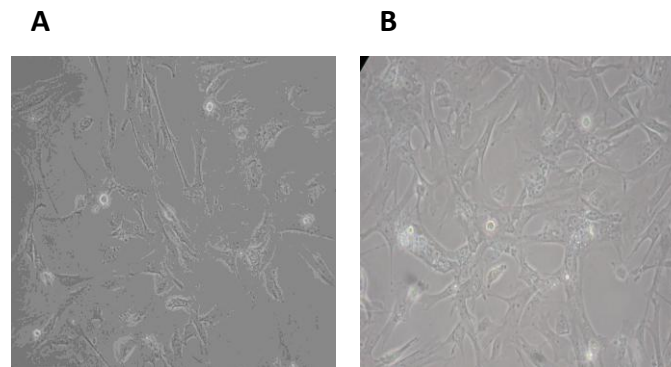


Figura R1.15. Èxit del procés de congelació. Aspecte cel·lular del cultiu primari #34 abans (A) i després (B) de la congelació (10X).

## 1.4.4 Caracterització dels cultius primaris

### 1.4.4.1 Caracterització mitjançant immunofluorescència

Com ja s'ha descrit anteriorment, una de les limitacions dels cultius primaris de CaOV és la contaminació per fibroblasts. Anteriorment s'han esmentat les tècniques usades per a l'eliminació d'aquests, sent la tripsinització selectiva la més efectiva (veure apartat 1.4.3.2). Quan es treballa amb cultius primaris és essencial la seva caracterització per assegurar la riquesa en cèl·lules epitelials.

- **Marcador CAM 5.2**

Per una millor caracterització dels cultius primaris, es van realitzar estudis d'immunofluorescència utilitzant un marcador específic de cèl·lules epitelials: CAM 5.2.

Per les cèl·lules adherides, es van usar cobreobjectes rodons que es van posar dins de les plaques on es plaquejaven els cultius primaris. Quan les cèl·lules van créixer, es va procedir a realitzar la immunofluorescència amb CAM 5.2, el marcatge del qual es va analitzar mitjançant observació amb el confocal. Les cèl·lules epitelials es van marcar de color verd (marcatge per CAM 5.2), mentre que les cèl·lules no epitelials no quedaven marcades i només s'observava el marcatge dels nuclis (color blau) (Fig.1.12 B). Per obtenir el percentatge de cèl·lules epitelials del cultiu primari, es va realitzar el comptatge de cèl·lules marcades per CAM 5.2 respecte el número total de cèl·lules que tenia el cultiu mitjançant el comptatge de diferents camps (6 camps com a mínim).

També es va realitzar la immunofluorescència per CAM 5.2 en cèl·lules amb suspensió, i es va analitzar per citometria de flux. Aquest anàlisi permet diferenciar les poblacions de cèl·lules marcades i no marcades per CAM 5.2, donant els resultats en percentatges de cèl·lules marcades per CAM 5.2 (epiteliais) (Fig.R1.12B).

Tots els cultius primaris que es van usar pels experiments, estaven prèviament caracteritzats. Es va realitzar immunofluorescència per CAM 5.2, majoritàriament per cèl·lules adherides, i es va analitzar pel confocal, obtenint el percentatge de cèl·lules epiteliais del cultiu. Els primaris caracteritzats per usar en els experiments van presentar una mitjana de marcatge de les cèl·lules epiteliais (CAM 5.2) del 85-90%. La majoria d'ells presentaven un marcatge igual o superior al 70%, exceptuant els cultius #40p3, #29p1 i #57p1, els quals van presentar un percentatge de 0%, 36% i 50%, respectivament. Aquests no es van usar per la realització de posteriors experiments (Fig.R1.16).

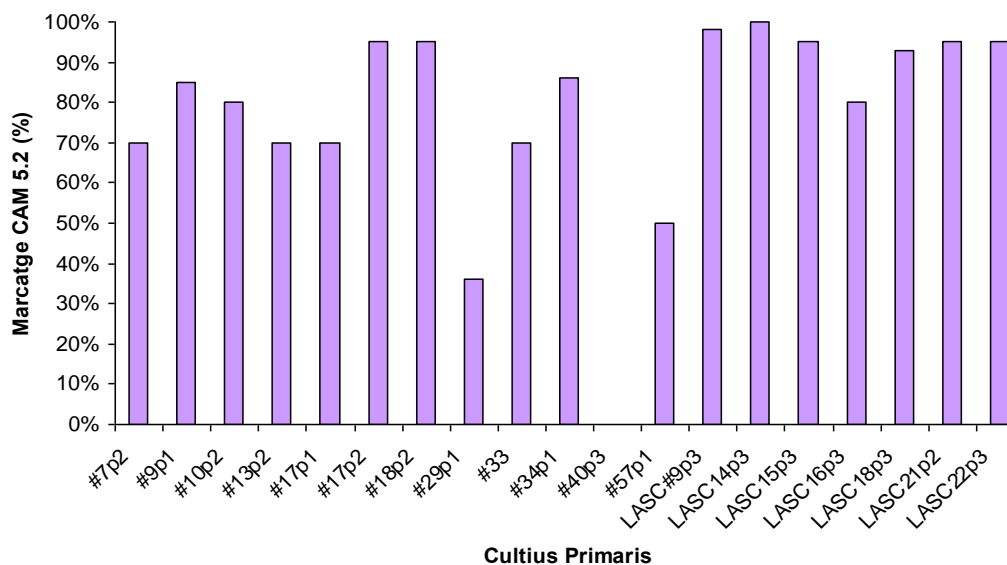


Figura R1.16. Caracterització dels cultius primaris amb CAM 5.2. Marcatge dels cultius primaris de CaOV amb CAM 5.2 i anàlisi per confocal després d'eliminar els fibroblasts amb tripsinització selectiva.

La figura R1.17 mostra les imatges de cultius altament contaminats per fibroblasts, i imatges d'uns cultius rics en cèl·lules epiteliais. En els cultius contaminats, la morfologia cel·lular és allargada amb polaritat anterior/posterior típica dels fibroblasts. Les imatges per confocal confirmen l'absència de cèl·lules epiteliais, amb poc o gens marcatge de CAM 5.2, i amb bon marcatge de nuclis

(fibroblasts). Els cultius rics en cèl·lules epitelials presenten una morfologia cel·lular *fibroblast-like* o *cobblestone*, típica de cèl·lules epitelials. Les imatges per confocal confirmen l'absència de fibroblasts pel total marcatge amb CAM 5.2.

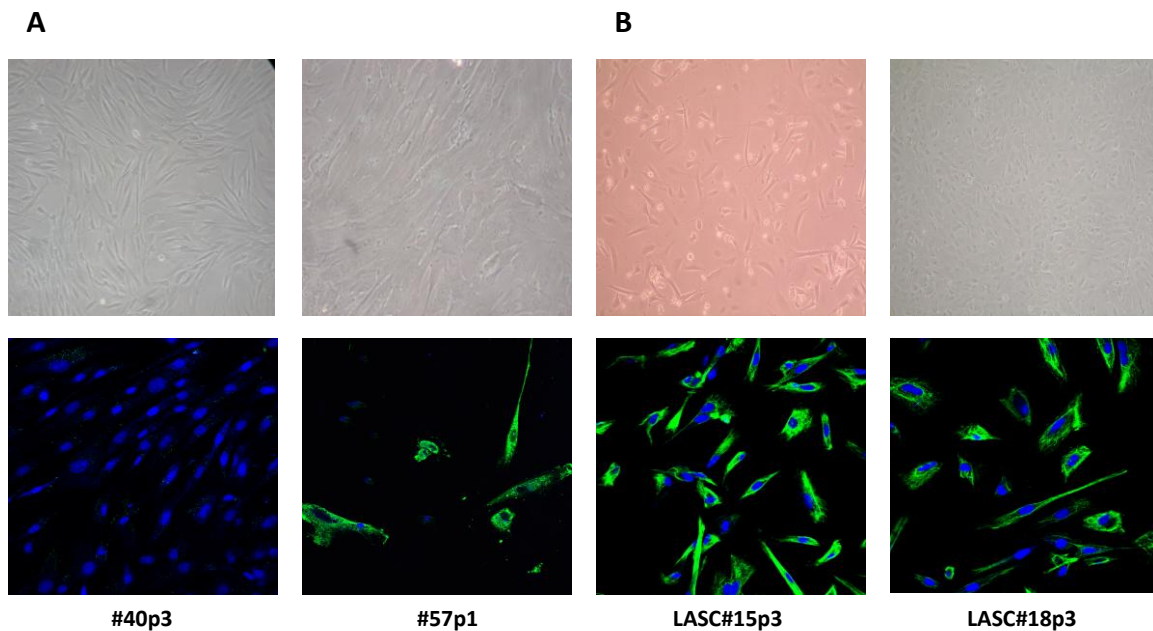


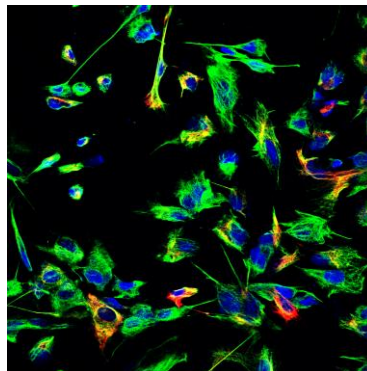
Figura R1.17. Caracterització dels cultius primaris. Fotografies per microscopi òptic (10x) i confocal (63x) de cultius primaris #40p3 i #57p1 cultius altament contaminats amb fibroblasts (A). LASC#15p3 i LASC#18p3 cultius rics en cèl·lules epitelials (B). Observació de la riquesa en cèl·lules epitelials mitjançant l'observació de la morfologia cel·lular (microscopi òptic) (10X) i mitjançant el marcatge de CAM 5.2 (confocal) (63X). Les cèl·lules amb marcatge verd corresponen a cèl·lules epitelials; en blau els nuclis cel·lulars (les cèl·lules o nuclis en blau no marcades per CAM 5.2 es consideren fibroblasts del cultiu).

- **Altres marcadors: Calretinina, Vimentina i Citoqueratina 7**

En un principi es van usar altres marcadors que també es detectaven mitjançant la tècnica d'immunofluorescència: la Calretinina (que marca les cèl·lules mesotelials), la Vimentina (per detectar cèl·lules mesenquimals com els fibroblasts), i la Citoqueratina (CK), CK7 (per detectar cèl·lules epitelials). Amb l'experiència es va observar que CAM 5.2, era bon marcador i suficient per detectar les cèl·lules epitelials dels cultius primaris. En l'adult, les CKs es troben exclusivament a les cèl·lules epitelials, i la seva expressió varia segons el tipus d'epiteli; expressant-se a l'ovari: CK7, CK8, CK18 i CK19. L'anticòs monoclonal CAM 5.2 és específic per la CK8 i en menor mesura per la CK7, per tant, és bon marcador de cèl·lula epitelial que permet la detecció de carcinomes i distingir-los d'altres tumors malignes que no tenen origen epitelial com ara els limfomes, melanomes i sarcomes. A més, no reconeix cèl·lules

mesenquimals com els fibroblasts, fet que permet saber si el cultiu primari està contaminat per aquest tipus cel·lular.

El marcador Vimentina es va usar en un principi per a marcar els fibroblasts. La Vimentina està present a cèl·lules d'origen mesenquimàtic (fibroblasts, adipòcits, condròcits, osteòcits, en múscul llis i estriat). En algunes mostres es va realitzar doble marcatge per immunofluorescència pels marcadors CAM 5.2 i Vimentina, i es va observar que algunes cèl·lules coexpressaven ambdós marcadors, així que algunes cèl·lules epitelials estaven expressant Vimentina (Fig.R1.18). Està descrit que en CaOV la Vimentina es coexpressa amb les CKs un 71% en els carcinomes endometrioides, un 42% en els carcinomes serosos, i 7% en cèl·lules clares, mentre que els mucinosos només són positius per CKs (Dabbs & Geisinger 1988). Per tant, es va deixar d'usar la Vimentina com a marcador específic de fibroblasts, ja que també detectava a les cèl·lules epitelials.



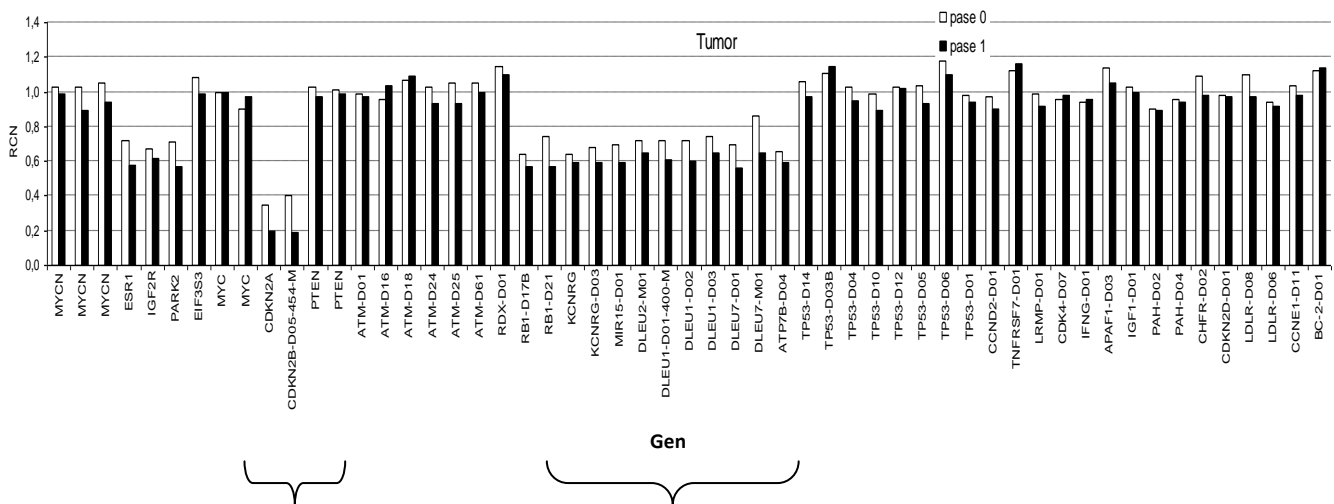
**Figura R1.18. Doble immunofluorescència amb CAM 5.2 i Vimentina. Caracterització del cultiu primari endometrioides #34 mitjançant el marcatge de CAM 5.2 (verd) i Vimentina (vermell). Fotografies del microscopi confocal (63X).**

Com a conclusió, es va decidir usar només el marcador CAM 5.2, suficient i específic per a marcar les cèl·lules epitelials dels cultius primaris.

### 1.4.4.2 Caracterització gènica mitjançant MLPA

Un dels mètodes per caracteritzar gènicament els cultius primaris va ser mitjançant l'anàlisi molecular, analitzant l'expressió de diferents gens mitjançant *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA). Les possibles mutacions presents en els gens del tumor original s'haurien de mantenir en el cultiu primari si aquest fos ric en cèl·lules epitelials, mentre que amb presència de fibroblasts al cultiu, no es mantindria el mateix patró gènic, ja que els fibroblasts no presenten el genotip de la cèl·lula epitelial tumoral.

Es va analitzar el DNA genòmic tant del tumor original #7 (serós postquímio, estadi III) com del primari establert del cultiu (#7p1). Les mutacions (delecions) observades en els gens del tumor original, també van aparèixer en el cultiu primari (Fig.R1.19), fet que indicava que les cèl·lules que abundaven en el cultiu primari establert, eren epitelials que derivaven del tumor original. No es va veure expressió diferencial de gens entre el tumor original i el cultiu primari, fet que evidenciava l'absència de fibroblasts.



**Figura R1.19. Caracterització gènica dels cultius primaris. Caracterització del cultiu primari #7 mitjançant MLPA: anàlisi de l'expressió gènica del tumor original i del cultiu primari derivat. Amb claudàtor s'assenyalen les mutacions (delecions) dels gens.**



## Objectiu 2. Efecte de la Nutlina-3a (Nut3a) en línies cel·lulars i cultius primaris de CaOV

### 2.1 Introducció

El gen supressor TP53 codifica per la proteïna p53 que regula la resposta a l'estrés produït per diferents estímuls com el trencament de DNA, radiacions UV, agents tòxics o activitat oncogènica. Enfront a aquestes situacions, p53 actua activant mecanismes d'aturada de cicle cel·lular i reparació, i si el dany és massa gran per ser reparat, indueix apoptosi o senescència a través d'una xarxa de vies de transducció de senyals anomenada via de p53.

Les Nutlines (anàleg de la cis-imidazolina) són inhibidors potents i selectius de Mdm2 (Vassilev *et al* 2004), que han mostrat ser capaces d'activar la via de p53 tant *in vitro* com *in vivo*, oferint una prova d'utilitat terapèutica en tumors amb p53 salvatge. Les nutlines activen a p53 alliberant-la del control negatiu que exerceix Mdm2, compensant així els defectes que pot haver per sobre de la via de p53.

### 2.2 Efecte de la Nut3a en línies cel·lulars

#### 2.2.1 Disminució de viabilitat i aturada de cicle cel·lular a G2/M

Per conèixer l'efecte de la Nut3a a la quimiosensibilització del CDDP en línies de CaOV, es van usar línies de carcinoma d'ovari humà: A2780p (sensible al CDDP) i A2780cis (resistent al CDDP), ambdues salvatges per TP53. També es va usar la línia cel·lular OV90 (sensible al CDDP) amb p53 no funcional com a conseqüència d'una mutació puntual al codó 215 de l'exó 6 (A→C: Ser→Arg), aquesta línia es va usar com a control negatiu del tractament amb Nut3a.

Per determinar el temps d'incubació i les dosis de CDDP i Nut3a que generaven disminució de viabilitat cel·lular, es va tractar la línia cel·lular A2780p a dosis creixents de CDDP i Nut3a a diferents temps. Les línies cel·lulars A2780p es van plaquejar en plaques de 96 pous i a les 24 hores, quan la confluència va ser del 60%, es va procedir a realitzar els tractaments: es va tractar amb dosis creixents de CDDP (de 0 a 20 µM),



o amb dosis creixents de Nut3a (de 0 a 10  $\mu\text{M}$ ) durant un període de temps de 24 a 96 hores. La metodologia usada per avaluar la resposta als tractaments va ser l'assaig de viabilitat cel·lular per MTT. Les cèl·lules a dosis de 0  $\mu\text{M}$  es van incubar amb aigua destil·lada (pel CDDP) i DMSO (per la Nut3a).

El temps d'incubació que va mostrar una disminució del creixement cel·lular del 50% va ser entre les 48 i 72 hores amb el tractament amb CDDP, i 72 hores amb el tractament amb Nut3a (Fig.R2.1A i B). Les cèl·lules presentaven una morfologia arrodonida, vacuolització citoplasmàtica i amb tendència a desenganxar-se de la placa (dades no mostrades), morfologia típica de mort per apoptosi. Tanmateix, les cèl·lules incubades 96 hores van mostrar un estat necròtic quan es van observar en el microscopi (dades no mostrades).

Per ambdós tractaments, el temps d'incubació de 72 hores va suposar una disminució de viabilitat més progressiva i dosi-dependent, amb unes cèl·lules amb morfologia típica d'apoptosi, sense aparèixer cèl·lules en estat necròtic. Per això es va procedir a tractar les tres línies amb dosis creixents de CDDP (0 a 20  $\mu\text{M}$ ) i Nut3a (0 a 10  $\mu\text{M}$ ) durant 72 hores i es va procedir a analitzar la viabilitat mitjançant l'assaig de MTT.

El tractament amb CDDP va generar disminució de viabilitat a dosis baixes a les línies sensibles A2780p i OV90 de forma progressiva i dosi-dependent, mentre que la línia cel·lular resistent A2780cis va mostrar una alta viabilitat a totes les dosis, confirmant-se la resistència d'aquesta línia pel CDDP. La  $\text{IC}_{50}$  pel CDDP a 72 hores per les línies A2780p i OV90 va ser de 3.5  $\mu\text{M}$  (Fig.R2.1C). Amb el tractament amb Nut3a, es va observar una disminució de viabilitat de les línies p53 salvatges A2780p i A2780cis, mentre que la línia OV90 no va disminuir la viabilitat en cap de les dosis, confirmant-se la resistència d'aquesta línia a la Nut3a, donat que és mutada per p53. La  $\text{IC}_{50}$  per la Nut3a a les 72 hores per les línies A2780p i A2780cis va ser de 5  $\mu\text{M}$  (Fig.R2.1D).

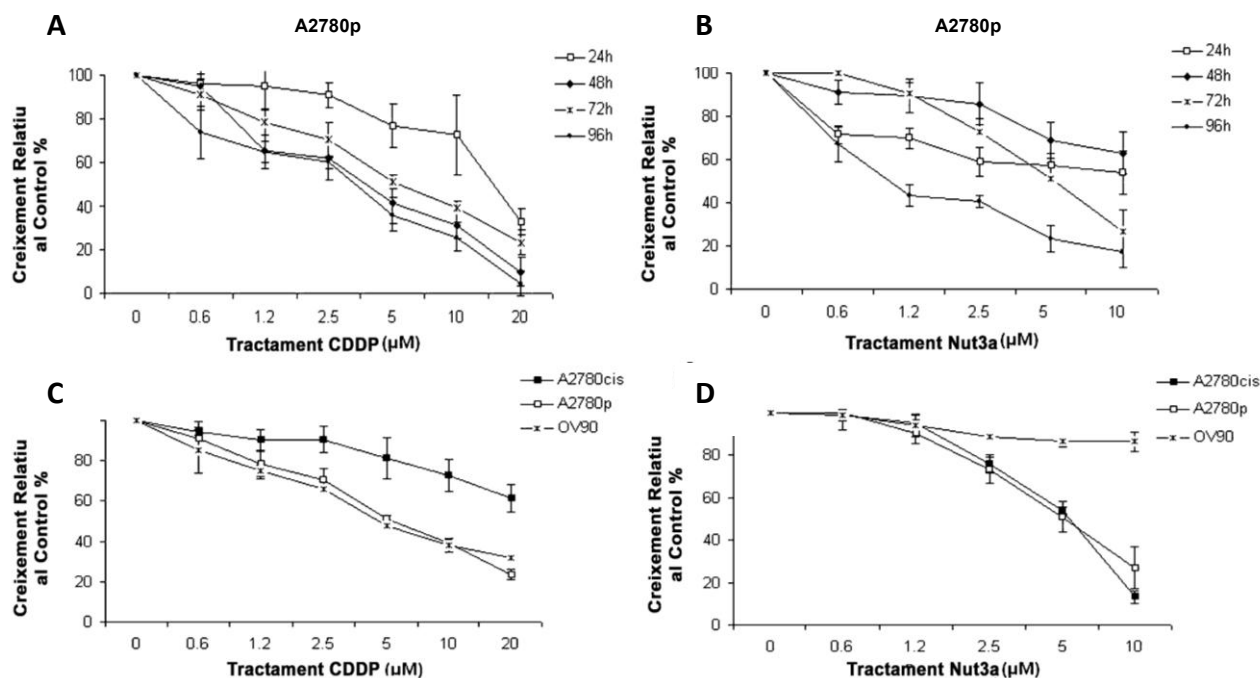


Figura R2.1. Anàlisi de la viabilitat cel·lular per assaig de MTT de les línies cel·lulars de CaOV. A2780p no tractada (aigua, vehicle) i tractada a dosis creixents de CDDP (0 a 20 µM) amb un període de tractament de 24 a 96 hores (A). A2780p no tractada (DMSO, vehicle) i tractada a dosis creixents de Nut3a (0 a 10 µM) amb un període de tractament de 24 a 96 hores (B). Anàlisi de la viabilitat cel·lular per assaig de MTT a línies cel·lulars, A2780p, A2780cis i OV90 no tractades (aigua, vehicle) i tractades amb dosis creixents de CDDP (0 a 20µM) (C) o no tractades (DMSO, vehicle) i tractades amb dosis creixents de Nut3a (0 a 10µM) (D) durant 72 hores. La gàfica és la mitjana de 3 experiments independents ± desviació estàndar.

Aquestes dosis es van usar per analitzar la viabilitat i fases del cicle cel·lular a les línies A2780p i A2780cis en un *time course* de 24 a 96 hores.

Per dur a terme l'experiment, ambdues línies cel·lulars es van plaquejar i a les 24 hores, quan la confluència va ser del 60%, es va procedir a realitzar els tractaments. Les línies cel·lulars es van no tractar (DMSO), es van tractar amb CDDP (3,5 µM), Nut3a (5 µM) i doble tractament (pre-tractament amb 5 µM de Nut3a durant dues hores i posterior addició del CDDP, sense retirar la Nut3a del medi) (Fig.R2.2). Després de 24, 48, 72 i 96 hores d'incubació, es va procedir a avaluar la inducció d'apoptosi amb Annexina V mitjançant citometria de flux. Es van considerar cèl·lules viables aquelles que eren negatives per Annexina i iodur de propidi (AnV-/IP-). El cicle cel·lular es va analitzar mitjançant la unió del iodur de propidi al DNA de les cèl·lules i citometria de flux. Quan s'analitzen les fases del cicle cel·lular per citometria

de flux apareix una zona per davant del pic de G1 amb baixa fluorescència (fase SubG1), que representa les cèl·lules mortes amb el DNA fragmentat. Aquesta zona s'anomena pic subdiploid i indica les cèl·lules en fase apoptòtica.

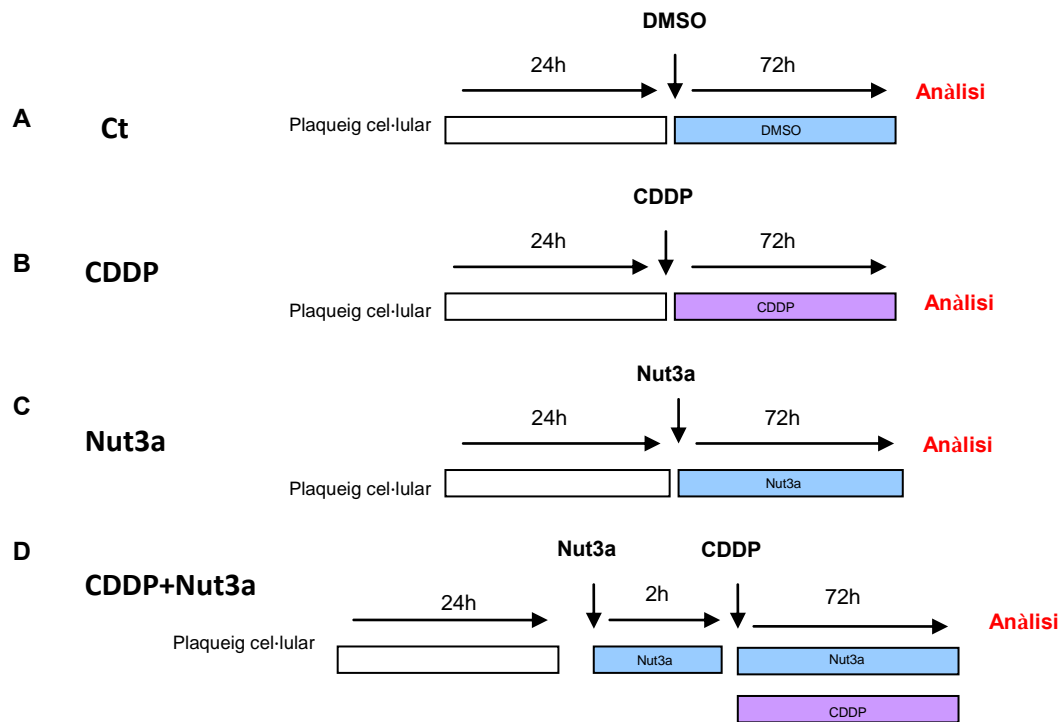


Figura R2.2. Esquema dels tractaments simples i doble tractament. Tractament control: tractament amb DMSO durant 72 hores (A). Tractament amb CDDP: 3,5  $\mu$ M de CDDP durant 72 hores (B). Tractament amb Nut3a: 5  $\mu$ M de Nut3a durant 72 hores (C). Doble tractament: Pre-tractament durant 2 hores amb 5  $\mu$ M de Nut3a i addició de 3,5  $\mu$ M de CDDP durant 72 hores més (D).

Analitzant els resultats de la viabilitat es va observar que el tractament amb CDDP no va disminuir la viabilitat en la línia resistent A2780cis en cap dels temps, mentre que a la línia A2780p va començar a disminuir a les 48 hores d'incubació. En cap d'ambdues línies es va observar un efecte a les 24 hores, i a les 96 hores de tractaments presentaven un aspecte necròtic. Amb el tractament amb Nut3a, la línia A2780cis va disminuir de viabilitat a les 72 i 96 hores de tractament més que la línia A2780p. Amb el doble tractament, la línia A2780p va presentar un 40% de disminució de viabilitat a les 48 hores del tractament, mentre que per la línia A2780cis va ser a les 72 hores. Cal destacar que el doble tractament a les 72 hores disminuïa la viabilitat molt més que el tractament sol amb CDDP en ambdues línies, fent palès que el

tractament amb Nut3a estava sensibilitzant a les cèl·lules al CDDP, fet interessant per la línia resistent A2780cis (Fig.R2.3A i B).

Els resultats del cycle cel·lular van mostrar que el tractament amb CDDP a la línia A2780p va augmentar la fase S i G2/M a les 24 hores de tractament, amb lleuger augment del pic subdiploid (cèl·lules apoptòtiques). A les 48 hores, la fase G2/M va augmentar considerablement, amb un lleuger augment del pic subdiploid, que va incrementar a les 72 i 96. La fase G2/M va començar a disminuir a les 72 hores, on moltes cèl·lules ja estaven en el pic subdiploid (apoptòtiques) (Fig.R2.3D). A la línia cel·lular A2780cis, el tractament amb CDDP va aturar les cèl·lules en fase S a les 24 hores, i en fase G2/M a les 48 hores, sempre sent inferior que la línia A2780p, i sense augment del pic subdiploid, degut a la resistència de la línia A2780cis al CDDP.

Amb el doble tractament, la fase del cycle cel·lular G2/M va augmentar considerablement respecte el tractament amb CDDP a la línia A2780cis, tant a les 24 com a les 48 hores (Fig.R2.3C). A les 72 hores, la fase G2/M va disminuir incrementant el pic subdiploid respecte les 48 hores, a ambdues línies cel·lulars, confirmant l'increment d'apoptosi a les 72 hores (Fig.R2.3 C i D). A les 96 hores, la fase G2/M va augmentar a la línia A2780cis, mentre que la línia A2780p va presentar un gran increment del pic subdiploid. Aquests resultats estarien indicant que a les 96 hores, les cèl·lules resistents al CDDP primerament estarien aturades en fase G2/M per posteriorment entrar en apoptosi tal i com li succeïa la línia sensible A2780p.

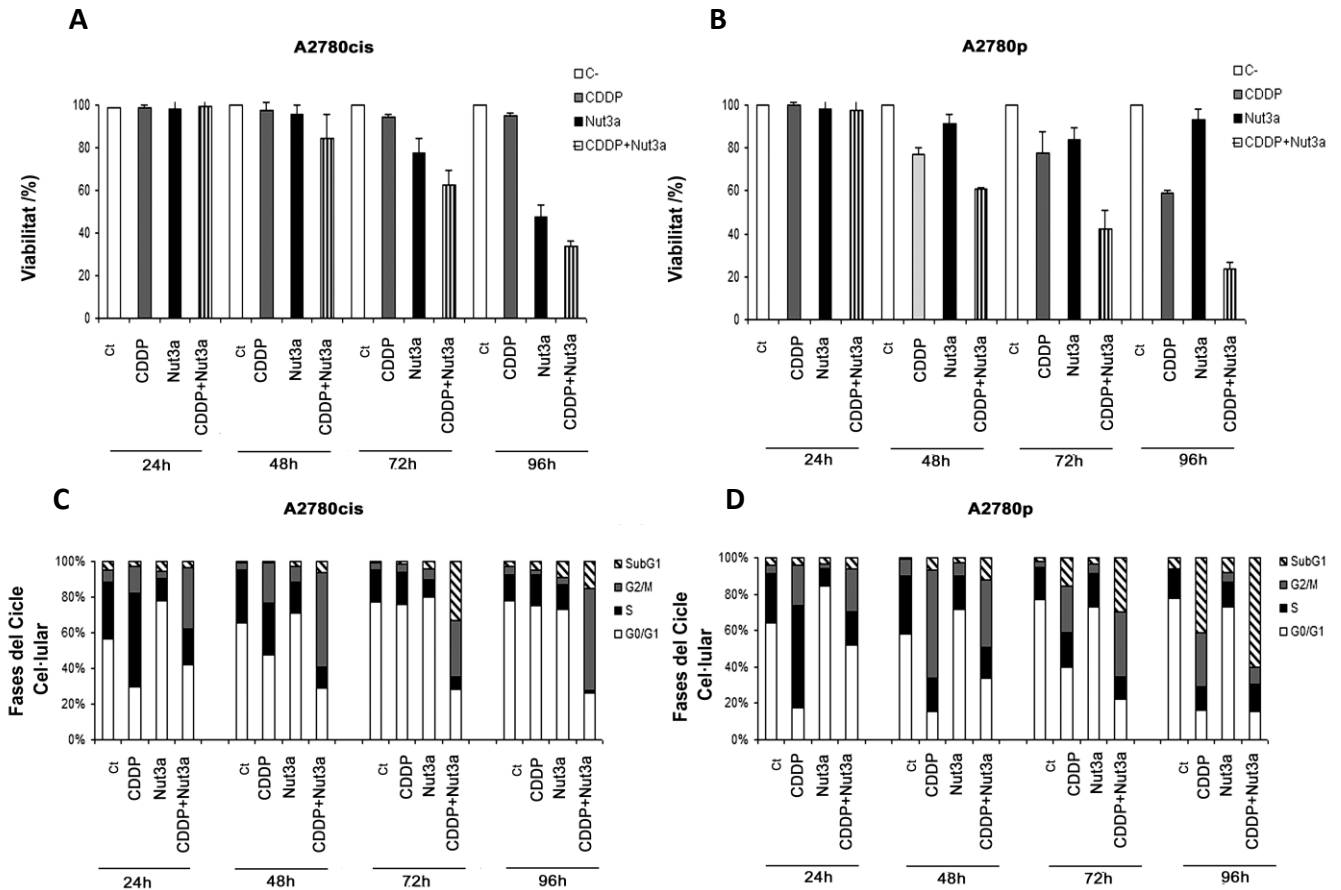


Figura R2.3. Viabilitat i cicle cel·lular de les línies cel·lulars després dels tractaments simples i doble tractament a diferents temps. A2780cis (A i C) i A2780p (B i D) després del no tractament (Ct), tractament amb CDDP (3,5  $\mu$ M), Nut3a (5  $\mu$ M) i doble tractament (5  $\mu$ M de Nut3a + 3,5  $\mu$ M de CDDP) durant 72 hores i anàlisi mitjançant citometria de flux. La viabilitat és referenciada al control (Ct). Les gràfiques representen la mitjana de tres experiments independents  $\pm$  desviació estàndar.

Amb aquests resultats, es va observar que el temps d'incubació de 72 hores amb les dosis  $IC_{50}$  era el temps òptim perquè hi hagués un possible efecte additiu amb el doble tractament, amb una disminució de viabilitat, aturada de fase del cicle cel·lular a G2/M i augment el pic subdiploid respecte els tractaments simples, sobretot a la línia resistent al CDDP A2780cis.

### 2.2.2 Potenciació de l'efecte del cisplatí

Per analitzar amb més detall si el CDDP i la Nut3a actuaven conjuntament de forma additiva o sinèrgica, es va procedir a estudiar el sinergisme. Les línies cel·lulars A2780p i A2780cis es van pre-tractar sense Nut3a (DMSO) o amb dues dosis de Nut3a (2 i 5  $\mu\text{M}$ ) durant 2 hores. Passat el temps, es van tractar amb diferents dosis de CDDP (2; 3,5 i 5  $\mu\text{M}$ ) sense retirar el medi que contenia la Nut3a. Després de 72 hores d'incubació, es va procedir a analitzar la viabilitat mitjançant l'assaig de MTT. Aquestes dades van ser processades en relació a la fracció de cèl·lules afectades usant l'anàlisi de l'Efecte de Dosis Mitjana per poder caracteritzar les interaccions entre Nut3a i CDDP (Veure apartat de Materials i Mètodes). Es va determinar el coeficient de combinació (CI) mitjançant la relació de la fracció de cèl·lules afectades amb les diferents dosis de Nut3a i CDDP. Les combinacions van ser sinèrgiques quan  $CI < 1$ .

La combinació 3,5  $\mu\text{M}$  de CDDP i 5  $\mu\text{M}$  de Nut3a va mostrar ser sinèrgica a la línia A2780p ( $CI=0,800$ ) (Fig.R2.4A i C) i a la línia A2780cis ( $CI=0,714$ ) (Fig.R2.4B i D), fet que coincidia amb els resultats obtinguts en el *time course* (Fig.R2.3).

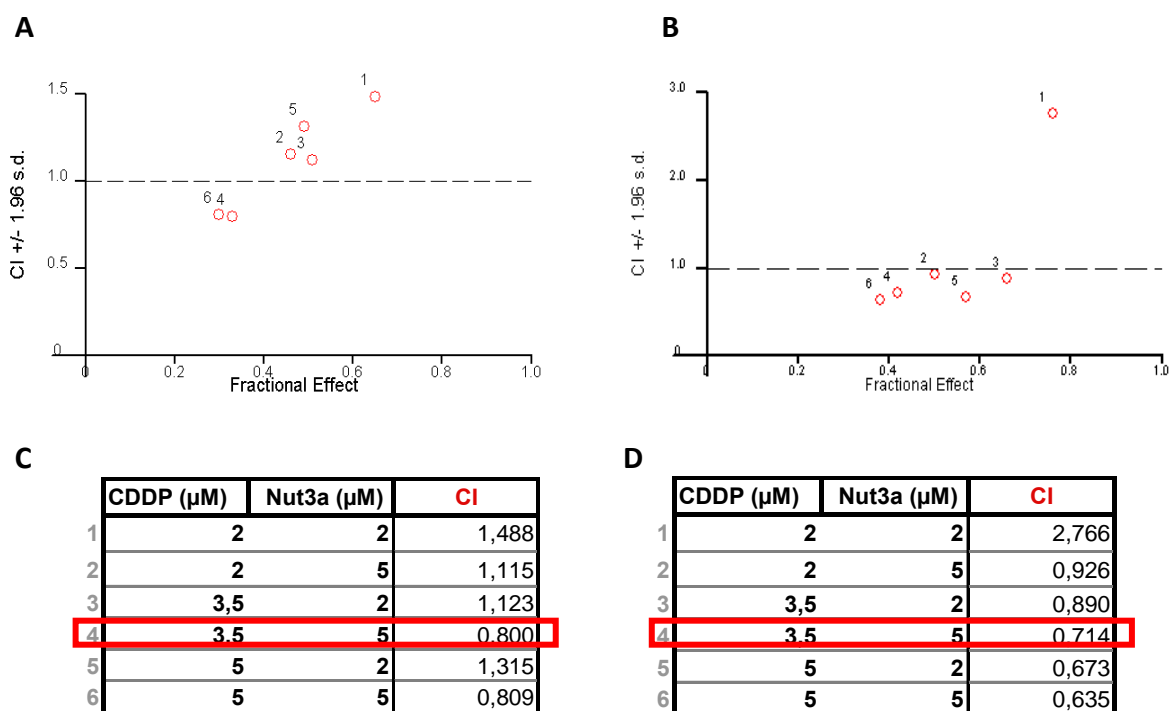


Figura R2.4. Estudi del sinergisme. Índex de Combinació (CI) determinat en relació a la fracció de cèl·lules afectades usant l'anàlisi de Efecte de Dosis Mitjana per poder caracteritzar les interaccions de Nut3a i CDDP. Les línies van ser no tractades (DMSO) o tractades amb diferents dosis de Nut3a (2 i 5  $\mu\text{M}$ ) durant 2 hores. Passat el temps, es va afegir el CDDP a diferents dosis (2; 3,5 i 5  $\mu\text{M}$ ) durant 72 hores. Es va analitzar la viabilitat cel·lular mitjançant MTT, i les dades es van processar per determinar el CI mitjançant el *software* Biosoft CalcuSyn . Isoblograma de la línia A2780p (A) i A2780cis (B) amb els seus valors numèrics (C i D).

A continuació es va procedir a avaluar l'apoptosi i les fases del cicle cel·lular de les línies salvatges (A2780p i A2780cis) i mutada (OV90) per TP53. Les línies cel·lulars es van tractar segons l'esquema de la Fig.R2.2. Després de 72 hores d'incubació, es va procedir a avaluar la inducció d'apoptosi amb Annexina V mitjançant citometria de flux. Es van considerar cèl·lules apoptòtiques aquelles que eren positives per Annexina (AnV<sup>+</sup>/IP<sup>+/</sup>). El cicle cel·lular es va analitzar mitjançant la unió del iodur de propidi al DNA de les cèl·lules i citometria de flux. També es va analitzar el pic subdiploid.

Com es mostra a la figura R2.5, a la línia A2780cis, el tractament amb CDDP va induir una apoptosi del 5% ± 7 i la Nut3a del 22,8% ± 10. Quan es va aplicar el doble tractament, l'apoptosi va augmentar fins al 40% ± 12 (p<0,0001). A la línia A2780p el tractament amb CDDP va induir una apoptosi del 20% ± 6 i la Nut3a del 15,5% ± 8, que va augmentar al 56,7 % ± 8 amb el doble tractament (p<0,0001). No es va mostrar cap efecte a la línia cel·lular amb p53 mutada OV90 (p=0,63).

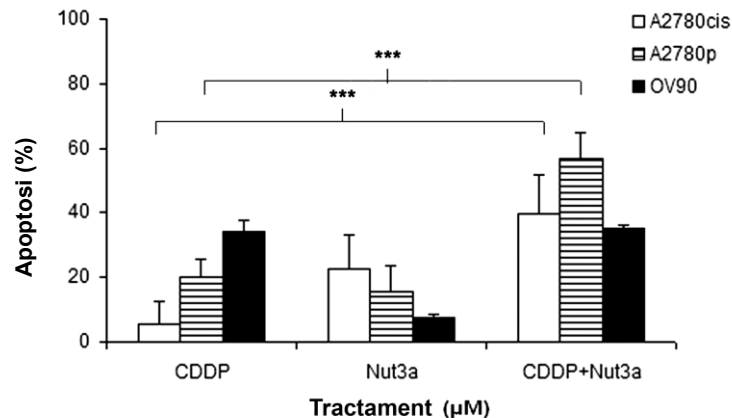


Figura R2.5. Inducció d'apoptosi de les línies cel·lulars després dels tractaments simples i doble tractament. Apoptosi de les línies A2780cis, A2780p i OV90, després de ser no tractades (Ct), tractades amb CDDP (3,5 µM), Nut3a (5 µM) o doble tractament (5 µM de Nut3a + 3,5 µM de CDDP) durant 72 hores. L'apoptosi es va expressar com a percentatge de l'apoptosi de les cèl·lules no tractades. Les gràfiques representen la mitjana de tres experiments independents ± desviació estàndard \*p<0,05; \*\*p<0,005; \*\*\*p<0,0005 (T-Student).

Analitzant la morfologia cel·lular de les línies A2780p i A2780cis després dels tractaments, es va observar que el CDDP disminuïa el nombre de cèl·lules només a la línia A2780p. La Nut3a va disminuir la confluència cel·lular en ambdues línies, observant-se una morfologia apoptòtica, que es va potenciar amb el doble tractament: cèl·lules desenganxades de la placa, forma arrodonida i vacuolització citoplasmàtica (Fig.R2.6).

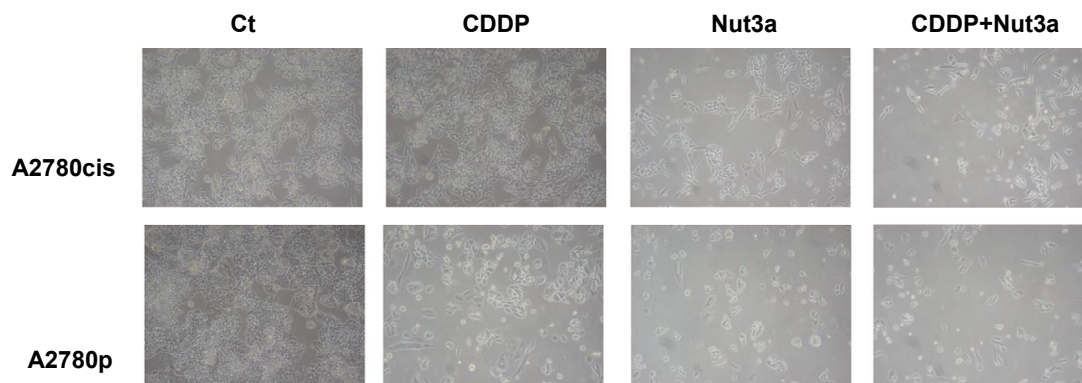


Figura R2.6. Morfologia cel·lular de les línies cel·lulars després dels tractaments simples i doble tractament. A2780cis i A2780p no tractades (Ct), tractades amb CDDP (3,5  $\mu$ M), Nut3a (5  $\mu$ M) i doble tractament (5  $\mu$ M Nut3a + 3,5  $\mu$ M de CDDP) durant 72 hores (10X).

Amb l'anàlisi del cicle cel·lular, es va observar que a les 72 hores de tractament amb CDDP, la línia A2780cis tenia  $5\% \pm 2,4$  de cèl·lules aturades en fase G2/M, mentre que en el doble tractament va augmentar a un  $31,8\% \pm 4$  ( $p=0,025$ ), el mateix va succeir amb el pic subdiploid, el qual va augmentar de  $1,4\% \pm 5$  (CDDP) a  $33\% \pm 6$  (doble tractament) ( $p<0,0001$ ) (Fig.R2.7A). Tanmateix, la línia A2780p va mostrar un increment de la fase G2/M de  $26\% \pm 11$  (CDDP) a  $35\% \pm 3$  (doble tractament) ( $p=0,394$ ), i el pic subdiploid va augmentar de  $15,4\% \pm 2,3$  (CDDP) a  $30\% \pm 2$  (doble tractament) ( $p=0,003$ ) (Fig.R2.7B). No es van observar variacions significatives en el perfil de cicle cel·lular de la línia OV90, en la qual la fase G2/M del doble tractament i el pic subdiploid van ser deguts a l'efecte del CDDP ( $p=0,9$  i  $p=0,364$ , respectivament) (Fig.R2.7C). El tractament simple amb Nut3a no va induir aturada significativa de la fase G2/M respecte el control en cap de les tres línies cel·lulars.



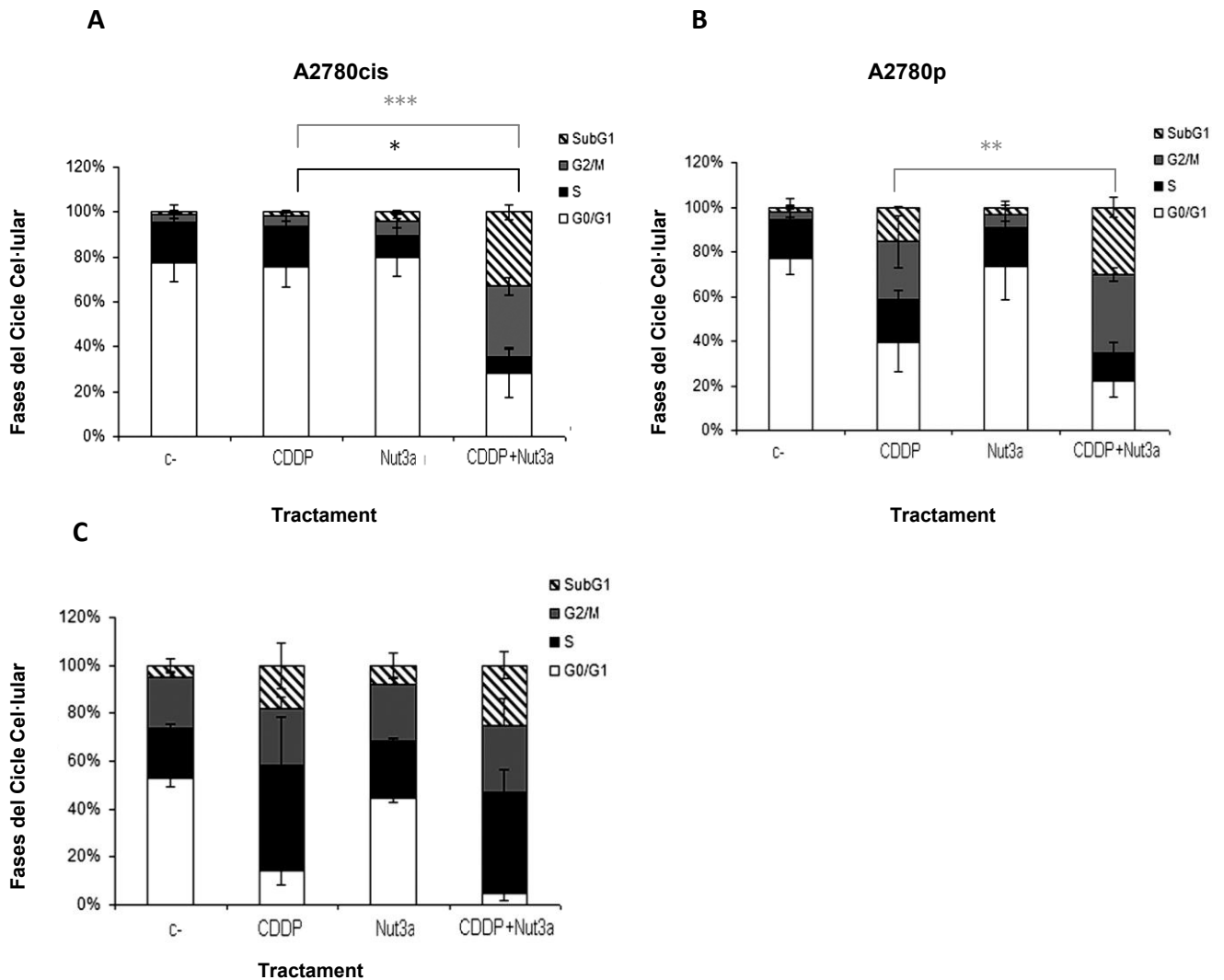


Figura R2.7. Anàlisi del cicle cel·lular de les línies cel·lulars després dels tractaments simples i doble tractament. A2780cis (A), A2780p (B) i OV90 (C). Les línies van ser no tractades (Ct), tractades amb CDDP (3,5 µM), Nut3a (5 µM) o doble tractament (5µM de Nut3a + 3,5µM de CDDP) durant 72 hores. Les gràfiques representen la mitjana de tres experiments independents ± desviació estàndar \*p<0,05;\*\*p<0,005;\*\*\*p<0,0005 (T-Student) comparant el doble tractament respecte el tractament amb CDDP (comparació de fases G2/M (negre); comparació pic subdiploid (gris)).

Així doncs, la Nut3a estava sensibilitzant a les cèl·lules resistents al CDDP, induint aturada del cicle cel·lular en fase G2/M i augmentant el pic subdiploid, actuant de forma sinèrgica amb el CDDP.

### 2.2.3 Efecte de la Nutlina-3b (Nut3b) en les línies cel·lulars

Hi ha descrites 3 classes de Nutlines: Nutlina-1, Nutlina-2 i Nutlina-3, i aquesta última es pot subdividir en 3a i 3b. La Nut3a és la forma més activa, mentre que la Nut3b ho és 150 vegades menys (Vassilev LT, 2004). Aquest enantiòmer inactiu s'usa com a control negatiu.

Per demostrar l'especificitat de la Nut3a a les línies cel·lulars de CaOV, es va usar l'enantiòmer Nut3b sol i en combinació amb CDDP, i es va procedir a realitzar el contacte cel·lular i l'anàlisi d'apoptosi per observar si generava el mateix efecte que l'observat amb la Nut3a.

Les 3 línies cel·lulars es van plaquejar i a les 24 hores, quan la confluència va ser del 60%, es va procedir a realitzar els tractaments segons l'esquema de la figura R2.2. Després de 72 hores d'incubació, es va realitzar el contacte cel·lular i es va procedir a avaluar la inducció d'apoptosi. Es van considerar cèl·lules apoptòtiques aquelles que eren positives per Anexina i iodur de propidi (AnV<sup>+</sup>/IP<sup>+/-</sup>).

Amb el tractament amb CDDP, la línia A2780cis va disminuir lleugerament el nombre de cèl·lules respecte el control (7%), mentre que les línies A2780p i OV90 van disminuir considerablement (61% i 35%, respectivament). El tractament amb Nut3b no va disminuir el nombre de cèl·lules respecte el control a cap de les tres línies cel·lulars, i el doble tractament va disminuir el nombre de cèl·lules només a les línies sensibles al CDDP A2780p i OV90 (58% i 37%, respectivament), indicant que l'apoptosi del doble tractament era degut al CDDP (Fig.R2.8A).

L'anàlisi de l'apoptosi va confirmar els resultats del contacte cel·lular. A la línia A2780cis la inducció d'apoptosi va ser del 5% (CDDP), i 6% (Nut3b i doble tractament). A la línia A2780p va ser del 23% (CDDP), del 3% (Nut3b) i del 24% (doble tractament). El mateix va succeir amb la línia OV90, on l'apoptosi va ser del 32% (CDDP), 6,5% (Nut3b) i del 32% (doble) (Fig.R2.8B). Aquests resultats confirmaven que l'efecte observat amb el doble tractament a les línies A2780p i OV90, era produït pel CDDP, sense efecte de la Nut3b.

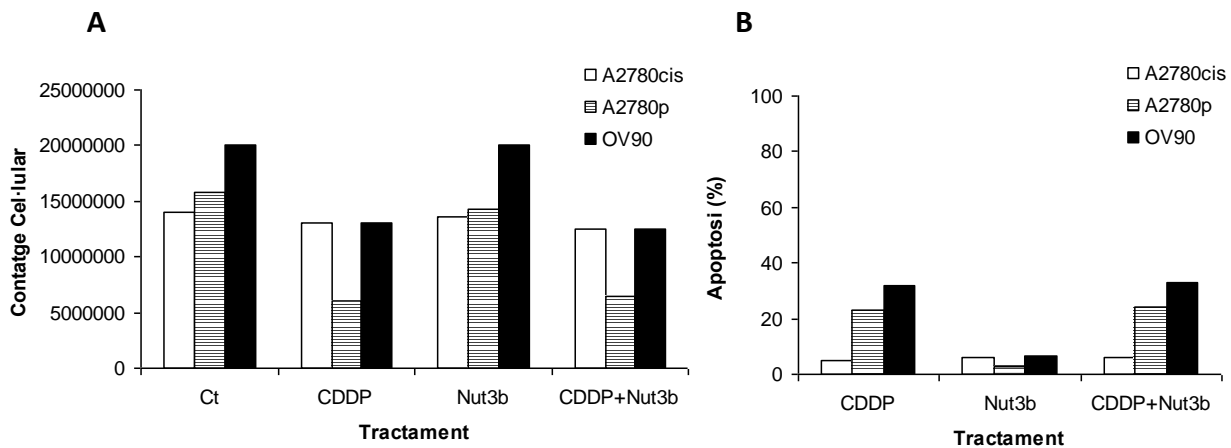


Figura R2.8. Contatge cel·lular i inducció d'apoptosi de les línies cel·lulars després dels tractaments simples i doble tractament amb Nut3b. Contatge (A) i apoptosi (B) de A278cis, A2780p i OV90, després de ser no tractades (Ct), tractades amb CDDP (3,5  $\mu$ M), Nut3b (5  $\mu$ M) o doble tractament (5  $\mu$ M de Nut3b + 3,5  $\mu$ M de CDDP ) durant 72 hores. L'apoptosi es va expressar com a percentatge de l'apoptosi respecte les cèl·lules no tractades.

Es va demostrar que la Nut3b no tenia cap efecte, corroborant-se l'especificitat de la Nut3a.

### 2.2.4 Anàlisi dels gens pro- i anti-apoptòtics després dels tractaments simples i doble tractament

Per tal d'avaluar el mecanisme pel qual la Nut3a era capaç d'induir mort cel·lular programada a les línies cel·lulars A2780p i A2780cis, es va analitzar el patró d'expressió de diferents gens implicats en el procés d'apoptosi mitjançant RT-MLPA. Les línies cel·lulars es van tractar seguint l'esquema de la figura R2.2, amb el temps d'incubació dels fàrmacs durant 48 hores.

A la figura R2.9 es mostren els canvis més importants observats en el patró d'expressió de diferents gens implicats en l'apoptosi de les línies cel·lulars després dels tractaments simples i doble. Ambdues línies cel·lulars van mostrar canvis en el perfil de diversos gens diana de p53 amb els tractaments simples i doble. La línia A2780cis amb el doble tractament va incrementar els gens pro-apoptòtics i diana de p53 com NOXA, PUMA, BAX, APAF-1, el gen pro-apoptòtic BIM i el gen responsable de la aturada de cicle cel·lular CDKN1A (p21), respecte el tractament amb CDDP. Sorprenentment, l'expressió del gen anti-apoptòtic SURVIVINA va disminuir considerablement en el doble tractament respecte el CDDP. També es va observar gran disminució del gen anti-apoptòtic BCL-2 amb el tractament doble respecte el

CDDP (Fig. R2.9A). La disminució de SURVIVINA succeïa simultàniament amb l'increment d'apoptosi del doble tractament respecte el tractament amb CDDP (FigR2.5).

A la línia A2780p, el tractament amb CDDP va incrementar els gens proapoptòtics NOXA, PUMA, BAX, BIM i APAF-1, així com el gen CDKN1A, confirmant la sensibilitat d'aquesta línia pel CDDP. En el doble tractament, CDKN1A també va augmentar però no tant com a la línia A2780cis. BCL-2 i SURVIVINA també van disminuir amb el doble tractament respecte el tractament simple amb CDDP (Fig.R2.9B).

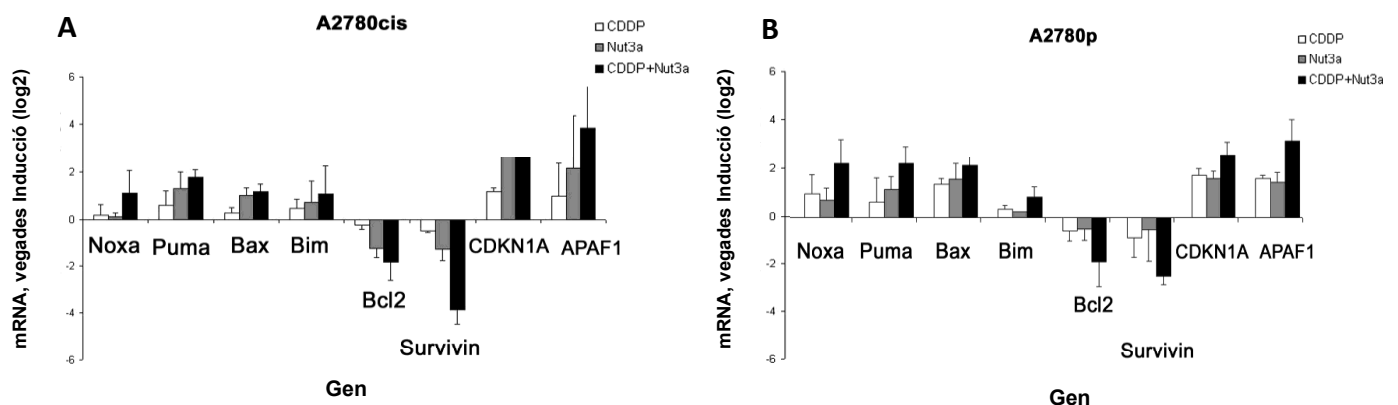


Figura R2.9. Anàlisi dels nivells d'expressió del mRNA dels gens implicats en el mecanisme d'apoptosi. A2780cis (A) i A2780p (B) no tractades (Ct), tractades amb CDDP (3,5 µM), Nut3a (5 µM) o doble tractament (5 µM de Nut3a + 3,5 µM de CDDP ) durant 48 hores. Es va extreure RNA i es va realitzar RT-MLPA. Quantificació de mRNA expressada en logaritme en base 2 de l'increment relatiu en relació al control. El gen normalitzador usat va ser GUSB. Les gràfiques mostren la mitjana de 3 experiments independents realitzats per a cada tipus de línia cel·lular ± desviació estàndar.

El perfil de mRNA observat en ambdues línies cel·lulars es va correlacionar amb la inducció d'apoptosi observada a la Fig.R2.5. Un fet interessant va ser que amb el tractament amb Nut3a, l'expressió de SURVIVINA va disminuir més a la línia A2780cis que a la línia A2780p, fet també observat amb el doble tractament. Això induïa a pensar que les cèl·lules resistents al CDDP A2780cis eren més sensibles a la Nut3a que les A2780p.

### 2.2.5 Anàlisi de les proteïnes induïdes després dels tractaments simples i doble tractament

Una vegada observat el perfil dels gens relacionats amb l'apoptosi, es va analitzar el perfil proteic per corroborar que els canvis del mRNA es traduïssin amb variacions de l'expressió proteica. Es van tractar ambdues línies amb els tractaments simples i doble (Fig.R2.2) i a les 72 hores d'incubació, es van obtenir els lisats per analitzar els nivells proteics mitjançant *western blot*.

El tractament amb CDDP a la línia A2780p va induir la proteïna p53 i les seves dianes com p21, Bax i acumulació de Mdm2. Els nivells de la proteïna anti-apoptòtica Bcl-2 van disminuir, coincidint amb la baixada de viabilitat des del 100% (tractades amb DMSO) al 73% amb el tractament amb CDDP (Fig.R2.10). El mateix tractament a la línia A2780cis no va generar canvis en aquestes proteïnes (Fig.R2.10). Els nivells de Survivina en ambdues línies cel·lulars tractades amb CDDP es van mantenir com el control. Amb el doble tractament, la línia A2780p també va augmentar els nivells de les proteïnes pro-apoptòtiques Noxa i Bax. Les proteïnes anti-apoptòtiques com Bcl-2 i Survivina van disminuir considerablement, coincidint amb la baixada de viabilitat del 73% (CDDP) al 45% (doble tractament) (Fig.R2.10). A la línia A2780cis, la Nut3a va induir p53 i les seves dianes com p21, Noxa i Bax, mentre que els nivells de Bcl-2 i Survivina van disminuir. Tots aquests canvis es van potenciar amb el doble tractament, amb el qual els nivells de Survivina van disminuir molt més que amb el tractament amb CDDP, coincidint amb la baixada de viabilitat del 95% (CDDP) al 64% (doble tractament) (Fig.R2.10). És important destacar que amb el tractament amb Nut3a, la Survivina va disminuir a la línia A2780cis, mentre que a la línia A2780p es va mantenir com el control (Fig. R2.10).

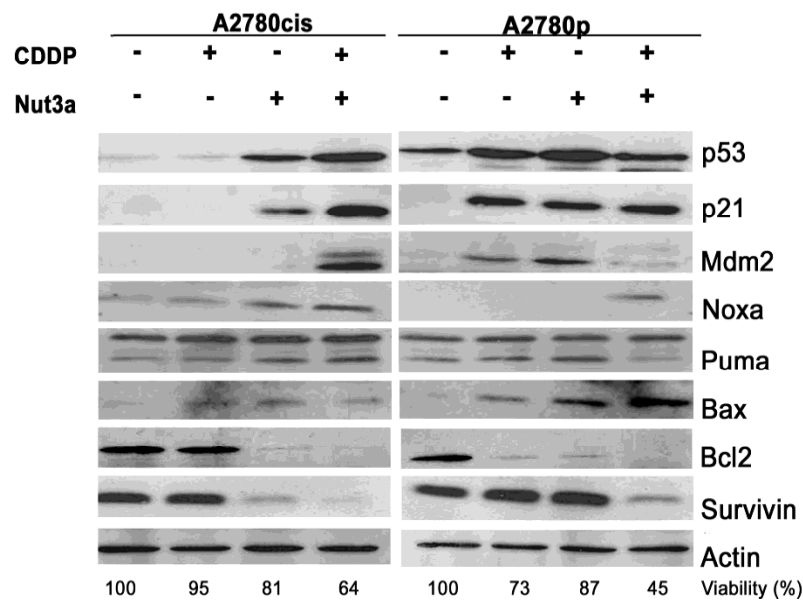


Figura R2.10. Efecte dels tractaments simples i doble tractament a les línies cel·lulars. A2780cis i A2780p no tractades (Ct), tractades amb CDDP (3,5 µM), Nut3a (5 µM) o doble tractament (5 µM de YM155 + 3,5 µM de CDDP ) durant 72 hores. L'actina es va usar com a control de càrrega. La viabilitat mostrada de cada tractament és referenciada al control. *Western blot* representatiu de 3 experiments independents.

Aquests resultats suggerien que la Nut3a estava dirigint a les cèl·lules resistents A2780cis, cap als mateixos resultats obtinguts amb la seva homòloga sensible A2780p tractada amb CDDP. La línia A2780cis va resultar ser més sensible a la Nut3a que la línia A2780p, ja que amb el tractament simple amb Nut3a només va disminuir Survivina a la línia A2780cis.

### 2.2.6 Silenciació de p53 amb els tractaments simples i doble tractament

L'eficàcia de la Nut3a resideix en que la cèl·lula tractada disposi de la proteïna i de la via de p53 intacta. Com s'ha observat en els resultats anteriors, la Nut3a va induir p53 a les línies A2780p i A2780cis. A més, amb el doble tractament van disminuir els nivells de Survivina, disminució que podia ser conseqüència de la inducció de p53. Per confirmar que la inactivació de p53 podria inhibir l'efecte de la Nut3a, es va procedir a inhibir p53. A continuació es van tractar les cèl·lules sense fàrmac (DMSO), CDDP, Nut3a i doble tractament. Després de les 72 hores d'incubació, els lisats es van processar i es va realitzar el *western blot*. Es va analitzar l'apoptosi

mitjançant el marcatge amb Anexina V per citometria de flux. Es va contar com a cèl·lules apoptòtiques aquelles que van ser AnexinaV-IP positives (AnV<sup>+</sup>/IP<sup>+/-</sup>).

Ambdues línies cel·lulars amb p53 inhibida (siRNA+) van mostrar menys inducció de p53 i les seves dianes (com p21 i Mdm2) en tots els tractaments respecte el control (siRNA-), demostrant-se l'eficàcia del siRNA. En ambdues línies, l'expressió de Survivina es va induir amb la inhibició de p53 (siRNA+) en tots els tractaments, mentre que va disminuir quan p53 era activa (siRNA-), sobretot amb el doble tractament (Fig.R2.11A i B).

L'apoptosi va ser inferior en ambdues línies cel·lulars amb p53 inhibida (Fig.R2.11C i D). Comparant els tractaments amb p53 inhibida (siRNA+) respecte el control (siRNA-), es va observar que l'apoptosi de la línia A2780cis amb p53 inhibida, no va disminuir amb el tractament amb CDDP de forma significativa ( $p=0,279$ ), mentre que amb Nut3a i el doble tractament va disminuir significativament ( $p=0,035$ ;  $p=0,003$ , respectivament) (Fig.R2.11C). L'apoptosi de la línia A2780p amb p53 inhibida va créixer significativament amb el tractament amb CDDP ( $p=0,032$ ), mentre que amb la Nut3a i doble tractament va disminuir però sense ser significatiu ( $p=0,364$ ;  $p=0,257$ , respectivament) (Fig.R2.11D). Aquests resultats tornaven a suggerir que la línia A2780cis era més sensible a la Nut3a que la línia A2780p.

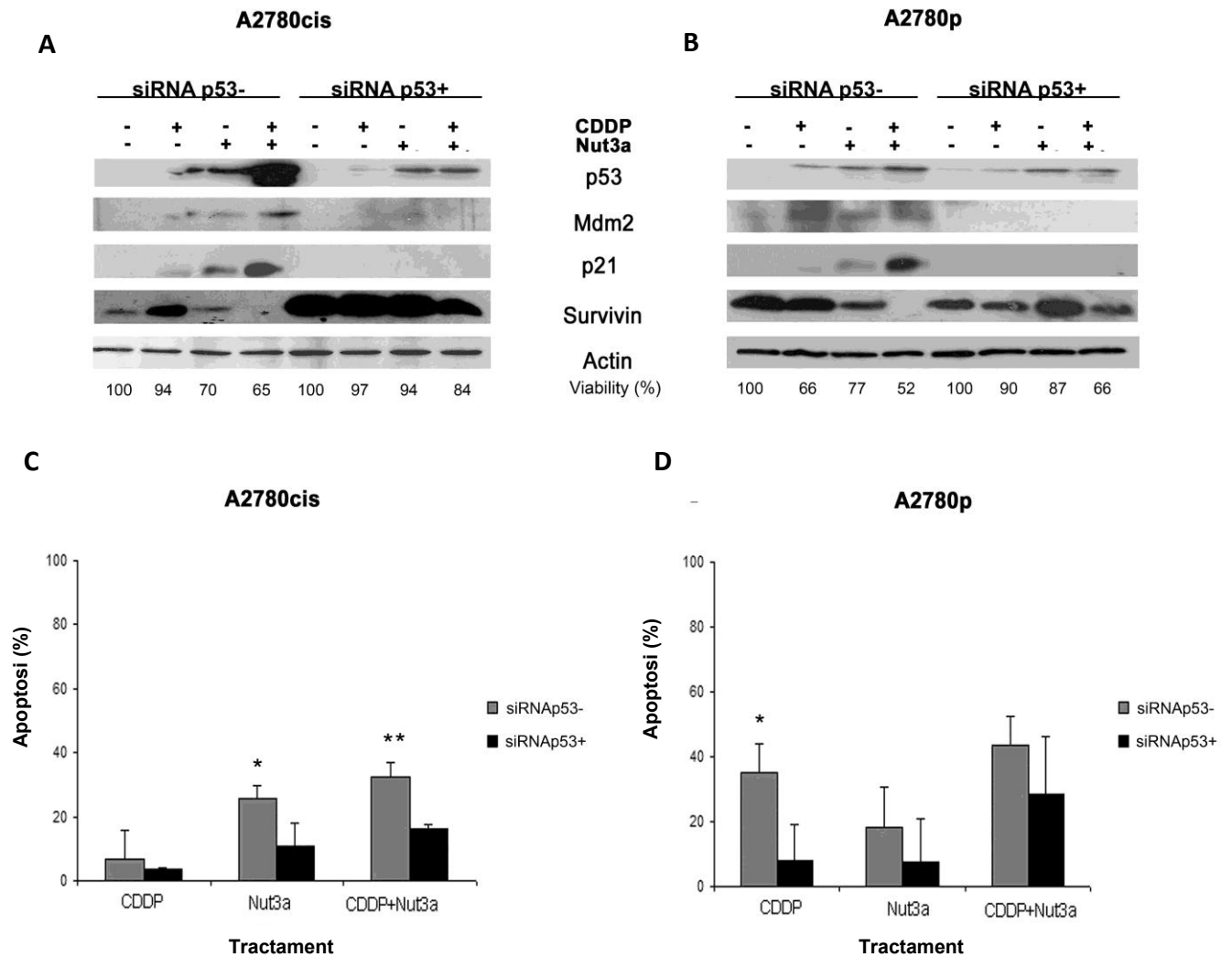


Figura R2.11. *Western blot* i anàlisi de l'apoptosi de les línies cel·lulars transfectades amb siRNA de p53 i posteriors tractaments. A2780cis (A i C) i A2780p (B i D) transfectades amb siRNA control (siRNA-) i siRNA de p53 (siRNA+). Després de 6 hores de transfecció, ambdues línies van ser no tractades (Ct), tractades amb CDDP (3,5µM), Nut3a (5µM) o doble tractament (5µM de Nut3a + 3,5µM de CDDP) durant 72 hores. L'apoptosi es va expressar com a percentatge de l'apoptosi de les cèl·lules no tractades. Les gràfiques representen la mitjana de tres experiments independent  $\pm$  desviació estàndard \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$  (T-Student) comparant apoptosi de siRNA- amb siRNA+.

Els resultats de l'apoptosi es van confirmar amb la morfologia i confluència cel·lular (Fig.R2.12). Ambdues línies amb p53 activa (siRNA-) tractades amb Nut3a i doble tractament, van mostrar una disminució de la confluència cel·lular i una morfologia típica d'apoptosi (arrodonides, vacuolització citoplasmàtica, amb tendència a desenganxar-se de la placa). Amb p53 inhibida (siRNA+), la confluència cel·lular del tractament amb Nut3a i doble, va augmentar respecte el control (siRNA-) amb menys morfologia cel·lular apoptòtica.



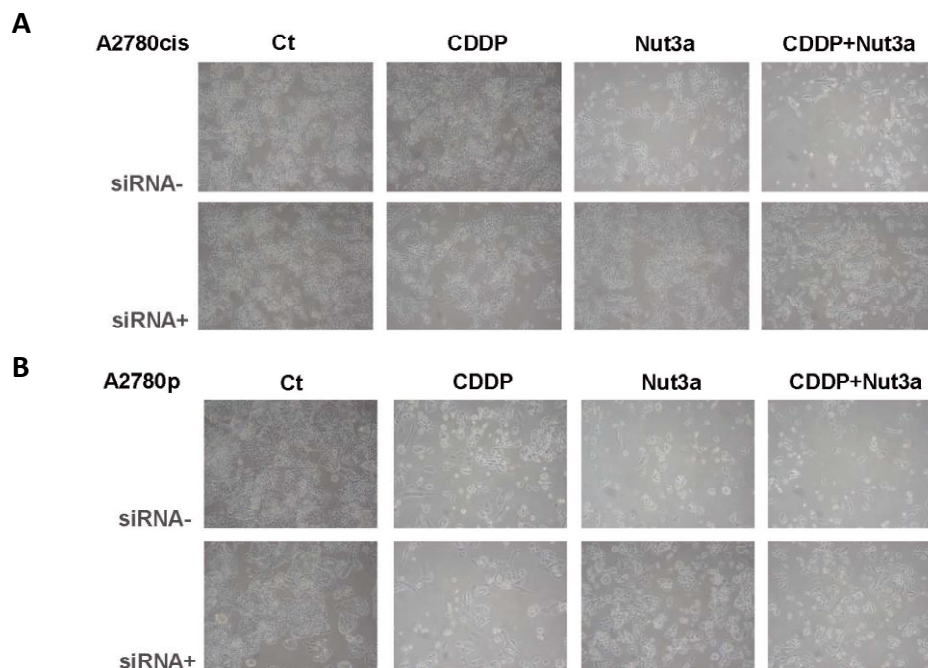


Figura R2.12. Morfologia cel·lular de les línies transfectades amb siRNA de p53 i tractades amb tractaments simples i doble tractament. A2780cis (A) i A2780p (B) transfectades amb siRNA control (siRNA-) i siRNA de p53 (siRNA+). Després de 6 hores de transfecció, ambdues línies van ser no tractades (Ct), tractades amb CDDP (3,5  $\mu$ M), Nut3a (5 $\mu$ M) o doble tractament (5  $\mu$ M de Nut3a + 3,5  $\mu$ M de CDDP ) durant 72 hores (10X).

### 2.2.7 Expressió ectòpica de Survivina amb els tractaments simples i doble tractament

Degut a la possible funció anti-apoptòtica de la Survivina, ens vam preguntar si la sobreexpressió ectòpica de Survivina seria capaç de protegir les cèl·lules de l'apoptosi induïda per la Nut3a. Les línies cel·lulars es van transfectar amb Survivina ectòpica i es van realitzar els tractaments simples i doble durant 72 hores.

Per determinar el millor temps de transfecció i el *ratio* de DNA:reactiu de transfecció (Fugene<sup>®</sup>6) a utilitzar, les línies cel·lulars es van transfectar amb el gen *reporter* GFP (*Green Fluorescent Protein*) com a marcador de transfecció, amb diferents proporcions de volums de DNA-GFP i de Fugene<sup>®</sup>6 (1:2 ; 1:3 ; 1:4) durant 24 i 48 hores. Es va avaluar l'eficiència de la transfecció mitjançant observació directa al microscopi de fluorescència (Fig.R2.13).

La figura R2.13 mostra com la màxima eficiència de transfecció per ambdues línies cel·lulars ja es va observar a les 24 hores post-transfecció, amb la proporció de

volums de 1  $\mu$ L DNA:4  $\mu$ L Fugene<sup>®</sup>6, on més del 50% de cèl·lules eren fluorescentes (transfectades amb GFP) en comparació a la imatge del canal visible.

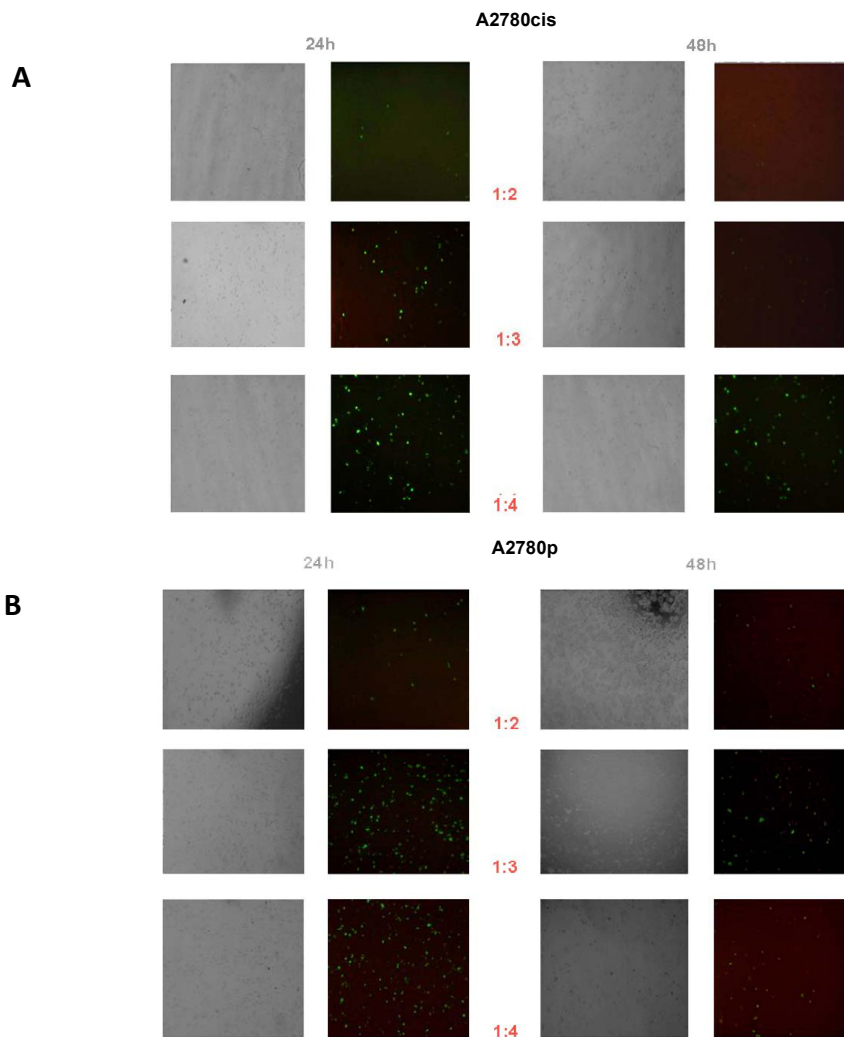


Figura R2.13. Transfecció de les línies cel·lulars amb el gen *reporter* GFP. A2780cis (A) i A2780p (B) a les 24 i 48 hores, amb diferents *ratios* de DNA:Fugene (1:2; 1:3; 1:4). Fotografies obtingudes amb el microscopi de fluorescència, on es mostren les cèl·lules positives per GFP (verd) i el camp clar (10X).

Les línies cel·lulars es van transfectar amb el vector control (pcDNA *empty*) i el vector amb la Survivina (pcDNA-Survivina) i a les 24 hores es van no tractar (DMSO), tractar amb CDDP, Nut3a i doble tractament. Després de 48 i 72 hores d'incubació, els lisats es van processar i es va realitzar el *western blot*. Es va analitzar l'apoptosi mitjançant el marcatge amb Anexina V per citometria de flux. Es va contar com a cèl·lules apoptòtiques aquelles que van ser AnexinaV positives (AnV<sup>+</sup>/IP<sup>+/-</sup>).

L'anàlisi de l'expressió proteica a les 48 i 72 hores, va mostrar uns nivells més alts de Survivina a les cèl·lules transfectades amb Survivina ectòpica en comparació

amb el vector control (*empty vector*), demostrant l'eficàcia de la transfecció (Fig.R2.14A i B). La sobreexpressió de Survivina va ser notable a les 48 hores, mentre que a les 72 hores els nivells de sobreexpressió no van ser tant alts amb el tractament amb Nut3a i doble, degut a l'efecte del tractament, el qual a dit temps genera disminució de Survivina. La restauració de Survivina no va impedir a les cèl·lules a activar p53, ja que es va observar inducció de p53 i les seves dianes després dels tractaments amb Nut3a i doble a les 48 hores (Fig.R2.14A), a ambdues línies. A les 72 hores de tractament, p53 i les seves dianes es van induir més a la línia A2780cis (PC3-Survivin) que a la línia A2780p (PC3-Survivin) (Fig.R2.14B).

La restauració de Survivina va protegir lleugerament de l'apoptosi a ambdues línies cel·lulars, però sense ser estadísticament significatiu. A les 48 hores de tractament, l'apoptosi de la línia A2780cis amb el tractament amb Nut3a va passar a ser del  $11\% \pm 6,4$  (pcDNA-*empty*) al  $8,8\% \pm 7$  (pcDNA-Survivina) i amb el doble tractament, del  $21,8\% \pm 8,3$  (pcDNA-*empty*) al  $15,8\% \pm 4,5$  (pcDNA-Survivina). A la línia A2780p l'apoptosi amb el tractament amb Nut3a va passar a ser del  $17\% \pm 12,3$  (pcDNA-*empty*) al  $12,5\% \pm 5,4$  (pcDNA-Survivina) i amb el doble tractament, del  $24,5\% \pm 10,6$  (pcDNA-*empty*) al  $23\% \pm 4,4$  (pcDNA-Survivina)(Fig.R2.14C).

A les 72 hores de tractament, l'apoptosi de la línia A2780cis amb el tractament amb Nut3a va passar del  $18\% \pm 6$  (pcDNA-*empty*) al  $13\% \pm 4,4$  (pcDNA-Survivina) i amb el doble tractament, del  $32\% \pm 11$  (pcDNA-*empty*) al  $28\% \pm 8$  (pcDNA-Survivina). A la línia A2780p l'apoptosi amb el tractament amb Nut3a va passar a ser del  $11\% \pm 8$  (pcDNA-*empty*) al  $10\% \pm 3$  (pcDNA-Survivina) i amb el doble tractament, del  $42\% \pm 15$  (pcDNA-*empty*) al  $30\% \pm 18$  (pcDNA-Survivina)(Fig.R2.14D).

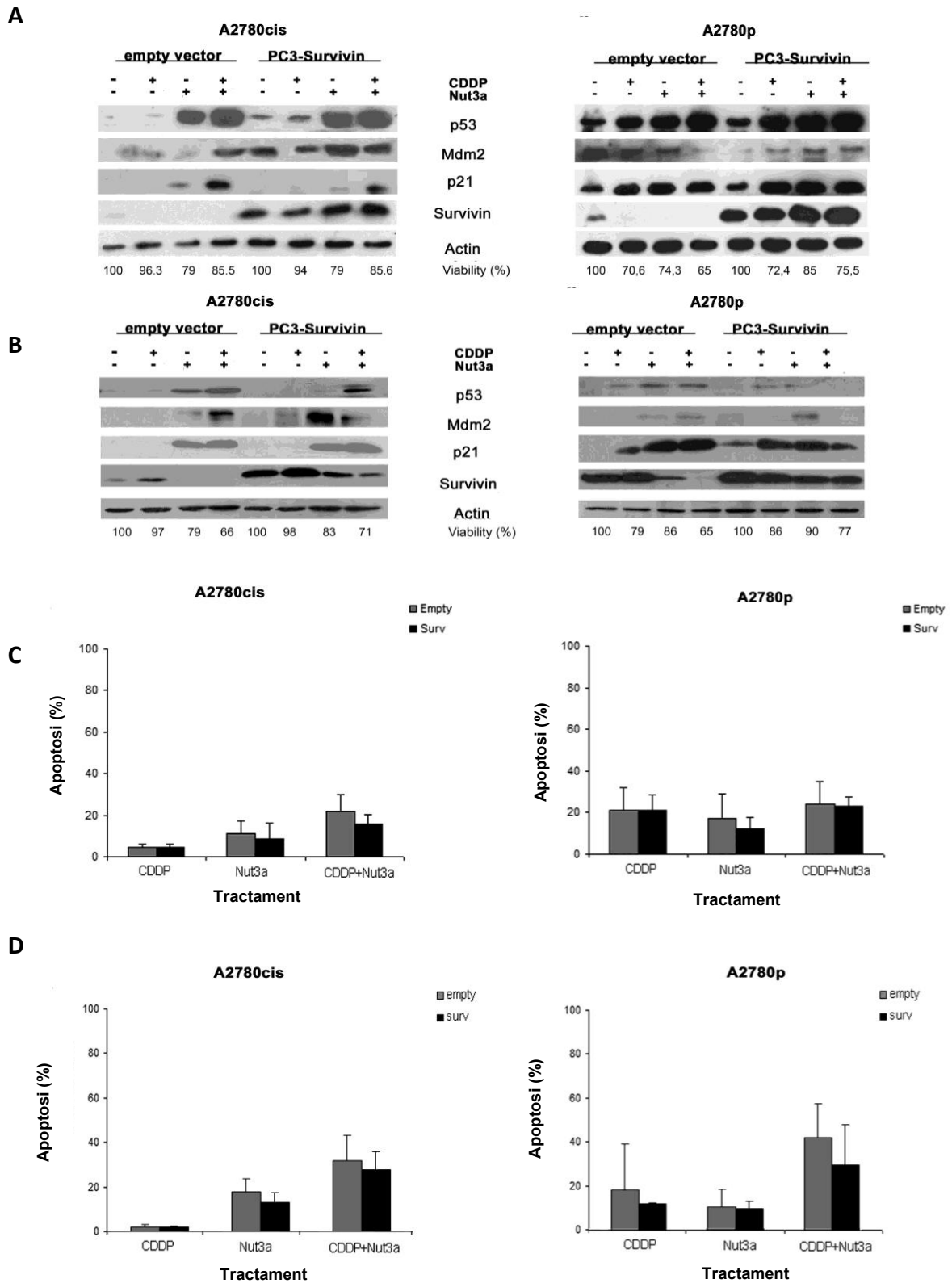


Figura R2.14. *Western blot* i anàlisi de l'apoptosi de les línies amb expressió ectòpica de Survivina i posteriors tractaments. Després de 24 hores de la transfecció, ambdues línies van ser no tractades (Ct), tractades amb CDDP (3,5  $\mu$ M), Nut3a (5  $\mu$ M) o doble tractament (5  $\mu$ M de Nut3a + 3,5  $\mu$ M de CDDP) durant 48 hores (A i C) i 72 hores (B i D). L'apoptosi es va expressar com a percentatge de l'apoptosi de les cèl·lules no tractades. Les gràfiques representen la mitjana de tres experiments independents  $\pm$  desviació estàndard  $p < 0,05$  (T-Student) comparant apoptosi de pcDNA-empty (*Empty*) i pcDNA-Survivina (*Surv*).

Els resultats de l'apoptosi es van confirmar amb la morfologia i confluència cel·lular (Fig.R2.15). Ambdues línies amb sobreexpressió de Survivina (Surv) en tots els tractaments, van mostrar pocs canvis de la confluència cel·lular i morfologia comparat amb les cèl·lules control (*empty*). Aquests resultats induïen a pensar que l'expressió ectòpica de Survivina no era suficient per rescatar les cèl·lules A2780p i A2780cis dels efectes citotòxics ocasionats pels tractaments simples i doble.

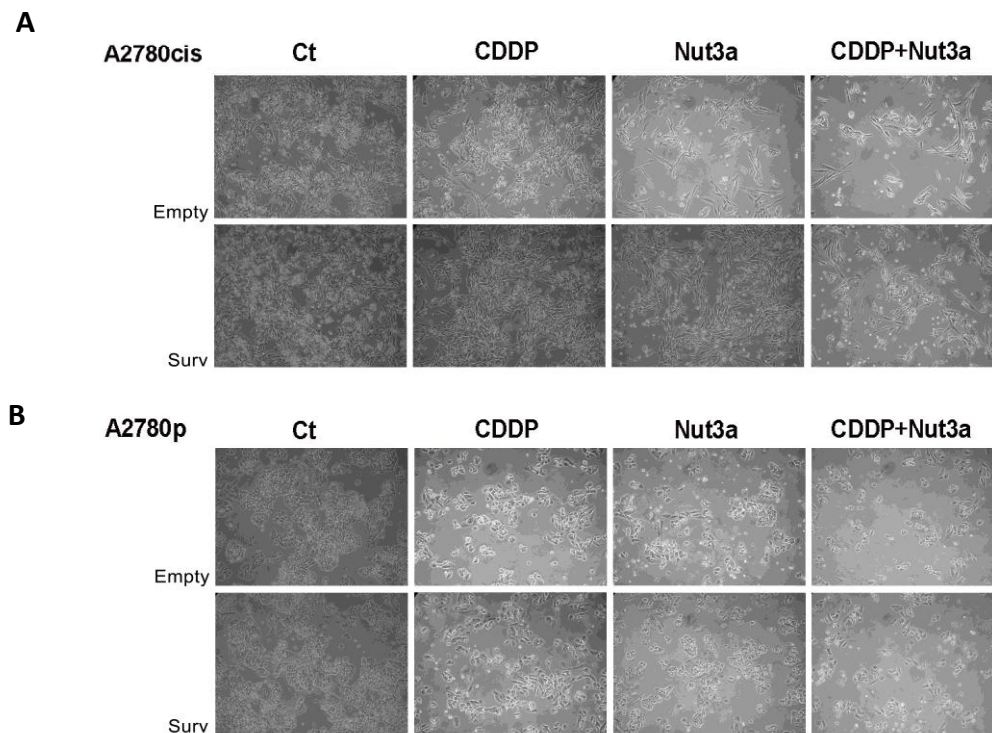


Figura R2.15. Morfologia cel·lular de les línies cel·lulars transfectades amb Survivina ectòpica i tractades amb els tractaments simples i doble tractament. A2780cis (A) i A2780p (B) transfectades amb pcDNA-*empty* (*Empty*) i pcDNA-Survivina (Surv). 24 hores després de la transfecció, ambdues línies van ser no tractades (Ct), tractades amb CDDP (3,5  $\mu$ M), Nut3a (5  $\mu$ M) o doble tractament (3,5  $\mu$ M de CDDP + 5  $\mu$ M de Nut3a) durant 72 hores (10X).

### 2.2.8 Silenciació de Survivina amb el tractament amb cisplatí

La disminució de Survivina i augment d'apoptosi amb el doble tractament a la línia A2780cis va fer pensar que la Survivina podria ser proteïna clau en la resistència al CDDP. Així doncs, es va procedir a inhibir-la mitjançant siRNA, tractar les cèl·lules amb CDDP i veure com quedava afectada l'apoptosi.

Per conèixer el siRNA a utilitzar i el temps en el qual la Survivina es mantenia inhibida, les cèl·lules es van transfectar amb 3 siRNA diferents (F07, F09 i F11) i es van

deixar incubar 24, 48 i 72 hores (Fig.R2.16). La Survivina es va inhibir a ambdues línies cel·lulars a les 24 hores post-transfecció i es va mantenir inhibida fins a les 48 hores amb tots els siRNAs. A les 72 hores va començar a expressar-se a la línia A2780p amb els siRNAs F09 i F11, mentre que es va mantenir inhibida amb el siRNA F07 (Fig.R2.16). Per la realització dels experiments es va escullir el siRNA F07 i les 48 hores pel temps d'incubació dels fàrmacs, per assegurar que els nivells de Survivina es mantinguessin baixos mentres es feien els tractaments.

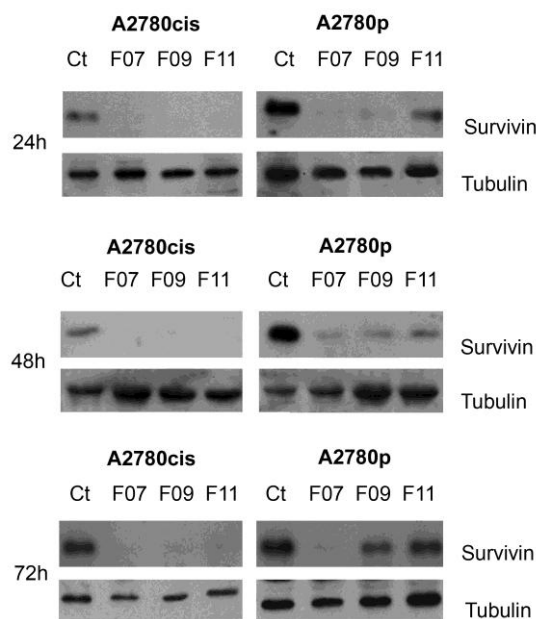


Figura R2.16. Expressió de Survivina a les línies cel·lulars transfectades amb diferents siRNA de Survivina (F07, F09, F11) durant 24, 48 i 72 hores.

Les línies cel·lulars es van transfectar amb el siRNA F07 (siRNA+) o control (siRNA-) i passades 24 hores es van tractar amb CDDP (3,5  $\mu$ M). Després de 48 hores d'incubació amb el fàrmac, es va analitzar l'apoptosi mitjançant el marcatge amb Annexina V per citometria de flux. Es va contar com a cèl·lules apoptòtiques aquelles que van ser AnnexinaV positives (AnV<sup>+</sup>/IP<sup>+/-</sup>).

L'apoptosi del tractament amb CDDP va ser superior amb Survivina inhibida (siRNA+) respecte el control (siRNA-), sobretot a la línia resistent al CDDP A2780cis, on l'apoptosi va augmentar del 5%  $\pm$  3 (siRNA-) al 15%  $\pm$  5,6 (siRNA+) (p=0,025) (Fig.R2.17A). A la línia A2780p l'increment no va ser tant gran, passant del 12%  $\pm$  3

(siRNA-) al  $17\% \pm 6$  (siRNA+) ( $p=0,289$ ) (Fig.R2.17B). Per tant, amb la inhibició de Survivina s'estava sensibilitzant la línia A2780cis al CDDP. Això demostrava que la Survivina podia tenir un paper important en la resistència al CDDP en aquest tipus de línia cel·lular de CaOV.

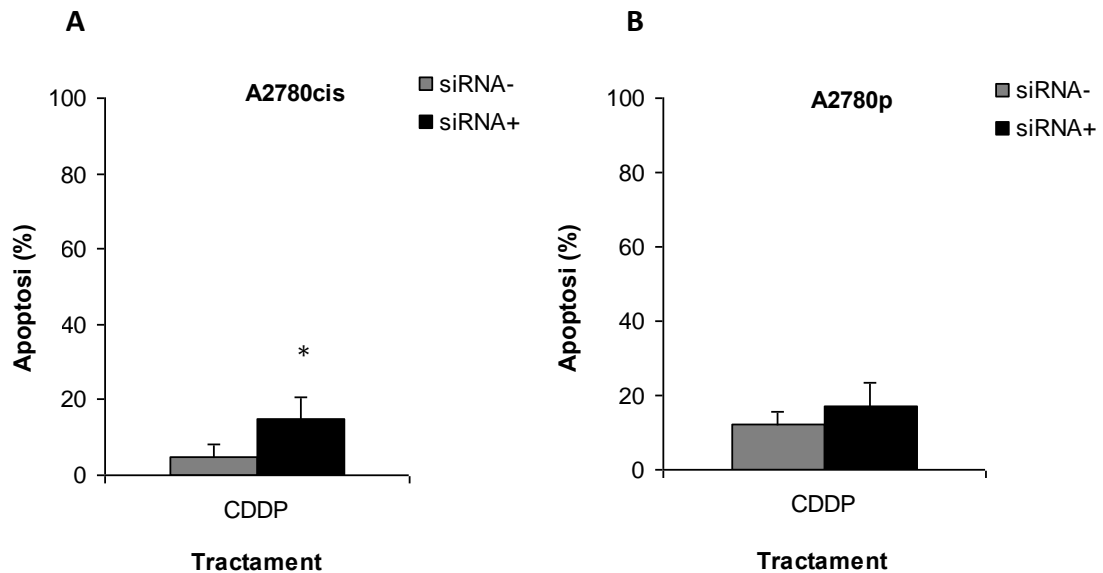


Figura R2.17. Apoptosi de les línies cel·lulars transfectades amb siRNA de Survivina i posterior tractament amb CDDP. A2780cis (A) i A2780p (B) transfectades amb siRNA control (siRNA-) i siRNA de Survivina (siRNA+). Després de 24 hores de transfecció, ambdues línies van ser no tractades (Ct) i tractades amb CDDP ( $3,5 \mu\text{M}$ ) durant 48 hores. L'apoptosi es va expressar com a percentatge de l'apoptosi de les cèl·lules no tractades. Les gràfiques representen la mitjana de quatre experiments independents  $\pm$  desviació estàndard \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$  (T-Student) comparant apoptosi de siRNA- amb siRNA+.

Els resultats de l'apoptosi es van confirmar amb la morfologia i confluència cel·lular (Fig.R2.18). La línia A2780cis amb Survivina activa (siRNA-) no va mostrar canvis morfològics ni de confluència cel·lular respecte el control, indicant de nou la resistència d'aquesta línia pel CDDP; mentre que amb Survivina inhibida (siRNA+), va disminuir la confluència cel·lular amb una morfologia típica d'apoptosi (cèl·lules arrodonides, vacuolització citoplasmàtica, i tendència a desenganxar-se de la placa).

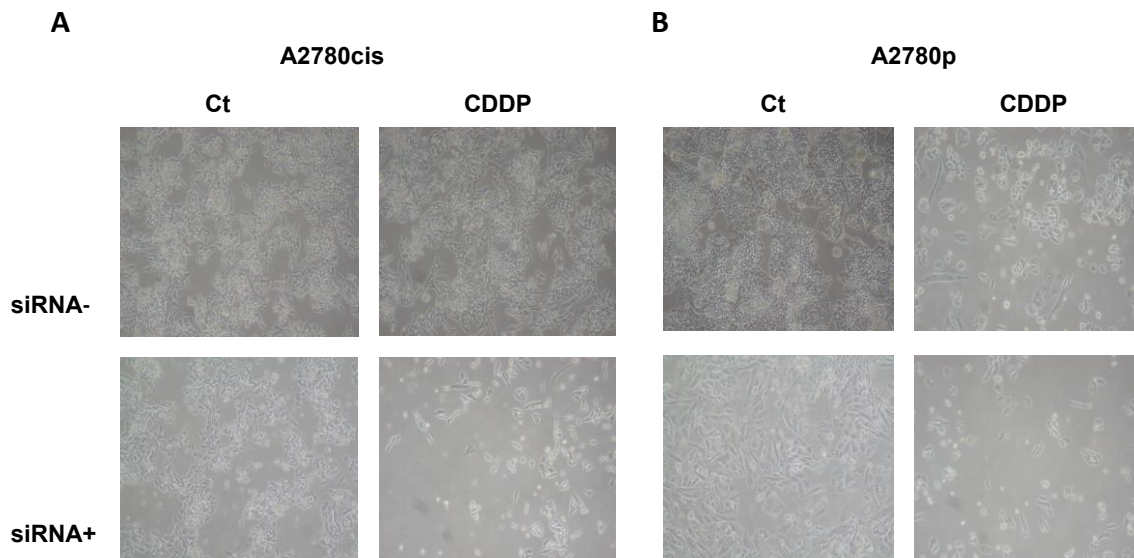


Figura R2.18. Morfologia cel·lular de les línies transfectades amb siRNA de Survivina i tractades amb CDDP. A2780cis (A) i A2780p (B) transfectades amb siRNA control (siRNA-) i siRNA de Survivina (siRNA+). Després de 24 hores de transfecció, ambdues línies van ser no tractades (Ct), tractades amb CDDP (3,5  $\mu$ M), durant 48 hores (10X).

### 2.2.9 Anàlisi de la senescència després dels tractaments simples i doble tractament

En anteriors resultats s'ha observat que el doble tractament generava aturada de cicle cel·lular en fase G2/M i augment de la proteïna p21, respecte el tractament amb CDDP. Està descrit que la Nut3a indueix senescència i pèrdua del potencial proliferatiu a diverses línies cel·lulars (Efeyan *et al.* 2007; Kumamoto *et al.* 2008; Lehmann *et al.* 2007; Villalonga-Planells *et al.* 2011). Es va procedir a estudiar si l'aturada del cicle cel·lular observada a les línies cel·lulars de CaOV era irreversible, és a dir, si la Nut3a era capaç de promoure senescència. Es va procedir a analitzar la senescència mitjançant la tinció de SA- $\beta$ GAL.

Les línies cel·lulars es van tractar amb els tractaments simples i doble durant 72 hores i posteriorment es va realitzar una tinció amb SA- $\beta$ GAL. Per confirmar que les cèl·lules havien parat de proliferar de forma irreversible, les línies cel·lulars es van tractar durant 72 hores, es va retirar el medi, i es va afegir medi fresc durant 4 dies addicionals, sense presència de fàrmacs. Es va realitzar la tinció per SA- $\beta$ GAL per a comprovar si continuaven presentant característiques suggestives de senescència.



Les cèl·lules no van presentar marcatge per AS- $\beta$ GAL en cap dels tractaments ni a les 72 hores (Fig.R2.19A) ni a les 72 hores + 4 dies de rentat (Fig.R2.19B). La línia A2780p va disminuir la confluència cel·lular després del tractament amb CDDP, assolint la morfologia típica d'apoptosi, sense haver marcatge per AS- $\beta$ GAL, mentre que la línia A2780cis es va mantenir com el control. Amb Nut3a no es va observar marcatge per AS- $\beta$ GAL en cap d'ambdues línies cel·lulars, ni a les 72 hores ni a les 72 hores + 4 dies, tanmateix les cèl·lules presentaven morfologia apoptòtica. Amb el doble tractament, va disminuir considerablement la confluència cel·lular a ambdues línies cel·lulars, amb una morfologia típicament apoptòtica, amb moltes cèl·lules flotants sense marcatge per AS- $\beta$ GAL en cap dels temps. Així doncs, en cap dels tractaments les cèl·lules van assolir morfologia típica de senescència, la qual es caracteritza per ser una morfologia cel·lular estesa i plana.

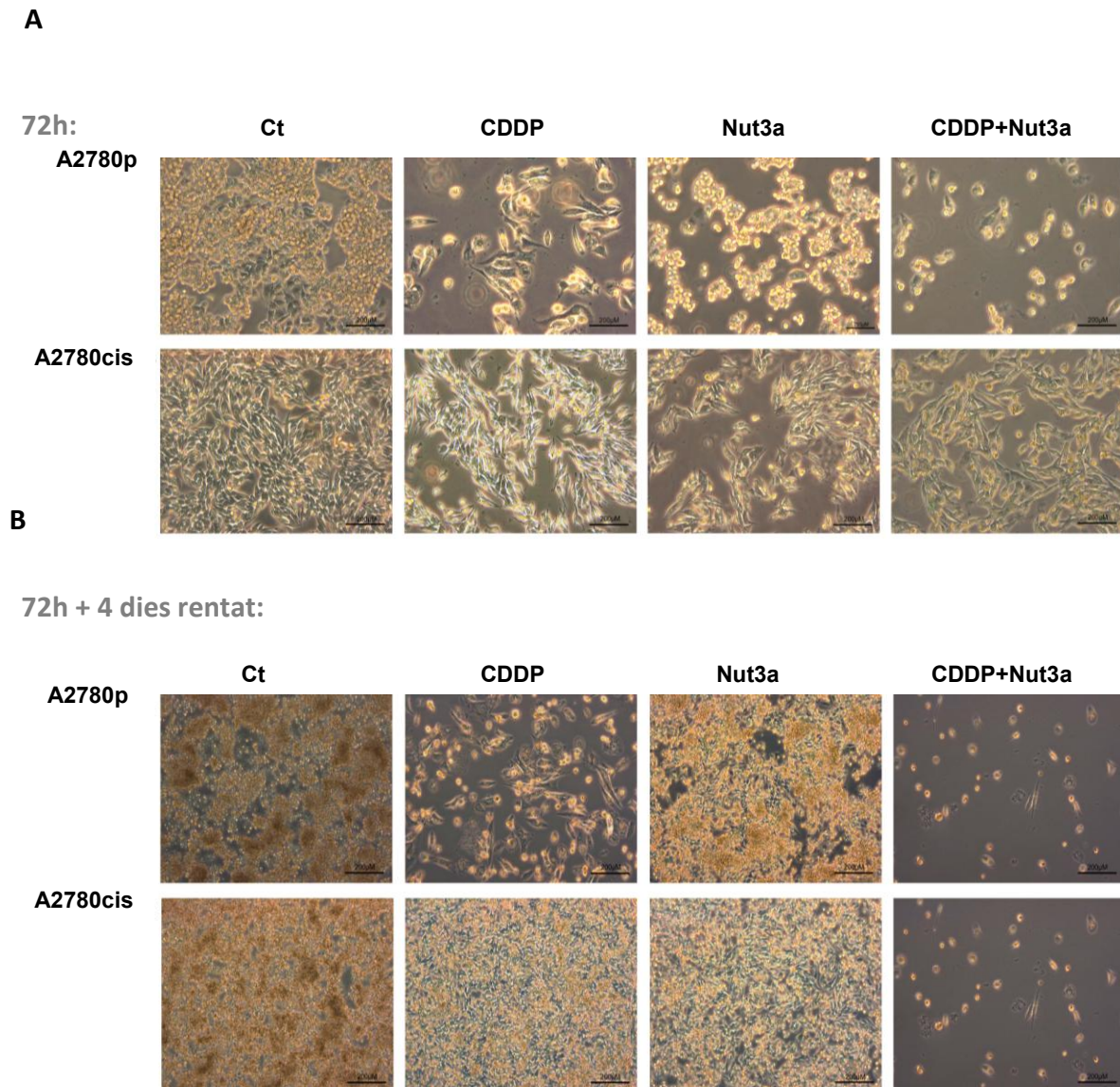


Figura R2.19. Anàlisi de la senescència cel·lular de les línies de CaOV. A2780p i A2780cis marcades amb AS- $\beta$ GAL després de ser tractades. Ambdues línies van ser no tractades (Ct), tractades amb CDDP (3,5  $\mu$ M), Nut3a (5  $\mu$ M) o doble tractament (5  $\mu$ M de Nut3a + 3,5  $\mu$ M de CDDP) durant 72 hores i marcades amb AS- $\beta$ GAL (20X)(A). Cèl·lules 72 hores després dels tractaments, més 4 dies addicionals sense presència de fàrmacs i posterior marcatge amb AS- $\beta$ GAL (10X)(B).

Aquests resultats indicaven que la Nut3a sensibilitzava a les cèl·lules al CDDP mitjançant aturada en la fase G2/M del cicle cel·lular, i posterior entrada en apoptosi, sense haver aturada del cicle cel·lular irreversible o senescència cel·lular.

## 2.3 Efecte de la Nut3a en cultius primaris

### 2.3.1 Sensibilització dels cultius primaris al cisplatí

Per tal d'analitzar l'efecte *ex vivo* de l'inhibidor de Mdm2 Nut3a en cultius primaris de CaOV, es van utilitzar cultius primaris establerts al laboratori a partir de mostra tumoral o líquid ascític (LASC). L'estat de TP53 es va analitzar per seqüenciació, i els que van ser TP53 salvatges van ser escollits per analitzar la resposta a la Nut3a i la sensibilització al CDDP (Fig.R2.20). Aquests cultius primaris es van incubar amb els tractaments simples i doble (seguint l'esquema de la Fig.R2.2). Es va realitzar el contacte cel·lular i es va avaluar la inducció d'apoptosi amb Annexina V. Es van considerar cèl·lules apoptòtiques les Annexina positives (AnV<sup>+</sup>/IP<sup>+/-</sup>).

	#9	LASC#9	#10	#13	#17	#18	#33	#34
Tipus Histològic	Endometrioide	Serós	Mucinos	Serós postquímio	Serós <i>borderline</i>	Serós	Mucinos	Endometrioide
Estadi	III	III	II	III	I	III	I	III
p53	Salvatge	Salvatge	Salvatge	Salvatge	Salvatge	Salvatge	Salvatge	Salvatge

Figura R2.20. Cultius primaris usats pels tractaments amb Nut3a. Tipus histològic, estadi i estat de p53.

Analitzant la morfologia cel·lular, alguns cultius primaris (LASC#9, #10, #13, #18, #33, #34) van disminuir de confluència cel·lular amb el tractament amb CDDP, amb cèl·lules desenganxades de la placa, vacuolització citoplasmàtica i aspecte arrodonit, morfologia típica de mort per apoptosi; d'altres cultius primaris no van experimentar canvis respecte el control (#9, #17) (Fig.R2.21). Així doncs, alguns primaris podien ser més sensibles al CDDP que d'altres. El tractament amb Nut3a va generar disminució del nombre de cèl·lules respecte el control a la majoria dels cultius primaris, presentant una morfologia típica d'apoptosi, on la majoria de cèl·lules tenien un aspecte arrodonit i estaven flotant. El doble tractament va potenciar aquest efecte; tots els primaris presentaven molt poca confluència cel·lular respecte el control, amb una morfologia apoptòtica (Fig.R2.21).

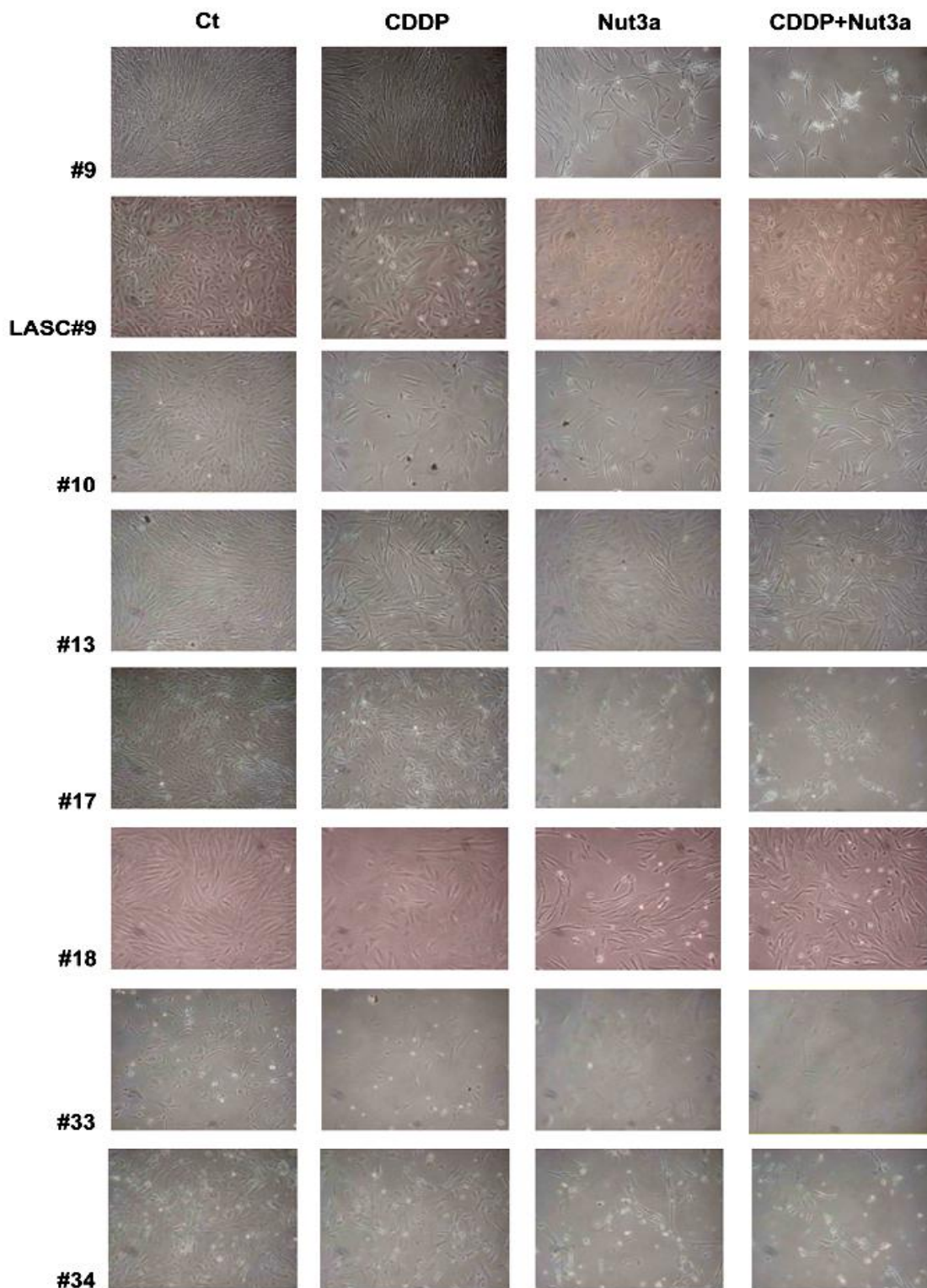


Figura R2.21. Canvis morfològics dels cultius primaris després dels tractaments simples i doble tractament. Els cultius van ser no tractats (Ct), tractats amb CDDP (3,5  $\mu$ M), Nut3a (5  $\mu$ M) o doble tractament durant 72 hores (10X).

Calculant la mitjana del nombre de cèl·lules de tots els primaris per cada tractament, es va poder comparar la disminució del nombre de cèl·lules que cada tractament generava respecte el control. El CDDP va generar una mitjana de

disminució del 40%, la Nut3a del 50% i el doble tractament del 70%. El doble tractament estava disminuint el nombre de cèl·lules molt més que els tractaments simples amb CDDP o Nut3a (Fig.R2.22A).

Analitzant l'apoptosi, es va observar que el tractament amb CDDP augmentava l'apoptosi respecte els controls en alguns primaris més que en d'altres (Fig.R2.22B). La mitjana d'apoptosi de tots els cultius primaris per a cada tractament, va ser del 11% ± 5 (DMSO), 20% ± 6,6 (CDDP), 30% ± 19 (Nut3a), i del 36% ± 22 (doble tractament) (Fig.R2.22B). L'apoptosi del tractament doble era generada, en gran part, per efecte de la Nut3a, indicant que la majoria dels cultius primaris de CaOV presentaven sensibilitat a la Nut3a (Fig.R2.22B). No es va veure l'efecte sinèrgic observat amb les línies cel·lulars.

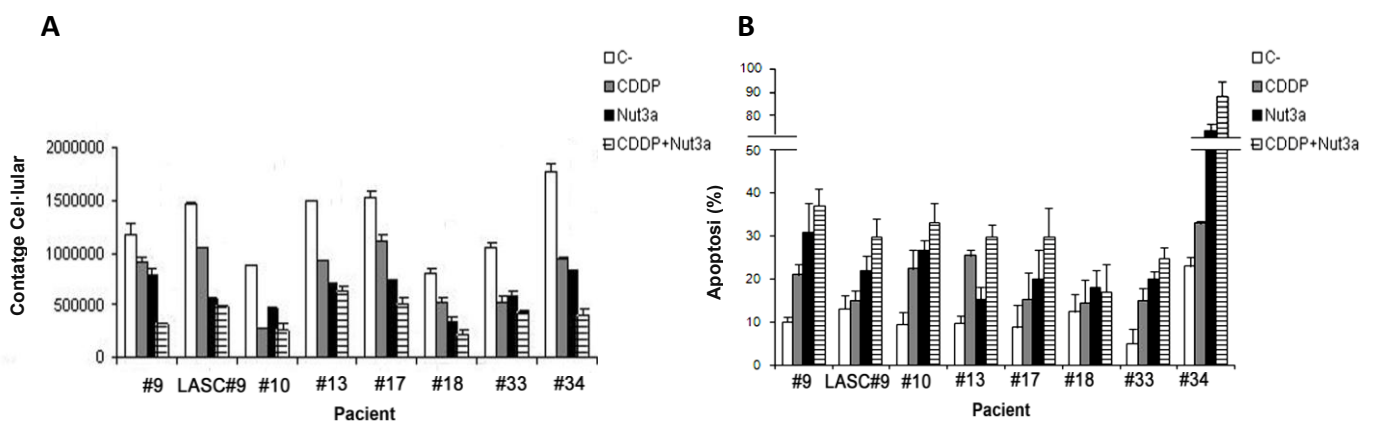


Figura R2.22. Contatge cel·lular i inducció d'apoptosi dels cultius primaris després dels tractaments simples i doble tractament. Contatge cel·lular (A) i apoptosi (B) dels primaris no tractats (Ct), tractats amb CDDP (3,5 µM), Nut3a (5 µM) o doble tractament (5 µM de Nut3a + 3,5 µM de CDDP) durant 72 hores.

### 2.3.2 Inducció de senescència després dels tractaments simples i doble tractament

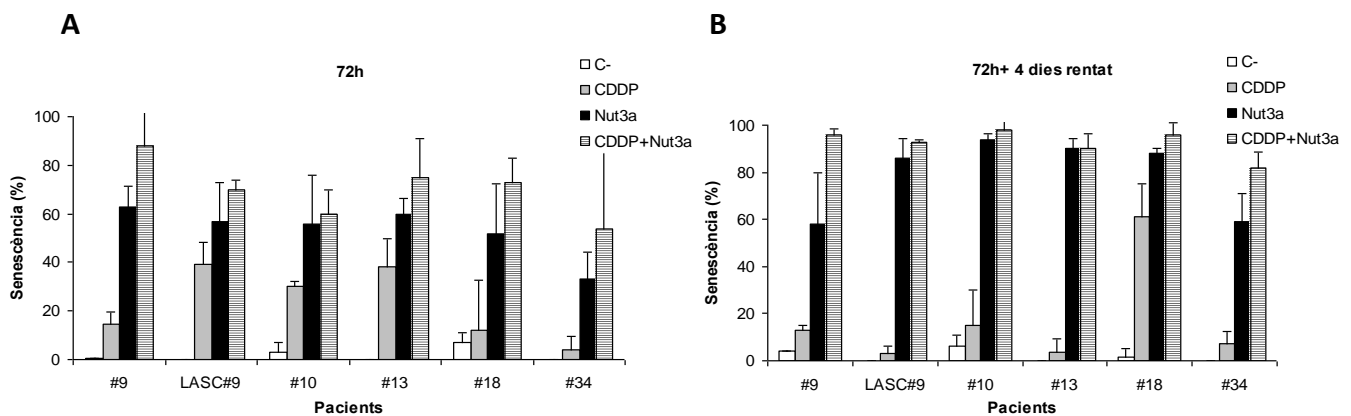
Amb el contatge cel·lular es va observar que el doble tractament disminuïa el nombre de cèl·lules respecte el control un 70%, mentre que els valors d'apoptosi en el doble tractament incrementaven respecte el control un 25%. Això indicava que un altre mecanisme podia estar disminuint el nombre de cèl·lules en el doble tractament. Per això es va procedir a analitzar l'aturada irreversible del cicle cel·lular o senescència, mitjançant la tinció amb SA-βGAL.

Dels cultius primaris que s'havia analitzat el contacte cel·lular i l'apoptosi, es va realitzar l'estudi de senescència en 6 d'ells (#9, LASC#9, #10, #13, #18 o #34) degut a la manca de mostra dels altres. Els cultius primaris es van tractar amb els tractaments simples i doble i es va realitzar una tinció per SA- $\beta$ GAL per comprovar si presentaven característiques de senescència a les 72 hores de tractament.

A les 72 hores, els diferents tractaments generaven senescència, mentre que el control escassament en presentava. El tractament amb CDDP va generar diferent senescència segons el cultiu primari, sent la mitjana per a tots ells del  $23\% \pm 15$ . El cultiu #10 va ser el que menys senescència va presentar amb presència de CDDP, mentre que els cultius LASC#9 i #13 van ser els que més (Fig.R2.23A). El tractament amb Nut3a va generar una senescència bastant elevada en tots els cultius, sent la mitjana de tots ells del  $53,5\% \pm 11$ , sent el cultiu primari #34 el de menys senescència ( $33\% \pm 11$ ), en el qual la disminució del nombre de cèl·lules va ser generada majoritàriament per apoptosi (Fig.R2.22B). El doble tractament va augmentar significativament la senescència a tots els cultius analitzats, sent la mitjana de tots ells del  $70\% \pm 12$ . El doble tractament va generar més senescència que els tractaments simples, amb una significància estadística de  $p=0,030$  (Nut3a) i  $p=0,0001$  (CDDP) (Fig.R2.23A). Les imatges de les cèl·lules marcades amb SA- $\beta$ GAL al microscopi òptic (Fig.R2.24) van confirmar els valors de senescència. Alguns primaris amb el tractament amb CDDP, Nut3a i sobretot amb el doble tractament, van adoptar una morfologia més estesa i plana, suggestiva de senescència, ja que també van ser positives pel marcador SA- $\beta$ GAL. La Nut3a estava induint senescència als cultius primaris de CaOV, potenciant-se quan es tractava amb CDDP conjuntament.

Per tal de confirmar que els cultius primaris adquirien característiques senescent de forma irreversible, es van tractar amb els diferents tractaments durant 72 hores, es van eliminar els fàrmacs del medi i es va afegir medi fresc durant 4 dies. A continuació es va realitzar la tinció per SA- $\beta$ GAL per comprovar si continuaven presentant característiques suggestives de senescència. Amb el tractament amb CDDP va disminuir la senescència respecte les 72 hores d'incubació en la majoria d'ells, excepte en el cultiu primari #18, que va augmentar. Amb Nut3a i doble tractament la

senescència va augmentar respecte les 72 hores d'incubació. La mitjana de cèl·lules positives per SA-βGAL de tots els cultius en els diferents tractaments va ser del 17% ± 22 (CDDP), 80% ± 16 (Nut3a), i 93% ± 2,3 (doble tractament), indicant que la Nut3a era la responsable de la senescència del doble tractament (Fig.R2.23B). Comparant el marcatge de SA-βGAL del doble tractament respecte el CDDP, la senescència va augmentar de forma significativa ( $p < 0,0001$ ) (Fig.R2.23B). Les imatges del microscopi òptic (Fig.R2.25) van demostrar que les cèl·lules tractades amb Nut3a i doble tractament van continuar sent positives per SA-βGAL, mostrant una morfologia estesa i plana suggestiva de senescència, tot i haver retirat els fàrmacs. La Nut3a estava induint senescència als cultius primaris de CaOV, la qual es mantenia després d'haver retirat els fàrmacs, fet que evidenciava la senescència irreversible adquirida.



**Figura R2.23.** Anàlisi de la senescència cel·lular dels cultius primaris després dels tractaments simples i doble tractament. Els cultius primaris van ser no tractats (Ct), tractats amb CDDP (3,5 μM), Nut3a (5 μM) o doble tractament (5 μM de Nut3a + 3,5 μM de CDDP) durant 72 hores i marcats amb SA-βGAL (A). Cèl·lules després de 72 hores de tractament, més 4 dies addicionals sense presència de fàrmacs i posterior marcatge amb SA-βGAL (B). Les gràfiques representen la mitjana de 5 camps (com a mínim) ± desviació estàndar.

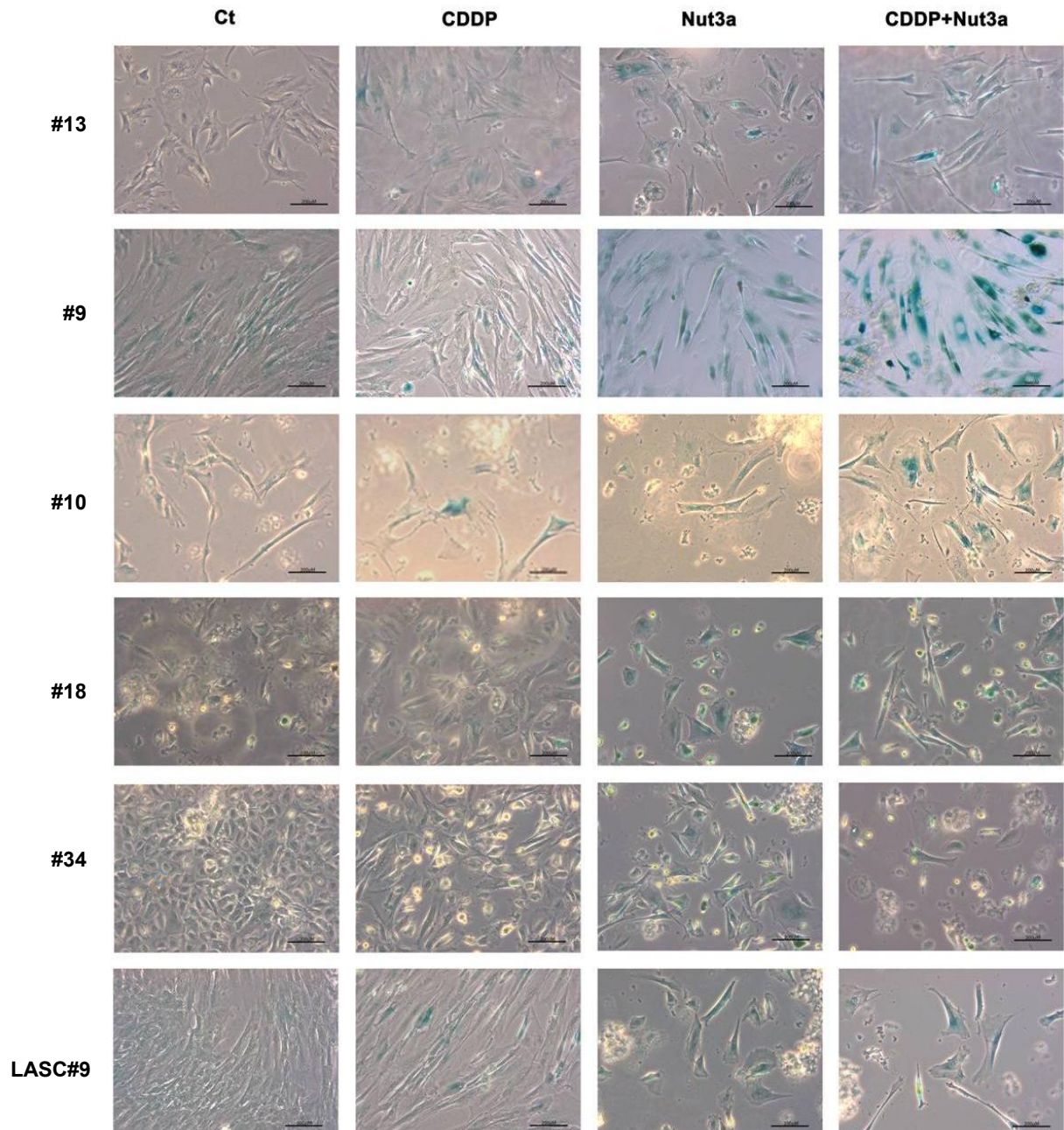


Figura R2.24. Senescència cel·lular dels cultius primaris després dels tractaments simples i doble tractament a les 72 hores. Els cultius primaris van ser no tractats (Ct), tractats amb CDDP (3,5  $\mu$ M), Nut3a (5  $\mu$ M) o doble tractament (5  $\mu$ M de Nut3a + 3,5  $\mu$ M de CDDP) durant 72 hores i marcats amb AS- $\beta$ GAL (10X).



72h + 4 dies rentat:

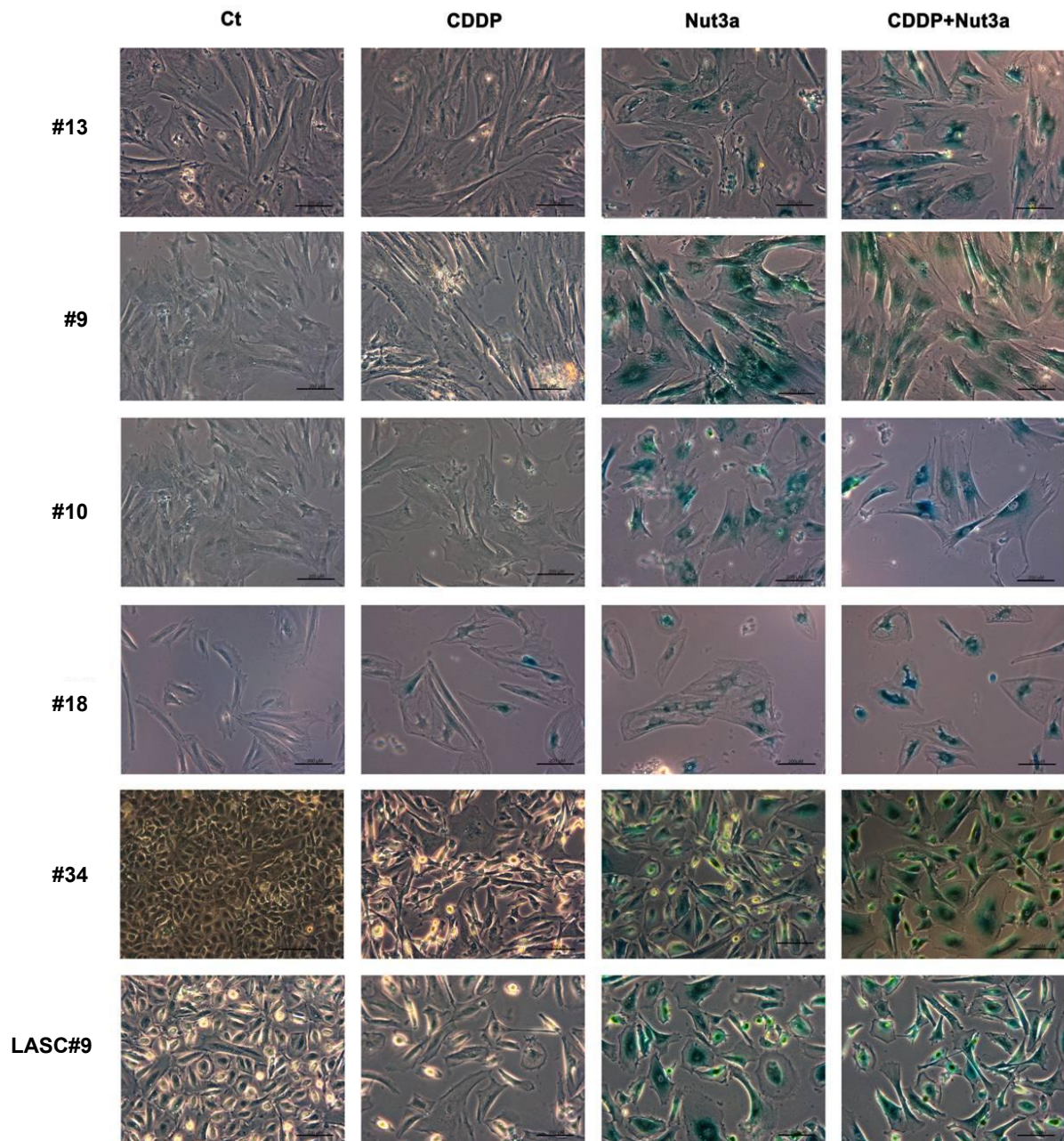


Figura R2.25. Senescència cel·lular dels cultius primaris després dels tractaments simples i doble tractament a les 72 hores + 4 dies de rentat. Els cultius primaris van ser no tractats (Ct), tractats amb CDDP (3,5  $\mu$ M), Nut3a (5  $\mu$ M) o doble tractament (5  $\mu$ M de Nut3a + 3,5  $\mu$ M de CDDP) durant 72 hores + 4 dies addicionals sense presència de fàrmacs i marcatge amb AS- $\beta$ GAL (10X).

### 2.3.3 Anàlisi dels gens pro- i anti-apoptòtics en els cultius primaris després dels tractaments simples i doble tractament

Per estudiar la inducció d'apoptosi dependent de p53 després dels tractaments simples i doble en els cultius primaris, es va procedir a analitzar el perfil de gens relacionats amb l'apoptosi mitjançant RT-MLPA. Es van tractar els cultius primaris #34 i #17 sense fàrmac (DMSO), CDDP, Nut3a i doble tractament segons l'esquema de la Fig.R2.2 durant 48 hores després d'afegir el CDDP. A continuació es va extreure el RNA i es va analitzar el perfil de gens relacionats amb l'apoptosi mitjançant RT-MLPA .

Els resultats del RT-MLPA mostraven que en ambdós cultius, CDKN1A (p21) augmentava amb el doble tractament comparat amb el tractament amb CDDP, de la mateixa manera que els gens pro-apoptòtics i dianes de p53: NOXA, PUMA i BAX. També APAF-1 va augmentar considerablement respecte el tractament amb CDDP. Els gens anti-apoptòtics BCL-2 i SURVIVINA van disminuir de forma considerable amb el doble tractament, molt més que amb el tractament amb CDDP (Fig.R2.26).

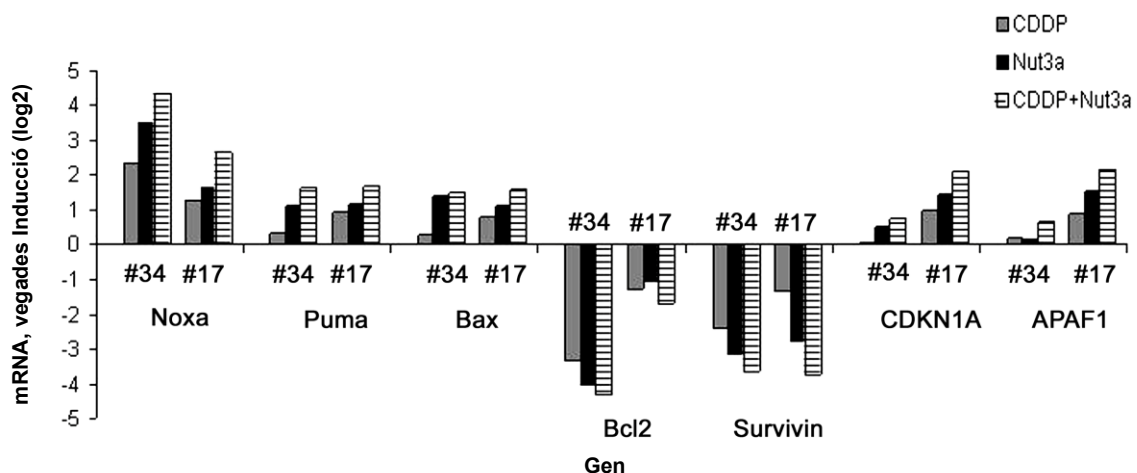


Figura R2.26. MLPA dels cultius primaris després dels tractaments simples i doble tractament. Els primaris #34 i #17 van ser no tractats (Ct), tractats amb CDDP (3,5  $\mu$ M), Nut3a (5  $\mu$ M) o doble tractament (5 $\mu$ M de Nut3a +3,5  $\mu$ M de CDDP) durant 48 hores. Quantificació de mRNA expressada en logaritme en base 2 de l'increment relatiu en relació al control. El gen normalitzador usat va ser GUSB.

Amb aquests resultats es va demostrar que el doble tractament estava incrementant l'expressió dels gens pro-apoptòtics i disminuint els nivells de BCL-2 i SURVIVINA de forma significativa respecte el tractament amb CDDP, fet que evidenciava el paper sinèrgic d'ambdós fàrmacs i l'efecte sensibilitzador de la Nut3a al CDDP també en els cultius primaris de CaOV.

### 2.3.4 Expressió proteica dels cultius primaris després dels tractaments simples i doble tractament

Per confirmar que els canvis observats a nivell de mRNA es corresponien amb els canvis en l'expressió proteica, es va analitzar el perfil proteic dels cultius primaris #34, #17, #9 i #13, després dels tractaments simples i doble (Fig.R2.2) durant 72 hores.

Els resultats dels *western blot* van mostrar que els tumors amb TP53 salvatge responien als tractaments amb Nut3a i doble tractament, induint l'acumulació de la proteïna p53, la inducció de p21 i l'estabilització de Mdm2 (Fig.R2.27). De la mateixa manera van augmentar les proteïnes pro-apoptòtiques i dianes de p53 Noxa, Puma i Bax, l'expressió de les quals va augmentar considerablement amb el doble tractament. Per altra banda, les proteïnes anti-apoptòtiques Bcl-2 i Survivina van disminuir amb la Nut3a i doble tractament en tots els cultius analitzats. De forma interessant, el tractament doble va disminuir de forma considerable els nivells proteics de Survivina en tots els cultius primaris, fet concomitant amb la baixada de viabilitat (Fig.R2.27).

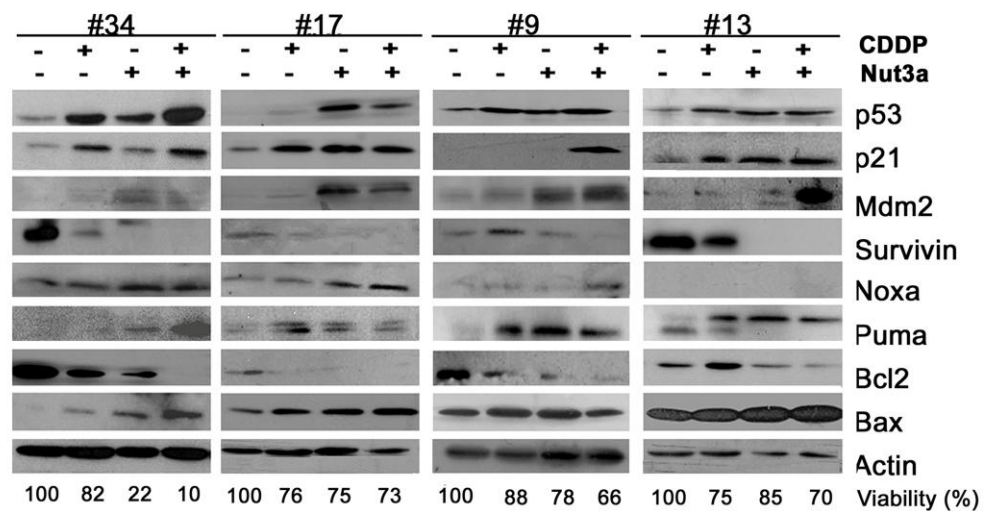


Figura R2.27. Efecte dels tractaments simples i doble tractament a cultius primaris de CaOV. Els cultius primaris van ser no tractats (Ct), tractats amb CDDP (3,5 µM), Nut3a (5 µM) o doble tractament (5 µM de Nut3a + 3,5 µM de CDDP) durant 72 hores. La tubulina es va usar com a control de càrrega. La viabilitat mostrada de cada tractament és referenciada al control.

Així doncs, els resultats van demostrar que la combinació Nut3a+CDDP sensibilitza a les cèl·lules resistents al CDDP, conduint-les cap a mort (apoptosi) o senescència.

## Objectiu 3. Efecte de l'inhibidor de la Survivina YM155 en línies cel·lulars, cultius primaris i xenoinjerts de CaOV

### 3.1 Introducció

Els membres de la família dels inhibidors de l'apoptosi (IAP) són reguladors negatius de l'apoptosi que suprimeixen l'activació de les caspases. La Survivina és el membre més petit de la família de les IAP, la qual es troba absent o mínimament expressada en la majoria dels teixits adults normals i diferenciats, però altament expressada en la majoria dels càncers. S'ha demostrat que la Survivina no només suprimeix l'apoptosi cel·lular, sino que també promou la progressió mitòtica precisa (Altieri 2008; Mita *et al.* 2008; Ryan *et al.* 2009). La Survivina és doncs, un objectiu atractiu pel tractament del càncer, i l'ús de petites molècules antagòniques que inhibeixen la seva expressió és una de les estratègies pel tractament de tumors malignes.

L'YM155 és un compost basat en imidazolium que bloqueja eficaçment l'expressió de Survivina mitjançant la inhibició del seu promotor (Nakahara *et al.* 2007). L'YM155 indueix la mort en cèl·lules tumorals *in vitro*, observant-se una major activitat antitumoral en les línies derivades de limfoma de no Hodking, càncer de pròstata hormono-dependent, càncer d'ovari, sarcoma, càncer de pulmó de cèl·lula gran, càncer de mama, leucèmia i melanoma (Nakahara *et al.* 2011a). Indueix la regressió del tumor de limfoma, càncer de pròstata i càncer de pulmó de cèl·lules gran *in vivo* (Iwasa *et al.* 2008; Nakahara *et al.* 2007). També s'ha demostrat que l'YM155 genera dany al DNA en un ventall de línies cel·lulars (Glaros *et al.* 2012). Actualment l'YM155 està en assajos clínics de fase I i II, els quals demostren que el compost pot ser administrat de forma segura, sense aparició d'una toxicitat severa. En alguns pacients es mostra reducció tumoral analitzada per tomografia computeritzada (Satoh *et al.* 2009; Giaccone *et al.* 2009; Lewis *et al.* 2011). Com a monoteràpia, l'YM155 és ben tolerat, encara que presenta una modesta activitat antitumoral. L'YM155 podria

oferir una opció atractiva en la teràpia combinada amb els quimioterapèutics convencionals, entre ells el CDDP en el CaOV (Yamanaka *et al.* 2011, Iwasa *et al.* 2010).

## 3.2 Efecte de l'YM155 en línies cel·lulars

### 3.2.1 Disminució de la viabilitat cel·lular de forma dosi/temps dependent

Per conèixer el comportament de les línies de CaOV en presència de l'YM155, es va realitzar un estudi de dosi/temps resposta amb les línies A2780p i A2780cis. Les cèl·lules es van plaquejar en plaques de 96 pous i a les 24 hores, quan la confluència va ser del 60%, es van tractar amb dosi creixents d'YM155 (2,5-400 nM), i es va realitzar l'anàlisi de viabilitat mitjançant l'assaig del MTT a les 24, 48 i 72 hores. La dosi 0nM va ser amb incubació amb DMSO (vehicle) i es va considerar el control.

El tractament amb l'YM155 va induir una disminució de la viabilitat temps i dosi-dependent en ambdues línies. La disminució de la viabilitat cel·lular va començar a ser visible a les 24 hores d'exposició, sent molt més alta a les 48 hores (Fig.R3.1). A les 72 hores s'observaven moltes cèl·lules necròtiques. Així doncs es va considerar com el millor temps d'anàlisi les 48 hores. La IC<sub>50</sub> a les 48 hores, va ser de 4 nM per la línia A2780p i 13,75 nM per la línia A2780cis.

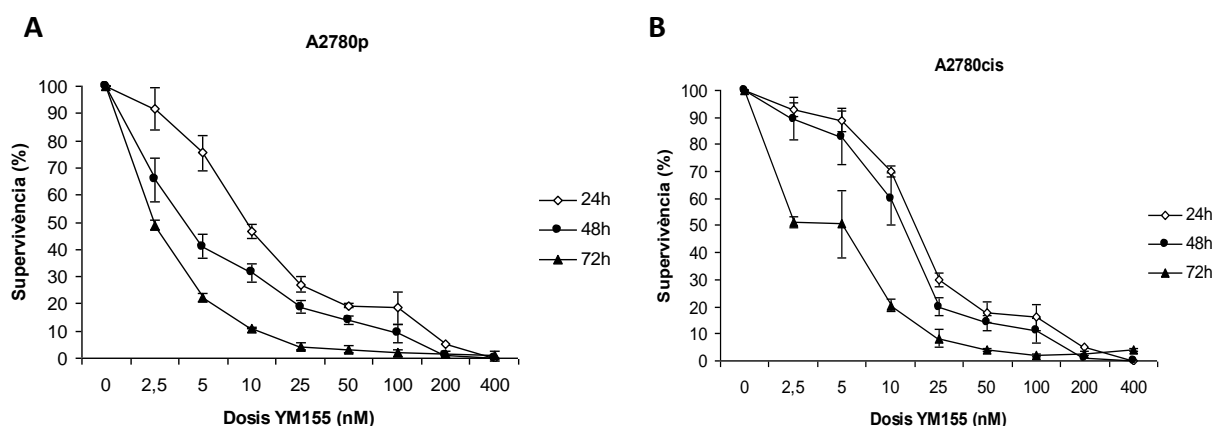


Figura R3.1. Viabilitat cel·lular per assaig de MTT en línies cel·lulars de CaOV tractades amb YM155. A2780p (A) i A2780cis (B) tractades amb dosi creixents d'YM155 amb un període de tractament de 24, 48 i 72h. La gràfica és la mitjana de 3 experiments independents  $\pm$  desviació estàndard.

### 3.2.2 Inducció d'apoptosi

Per tal d'avaluar quina era la causa de la disminució de la viabilitat observada en el MTT, les línies A2780p i A2780cis es van tractar amb dosi creixents d'YM155 (0-100 nM) durant 48 hores, on la dosi 0 nM era DMSO (vehicle) i es va considerar com a control. Quan les cèl·lules es van observar en el microscopi òptic, es va evidenciar una disminució del nombre de cèl·lules respecte al control tractat amb el vehicle, un increment de cèl·lules arrodonides, increment de vacuolització citoplasmàtica i cèl·lules amb tendència a desenganxar-se de la placa. Aquest arrodoniment i vacuolització cel·lular suggeria l'inici d'un procés de mort cel·lular del tipus apoptòtic (Fig.R3.2). La disminució del nombre de cèl·lules i els canvis morfològics que s'originaven van ser dosi-dependents.

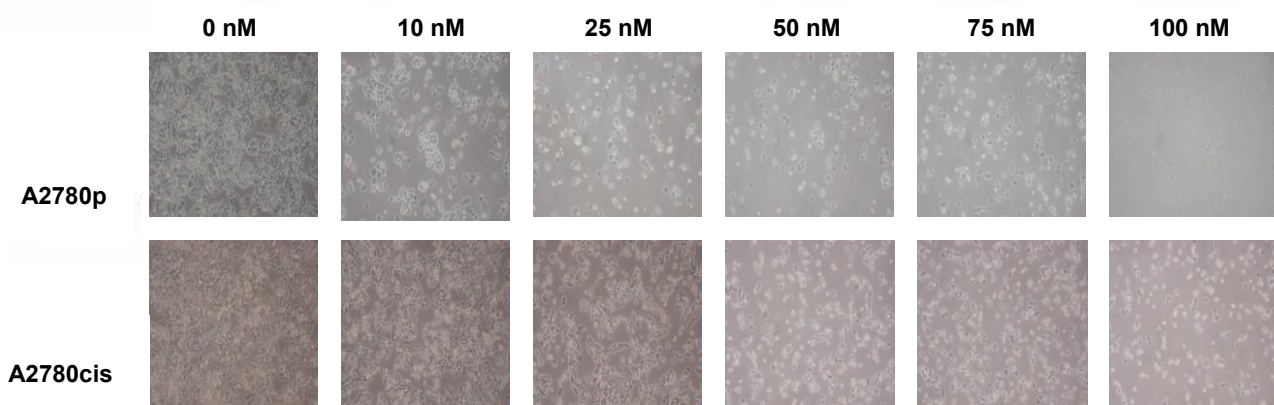


Figura R3.2. Canvis morfològics de les A2780p i A2780cis després de 48 hores d'exposició amb dosis creixents d' YM155 (0-100 nM) (10X).

Donat que els canvis morfològics observats indicaven que hi havia mort cel·lular, es va procedir a analitzar el tipus de mort, i es va començar per analitzar l'apoptosi. Quan les cèl·lules estaven amb una confluència del 60% es van tractar amb dosis creixents d'YM155 durant 24 i 48 hores. Després del tractament, es va efectuar el comptatge cel·lular i es va observar disminució del nombre de cèl·lules. A continuació es va avaluar la inducció d'apoptosi mesurada per Annexina V. Es van considerar cèl·lules apoptòtiques les Annexina V<sup>+</sup>/IP<sup>-/+</sup> (apoptosi temprana i tardana).

El nombre de cèl·lules després del tractament amb dosis creixents d'YM155 disminuïa significativament a ambdues línies cel·lulars en relació al control (DMSO) de

forma temps/dosi dependent, observant-se tant a les 24 com a les 48 hores d'incubació, sent molt més significatiu a les 48 hores (Fig.R3.3).

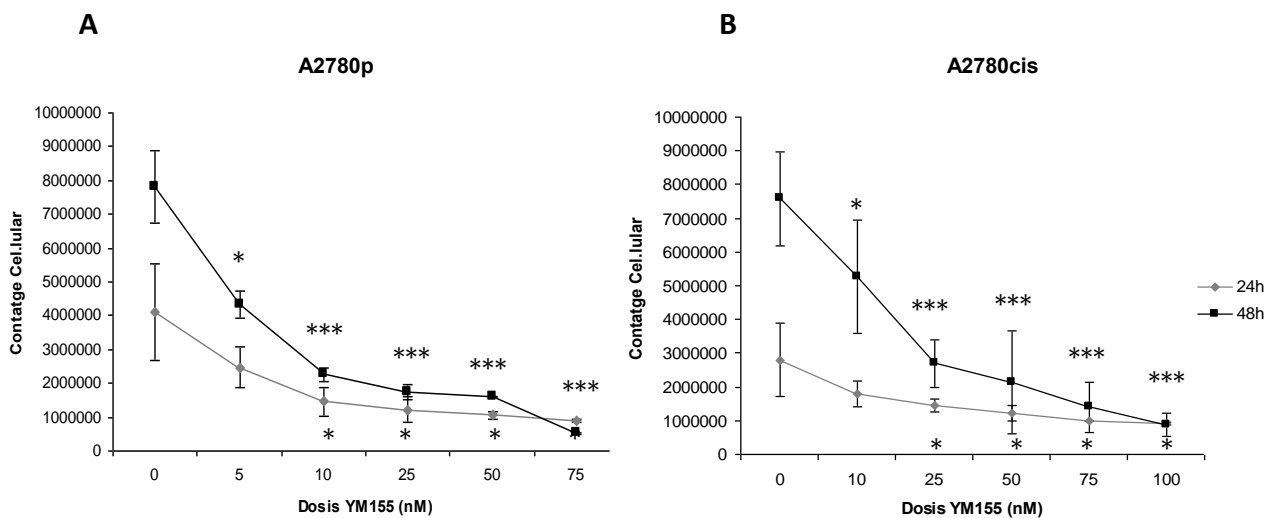


Figura R3.3. Contatge cel·lular després del tractament amb YM155 de les línies cel·lulars A2780p (A) i A2780cis (B). Ambdues línies van ser tractades amb dosis creixents d'YM155 i contades 24 i 48 hores després del tractament. La dosi 0 nM indica els controls no tractats (DMSO). Les gràfiques representen la mitjana de tres experiments independents  $\pm$  desviació estàndard \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$  (T-Student).

L'anàlisi amb Anexina V va demostrar que el tractament amb YM155 induïa mort tipus apoptosi de forma temps/dosi dependent al comparar-ho amb els controls tractats amb DMSO, sent màxima a les 48 hores d'incubació (Fig.R3.4). A la línia A2780p, la inducció d'apoptosi a les 24 hores d'incubació amb YM155 va ser estadísticament significativa en relació al control a dosis altes, sent del  $10\% \pm 1$  (50 nM) i del  $15\% \pm 2$  (100 nM) ( $p=0,026$ ;  $p=0,049$ , respectivament). A les 48 hores, la inducció d'apoptosi va ser estadísticament significativa en relació al control ja a dosis baixes d'YM155, sent del  $12\% \pm 2,5$  (5 nM) i del  $21\% \pm 5$  (10 nM) ( $p=0,023$ ;  $p=0,020$ , respectivament). A dosis més altes, l'apoptosi va augmentar al  $25\% \pm 8,5$  (25 nM) ( $p=0,0004$ ),  $42\% \pm 2$  (50 nM) ( $p < 0,0001$ ) i  $66\% \pm 1,5$  (100 nM) ( $p < 0,0001$ ). La  $IC_{50}$  d'apoptosi va ser de 65 nM a les 48 hores d'incubació amb YM155 (Fig.R3.4A). A la línia A2780cis, la inducció d'apoptosi a les 24h d'incubació amb YM155 no va ser estadísticament significativa a cap dosi, mentre que a les 48 hores sí que ho va ser ja a a dosis baixes, assolint valors de  $15\% \pm 4$  (10 nM) ( $p=0,045$ ). Incrementant la dosi, l'apoptosi va augmentar al  $21\% \pm 10$  (25 nM) ( $p=0,036$ ),  $25\% \pm 3,5$  (50 nM) ( $p=0,0019$ ),

54% ± 5,5 (75 nM) (p=0,0013) i 77% ± 8 (100 nM) (p=0,0005). La IC<sub>50</sub> d'apoptosi va ser de 70 nM a les 48 hores d'incubació amb YM155 (Fig.R3.4B).

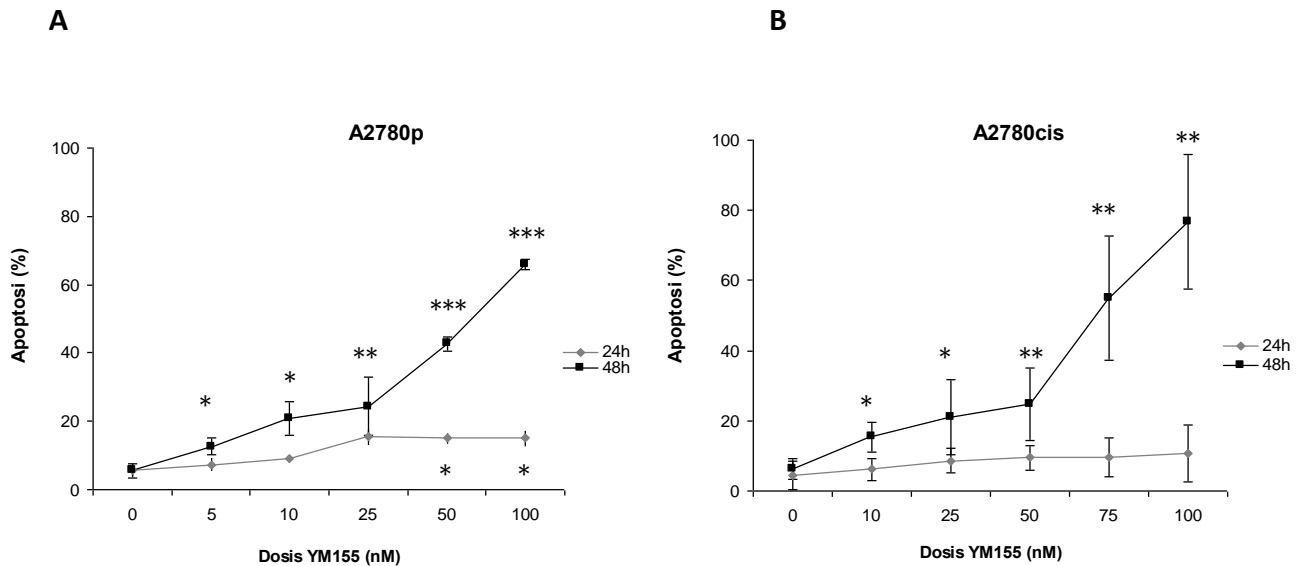


Figura R3.4. Inducció d'apoptosi després del tractament amb YM155 en línies cel·lulars de CaOV. Les línies cel·lulars A2780p (A) i A2780cis (B) van ser tractades amb dosis creixents d'YM155 i contades 24 i 48 hores després del tractament. La dosi 0 nM indica els controls no tractats (DMSO). Les gràfiques representen la mitjana de tres experiments independents ± desviació estàndard \*p<0,05;\*\*p<0,005;\*\*\*p<0,0005 (T-Student).

En cap de les dues línies cel·lulars es va detectar necrosi amb el tractament d'YM155 (resultats no mostrats).

### 3.2.3 Canvis en el patró del cicle cel·lular

La Survivina té una expressió dependent de cicle cel·lular. En la majoria de cèl·lules, l'expressió de Survivina es troba restringida a la fase G2/M del cicle cel·lular (es troba controlada transcripcionalment), i s'hipotetitzava que és per inhibir l'apoptosi durant la mitosi (Kanwar *et al.* 2010). Juntament amb les proteïnes Aurora B quinasa i INCENP, forma el *Chromosome Passenger Complex* (CPC), el qual juga un paper en la segregació cromosòmica i la citocinesi durant la divisió cel·lular. L'abolició funcional de la Survivina provoca alteracions a la fase de la mitosi que acaben provocant inestabilitat cromosòmica i catàstrofe mitòtica (Yamamoto *et al.* 2008).

Durant la realització dels experiments de viabilitat cel·lular i apoptosi, es va observar una diferència important entre els valors de IC<sub>50</sub> (MTT), la disminució del nombre de cèl·lules i la inducció d'apoptosi, que suggeria que l'YM155 podria estar



induint canvis en el cicle cel·lular. Per avaluar l'efecte de l'YM155 sobre el perfil del cicle cel·lular, ambdues línies van ser tractades amb dosis creixents de YM155 (0 a 100 nM) i es va analitzar el patró de cicle cel·lular a les 24 i 48 hores.

L'anàlisi del cicle cel·lular va mostrar lleugeres variacions dosi-dependent a ambdues línies cel·lulars pel que fa a la fase G2/M, variacions que es van iniciar a les 24 hores d'incubació, amb un lleuger augment de la fase G2/M respecte el control a totes les dosis d'YM155. El pic subdiploid va augmentar, però es va mantenir a partir de certes dosis. A les 48 hores, l'augment de la fase G2/M es va observar a dosis baixes fins a la dosi de 25 nM (a la línia A2780p) i a 50 nM (a la línia A2780cis), quan va començar a augmentar la proporció de cèl·lules apoptòtiques (augment del pic subdiploid) amb una conseqüent disminució de la fase G2/M (Fig.R3.5).

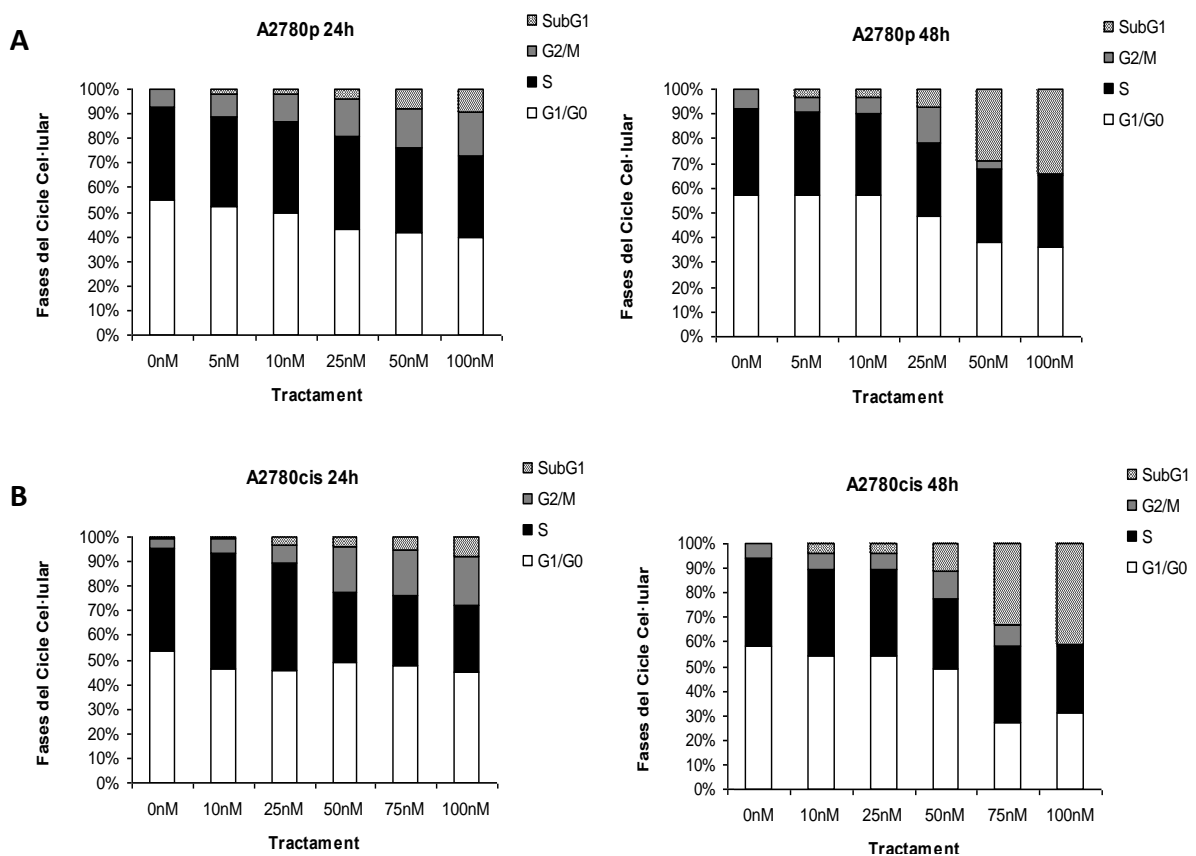


Figura R3.5. Cicle cel·lular després del tractament amb YM155 a la línia A2780p (A) i A2780cis (B) a les 24 i 48 hores. Ambdues línies van ser tractades amb dosi creixents d'YM155. La dosi 0 nM indica els controls no tractats (DMSO).

El perfil del cicle cel·lular d'ambdues línies cel·lulars incubades amb YM155 durant 24 hores va demostrar que l'inhibidor generava un lleuger augment de la fase

G2/M de forma dosi-dependent. A les 48 hores de tractament amb YM155 augmentava el pic subdiploid de forma dosi-dependent. El que aquests resultats suggerien era que l'YM155 estava aturant les cèl·lules a fase G2/M de forma dosi-dependent, i a continuació les feia entrar en apoptosi.

### 3.2.4 Disminució de l'expressió de Survivina temps-dependent

El tractament amb YM155 provoca una disminució de l'expressió de Survivina a través de la inhibició del seu promotor. Per confirmar que l'efecte de l'YM155 ocasionava una disminució dels nivells de Survivina a cèl·lules de CaOV, les línies es van exposar a una única dosi d'YM155 i es va analitzar l'expressió de mRNA de Survivina a diferents temps (de 30 minuts a 24 hores) mitjançant PCR quantitativa a temps real. Per corroborar que els nivells de Survivina disminuïen, es va procedir a analitzar els nivells proteics de Survivina a diferents temps (de 2 a 48 hores) mitjançant *western blot*, el qual es va quantificar mitjançant densitometria amb el *software* ImageJ (mirar apartat 4.3.3 de Materials i Mètodes). Per cada línia es va usar la dosi d'YM155 que induïa apoptosi al 50% de la població a les 48 hores (IC<sub>50</sub> apoptòtica), sent 65 nM per la línia A2780p i 70 nM per la línia A2780cis. Com a control, les cèl·lules es van tractar amb DMSO.

El tractament amb YM155 en ambdues línies cel·lulars va produir disminució de l'expressió del mRNA i dels nivells proteics de Survivina temps-dependent al comparar-ho amb els controls (Fig.R3.6). A la línia A2780p l'expressió de mRNA va disminuir de forma significativa en relació al control a partir de les 6 hores:  $0,75 \pm 0,03$  ( $p=0,010$ ), a les 12 hores  $0,47 \pm 0,12$  ( $p=0,027$ ) i a les 24 hores  $0,37 \pm 0,2$  ( $p=0,04$ ) (Fig.R3.6A). Amb la quantificació proteica es va observar disminució respecte el control (1), amb valors de 0,7 (6 hores), de 0,6 (12 hores), de 0,44 (24 hores) i 0,17 (48 hores) (Fig. R3.6C). A la línia A2780cis l'expressió de mRNA va començar a disminuir en relació al control a partir de les 3 i 6 hores sense ser estadísticament significatiu. A les 12 i 24 hores l'expressió va baixar significativament, sent a les 12 hores  $0,44 \pm 0,15$  ( $p=0,036$ ) i a les 24 hores  $0,28 \pm 0,07$  ( $p=0,0048$ ) (Fig.R3.6B). La quantificació proteica va coincidir amb l'expressió de mRNA: a les 6 hores no hi havia disminució de proteïna respecte el control (0,92), mentre que a partir de les 12 hores els nivells de proteïna

van començar a disminuir, amb valors de 0,7 (12 hores), 0,25 (24 hores) i 0,06 (48 hores) (Fig. R3.6C).

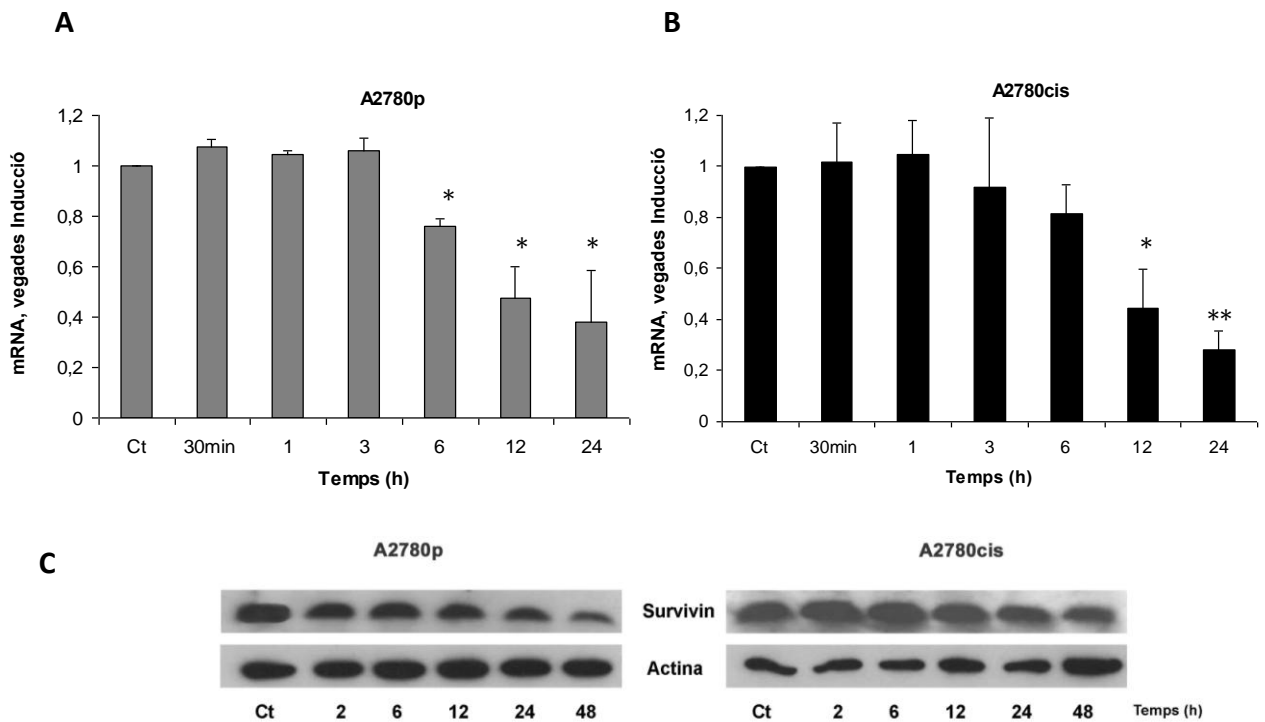


Figura R3.6. Efecte de l'YM155 en l'expressió del RNA i dels nivells proteics de Survivina a les línies A2780p i A2780cis. Les cèl·lules van ser incubades sense YM155 (DMSO) o amb presència d'una única dosi (65 nM línia A2780p, 70 nM línia A2780cis) a diferents temps (de 30 minuts a 24 hores) i es va realitzar una PCR a temps real: A2780p (A), A2780cis (B). Les gràfiques representen la mitjana de tres experiments independents  $\pm$  desviació estàndard \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$  (T-Student) de DcT tractament respecte els DcT no tractament (DMSO). El gen normalitzador usat va ser 18S. Per la realització del *western blot* les cèl·lules van ser incubades sense YM155 (DMSO) o amb presència d'una única dosi (65 nM línia A2780p, 70 nM línia A2780cis) a diferents temps (de 2 a 48 hores) (C).

La dosi d'YM155 que generava apoptosi a un 50% de la població cel·lular a les 48 hores de tractament, va fer disminuir significativament l'expressió de mRNA i de proteïna de Survivina a ambdues línies cel·lulars sobretot a les 24 i també a les 48 hores de tractament.

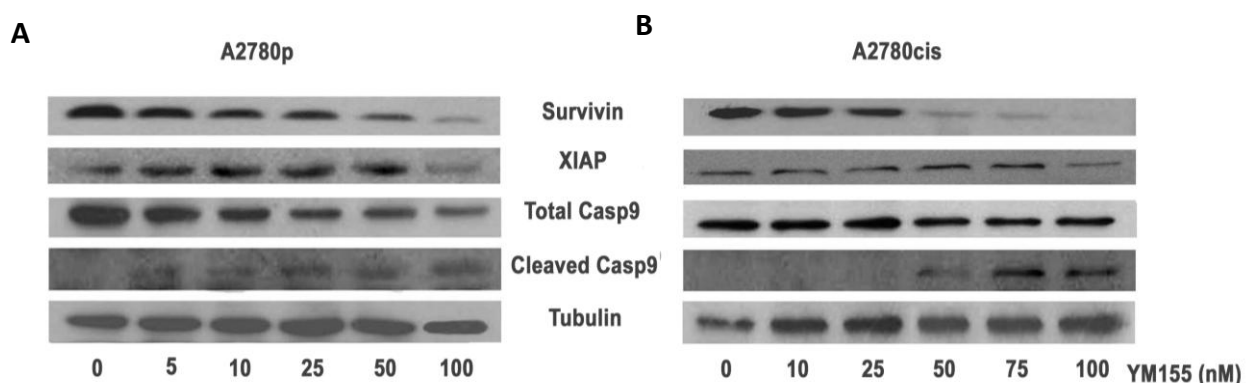
### 3.2.5 Inhibició específica en l'expressió proteica de Survivina

Després d'observar que a les 24 hores d'incubació amb YM155 ja hi havia disminució significativa del mRNA de Survivina, i que a les 48 hores hi havia gran disminució del nombre de cèl·lules i augment significatiu de l'apoptosi de forma dosi-dependent, es van avaluar els nivells proteics de Survivina a les 48h de tractament a dosis creixents d'YM155 (0 a 100 nM). Les cèl·lules control (0 nM) se les va tractar amb DMSO (vehicle). A més de la Survivina, es van analitzar mitjançant *western blot* els nivells d'una altra IAP, la Xiap, i de caspasa 9 (total i truncada). El *western blot* es va quantificar mitjançant densitometria amb el *software* ImageJ (apartat 4.3.3 de Materials i Mètodes).

El tractament de les línies cel·lulars amb YM155 durant 48 hores va inhibir l'expressió de Survivina de forma dependent a la concentració i en funció de la sensibilitat de cada línia a la molècula (Fig.R3.7). A la línia A2780p, els nivells de Survivina en relació al control (1) ja havia disminuït a la dosi de 5nM (0,65). A mesura que la dosi augmentava, disminuïen els nivells de Survivina amb valors de 0,5 (10 nM), 0,41 (25 nM), 0,23 (50 nM) i 0,08 (100 nM) (Fig.R3.7A). Els nivells proteics de Survivina a la línia A2780cis a dosis baixes d'YM155 no van disminuir tant respecte el control en comparació amb la línia A2780p, amb valors de: 0,73 (10 nM) i 0,52 (25 nM). Tanmateix a dosis altes, la línia A2780cis va tenir més disminució de Survivina que la línia A2780p, amb valors de: 0,14 (50 nM), 0,09 (75 nM) i 0,03 (100 nM) (Fig.R3.7B).

Per confirmar que l'YM155 era inhibidor específic de Survivina en les línies de CaOV, es van comprovar els nivells d'una altra IAP, la Xiap. Els nivells d'aquesta proteïna respecte el control a la línia A2780p van ser de: 1,1 (5 nM), 1,2 (10 nM), 1 (25 nM), 1,1 (50 nM) i 0,4 (100nM) (Fig.R3.7A). A la línia A2780cis: 0,8 (5 nM), 0,75 (10 nM), 1 (25 nM), 0,97 (50 nM) i 0,41 (100 nM) (Fig.R3.7B). Per tant, els nivells proteics de Xiap a ambdues línies cel·lulars amb la majoria de dosis usades, no van disminuir massa respecte el control, a excepció de dosis altes (100 nM), que la proteïna va disminuir considerablement a ambdues línies cel·lulars, evidenciant la inespecificitat de l'inhibidor YM155 a dosis altes.

Per confirmar que l'apoptosi augmentava de forma dependent a la concentració d'YM155 en ambdues línies cel·lulars, es van mesurar els nivells de la caspasa 9 total i truncada. Es va observar que a mesura que augmentava la dosi, hi havia disminució de la caspasa 9 total i augment de la forma truncada de forma correlativa. A la línia A2780p els nivells proteics de caspasa 9 en relació al control a la dosi de 5 nM ja havia disminuït (0,6), on ja s'apreciava la forma truncada de la proteïna. Els nivells de caspasa 9 van disminuir a mesura que augmentava la dosi, amb valors de 0,50 (10 nM), 0,31 (25 nM), 0,30 (50 nM) i 0,29 (100 nM) amb correlatiu augment de la forma truncada, indicant apoptosi (Fig.R3.7A). A la línia A2780cis, la disminució de caspasa 9 respecte el control, no va ser tant evident com a la línia A2780p, assolint valors de 0,6 a les dosis de 10 nM, 25 nM i 50 nM d'YM155. A la dosi de 50 nM es començava a apreciar la forma truncada de la proteïna. A dosis de 75 nM i 100 nM els nivells proteics de caspasa 9 total van ser molt similars, amb valors de 0,5 i 0,46, i amb un augment de la forma truncada (Fig.R3.7B).



**Figura R3.7.** Efecte de l'YM155 en l'expressió proteica de Survivina a les línies A2780p (A) i A2780cis (B). Les línies van ser incubades sense YM155 (DMSO) o amb presència de dosis creixents (0 a 100 nM) durant 48h. Els lisats van ser analitzats per *western blot*. De control de càrrega es va usar la tubulina. *Western blot* representatiu de 3 experiments independents.

Així doncs, a les 48 hores l'YM155 disminuïa els nivells proteics de Survivina i augmentava els nivells de caspasa 9 truncada (indicadora d'apoptosi) de forma dosi-dependent, fet que es correlacionava amb els resultats observats en el comptatge cel·lular (Fig.R3.3) i apoptosi (Fig.R3.4). A l'experiment d'expressió de mRNA, es va detectar que a dosi de 65 nM (A2780p) i 70 nM (A2780cis) d'YM155 hi havia disminució significativa de mRNA de Survivina a les 24h, a ambdues línies cel·lulars. A

més, l'expressió proteica de Survivina d'ambdues línies a dosi de 50nM a 48 hores també disminuïa. Per tant, la disminució dels nivells del mRNA a les esmentades dosis a 24 hores es correlacionaven amb la disminució dels nivells proteics de Survivina observats a les 48 hores.

### 3.2.6 Potenciació de l'efecte del cisplatí

En l'anterior apartat hem observat que la disminució dels nivells de Survivina indueix apoptosi a la línia cel·lular resistent al CDDP. Així doncs, la Survivina podria estar participant en el mecanisme de resistència al CDDP en les línies de CaOV.

Estudis previs amb YM155 demostren que l'inhibidor té un efecte sensibilitzador quan es combina amb docetaxel (Yamanaka *et al.* 2011), Rituximab (Kita *et al.* 2012), gemcitabina (Yoon *et al.* 2012), compostos platinats (Iwasa *et al.* 2010; Kumar *et al.* 2012), o radioteràpia (Iwasa *et al.* 2008) tant en models *in vitro* com *in vivo*.

Per avaluar la capacitat sensibilitzadora de l'YM155 en CaOV, les línies cel·lulars A2780p i A2780cis es van pre-tractar sense (DMSO) o amb diferents dosis (0 a 100 nM) d'YM155 durant 24 i 48 hores, per tal de sensibilitzar a les cèl·lules al CDDP. Passat el temps, es van tractar amb diferents dosis de CDDP (2 i 4 µM) amb presència d'YM155. Després de 48 hores d'incubació amb tots dos fàrmacs, es va procedir a analitzar la viabilitat mitjançant l'assaig de MTT. Aquestes dades van ser processades en relació a la fracció de cèl·lules afectades usant l'anàlisi de l'efecte de dosi mitjana, per poder caracteritzar les interaccions dintre l'YM155 i el CDDP, i es va determinar l'Índex de Combinació (CI) mitjançant la relació de la fracció de cèl·lules afectades amb les diferents dosis d'YM155 i CDDP. Les combinacions es consideraven sinèrgiques quan  $CI < 1$ .

El tractament combinat de CDDP i YM155 va donar diferents valors sinèrgics a ambdues línies cel·lulars a les 24 hores i 48 hores de pre-tractament amb YM155, segons les dosis usades dels fàrmacs. A la línia A2780p, la combinació que va generar millor sinergisme va ser 2 µM de CDDP + 10 nM d'YM155 per tots dos temps, sent el  $CI=0,757$  (24h) i  $CI=0,458$  (48h). Una altra combinació sinèrgica va ser de 4 µM de

CDDP + 10 nM d'YM155 per ambdós temps, sent  $CI=0,818$  (24h) i  $CI=0,240$  (48h) (Fig.R3.8A i B ; TA i TB).

A la línia A2780cis, la combinació que va generar més sinergisme va ser de 2  $\mu$ M de CDDP + 25 nM d'YM155 per tots dos temps, sent el  $CI=0,646$  (24h) i  $CI=0,620$  (48h). Altra combinació sinèrgica va ser la de 4  $\mu$ M de CDDP + 25 nM d'YM155 per ambdós temps de pre-tractament, sent el  $CI=0,443$  (24h) i  $CI=0,541$  (48h) (Fig.R3.8C i D ; TC i TD).

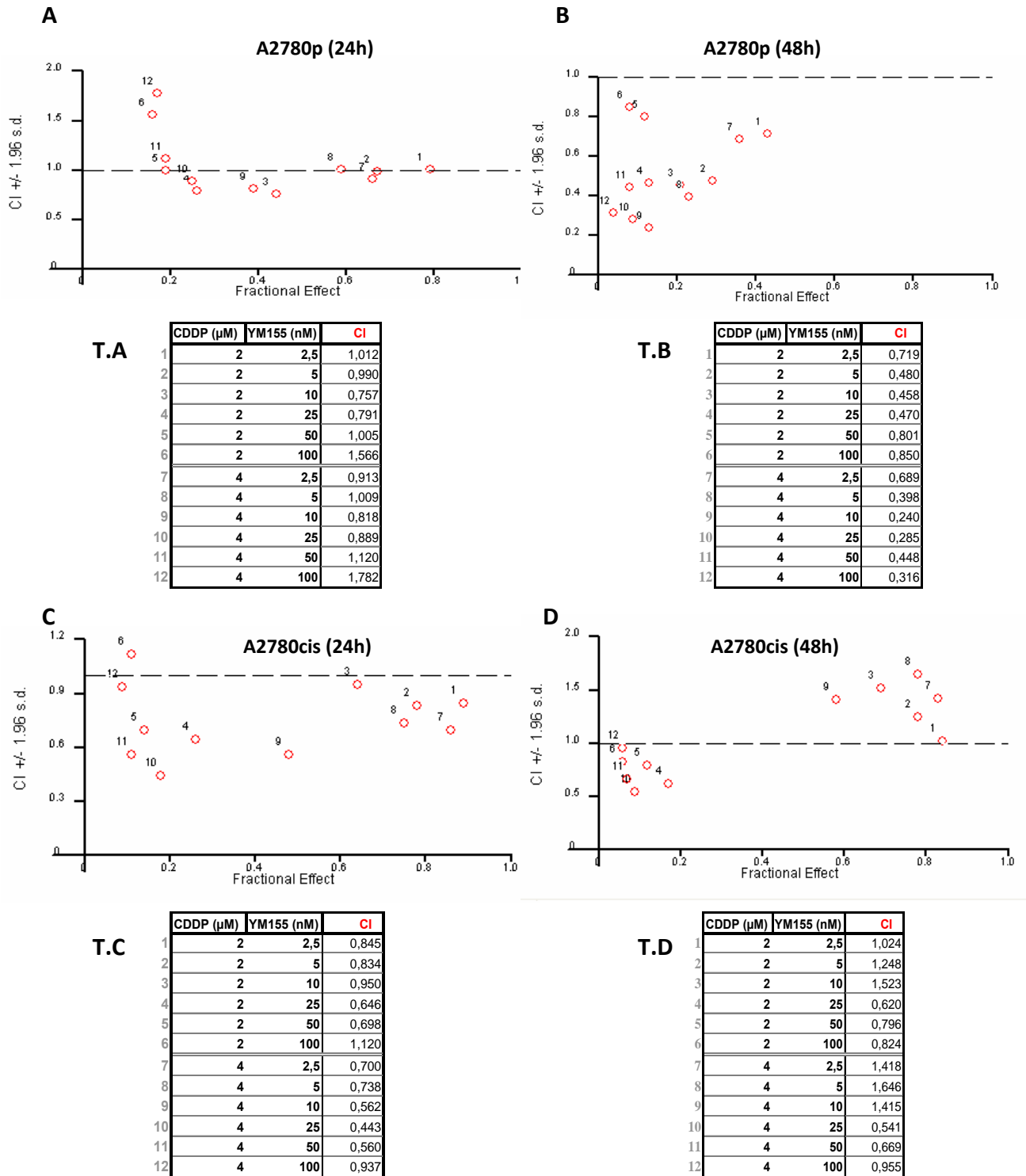


Figura R3.8. Estudi del sinergisme entre el CDDP i l'YM155 mitjançant l'Índex de Combinació (CI). El CI es va determinar en relació a la fracció de cèl·lules afectades usant l'anàlisi de l'efecte de dosi mitjana per poder caracteritzar les interaccions entre l'YM155 i el CDDP. Les línies van ser pre-tractades sense (DMSO) o amb diferents dosis d'YM155 (0 a 100 nM) i a les 24 h i 48 hores d'incubació, s'hi va afegir el CDDP a diferents dosis (2 µM i 4 µM). A les 48 hores de tractament combinat, es va analitzar la viabilitat cel·lular mitjançant MTT i les dades es van processar per determinar el CI mitjançant el *software Biosoft CalcuSyn*. Isoblograma de la línia A2780p i A2780cis a les 24 de pre-tractament amb YM155 (A i C) amb els seus valors numèrics (TA i TC). Isoblograma de la línia A2780p i A2780cis a les 48 hores de pre-tractament amb YM155 (B i D) amb els seus valors numèrics (TB i TD).



Un cop observades les combinacions de dosis de CDDP i YM155 que generaven descens de viabilitat de forma sinèrgica, es va procedir a analitzar el tipus de mort cel·lular. Es van seleccionar les dosis d'ambdós fàrmacs que a la línia resistent al CDDP A2780cis, generaven un CI més baix a les 48 hores de pre-tractament amb YM155. Es va escullir aquest temps donat que era quan es veia més inducció d'apoptosi (Fig.R3.4). A més, el CI de la línia A2780p en dites dosis era inferior (més sinèrgic) a dit temps. Per tant, es va triar la dosi sinèrgica de 4  $\mu$ M de CDDP + 25 nM d'YM155 (Fig.R3.8B i TB; D i TD), pre-incubant amb YM155 durant 48 hores.

Les línies cel·lulars es van tractar amb el vehicle (DMSO), CDDP (4  $\mu$ M), YM155 (25 nM) i doble tractament (4  $\mu$ M de CDDP+25 nM d'YM155), segons l'esquema de la figura R3.9. Es va procedir a efectuar el comptatge cel·lular, observar la morfologia cel·lular i avaluar la inducció d'apoptosi per Annexina V. Es van considerar cèl·lules apoptòtiques les Annexina positives (AnV<sup>+</sup>/IP<sup>+/-</sup>)(apoptosi temprana i tardana).

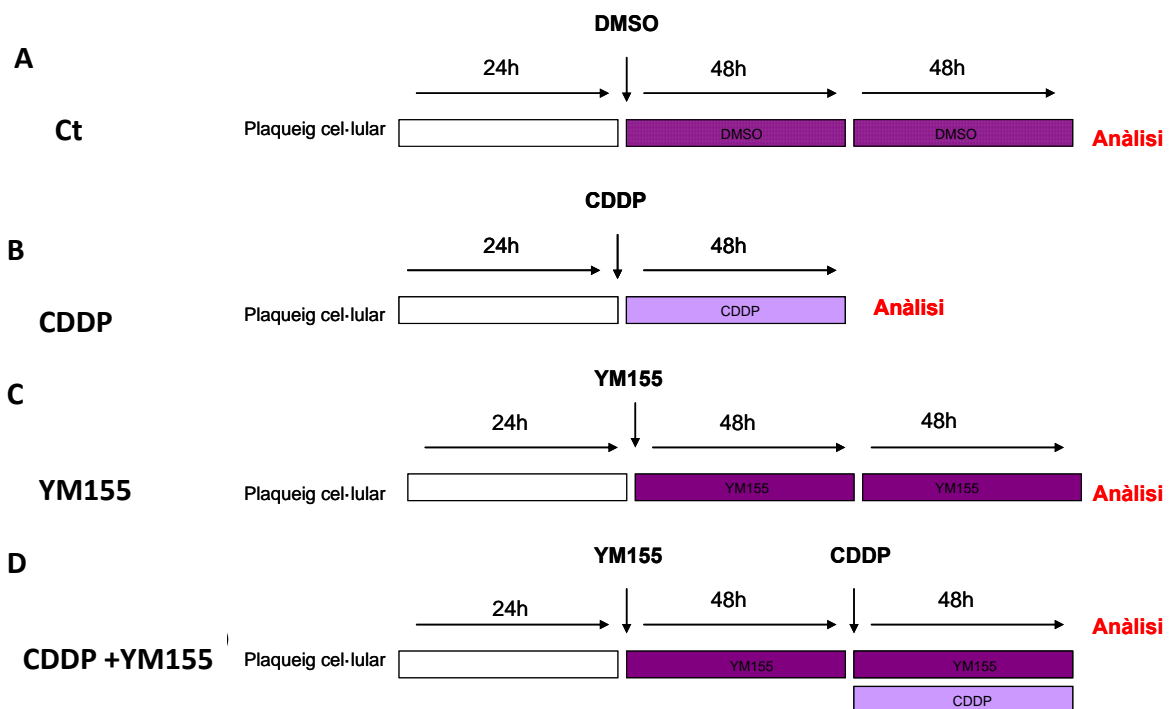


Figura R3.9. Esquema dels tractaments simples i doble tractament. Tractament control: tractament amb DMSO durant 48 hores, més 48 hores addicionals (A). Tractament amb CDDP: 4  $\mu$ M de CDDP durant 48 hores (B). Tractament amb YM155: tractament amb 25 nM d'YM155 durant 48 hores, més 48 hores addicionals (C). Doble tractament: Pre-tractament durant 48h amb 25 nM d'YM155 i addició de 4  $\mu$ M de CDDP durant 48h més (D).

Amb el contactge cel·lular, quan es comparen els tres tractaments respecte el control, s'observa que la línia A2780p després del tractament simple amb CDDP va presentar una disminució significativa del nombre de cèl·lules ( $p=0,04$ ) (Fig.R3.10A). D'igual manera, el tractament amb YM155 va generar una disminució significativa del nombre de cèl·lules ( $p=0,02$ ), les quals presentaven una morfologia arrodonida, vacuolització citoplasmàtica i amb tendència a desenganxar-se de la placa. El doble tractament va augmentar aquest fenomen: més cèl·lules desenganxades de la placa i amb aspecte arrodonit (Fig.R3.11), i una disminució més marcada del nombre de cèl·lules en relació als tractaments simples ( $p=0,015$ ) (Fig.R3.10A). Pel que fa a la línia A2780cis, el nombre de cèl·lules va disminuir després del tractament amb CDDP, però no tant com la línia A2780p ( $p=0,15$ ) (Fig.R3.10B). El tractament amb YM155 va generar una disminució significativa del nombre de cèl·lules ( $p=0,014$ ), les quals també presentaven un aspecte arrodonit, amb vacuolització citoplasmàtica i amb tendència a desenganxar-se de la placa (Fig.R3.11). El doble tractament també va augmentar aquest fenomen, i el nombre de cèl·lules va continuar disminuint de forma significativa ( $p=0,006$ ) (Fig.R3.10B).

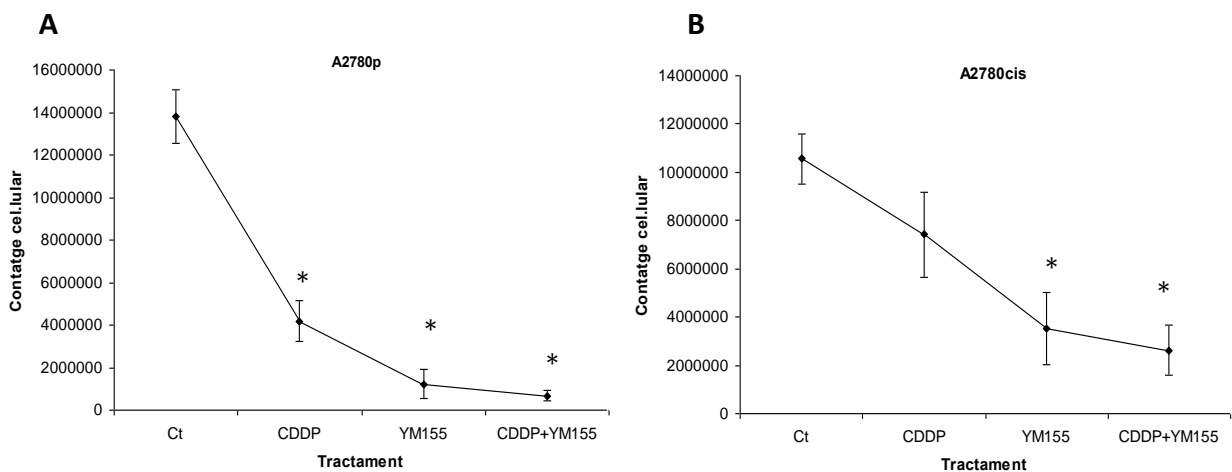


Figura R3.10. Contatge cel·lular de les línies de CaOV després de ser tractades amb CDDP i YM155. Contatge cel·lular A2780p (A) i A2780cis (B) després de ser no tractades (Ct), tractades amb 4  $\mu$ M de CDDP durant 48 hores (tractament CDDP), pre-tractades 48 hores amb 25 nM d'YM155 amb absència (tractament YM155) o presència de 4  $\mu$ M de CDDP (tractament CDDP+YM155) durant 48 hores. Les gràfiques representen la mitjana de tres experiments independents  $\pm$  desviació estàndard \* $p<0,05$  (T-Student).

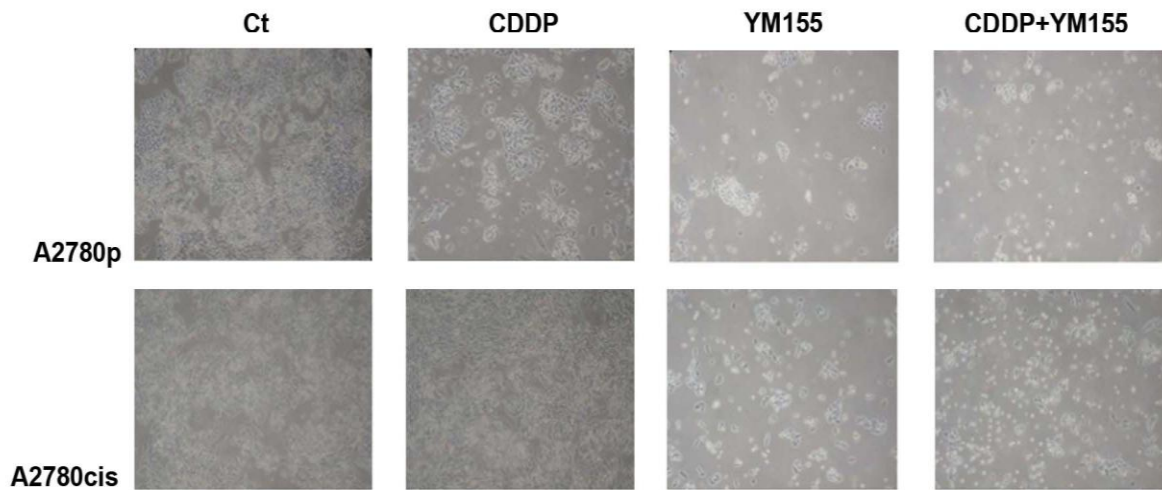


Figura R3.11. Morfologia de les línies de CaOV després de ser tractades amb CDDP i YM155. A2780p i A2780cis després de ser tractades amb DMSO (Ct), 4  $\mu$ M de CDDP durant 48 hores (tractament CDDP), pre-tractades 48 hores amb 25 nM de YM155 amb absència (tractament YM155) o presència de 4  $\mu$ M de CDDP (tractament CDDP+YM155) durant 48 hores (10X).

Quan es va procedir a analitzar l'apoptosi, es va observar que la línia A2780p incubada durant 48h amb CDDP, YM155 o conjuntament, presentava una apoptosi del  $12,45\% \pm 5$  (CDDP),  $25\% \pm 17$  (YM155) i  $63\% \pm 22$  (CDDP+YM155). El tractament doble augmentava l'apoptosi significativament respecte el tractament amb CDDP ( $p=0,0049$ ) (Fig.R3.12A). La línia A2780cis incubada amb cadascun dels tractaments durant 48 hores, va mostrar una apoptosi de  $2,4\% \pm 2$  (CDDP),  $21\% \pm 9$  (YM155) i  $39\% \pm 15$  (CDDP+YM155). El doble tractament augmentava significativament l'apoptosi respecte el tractament amb CDDP ( $p=0,028$ ) (Fig.R3.12B).

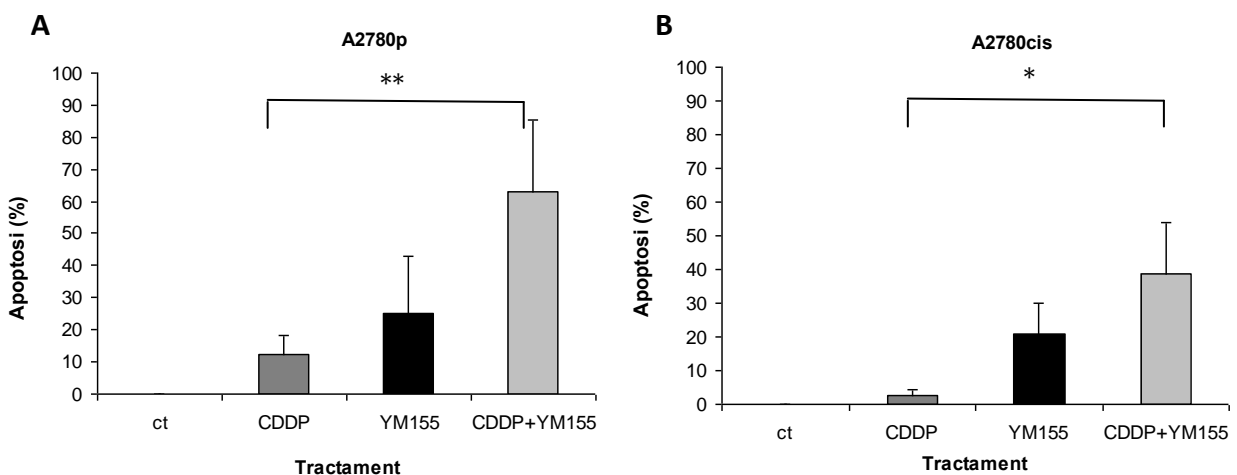


Figura R3.12. Inducció d'apoptosi en línies cel·lulars de CaOV després de ser tractades amb CDDP i YM155. Apoptosi A2780p (A) i A2780cis (B), després de ser tractades amb DMSO (Ct), 4  $\mu$ M de CDDP durant 48 hores (tractament CDDP), pre-tractades 48 hores amb 25nM d'YM155 amb absència (tractament YM155) o presència de 4  $\mu$ M de CDDP (tractament CDDP+YM155) durant 48 hores. L'apoptosi es va expressar com a percentatge de l'apoptosi de les cèl·lules no tractades. Les gràfiques representen la mitjana de tres experiments independents  $\pm$  desviació estàndard \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,005$  (T-Student).

Així doncs, podríem dir que aquest augment d'apoptosi generat pel doble tractament seria conseqüència d'una sensibilització per part de l'YM155 al CDDP.

### **3.2.7 Estudi del cicle cel·lular després dels tractaments simples i doble tractament**

Per avaluar si el pre-tractament amb YM155 afectava el perfil del cicle cel·lular, es va procedir a tractar les línies cel·lulars amb els tractaments simples i doble, tal i com s'ha descrit a la figura R3.9, analitzant-se el perfil del cicle cel·lular després de les 24 i 48 hores d'incubació amb el CDDP: El control vehicle (DMSO) (48 hores d'incubació + 24 ó 48 hores addicionals sense retirar el DMSO), el CDDP (24 ó 48 hores d'incubació), el YM155 (48 hores d'incubació + 24 ó 48 hores addicionals sense retirar l'YM155) i el doble tractament (pre-incubació durant 48 hores amb YM155 i addició del CDDP, incubant-lo 24 ó 48 hores més).

Analitzant el cicle cel·lular es va observar que a les 24 hores de tractament amb CDDP, la fase S i G2/M augmentava a ambdues línies cel·lulars respecte el control, sent significatiu només en la fase S ( $p=0,0195$  (A2780p);  $p=0,0138$  (A2780cis)). L'augment de la fase S, G2/M i pic subdiploid van ser superiors a la línia A2780p que a la A2780cis, donat a la resistència d'aquesta línia cel·lular al CDDP. Comparant el doble tractament respecte el CDDP, la fase G2/M va augmentar a la línia A2780p ( $p=0,0479$ ) i a la línia A2780cis ( $p=0,0422$ ), sense ser significatiu l'augment del pic subdiploid (Fig.R3.13A i C). Així doncs, a les 24 hores el doble tractament estava augmentant a ambdues línies cel·lulars la fase G2/M respecte el tractament amb CDDP, mentre que l'augment del pic subdiploid no era significatiu.

A les 48 hores de tractament amb CDDP, la fase G2/M va augmentar respecte el control a ambdues línies cel·lulars, sent superior per la línia A2780p ( $p<0,0001$ ) que per la línia A2780cis ( $p=0,0368$ ). El pic subdiploid només va augmentar significativament a la línia A2780p ( $p=0,0163$ ), degut a la sensibilitat al CDDP. Comparant la fase G2/M del doble tractament respecte el CDDP, a la línia A2780p va disminuir ( $p=0,0229$ ), concomitantment amb un augment del pic subdiploid ( $p=0,012$ ); a la línia A2780cis també va disminuir ( $p=0,529$ ), augmentant també el pic subdiploid ( $p=0,0114$ ) (Fig.R3.13B i D).

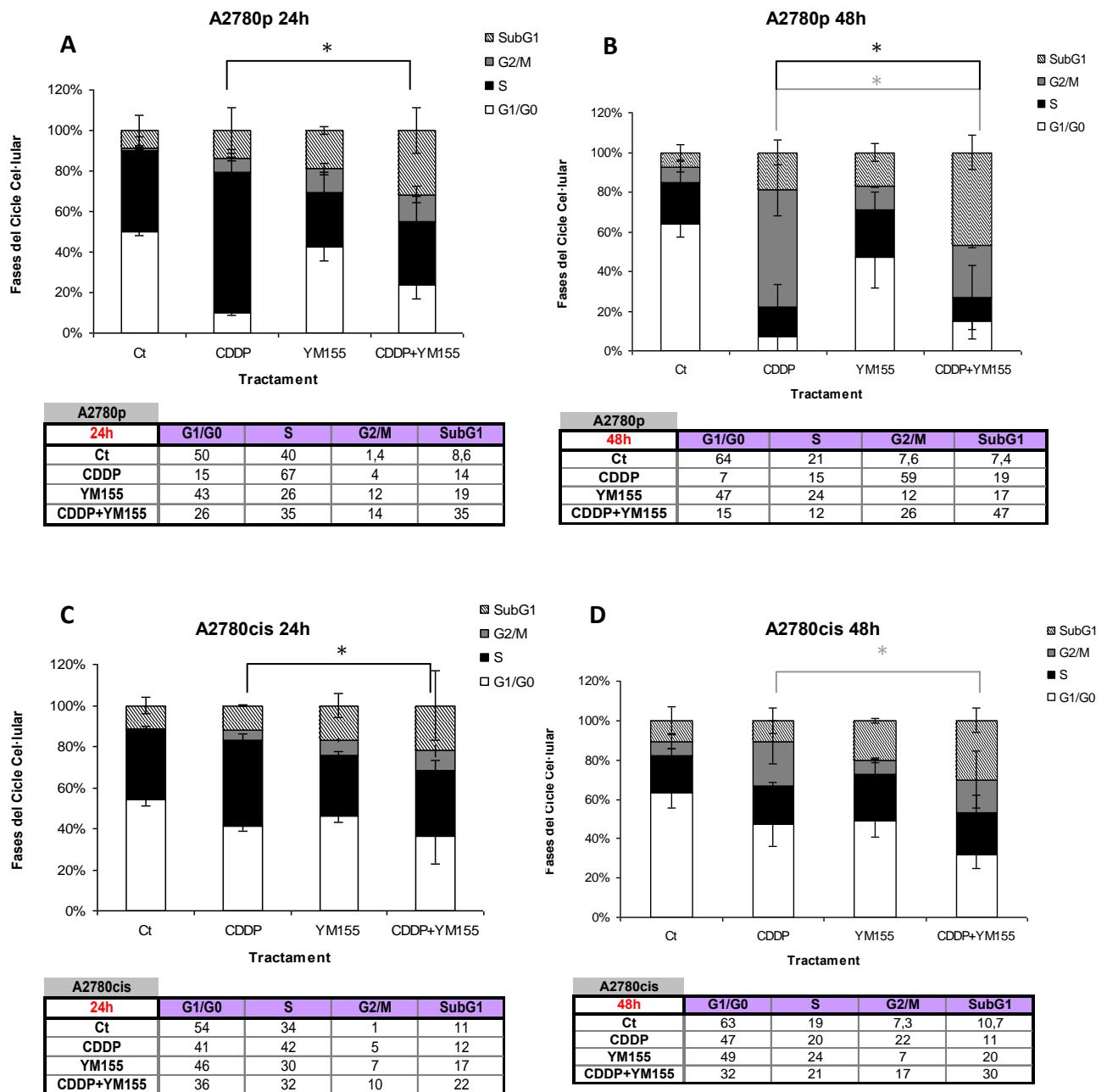


Figura R3.13. Cicle cel·lular de les línies de CaOV després de ser tractades amb CDDP i YM155. Ambdues línies després de ser tractades amb DMSO (Ct), 4µM de CDDP durant 24 o 48 hores (tractament CDDP), pre-tractades 48 hores amb 25nM d'YM155 amb absència (tractament YM155) o presència de 4µM de CDDP (tractament CDDP+YM155) durant 24 o 48 hores. A2780p i A2780cis a les 24h (A i C) i 48h (B i D). Les gràfiques representen la mitjana de tres experiments independents ± desviació estàndard \*p<0,05 (T-Student) comparant el doble tractament respecte el tractament amb CDDP (comparació de fases G2/M (negre); comparació pic subdiploid (gris)).

En conclusió, la pre-incubació amb YM155 estava sensibilitzant a les cèl·lules al CDDP fent-les aturar en fase G2/M a les 24 hores (disminuint la fase S produïda pel CDDP) i portant-les cap a mort cel·lular a les 48 hores de tractament (disminuint la fase G2/M del tractament amb CDDP).

### 3.2.8 Anàlisi dels gens pro- i anti-apoptòtics després dels tractaments simples i doble tractament

Després d'observar que l'YM155 potenciava l'efecte del CDDP induint aturada de cicle cel·lular a les 24 hores (Fig.R3.13) i inducció d'apoptosi a les 48 hores (Fig.R3.12), es va procedir a analitzar el perfil de gens relacionats amb l'apoptosi. Ambdues línies es van tractar amb els fàrmacs i es van incubar seguint l'esquema de la fig.R3.9 però analitzant 24 hores després de la incubació amb el CDDP: El control vehicle (DMSO) (48 hores d'incubació + 24 hores addicionals sense retirar el DMSO), el CDDP (24 hores d'incubació), l'YM155 (48 hores d'incubació + 24 hores addicionals sense retirar l'YM155) i el doble tractament (pre-incubació durant 48 hores amb YM155 i addició del CDDP, incubant-lo 24 hores més). Es va extreure RNA per analitzar el perfil de gens relacionats amb l'apoptosi, mitjançant la tècnica RT-MLPA .

A la figura R3.14 es mostren només aquells gens relacionats amb l'apoptosi que van presentar canvis més importants a les línies de CaOV tractades amb els diferents fàrmacs. A la línia A2780p el tractament amb CDDP va incrementar els gens pro-apoptòtics PUMA, BAX, APAF-1, així com el gen CDKN1A (p21), confirmant la sensibilitat d'aquesta línia pel CDDP (R3.14A), mentre que a la línia A2780cis aquests gens no es van veure tant augmentats amb el tractament amb CDDP. Amb el doble tractament tots aquests gens van augmentar l'expressió a ambdues línies. Comparant el doble tractament amb el CDDP, la línia A2780cis va incrementar els gens pro-apoptòtics i diana de p53 NOXA, PUMA i APAF-1, mentre que el gen BAX es va expressar igual que amb el tractament amb CDDP. El gen CDKN1A també va incrementar-se respecte el tractament amb CDDP. Per tant, el doble tractament estava incrementant els gens pro-apoptòtics i d'aturada de cicle cel·lular en comparació al tractament amb CDDP (R3.14B). En quan als gens anti-apoptòtics, el gen SURVIVINA va disminuir amb el tractament amb CDDP a la línia A2780p, mentre que no va disminuir tant a la línia A2780cis. Comparant el doble tractament amb el CDDP, SURVIVINA va disminuir de forma significativa a la línia A2780cis, fet que es correlacionava amb l'augment de l'apoptosi trobada amb el doble tractament. Pel que fa a la XIAP, proteïna de la família de les IAP, va disminuir amb el CDDP i amb el doble

tractament en ambdues línies, i va augmentar lleugerament a la línia A2780p amb el tractament amb YM155. El mateix va succeir amb MCL-1, però augmentant lleugerament també a la línia A2780cis. Així doncs, el tractament amb YM155 en dites dosis estava inhibint específicament la SURVIVINA, sense disminuir els nivells de XIAP i MCL-1.

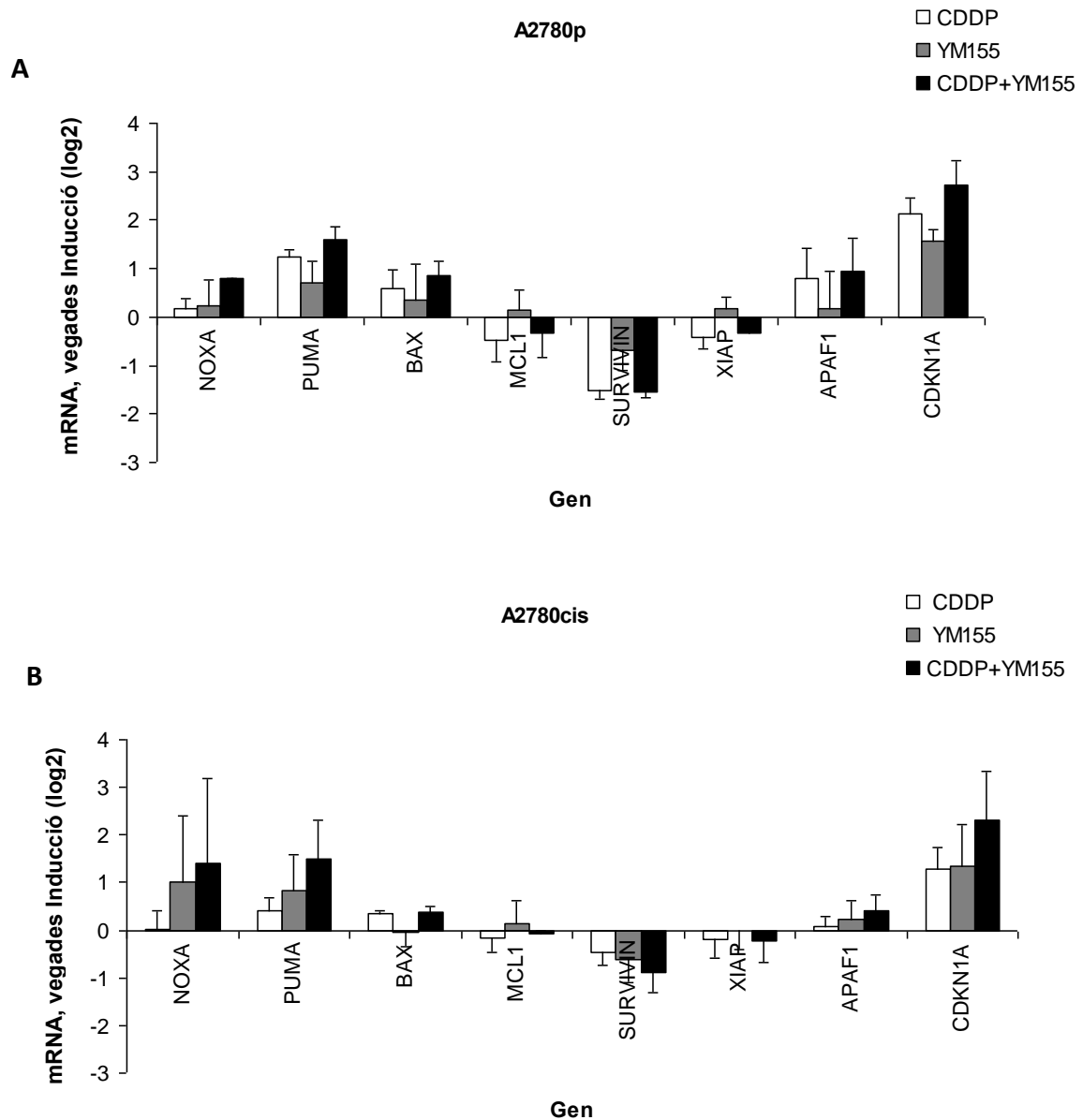


Figura R3.14. Anàlisi dels nivells d'expressió del mRNA d'alguns dels gens implicats en el mecanisme d'apoptosi. Les línies A2780p (A) i A2780cis (B) després de ser tractades amb DMSO (Ct), 4 µM de CDDP durant 24 hores (tractament CDDP), pre-tractades 48 hores amb 25 nM d'YM155 amb absència (tractament YM155) o presència de 4 µM de CDDP (tractament CDDP+YM155) durant 24 hores. Es va extreure RNA i es va realitzar RT-MLPA. Quantificació de mRNA expressada en logaritme en base 2 de l'increment relatiu en relació al control (DMSO). El gen normalitzador usat va ser GUSB. Les gràfiques mostren la mitjana de 3 experiments independents realitzats per a cada línia cel·lular ± desviació estàndar.

Amb aquests resultats es va demostrar que el tractament doble estava incrementant l'expressió dels gens pro-apoptòtics i disminuint els nivells de SURVIVINA respecte el tractament amb CDDP, fet que evidenciava l'efecte sensibilitzador de l'YM155 al CDDP en les línies cel·lulars de CaOV.

### **3.2.9 Anàlisi de les proteïnes induïdes després dels tractaments simples i doble tractament**

Una vegada observat el perfil dels gens relacionats amb l'apoptosi, es va analitzar el seu perfil proteic. Ambdues línies es van incubar amb els tractaments simples i doble (seguint l'esquema de la Fig.R3.9) durant 48 hores, i es van analitzar els nivells proteics mitjançant *western blot*, que es va quantificar mitjançant densitometria amb el *software* ImageJ.

Analitzant el perfil proteic del *western blot* (Fig.R3.15), amb el tractament amb CDDP es va observar una disminució dels nivells de Survivina respecte el control a la línia sensible al CDDP A2780p (0,41), mentre que a la línia resistent A2780cis va induir menys disminució (0,7), confirmant la resistència d'aquesta línia pel CDDP. Amb el tractament amb YM155, la Survivina va disminuir respecte el control, assolint valors de 0,43 (A2780p) i 0,52 (A2780cis). Amb el doble tractament encara va disminuir més, amb valors respecte el control de 0,27 (A2780p) i 0,3 (A2780cis).

L'augment de l'apoptosi observat amb citometria de flux (Fig.R3.12) s'acompanyava de la disminució de la caspasa 3 total i l'augment de la seva forma truncada. Aquesta es va observar a la línia A2780p tractada amb CDDP, i no a la línia A2780cis. Amb el tractament amb YM155 la forma truncada de la caspasa 3 va aparèixer a ambdues línies, i amb el doble tractament va augmentar. Per tant, amb el doble tractament la caspasa 3 s'estava trencant induint-se apoptosi en la línia resistent al CDDP, fet que no succeïa amb el tractament simple amb CDDP (Fig.R3.15). En el cas de la línia A2780cis, la disminució de Survivina i l'augment de la forma truncada de la caspasa 3 en el doble tractament va ser paral·lela a l'augment de l'apoptosi, evidenciant-se el paper sensibilitzador de l'YM155.



Per demostrar l'especificitat inhibidora de l'YM155 per Survivina a les dosis treballades, es va analitzar l'expressió d'altres proteïnes anti-apoptòtiques com Mcl-1 i Xiap. Mcl-1 és una proteïna anti-apoptòtica de la família de Bcl-2, la qual s'ha demostrat que és inhibida per YM155 a línies cel·lulars de càncer de pròstata, de mesotelioma, de pulmó, càncer intestinal epitelial, glioma, glioblastoma epitelial i carcinoma escamós de llengua (Tang *et al.* 2011). A les dosis utilitzades pel nostre grup, i en aquestes línies cel·lulars de CaOV, Mcl-1 no es va modificar a nivell de proteïna (fet que es corrobora a nivell de mRNA (Fig.R3.14)). Els nivells proteics de Xiap en relació al control a la línia A2780p van disminuir amb el CDDP (0,8), mentre que amb l'YM155 va augmentar (3,6) i amb el doble tractament va presentar valors similars al CDDP (0,77); a la línia A2780cis els nivells proteics de Xiap van disminuir lleugerament en relació al control amb el CDDP (0,9), amb l'YM155 (0,9) i amb el doble tractament (0,7). Per tant, l'YM155 a dita dosi no estava disminuint els nivells de Xiap; la disminució observada amb el doble tractament era deguda majoritàriament, per l'efecte del CDDP (Fig.R3.15). Amb això es va demostrar que el tractament amb YM155 no inhibia altres membres de la família IAP, sinó que era específic per la Survivina.

La proteïna p53 es va induir amb el tractament amb CDDP en ambdues línies, sent superior a la línia A2780p (Fig.R3.14). Amb YM155, els nivells de p53 també es van veure augmentats a ambdues línies, incrementant-se encara més amb el doble tractament. Aquest augment de p53 observat a nivell proteic, es correlacionava amb l'augment dels gens diana de p53 observats al MLPA (Fig.R3.14). La proteïna p21 va seguir el mateix patró que p53; a la línia A2780p va augmentar considerablement amb el CDDP, mentre que a la línia A2780cis es va induir lleugerament. Amb YM155, els nivells de p21 també van augmentar en ambdues línies, sobretot a la línia A2780p, incrementant-se considerablement amb el doble tractament (Fig.R3.15).

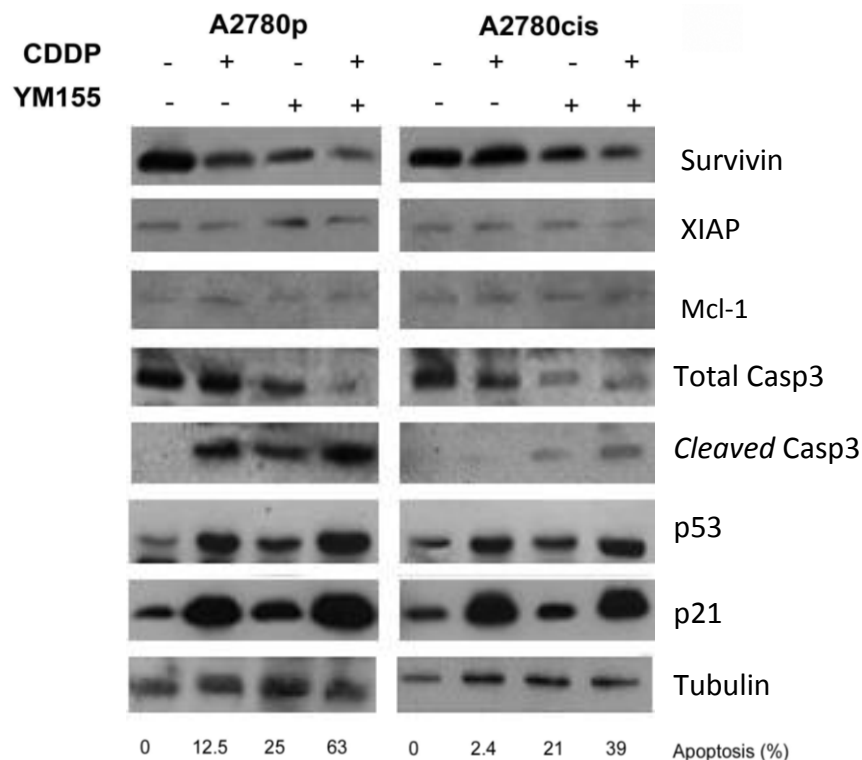


Figura R3.15. Efecte dels tractaments simples i doble tractament a les línies A2780p i A2780cis després de ser tractades amb DMSO (Ct), 4 µM de CDDP durant 48 hores (tractament CDDP), pre-tractades 48 hores amb 25 nM d'YM155 amb absència (tractament YM155) o presència de 4 µM de CDDP (tractament CDDP+YM155) durant 48 hores. Els lisats van ser analitzats per *western blot*, usant els anticossos de Survivina, caspasa 3 (total i truncada), p21 i tubulina com a control de càrrega. L'apoptosi mostrada de cada tractament és referenciada al control. *Western blot* representatiu de 3 experiments independents.

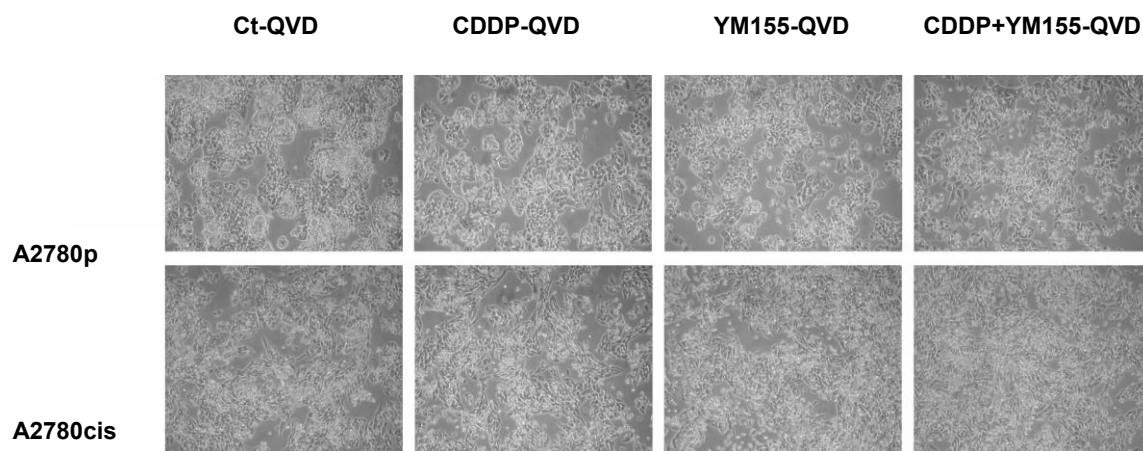
Aquests resultats indicaven que el tractament amb YM155 estava sensibilitzant a la línia resistent A2780cis al CDDP, augmentant l'aturada del cycle cel·lular i apoptosi, fet que es va demostrar amb la disminució de Survivina, augment de p53, p21 i del petit fragment de la caspasa 3, en el doble tractament respecte el CDDP.

### 3.2.10 Reversió de l'apoptosi induïda per l'YM155 i doble tractament

Per demostrar que un dels papers principals de l'YM155 en les línies cel·lulars de CaOV és l'apoptosi dependent de caspases, es va procedir a utilitzar el Q-VD-Oph (QVD), un inhibidor irreversible d'ampli espectre de les caspases, que inhibeix les caspases -1, -3 -8,-9 a dosis molt baixes sense presentar efectes citotòxics. Les cèl·lules es van incubar a una concentració de 20 µM de QVD durant 1 hora i a continuació, es van tractar amb els tractaments simples i doble durant 48 hores (Fig.R3.9). Passat el temps, les cèl·lules es van observar pel microscopi (Fig.R3.16) i es va avaluar la

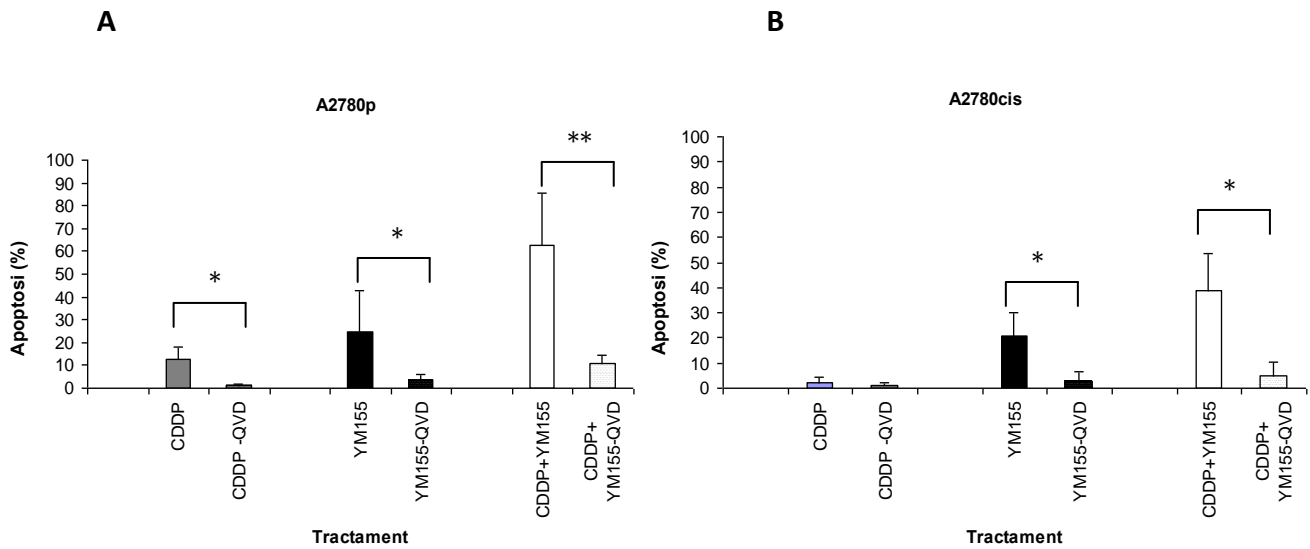
inducció d'apoptosi (Fig.R3.17). Es van considerar cèl·lules apoptòtiques les Annexina V<sup>+</sup>/IP<sup>+/-</sup> (apoptosi temprana i tardana).

La morfologia cel·lular de les línies incubades amb QVD i posteriors tractaments, mostrava que cap de les condicions disminuïa el nombre de cèl·lules. La confluència cel·lular es mantenia respecte el control i les cèl·lules no assolien morfologia arrodonida, vacuolització citoplasmàtica ni tendència a desenganxar-se de la placa (Fig.R3.16).



**Figura R3.16.** Morfologia de les línies pre-incubades amb QVD i tractades amb CDDP i YM155. Canvis morfològics de les línies A2780p i A2780cis pre-incubades amb QVD i tractades amb els tractaments simples i doble durant 48 hores. Les línies es van incubar amb l'inhibidor de les caspases QVD (20 µM) durant 1 hora i després van ser no tractades (Ct), tractades amb 4 µM de CDDP durant 48 hores (tractament CDDP), pre-tractades 48 hores amb 25 nM d'YM155 amb absència (tractament YM155) o presència de 4 µM de CDDP (tractament CDDP+YM155) durant 48 hores (10X).

Es va analitzar l'apoptosi per Annexina V de les cèl·lules pre-incubades amb QVD i es va comparar amb l'apoptosi de les que no havien estat pre-incubades amb l'inhibidor de les caspases (Fig.R3.17). Amb el tractament amb CDDP, només la línia A2780p va mostrar una disminució significativa d'apoptosi ( $p=0,0076$ ) (Fig.R3.17A), mentre que la línia A2780cis va presentar poca apoptosi basal, fet esperat, al ser resistent al CDDP (Fig.R3.17B). La pre-incubació de les línies amb QVD va revertir l'apoptosi generada per l'YM155 de forma significativa a ambdues línies ( $p=0,0433$  (A2780p) i  $p=0,0296$  (A2780cis), respectivament). De la mateixa manera, la pre-incubació amb QVD i el doble tractament va seguir revertint l'apoptosi a ambdues línies ( $p=0,0040$  (A2780p) i  $p=0,030$  (A2780cis), respectivament).



**Figura R3.17.** Apoptosi de les línies sense o pre-incubades amb QVD i tractades amb CDDP i YM155. Apoptosi de A2780p (A) i A2780cis (B) incubades sense o amb l'inhibidor de les caspases QVD (20  $\mu$ M) durant 1 hora i després tractades amb DMSO (Ct), 4 $\mu$ M de CDDP durant 48 hores (tractament CDDP), pre-tractades 48 hores amb 25nM d'YM155 amb absència (tractament YM155) o presència de 4 $\mu$ M de CDDP (tractament CDDP+YM155) durant 48 hores. L'apoptosi es va expressar com a percentatge de l'apoptosi de les cèl·lules no tractades. Les gràfiques representen la mitjana de quatre experiments independents  $\pm$  desviació estàndard \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,005 (T-Student).

Per verificar aquests resultats, es va procedir a fer un *western blot* de les línies pre-incubades amb l'inhibidor i es van analitzar els nivells proteics de caspasa 3 total i forma truncada (indicador d'apoptosi) (Fig.R3.18). Es van observar nivells quasi indetectables de la forma truncada de la caspasa 3 amb el tractament amb CDDP i doble a la línia A2780p, sent molt més inferior respecte les cèl·lules no incubades amb QVD (Fig.R3.15), confirmant la reversió d'apoptosi amb presència de QVD. En la línia A2780cis, tampoc no va aparèixer el fragment petit de la caspasa 3 en cap dels tractaments. Amb això, es va confirmar a nivell proteic que la incubació amb QVD estava revertint l'apoptosi generada pels tractaments simples i doble.

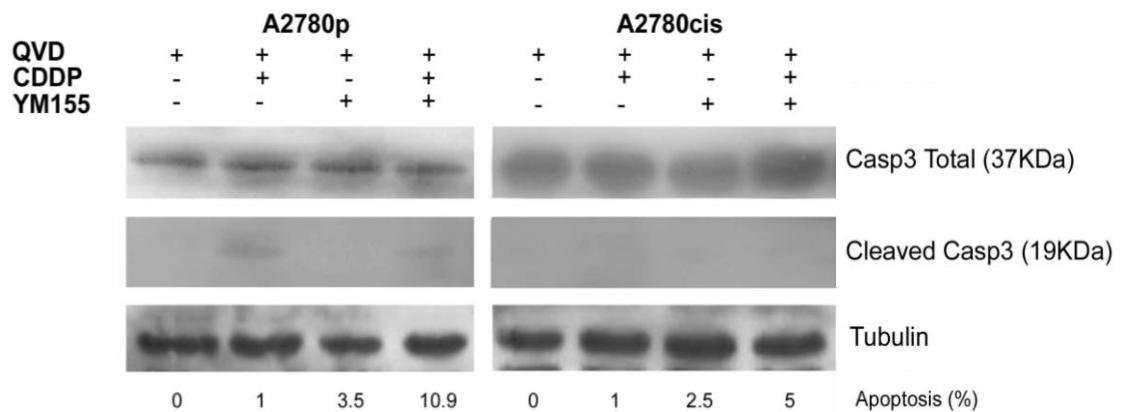


Figura R3.18. Efecte de l'inhibidor QVD amb els tractaments simples i doble tractament. Ambdues línies A2780p i A2780cis incubades sense o amb l'inhibidor de les caspases QVD (20  $\mu$ M) durant 1 hora i després tractades amb DMSO (Ct), 4  $\mu$ M de CDDP durant 48 hores (tractament CDDP), pre-tractades 48 hores amb 25 nM d'YM155 amb absència (tractament YM155) o presència de 4  $\mu$ M de CDDP (tractament CDDP+YM155) durant 48 hores. Els lisats van ser analitzats per *western blot*. Es va usar la tubulina com a control de càrrega. L'apoptosi mostrada de cada tractament és referenciada al control. *Western blot* representatiu de 3 experiments independents.

L'inhibidor de caspases QVD va ser capaç de revertir quasi tota l'apoptosi amb el tractament amb CDDP a la línia sensible a aquest, fet que indicava que les caspases juguen un paper majoritari en l'activació de l'apoptosi mediada pel CDDP a les línies de CaOV. De la mateixa manera, l'activació de l'apoptosi induïda per YM155 es va veure afectada amb la inhibició de les caspases, fet que indicava que l'apoptosi era mitjançant l'activació de caspases.

### 3.2.11 Anàlisi de la senescència després dels tractaments simples i

#### doble tractament

Fins ara s'ha vist que el tractament amb YM155 sensibilitzava les cèl·lules al CDDP induint aturada de cicle cel·lular en fase G2/M a les 24 hores, i que a les 48 hores de tractament, els nivells proteics de p21 es mantenien elevats amb l'YM155 i el doble tractament. A continuació, es va estudiar si l'aturada de cicle cel·lular induïda per l'YM155 era irreversible. Per això es va procedir a analitzar la senescència mitjançant la tinció de AS- $\beta$ GAL.

Les línies cel·lulars es van tractar amb els tractaments simples i doble, seguint el protocol ja descrit (Fig.R3.9) durant 48 hores, i es va realitzar una tinció per AS- $\beta$ GAL per comprovar si presentaven característiques de senescència. Les cèl·lules es van mantenir durant tres dies addicionals sense presència dels fàrmacs, i passat aquest

temps, es va tornar a realitzar la tinció per AS- $\beta$ GAL per comprovar si continuaven presentant característiques senescents.

A les 48 hores, les cèl·lules no presentaven marcatge per AS- $\beta$ GAL en cap dels tractaments (Fig.R3.19A); tampoc a les 48 hores + 3 dies de rentat (Fig.R3.19B). Ambdues línies en cadascun dels tractaments, assolia la morfologia típica d'apoptosi, exceptuant el tractament amb CDDP a la línia A2780cis (resultats ja observats a la fig.R3.11), sense haver-hi marcatge per AS- $\beta$ GAL en cap dels tractaments i sense assolir la morfologia típica de senescència, la qual es caracteritza per ser una morfologia cel·lular estesa i plana, tal i com s'ha vist amb els tractaments amb Nut3a dels cultius primaris (Fig.R2.21).

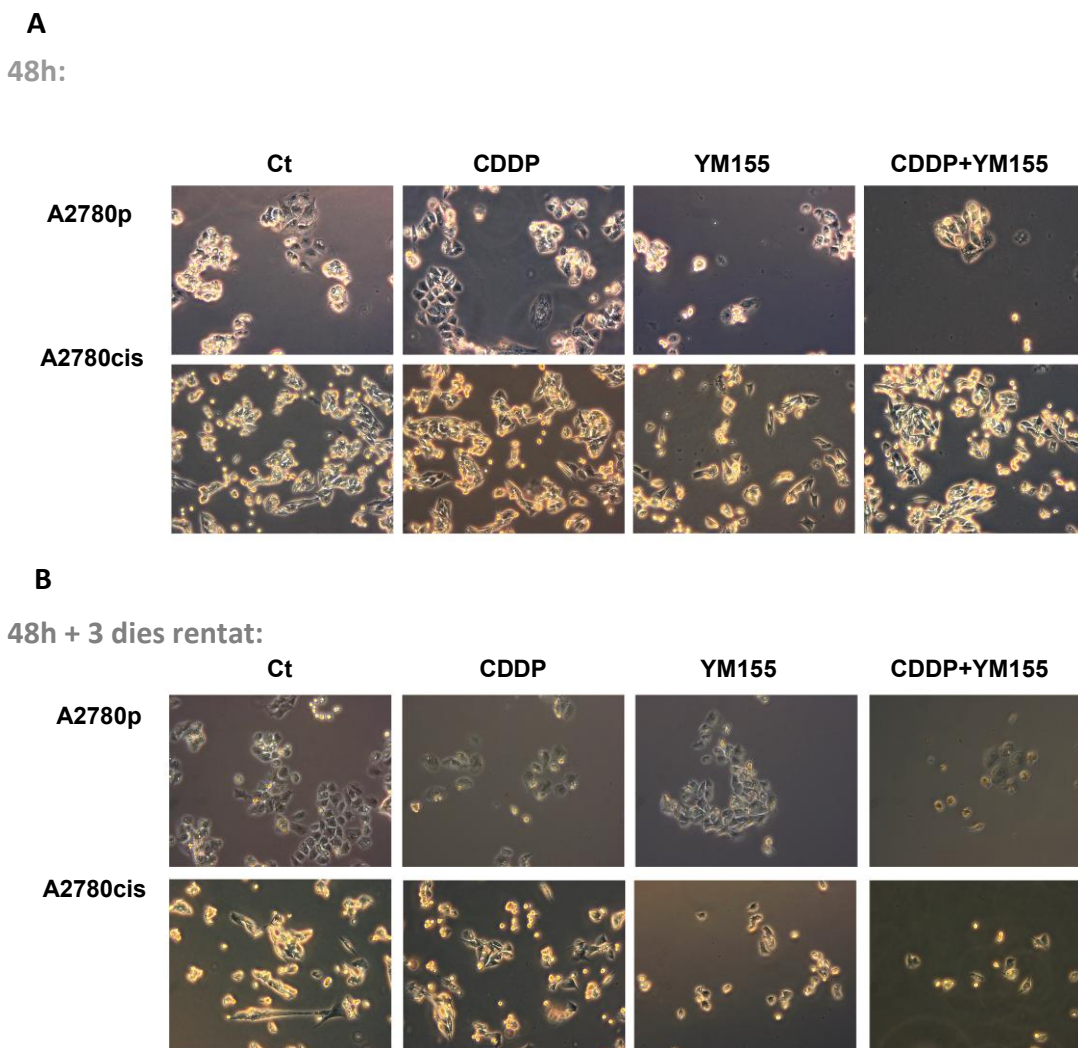


Figura R3.19. Anàlisi de la senescència cel·lular de les línies de CaOV després de ser tractades amb CDDP i YM155. A2780p i A2780cis marcades amb AS-βGAL després de ser tractades amb DMSO (Ct), 4 μM de CDDP durant 48 hores (tractament CDDP), pre-tractades 48 hores amb 25 nM d'YM155 amb absència (tractament YM155) o presència de 4 μM de CDDP (tractament CDDP+YM155) durant 48 hores i marcades amb AS-βGAL (20X)(A). Cèl·lules després dels tractaments durant 48 hores, més 3 dies addicionals sense presència de fàrmacs, i posterior marcatge amb AS-βGAL (20X)(B).

Com a conclusió, el tractament amb YM155 conjunt amb el CDDP condueix a les cèl·lules a l'aturada de cycle cel·lular en fase G2/M i posterior entrada a apoptosi, sense haver aturada del cycle irreversible o senescència cel·lular.

### 3.2.12 Efecte del doble tractament cisplatí i YM155 en la reparació del DNA

El CDDP és un agent que genera adductes inter-catenaris al DNA, el qual pot obstruir la forquilla de replicació a cèl·lules que es divideixen generant trencaments de cadena doble del DNA (DSB). Una proteïna clau en la reparació dels DSB és H2AX, la qual en presència de DSB és ràpidament fosforilada, formant  $\gamma$ H2AX als llocs on hi ha els DSB. Durant els 30 minuts després de la formació de DSB, un gran nombre de molècules  $\gamma$ H2AX envolten la cromatina als llocs on hi ha els DSB, formant focis nuclears els quals poden ser visualitzats mitjançant immunofluorescència amb l'anticòs anti- $\gamma$ H2AX. D'altra banda, estudis recents demostren que l'YM155 pot induir dany al DNA (Glaros *et al.* 2012).

Per analitzar la inducció de dany al DNA induït per l'YM155 en les cèl·lules CaOV, es va procedir a la mesura del dany del DNA mitjançant la detecció de  $\gamma$ H2AX. Donat que les cèl·lules resistents al CDDP A2780cis són capaces de reparar el dany al DNA (Clingen *et al.* 2008), amb l'intenció de demostrar que el doble tractament augmentava el marcatge de  $\gamma$ H2AX, augmentant el dany al DNA, o el que és equivalent, disminuint la reparació, portant les cèl·lules a mort i salvant-les de la resistència al CDDP.

Les línies cel·lulars es van tractar amb els tractaments simples i doble, i es va procedir a la fixació de les cèl·lules a diferents temps (des dels 30 minuts a les 48 hores) després de la incubació amb el CDDP: El control vehicle (DMSO) (48 hores d'incubació + 30 minuts-48 hores addicionals sense retirar el DMSO), el CDDP (des dels 30 minuts a les 48 hores d'incubació), l'YM155 (48 hores d'incubació + 30 minuts-48 hores addicionals sense retirar l'YM155) i el doble tractament (pre-incubació durant 48 hores amb YM155 i addició del CDDP, incubant-lo des dels 30 minuts a les 48 hores). Mitjançant immunofluorescència es va avaluar la presència de  $\gamma$ H2AX. Per microscopia confocal es va avaluar el nombre de cèl·lules amb marcatge  $\gamma$ H2AX (es van considerar positives aquelles que tenien més de quatre focis per cèl·lula) i el nombre de focis nuclears per cèl·lula.



Analitzant el tractament amb CDDP després de 30 minuts d'incubació, s'observava el mateix marcatge de  $\gamma$ H2AX a ambdues línies cel·lulars. A mesura que augmentava el temps d'incubació amb el fàrmac, la línia A2780p tenia més marcatge que la línia A2780cis en tots els temps. La línia A2780cis va obtenir el màxim nombre de cèl·lules marcades amb  $\gamma$ H2AX a les 12 hores (màxim dany), sent inferior que la línia A2780p ( $p=0,073$ ). A partir d'aquest temps, la línia A2780cis va disminuir el marcatge de forma temps-dependent, retornant als valors basals, el que indicava que són cèl·lules capaces de reparar el dany al DNA; mentre que la línia A2780p va mantenir el dany i fins tot el va augmentar a les 48 hores de tractament. La disminució de marcatge de la línia A2780cis respecte la línia A2780p va ser estadísticament significativa a les 24 hores ( $p=0,0034$ ) i 48 hores ( $p<0,0001$ ) (Fig.R3.20).

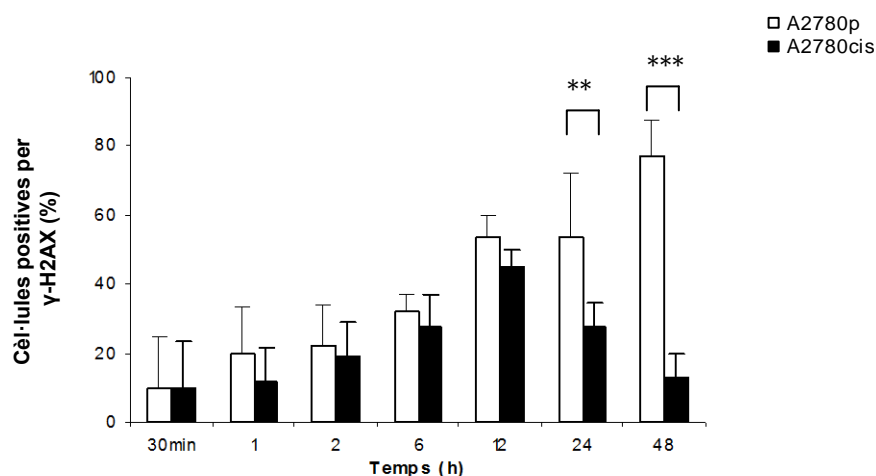


Figura R3.20. Efecte del CDDP en la formació de foci  $\gamma$ H2AX a les línies de CaOV. Ambdues línies van ser tractades amb DMSO (Ct) i CDDP (4  $\mu$ M). Després de 30 minuts, 1, 2, 6, 12, 24 i 48 hores d'incubació amb el fàrmac, les cèl·lules es van fixar i es va realitzar immunofluorescència per  $\gamma$ H2AX. Es van considerar positives les cèl·lules que obtenien més de quatre focis marcats per cèl·lula. El marcatge de cada tractament es va referenciar al control del temps corresponent. Les gràfiques representen la mitjana de 5 camps (com a mínim)  $\pm$  desviació estàndard \*\* $p<0,005$ ; \*\*\* $p<0,0005$  (T-Student).

Amb el comptatge de cèl·lules positives per  $\gamma$ H2AX, es va poder apreciar que el doble tractament augmentava el dany respecte al tractament amb CDDP a la línia resistent a aquest A2780cis, mantenint-se en tots els temps ( $p=0,0063$  (30min);  $p=0,0266$  (1h);  $p=0,036$  (2h);  $p=0,010$  (6h);  $p=0,092$  (12h);  $p=0,0012$  (24h) i  $p<0,0001$  (48h)) (Fig.R3.21B). A la línia A2780p el marcatge de  $\gamma$ H2AX del doble tractament es va mantenir elevat en tots els temps, dany del qual era produït majoritàriament pel CDDP, sent estadísticament significatiu només a les 48 hores ( $p=0,0078$ ) (Fig.R3.21A).

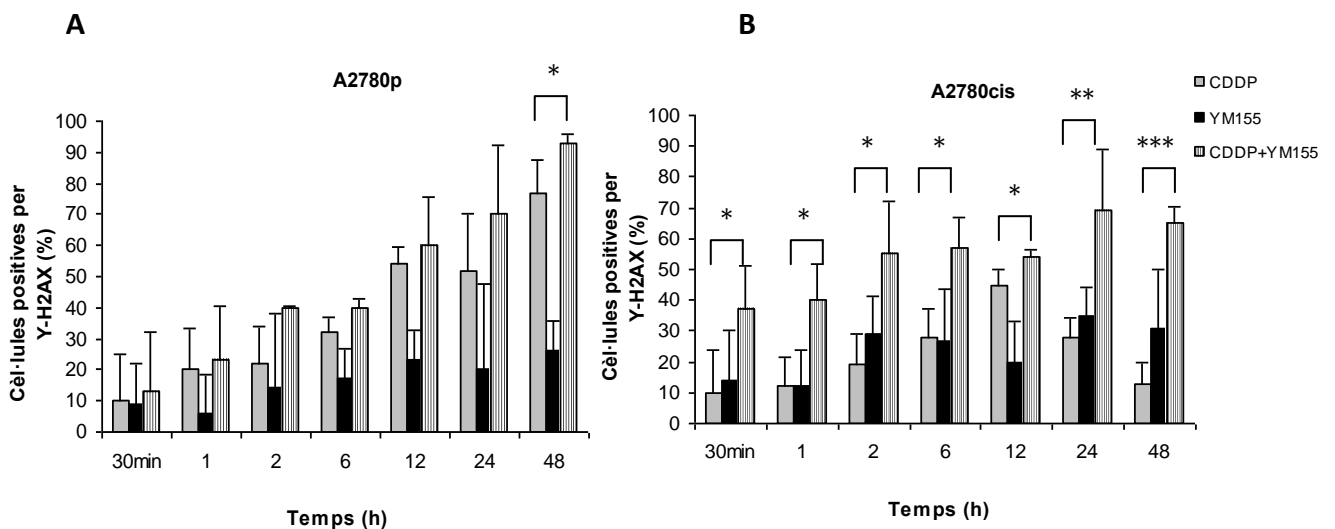


Figura R3.21. Efecte dels tractaments simples i doble tractament en la reparació del DNA. A2780p (A) i A2780cis (B) van ser tractades amb DMSO (Ct) i 4  $\mu$ M de CDDP (CDDP), pre-tractades 48 hores amb 25 nM d'YM155 amb absència (tractament YM155) o presència de 4 $\mu$ M de CDDP (tractament CDDP+YM155). Després de 30 minuts, 1, 2, 6, 12, 24 i 48 hores d'incubació amb els fàrmacs, les cèl·lules es van fixar per realitzar una immunofluorescència pel marcatge amb  $\gamma$ H2AX. Es van considerar positives les cèl·lules que obtenien més de quatre focis. El marcatge de cada tractament es va referenciar al control del temps corresponent. Les gràfiques representen la mitjana de 5 camps (com a mínim)  $\pm$  desviació estàndard \* $p$ <0,05;\*\* $p$ <0,005;\*\*\* $p$ <0,0005 (T-Student).

Una vegada avaluades les cèl·lules positives per  $\gamma$ H2AX, es va procedir a contar els focis de cadascuna de les cèl·lules. Els resultats van demostrar que la línia A2780p presentava més nombre de focis de  $\gamma$ H2AX per cèl·lula en totes les condicions, el que indicava que el dany es mantenia al llarg del temps, i per tant, no hi havia reparació. El CDDP va generar molts focis per cèl·lula a la línia A2780p, degut a la sensibilitat d'aquesta línia pel CDDP, mentre que la línia A2780cis va tenir pocs focis en tots els temps, és a dir, poc dany degut a que les cèl·lules aconseguïen reparar el dany (Fig.R3.22). El tractament amb YM155 a la línia A2780p va generar un augment del nombre de focis en comparació al control que es va mantenir al llarg del temps; ja a partir dels 30 minuts, (48 hores + 30 minuts d'YM155) ( $p=0,0028$ ), 1 hora (48 hores + 1 hora d'YM155) ( $p=0,0022$ ) i a les 6 hores (48 hores + 6 hores d'YM155) ( $p<0,001$ ) (Fig.R3.22A). A diferència, el tractament amb YM155 a la línia A2780cis només va generar un augment significatiu del nombre de focis respecte el control a les 72 hores (48 hores + 24 hores d'YM155) ( $p=0,049$ ), retornant a nivells baixos a les 96 hores d'incubació amb el fàrmac (48 hores + 48 hores d'YM155), indicant que el dany havia estat reparat (Fig.R3.22B). Tanmateix, amb el doble tractament es va generar un augment del nombre de focis respecte el tractament amb CDDP que es va mantenir al

llarg del temps, el que indicava que el doble tractament mantenia el dany a les cèl·lules resistents al CDDP, mentre que amb el tractament amb YM155 o CDDP les cèl·lules aconseguien reparar el dany. La diferència entre ambdós tractaments va ser estadísticament significativa:  $p=0,026$  (2h);  $p=0,03$  (6h);  $p=0,029$  (12h);  $p=0,046$  (24h) i  $p=0,0033$  (48h) (Fig.R3.22B).

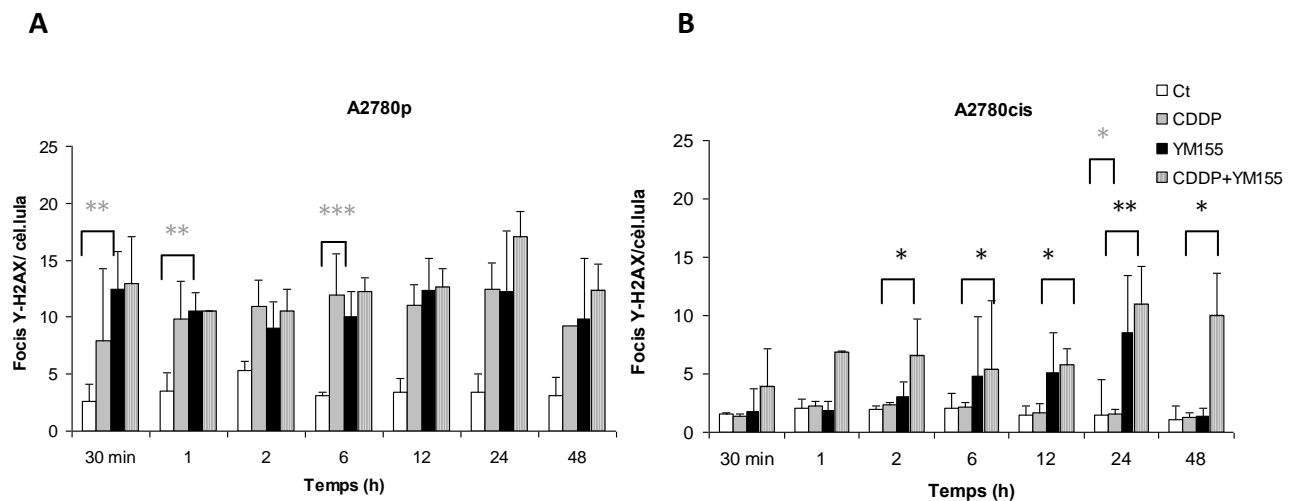


Figura R3.22. Efecte dels tractaments simples i doble tractament en la reparació del DNA mitjançant el comptatge de focis  $\gamma$ H2AX a les línies A2780p (A) i A2780cis (B). Línies cel·lulars després de ser tractades amb DMSO (Ct), 4 $\mu$ M de CDDP (tractament CDDP), pre-tractades 48 hores amb 25nM d'YM155 amb absència (tractament YM155) o presència de 4 $\mu$ M de CDDP (tractament CDDP+YM155). Després de 30 minuts, 1, 2, 6, 12, 24 i 48 hores d'incubació amb els fàrmacs, les cèl·lules es van fixar per realitzar immunofluorescència per  $\gamma$ H2AX. Es van realitzar el comptatge dels focis de cada cèl·lula. Valors no referenciats al control. Les gràfiques representen la mitjana de 5 camps (com a mínim)  $\pm$  desviació estàndar. La comparació entre tractament doble respecte el CDDP està indicada amb negre: \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,005$  (T-Student). La comparació entre tractament YM155 respecte el control està indicada amb gris: \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,005$ ; \*\*\* $p<0,0005$  (T-Student).

Per tant, a el doble induïa i mantenia el dany al DNA. L'YM155 estava sensibilitzant a les línies resistents al CDDP a aquest, disminuint i/o retardant la reparació o augmentant-ne el dany al DNA.

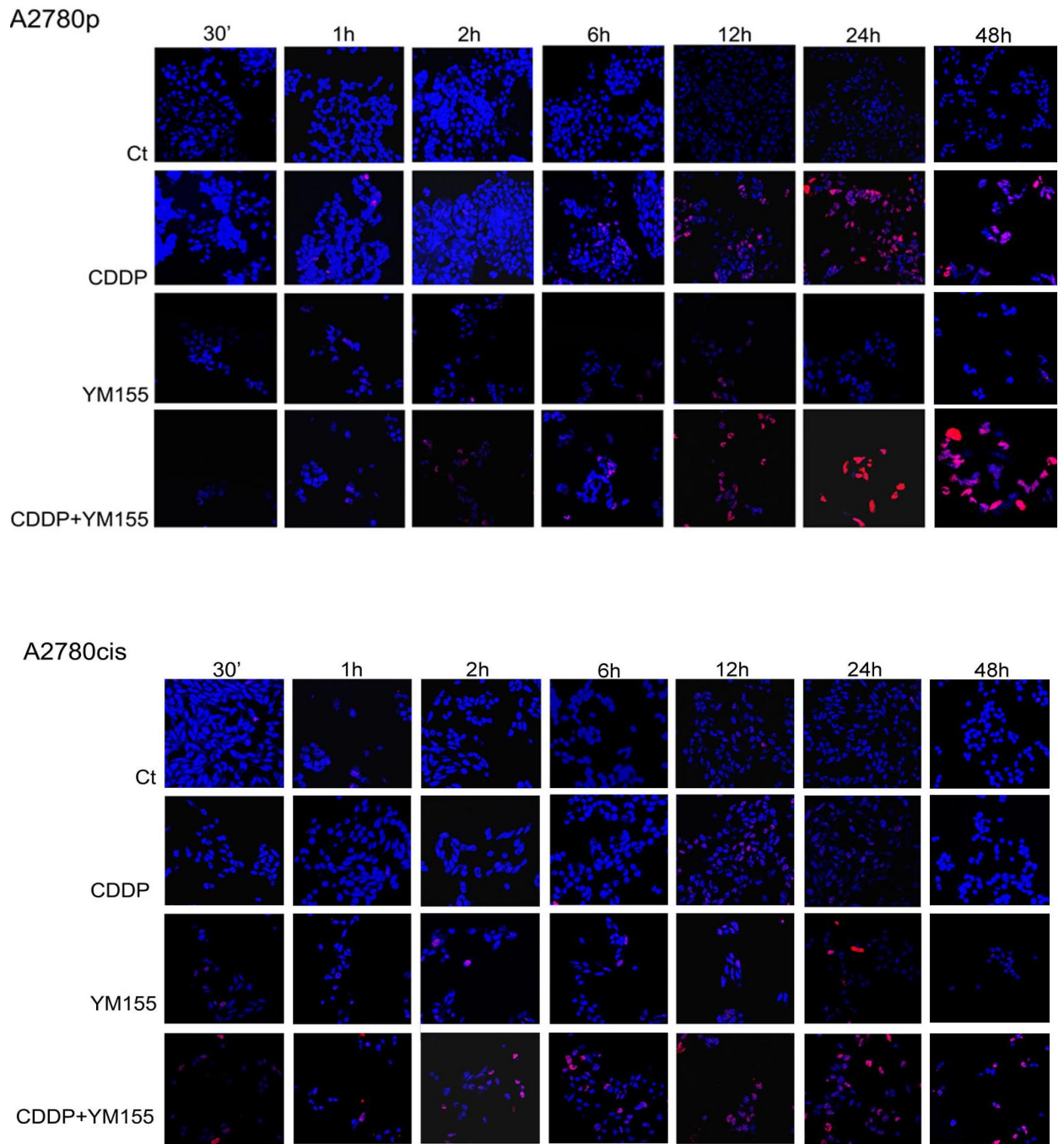


Figura R3.23. Efecte dels tractaments simples i doble tractament en la formació de foci  $\gamma$ H2AX a les línies de CaOV. Línies cel·lulars després de ser tractades amb DMSO (Ct), 4  $\mu$ M de CDDP (tractament CDDP), pre-tractades 48 hores amb 25 nM d'YM155 amb absència (tractament YM155) o presència de 4  $\mu$ M de CDDP (tractament CDDP+YM155). Després de 30 minuts, 1, 2, 6, 12, 24 i 48 hores d'incubació amb els fàrmacs, les cèl·lules es van fixar per realitzar immunofluorescència per  $\gamma$ H2AX (color vermell) (63X).

### 3.2.13 Expressió de gens de detecció de dany i de reparació amb el tractament amb l'YM155

En l'estudi d'immunofluorescència es va observar que el tractament amb YM155 a la línia A2780p generava un augment del nombre de focis  $\gamma$ H2AX per cèl·lula respecte el control mantenint-se al llarg del temps, fet que no succeïa amb la línia resistent al CDDP, en la qual el tractament amb YM155 només generava dany significatiu a les 72 hores retornant a nivells basals a les 96 hores d'incubació, el què indicava que les cèl·lules reparaven el dany. Per veure l'expressió dels gens relacionats amb la detecció de dany i reparació del DNA, es va realitzar un estudi a nivell de mRNA. Les cèl·lules es van tractar amb 25 nM d'YM155 durant 48 hores. A continuació es va extreure RNA, es va obtenir el cDNA i es va realitzar una TLDA. De tots els gens analitzats a la TLDA, només es mostra l'expressió dels gens relacionats amb la detecció i reparació del DNA.

L'expressió de mRNA de  $\gamma$ H2AX es va veure més expressat a la línia A2780p que a la línia A2780cis. El mateix va succeir amb els gens de detecció de dany com ATM, ATR, CHEK1 i CHEK2, MCD1 els quals també es van expressar més a la línia A2780p (Fig.R3.24). De la mateixa manera, els gens de reparació de DSB com MRE11A, NBN, RAD50 es van veure més expressats a la línia A2780p, així com els gens XRCC4, XRCC5 i XRCC6 (Fig.R3.24), el què estava indicant que a les 48 hores de tractament amb YM155, la línia A2780p tenia dany al DNA, i com a conseqüència els gens de detecció de dany i reparació augmentaven; mentre que en dit temps d'incubació amb l'YM155, la línia A2780cis no tenia dany, i per tant, els gens de detecció i reparació es trobaven en nivells baixos, perquè el dany s'havia reparat.

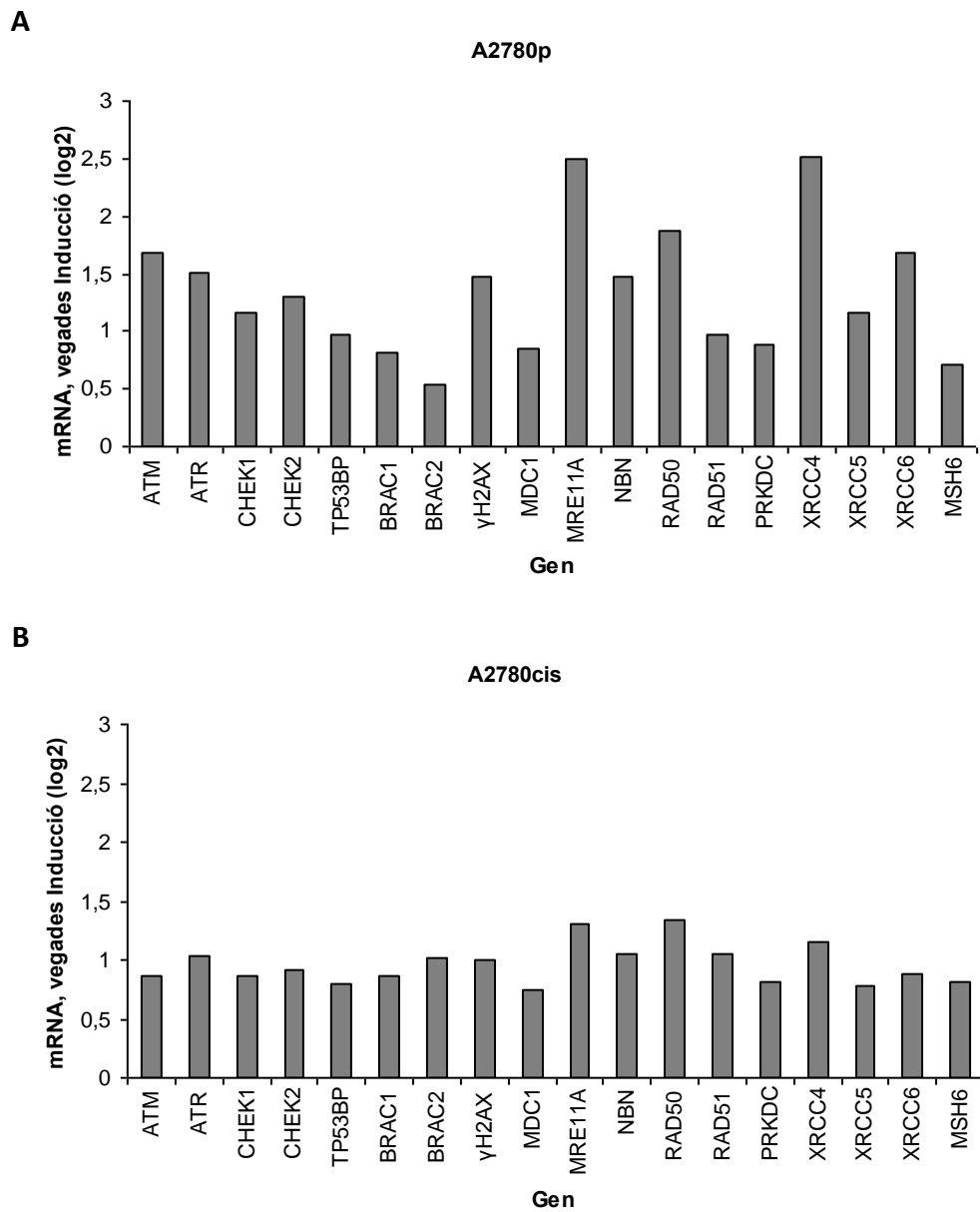


Figura R3.24. Efecte de l'YM155 en l'expressió dels gens de detecció i reparació de DSB a les línies A2780p (A) i A2780cis (B). Les cèl·lules van ser incubades sense YM155 (DMSO) o amb presència d'una única dosi d'YM155 (25 nM) durant 48 hores. El mRNA, vegades d'inducció es va calcular usant el logaritme en base dos dels DDCT. El control pren el valor de 1. El gen normalitzador usat va ser GAPDH.

### **3.2.14 Estudi conjunt de l'apoptosi, dany i proliferació cel·lular amb el tractament amb l'YM155**

Es va procedir a realitzar un estudi conjunt de proliferació cel·lular, dany al DNA i apoptosi en un mateix assaig. Les cèl·lules es van incubar amb 25 nM de YM155 durant 24 i 48 hores i es va procedir a analitzar la proliferació cel·lular, el dany al DNA i l'apoptosi mitjançant la incubació amb anticossos fluorescents específics per la incorporació de BrdU,  $\gamma$ H2AX i PARP truncat, respectivament. L'anàlisi es va realitzar mitjançant citometria de flux.

Amb el tractament amb YM155, la línia A2780p presentava dany (marcatge per  $\gamma$ H2AX) a les 24 hores, mantenint-se fins les 48 hores (Fig.R3.25A). Aquest dany es va associar a una disminució de la síntesi de DNA (no incorporació de BrdU, BrdU-) que va tenir lloc en ambdós temps (Fig.R3.25C). A les 24 hores va haver un lleuger augment de l'apoptosi (presència de PARP truncat, PARP+) que va augmentar considerablement a les 48 hores, associant-se amb una poca proliferació cel·lular (BrdU-) (Fig.R3.25D). Aquesta apoptosi era induïda pel dany generat al DNA (presència de  $\gamma$ H2AX, H2AX+) (Fig.R3.25E). D'altra banda, a la línia A2780cis no es van observar dits canvis; el tractament amb YM155 incubat a dits temps no va generar dany al DNA, apoptosi ni disminució de la proliferació cel·lular, el que indicava que aquestes cèl·lules tenen capacitat per a reparar el dany generat per l'YM155 (Fig.R3.25B).

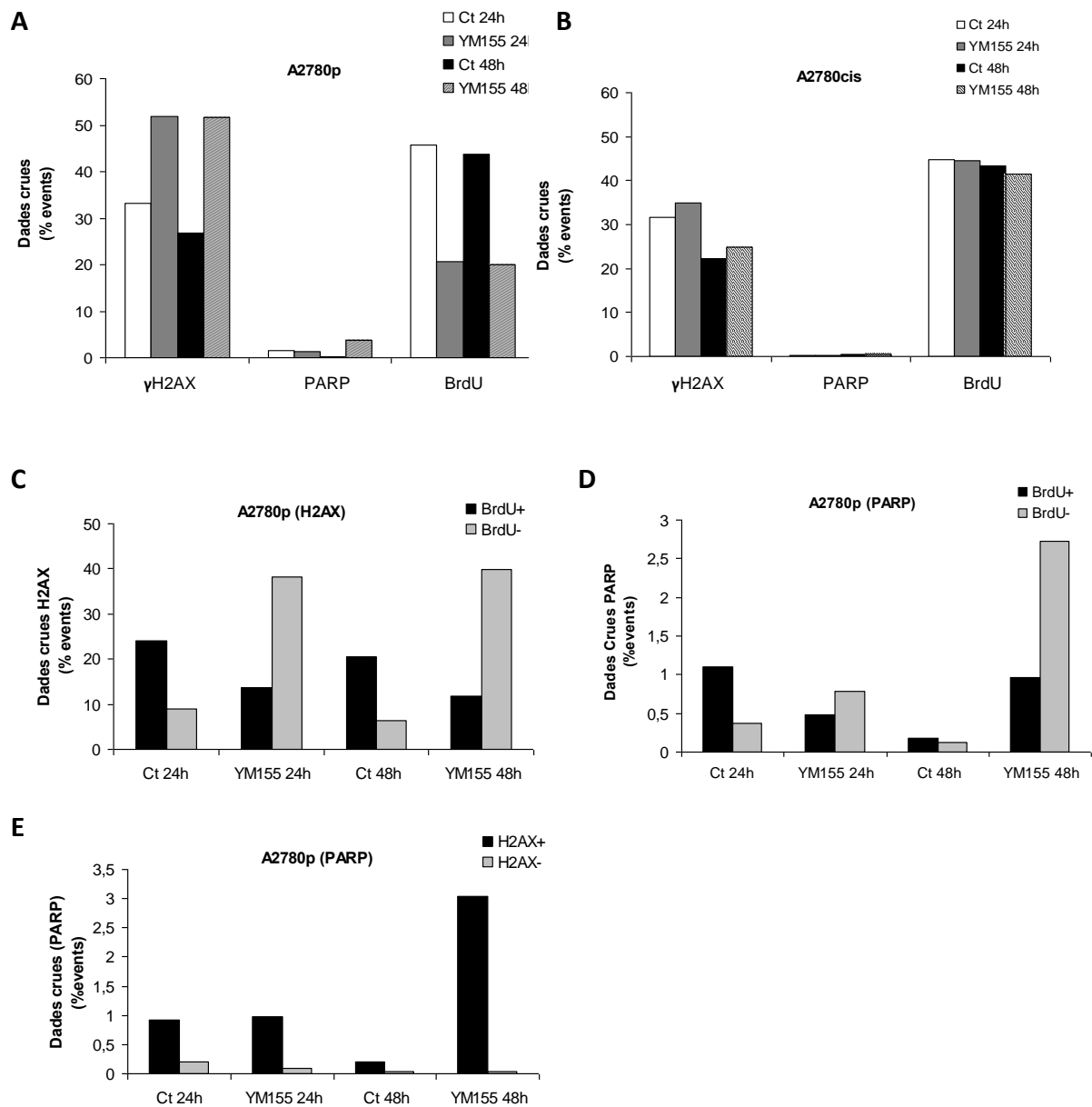


Figura R3.25. Efecte de l'YM155 en la proliferació cel·lular, el dany al DNA i l'apoptosi a les línies cel·lulars de CaOV. A2780p (A, C, D i E) i A2780cis (B) van ser incubades sense YM155 (DMSO) o amb presència d'una única dosi d'YM155 (25 nM) durant 24 i 48 hores. Passat el temps, les mostres es van incubar amb anticossos units a fluorocroms: anti-BrdU (per l'estudi de la proliferació cel·lular), anti- $\gamma$ H2AX (per l'estudi del dany al DNA) i anti-PARP truncat (per l'estudi d'apoptosi). Es van analitzar mitjançant citometria de flux. Els resultats es mostren amb les dades crues (% events gated) (A i B), i les dades crues referenciades a BrdU+/- (C i D) o H2AX (E).



### 3.3 Efecte de l'YM155 en cultius primaris

#### 3.3.1 Sensibilització dels cultius primaris al cisplatí

Per tal d'analitzar l'efecte *ex vivo* del doble tractament amb CDDP i YM155 en cultius primaris de CaOV, es van tractar 6 cultius primaris establerts en el laboratori a partir de mostra tumoral o LASC, amb p53 salvatge o mutada. Els cultius primaris de les 6 pacients es van incubar amb els tractaments simples i doble (Fig.R3.9). Es va procedir a observar els cultius primaris al microscopi, es va realitzar el comptatge cel·lular i es va avaluar la inducció d'apoptosi. Es van considerar cèl·lules apoptòtiques les Annexina positives (AnV<sup>+</sup>/IP<sup>+/-</sup>).

Analitzant la morfologia cel·lular es va observar que amb el tractament amb CDDP, només el cultiu LASC#21, disminuïa la confluència cel·lular respecte el control, amb cèl·lules desenganxades de la placa, vacuolització citoplasmàtica i aspecte arrodonit, morfologia típica de mort per apoptosi; mentre que la resta dels cultius com #10, LASC#14, LASC#15, LASC#16 i LASC#22 no experimentaven cap canvi morfològic, indicant la manca d'apoptosi i la resistència d'aquestes cèl·lules al CDDP (Fig.R3.26). Així doncs, alguns cultius primaris podien ser més resistents al CDDP que d'altres. D'altra banda, el tractament amb l'YM155 generava molta disminució del nombre de cèl·lules respecte el control a tots els cultius primaris, i alhora aquests presentaven una morfologia típica d'apoptosi, on la majoria de cèl·lules tenien un aspecte molt arrodonit i estaven flotant. El doble tractament va potenciar aquest efecte; tots els cultius primaris presentaven molt poca confluència cel·lular respecte el control, i la majoria de cèl·lules tenien aspecte arrodonit, vacuolització citoplasmàtica i tendència a desenganxar-se de la placa (Fig.R3.26). L'observació dels cultius primaris indicava que el tractament amb YM155 estava induint mort per apoptosi als cultius primaris, independentment de l'estat de p53.

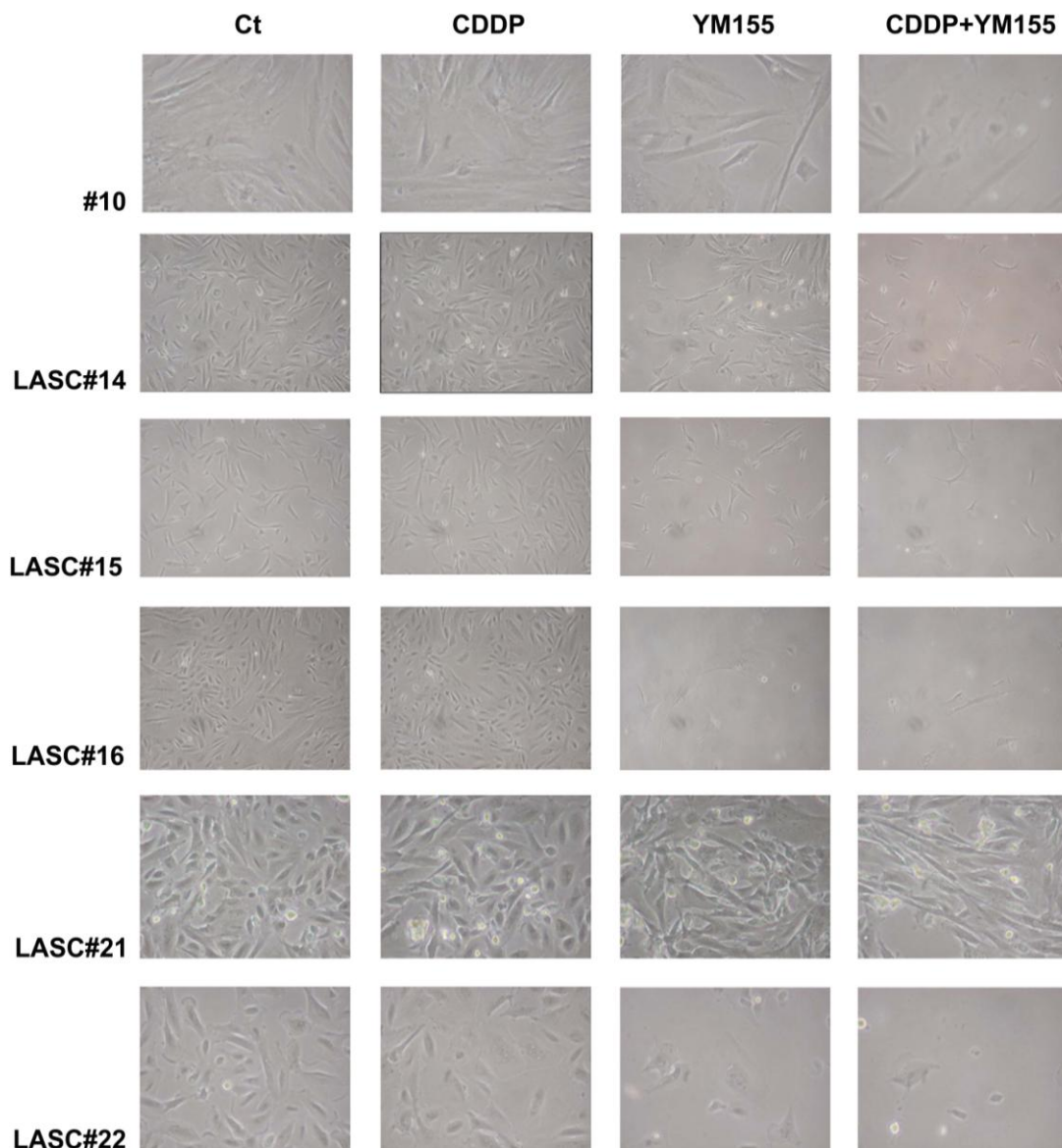


Figura R3.26. Canvis morfològics dels cultius primaris de CaOV després de ser incubats amb CDDP i YM155. Els primaris van ser tractats amb DMSO (Ct), 4  $\mu\text{M}$  de CDDP (tractament CDDP) durant 48 hores, pre-tractats 48 hores amb 25 nM d'YM155 amb absència (tractament YM155) o presència de 4  $\mu\text{M}$  de CDDP (tractament CDDP+YM155) durant 48 hores (10X).

Analitzant el comptatge cel·lular es va apreciar que tots els tractaments disminuïen el nombre de cèl·lules respecte el control (DMSO), especialment en el doble tractament (Fig.R3.27A). Calculant la mitjana del nombre de cèl·lules de tots els cultius primaris per cada tractament, es va comparar la disminució del nombre de cèl·lules que cada tractament generava respecte el control, sent del 24% (CDDP), 52% (YM155) i 70% (doble tractament). Així doncs, el doble tractament estava disminuint el nombre de cèl·lules molt més que els tractaments simples, comportant-se de forma additiva.

Analitzant l'apoptosi, es va observar poca inducció amb el tractament amb el CDDP, mentre que amb YM155 i doble tractament l'apoptosi va incrementar en tots els cultius primaris (Fig.R3.27B). La mitjana d'apoptosi de tots els cultius primaris per cada tractament, va ser del 12% ± 5 (Ct), 15% ± 5,5 (CDDP), del 29% ± 13 (YM155), i 33% ± 12 (doble tractament). El doble tractament va augmentar l'apoptosi respecte el tractament amb CDDP un 18%, sent estadísticament significatiu (p=0,0026). Mentre que l'augment d'apoptosi del doble tractament respecte l'YM155 va ser només del 4%, sense ser significatiu (p=0,578). L'apoptosi del tractament doble era generada en gran part, per l'efecte de l'YM155, indicant que els cultius primaris de CaOV presentaven gran sensibilitat a l'YM155 (Fig.R3.27B). No es va veure l'efecte sinèrgic observat en les línies cel·lulars.

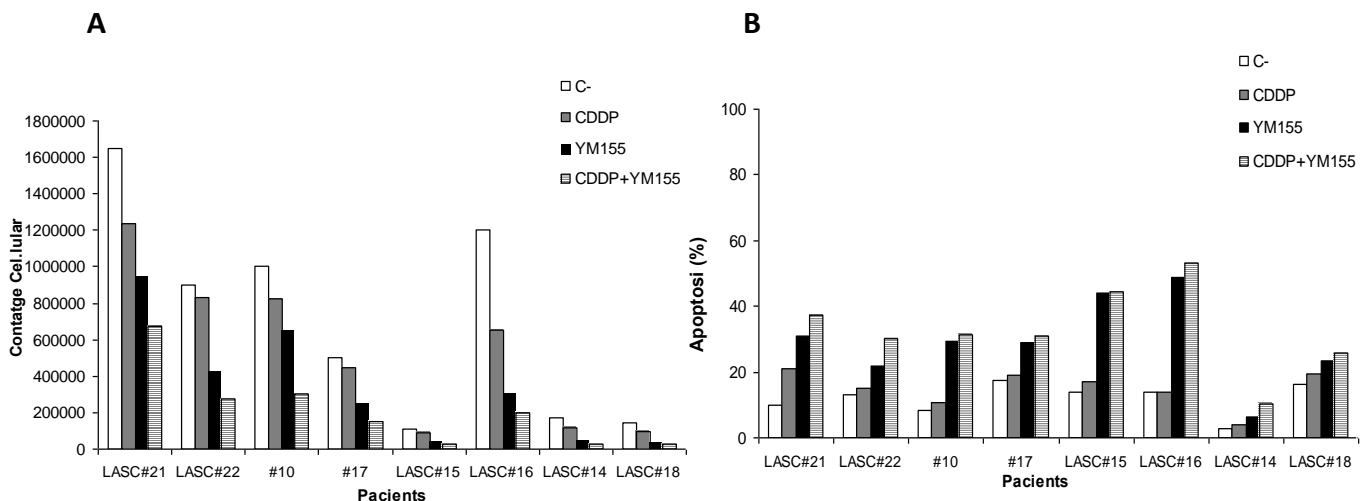


Figura R3.27. Efecte del CDDP, YM155 i doble tractament en cultius primaris de CaOV. Contatge cel·lular (A) i apoptosi (B). Primaris després de ser tractats amb DMSO (Ct), 4 μM de CDDP (tractament CDDP) durant 48 hores, pre-tractats 48 hores amb 25nM d'YM155 amb absència (tractament YM155) o presència de 4 μM de CDDP (tractament CDDP+YM155) durant 48 hores.

### 3.3.2 Inducció de senescència després dels tractaments simples i doble tractament

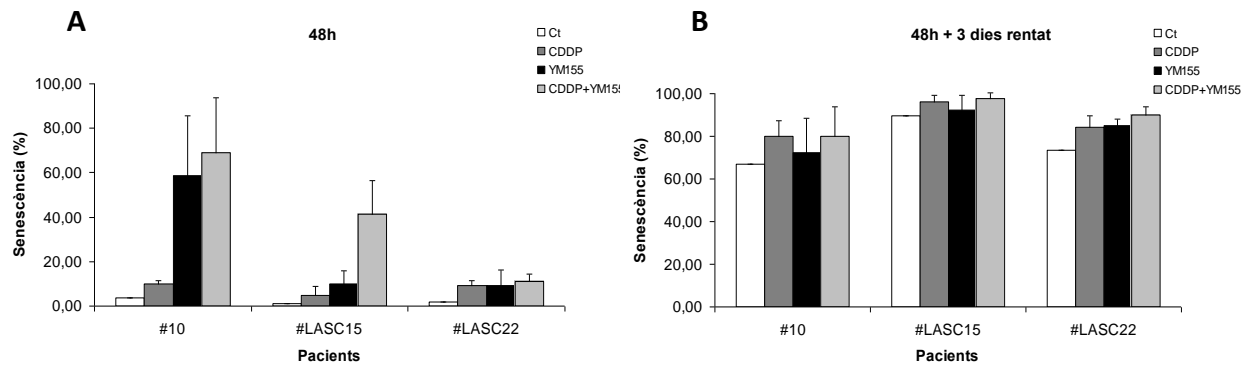
Donat que el doble tractament estava disminuint el nombre de cèl·lules respecte el control un 70% i que l'apoptosi del doble tractament respecte el control augmentava només el 21%, es va procedir a analitzar si el doble tractament estava induint aturada irreversible del cicle cel·lular o senescència, mitjançant el marcatge amb SA-βGAL.

Dels cultius primaris que s'havia analitzat el contacte cel·lular i l'apoptosi, es va poder realitzar l'estudi de senescència en 3 d'ells (#10, LASC#15 i LASC#22) degut a la manca de mostra dels altres cultius. Els cultius primaris es van incubar amb els tractaments simples i doble i es va realitzar una tinció per SA- $\beta$ GAL per comprovar si presentaven característiques de senescència a les 48 hores de tractament (Fig.R3.28A).

Es va observar que a les 48 hores, els diferents tractaments generaven senescència, mentre que el control escassament en presentava. El tractament amb CDDP va generar diferent percentatge de senescència segons el cultiu primari, sent la mitjana de tots del  $8\% \pm 3$ . El tractament amb YM155 va generar una elevada senescència al cultiu #10, mentre que els altres cultius primaris van mantenir nivells baixos, sent la mitjana de tots del  $26\% \pm 28$ . El doble tractament va augmentar la senescència als cultius #10 i LASC#15, mentre que el LASC#22 va mantenir els nivells de senescència com en els tractaments simples. La mitjana de senescència en el doble tractament de tots els cultius primaris va ser del  $40,5\% \pm 29$ . En el cas del cultiu primari #10, quasi tota la senescència del doble tractament va ser produïda per l'YM155, mentre que en el LASC#15 es va observar un efecte sinèrgic entre ambdós fàrmacs. En el cultiu LASC#22 la senescència amb el tractament doble no va augmentar respecte els tractaments simples, va ser produïda pel CDDP i per l'YM155 sense tenir efecte sinèrgic ni additiu (Fig.R3.28A). En general, l'YM155 va induir senescència en alguns cultius primaris de CaOV, l'efecte del qual es va potenciar quan es va tractar conjuntament amb el CDDP (Fig.R3.29A).

Per tal de confirmar que els cultius primaris adquirien característiques senescentes de forma irreversible, es van tractar amb els diferents tractaments durant 48 hores i es van eliminar els fàrmacs del medi afegint-hi medi fresc. Els cultius primaris es van mantenir durant 3 dies addicionals sense fàrmacs i passat aquest temps, es va realitzar la tinció per SA- $\beta$ GAL (Fig.R3.28B). Els resultats mostren que la senescència va augmentar considerablement en tots els tractaments inclús als controls, fet que es deu a que les cèl·lules van romandre massa temps en cultiu i van

acabar obtenint característiques senescent, independentment dels tractaments, ja que aquestes cèl·lules deriven de cultius primaris, no són immortalitzades (Fig.R3.29B). Per tant, no es van considerar els valors obtinguts en les 48 hores+3 dies de rentat.



**Figura R3.28.** Anàlisi de la senescència cel·lular dels cultius primaris de CaOV després de ser tractats amb CDDP i YM155. Primaris després de ser tractats amb DMSO (Ct), 4  $\mu$ M de CDDP (tractament CDDP) durant 48 hores, pre-tractats 48 hores amb 25 nM d'YM155 amb absència (tractament YM155) o presència de 4  $\mu$ M de CDDP (tractament CDDP+YM155) durant 48 hores, i marcats amb SA- $\beta$ GAL (A). Cèl·lules després dels tractaments simples i doble durant 48 hores, més 3 dies addicionals sense fàrmacs, i posterior marcatge amb SA- $\beta$ GAL (B). Les gràfiques representen la mitjana de 5 camps (com a mínim)  $\pm$  desviació estàndar.

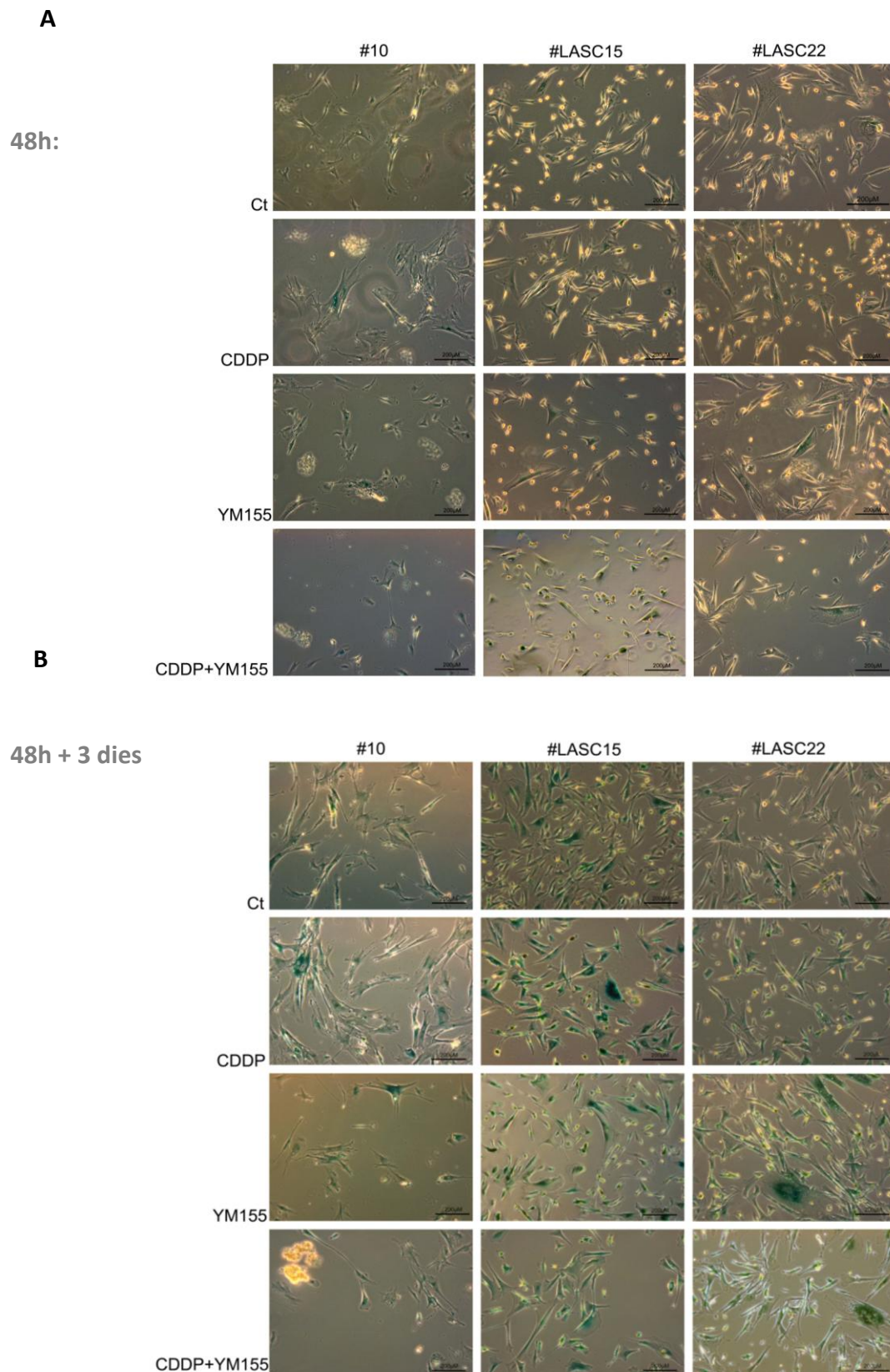


Figura R3.29. Anàlisi de la senescència cel·lular dels cultius primaris de CaOV. Primaris després de ser tractats amb DMSO (Ct), 4  $\mu$ M de CDDP (tractament CDDP) durant 48 hores, pre-tractats 48 hores amb 25 nM d'YM155 amb absència (tractament YM155) o presència de 4  $\mu$ M de CDDP (tractament CDDP+YM155) durant 48 hores i marcats amb SA- $\beta$ GAL (A). Cèl·lules després dels tractaments simples i doble durant 48 hores, més 3 dies addicionals sense fàrmacs, i posterior marcatge amb SA- $\beta$ GAL (B) (10X).

Donat que l'apoptosi i la senescència eren les causants de la disminució del nombre de cèl·lules del doble tractament respecte el control, es va estudiar l'efecte de cadascuna d'elles en cada cultiu primari. Es va comparar el contatge cel·lular, l'apoptosi i la senescència cel·lular produïda pel doble tractament respecte el control (DMSO), en tots tres cultius primaris (Fig.R3.30). Es va observar que el cultiu primari #10 disminuïa amb un 70% el contatge cel·lular en el doble tractament respecte el control, l'apoptosi augmentava un 23% i la senescència també incrementava un 64,27%. Per tant, en aquest cultiu primari, la disminució del nombre de cèl·lules produïa pel doble tractament semblaria ser majoritàriament deguda a la inducció de senescència. El mateix succeïa amb el cultiu primari LASC#15, on la disminució del contatge cel·lular del doble tractament respecte el control va ser del 71%, l'apoptosi augmentava un 30,7% i la senescència s'incrementava un 40,3%. En el cultiu primari LASC#22, la disminució del contatge cel·lular va ser del 69%, l'apoptosi va augmentar un 17%, i la senescència va incrementar només un 9,28% al comparar el doble tractament amb el control. En aquest primari, la disminució del nombre de cèl·lules produïa pel doble tractament va ser majoritàriament deguda a l'apoptosi. Cal remarcar que la suma dels percentatges d'apoptosi i senescència no equivalen a la disminució del nombre de cèl·lules que es va observar respecte el control, ja que els experiments d'apoptosi i senescència es van fer de forma independent, usant en l'apoptosi les cèl·lules adherides i flotants, i en la senescència només les adherides. Per tant, la comparació és una aproximació del què estaria succeint en quan apoptosi i senescència dels cultius primaris analitzats.

	Contatge Cel·lular Ct (Cèl·lules)	Contatge Cel·lular CDDP+YM155 (Cèl·lules)	Augment (%)
#10	1.000.000	300.000	70
LASC#15	106.666	30.000	71
LASC#22	900.000	275.000	69

	Apoptosi Ct (%)	Apoptosi CDDP+YM155 (%)	Augment (%)
#10	8,5	31,52	23,02
LASC#15	13,8	44,5	30,7
LASC#22	13	30	17

	Senescència Ct (%)	Senescència CDDP+YM155 (%)	Augment (%)
#10	3,72	68	64,27
LASC#15	1,22	41,5	40,28
LASC#22	1,72	11	9,28

Figura R3.30. Contatge cel·lular, apoptosi i senescència dels cultius primaris després de ser tractats amb CDDP i YM155. Comparació entre el contatge cel·lular, l'apoptosi i la senescència del tractament doble respecte el Ct (DMSO) en els cultius primaris #10, LASC#15 i LASC#21.

Amb aquests resultats es podia concloure que el doble tractament podia induir senescència als cultius primaris, que seria produïda majoritàriament per l'YM155. Per tant, el doble tractament disminuiria el nombre de cèl·lules dels cultius mitjançant la inducció d'apoptosi i/o senescència depenent el cultiu primari.

### **3.3.3 Anàlisi dels gens pro-apoptòtics i anti-apoptòtics després dels tractaments simples i doble tractament**

Després d'observar que l'YM155 i el tractament doble induïen apoptosi i senescència als cultius primaris de CaOV, es va procedir a analitzar el perfil de gens relacionats amb l'apoptosi mitjançant RT-MLPA a mostres tumorals amb p53 salvatge. Els cultius primaris #10, #17, LASC#21 i LASC#22 es van tractar amb els fàrmacs seguint l'esquema de la fig.R3.9, durant 24 hores després de la incubació amb el CDDP: El control vehicle (DMSO) (48 hores d'incubació + 24 hores addicionals sense retirar el DMSO), el CDDP (24 hores), l'YM155 (48 hores d'incubació + 24 hores addicionals sense retirar l'YM155) i el doble tractament (pre-incubació durant 48 hores amb YM155 i addició del CDDP, incubant-lo 24 hores més). Es va extreure RNA per analitzar el perfil de gens relacionats amb l'apoptosi, mitjançant la tècnica RT-MLPA.

L'expressió de SURVIVINA amb el doble tractament va disminuir considerablement a tots els primaris, sent inferior a la generada pel CDDP i correlacionant-se amb l'augment de l'apoptosi del doble tractament respecte el tractament amb CDDP (Fig.R3.27B). En la majoria dels cultius primaris la disminució de SURVIVINA va ser efecte de l'YM155 (Fig.R.3.31). Comparant el tractament doble amb el tractament amb CDDP, es va observar un augment dels gens pro-apoptòtics NOXA, PUMA i APAF-1 en tots els cultius primaris. L'expressió de BAX amb el doble tractament només va augmentar respecte el CDDP en el cultiu #17, mentre que no va variar en el cultiu LASC#22 i va disminuir en els cultius primaris #10 i LASC#22 (Fig.R.3.31). L'expressió de CDNK1A (p21), gen relacionat amb l'aturada de cicle cel·lular, va augmentar amb el doble tractament respecte el CDDP en tots els cultius primaris, excepte en el cultiu #10, que no es va expressar en cap dels tractaments (Fig.R.3.31). L'expressió de MCL-1 va ser diferent per cada primari i tractament, però



no va disminuir amb el tractament amb l'YM155 en cap d'ells. El mateix va succeir amb XIAP, que amb el tractament amb YM155 només va disminuir lleugerament en els cultius LASC#21 i #10 (Fig.R.3.31). Per tant, l'YM155 no estava inhibint l'expressió de MCL-1 ni XIAP en els cultius primaris (verificant l'especificitat de l'inhibidor YM155 per la Survivina i confirmant els resultats obtinguts amb les línies cel·lulars (Fig.R3.14)).

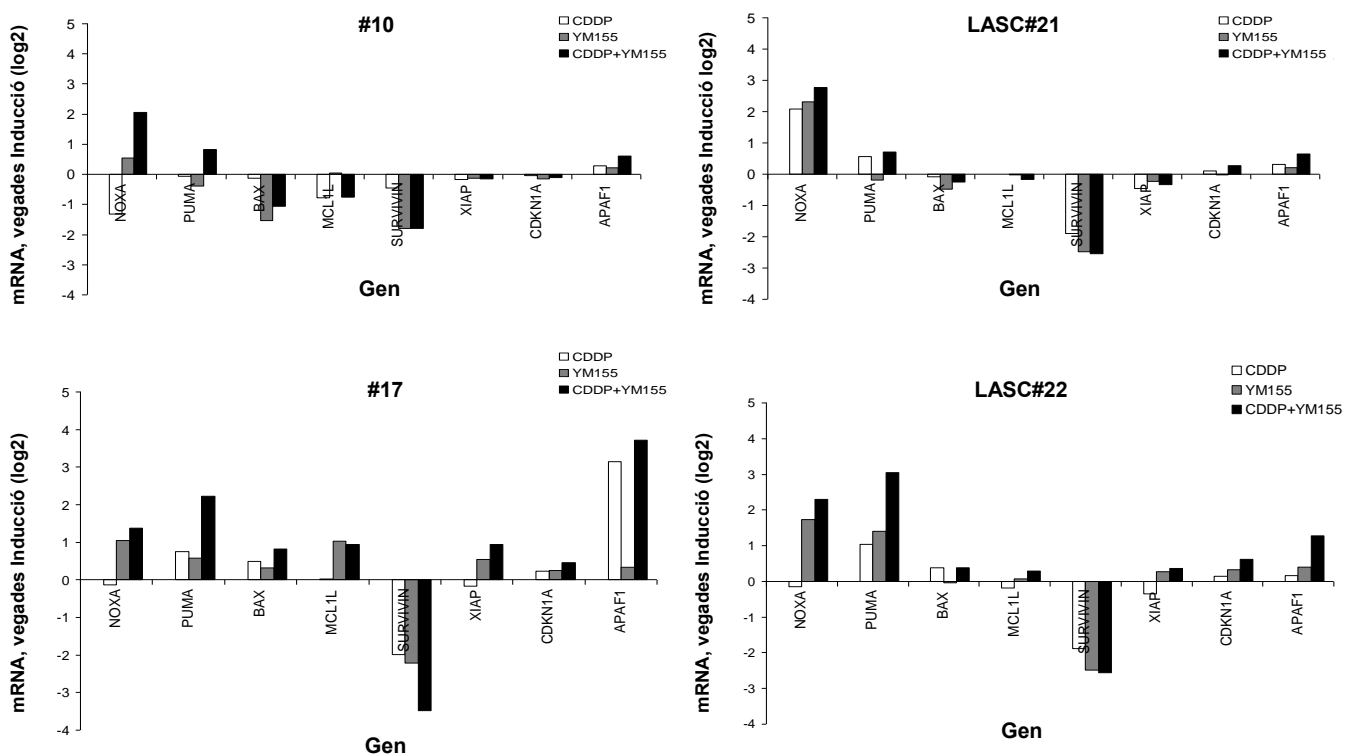


Figura R3.31. Anàlisi dels nivells d'expressió del mRNA dels gens implicats en el mecanisme d'apoptosi mitjançant RT-MLPA. Primaris després de ser tractats amb DMSO (Ct), 4  $\mu$ M de CDDP (tractament CDDP) durant 24 hores, pre-tractats 48 hores amb 25nM d'YM155 amb absència (tractament YM155) o presència de 4 $\mu$ M de CDDP (tractament CDDP+YM155) durant 24 hores. Quantificació de mRNA expressada en logaritme en base 2 de l'increment relatiu en relació al control. El gen normalitzador usat va ser GUSB.

Amb aquests resultats es va demostrar que el doble tractament incrementava l'expressió dels gens pro-apoptòtics i disminuïa els nivells de SURVIVINA respecte al tractament amb CDDP, confirmant l'augment de l'apoptosi del doble tractament respecte el tractament amb CDDP (Fig.R3.27B), fet que evidenciava l'efecte sensibilitzador de l'YM155 al CDDP també en els cultius primaris.

### 3.3.4 Expressió proteica dels cultius primaris després dels tractaments simples i doble tractament

Els cultius amb p53 salvatge LASC#14, LASC#21, LASC#22 es van incubar amb tractaments simples i doble seguint l'esquema de la figura R3.9 durant 48 hores. A continuació es van analitzar els nivells proteics mitjançant *western blot* (Fig.R3.32). Cal mencionar que el perfil gènic i proteic no es va poder realitzar amb els mateixos primaris (a excepció del LASC#21 i LASC#22), degut a la manca de mostra.

Els nivells de Survivina van disminuir amb els tractaments simples CDDP i YM155 (amb lleugera expressió en el cultiu LASC#22) desapareixent amb el doble tractament i coincidint amb l'augment considerable de l'apoptosi (Fig.R3.32). La proteïna p21, amb el tractament amb CDDP només es va expressar lleugerament al LASC#22, mentre que amb YM155 i el doble tractament va induir-se en tots els cultius. (Fig.R3.32). Així doncs, el doble tractament estava expressant més p21 que el tractament amb CDDP. El tractament amb l'YM155 va mantenir els nivells de Xiap igual que el control en tots els primaris, excepte al cultiu LASC#21, que va presentar un lleuger augment (fet que torna a demostrar l'especificitat de l'YM155 per la Survivina) (Fig.R3.32). La disminució dels nivells de Parp total indicava augment de la seva forma truncada, i per tant, apoptosi. Dels cultius primaris analitzats, la forma truncada no es va poder detectar. Amb el doble tractament es va observar una disminució de Parp total respecte el tractament amb CDDP a tots els cultius primaris, fet que es correlacionava amb l'augment de l'apoptosi en tots els cultius (Fig.R3.32).

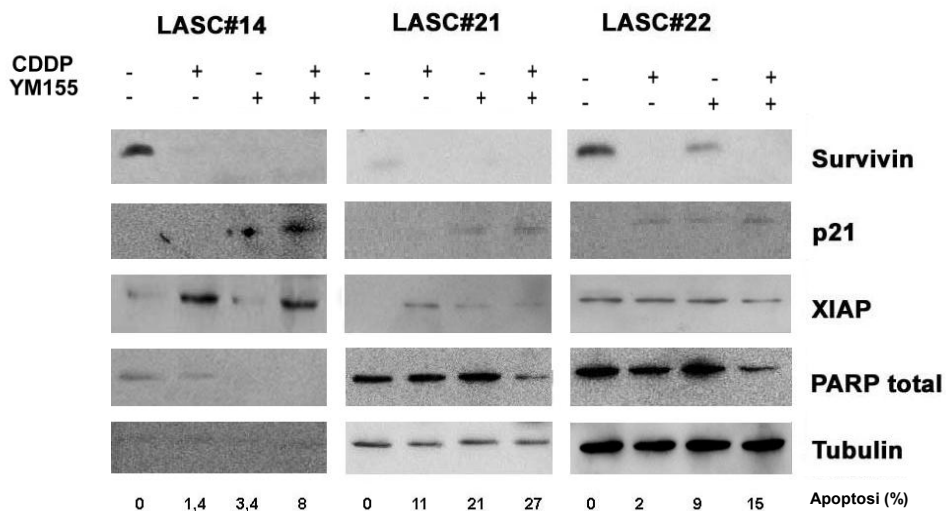


Figura R3.32. Efecte dels tractaments simples i doble tractament en els cultius primaris de CaOV. Primaris després de ser tractats amb DMSO (Ct), 4 µM de CDDP (tractament CDDP) durant 48 hores, pre-tractats 48 hores amb 25 nM d'YM155 amb absència (tractament YM155) o presència de 4 µM de CDDP (tractament CDDP+YM155) durant 48 hores. La tubulina es va usar com a control de càrrega. L'apoptosi mostrada de cada tractament és referenciada al control.

El doble tractament mitjançant la disminució dels nivells proteics de Parp total i Survivina, estava incrementant l'apoptosi als cultius primaris. A més, els nivells de p21 també augmentaven, fet que es correlacionava amb l'aturada en el cicle cel·lular irreversible o senescència observada en els cultius primaris.

### 3.4 Efecte de l'YM155 en xenoinjerts

Els models *in vivo*, permeten analitzar les interaccions complexes que es produeixen a l'organisme, tals com la resposta immune, angiogènesi, la resposta a la quimioteràpia i d'altres. Entre els models *in vivo*, els ratolins immunodeprimits amb injerts tumorals són els més usats en investigació, ja que la biologia d'aquests és molt similar a la dels humans (Stakleff & Von Gruenigen 2003). Aquests models constitueixen una font única de material per l'anàlisi biològic dels elements moleculars i cel·lulars de la transformació neoplàsica, tumorogènesi, i desenvolupament de metàstasi.

El model ectòpic de transplant subcutani s'ha utilitzat extensament en estudis de tumorogènesi. Aquest model presenta l'avantatge sobre els models *in vitro* de reproduir l'arquitectura del tumor original, tanmateix en ocasions no reflexa la

interacció real amb el microentorn tumoral i no reproduïx la disseminació metastàtica (Bex *et al.* 2000).

Per l'estudi de l'YM155 i el doble tractament amb CDDP i YM155, es va usar el model ectòpic de transplant subcutani amb la finalitat de no produir toxicitat i reduir la mida dels tumors amb la combinació dels fàrmacs.

### **3.4.1 Efecte dels tractaments simples i doble tractament en els ratolins amb xenoinjerts**

L'experiment es va realitzar amb un total de 40 ratolins *nude mice* femella (4 ratolins per gàbia/grup), dels quals se'ls va inocular  $3,5 \times 10^6$  cèl·lules a l'esquena per via subcutània. Les cèl·lules inoculades van ser les línies cel·lulars A2780p (20 ratolins) i A2780cis (20 ratolins). Una vegada el tumor va créixer en el ratolí (15-20 dies després de la inoculació cel·lular) amb una mida entre  $0,250-0,3 \text{ cm}^3$ , es va procedir a iniciar el tractament i es va seguir l'evolució de la mida de cada tumor durant els 7 dies de tractament.

Una de les problemàtiques del nostre model va ser que les línies cel·lulars inoculades als ratolins, van créixer amb dispersió i van generar tumors de mida heterogènia: l'experiment amb la línia A2780p es va dur a terme amb tumors de mida bastant heterogènia, però mai superant la mida de  $0,3 \text{ cm}^3$  de volum. Per l'experiment amb la línia A2780cis es va millorar la tècnica: després del creixement tumoral, on també s'observava heterogeneïtat, es va procedir a extripar els tumors crescuts de diferent mida i amb un bisturí es van tallar a la mateixa mida ( $0,1 \text{ cm}^3$ ). Amb cirurgia es van tornar a introduir via subcutània a l'esquena de nous ratolins (2 tumors/ratolí) i es van deixar créixer. Quan els tumors van ser tots homogenis i van assolir la mida de  $0,3 \text{ cm}^3$  de volum, es va iniciar el tractament. El pes i mida dels ratolins amb dos tumors es va obtenir calculant la mitjana d'ambdós tumors.

Les mitjanes dels experiments no es van realitzar amb tots els ratolins tractats de cada línia (5 ratolins per tractament), ja que els que presentaven molta heterogeneïtat o un tumor molt gran ( $>0,3 \text{ cm}^3$  de diàmetre) es van sacrificar abans d'iniciar el tractament. En alguns casos els ratolins van morir degut al trencament de

les bombes al seu interior, sent amb DMSO o YM155, la qual no es va considerar mort per efecte de la droga i també es van obviar al moment de calcular les mitjanes.

Per realitzar el tractament, a cada grup hi havia el ratolí control, el qual se li administrava el vehicle del fàrmac (DMSO a l'1% en solució salina), el ratolí CDDP (tractat amb CDDP), el ratolí YM155 (tractat amb l'YM155), i el ratolí amb el doble tractament (CDDP+YM155). A la figura R3.33 es mostra l'esquema de cada tractament.

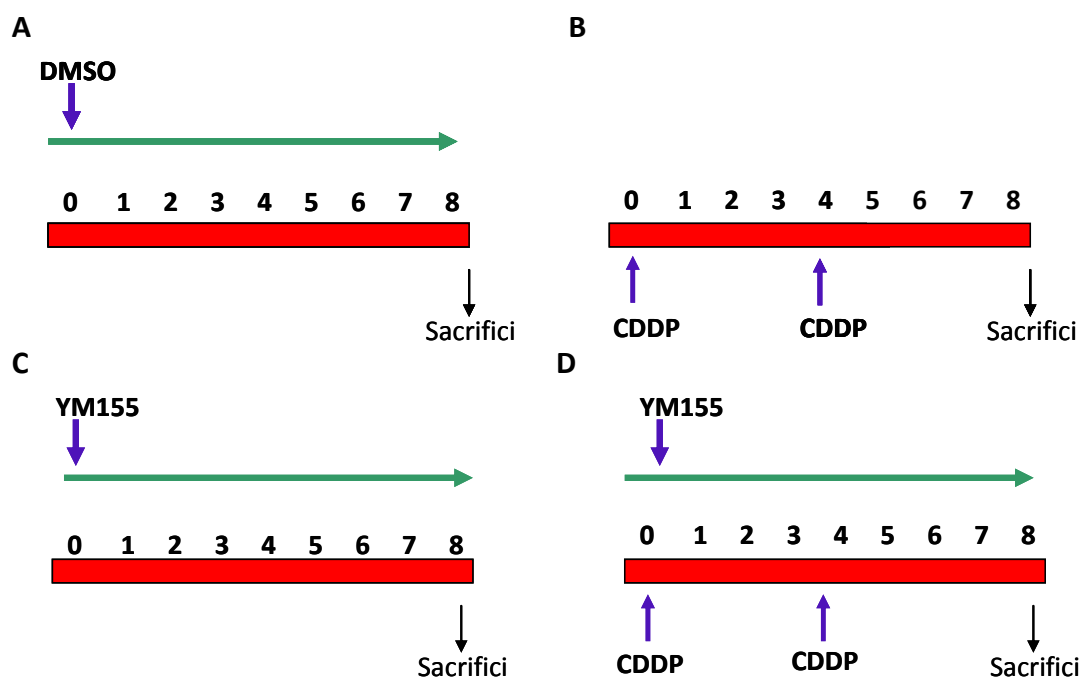


Figura R3.33. Esquema del tractament amb CDDP i YM155 durant 7 dies. Ratolins control: portaven la bomba de perfusió a la cavitat intraperitoneal, la qual alliberava de forma contínua el DMSO a l'1% en solució salina durant els 7 dies, amb un flux de 0.5  $\mu\text{L}/\text{h}$  (A). Ratolins amb CDDP: Se'ls hi va injectar un volum de 300  $\mu\text{L}$  de CDDP a una dosi de 4 mg/Kg amb xeringa via intraperitoneal els dies 0 i 4 del tractament (B). Ratolins amb YM155: el fàrmac es va dissoldre amb DMSO a una concentració final de 15 mg/mL, es va introduir als ratolins mitjançant bombes de perfusió a la cavitat intraperitoneal, les quals alliberaven YM155 de forma contínua durant els 7 dies, amb un flux de 0.5  $\mu\text{L}/\text{h}$  (a dosi de 5mg/Kg) (C). Ratolins amb doble tractament: se'ls va introduir la bomba de perfusió a dosi de 5 mg/Kg de YM155 des del dia 0 al 7, i als dies 0 i 4 de tractament, se'ls va injectar el CDDP via intraperitoneal a la dosi de 4 mg/Kg (D).

Els paràmetres de supervisió de dolor com la pèrdua de pes, l'aspecte físic, les alteracions de la conducta i la mida del tumor es van realitzar des de l'inici del tractament. A l'experiment de la línia A2780p, es va procedir a mesurar el pes corporal i la mida de tumor els dies 0, 4 i 8, mentre que en l'experiment amb la línia

A2780cis, la mesura es va realitzar els dies 0, 2, 4, 6 i 8. El dia del sacrifici va ser el vuitè dia després de l'inici del tractament per tots els ratolins.

Amb la supervisió i la mesura del pes corporal dels ratolins tractats al llarg del temps no es va observar en cap dels tractaments signes de deteriorament. Tots ells tenien un físic normal, sense alteracions de la conducta (com inconsciència, incapacitat de moure's en normalitat, etc), caquèxia, icterícia o pèrdua excessiva de pes. Els ratolins que més van disminuir de pes el dia del sacrifici respecte el dia d'inici del tractament van ser els tractats amb CDDP ( $p=0,0117$  (A2780p) i  $p=0,013$  (A2780cis)), els quals presentaven lleugera caquèxia: un aspecte físic amb desnutrició, atròfia muscular, debilitat i anorèxia. La disminució de pes amb el doble tractament va ser significatiu només a la línia A2780cis ( $p=0,003$ )(Fig.R3.34B), però tots presentaven un aspecte físic normal. El tractament amb l'YM155 no va generar disminució del pes de forma significativa a cap dels ratolins i tots presentaven un aspecte físic normal. El doble tractament estava disminuint el pes dels ratolins, per efecte del CDDP, tanmateix, no van presentar un aspecte físic de deteriorament, a diferència dels tractats amb CDDP (Fig.R3.34).

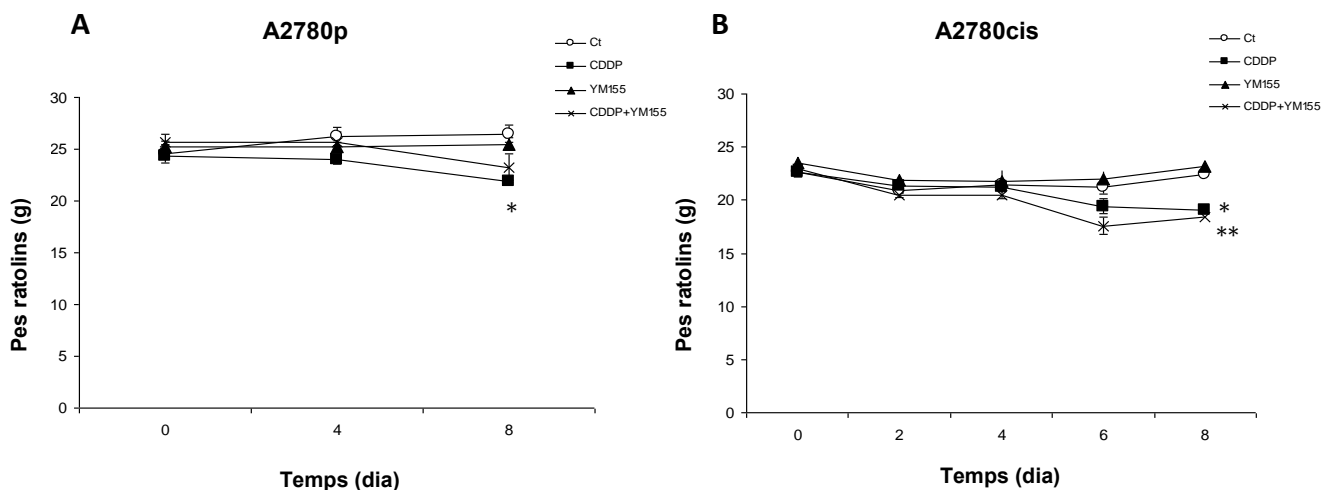


Figura R3.34. Pes dels ratolins després dels tractaments simples i doble tractament. Els ratolins van ser inoculats amb A2780p (A) i A2780cis (B) amb DMSO (Ct), CDDP (4 mg/Kg), YM155 (5 mg/Kg) i doble tractament (CDDP (4 mg/Kg) + YM155 (5 mg/Kg)). En els ratolins amb A2780p, la mesura del pes va ser els dies 0, 4 i 8 del tractament. En els ratolins amb A2780cis la mesura del pes va ser els dies 0, 2, 4, 6 i 8 del tractament. Els valors s'expressen com a mitja de n=3 ratolins en la línia A2780p; mitja de n=4 en els ratolins de la línia A2780cis  $\pm$  error estàndard (SEM). Pes del tumor dia del sacrifici respecte el dia d'inici del tractament \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,005$  (T-Student).

Analitzant la mida dels tumors dels ratolins, els control van créixer des de l'inici del tractament fins al dia del sacrifici. Amb el tractament amb CDDP, els tumors A2780p van créixer respecte el control fins al quart dia, quan van començar a disminuir de mida fins al dia del sacrifici ( $p=0,0021$ ). Mentre que els tumors A2780cis van créixer al llarg de tot el tractament, amb inferior mida respecte als control només en el dia del sacrifici ( $p=0,0124$ ) (Fig.R3.35). Amb el tractament amb l'YM155, els tumors d'ambdós tipus cel·lulars van créixer, sempre sent inferiors al control, sent al dia del sacrifici estadísticament significatiu: ( $p=0,01$  (A2780p),  $p=0,03$  (A2780cis)) (Fig.R3.35). Amb el doble tractament, es va observar una lleugera disminució de la mida del tumor de tots els ratolins respecte els control durant tot el tractament: A2780p:  $p=0,0016$  (dia 8); A2780cis:  $p=0,0021$  (dia 4);  $p=0,0013$  (dia 6);  $p=0,0001$  (dia 8) (Fig.R3.35). Comparant la mida dels tumors tractats amb doble tractament respecte el CDDP, es va observar una reducció de mida dels tumors dels ratolins tractats amb el doble tractament: A2780p:  $p=0,02$  (dia 4), mentre que en el dia del sacrifici, la disminució no va ser significativa ( $p=0,26$ ), degut a què són cèl·lules sensibles al CDDP, tractament que ja havia generat gran disminució de la mida dels tumors; A2780cis:  $p=0,041$  (dia 2);  $p=0,0021$  (dia 4);  $p=0,0015$  (dia 6);  $p=0,0015$  (dia 8) (Fig.R3.35B).

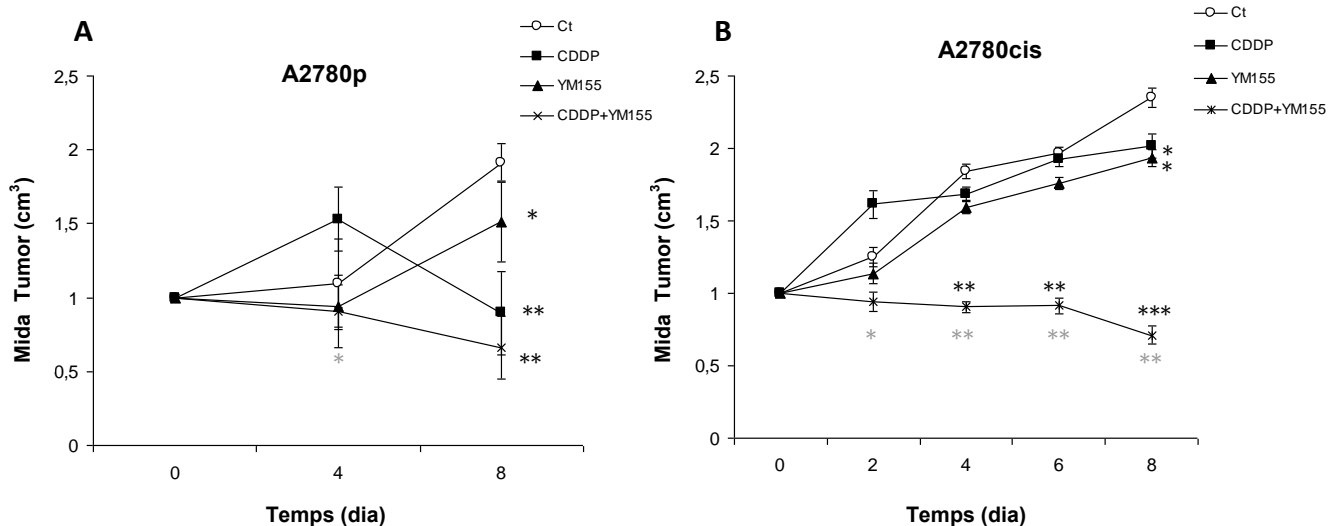


Figura R3.35. Augment relatiu de la mida dels tumors de CaOV després dels tractaments simples i doble. Ratolins inoculats amb A2780p (A) i A2780cis (B) amb DMSO (Ct), CDDP (4 mg/Kg), YM155 (5 mg/Kg) i doble tractament (CDDP (4 mg/Kg) + YM155 (5 mg/Kg)) durant 7 dies. En els ratolins amb A2780p la mesura de la mida tumoral va ser els dies 0, 4 i 8 del tractament. En els ratolins amb A2780cis la mesura del pes va ser els dies 0, 2, 4, 6 i 8 del tractament. Els valors s'expressen com a mitja ( $n=3$  ratolins en la línia A2780p;  $n=4$  ratolins de la línia A2780cis)  $\pm$  error estàndard (SEM). Valors referenciats a la mida del tumor al dia d'inici de tractament (dia 0), el qual pren el valor de 1. L'estadística es va realitzar comparant la mida del tumor del tractament respecte el control (Ct) del mateix dia. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,005$ ; \*\*\* $p<0,0005$  (T-Student) o bé comparant la mida dels tumors del doble tractament respecte el CDDP del mateix dia: \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,005$ ; \*\*\* $p<0,0005$  (T-Student).

Amb aquests resultats es va observar que l'YM155 per sí sol no tenia efecte reduint la mida dels tumors de CaOV a ratolins, tanmateix quan es combinava amb el CDDP, la mida del tumor disminuïa considerablement. L'YM155 estava sensibilitzant a les cèl·lules al CDDP, disminuint la mida dels tumors resistents a aquest (Fig.R3.36).

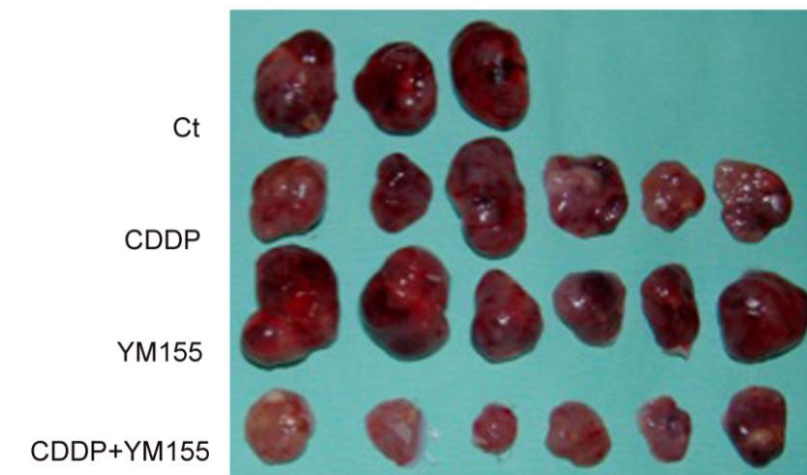


Figura R3.36. Mida dels tumors dels ratolins A2780cis després dels tractaments simples i doble tractament. Els ratolins es van tractar amb DMSO (Ct), CDDP (4 mg/Kg), YM155 (5 mg/Kg) i doble tractament (CDDP (4 mg/Kg) + YM155 (5 mg/Kg)) durant 7 dies.

### 3.4.2 MLPA dels xenoinjerts dels ratolins després dels tractaments simples i doble tractament

Després d'observar que l'YM155 mostrava sinergisme *in vitro* amb el CDDP i que el doble tractament disminuïa més la mida tumoral que els tractaments simples en els xenoinjerts de CaOV, es va procedir a analitzar el perfil de gens relacionats amb l'apoptosi dels xenoinjerts.

Analitzant els gens pro-apoptòtics amb el tractament amb CDDP, es va observar un increment dels gens NOXA, BAX i APAF-1, sobretot als tumors A2780p (Fig.R3.37A). Amb el doble tractament, l'expressió dels gens pro-apoptòtics va augmentar considerablement en comparació al tractament amb CDDP, sobretot als tumors A2780cis, on NOXA, PUMA, BAX i APAF-1 van augmentar l'expressió respecte el tractament amb CDDP (Fig.R3.37B). El mateix va succeir amb el gen CDKN1A (p21), el qual amb el doble tractament va incrementar l'expressió respecte el tractament amb



CDDP en ambdós tipus tumoral (Fig.R3.37A i B). Per tant, el doble tractament estava augmentant l'expressió dels gens pro-apoptòtics i del gen regulador del cicle cel·lular en comparació amb el tractament amb CDDP, fet que es correlacionava amb la disminució de mida de tots els tumors tractats amb el doble tractament (Fig.R3.35). L'expressió del gen anti-apoptòtic SURVIVINA va disminuir considerablement als tumors A2780p tractats amb CDDP, mentre que en els A2780cis va disminuir lleugerament. Tanmateix, el doble tractament va induir una forta disminució de l'expressió de SURVIVINA a ambdós tipus tumoral (Fig.R3.37). Comparant l'expressió de SURVIVINA del doble tractament respecte el tractament amb CDDP, els tumors A2780cis van ser els que van obtenir una disminució significativa de l'expressió de SURVIVINA amb el doble tractament respecte el tractament amb CDDP ( $p=0,0102$ ) (Fig.R3.37B). Per tant, el doble tractament en comparació amb el CDDP, estava fent disminuir els nivells de SURVIVINA als tumors resistents al CDDP, fet que es correlacionava amb la disminució de la mida dels tumors quan rebien el doble tractament (Fig.R3.35). El mRNA de XIAP es va comportar de manera diferent en ambdós tipus tumoral. En els tumors A2780p va disminuir amb els tractaments amb YM155 i doble tractament, mentre que en els tumors A2780cis va disminuir lleugerament amb l'YM155 i va augmentar amb el doble tractament. MCL-1 també va disminuir considerablement l'expressió amb el tractament amb l'YM155 en els tumors A2780p, mentre que ho va fer lleugerament als tumors A2780cis (Fig.R3.37). Aquests resultats no concordaven amb els observats amb les línies cel·lulars i cultius primaris; s'hauria d'augmentar la "n" del MLPA dels tumors dels ratolins tractats per verificar els resultats de l'expressió de MCL-1 i XIAP.

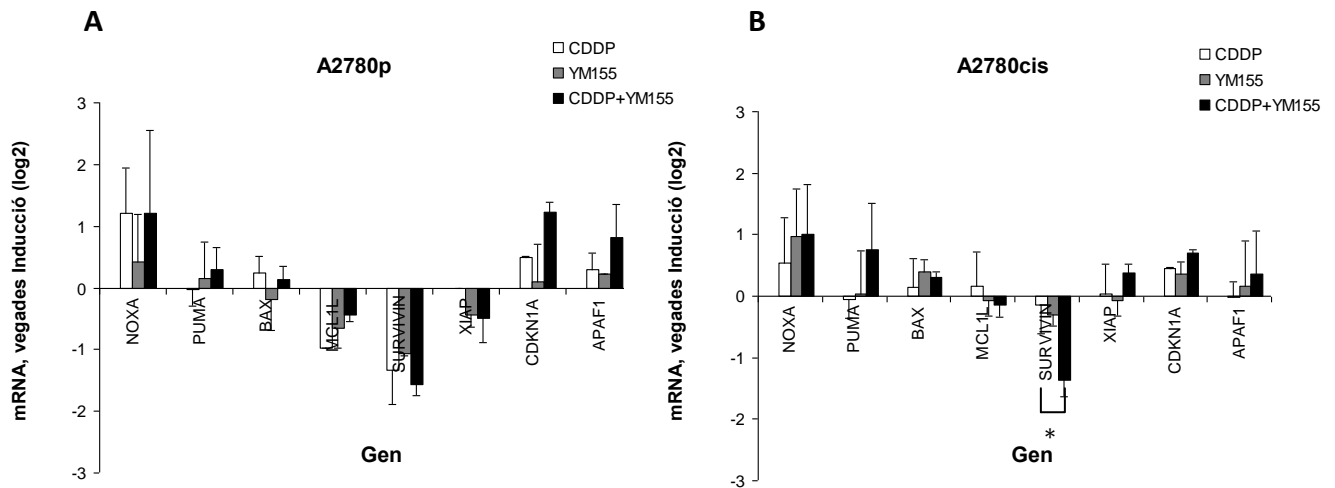


Figura R3.37. MLPA dels tumors dels ratolins després dels tractaments simples i doble tractament. Els ratolins es van tractar amb DMSO (Ct), CDDP (4mg/Kg), YM155 (5mg/Kg) i doble tractament (CDDP (4mg/Kg) + YM155 (5mg/Kg)) durant 7 dies. Es va realitzar disgregació mecànica de 0,1 cm<sup>3</sup> de tumor i es va extreure RNA per la realització del RT-MLPA. Quantificació de mRNA expressada en logaritme en base 2 de l'increment relatiu en relació al control. El gen normalitzador usat va ser GUSB. Les gràfiques mostren la mitjana de 3 experiments independents realitzats per a cada tipus de xenoinjert A2780p (A) o A2780cis (B) ± desviació estàndard \*p<0,05 (T-Student).

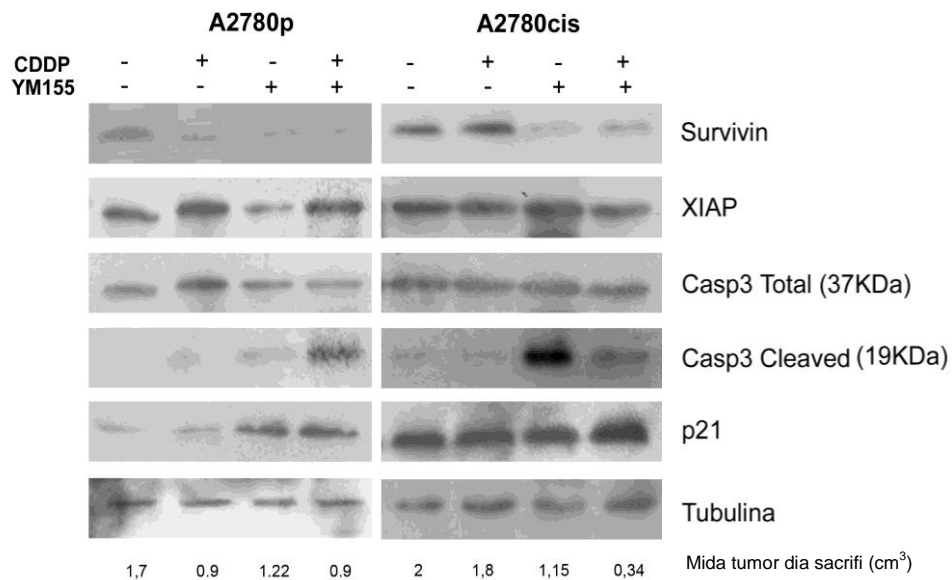
Així doncs, el doble tractament en el model de xenoinjert estava incrementant l'expressió dels gens pro-apoptòtics i disminuint els nivells de SURVIVINA respecte el tractament amb CDDP, fet que tornava a evidenciar l'efecte sensibilitzador de l'YM155 respecte el CDDP en els tumors de CaOV.

### 3.4.3 Expressió proteica dels xenoinjerts després dels tractaments simples i doble tractament

Després d'analitzar el perfil d'expressió dels gens relacionats amb l'apoptosi dels tumors de CaOV tractats sense fàrmac (DMSO), CDDP, YM155 i doble tractament, es va procedir a l'anàlisi del perfil proteic mitjançant *western blot*, que es va quantificar mitjançant densitometria amb el *software* ImageJ.

El tractament amb CDDP va disminuir l'expressió de Survivina respecte el control als tumors A2780p, assolint valors de 0,19, confirmant així els resultats del mRNA observats (Fig.R3.37) i la sensibilitat d'aquests tumors al CDDP. Tanmateix, els tumors A2780cis van mantenir els nivells de la proteïna igual que el control (Fig.R3.38). El tractament amb l'YM155 va disminuir l'expressió de Survivina als dos tipus tumoral, amb valors de 0,14 (A2780p) i 0,15 (A2780cis). Aquest efecte es va potenciar amb el doble tractament, assolint nivells proteics respecte el control de 0,11

(A2780p) i 0,10 (A2780cis), amb una reducció considerable de la mida del tumor a ambdós tipus tumoral (Fig.R3.38). Aquests resultats indicaven que l'YM155 estava inhibint l'expressió de Survivina dels tumors i estava sensibilitzant a les cèl·lules A2780cis al CDDP generant una disminució de la mida tumoral. Els nivells de Xiap es van mantenir constants en tots els tractaments dels tumors A2780cis, mentre que en els A2780p tractats amb YM155, l'expressió va disminuir respecte el control. No van haver canvis amb el doble tractament (Fig.R.38). Pel que fa a la caspasa 3 total, va disminuir amb l'YM155 i el doble tractament en els tumors A2780p, augmentant la forma truncada, sobretot en el doble tractament. Mentre que en els tumors A2780cis no va disminuir la forma total, però sí va augmentar la forma truncada amb l'YM155 i el doble tractament (Fig.R.38). Comparant el doble tractament respecte el CDDP, la forma truncada va augmentar en comparació al tractament amb CDDP en ambdós tipus de tumor, indicant que el doble tractament estava generant més apoptosi que el CDDP, correlacionant-se amb la disminució de la mida tumoral. De la mateixa manera, p21 es va induir més amb el doble tractament que amb el CDDP en ambdós tipus tumoral (Fig.R.38).



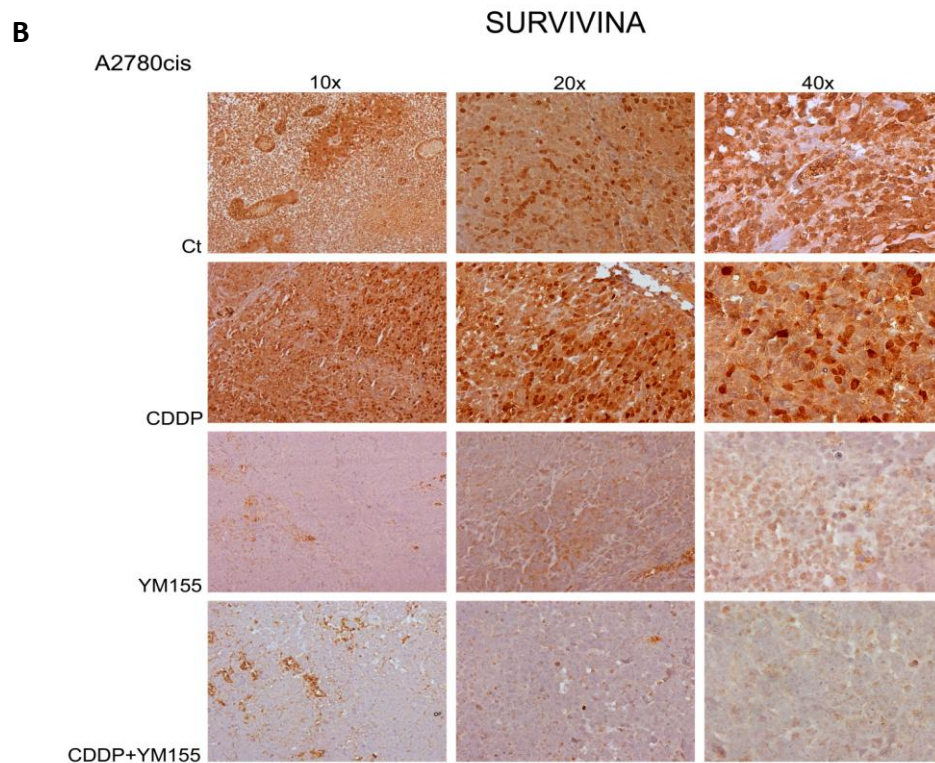
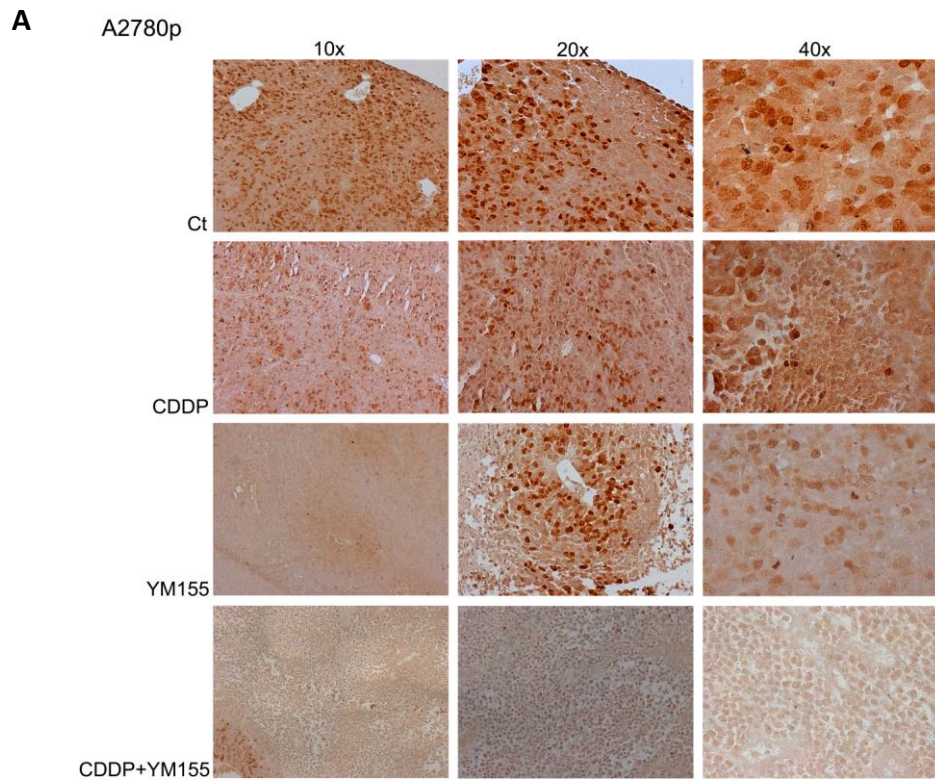
**Figura R3.38.** Expressió proteica dels tumors dels ratolins després dels tractaments simples i doble tractament. Els ratolins es van tractar amb DMSO (Ct), CDDP (4 mg/Kg), YM155 (5 mg/Kg) i doble tractament (CDDP (4 mg/Kg) + YM155 (5 mg/Kg)) durant 7 dies. Es va realitzar disgregació mecànica de 0,1 cm<sup>3</sup> de tumor, i els lisats es van usar per a detectar els nivells proteics mitjançant *western blot*. La tubulina es va usar com a control de càrrega. La mida dels tumors mostrada de cada tractament és l'obtinguda el dia del sacrifici.

Així doncs, es va demostrar que el tractament doble estava incrementant l'apoptosi, amb l'augment de la forma truncada de la caspasa 3, i la disminució dels nivells de Survivina. A més, els nivells de p21 augmentaven, fet que evidenciava la aturada en el cicle cel·lular de les cèl·lules tumorals tractades amb el doble tractament.

#### **3.4.4 Anàlisi per immunohistoquímica dels xenoinjerts després dels tractaments simples i doble tractament**

Per ampliar el coneixement de l'efecte de l'inhibidor de Survivina YM155 *in vivo* i el procés apoptòtic que s'estava portant a terme en els tumors dels ratolins tractats, es va procedir a analitzar l'expressió de Survivina i caspasa 3 en teixit parafinat dels xenoinjerts de CaOV que havien estat tractats sense fàrmac (DMSO), CDDP, YM155 i doble tractament. Els teixits es van fixar amb formol al 10% i es va procedir a la deshidratació i inclusió amb parafina.

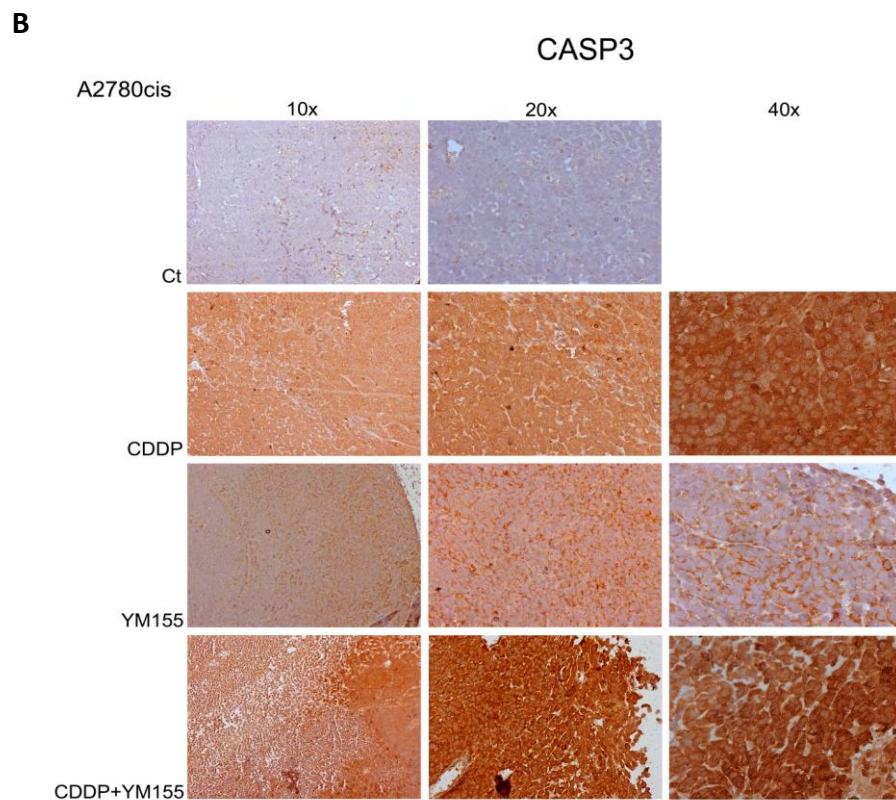
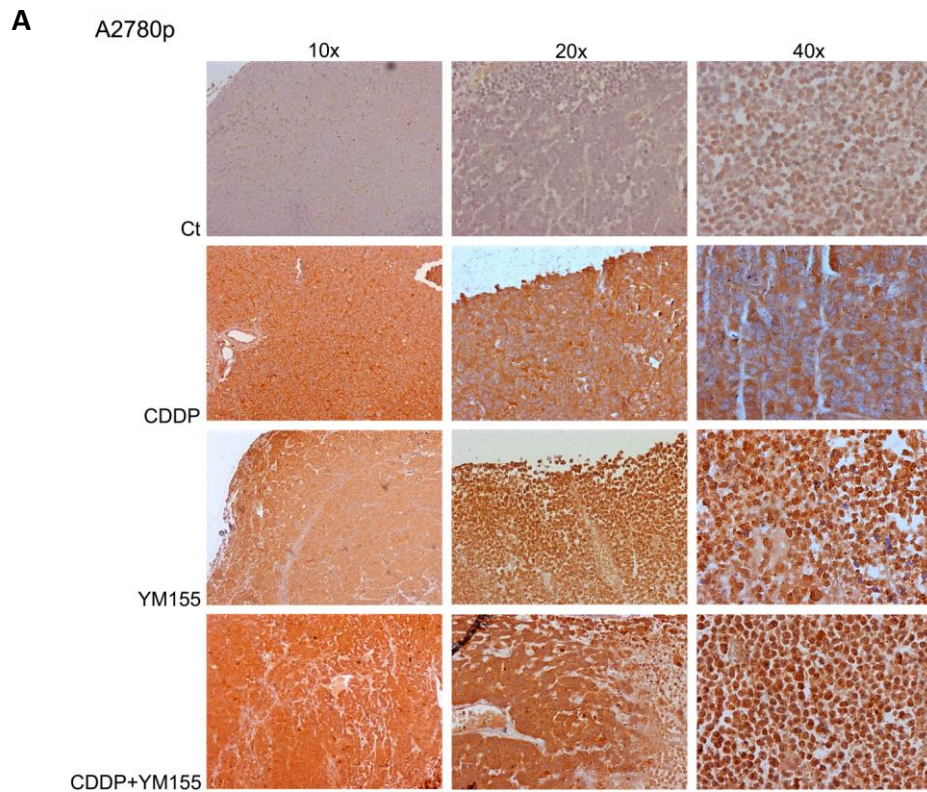
El marcatge per Survivina (Fig.R3.39) va ser fort pels tumors que no van rebre tractament (Ct), on la proporció de cèl·lules positives va ser igual o superior al 75%. El tractament amb CDDP va disminuir la intensitat de marcatge i proporció de cèl·lules marcades en els tumors A2780p (Fig.R3.39A), mentre que en els tumors A2780cis es va mantenir com al control (Fig.R3.39B). Tanmateix, el marcatge de Survivina dels tumors tractats amb l'YM155 va ser moderat i la proporció de cèl·lules positives va ser del 50% en ambdós tipus tumoral. Finalment els tumors tractats amb el doble tractament, van presentar una intensitat de marcatge molt dèbil, i la proporció de cèl·lules positives per camp va ser inferior al 25% (Fig.R3.39).



**SURVIVINA**

Figura R3.39. Marcatge de Survivina dels tumors dels ratolins després dels tractaments simples i doble tractament. Els ratolins de la línia A2780p (A) i A2780cis (B) van ser tractats amb DMSO (Ct), CDDP (4 mg/Kg), YM155 (5 mg/Kg) i doble tractament (CDDP (4 mg/Kg) + YM155 (5 mg/Kg)) durant 7 dies. Els tumors es van deshidratar, parafinar i es van obtenir talls de 4 µm que es van adherir a portes polilisinats. Es va realitzar la immunohistoquímica per Survivina (1/50): Tinció positiva (marró) a nucli i citoplasma.

Pel que fa al marcatge de la caspasa 3 total i truncada (Fig.R3.40), va ser dèbil en els tumors que no van rebre tractament (Ct), amb menys del 10% de cèl·lules positives per camp. El tractament amb CDDP va augmentar la intensitat de marcatge en els tumors A2780p amb 50-75% de cèl·lules positives (Fig.R3.40A), mentre que en els tumors A2780cis el marcatge va ser moderat amb 25-50% de cèl·lules marcades (Fig.R3.40B). L'YM155 i el doble tractament van augmentar la proporció de cèl·lules marcades a ambdós tipus de tumor (més del 75% de cèl·lules marcades per camp) sent un marcatge fort pel tractament amb l'YM155, i molt fort amb el doble tractament.



**CASP3**

Figura R3.40. Marcatge de caspasa 3 dels tumors dels ratolins després dels tractaments simples i doble tractament. Els ratolins de la línia A2780p (A) i A2780cis (B) van ser tractats amb DMSO (Ct), CDDP (4 mg/Kg), YM155 (5 mg/Kg) i doble tractament (CDDP (4 mg/Kg) + YM155 (5 mg/Kg)) durant 7 dies. Els tumors es van deshidratar, parafinar i es van obtenir talls de 4 µM que es van adherir a portes polilisinats. Es va realitzar la immunohistoquímica per caspasa 3 total i truncada (1/20): Tinció positiva (marró) al citoplasma.

L'expressió de Survivina dels tumors tractats amb CDDP, va disminuir de forma no significativa respecte el control (Fig.R3.41). Amb el tractament amb l'YM155, els nivells de Survivina van disminuir respecte el control a ambdós casos, sent estadísticament significatiu en els tumors A2780cis ( $p=0,0019$ ) (Fig.R3.41). Amb el doble tractament, els nivells de Survivina també van disminuir a ambdós tipus tumorals ( $p=0,03$  (A2780p);  $p=0,004$  (A2780cis)). Comparant el doble tractament respecte el tractament amb CDDP, els nivells de Survivina van disminuir significativament, sobretot als tumors resistents al CDDP A2780cis ( $p=0,0018$ ) (Fig.R3.41B).

Amb aquests resultats es va confirmar que el tractament amb YM155 i doble tractament estava disminuint els nivells de Survivina també *in vivo*.

L'expressió de la caspasa 3 dels tumors tractats amb CDDP va augmentar als dos tipus tumorals, sent molt més elevada l'expressió en els tumors de la línia sensible al CDDP ( $p=0,0008$ ), que en els tumors A2780cis ( $p=0,025$ ) (Fig.R3.41). Amb el tractament amb l'YM155, els valors de caspasa 3 no van augmentar significativament respecte els controls en cap dels dos tipus tumorals, mentre que amb el doble tractament va augmentar significativament el marcatge de caspasa 3 en ambdós ( $p=0,0001$  (A2780p);  $p<0,0001$  (A2780cis)) (Fig.R3.41). Comparant el doble tractament respecte el tractament amb CDDP, els nivells de caspasa 3 van augmentar significativament a ambdós tipus tumorals ( $p=0,037$  (A2780p);  $p=0,024$  (A2780cis)) (Fig.R3.41).



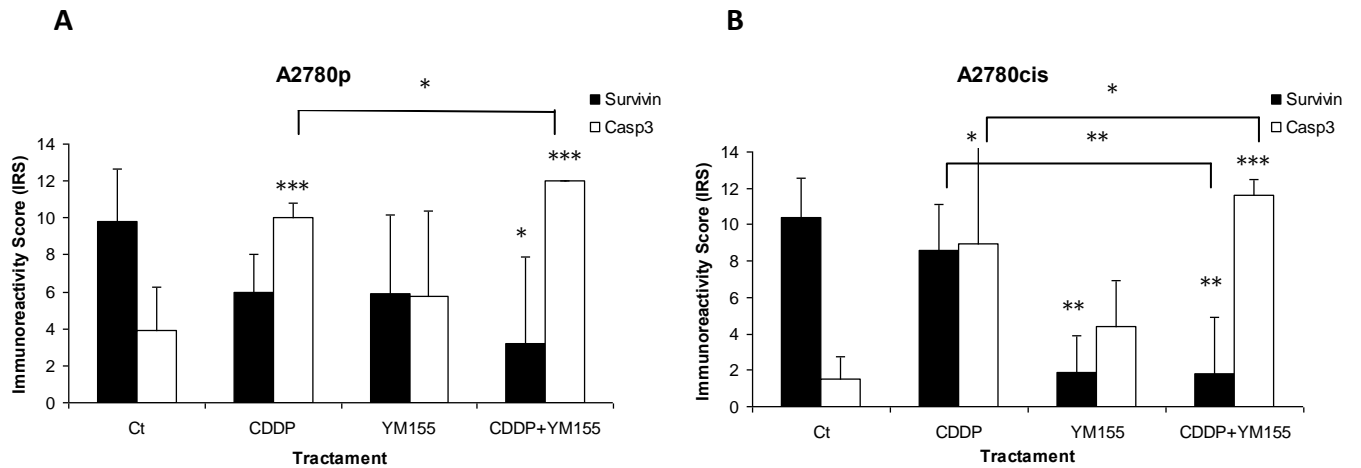


Figura R3.41. *Immunoreactivity Score* (IRS) de la Survivina i caspasa 3 (total i truncada) dels tumors dels ratolins inoculats amb A2780p (A) i A2780cis (B) després dels tractaments simples i doble tractament. Els ratolins es van tractar amb DMSO (Ct), CDDP (4mg/Kg), YM155 (5mg/Kg) i doble tractament (CDDP (4 mg/Kg) + YM155 (5 mg/Kg)) durant 7 dies. Els tumors es van deshidratar, parafinar i es van obtenir talls de 4  $\mu$ M que es van adherir a portes polilisinats. Es va realitzar la immunohistoquímica. Observació de 5 a 10 camps adjacents per condició, amb augment de 10X, 20X i 40X. IRS es va determinar multiplicant els valors dels percentatges de les cèl·lules positives (PP) per cada l'anticòs (PP: 0: < 1%, 1: 1-25%, 2: 26-50%, 3: 51-75%, 4:>75%) amb els valors de la intensitat de marcatge (SI) (SI: 0: no marcatge, 1: dèbil, 2: moderat, 3: fort). Les gràfiques representen la mitjana dels diferents camps analitzats  $\pm$  desviació estàndar \* $p$ <0,05;\*\* $p$ <0,005;\*\*\* $p$ <0,0005 (T-Student). La comparació va ser de cada tractament respecte el control. La comparació del doble tractament respecte el CDDP s'indica amb claudàtor.

Aquests resultats indicaven que el doble tractament estava generant més apoptosi que els tractaments simples, sobretot als tumors resistents al CDDP, amb una disminució dels nivells proteics de Survivina i augment de caspasa 3 del doble tractament en relació al CDDP, fet que es correlacionava amb la disminució de la mida dels tumors observada amb el doble tractament.

## DISCUSSIÓ

---



## DISCUSSIÓ

El CaOV és la causa més freqüent de mort degut a malalties ginecològiques, amb una supervivència als 5 anys del 30%. Dins del CaOV, el CaOV epitelial és el més freqüent, i es caracteritza per un diagnòstic tardà degut a la manca de símptomes, i com a conseqüència, el diagnòstic es sol realitzar en estadis avançats de la malaltia. El tractament del CaOV es basa en la cirurgia seguida de quimioteràpia basada en CDDP. És molt comú que la majoria de les pacients desenvolupin resistència als fàrmacs en els primers 6 mesos de tractament, fenomen conegut amb el nom de quimioresistència, que condueix a la mort de la pacient.

Els treballs que inclou aquesta tesi han permès establir cultius primaris de CaOV com a model *ex vivo* per analitzar la resposta a nous tractaments en CaOV humà i ampliar el coneixement dels mecanismes implicats en la resistència al CDDP. S'ha usat la combinació de nous fàrmacs (Nutlina-3a i YM155) que juntament amb el CDDP, sensibilitzen a les cèl·lules resistents al CDDP, fent que el CaOV sigui sensible a la teràpia. Els resultats obtinguts suggereixen que aquests fàrmacs podrien suposar una nova opció de tractament per les pacients amb CaOV.

### **1 Establiment de cultius primaris de CaOV a partir de mostres tumorals humanes**

El primer dels objectius de la tesi doctoral va ser l'establiment de cultius primaris de CaOV epitelial com a model *ex vivo* per l'estudi de la resposta al tractament amb nous fàrmacs en combinació amb la teràpia actual basada en el CDDP. Això comportaria un pas intermig entre l'ús de línies comercials i treballs *in vivo* amb models animals.

Les línies cel·lulars comercials tenen un ritme de creixement continu i regular, el que permet l'obtenció d'un gran nombre de cèl·lules en poc temps. S'usen rutinàriament en els laboratoris de biologia molecular ja que el seu ús permet molts estudis, entre els quals s'inclouen l'anàlisi de la resposta a noves substàncies o teràpies. Existeixen una gran varietat de línies cel·lulars de CaOV humà, tanmateix, la

majoria acaben adquirint alteracions genètiques, perdent les característiques pròpies del tumor original, així com inestabilitat genòmica i àmplia variació en l'expressió del RNA durant els subcultius (Hiorns *et al.* 2004).

Per tal d'evitar aquests problemes, diversos laboratoris han treballat en models de cultius primaris. El cultiu primari cel·lular és el cultiu inicial obtingut directament del teixit, i per tant, representa la situació més propera relacionada amb el teixit original, reflectint les característiques i funcionament del tumor del qual procedeixen. Analitzant els nivells d'expressió de RNA de diferents gens de cultius primaris i tumors originals de CaOV, es demostra que el patró d'expressió diferencial observat en les cèl·lules epitelials dels cultius primaris està present en el carcinoma d'ovari epitelial, conservant-se les característiques genotípiques (Matei *et al.* 2002). Altres estudis d'anàlisi de cDNA afirmen que hi ha poques diferències fenotípiques i de creixement entre els tumors i els cultius primaris establerts de CaOV (Ismail *et al.* 2000). El fet d'establir cultius primaris de CaOV ha permès l'estudi *ex vivo* de la resposta a la quimioteràpia, observant-se una correlació amb la resposta *in vivo*. Per tant, el model de cultiu primari en CaOV és una bona estratègia per estudiar la resposta clínica a la quimioteràpia (Trope & Sigurdsson 1982; Morasca *et al.* 1983).

Per evitar la pèrdua de característiques semblants a la del tumor d'origen, és necessari a l'hora de treballar amb cultius primaris, limitar el màxim nombre de passes per evitar l'adquisició de noves alteracions genètiques. A més, els cultius primaris de CaOV tenen un creixement potencial limitat (6-8 passes), i normalment acaben adquirint la morfologia aplanada de cèl·lules senescentes que fallen al dividir-se (inclús després de 30 dies en cultiu), per tant, el temps òptim per realitzar els experiments amb cultius primaris és quan aquests són de passes baixos (Dunfield *et al.* 2002). A més, s'ha descrit que les cèl·lules epitelials d'ovari quan romanen molt de temps en cultiu, perden els marcadors epitelials, així com la pèrdua de CKs a mesura que augmenta el passe (Auersperg *et al.* 1994). Amb la finalitat d'evitar canvis en el comportament biològic dels cultius primaris establerts, sempre es va avaluar la resposta al tractament (Nutlina-3a i YM155) dins dels 6 primers passes dels cultius.

D'aquesta manera la morfologia, el ritme de creixement i la resposta a un determinat fàrmac, es va mantenir estable en cada cultiu analitzat.

Per l'obtenció dels cultius primaris de CaOV es van realitzar dos protocols diferents segons si la mostra procedia de mostres tumorals sòlides o de LASC. Ambdós tipus de mostra van ser recollides immediatament després del moment de la cirurgia de la pacient, i s'hi va aplicar el protocol determinat. En les mostres sòlides es va usar disgregació mecànica i enzimàtica, mentre que en els LASCs vam modificar el protocol de Shepherd i col·laboradors, plaquejant directament el LASC amb un volum equivalent de medi complet (Shepherd *et al.* 2006) o bé mitjançant l'obtenció del *pellet*. El LASC proporciona una bona font de cèl·lules tumorals i és més fàcil d'aconseguir que el tumor sòlid, ja que s'obté material a mesura que es drena rutinàriament per evitar les molèsties de la pacient. Són cèl·lules que estan preparades pel cultiu *in vitro*, ja que estan sobrevivint com cèl·lules individuals o petits grups, evitant així la necessitat mecànica o enzimàtica de disgregació (Langdom S.P 2004). Es van establir línies de cèl·lules epitelials de CaOV que es van congelar a passes baixes (entre passe 0 i 4) i es van descongelar amb èxit, conservant la viabilitat i característiques del tumor del qual s'havien originat. Es van processar un total de 102 cultius primaris de CaOV, entre els quals la majoria van ser tumors epitelials, i en menor percentatge, tumors de cèl·lules germinals i de cordons sexuals-estroma. Es van rebre mostres tumorals malignes, *borderline* i benignes. La majoria dels tumors serosos van ser malignes, doncs són tumors que presenten molta agressivitat i malignitat (McCluggage WG 2011); mentre que dels mucinosos va haver quasi el mateix nombre de mostres tumorals malignes i *borderline*.

Els tumors malignes d'ovari d'origen epitelial (carcinomes d'ovari) constitueixen aproximadament el 90% dels tumors malignes d'ovari (Cho & Shih 2009). Aquests es classifiquen segons la morfologia cel·lular del tumor, i es divideixen en tipus histològics, sent el carcinoma serós el més comú (Cho & Shih 2009). De les mostres de CaOV processades, el carcinoma serós va ser el que més va predominar, seguit de l'endometrioides; en menor proporció es van processar mostres de carcinoma mucinosos i cèl·lula clara. Estudis demostren que els carcinomes serosos d'alt

grau són els més comuns i representen el 70% dels casos (Kobel *et al.* 2010). Estudis recents demostren que el carcinoma mucinós és el menys comú dels CaOV (3%) (McCluggage WG 2011), el què representa un canvi en la majoria dels estudis més antics, on el carcinoma mucinós era el segon tipus més comú, representant aproximadament el 12% dels carcinomes d'ovari primaris (Koonings *et al.* 1989).

En quan a freqüències d'estadiatge, la majoria de mostres de CaOV processades van ser d'estadi III. El tipus que més va presentar dit estadi va ser el carcinoma serós, ja que són tumors amb alta malignitat, i la malaltia es diagnostica quan està en un estat molt avançat (estadi III i IV) (McCluggage WG 2011). No es van rebre mostres d'estadi IV, ja que amb dit estadi no hi ha indicació de cirurgia. Dels carcinomes mucinosos, el que més va abundar va ser l'estadi I, ja que són tumors poc agressius i solen trobar-se confinats a l'ovari.

En aquesta tesi es van establir cultius primaris de totes les mostres rebudes, tanmateix, pels experiments realitzats amb fàrmacs es van utilitzar només els cultius primaris de CaOV epitelial.

La majoria de mostres processades van ser viables, van créixer amb èxit i van poder ser congelades per futurs experiments. Tanmateix, es van identificar una sèrie de paràmetres que en limitaven l'èxit. Un dels factors limitants pel creixement dels cultius va ser la mida de la mostra, la qual només va afectar a aquells cultius que provenien de mostres tumorals sòlides. Les mostres amb pes inferior a 20 mg no van créixer de forma adequada en el cultiu. Per tant, per establir cultius primaris és important obtenir la major quantitat de mostra tumoral, sense limitar la quantitat de mostra que el patòleg necessita per realitzar el correcte diagnòstic de la pacient. Aquesta tesi ha permès establir una col·laboració estable entre els Serveis d'Anatomia Patològica i Ginecologia de l'HUB i la Universitat de Barcelona per dur a terme cultius primaris de CaOV.

Un altre factor limitant per l'establiment de cultius primaris va ser la histologia. Aquesta limitació només va afectar a aquells cultius que provenien de mostres tumorals sòlides. Només les mostres amb un diagnòstic histològic de CaOV van créixer

correctament en cultiu. Cap de les altres histologies rebudes que no eren CaOV i es van cultivar, no van créixer amb èxit degut a que el medi i les condicions de cultius no van ser els adequats pel seu creixement. Per tant es pot concloure que, en les condicions de cultiu establertes en el nostre laboratori, les condicions eren específiques pels CaOV.

La contaminació per cèl·lules mesenquimals, com els fibroblasts, és un factor limitants molt important per establir cultius primaris. La composició cel·lular dels cultius primaris és sovint bastant variable amb cèl·lules hematopoiètiques i estromals que formen part de la matriu cel·lular del tumor. Els fibroblasts en particular, poden ser un problema pels cultius cel·lulars, ja que aquests s'adhereixen fàcilment a la placa i arriben a créixer més que la població de cèl·lules cancerígenes. Després del cultiu inicial, un control cuidados és necessari per determinar el nivell de contaminació per fibroblasts. Encara que aquests deixaran de proliferar després d'un nombre de generacions, si el percentatge inicial de fibroblasts és massa alt, podran superar les cèl·lules de carcinoma, emmascarant-les. Aquest fet suposa una pèrdua del cultiu primari, ja que el material amb el què es treballa, no té cèl·lules epitelials. Els cultius primaris que provenen de LASC comuntment presenten fibroblasts de partida; les mostres tumorals sòlides tenen presència de cèl·lules mesenquimals degut a que quan es disgrega la mostra, es fa amb molta firmesa obtenint cèl·lules subjacents estromals, o bé per la manipulació en excés del teixit. Ocasionalment s'observa la pèrdua de fibroblasts quan els cultius es mantenen amb el medi MCDB105/M199 després d'una o dues setmanes en cultiu continu (Shepherd *et al.* 2006). A més, el medi complet MCDB105/M199 usat per propagar cèl·lules epitelials d'ovari tampoc suporta el creixement de cèl·lules contaminants hematopoiètiques, les quals seran descartades després dels primers canvis de medi de cultiu (Shepherd *et al.* 2006). Tanmateix, en moltes ocasions els fibroblasts segueixen adherits a la placa contaminant els cultius. Hi ha diferents mètodes per descartar els fibroblasts dels cultius primaris, dels que s'inclouen: tripsinització selectiva, tècnica en la qual els fibroblasts es separen ràpidament del plàstic després de tripsinitzacions a temps curts, ja que aquests es desenganxen de la placa més ràpidament que les cèl·lules epitelials (Langdon S.P 2004). Una altra tècnica, és transferir el medi en suspensió a una nova placa en les



primeres hores de plaqueig. Els fibroblasts s'adhereixen a la placa més ràpidament que les cèl·lules epitelials, i per tant, aquelles cèl·lules que en les 2-3 hores estan adherides, són fibroblasts. Transferint la suspensió de cèl·lules a una nova placa, molts dels fibroblasts es mantindran a la placa original, que es podrà llençar (Langdon S.P 2004). Una altra de les tècniques és l'ús d'anticossos monoclonals dirigits a antígens específics de fibroblasts, que en permeten l'eliminació selectiva. Per poder eliminar els fibroblasts dels nostres cultius, vam usar dues de les metodologies esmentades: l'ús d'anticòs específic d'antigen de fibroblast (1B10) i la tripsinització selectiva. L'anticòs murí monoclonal IgM 1B10 elimina els fibroblasts del cultiu inhibint l'adherència a la placa o bé per efecte citotòxic en presència de proteïnes de complement de conill. Estudis previs demostren que l'ús de l'anticòs 1B10 amb complement de conill redueix amb èxit els fibroblasts dels cultius epitelials humans de tim, enriquint-los amb cèl·lules epitelials (Singer *et al.* 1989). Altres estudis descriuen la distribució subcel·lular de l'antigen que reconeix l'anticòs 1B10, demostrant que aquest es troba a la superfície de la membrana cel·lular i als lisosomes dels fibroblasts. La immunoreactivitat de l'anticòs 1B10 és específica per fibroblasts diferenciats de la musculatura llisa en el context de cèl·lules vasculars de múscul llis (Ronnov-Jessen *et al.* 1992). Es va usar l'esmentada tècnica en cèl·lules en suspensió i cèl·lules adherides, però no es van obtenir els resultats esperats. L'enriquiment dels cultius en cèl·lules epitelials no va ser significatiu; pocs cultius primaris van disminuir el percentatge de fibroblasts. Tanmateix, usant la tripsinització selectiva es van obtenir uns resultats més exitosos; la tècnica va fer disminuir considerablement la proporció de fibroblasts enriquint els cultius primaris en cèl·lules epitelials. La mitjana del percentatge de cèl·lules epitelials dels cultius primaris abans d'ambdós tractaments (anticòs 1B10/tripsinització selectiva) va ser el mateix (al voltant del 30%), tot i usar cultius primaris diferents; això indicava que en general, els cultius primaris obtenen de mitjana, aproximadament, un 30% de cèl·lules epitelials de partida.

Els cultius obtinguts a partir de LASCs, tenen certa proporció de cèl·lules mesotelials. Després de la tripsinització selectiva, tots els primaris procedents de LASC es van analitzar mitjançant immunofluorescència amb l'anticòs Calretinina (específic

de mesoteli) per verificar manca de contaminació per cèl·lules mesotelials. La majoria dels cultius procedents de LASC després de la tripsinització selectiva, no van presentar marcatge per Calretinina, el què indicava que aquesta tècnica també elimina les cèl·lules mesotelials presents al cultiu. Per tant, la tripsinització selectiva dels cultius primaris establerts a partir de mostra tumoral sòlida o de LASC, va permetre l'eliminació de fibroblasts i de cèl·lules mesotelials presents en el cultiu, obtenint-se una riquesa del 90% en cèl·lules epitelials.

Una altre factor limitant observat en alguns dels cultius primaris establerts, va ser un enlentiment progressiu del creixement fins a finalitzar completament la proliferació cel·lular i aparèixer signes morfològics de senescència. Hayflick i Moorehead van desenvolupar el concepte de senescència replicativa, observant que les cèl·lules en cultiu després d'un nombre finit de divisions experimentaven una aturada del cicle cel·lular irreversible que impedia la proliferació (Hayflick & Moorhead 1961). Els cultius primaris, a diferència de les línies cel·lulars, són cèl·lules no immortalitzades els quals perden l'activitat telomerasa (hi ha escurçament telomèric) després d'un nombre limitat de divisions, fet que condueix a la senescència i finalment, a la mort cel·lular. Una de les causes de la senescència prematura pot ser degut a que les cèl·lules es plaquegen a baixa densitat (Shepherd *et al.* 2006). De totes formes, si els cultius primaris es mantenen durant un període de temps prolongat, augmenta la possibilitat d'adquirir noves alteracions genètiques i cromosòmiques que l'allunyarien del tumor original del qual procedeixen (Hiorns *et al.* 2004), i per tant, es perdria l'avantatge d'utilitzar un cultiu primari enfront una línia comercial establerta. A més, també augmenta la possibilitat de contaminació per romandre un temps prolongat a l'incubador.

L'últim factor limitant dependent de la mostra va ser la necrosi. Aquest factor només va ser limitant pels cultius primaris establerts a partir de mostra sòlida. En alguns casos, les mostres obtingudes presentaven necrosi macroscòpica i microscòpica, el que comporta que, malgrat la mida de la mostra sigui gran, en alguns casos el nombre de cèl·lules viables és menor a l'esperada. Per disminuir la necrosi es

va seleccionar la part del tumor amb menys massa necròtica, descartant al màxim la part necròtica.

Finalment es van observar factors limitants no relacionats amb el propi cultiu, sinó amb la manipulació del mateix o amb altres factors externs com les sobreinfeccions bacterianes o de fongs, i problemes derivats d'un mal funcionament dels aparells de la sala de cultius i congeladors. En quan a la vulnerabilitat dels cultius primaris a les contaminacions bacterianes o per fongs, cal tenir en compte que si els cultius tenen una taxa de proliferació baixa, hauran de mantenir-se llargs períodes de temps a l'incubador (en algunes ocasions va ser de 30 dies), augmentant la probabilitat de contaminació, i com ja s'ha esmentat, augmentant la probabilitat de senescència i mort cel·lular. En aquest sentit és molt recomanable i necessari extreure les mesures higièniques a l'hora de manipular-los, i intentar que els cultius primaris no romanguin períodes llargs de temps a l'incubador (per evitar contaminacions, senescència i mort cel·lular).

Donat que els cultius primaris de CaOV poden contenir una mescla de diferents tipus cel·lulars (sobretot aquells que provenen de LASCs els quals no només contenen les cèl·lules del carcinoma, sinó també limfòcits, macròfags, hematies, cèl·lules mesotelials i fibroblasts (Dunfield *et al.* 2002; Langdom S.P 2004), és imprescindible caracteritzar-los per poder assegurar que el material amb el què es treballa és majoritàriament càncer epitelial d'ovari. És per això que es van usar diferents marcadors per poder caracteritzar els cultius primaris mitjançant immunofluorescència. En un principi es van usar un seguit d'anticossos que permetien diferenciar els diferents tipus cel·lulars presents en el cultiu. Es va usar l'anticòs Calretinina per detectar cèl·lules mesotelials (Doglioni *et al.* 1996), Vimentina per detectar els fibroblasts (Auersperg *et al.* 1994), CK7 (Moll *et al.* 1982; McCluggage WG 2002) i CAM 5.2 (Makin *et al.* 1984; Leader *et al.* 1986) per detectar les cèl·lules epitelials. Amb l'experiència es va observar que CAM 5.2 era bon marcador i suficient per detectar les cèl·lules epitelials dels cultius primaris. En l'adult, les CKs es troben exclusivament a les cèl·lules epitelials i la seva expressió varia segons el tipus d'epiteli.

En CaOV epitelial, l'epiteli del qual és simple, s'hi expressen les CKs 7, 8, 18 i 19. La CK20 només s'expressa en el tipus histològic mucinós (Moll *et al.* 2008).

L'anticòs monoclonal CAM 5.2 en un principi es va pensar que reconeixia les CK8, CK18 i CK19. Un estudi realitzat per Makin i col·laboradors demostrà que en el 100% dels casos d'ADK d'ovari hi havia marcatge per CAM 5.2, reconeixent CK8, CK18 i CK19 (Makin *et al.* 1984). Estudis posteriors van demostrar que l'anticòs CAM 5.2 tenia només reactivitat específica per la CK8, i en menor mesura per la CK7, sense mostrar reactivitat per CK18 i CK19 (Smedts *et al.* 1990). L'anticòs CAM 5.2 és un marcador específic de cèl·lula epitelial que permet la detecció de carcinomes i distingir-los d'altres tumors malignes que no tenen origen epitelial com ara els limfomes, melanomes i sarcomes (Leader *et al.* 1986). No marca a cèl·lules mesenquimals ni mesotelials, però sí a totes les cèl·lules epitelials presents en el cultiu. Quan la mostra presenta poc marcatge per CAM 5.2 i hi ha només marcatge de nuclis, permet estimar la riquesa en cèl·lules epitelials del cultiu i la possible contaminació per altres tipus cel·lulars. L'anticòs monoclonal CAM 5.2 es va usar per tal d'estimar el percentatge de cèl·lules epitelials front la possible contaminació de fibroblasts que formen part del teixit conjuntiu de la massa tumoral. Es va realitzar immunofluorescència de les cèl·lules adherents i en suspensió, bé analitzant amb microscopia confocal, mitjançant el contactge de cèl·lules positives marcades per l'anticòs, o bé per citometria de flux la qual permet conèixer la població de cèl·lules marcades amb l'anticòs. Amb la finalitat d'obtenir uns resultats fiables, sempre es va avaluar la resposta al tractament (Nutlina-3a i YM155) amb cultius primaris que tenien una riquesa en cèl·lules epitelials del 85-90%.

Un dels anticossos usats al principi va ser la Vimentina per tal d'identificar els fibroblasts dels cultius i poder conèixer la riquesa en cèl·lules epitelials. Realitzant immunofluorescència de doble marcatge per CAM 5.2 i Vimentina, es va observar que molts dels cultius analitzats, sobretot els del tipus histològic endometriode, presentaven coexpressió amb CAM 5.2 i Vimentina; les cèl·lules epitelials coexpressaven ambdós marcadors. Aquests resultats es recolzen amb estudis d'immunohistoquímica de filaments intermedis en CaOV, els quals demostren que la

Vimentina es sobreexpressa amb les CKs un 71% en carcinomes endometrioides, un 42% en carcinomes serosos i 7% en carcinomes de cèl·lula clara, expressant-se només les CKs i no la Vimentina en els carcinomes mucinosos (Dabbs & Geisinger 1988). Altres estudis demostren que l'expressió dels filaments intermedis en els tumors d'ovari correspon a l'expressió dels teixits parentals, així com l'epiteli celòmic coexpressa Vimentina i CK. La tipificació dels filaments intermedis podria usar-se pel diagnòstic diferencial de CaOV (Miettinen *et al.* 1983). Per tant, el marcador Vimentina no és útil per a la identificació de fibroblasts en cultius primaris de CaOV, ja que també pot marcar les cèl·lules epitelials presents en el cultiu, en percentatges diferents segons el subtipus histològic. L'anticòs de Vimentina per la detecció de fibroblasts es va deixar d'usar, i es va decidir realitzar la caracterització dels cultius primaris només amb el marcador de cèl·lules epitelials CAM 5.2; les cèl·lules del cultiu que no presentaven marcatge pel marcador, eren considerades fibroblasts.

L'anticòs Calretinina, usat en un principi per detectar presència de cèl·lules mesotelials (sobretot en aquells cultius que provenien de LASCs) també es va deixar d'usar, donat que tots els LASCs després de la tripsinització selectiva no mostraven marcatge per cèl·lules mesotelials. La contaminació del cultiu per cèl·lules no epitelials es perdia amb l'ús de la tripsinització selectiva. Per tant, es va determinar que per la caracterització dels cultius primaris després de la tripsinització selectiva, era suficient l'ús del marcador específic de cèl·lules epitelials CAM 5.2.

Un altre mètode que es va usar per la caracterització dels cultius primaris va ser l'expressió gènica diferencial entre el cultiu primari i el tumor original del qual procedia. Com s'ha esmentat anteriorment, hi ha estudis que demostren que el patró gènic d'expressió diferencial observada en les cèl·lules epitelials dels cultius primaris està present al tumor, conservant-se les característiques genotípiques, fenotípiques i de creixement (Ismail *et al.* 2000; Matei *et al.* 2002). Analitzant el patró gènic del cultiu i del tumor, es podia saber si el cultiu presentava cèl·lules epitelials derivades del tumor, o bé altres tipus cel·lulars. Si les diferències gèniques entre el tumor i el cultiu establert eren grans, es podia considerar la presència d'un altre tipus cel·lular (com ara els fibroblasts), mentre que si es mantenia el mateix patró, les cèl·lules eren

epitelials. Es va analitzar el DNA genòmic del tumor original i del seu cultiu primari establert mitjançant la tècnica del MLPA , la qual en una sola reacció de PCR permet analitzar el nombre de còpies de fins a 40 seqüències de DNA genòmic (Schouten *et al.* 2002). És una tècnica que permet la identificació de mutacions puntuals, amplifícacions o delecions i la qual ha estat usada en molts estudis (Schouten *et al.* 2002; Taylor *et al.* 2003; Michils *et al.* 2005; Aretz *et al.* 2007) i el nostre departament té a punt. Els resultats del MLPA van demostrar que les delecions del tumor original també hi eren presents al cultiu primari, mantenint-se el patró gènic. Això descartava la presència de fibroblasts al cultiu, ja que aquests presentarien un genotip diferent de les cèl·lules epitelials. Per tant, la caracterització gènica mitjançant MLPA és una bona tècnica per caracteritzar i conèixer la riquesa en cèl·lules epitelials dels cultius primaris establerts.



## 2 Efecte de la Nutlina-3a (Nut3a) en línies cel·lulars i cultius primaris de CaOV

El segon objectiu de la tesi doctoral es va centrar en l'estudi de la resposta al tractament amb nous fàrmacs en combinació amb la teràpia actual basada en el CDDP. El CDDP és l'agent citotòxic utilitzat com a teràpia en CaOV però genera quimioresistència, l'obstacle més gran en tractar pacients amb malaltia recurrent. A més, el CDDP genera efectes secundaris com nefrotoxicitat, neurotoxicitat i mielotoxicitat (McWhinney *et al.* 2009). És necessari el desenvolupament de nous agents o teràpies dirigides a la millora de la quimiosensibilitat del CaOV, i al mateix temps, reduir les toxicitats que genera el tractament. L'apoptosi és, entre d'altres, un dels mecanismes que poden generar quimioresistència al CDDP, la restauració de dita via podria millorar la sensibilitat de les cèl·lules al tractament (Ahmad 2010; Galluzzi *et al.* 2012).

La proteïna p53 també anomenada "guardià del genoma" és una proteïna encarregada de coordinar la resposta cel·lular enfront un ventall d'estímuls. Depenent del nivell i el tipus d'estímul, p53 pot actuar activant mecanismes d'apoptosi, senescència, aturada de cicle cel·lular, reparació de dany, metabolisme cel·lular o autofàgia (Vogelstein *et al.* 2000; Braithwaite *et al.* 2005). La proteïna p53 es manté a nivells molt baixos en cèl·lules normals (Wawrzynow *et al.* 2007). Estímuls cel·lulars com la hipòxia, el dany al DNA, l'activació d'oncògens, generen acumulació de p53 al nucli on pot exercir la seva activitat transcripcional (Meek 2004; Wawrzynow *et al.* 2007). L'important paper de p53 suggereix que la pèrdua de la proteïna pot causar conseqüències dramàtiques per la cèl·lula. En humans, el 50% dels tumors presenten mutacions a p53, i en la majoria, aquestes mutacions estan associades a un mal pronòstic i resistència al tractament (Vousden & Lu 2002; Toledo & Wahl 2006). Pacients amb CaOV que obtenen p53 salvatge, tenen major probabilitat de beneficiar-se de la teràpia amb CDDP en comparació amb les que tenen mutacions al gen TP53 (Kigawa *et al.* 2001; Gadducci *et al.* 2002; Feldman *et al.* 2008). Mutacions i pèrdua de



funció de TP53 s'observa en un 60-80% dels CaOV esporàdics i està altament correlacionat amb tumors d'alt grau de malignitat (Ferte *et al.* 2010).

La pèrdua de p53 no és l'única manera d'inactivar p53 en els tumors, p53 també pot ser inactivada per la sobreexpressió de la proteïna Mdm2 (Vassilev 2007). Mdm2 és activat transcripcionalment per p53, i a la vegada, inhibeix p53. Mdm2 és una proteïna amb activitat E3 ubiquitin lligasa encarregada de la regulació de p53, reprimint la seva activitat transcripcional, exportant-la del nucli i estimulant la seva degradació mitjançant l'activitat proteosomal (Tovar *et al.* 2006; Shu *et al.* 2007). La inhibició de la interacció Mdm2-p53 amb molècules sintètiques és una bona estratègia per activar la via de p53, aturant les cèl·lules cancerígenes en el cicle cel·lular i induint apoptosi (Chene 2003; Vassilev 2004; Vassilev 2005).

Les Nutlines inhibeixen la unió de p53 al seu regulador negatiu Mdm2, estabilitzant p53 i activant la via de senyalització *downstream* de p53, tant *in vivo* com *in vitro* (Vassilev 2004). Estudis preclínic amb diferents tipus de càncer demostren que el tractament *in vitro* amb Nut3a de cèl·lules tumorals amb p53 salvatge, pot induir diversos fenòmens depenent del tipus cel·lular, entre els quals s'inclouen: aturada del cicle cel·lular, disminució de la proliferació cel·lular, inducció d'apoptosi i en alguns casos, senescència (Cao *et al.* 2006; Coll-Mulet *et al.* 2006; Logan *et al.* 2007; Gu *et al.* 2008; McCormack *et al.* 2011; Pishas *et al.* 2011; Roh *et al.* 2011; Villalonga-Planells *et al.* 2011; Manfe *et al.* 2012).

Estudis preclínic han demostrat que la Nut3a estabilitza a p53 i sensibilitza a les cèl·lules al CDDP induint apoptosi, demostrant un efecte additiu o sinèrgic de la Nut3a amb el CDDP, potenciant l'efecte d'aquest en diferents tipus de càncer: neuroblastoma (Barbieri *et al.* 2006), de cèl·lules germinals testiculars (Bauer *et al.* 2010), gàstric (Endo *et al.* 2011) i testicle (Koster *et al.* 2011).

En aquesta tesi doctoral es va investigar la capacitat antitumoral de Nut3a sola i en combinació amb el CDDP a línies cel·lulars i cultius primaris de CaOV. Els resultats del present estudi han demostrat que la Nut3a activa la via de p53 induint apoptosi i

aturada de cicle cel·lular en fase G2/M i potenciant l'efecte del CDDP, tant a les línies cel·lulars com als cultius primaris.

La línia sensible al CDDP A2780p tractada amb CDDP, va presentar una disminució de la viabilitat i un augment de la fase G2/M a les 48 hores de tractament, mentre que cap canvi va succeir a la línia resistent al CDDP A2780cis. Quan el CDDP es va combinar amb la Nut3a, la viabilitat d'ambdues línies cel·lulars va decreixer considerablement a les 72 hores i les cèl·lules es van aturar a fase G2/M del cicle cel·lular.

El tractament simple amb Nut3a va establir i activar p53 de forma diferent a ambdues línies cel·lulars. La línia A2780cis sembla ser més sensible a la Nut3a que la línia A2780p, reflectit pels nivells més alts d'apoptosi trobats a la línia A2780cis que en la línia A2780p, tractades amb Nut3a. Això també es va observar amb el perfil gènic i proteic: el mRNA de Survivina va disminuir més a la línia A2780cis, i els nivells proteics de Survivina van desaparèixer, mentre que a la línia A2780p, el mRNA no va disminuir tant i els nivells proteics es van mantenir com el control. La línia A2780cis deriva de la línia A2780p, i s'obté després de l'exposició amb dosis creixents de CDDP, seleccionant els clons resistents a aquest. El diferent comportament d'ambdues línies cel·lulars enfront a la Nut3a, podria ser explicada pel fet que A2780cis deriva de clons seleccionats que han divergit de la línia original.

Ambdues línies tractades amb CDDP i Nut3a van mostrar un increment dels gens pro-apoptòtics NOXA, PUMA, BAX i APAF-1 i disminució dels gens anti-apoptòtics BCL-2 i SURVIVINA. Els nivells proteics de Bcl-2 es troben elevats a l'orina de pacients amb CaOV i pot servir com a mètode de diagnòstic i/o pronòstic d'importància clínica (Anderson *et al.* 2009). Estudis demostren que la sobreexpressió de Bcl-2 en línies de CaOV genera protecció enfront l'apoptosi (Powell *et al.* 2003). Un increment de l'expressió de mRNA i proteïna de Bcl-2 s'associen a la resistència al CDDP en línies cel·lulars endometrials resistents al CDDP; Bcl-2 juga un paper important inhibint l'apoptosi generada pel CDDP a línies cel·lulars de càncer d'endometri (Rouette *et al.* 2011). Els nostres resultats van demostrar que el CDDP no disminueix els nivells proteics de Bcl-2 a la línia resistent al CDDP A2780cis, mentre que el tractament amb

Nut3a i CDDP conjunt, sí. Estudis demostren que el CDDP no disminueix els nivells de Bcl-2 a línies cel·lulars de CaOV resistents al CDDP, però sí quan es combina amb metformin (Yasmeen *et al.* 2011). En el present estudi, el tractament amb CDDP va disminuir els nivells de mRNA i proteïna Bcl-2 a la línia A2780p i als cultius primaris, confirmant la sensibilitat de les cèl·lules al CDDP. El CDDP genera radicals lliures a la cèl·lula (com els radicals hidroxil), que tenen la capacitat de disminuir els nivells proteics de Bcl-2 mitjançant la poliubiquitinació i la degradació proteosomal (Luanpitpong *et al.* 2011). També s'ha descrit que el CDDP disminueix els nivells de Bcl-2 incrementant la seva proteòlisi mitjançant l'activació de la caspasa 3/7 (Del Bello *et al.* 2001). La disminució proteica de Bcl-2 induïda pel CDDP es demostra en diversos estudis, com el realitzat per Tingyan Liu i col·laboradors (Liu *et al.* 2010).

A més de la disminució dels nivells proteics de Bcl-2, el tractament combinat també va disminuir els nivells de Survivina tant a les línies cel·lulars de CaOV com als cultius primaris amb TP53 salvatge. Survivina, membre de la família de proteïnes inhibidores de l'apoptosi (IAP), està implicada en la carcinogènesi i progressió de càncer, i la seva expressió a cèl·lules tumorals està relacionada amb la hiperactivitat de vies oncogèniques (STAT3, NFκB, Myc, etc.) que activen vigorosament la seva transcripció (Guha & Altieri 2009). La sobreexpressió de Survivina a teixits tumorals, incluint el CaOV, ha estat associat a progressió tumoral i mal pronòstic de la malaltia, reduïda supervivència dels pacients i quimioresistència (Liguang *et al.* 2007). Wang Z. i col·laboradors van demostrar que l'expressió de Survivina incrementa després de l'exposició al CDDP a les cèl·lules resistents al CDDP A2780cis (Wang *et al.* 2005). Per tant, la Survivina podria ser considerada com un indicador biològic de quimioresistència en CaOV.

En aquest treball es mostra la disminució dels nivells de Survivina a la línia resistent al CDDP A2780cis de forma correlativa amb un increment de la inducció d'apoptosi amb Nut3a i el doble tractament. Tal disminució no es va observar a la línia sensible A2780p que, en comparació amb la línia resistent A2780cis, la Survivina no va disminuir amb la Nut3a sola, però sí amb el doble tractament. La disminució dels nivells de Survivina podrien ser responsables de l'activació de l'apoptosi com es

demostra en estudis previs amb d'altres cèl·lules tumorals (Altieri 2003; Uchida *et al.* 2004). L'expressió del gen de la SURVIVINA és transcripcionalment reprimida per p53 salvatge (Hoffman *et al.* 2002; Mirza *et al.* 2002) i disminució dels nivells de Survivina indueixen bloqueig per entrar a la fase S i aturada en la fase G2/M del cicle cel·lular (Sullivan *et al.* 2004). Ambdues línies cel·lulars van respondre al tractament simple amb la Nut3a, però només la línia A2780cis va disminuir els nivells de Survivina. Això deu ser perquè la línia A2780cis és més sensible a la Nut3a que la seva homòloga línia sensible al CDDP A2780p. Quan p53 es va inhibir mitjançant siRNA, es va observar més inducció de Survivina a la línia A2780cis que a la línia A2780p. Donat que p53 inhibeix l'expressió de Survivina, la inducció més elevada de Survivina a la línia A2780cis concorda amb la major resposta a la activació/inhibició de p53.

Es va demostrar que la inhibició de p53 mitjançant siRNA d'ambdues línies cel·lulars tractades amb CDDP, Nut3a o doble tractament, va disminuir els nivells proteics de p21 i Mdm2 a nivells basals. La inhibició de p53 a la línia A2780cis va induir l'expressió de Survivina a tots els tractaments, mentre que la línia A2780p mostrava menys inducció de Survivina. En conclusió, la línia A2780cis va ser més sensible a l'activació de p53 per Nut3a (disminució de Survivina) que la línia A2780p. A més, l'efecte revers (augment de Survivina) es va obtenir amb la inhibició de p53. La inhibició de p53 també va disminuir l'apoptosi a ambdues línies tractades amb Nut3a, això va demostrar que la Nut3a i el doble tractament indueixen aturada de cicle cel·lular i apoptosi dependent de p53.

Per confirmar el paper anti-apoptòtic de la Survivina, aquesta es va sobreexpressar a les línies cel·lulars, i a continuació es van tractar amb tractaments simples i doble per tal de revertir l'apoptosi. Els resultats van demostrar que després del tractament simple amb Nut3a i doble tractament, les cèl·lules que sobreexpressaven Survivina tenien menys inducció d'apoptosi que les cèl·lules amb expressió basal de Survivina, però sense ser estadísticament significatiu, el que està amb acordança amb estudis publicats prèviament (Jacob *et al.* 2012; Villalonga-Planells *et al.* 2011 ). Per tant, la sobreexpressió ectòpica de Survivina seria incapaç per sí sola de revertir completament l'apoptosi a les línies cel·lulars de CaOV.

La inhibició de Survivina mitjançant siRNA a la línia resistent A2780cis tractada amb CDDP va generar un augment d'apoptosi, tal i com s'observava amb el tractament amb Nut3a (disminució de Survivina amb conseqüent augment de l'apoptosi). Per tant, la Nut3a o siRNA podrien estar quimiosensibilitzant a les cèl·lules al CDDP mitjançant la disminució de Survivina. Tanmateix el mecanisme pel qual Nut3a induïx disminució de Survivina és desconegut. Per tant, les teràpies anti-Survivina podrien ser bones opcions per vèncer la quimioresistència al CaOV. Diversos estudis demostren que la disminució de Survivina induïx apoptosi *in vitro* (Uchida *et al.* 2004; Huang *et al.* 2011) i *in vivo* (Kanwar *et al.* 2001) a altres línies cel·lulars, i recentment s'ha descrit que la inhibició de Survivina mitjançant siRNA incorporat a nanoliposomes, redueix el creixement tumoral en models ortotòpics de CaOV quimiorresistent als taxans (Vivas-Mejia *et al.* 2011). Altres estudis demostren que la inhibició de Survivina quimiosensibilitza al CDDP: shRNA de Survivina a línies cel·lulars i xenoinjerts de CaOV resistents al CDDP, sensibilitza a les cèl·lules a aquest, amb un augment de l'apoptosi i disminució de la mida tumoral (Xing *et al.* 2012). Línies cel·lulars de tiroides resistents al CDDP i doxorubicina presentaven alts nivells de IAP-1 i Survivina, i el seu silenciament mitjançant siRNA va restaurar la sensibilitat al CDDP (Tirro *et al.* 2006). L'ús de siRNA específic de Survivina va augmentar l'apoptosi, disminuir la proliferació i va restaurar la sensibilitat al CDDP a cèl·lules de pulmó *in vitro* i *in vivo* (Liu JL *et al.* 2010). El shRNA de Survivina va induir apoptosi dependent de caspasa-3 millorant la sensibilitat al CDDP en el carcinoma de cèl·lules escamoses de llengua (Xu JH *et al.* 2010).

Hi ha diverses estratègies per inhibir la Survivina, com l'ús de molècules antagonistes que inhibeixen la seva expressió (siRNAs, oligonucleòtids antisentit, ribozims), petites molècules inhibidores o peptidomimètics que inhibeixen la seva funció, teràpia gènica amb mutants dominants negatius capaços d'inhibir la dimerització de la Survivina o la seva estabilització mitjançant la fosforilació del residu Thr34; petites molècules antagonistes capaces d'inhibir la fosforilació del residu Thr34 (inhibidors de CDK), petites molècules que inhibeixen la interacció Survivina-Hsp90 (inhibidors Hsp90), petites molècules que inhibeixen l'expressió del seu promotor (YM155) o immunoteràpia (Pennati *et al.* 2008; Church & Talbot 2012).

Els resultats obtinguts amb les línies cel·lulars es van corroborar amb els cultius primaris de CaOV amb p53 salvatge. Es va confirmar que les cèl·lules de cultius primaris de CaOV p53 salvatge responen al tractament amb Nut3a incrementant l'apoptosi amb el doble tractament. A les línies cel·lulars, el doble tractament generava inducció d'apoptosi sense induir senescència, en contrast, en els cultius primaris, el tractament simple amb Nut3a i doble tractament generava senescència, la qual va ser irreversible. La inducció de senescència per Nut3a ja va ser descrita pel nostre grup amb el model de glioblastoma multiforme (Villalonga-Planells *et al.* 2011). El doble tractament a les línies cel·lulars va generar una entrada a fase G2/M, i en els cultius primaris la persistent inducció de p21 observada, suggestionava que l'aturada del cicle cel·lular excedia a la durada del tractament, i que les cèl·lules persistien senescentes sense tronar a proliferar. Les cèl·lules que aturaven el cicle cel·lular podien entrar en senescència (com els cultius primaris) o anar cap a apoptosi (primaris i sobretot les línies cel·lulars), disminuint així el creixement de les cèl·lules tumorals. Es coneix que depenent del tipus cel·lular o altres factors, p53 pot produir aturada del cicle cel·lular reversible (quiescència) o irreversible (senescència). Està descrit que la Nut3a genera morfologia senescent i pèrdua del potencial proliferatiu a diverses línies cel·lulars (Efeyan *et al.* 2007; Lehmann *et al.* 2007; Kumamoto *et al.* 2008), tanmateix, a altres línies cel·lulars genera quiescència, reestablint l'activitat proliferativa quan es retira el medi que conté Nut3a (Huang *et al.* 2009; Korotchkina *et al.* 2009; Cheok *et al.* 2010). Korotchkina i col·laboradors han descrit la possible interrelació de la via de p53 i mTOR, la qual participa en la regulació de la senescència cel·lular (Demidenko & Blagosklonny 2009; Demidenko *et al.* 2010). L'aturada del cicle mitjançant p53 pot ser reversible (quiescent) sempre que l'activació de p53 comporti una inhibició de la via de mTOR. El contrari, quan l'activació de p53 no pugui inhibir mTOR, llavors es provocarà una aturada irreversible del cicle cel·lular, i com a conseqüència senescència (Korotchkina *et al.* 2009; Korotchkina *et al.* 2010, Long & Ryan 2010; Poyurovsky & Prives 2010; Serrano 2010). D'acord amb els mecanismes esmentats, els resultats obtinguts amb el tractament simple amb Nut3a i doble tractament en els cultius primaris de CaOV, suggereix que la inducció de senescència a cèl·lules de CaOV està relacionada amb l'activació de p53, i al mateix temps, amb el manteniment de la

via de mTOR activa. Quan a les cèl·lules se'ls retira el medi amb Nut3a, es segueix observant una morfologia senescent i no tornen a proliferar, fet que evidencia que les cèl·lules es mantenen senescentes i no quiescents. A priori, Nut3a podria ser incapaç d'inhibir la via de mTOR a les cèl·lules humanes de CaOV.

Recentment s'ha descrit que els CaOV serosos d'alt grau tenen un 96% de mutacions a TP53 (*The Cancer Genome Atlas Research Network 2011; Durinck et al. 2011*). Aquest tipus histològic representa el 70 % dels CaOV (Cho & Shih 2009), per tant, el 30% dels altres tipus histològics i el 4% dels serosos d'alt grau podrien ser tractats amb el doble tractament Nut3a i CDDP. Dels cultius primaris tractats en aquest treball, quatre d'ells van ser CaOV serosos d'alt grau, dos endometrioides i dos mucinosos, tots ells amb TP53 salvatge. Ambdós tipus tenen baixes freqüències de mutacions a TP53 (Cuatrecasas *et al.* 1997; Kuo *et al.* 2009; Wiegand *et al.* 2010). El tipus endometrioides representa el 11% de casos de CaOV, mentre que els mucinosos representen el 3% (McLuggage WG 2011). Per tant, una tercera part de les pacients amb CaOV amb TP53 salvatge podrien beneficiar-se del tractament combinat amb CDDP i Nut3a.

Han hagut avenços recents en el desenvolupament de petites molècules de Mdm2 com terapèutiques potencials pel càncer, amb ènfasi a la Nut3a (Secchiero *et al.* 2011; Shen & Maki 2011). La Nut3a sembla ser un bon candidat d'agent quimioterapèutic, tanmateix presenta solubilitat limitada, baixa accessibilitat als teixits tumorals, toxicitat sistèmica i manca d'orientació específica (Das & Sahoo 2011). Una de les seves limitacions en clínica és que Nut3a actua com un substrat per les proteïnes de resistència a múltiples fàrmacs MRP-1 i PGP (Michaelis *et al.* 2009).

Estudis amb cèl·lules humanes de leucèmia amb TP53 salvatge han mostrat una consistent citotoxicitat de la Nut3a, el que fa que no pugui ser usada en assajos clínics (Lane *et al.* 2011). Tanmateix, hi ha estudis clínics que s'estan realitzant amb anàlegs de la Nut3a. Un dels inhibidors de Mdm2 emergents és RO5045337 (RG7112), es tracta d'una formulació oral d'una molècula derivada de la Nut3a que es troba actualment en fase I d'estudis clínics pels pacients amb tumors sòlids avançats (NCT00559533), leucèmia aguda refractària i leucèmia linfofítica crònica

(NCT00623870). L'objectiu d'ambdós estudis és determinar la dosi màxima tolerada i la dosi òptima de RO5045337, administrat com monoteràpia. Les dades preliminars han demostrat que els perfils de seguretat acceptables amb la resposta són els pacients amb liposarcoma, leucèmia mielògena aguda i la leucèmia linfocítica crònica (Yuan *et al.* 2011). Un altre inhibidor de Mdm2 que s'ha provat en estudis clínics en fase I és un nou derivat de la triptamina JNJ-26854165 (NCT00676910), el qual s'ha administrat a pacients amb tumors sòlids en estat avançat i/o refractaris per avaluar la seguretat, la dosi òptima i la dosi màxima tolerada, administrat com monoteràpia (Tabernero *et al.* 2011; Yuan *et al.* 2011).

Aquest estudi ha permès demostrar que la combinació de Nut3a amb CDDP indueix apoptosi a línies de CaOV sensibles i sobretot a resistents al CDDP amb TP53 salvatge. Les pacients amb CaOV avançat i TP53 salvatge, present en una tercera part dels casos, podrien ser beneficiàries d'aquesta combinació, evitant així la quimioresistència de la teràpia convencional del CDDP.





### **3 Determinar l'efecte de l'inhibidor de Survivina YM155 en línies cel·lulars, cultius primaris i xenoinjerts de CaOV**

El tercer objectiu de la tesi doctoral va ser l'anàlisi de la resposta al tractament amb un inhibidor de la Survivina, com ara és l'YM155, amb combinació amb el CDDP. Com ja s'ha comentat, la Survivina podria ser una de les proteïnes causants de la resistència al CDDP, limitant la via d'apoptosi.

La Survivina és el membre més petit de la família de proteïnes inhibidores de l'apoptosi (IAP). Posseeix un ampli ventall funcional, participant en processos com la regulació del cicle cel·lular, la inhibició de l'apoptosi, l'activació de l'angiogènesi associada a tumors, així com també actuant com a factor de resistència a teràpies antitumorals i adaptació a nous ambients, entre d'altres (Altieri 2008; Yamamoto *et al.* 2008). La Survivina s'expressa a nivells elevats durant el desenvolupament del teixit embrionari i fetal, mentre que en teixits adults la seva expressió és pràcticament inapreciable excepte en placenta, tim, cèl·lules mare CD34+ i cèl·lules epitelials basals colòniques (Ambrosini *et al.* 1997; Gianani *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2001; Liu *et al.* 2010). Diversos estudis han demostrat que hi ha sobreexpressió de Survivina en un gran nombre de càncers humans, entre els quals s'inclouen neuroblastoma (Adida *et al.* 1998), glioma (Chakravarti *et al.* 2002), càncer gàstric (Lu *et al.* 1998), pulmó (Monzo *et al.* 1999), mama (Tanaka *et al.* 2000), colorectal (Kawasaki *et al.* 1998), CaOV (Cohen *et al.* 2003), pancreàtic (Sarela *et al.* 2002), esofàgic (Grabowski *et al.* 2003) i melanoma (Nasr & El-Zammar 2008).

L'atractiu de la Survivina com a marcador i diana de noves teràpies resideix al fet de tractar-se d'una proteïna nodal involucrada en múltiples vies de senyalització que faciliten el manteniment tumoral (Church & Talbot 2012). A més, alts nivells de Survivina es correlacionen amb mal pronòstic, disminució de l'apoptosi, augment d'angiogènesi i quimioresistència (Altieri 2003; Zhen *et al.* 2005). S'ha demostrat que certs agents antitumorals poden reduir l'expressió de la Survivina, el què suggereix

que la Survivina podria ser una diana molecular contra tumors malignes humans (Yamamoto *et al.* 2008).

En CaOV la sobreexpressió de Survivina s'observa en un 74% de casos i es correlaciona amb mal pronòstic (Cohen *et al.* 2003). En els carcinomes d'ovari els nivells d'expressió de mRNA de Survivina es correlaciona amb estadis clínics avançats, i la seva sobreexpressió és important en la progressió dels tumors de CaOV, sent un factor de mal pronòstic (Liguang *et al.* 2007).

Existeix una associació entre els nivells de Survivina i la resistència a l'apoptosi mediada pel CDDP en línies de càncer de pròstata (Nomura *et al.* 2005), càncer de tiroïdes (Tirro *et al.* 2006), pulmó (Zaffaroni *et al.* 2007) i CaOV (Xing *et al.* 2012), on s'ha observat que inhibint la Survivina mitjançant DNA d'interferència i/o siRNA, es restaura la sensibilitat al CDDP. Estudis *in vitro* i *in vivo* dirigits contra la Survivina utilitzant oligonucleòtids anti-sentit, mutants dominants negatius o ribozims, han demostrat induir l'apoptosi, reduir la mida dels tumors i sensibilitzar les cèl·lules dels fàrmacs quimioterapèutics com ara el taxol, el CDDP i etopòsid, la radiació gamma, i la immunoteràpia (Pennati *et al.* 2002; Zaffaroni & Daidone 2002; Liu *et al.* 2010; Xu *et al.* 2010). Estudis preliminars de silenciament de Survivina mitjançant siRNA, apunten que en el nostre model de CaOV, la inhibició de Survivina també augmenta l'apoptosi generada pel CDDP a la línia resistent al CDDP.

Estudis previs han demostrat que el CDDP activa la via de PI3K/AKT/Survivina, la qual protegeix a les cèl·lules de l'apoptosi induïda pel CDDP. Inhibint l'esmentada via amb inhibidors/dominants negatius d'Akt o siRNA de Survivina, es sensibilitza a les cèl·lules de càncer de pulmó de cèl·lules petites al CDDP (Belyanskaya *et al.* 2005). Per tant, l'efecte apoptòtic del CDDP augmenta quan s'inhibeix la sobreexpressió de Survivina.

L'YM155, també conegut com *Sepantronium bromide*, és un compost basat en l'imidazolium que va ser identificat mitjançant un cribatge d'alt rendiment a partir de llibreries d'inhibidors de l'activitat promotora del gen de la Survivina (Nakahara *et al.* 2007). En experiments pre-clínic, l'YM155 inhibeix l'expressió del mRNA de Survivina i

disminueix l'expressió de la proteïna a dosi/temps dependent resultant amb l'activació de caspases i la inducció d'apoptosi en una àmplia gamma de cèl·lules tumorals humanes (Nakahara *et al.* 2011a). A més, el seu efecte citotòxic és independent de l'estat de p53 (Nakahara *et al.* 2007; Nakahara *et al.* 2011a). En models de xenoinjerts de càncer de mama, neoplàsia de bufeta, càncer de pulmó de cèl·lula gran, melanoma, càncer de pròstata i limfoma no-Hodgkin, la infusió contínua d'YM155 durant 3 ó 7 dies (1-10 mg/kg) va demostrar una activitat antitumoral significativa sense mostrar pèrdua del pes corporal dels ratolins. La disminució de la mida del tumor induït per l'YM155 es va associar a una reducció dels nivells intratumorals de l'expressió de Survivina, un augment de l'apoptosi i una disminució dels índexs de mitosi (Nakahara *et al.* 2011a). En l'àmbit clínic, l'YM155 ha demostrat ser ben tolerat en pacients amb càncer avançat sense presentar toxicitat severa ni efectes hematològics, mostrant una activitat antitumoral en estudis de fase I (Tolcher *et al.* 2008; Satoh *et al.* 2009). Assajos clínics multicèntrics de fase II han demostrat seguretat i tolerabilitat de l'YM155 en pacients amb melanoma avançat, càncer de pulmó avançat de cèl·lules grans, càncer de pròstata resistent a la teràpia amb taxans i limfoma refractari difós de cèl·lules B (Giaccone *et al.* 2009; Lewis *et al.* 2011; Cheson *et al.* 2012; Tolcher *et al.* 2012).

Estudis recents suggereixen que l'YM155 podria actuar com inductor de dany al DNA més que inhibint la Survivina. Quan es compara l'efecte de l'YM155 amb un compost similar, el NSC80467, es demostra que ambdós agents causen la mort a les cèl·lules no per la supressió directa de Survivina, sinó per la inducció de dany al DNA (Glaros *et al.* 2012). En el nostre model també es demostra que l'YM155 ocasiona dany al DNA a les línies cel·lulars de CaOV, mantenint-se al llarg del temps a la línia sensible A2780p, però disminuint a la línia resistent al CDDP A2780cis, per la capacitat d'aquestes cèl·lules en reparar el dany ocasionat pel CDDP.

En aquesta tesi doctoral s'ha investigat la capacitat antitumoral de l'YM155 sol i en combinació amb el CDDP *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*. S'ha observat que el pretractament amb l'YM155 ocasiona una activació de caspases, augment de dany al DNA

i inducció de l'apoptosi, amb un efecte sinèrgic quan es combina amb el CDDP, disminuint la viabilitat cel·lular i disminuint la mida dels tumors xenoinjerts de CaOV.

Els resultats obtinguts mostren que el tractament amb YM155 en línies cel·lulars de CaOV inhibeix l'expressió de Survivina de forma dosi/temps dependent, augmentant l'apoptosi.

A les dosis utilitzades en aquest treball i en aquestes línies cel·lulars, l'YM155 no va modificar l'expressió de Mcl-1, ni a nivell de mRNA ni de proteïna. L'expressió de XIAP tampoc es va veure inhibida amb el tractament amb YM155; fet que demostrava l'especificitat de l'inhibidor YM155 per la Survivina. S'ha demostrat que la inhibició de Survivina per l'YM155 té efectes mínims en els nivells d'expressió d'altres membres de les IAPs o proteïnes relacionades amb Bcl-2 (Nakahara 2007; Iwasa T 2008; Iwasa T 2010; Yamanaka 2011). Tanmateix, hi ha estudis que demostren que l'YM155 regula negativament a Mcl-1 a línies cel·lulars de càncer de pròstata, mesotelioma, càncer de pulmó, càncer intestinal epitelial, glioma, glioblastoma epitelial i carcinoma escamós de llengua (Tang *et al.* 2011).

El tractament amb YM155 a les línies cel·lulars de CaOV va provocar un augment de la fase G2/M del cicle cel·lular de forma dosi-dependent a les 24 hores, mentre que a les 48 hores, i a dosis altes de YM155, la fase G2/M disminuïa amb un conseqüent augment dosi-dependent del pic subdiploid que es corresponia amb un augment de l'apoptosi, indicant que l'YM155 aturava les cèl·lules en fase G2/M i posteriorment les conduïa cap a apoptosi. Estudis amb línies cel·lulars de melanoma demostren que l'exposició a dosis creixents d'YM155 a les 48 hores, incrementa la distribució del pic subdiploid de forma dosi-dependent (Yamanaka *et al.* 2011).

La línia sensible al CDDP A2780p tractada amb CDDP durant 48 hores, va presentar disminució del contacte cel·lular, augment de l'apoptosi i increment de la fase G2/M del cicle cel·lular i del pic subdiploid, que no va presentar la línia resistent al CDDP A2780cis. Amb la pre-incubació d'YM155 durant 48 hores i l'addició de CDDP 48 hores més (doble tractament), es va observar que en ambdues línies cel·lulars, i en especial la línia A2780cis, el nombre de cèl·lules disminuïa, augmentava l'apoptosi, i

disminuïa la fase G2/M del cicle cel·lular augmentant el pic subdiploid, molt més que amb el tractament amb CDDP. Així doncs, el tractament amb YM155 estava potenciant l'efecte del CDDP augmentant l'apoptosi.

Amb el doble tractament, va haver un increment dels gens relacionats amb l'apoptosi en comparació al tractament amb CDDP, sobretot a la línia resistent a aquest. Els canvis més destacables van ser la inducció del mRNA de gens diana de p53 com NOXA, PUMA, APAF-1 i CDKN1A (p21). Aquests gens són diana de p53, el que comporta al doble tractament a la inducció de p53, la qual activaria la via intrínseca de l'apoptosi induint l'augment dels seus gens diana. A nivell proteic es va observar un augment de p53 amb el tractament amb l'YM155 que va augmentar amb el doble tractament, així com també un increment de la proteïna p21 a ambdues línies cel·lulars. S'ha descrit que la Survivina regula indirectament l'expressió proteica de p53 modificant la seva degradació mitjançant l'eix caspasa-3/Mdm2. Una disminució de Survivina augmenta l'activitat de les caspases que degraden a Mdm2, i conseqüentment augmenta l'activitat de p53. Per tant, una disminució de Survivina permetria l'alliberació i la inducció proteica de p53 (Wang *et al.* 2004). D'altra banda, l'augment de p53 i les seves dianes també podria ser conseqüència del dany al DNA generat per l'YM155, dany que va augmentar amb el doble tractament a ambdues línies cel·lulars.

L'augment dels gens pro-apoptòtics amb el doble tractament s'acompanyava d'una disminució considerable del gen anti-apoptòtic SURVIVINA, sobretot a la línia resistent al CDDP A2780cis, fet que indicava que el pre-tractament amb l'YM155 estava sensibilitzant a les cèl·lules al CDDP. A nivell proteic també es va observar gran disminució de la proteïna Survivina amb el doble tractament respecte el tractament amb CDDP a la línia A2780cis, amb un augment de la forma truncada de la caspasa 3, indicant que el doble tractament estava augmentant l'apoptosi respecte el tractament amb CDDP. Estudis previs demostren que la combinació d'YM155 amb compostos del platí, induïx apoptosi i activació de la caspasa 3 a cèl·lules de càncer de pulmó, de major manera que els tractaments simples (Iwasa *et al.* 2010). El mateix es demostra en un estudi de càncer de coll i cap, on la combinació de l'YM155 amb CDDP

augmenta l'apoptosi a línies cel·lulars resistents al CDDP revertint la resistència, suggerint que l'YM155 actua de forma sinèrgica promovent l'apoptosi dels compostos del platí (Church & Talbot 2012).

L'augment del gen CDKN1A (a les 24 hores) i de la seva respectiva proteïna (p21) (a les 48 hores) del doble tractament respecte el tractament amb CDDP, es va correlacionar amb l'augment de la fase G2/M del cicle cel·lular a les 24 hores a ambdues línies cel·lulars. Així doncs, el pre-tractament amb YM155 aturava les cèl·lules en fase G2/M a les 24 hores i a les 48 hores les dirigia cap a apoptosi.

En el nostre model de CaOV es va demostrar que l'YM155 i el CDDP induïen apoptosi dependent de caspases. Tots dos components activen l'apoptosi de forma caspasa dependent. Estudis previs han demostrat que l'YM155 activa l'apoptosi mitjançant l'activació de les caspases (Bast *et al.* 2009; Iwasa *et al.* 2008; Iwasa *et al.* 2010; Yamanaka *et al.* 2011), i amb la línia cel·lular A2780p, els nostres resultats demostren que la inducció d'apoptosi generada pel CDDP va ser dependent de caspases, ja que amb la inhibició d'aquestes mitjançant QVD es va revertir l'apoptosi. D'altra banda, hi ha estudis que demostren que la inhibició de Survivina pot augmentar l'apoptosi independent de caspases, mitjançant l'activació del Factor Inductor d'Apoptosi (AIF). Enfront un estímul apoptòtic, AIF surt del mitocondri al citoplasma i es transloca al nucli, on promourà la fragmentació del DNA, condensació de la cromatina i activació de l'apoptosi independent de caspases (Susin *et al.* 1999; Joza *et al.* 2001). Altres estudis demostren que la funció primària antiapoptòtica de la Survivina és la d'inhibir l'alliberació d'AIF del mitocondri, protegint així l'entrada de la cèl·lula en apoptosi (Liu *et al.* 2004). Tanmateix, en el nostre model es va demostrar que la inducció d'apoptosi era caspasa dependent.

Les respostes a l'estrés o dany al DNA són importants pel manteniment de l'estabilitat genòmica i la integritat cel·lular (Hirao *et al.* 2000). Depenent de l'extensió del dany, les cèl·lules poden reparar-lo o bé quan és massa greu, iniciar la mort cel·lular programada (Zhao *et al.* 2001). Els agents que inhibeixen la reparació del dany al DNA incrementen la sensibilitat de les cèl·lules als fàrmacs quimioterapèutics o a les radiacions ionitzants (Banath *et al.* 2004; Taneja *et al.* 2004). L'efecte

quimioterapèutic del CDDP resulta de la interacció amb el DNA, formant enllaços creuats DNA-proteïna, monoadductes de DNA, així com reticulacions inter/intra-catenàries (Chu 1994; Siddik 2003). Aquests adductes en el DNA indueixen la distorsió de la doble hèlix, obstruint la forquilla de replicació a cèl·lules en divisió, generant trencaments de cadena doble del DNA (DSB) (Clingen *et al.* 2008). Una proteïna clau en la reparació dels DSB és H2AX, la qual en presència de DSB és ràpidament fosforilada, formant  $\gamma$ H2AX als llocs on hi ha els DSB. Tenint en compte que  $\gamma$ H2AX apareix ràpidament en els DSBs (Rogakou *et al.* 1998; Zhou & Elledge 2000; Khanna *et al.* 2001; Shiloh & Kastan 2001), la seva presència serveix com un marcador sensible i específic del dany al DNA no reparat. El temps de persistència de  $\gamma$ H2AX després del tractament amb CDDP pot ser capaç de predir la quimiosensibilitat cel·lular o la resistència al CDDP. Estudis previs amb les línies de CaOV A2780p i A2780cis tractades amb CDDP, demostren que el nombre de cèl·lules amb focis positius per  $\gamma$ H2AX és menor a les cèl·lules A2780cis en comparació a les cèl·lules sensibles al CDDP A2780p, el què significa que les cèl·lules resistents presenten menys dany, o dit d'una altra manera, reparen més aviat. L'augment del nombre de focis a la línia A2780cis és màxim a les 16 hores post-tractament amb CDDP, arribant a nivells basals a les 48 hores (Clingen *et al.* 2008). El nostre estudi va confirmar aquests resultats: la línia A2780p tractada amb CDDP va tenir un marcatge més elevat de  $\gamma$ H2AX que la línia A2780cis en tots els temps analitzats, mantenint-se fins a les 48 hores post-tractament, mentre que la línia A2780cis va tenir el màxim marcatge a les 12 hores post-tractament, quan va començar a disminuir fins a nivells basals (a les 48 hores post-tractament). Això suggeria que la línia A2780cis reparava el dany generat pel CDDP. El tractament simple amb l'YM155 també va generar un augment de dany a la línia A2780p mantenint-se al llarg del temps, mentre que el dany de la línia A2780cis va ser inferior en tots els temps, només augmentant a les 72 hores post-tractament (48 hores d'incubació amb l'YM155 més 24 hores addicionals) i a continuació retornant als valors basals; això indicava que les cèl·lules A2780cis reparaven el dany. Amb l'expressió del mRNA dels gens de detecció de dany i de reparació a les 48 hores post-tractament amb YM155, la línia A2780p va presentar un augment dels gens de dany i reparació del DNA, mentre que la línia A2780cis no presentava aquests canvis,



el què suggeria que a dit temps i a les dosis usades no s'havia generat dany, i per tant, els gens de detecció i reparació del dany es trobaven a nivells baixos. Aquests resultats es van confirmar amb l'estudi conjunt de dany, apoptosi i proliferació cel·lular realitzat a les 24 i 48 hores post-tractament amb l'YM155, on es va observar que l'YM155 va generar dany al DNA a la línia A2780p que es va mantenir fins a les 48 hores, les cèl·lules van deixar de proliferar i van començar a entrar en apoptosi, sobretot a les 48 hores de tractament. A la línia A2780cis no es va observar ni dany ni apoptosi en cap dels temps, suggerint que la dosi i temps no era suficient per generar dany en aquesta línia cel·lular.

Ara bé, el doble tractament sí va generar un augment de dany al DNA a la línia resistent al CDDP A2780cis, en comparació al tractament amb CDDP. A més, aquest dany es va mantenir al llarg del temps, el què indicava que l'YM155 estava inhibint la reparació dels DSB induïts pel CDDP mitjançant la disminució de Survivina o bé augmentant i mantenint el dany, sensibilitzant les cèl·lules al CDDP. Chakravarti i col·laboradors demostraren que la baixa regulació de la Survivina a línies cel·lulars de glioma va donar lloc a un grau significativament major de DSBs segons l'assaig de *comet assay*. Per contra, hi havia un nombre significativament menor de DSBs en cèl·lules que sobreexpressaven Survivina (Chakravarti *et al.* 2004). Així mateix, Rodel i col·laboradors van trobar que la inducció de  $\gamma$ H2AX va augmentar significativament després de la irradiació a cèl·lules de càncer de colon amb Survivina inhibida mitjançant siRNA (Rodel *et al.* 2005). S'ha descrit que la sobreexpressió de Survivina pot augmentar la reparació de DSB a les cèl·lules tumorals a través de la regulació positiva de la proteïna Ku70 (Jiang *et al.* 2009). Altres estudis demostren que la Survivina s'acumula al nucli i interacciona amb els components de la maquinària de reparació dels DSB (MDC1, DNA-PKc, Ku i  $\gamma$ H2AX), indicant el paper de la Survivina en la reparació de DSB després de les radiacions ionitzants a cèl·lules de glioblastoma (Reichert *et al.* 2011). Tanmateix, en un estudi recent es demostra que el tractament amb l'YM155 genera inducció dosi-dependent dels marcadors de dany de DNA,  $\gamma$ H2AX i KAP-1. La dosi necessària d'YM155 per estimular  $\gamma$ H2AX és considerablement inferior a la dosi necessària per inhibir la Survivina, el que suggereix que el dany al DNA és el primer esdeveniment generat per l'YM155 (Glaros *et al.* 2012). Aquests resultats

indiquen que probablement l'efecte més important de l'YM155 està relacionat amb la inducció de dany al DNA, i que de forma secundària es produiria una inhibició de la Survivina. L'YM155 inhibeix la reparació dels DSBs induïts per radiació a cèl·lules grans de càncer de pulmó (NSCLC), efecte que probablement representa l'acció radiosensibilitzadora observada amb l'YM155 (Iwasa *et al.* 2008). Altres demostren que la quimiosensibilització de l'YM155 és atribuïble a la inhibició de la reparació dels DSB induïts pels compostos del platí en NSCLC (Iwasa *et al.* 2010).

En el nostre model, l'YM155 combinat amb el CDDP disminueix la Survivina, el que indueix activació d'apoptosi. A més a més, l'YM155 sol genera dany al DNA a la línia sensible al CDDP A2780p mantenint-lo al llarg del temps. A la línia A2780cis, el dany es manté elevat sense reparar només amb el doble tractament.

Es desconeix si la diana principal de l'YM155 és la inhibició de la Survivina o bé el dany al DNA. Es poden suposar dos models:

1) L'YM155 inhibeix la Survivina (1er esdeveniment), sent la disminució de Survivina la causant de mantenir els DSB del DNA elevats (2n esdeveniment) per manca de reparació, ja que Survivina forma part de la maquinària de reparació (Reichert *et al.* 2011). La disminució de Survivina activa l'apoptosi, potenciada amb l'augment de dany al DNA (Fig.D3.1A).

2) L'YM155 genera dany al DNA (1er esdeveniment), el qual disminueix els nivells de Survivina (2n esdeveniment) (Glaros *et al.* 2012) amb conseqüent inducció d'apoptosi. El dany per sí sol també genera apoptosi (Fig.D3.1B).

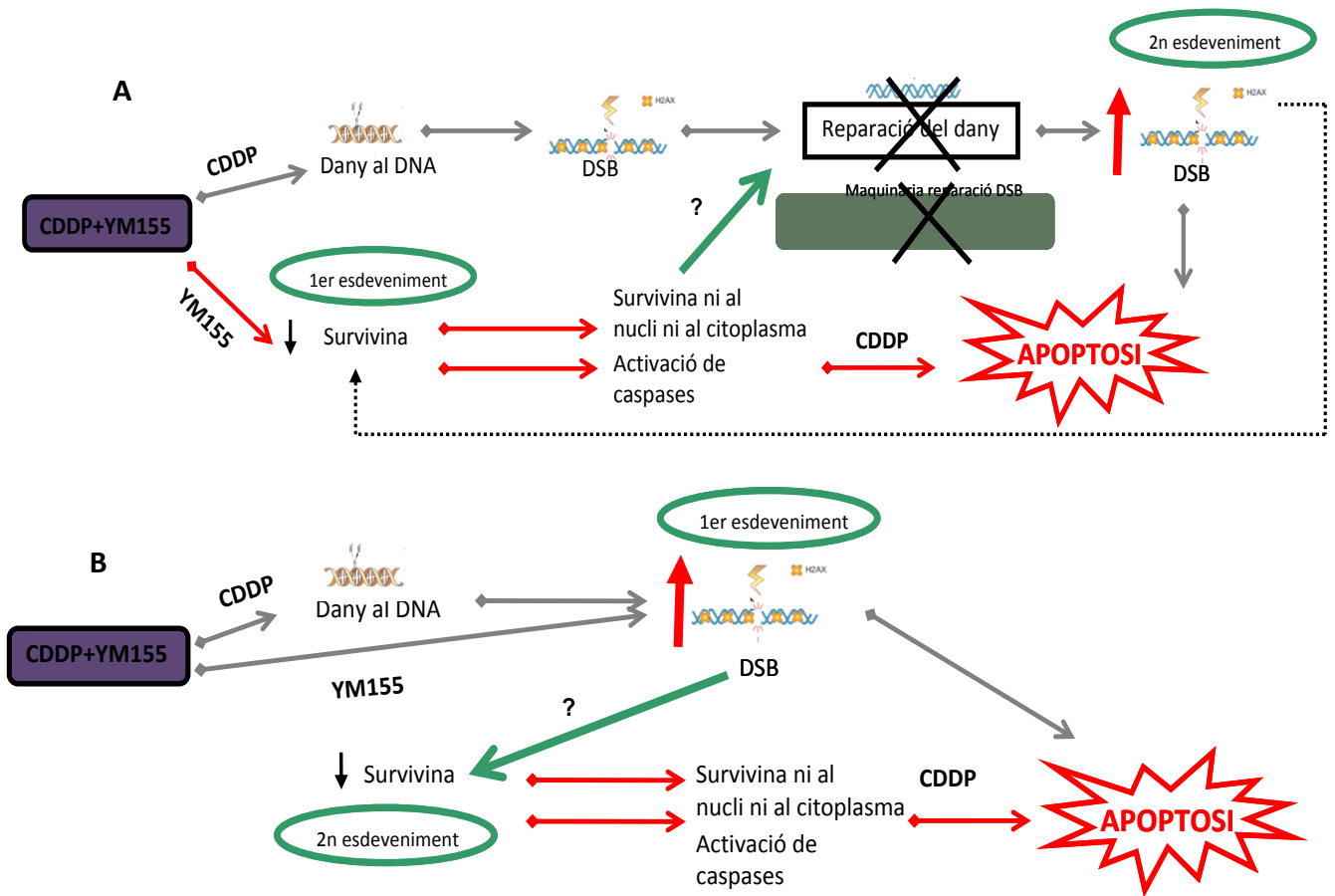


Figura D3.1: Models del mecanisme d'acció de l'YM155 en el doble tractament a les línies cel·lulars de CaOV. L'YM155 primer inhibeix Survivina que activa l'apoptosi, i la seva disminució genera augment i manteniment del dany al DNA i l'activació de l'apoptosi (A). L'YM155 augmenta al dany al DNA que indueix apoptosi, amb conseqüent disminució de Survivina i activació de l'apoptosi (B).

Per conèixer si la Survivina és la diana de l'YM155 que posteriorment genera dany, o bé a la inversa, es podrien realitzar els experiments següents: tractar la línia sensible A2780p amb la dosi de la IC<sub>50</sub> apoptòtica d'YM155 (65 nM), i analitzar la inducció de dany al DNA mitjançant γH2AX als 30 minuts, 1, 3, 6, 12 i 24 hores de tractament. Les dades obtingudes es compararien amb les dades de l'expressió de mRNA de Survivina (Fig.R3.6). L'efecte que observéssim abans, seria el primer esdeveniment i diana de l'YM155, mentre que l'altre seria la conseqüència del primer. Un altre experiment seria sobreexpressar Survivina ectòpica a la línia A2780p i tractar-la sense o amb YM155 i mesurar la inducció de dany al DNA, apoptosi i verificar l'expressió de Survivina. Si amb el tractament amb l'YM155 s'observés més dany, igual expressió de Survivina i activació de l'apoptosi respecte el control, ens indicaria que el

primer esdeveniment i diana de l'YM155 és el dany al DNA, i secundàriament la disminució de Survivina. Si s'observés menys dany, igual expressió de Survivina i activació de l'apoptosi respecte el control, indicaria que l'YM155 inhibeix primàriament a la Survivina i secundàriament es genera dany al DNA.

Els resultats obtinguts amb les línies cel·lulars es van confirmar a cultius primaris de CaOV quan es va aplicar el doble tractament de CDDP i YM155. A nivell de mRNA van augmentar els gens pro-apoptòtics NOXA, PUMA i APAF-1 a tots els cultius primaris tractats amb el doble tractament en relació al tractament amb CDDP. L'expressió de SURVIVINA amb el doble tractament va disminuir considerablement en tots els cultius primaris tractats, i es va associar a un augment de l'apoptosi del doble tractament respecte el tractament amb CDDP. En la majoria dels cultius primaris, la disminució de SURVIVINA va ser efecte de l'YM155, ja que amb aquest tractament els nivells van disminuir amb valors similars al doble tractament. A nivell proteic també es va observar una disminució de SURVIVINA i de PARP total amb el doble tractament respecte el CDDP, el què demostrava que l'YM155 estava sensibilitzant als cultius primaris envers al CDDP. El gen CDKN1A es va incrementar amb el doble tractament respecte el CDDP a les 24 hores, la proteïna del qual (p21) va continuar induïda a les 48 hores de tractament, fet també observat a les línies cel·lulars; amb el doble tractament durant 48 hores, p21 també augmentava respecte el CDDP. En els cultius primaris, va haver un augment considerable de la proteïna p21 amb l'YM155 i doble tractament a les 48 hores, que es va associar a una aturada irreversible del cicle cel·lular amb inducció de senescència, mentre que a les línies cel·lulars no se'n va detectar. Per tant, el doble tractament CDDP i YM155 a les 48 hores va induir dany al DNA i apoptosi a les línies cel·lulars, mentre que en els cultius primaris va generar apoptosi i senescència. L'estudi de dany al DNA en cultius primaris no es va poder realitzar per manca de mostra.

En el nostre estudi es va avaluar la resposta al tractament amb infusió contínua d'YM155 durant 7 dies amb administració de CDDP en els dies 0 i 4 del tractament, en el model ectòpic de transplant subcutani de les línies cel·lulars A2780p i A2780cis. Els models animals reflecteixen amb fidelitat els canvis cel·lulars i moleculars associats

amb la iniciació i progressió del càncer, i tenen un gran potencial per facilitar el desenvolupament de millors mètodes per la detecció precoç i el tractament del CaOV (Vanderhyden *et al.* 2003). Estudis amb models de transplants ectòpics i ortotòpics de cèl·lules de càncer de pròstata hormono-refractari (HRPC) demostren que l'YM155 suprimeix la Survivina intratumoral mostrant una potent activitat antitumoral. La infusió contínua d'YM155 no indueix toxicitat sistèmica, tals com la pèrdua de pes corporal o disminució del nombre de cèl·lules a la sang. A més, estudis de farmacocinètica demostren que l'YM155 es distribueix ràpidament als teixits, distribuint-se 20 vegades més als teixits tumorals que al plasma, independentment del model de xenoinjert (Nakahara *et al.* 2007). Estudis en models animals amb infusió contínua d'YM155 en combinació amb altres compostos, demostren disminuir la mida del tumor en comparació amb els tractaments simples. Així, en el model de xenoinjert subcutani de melanoma o pulmó (NSCLC), es demostra que la infusió contínua d'YM155 durant 7 dies amb administració intravenosa de docetaxel en determinats dies de tractament, també genera una regressió de la mida del tumor en comparació amb els tractaments simples (Yamanaka *et al.* 2011; Nakahara *et al.* 2011b). També es demostra l'YM155 combinat amb Rituximab genera millores significatives en la regressió del tumor i supervivència en models de xenoinjert de limfoma de no Hodking (Kita *et al.* 2012). L'YM155 potencia la quimiosensibilitat a la gemcitabina a les cèl·lules de càncer de pàncrees i potencia l'efecte antitumoral dels xenoinjerts (Yoon *et al.* 2012). Un model de xenoinjert subcutani de NSCLC amb infusió contínua d'YM155 durant 7 dies i administració intravenosa de CDDP o carboplatí en els dies 0-3 i 7-11, demostra disminuir la mida del tumor de forma considerable en comparació amb els tractaments amb CDDP o carboplatí (Iwasa *et al.* 2010). El mateix succeeix en un model de xenoinjert de carcinoma escamós de cap i coll, on l'YM155 potencia l'efecte antiangiogènic i antitumoral del CDDP sense produir toxicitat als ratolins (Kumar *et al.* 2012).

En el nostre estudi es va demostrar que els tumors resistents al CDDP tractats amb el doble tractament amb CDDP i YM155, disminuïen més de mida que els tumors que només rebien CDDP. A més, no presentaven signes clínics de toxicitat, i la lleugera disminució de pes dels ratolins era conseqüència de l'efecte del CDDP i la reducció de

massa tumoral. Això demostrava la sensibilització de l'YM155 al CDDP *in vivo*. L'anàlisi gènic dels tumors tractats va demostrar que l'YM155 conjuntament amb el CDDP augmentava els gens pro-apoptòtics i el gen de cicle cel·lular CDKN1A respecte el tractament amb CDDP, sobretot als ratolins amb tumors resistents al CDDP A2780cis, amb una forta disminució dels nivells de mRNA de SURVIVINA, fet que es correlacionava amb una disminució de la mida del tumor. L'anàlisi proteic dels tumors va confirmar els resultats observats a nivell de mRNA. El tractament amb l'YM155 conjuntament amb el CDDP estava incrementant l'apoptosi, amb augment de la forma truncada de la caspasa 3, disminució dels nivells de Survivina i augment de la proteïna p21, fet que es correlacionava amb els resultats observats *in vitro* i *ex vivo*. Els resultats es van confirmar amb l'anàlisi immunohistoquímic dels tumors tractats: els tumors que van rebre doble tractament van reduir significativament l'expressió de Survivina i van augmentar l'expressió de caspasa 3 total i truncada en comparació als tractaments simples. Per tant, el doble tractament va generar apoptosi als xenoinjerts de CaOV amb una conseqüent reducció de la mida del tumor respecte el tractament amb CDDP.

El model de transplant subcutani ectòpic s'ha utilitzat extensament en estudis de tumorogènesi: aquests models presenten l'avantatge sobre els models *in vitro* de reproduir l'arquitectura del tumor original, tanmateix en ocasions no reflecteixen la interacció real amb el microentorn tumoral i no reproduïen la disseminació metastàtica (Stephenson *et al.* 1992; Bex *et al.* 2000). En l'actualitat, nombrosos autors han plantejat que el microambient tissular del lloc d'inoculació del tumor juga un paper fonamental en el desenvolupament de la neoformació, i per tant, els models ortotòpics reproduïen més fidelment el comportament biològic del tumor original i el seu patró d'invasió i disseminació metastàsica en diversos carcinomes (Fidler 1991; Killion *et al.* 1998; Hoffman 1999). Aquests models representen el model de metastasi, el qual consta del creixement local del tumor, creixement vascular, invasió limfàtica i l'extravasació dels òrgans metastàsics. A més, presenten un patró de quimiosensibilitat diferent en comparació amb el model transplantat per via subcutània (Kubota 1994). Fidler i col·laboradors assenyalen que el microambient dels tumors humans subcutanis és molt diferent al seu medi ambient original (Fidler *et al.*

1990). Postula que aquesta diferència pot resultar en la falta de metàstasi i l'alterada resposta als fàrmacs observada en els models subcutanis. Aquestes diferències han sigut assenyalades per Fidler (Wilmanns *et al.* 1992) i Kuo (Kuo *et al.* 1993) sobre les respostes als fàrmacs dels tumors transplantats ortotòpicament respecte els tumors de via subcutània. Malgrat les diferències entre espècies, l'òrgan corresponent al ratolí *nude* s'assimila més al pacient original que el medi subcutani (model ectòpic). Fu i col·laboradors van presentar el primer model de transplant ortotòpic de CaOV humà. Les mostres de pacients de CaOV es van transplantar sota la càpsula de l'ovari del *nude mice* mitjançant tècniques de microcirurgia. Els tumors humans a nivell local van créixer en els ratolins i van donar lloc a un patró de metàstasi, incluint el peritoneu parietal, el colon, l'epipló i ascitis. El model ortotòpic descrit per aquests autors va ser útil per avaluar noves teràpies i diagnòstic pel CaOV (Fu & Hoffman 1993). Seria interessant usar la combinació de l'YM155 i CDDP en un model ortotòpic de CaOV mitjançant inoculació de les línies cel·lulars, o encara millor, mitjançant xenoinjerts tumorals derivats de pacients, ja que els resultats reproduirien de manera fidedigna el comportament biològic del tumor original. Els models de xenoinjert amb tumors de pacients ofereixen un seguit d'avantatges sobre els models estàndars de xenoinjerts amb línies cel·lulars, ja que mantenen l'heterogeneïtat molecular, genètica i histològica del tumor d'origen a través de passes en ratolins. El fet que les línies cel·lulars, inclús quan es propaguen *in vivo*, derivin de cèl·lules tumorals que s'han adaptat al creixement fora d'un microambient tumoral natural, ocasiona l'aparició de canvis genètics que són diferents a l'empremta genètica que tenien els tumors originals (Daniel *et al.* 2009). A més, existeix una forta divergència genètica entre un tumor primari i la línia cel·lular corresponent derivada del tumor, en comparació amb un xenoinjert directe, inclús després de generacions (Daniel *et al.* 2009). Una de les principals avantatges dels models de xenoinjerts amb tumors de pacients és el manteniment de l'arquitectura original del tumor i les característiques histològiques. Aquest model presenta un recurs ric en informació pre-clínica per l'anàlisi de l'activitat de fàrmacs, incluint les combinacions de nous medicaments, així com el descobriment de biomarcadors predictius (Tentler *et al.* 2012). Donat que aquest model presenta avantatges enfront als xenoinjerts de línies cel·lulars, per la millora

del nostre model *in vivo*, seria útil usar el model de xenoinjerts amb tumors de pacients i observar la resposta al doble tractament amb l'YM155 i el CDDP.

No s'ha reportat toxicitat ni esdeveniments hematològics adversos relacionats amb el tractament farmacològic amb l'YM155 en estudis de fase I d'YM155 com a monoteràpia (Tolcher *et al.* 2008; Satoh *et al.* 2009). Estudis clínics en fase II han demostrat que la monoteràpia és segura, però moderament eficaç en pacients amb càncer de pulmó (NSCLC) (Giaccone *et al.* 2009), melanoma avançat (Lewis *et al.* 2011), càncer de pròstata resistent a la teràpia amb taxans (Tolcher *et al.* 2012) i limfoma difós de cèl·lules grans B. En aquest últim estudi, una persona va tenir remissió completa, i altres dos participants van tenir una significant resposta a la teràpia (Cheson *et al.* 2012).

El mecanisme d'acció de l'YM155 mitjançant la inducció de dany al DNA i/o la inhibició de la Survivina induint apoptosi, i l'augment de sensibilitat als tractaments contra el càncer i altres estímuls apoptòtics degut a la supressió de Survivina, suggereix que l'YM155 ofereix una bona opció a la teràpia combinada. Actualment s'està portant a terme l'estudi en fase I/II de la combinació de paclitaxel, carboplatí i YM155 a pacients amb tumors sòlids (fase I) i NSCLC avançat (fase II) (NCT01100931).

Altres estratègies alternatives per suprimir la Survivina també han entrat en proves clíniques inicials, incluint vacunes per generar una resposta immune a un antigen específic de les cèl·lules tumorals que expressen Survivina, així com diferents tipus d'oligonucleòtids anti-sentit. Aquests últims, que inclouen productes de farmacèutiques importants, haurien de ser capaços de silenciar el gen que codifica per la Survivina, amb més precisió que les petites molècules com l'YM155 (Holmes 2012).

La quimioteràpia basada en la combinació amb el CDDP és el tractament estàndar per les pacients de CaOV. Aquest treball ha demostrat que el tractament de les cèl·lules de CaOV amb l'YM155 incrementa els efectes antitumorals del CDDP *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*. La sensibilització induïda per l'YM155 sembla ser atribuïda a la inducció d'apoptosi caspasa-dependent, la inducció de senescència i la inhibició de la reparació del dany del DNA o augment de dany induït per l'YM155.



Els resultats d'aquest estudi suggereixen que la combinació de compostos del platí amb l'YM155 o molècules anti-sentit de la Survivina, podria tenir potencial com un nou règim terapèutic en pacients amb CaOV, independentment de l'estat de p53. Com s'ha descrit en el capítol 2, amb la teràpia combinada de CDDP i Nut3a, les pacients que podrien rebre tractament es redueix a aquelles que tenen p53 salvatge, mentre que la teràpia combinada de CDDP i YM155 seria bona per tota pacient, independentment de l'estat de p53.

## CONCLUSIONS



## CONCLUSIONS

1. Els cultius primaris de CaOV humà establerts tant a partir de mostra tumoral sòlida com de LASC són un bon model *ex vivo* per l'anàlisi de la resposta a nous tractaments.
2. La tècnica de tripsinització selectiva permet l'eliminació de la majoria dels fibroblasts dels cultius primaris de CaOV obtinguts a partir de tumor sòlid o LASC, obtenint una riquesa al voltant del 90% de cèl·lules epitelials.
3. L'inhibidor de Mdm2 Nutlina-3a (Nut3a) estabilitza i activa p53 a les línies cel·lulars A2780p i A2780cis i als cultius primaris amb TP53 salvatge, mentre que la línia OV90 amb TP53 mutada, presenta resistència a la Nut3a.
4. La Nut3a potencia l'efecte del CDDP i sensibilitza a les cèl·lules resistents a aquest compost, induint aturada de cicle cel·lular a fase G2/M i apoptosi. Als cultius primaris indueix apoptosi i senescència.
5. El doble tractament CDDP i Nut3a indueix una disminució dels nivells de mRNA i de la proteïna Survivina en les línies cel·lulars i cultius primaris de CaOV, que es correlaciona amb un augment de l'apoptosi.
6. El tractament amb l'inhibidor de la Survivina YM155 a les línies cel·lulars de CaOV indueix disminució de la viabilitat cel·lular i inducció d'apoptosi temps/dosi-dependent, acompanyat d'una disminució dels nivells de mRNA i de proteïna Survivina.
7. YM155 potencia l'efecte del CDDP i sensibilitza a les cèl·lules resistents a aquest, induint aturada de cicle cel·lular en fase G2/M a les 24 hores, i apoptosi a les 48 hores. En els cultius primaris indueix apoptosi i senescència.

8. El doble tractament CDDP i YM155 indueix i manté el dany al DNA a la línia resistent A2780cis, mentre que no s'observa efecte amb els tractaments amb CDDP i YM155 per separat.
9. El tractament amb YM155 i CDDP a ratolins amb xenoinjerts de CaOV resistents al CDDP, disminueix la mida dels tumors concomitantment amb un augment de gens pro-apoptòtics, disminució del mRNA i proteïna Survivina i augment proteic de la caspasa 3.
10. Les combinacions de Nut3a i/o YM155 amb el CDDP podrien ser una bona opció per la teràpia de CaOV resistent al CDDP, sent la combinació amb la Nut3a exclusiva pels tumors amb p53 salvatge, i amb l'YM155 independent de l'estat de p53.

## BIBLIOGRAFIA



## BIBLIOGRAFIA

### A

- Adams JM & Cory S (2007): Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* **19**, 488-496.
- Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M and Altieri DC (1998): Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* **351**, 882-883.
- AECC: <https://www.aecc.es>
- Agarwal R & Kaye SB (2003): Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 502-516.
- Ahmad S (2010): Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. *Chem Biodivers* **7**, 543-566.
- Altieri DC (2003a): Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer. *Prog Cell Cycle Res* **5**, 447-452.
- Altieri DC (2003b): Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* **22**, 8581-8589.
- Altieri DC (2008): Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer* **8**, 61-70.
- Altieri DC (2010): Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem J* **430**, 199-205.
- Ambrosini G, Adida C and Altieri DC (1997): A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* **3**, 917-921.
- Ambrosini G, Sambol EB, Carvajal D, Vassilev LT, Singer S and Schwartz GK (2007): Mouse double minute antagonist Nutlin-3a enhances chemotherapy-induced apoptosis in cancer cells with mutant p53 by activating E2F1. *Oncogene* **26**, 3473-3481.
- Andersen MH, Svane IM, Becker JC and Straten PT (2007): The universal character of the tumor-associated antigen survivin. *Clin Cancer Res* **13**, 5991-5994.



- Anderson NS, Bermudez Y, Badgwell D, Chen R, Nicosia SV, Bast RC, *et al.* (2009): Urinary levels of Bcl-2 are elevated in ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol* **112**, 60-67.
- Appella E & Anderson CW (2001): Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* **268**, 2764-2772.
- Arany I & Safirstein RL (2003): Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol* **23**, 460-464.
- Aretz S, Stienen D, Uhlhaas S, Stolte M, Entius MM, Loff S, *et al.* (2007): High proportion of large genomic deletions and a genotype phenotype update in 80 unrelated families with juvenile polyposis syndrome. *J Med Genet* **44**, 702-709.
- Auersperg N, Maines-Bandiera SL, Dyck HG i Kruk PA (1994): Characterization of cultured human ovarian surface epithelial cells: phenotypic plasticity and premalignant changes. *Lab Invest* **71**, 510-518.

## B

- Bader M & Steller H (2009): Regulation of cell death by the ubiquitin-proteasome system. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 878-884.
- Banath JP, Macphail SH and Olive PL (2004): Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res* **64**, 7144-7149.
- Banks DP, Plescia J, Altieri DC, Chen J, Rosenberg SH, Zhang H i Ng SC (2000): Survivin does not inhibit caspase-3 activity. *Blood* **96**, 4002-4003.
- Banks DP, Plescia J, Altieri DC, Chen J, Rosenberg SH, Zhang H and Ng SC (2000): Survivin does not inhibit caspase-3 activity. *Blood* **96**, 4002-4003.
- Barak Y, Juven T, Haffner R and Oren M (1993): mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J* **12**, 461-468.
- Barbarotto E, Corallini F, Rimondi E, Fadda R, Mischiati C, Grill V, *et al.* (2008): Differential effects of chemotherapeutic drugs versus the MDM-2 antagonist nutlin-3 on cell cycle progression and induction of apoptosis in SKW6.4 lymphoblastoid B-cells. *J Cell Biochem* **104**, 595-605.

- Barbieri E, Mehta P, Chen Z, Zhang L, Slack A, Berg S and Shohet JM (2006): MDM2 inhibition sensitizes neuroblastoma to chemotherapy-induced apoptotic cell death. *Mol Cancer Ther* **5**, 2358-2365.
- Bast RC, Jr., Hennessy B and Mills GB (2009): The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer* **9**, 415-428.
- Bauer S, Muhlenberg T, Leahy M, Hoiczky M, Gauler T, Schuler M *et al.* (2010): Therapeutic potential of Mdm2 inhibition in malignant germ cell tumours. *Eur Urol* **57**, 679-687.
- Bex A, Luboldt H, Sudermann T, Rembrink K, Otto T and Rubben H (2000): Influence of linomide on local tumor growth and metastasis of the human hormone-resistant prostate cancer cell line PC3 in an orthotopic model. *Eur Urol* **37**, 628-633.
- Belyanskaya LL, Hopkins-Donaldson S, Kurtz S, Simoes-Wust AP, Yousefi S, Simon HU, *et al.* (2005): Cisplatin activates Akt in small cell lung cancer cells and attenuates apoptosis by survivin upregulation. *Int J Cancer* **117**, 755-763.
- Blagosklonny MV (2005): Carcinogenesis, cancer therapy and chemoprevention. *Cell Death Differ* **12**, 592-602.
- Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S and Pommier Y (2008): GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 957-967.
- Bookman MA, Greer BE and Ozols RF (2003): Optimal therapy of advanced ovarian cancer: carboplatin and paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel (GOG158) and an update on GOG0182-ICON5. *Int J Gynecol Cancer* **13 Suppl 2**, 149-155.
- Braithwaite AW, Royds JA and Jackson P (2005): The p53 story: layers of complexity. *Carcinogenesis* **26**, 1161-1169.
- Byun SJ, Choi KS, Park SH, Cho NW, Hyun Yoo C, Yun KJ, *et al.* (2007): Cartilage oligomeric matrix protein-angiopoietin-1 promotes revascularization through increased survivin expression in dermal endothelial cells of skin grafts in mice. *Am J Pathol* **171**, 1682-1690.

## C

- Cancer Research UK : <http://www.cancerresearchuk.org/>
- Cann KL & Hicks GG (2007): Regulation of the cellular DNA double-strand break response. *Biochem Cell Biol* **85**, 663-674.
- Cannistra SA (2004): Cancer of the ovary. *N Engl J Med* **351**, 2519-2529.
- Cao C, Shinohara ET, Subhawong TK, Geng L, Woon Kim K, Albert JM, *et al.* (2006): Radiosensitization of lung cancer by nutlin, an inhibitor of murine double minute 2. *Mol Cancer Ther* **5**, 411-417.
- Carter BZ, Mak DH, Schober WD, Dietrich MF, Pinilla C, Vassilev LT, *et al.* (2008): Triptolide sensitizes AML cells to TRAIL-induced apoptosis via decrease of XIAP and p53-mediated increase of DR5. *Blood* **111**, 3742-3750.
- Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C i Perez JM (2007): Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* **7**, 3-18.
- Chakravarti A, Noll E, Black PM, Finkelstein DF, Finkelstein DM, Dyson NJ and Loeffler JS (2002): Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. *J Clin Oncol* **20**, 1063-1068.
- Chakravarti A, Zhai GG, Zhang M, Malhotra R, Latham DE, Delaney MA, *et al.* (2004): Survivin enhances radiation resistance in primary human glioblastoma cells via caspase-independent mechanisms. *Oncogene* **23**, 7494-7506.
- Chari NS, Pinaire NL, Thorpe L, Medeiros LJ, Routbort MJ and McDonnell TJ (2009): The p53 tumor suppressor network in cancer and the therapeutic modulation of cell death. *Apoptosis* **14**, 336-347.
- Chen J, Marechal V and Levine AJ (1993): Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol* **13**, 4107-4114.
- Chen J, Wu X, Lin J and Levine AJ (1996): mdm-2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol* **16**, 2445-2452.
- Chene P (2003): Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 102-109.

- Cheng Q, Ling X, Haller A, Nakahara T, Yamanaka K, Kita A, *et al.* (2012): Suppression of survivin promoter activity by YM155 involves disruption of Sp1-DNA interaction in the survivin core promoter. *Int J Biochem Mol Biol* **3**, 179-197.
- Cheok CF, Kua N, Kaldis P and Lane DP (2010): Combination of nutlin-3 and VX-680 selectively targets p53 mutant cells with reversible effects on cells expressing wild-type p53. *Cell Death Differ* **17**, 1486-1500.
- Cheson BD, Bartlett NL, Vose JM, Lopez-Hernandez A, Seiz AL, Keating AT and Shamsili S (2012): A phase II study of the survivin suppressant YM155 in patients with refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer* **118**, 3128-3134.
- Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ and Green DR (2010): The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* **37**, 299-310.
- Cho KR & Shih Ie M (2009): Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol* **4**, 287-313.
- Chowdhury I, Tharakan B and Bhat GK (2008): Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **151**, 10-27.
- Chu G (1994): Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. *J Biol Chem* **269**, 787-790.
- Church DN & Talbot DC (2012): Survivin in solid tumors: rationale for development of inhibitors. *Curr Oncol Rep* **14**, 120-128.
- Clinical trials: <http://www.clinicaltrials.gov>
- Clingen PH, Wu JY, Miller J, Mistry N, Chin F, Wynne P, *et al.* (2008): Histone H2AX phosphorylation as a molecular pharmacological marker for DNA interstrand crosslink cancer chemotherapy. *Biochem Pharmacol* **76**, 19-27.
- Cohen C, Lohmann CM, Cotsonis G, Lawson D and Santoianni R (2003): Survivin expression in ovarian carcinoma: correlation with apoptotic markers and prognosis. *Mod Pathol* **16**, 574-583.
- Coll-Mulet L, Iglesias-Serret D, Santidrian AF, Cosialls AM, de Frias M, Castano E, *et al.* (2006): MDM2 antagonists activate p53 and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* **107**, 4109-4114.
- Conway EM, Zwerts F, Van Eygen V, DeVriese A, Nagai N, Luo W and Collen D (2003): Survivin-dependent angiogenesis in ischemic brain: molecular mechanisms of hypoxia-induced up-regulation. *Am J Pathol* **163**, 935-946.

- Corney DC, Flesken-Nikitin A, Choi J and Nikitin AY (2008): Role of p53 and Rb in ovarian cancer. *Adv Exp Med Biol* **622**, 99-117.
- Crook NE, Clem RJ and Miller LK (1993): An apoptosi-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* **67**, 2168-2174.
- Cuatrecasas M, Villanueva A, Matias-Guiu X and Prat J (1997): K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: a clinicopathologic and molecular study of 95 cases. *Cancer* **79**, 1581-1586.

## D

- Dabbs DJ & Geisinger KR (1988): Common epithelial ovarian tumors. Immunohistochemical intermediate filament profiles. *Cancer* **62**, 368-374.
- Damia G, Filiberti L, Vikhanskaya F, Carrassa L, Taya Y, D'Incalci M and Broggin M (2001): Cisplatinum and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation. *Neoplasia* **3**, 10-16.
- Dan HC, Jiang K, Coppola D, Hamilton A, Nicosia SV, Sebti SM and Cheng JQ (2004): Phosphatidylinositol-3-OH kinase/AKT and survivin pathways as critical targets for geranylgeranyltransferase I inhibitor-induced apoptosi. *Oncogene* **23**, 706-715.
- Danial NN & Korsmeyer SJ (2004): Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205-219.
- Daniel VC, Marchionni L, Hierman JS, Rhodes JT, Devereux WL, Rudin CM, *et al.* (2009): A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro. *Cancer Res* **69**, 3364-3373.
- Das M & Sahoo SK (2011): Epithelial cell adhesion molecule targeted nutlin-3a loaded immunonanoparticles for cancer therapy. *Acta Biomater* **7**, 355-369.
- Dasgupta P, Kinkade R, Joshi B, Decook C, Haura E and Chellappan S (2006): Nicotine inhibits apoptosi induced by chemotherapeutic drugs by up-regulating XIAP and survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6332-6337.

- Del Bello B, Valentini MA, Zunino F, Comporti M and Maellaro E (2001): Cleavage of Bcl-2 in oxidant- and cisplatin-induced apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene* **20**, 4591-4595.
- Demidenko ZN & Blagosklonny MV (2009): Quantifying pharmacologic suppression of cellular senescence: prevention of cellular hypertrophy versus preservation of proliferative potential. *Aging (Albany NY)* **1**, 1008-1016.
- Demidenko ZN, Korotchkina LG, Gudkov AV and Blagosklonny MV (2010): Paradoxical suppression of cellular senescence by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 9660-9664.
- De Silva IU, McHugh PJ, Clingen PH and Hartley JA (2000): Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **20**, 7980-7990.
- Deveraux QL & Reed JC (1999): IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**, 239-252.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, *et al.* (1995): A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363-9367.
- Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J and Altieri DC (2004a): Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest* **114**, 1117-1127.
- Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, Welsh K, *et al.* (2004b): An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem* **279**, 34087-34090.
- Dogliani C, Dei Tos AP, Laurino L, Iuzzolino P, Chiarelli C, Celio MR and Viale G (1996): Calretinin: a novel immunocytochemical marker for mesothelioma. *Am J Surg Pathol* **20**, 1037-1046.
- Drakos E, Atsaves V, Schlette E, Li J, Papanastasi I, Rassidakis GZ and Medeiros LJ (2009): The therapeutic potential of p53 reactivation by nutlin-3a in ALK+ anaplastic large cell lymphoma with wild-type or mutated p53. *Leukemia* **23**, 2290-2299.
- Duan Z, Bradner JE, Greenberg E, Levine R, Foster R, Mahoney J and Seiden MV (2006): SD-1029 inhibits signal transducer and activator of transcription 3 nuclear translocation. *Clin Cancer Res* **12**, 6844-6852.

- Dunfield LD, Shepherd TG and Nachtigal MW (2002): Primary culture and mRNA analysis of human ovarian cells. *Biol Proced Online* **4**, 55-61.
- Durinck S, Ho C, Wang NJ, Liao W, Jakkula LR, Collisson EA, *et al.* (2011): Temporal dissection of tumorigenesis in primary cancers. *Cancer Discov* **1**, 137-143.

## E

- Eckelman BP & Salvesen GS (2006): The human anti-apoptotic proteins ciAP1 and ciAP2 bind but do not inhibit Caspases. *J Biol Chem* **281**, 3254-3260.
- Eldering E, Spek CA, Aberson HL, Grummels A, Derks IA, de Vos AF, *et al.* (2003): Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways. *Nucleic Acids Res* **31**, e153.
- Endo S, Yamato K, Hirai S, Moriwaki T, Fukuda K, Suzuki H, *et al.* (2011): Potent in vitro and in vivo antitumor effects of MDM2 inhibitor nutlin-3 in gastric cancer cells. *Cancer Sci* **102**, 605-613.
- Esterre P, Melin M, Serrar M and Grimaud JA (1992): New specific markers of human and mouse fibroblasts. *Cell Mol Biol* **38**, 297-301.
- Esteve PO, Chin HG and Pradhan S (2007): Molecular mechanisms of transactivation and doxorubicin-mediated repression of survivin gene in cancer cells. *J Biol Chem* **282**, 2615-2625.
- Efeyan A, Ortega-Molina A, Velasco-Miguel S, Herranz D, Vassilev LT and Serrano M (2007): Induction of p53-dependent senescence by the MDM2 antagonist nutlin-3a in mouse cells of fibroblast origin. *Cancer Res* **67**, 7350-7357.

## F

- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL and Henson PM (1992): Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **148**, 2207-2216.

- Feldman DR, Bosl GJ, Sheinfeld J and Motzer RJ (2008): Medical treatment of advanced testicular cancer. *JAMA* **299**, 672-684.
- Ferte C, Andre F and Soria JC (2010): Molecular circuits of solid tumors: prognostic and predictive tools for bedside use. *Nat Rev Clin Oncol* **7**, 367-380.
- Fidler IJ (1990): Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res* **50**, 6130-6138.
- Fidler IJ (1991): Orthotopic implantation of human colon carcinomas into nude mice provides a valuable model for the biology and therapy of metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **10**, 229-243.
- Flinterman M, Guelen L, Ezzati-Nik S, Killick R, Melino G, Tominaga K, *et al.* (2005): E1A activates transcription of p73 and Noxa to induce apoptosis. *J Biol Chem* **280**, 5945-5959.
- Fortugno P, Beltrami E, Plescia J, Fontana J, Pradhan D, Marchisio PC, *et al.* (2003): Regulation of survivin function by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13791-13796.
- Fu X & Hoffman RM (1993): Human ovarian carcinoma metastatic models constructed in nude mice by orthotopic transplantation of histologically-intact patient specimens. *Anticancer Res* **13**, 283-286.
- Fuertes MA, Alonso C and Perez JM (2003): Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev* **103**, 645-662.
- Fulda S, Los M, Friesen C and Debatin KM (1998): Chemosensitivity of solid tumor cells in vitro is related to activation of the CD95 system. *Int J Cancer* **76**, 105-114.
- Fulda S & Vucic D (2012): Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 109-124.

## G

- Gadducci A, Cosio S, Muraca S and Genazzani AR (2002): Molecular mechanisms of apoptosis and chemosensitivity to platinum and paclitaxel in ovarian cancer: biological data and clinical implications. *Eur J Gynaecol Oncol* **23**, 390-396.



- Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, *et al.* (2012): Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene* **31**, 1869-1883.
- Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C and Kroemer G (2006): Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* **13**, 1423-1433.
- Gemignani F, Moreno V, Landi S, Moullan N, Chabrier A, Gutierrez-Enriquez S, *et al.* (2004): A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene* **23**, 1954-1956.
- Giaccone G, Zatloukal P, Roubec J, Floor K, Musil J, Kuta M, *et al.* (2009): Multicenter phase II trial of YM155, a small-molecule suppressor of survivin, in patients with advanced, refractory, non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **27**, 4481-4486.
- Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, Frost M, Bobak J, Lehner R and Shroyer KR (2001): Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. *Hum Pathol* **32**, 119-125.
- Gillet LC & Scharer OD (2006): Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev* **106**, 253-276.
- Gimenez-Bonafe P, Tortosa A and Perez-Tomas R (2009): Overcoming drug resistance by enhancing apoptosis of tumor cells. *Curr Cancer Drug Targets* **9**, 320-340.
- Glaros TG, Stockwin LH, Mullendore ME, Smith B, Morrison BL and Newton DL (2012): The "survivin suppressants" NSC 80467 and YM155 induce a DNA damage response. *Cancer Chemother Pharmacol*.
- Globocan: <http://globocan.iarc.fr/>
- Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG, Jr., *et al.* (1999): The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* **399**, 806-809.
- Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C and Perez JM (2001): Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* **59**, 657-663.
- Green DR & Evan GI (2002): A matter of life and death. *Cancer Cell* **1**, 19-30.
- Grabowski P, Kuhnel T, Muhr-Wilkenshoff F, Heine B, Stein H, Hopfner M, Germer CT and Scherubl H (2003): Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* **88**, 115-119.

Gu L, Zhu N, Findley HW and Zhou M (2008): MDM2 antagonist nutlin-3 is a potent inducer of apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia cells with wild-type p53 and overexpression of MDM2. *Leukemia* **22**, 730-739.

Guha M, Plescia J, Leav I, Li J, Languino LR and Altieri DC (2009): Endogenous tumor suppression mediated by PTEN involves survivin gene silencing. *Cancer Res* **69**, 4954-4958.

## H

Haldar S, Basu A and Croce CM (1997): Bcl2 is the guardian of microtubule integrity. *Cancer Res* **57**, 229-233.

Harris SL & Levine AJ (2005): The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* **24**, 2899-2908.

Hayflick L & Moorhead PS (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**, 585-621.

He Q, Liang CH and Lippard SJ (2000): Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5768-5772.

Hegde R, Srinivasula SM, Datta P, Madesh M, Wassell R, Zhang Z, *et al.* (2003): The polypeptide chain-releasing factor GSPT1/eRF3 is proteolytically processed into an IAP-binding protein. *J Biol Chem* **278**, 38699-38706.

Herceg Z & Wang ZQ (2001): Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutat Res* **477**, 97-110.

Hiorns LR, Bradshaw TD, Skelton LA, Yu Q, Kelland LR and Leyland-Jones B (2004): Variation in RNA expression and genomic DNA content acquired during cell culture. *Br J Cancer* **90**, 476-482.

Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, *et al.* (2000): DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* **287**, 1824-1827.

- Hoffman RM (1999): Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Invest New Drugs* **17**, 343-359.
- Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J and Murphy M (2002): Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* **277**, 3247-3257.
- Holmes D (2012): Cancer drug's survivin suppression called into question. *Nat Med* **18**, 842-843
- Holschneider CH & Berek JS (2000): Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol* **19**, 3-10.
- Holzer AK, Manorek GH and Howell SB (2006): Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol Pharmacol* **70**, 1390-1394.
- Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE and Swanson PE (2009): Cell death. *N Engl J Med* **361**, 1570-1583.
- Hu W & Kavanagh JJ (2003): Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *Lancet Oncol* **4**, 721-729.
- Huang B, Deo D, Xia M and Vassilev LT (2009): Pharmacologic p53 activation blocks cell cycle progression but fails to induce senescence in epithelial cancer cells. *Mol Cancer Res* **7**, 1497-1509.
- Huang Y, Jin H, Liu Y, Zhou J, Ding J, Cheng KW, Yu Y & Feng Y (2011): FSH inhibits ovarian cancer cell apoptosis by up-regulating survivin and down-regulating PDCD6 and DR5. *Endocr Relat Cancer* **18**, 13-26.

**I**

- IARC: "Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs". World Health Organization Classification of Tumours. Edited by Fattaneh A. Tavassoéli and Peter Devilee, 2003.
- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, *et al.* (1997): Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**, 190-195.

- Ismail RS, Baldwin RL, Fang J, Browning D, Karlan BY, Gasson JC and Chang DD (2000): Differential gene expression between normal and tumor-derived ovarian epithelial cells. *Cancer Res* **60**, 6744-6749.
- Ishida S, Lee J, Thiele DJ and Herskowitz I (2002): Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14298-14302.
- Ishida S, McCormick F, Smith-McCune K and Hanahan D (2010): Enhancing tumor-specific uptake of the anticancer drug cisplatin with a copper chelator. *Cancer Cell* **17**, 574-583.
- Iurlaro M, Demontis F, Corada M, Zanetta L, Drake C, Gariboldi M, *et al.* (2004): VE-cadherin expression and clustering maintain low levels of survivin in endothelial cells. *Am J Pathol* **165**, 181-189.
- Iwasa T, Okamoto I, Suzuki M, Nakahara T, Yamanaka K, Hatashita E, *et al.* (2008): Radiosensitizing effect of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* **14**, 6496-6504.
- Iwasa T, Okamoto I, Takezawa K, Yamanaka K, Nakahara T, Kita A, *et al.* (2010): Marked anti-tumour activity of the combination of YM155, a novel survivin suppressant, and platinum-based drugs. *Br J Cancer* **103**, 36-42.

## J

- Jacob NK, Cooley JV, Shirai K and Chakravarti A (2012): Survivin splice variants are not essential for mitotic progression or inhibition of apoptosis induced by doxorubicin and radiation. *Oncotargets Ther* **5**, 7-20.
- Janson V, Johansson A and Grankvist K (2010): Resistance to caspase-8 and -9 fragments in a malignant pleural mesothelioma cell line with acquired cisplatin-resistance. *Cell Death Dis* **1**, e78.
- Jiang G, Ren B, Xu L, Song S, Zhu C and Ye F (2009): Survivin may enhance DNA double-strand break repair capability by up-regulating Ku70 in human KB cells. *Anticancer Res* **29**, 223-228.

- Jiang M, Pabla N, Murphy RF, Yang T, Yin XM, Degenhardt K, White E and Dong Z (2007): Nutlin-3 protects kidney cells during cisplatin therapy by suppressing Bax/Bak activation. *J Biol Chem* **282**, 2636-2645.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, *et al.* (2001): Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**, 549-554.
- Jung Y & Lippard SJ (2007): Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. *Chem Rev* **107**, 1387-1407.

## K

- Kalamanathan S, Bates V, Lord R and Green JA (2011): The mutational profile of sporadic epithelial ovarian carcinoma. *Anticancer Res* **31**, 2661-2668.
- Kanwar RK, Cheung CH, Chang JY and Kanwar JR (2010): Recent advances in anti-survivin treatments for cancer. *Curr Med Chem* **17**, 1509-1515.
- Kanwar JR, Shen WP, Kanwar RK, Berg RW and Krissansen GW (2001): Effects of survivin antagonists on growth of established tumors and B7-1 immunogene therapy. *J Natl Cancer Inst* **93**, 1541-1552.
- Karczmarek-Borowska B, Filip A, Wojcierowski J, Smolen A, Pilecka I and Jablonka A (2005): Survivin antiapoptotic gene expression as a prognostic factor in non-small cell lung cancer: in situ hybridization study. *Folia Histochem Cytobiol* **43**, 237-242.
- Karst AM & Drapkin R (2010): Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution. *J Oncol* **2010**, 932371.
- Katano K, Kondo A, Safaei R, Holzer A, Samimi G, Mishima M, Kuo YM, Rochdi M and Howell SB (2002): Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper. *Cancer Res* **62**, 6559-6565.
- Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, Shinoda N, Sato A, Toyama T, *et al.* (2001): Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int J Cancer* **95**, 92-95.

- Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T and Tanigawa N (1998): Inhibition of apoptosi by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* **58**, 5071-5074.
- Kelland L (2007): The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **7**, 573-584.
- Kellett A, Howe O, O'Connor M, McCann M, Creaven BS, McClean S, *et al.* (2012): Radical-induced DNA damage by cytotoxic square-planar copper(II) complexes incorporating o-phthalate and 1,10-phenanthroline or 2,2'-dipyridyl. *Free Radic Biol Med* **53**, 564-576.
- Kigawa J, Sato S, Shimada M, Takahashi M, Itamochi H, Kanamori Y and Terakawa N (2001): p53 gene status and chemosensitivity in ovarian cancer. *Hum Cell* **14**, 165-171.
- Khanna KK, Lavin MF, Jackson SP and Mulhern TD (2001): ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ* **8**, 1052-1065.
- Killion JJ, Radinsky R and Fidler IJ (1998): Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev* **17**, 279-284.
- Kita A, Mitsuoka K, Kaneko N, Nakata M, Miyoshi S, Jitsuoka M, *et al.* (2012): Sepantronium Bromide (YM155) Enhances Response of Human B-cell non-Hodgkin Lymphoma to Rituximab. *J Pharmacol Exp Ther.*
- Klein C & Vassilev LT (2004): Targeting the p53-MDM2 interaction to treat cancer. *Br J Cancer* **91**, 1415-1419.
- Kobel M, Kalloger SE, Huntsman DG, Santos JL, Swenerton KD, Seidman JD and Gilks CB (2010): Differences in tumor type in low-stage versus high-stage ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol* **29**, 203-211.
- Koberle B, Tomicic MT, Usanova S and Kaina B (2010): Cisplatin resistance: preclinical findings and clinical implications. *Biochim Biophys Acta* **1806**, 172-182.
- Kojima K, Shimanuki M, Shikami M, Samudio IJ, Ruvolo V, Corn P, *et al.* (2008): The dual PI3 kinase/mTOR inhibitor PI-103 prevents p53 induction by Mdm2 inhibition but enhances p53-mediated mitochondrial apoptosi in p53 wild-type AML. *Leukemia* **22**, 1728-1736.

- Koonings PP, Campbell K, Mishell DR, Jr. and Grimes DA (1989): Relative frequency of primary ovarian neoplasms: a 10-year review. *Obstet Gynecol* **74**, 921-926.
- Korotchkina LG, Demidenko ZN, Gudkov AV and Blagosklonny MV (2009): Cellular quiescence caused by the Mdm2 inhibitor nutlin-3A. *Cell Cycle* **8**, 3777-3781.
- Korotchkina LG, Leontieva OV, Bukreeva EI, Demidenko ZN, Gudkov AV and Blagosklonny MV (2010): The choice between p53-induced senescence and quiescence is determined in part by the mTOR pathway. *Aging (Albany NY)* **2**, 344-352.
- Koster R, Timmer-Bosscha H, Bischoff R, Gietema JA and de Jong S (2011): Disruption of the MDM2-p53 interaction strongly potentiates p53-dependent apoptosis in cisplatin-resistant human testicular carcinoma cells via the Fas/FasL pathway. *Cell Death Dis* **2**, e148.
- Kruse JP & Gu W (2009): Modes of p53 regulation. *Cell* **137**, 609-622.
- Kubbutat MH, Jones SN and Vousden KH (1997): Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299-303.
- Kubota T (1994): Metastatic models of human cancer xenografted in the nude mouse: the importance of orthotopic transplantation. *J Cell Biochem* **56**, 4-8.
- Kumamoto K, Spillare EA, Fujita K, Horikawa I, Yamashita T, Appella E, *et al.* (2008): Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate mir-34a, mir-34b, and mir-34c expression, and induce senescence. *Cancer Res* **68**, 3193-3203.
- Kumar B, Yadav A, Lang JC, Cipolla M, Schmitt AC, Arradaza N, *et al.* (2012): YM155 reverses cisplatin resistance in head and neck cancer by decreasing cytoplasmic survivin levels. *Mol Cancer Ther.*
- Kuo KT, Mao TL, Jones S, Veras E, Ayhan A, Wang TL, *et al.* (2009): Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol* **174**, 1597-1601.
- Kuo TH, Kubota T, Watanabe M, Furukawa T, Kase S, Tanino H, *et al.* (1993): Site-specific chemosensitivity of human small-cell lung carcinoma growing orthotopically compared to subcutaneously in SCID mice: the importance of

orthotopic models to obtain relevant drug evaluation data. *Anticancer Res* **13**, 627-630.

Kurman RJ & Shih le M (2010): The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol* **34**, 433-443.

## L

Lane DP, Brown CJ, Verma C and Cheek CF (2011): New insights into p53 based therapy. *Discov Med* **12**, 107-117.

Langdon S.P. "Methods in Molecular Medicine, vol.88: Cancer Cell Cultures: Methods and Protocols". Edited by S.P Langdon. Humana Press Inc., Totowa, NJ. (2003).

Lalwani N, Prasad SR, Vikram R, Shanbhogue AK, Huettner PC and Fasih N (2011): Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment. *Radiographics* **31**, 625-646.

Lau LM, Nugent JK, Zhao X & Irwin MS (2008): HDM2 antagonist Nutlin-3 disrupts p73-HDM2 binding and enhances p73 function. *Oncogene* **27**, 997-1003.

Leader M, Patel J, Makin C and Henry K (1986): An analysis of the sensitivity and specificity of the cytokeratin marker CAM 5.2 for epithelial tumours. Results of a study of 203 sarcomas, 50 carcinomas and 28 malignant melanomas. *Histopathology* **10**, 1315-1324.

Lechler P, Wu X, Bernhardt W, Campean V, Gastiger S, Hackenbeck T, *et al.* (2007): The tumor gene survivin is highly expressed in adult renal tubular cells: implications for a pathophysiological role in the kidney. *Am J Pathol* **171**, 1483-1498.

Ledgerwood EC & Morison IM (2009): Targeting the apoptosome for cancer therapy. *Clin Cancer Res* **15**, 420-424.

Lehmann BD, McCubrey JA, Jefferson HS, Paine MS, Chappell WH and Terrian DM (2007): A dominant role for p53-dependent cellular senescence in radiosensitization of human prostate cancer cells. *Cell Cycle* **6**, 595-605.

Levine AJ, Hu W and Feng Z (2006): The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* **13**, 1027-1036.



- Lewis KD, Samlowski W, Ward J, Catlett J, Cranmer L, Kirkwood J, *et al.* (2011): A multi-center phase II evaluation of the small molecule survivin suppressor YM155 in patients with unresectable stage III or IV melanoma. *Invest New Drugs* **29**, 161-166.
- Li F (2005): Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *Br J Cancer* **92**, 212-216.
- Li F & Altieri DC (1999): Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *Biochem J* **344 Pt 2**, 305-311.
- Li F & Brattain MG (2006): Role of the Survivin gene in pathophysiology. *Am J Pathol* **169**, 1-11.
- Li F & Ling X (2006): Survivin study: an update of "what is the next wave"? *J Cell Physiol* **208**, 476-486.
- Liang W, Zhang WJ, Gao QM, Qin W, Lu HN, Huang BB, Xiu B and Liang AB (2012): Preliminary study of biological mechanism and apoptotic effect induced by YM155 in SUDHL-4 cell line]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **92**, 700-704.
- Liedert B, Materna V, Schadendorf D, Thomale J and Lage H (2003): Overexpression of cMOAT (MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G2-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin. *J Invest Dermatol* **121**, 172-176.
- Liguang Z, Peishu L, Hongluan M, Hong J, Rong W, Wachtel MS and Frezza EE (2007): Survivin expression in ovarian cancer. *Exp Oncol* **29**, 121-125.
- Liston P, Fong WG and Korneluk RG (2003): The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* **22**, 8568-8580.
- Liu JL, Wang Y, Jiang J, Kong R, Yang YM, Ji HF and Shi YZ (2010): Inhibition of survivin expression and mechanisms of reversing drug-resistance of human lung adenocarcinoma cells by siRNA. *Chin Med J (Engl)* **123**, 2901-2907.
- Liu T, Brouha B & Grossman D (2004): Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells. *Oncogene* **23**, 39-48.
- Liu T, Peng H, Zhang M, Deng Y and Wu Z (2010): Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of

- laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. *Eur J Pharmacol* **641**, 15-22.
- Logan IR, McNeill HV, Cook S, Lu X, Lunec J and Robson CN (2007): Analysis of the MDM2 antagonist nutlin-3 in human prostate cancer cells. *Prostate* **67**, 900-906.
- Lomonosova E & Chinnadurai G (2008): BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* **27 Suppl 1**, S2-19.
- Long J, Parkin B, Ouillet P, Bixby D, Shedden K, Erba H, Wang S and Malek SN (2010): Multiple distinct molecular mechanisms influence sensitivity and resistance to MDM2 inhibitors in adult acute myelogenous leukemia. *Blood* **116**, 71-80.
- Long JS & Ryan KM (2010): p53 and senescence: a little goes a long way. *Cell Cycle* **9**, 4050-4051.
- Lu CD, Altieri DC and Tanigawa N (1998): Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* **58**, 1808-1812.
- Luanpitpong S, Nimmannit U, Chanvorachote P, Leonard SS, Pongrakhananon V, Wang L and Rojanasakul Y (2011): Hydroxyl radical mediates cisplatin-induced apoptosis in human hair follicle dermal papilla cells and keratinocytes through Bcl-2-dependent mechanism. *Apoptosis*.

## M

- Makin CA, Bobrow LG and Bodmer WF (1984): Monoclonal antibody to cytokeratin for use in routine histopathology. *J Clin Pathol* **37**, 975-983.
- Manfe V, Biskup E, Johansen P, Kamstrup MR, Krejsgaard TF, Morling N, *et al.* (2012): MDM2 Inhibitor Nutlin-3a Induces Apoptosis and Senescence in Cutaneous T-Cell Lymphoma: Role of p53. *J Invest Dermatol* **132**, 1487-1496.
- Mansouri A, Ridgway LD, Korapati AL, Zhang Q, Tian L, Wang Y, *et al.* (2003): Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* **278**, 19245-19256.

- Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I and Reed JC (2003): HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J* **22**, 2729-2740.
- Masters JR & Koberle B (2003): Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat Rev Cancer* **3**, 517-525.
- Matei D, Graeber TG, Baldwin RL, Karlan BY, Rao J and Chang DD (2002): Gene expression in epithelial ovarian carcinoma. *Oncogene* **21**, 6289-6298.
- Mayr D, Kanitz V, Anderegg B, Luthardt B, Engel J, Lohrs U, Amann G and Diebold J (2006): Analysis of gene amplification and prognostic markers in ovarian cancer using comparative genomic hybridization for microarrays and immunohistochemical analysis for tissue microarrays. *Am J Clin Pathol* **126**, 101-109.
- McCluggage WG (2002): Recent advances in immunohistochemistry in gynaecological pathology. *Histopathology* **40**, 309-326.
- McCluggage WG (2011): Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. *Pathology* **43**, 420-432.
- McCormack E, Haaland I, Venas G, Forthun RB, Huseby S, Gausdal G, *et al.* (2011): Synergistic induction of p53 mediated apoptosis by valproic acid and nutlin-3 in acute myeloid leukemia. *Leukemia*.
- McWhinney SR, Goldberg RM and McLeod HL (2009): Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Mol Cancer Ther* **8**, 10-16.
- Meek DW (2004): The p53 response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1049-1056.
- Meijer C, Mulder NH, Timmer-Bosscha H, Sluiter WJ, Meersma GJ and de Vries EG (1992): Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds. *Cancer Res* **52**, 6885-6889.
- Melino G, Bernassola F, Ranalli M, Yee K, Zong WX, Corazzari M, *et al.* (2004): p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem* **279**, 8076-8083.
- Michaelis M, Rothweiler F, Klassert D, von Deimling A, Weber K, Fehse B, *et al.* (2009): Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by the murine double minute 2 antagonist nutlin-3. *Cancer Res* **69**, 416-421.

- Michils G, Tejpar S, Thoelen R, van Cutsem E, Vermeesch JR, Fryns JP, *et al.* (2005): Large deletions of the APC gene in 15% of mutation-negative patients with classical polyposis (FAP): a Belgian study. *Hum Mutat* **25**, 125-134.
- Miettinen M, Lehto VP and Virtanen I (1983): Expression of intermediate filaments in normal ovaries and ovarian epithelial, sex cord-stromal, and germinal tumors. *Int J Gynecol Pathol* **2**, 64-71.
- Minematsu T, Felder L, Oppeneer T, Sakazume M, Oikawa K, Hashimoto T, *et al.* (2008): Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometric assay suitable for quantitation of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in dog plasma. *Biomed Chromatogr* **22**, 763-769.
- Minematsu T, Iwai M, Umehara K, Usui T and Kamimura H (2010): Characterization of human organic cation transporter 1 (OCT1/SLC22A1)- and OCT2 (SLC22A2)-mediated transport of 1-(2-methoxyethyl)-2-methyl-4,9-dioxo-3-(pyrazin-2-ylmethyl)-4,9-dihydro-1H-naphtho[2,3-d]imidazolium bromide (YM155 monobromide), a novel small molecule survivin suppressant. *Drug Metab Dispos* **38**, 1-4.
- Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, *et al.* (2002): Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* **21**, 2613-2622.
- Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST and Giles FJ (2008): Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* **14**, 5000-5005.
- Moll R, Divo M and Langbein L (2008): The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* **129**, 705-733.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B and Krepler R (1982): The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**, 11-24.
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D and Levine AJ (1992): The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**, 1237-1245.

Montague JW & Cidlowski JA (1996): Cellular catabolism in apoptosis: DNA degradation and endonuclease activation. *Experientia* **52**, 957-962.

Monzo M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sanchez JJ, Maestre J, *et al.* (1999): A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* **17**, 2100-2104.

Morasca L, Erba E, Vaghi M, Ghelardoni C, Mangioni C, Sessa C, *et al.* (1983): Clinical correlates of in vitro drug sensitivities of ovarian cancer cells. *Br J Cancer* **48**, 61-68.

MultALin : <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

## N

Nagatani G, Nomoto M, Takano H, Ise T, Kato K, Imamura T, *et al.* (2001): Transcriptional activation of the human HMG1 gene in cisplatin-resistant human cancer cells. *Cancer Res* **61**, 1592-1597.

Nakahara T, Takeuchi M, Kinoyama I, Minematsu T, Shirasuna K, Matsuhisa A, *et al.* (2007): YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. *Cancer Res* **67**, 8014-8021

Nakahara T, Kita A, Yamanaka K, Mori M, Amino N, Takeuchi M, *et al.* (2011a): Broad spectrum and potent antitumor activities of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in a wide variety of human cancer cell lines and xenograft models. *Cancer Sci* **102**, 614-621.

Nakahara T, Yamanaka K, Hatakeyama S, Kita A, Takeuchi M, Kinoyama I, *et al.* (2011b): YM155, a novel survivin suppressant, enhances taxane-induced apoptosis and tumor regression in a human Calu 6 lung cancer xenograft model. *Anticancer Drugs* **22**, 454-462.

Nakamura M, Tsuji N, Asanuma K, Kobayashi D, Yagihashi A, Hirata K, *et al.* (2004): Survivin as a predictor of cis-diamminedichloroplatinum sensitivity in gastric cancer patients. *Cancer Sci* **95**, 44-51.

- Nakamura N, Yamauchi T, Hiramoto M, Yuri M, Naito M, Takeuchi M, *et al.* (2012): ILF3/NF110 is a target of YM155, a suppressant of survivin. *Mol Cell Proteomics*.
- Nasr MR & El-Zammar O (2008): Comparison of pHH3, Ki-67, and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* **30**, 117-122.
- Nomura T, Yamasaki M, Nomura Y and Mimata H (2005): Expression of the inhibitors of apoptosi proteins in cisplatin-resistant prostate cancer cells. *Oncol Rep* **14**, 993-997.
- Nucci MD. "Gynecologic Pathology: A Volume in Foundations in Diagnostic Pathology" Series editor: John R. Goldblum. Churchill Livingstone Elsevier (2009).

## O

- O'Connor DS, Grossman D, Plescia J, Li F, Zhang H, Villa A *et al.* (2000): Regulation of apoptosi at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13103-13107.
- Ohnstad HO, Paulsen EB, Noordhuis P, Berg M, Lothe RA, Vassilev LT and Myklebost O (2011): MDM2 antagonist Nutlin-3a potentiates antitumour activity of cytotoxic drugs in sarcoma cell lines. *BMC Cancer* **11**, 211:211-211.
- Olsson A, Manzl C, Strasser A and Villunger A (2007): How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression? *Cell Death Differ* **14**, 1561-1575.
- OncoGuia de Ovario: OG01/2004 Noviembre 2004. Guías de Práctica Clínica en Cáncer en Cataluña.

## P

P53 Knowledgebase: <http://p53.bii.a-star.edu.sg/aboutp53/index.php>

- Palazzo JP, Monzon F, Burke M, Hyslop T, Dunton C, Barusevicius A, Capuzzi D and Kovatich AJ (2000): Overexpression of p21WAF1/CIP1 and MDM2 characterizes serous borderline ovarian tumors. *Hum Pathol* **31**, 698-704.
- Pavlyukov MS, Antipova NV, Balashova MV, Vinogradova TV, Kopantzev EP and Shakhparonov MI (2011): Survivin monomer plays an essential role in apoptosis regulation. *J Biol Chem* **286**, 23296-23307.
- Peirce SK & Findley HW (2009): The MDM2 antagonist nutlin-3 sensitizes p53-null neuroblastoma cells to doxorubicin via E2F1 and TAp73. *Int J Oncol* **34**, 1395-1402.
- Pennati M, Colella G, Folini M, Citti L, Daidone MG and Zaffaroni N (2002): Ribozyme-mediated attenuation of survivin expression sensitizes human melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *J Clin Invest* **109**, 285-286.
- Pennati M, Campbell AJ, Curto M, Binda M, Cheng Y, Wang LZ, *et al.* (2005): Potentiation of paclitaxel-induced apoptosis by the novel cyclin-dependent kinase inhibitor NU6140: a possible role for survivin down-regulation. *Mol Cancer Ther* **4**, 1328-1337.
- Pennati M, Folini M and Zaffaroni N (2008): Targeting survivin in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* **12**, 463-476.
- Pishas KI, Al-Ejeh F, Zinonos I, Kumar R, Evdokiou A, Brown MP, *et al.* (2011): Nutlin-3a is a potential therapeutic for ewing sarcoma. *Clin Cancer Res* **17**, 494-504.
- Pop C & Salvesen GS (2009): Human Caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* **284**, 21777-21781.
- Pothuri B, Leitao MM, Levine DA, Viale A, Olshen AB, Arroyo C, *et al.* (2010): Genetic analysis of the early natural history of epithelial ovarian carcinoma. *PLoS One* **5**, e10358.
- Powell CB, Fung P, Jackson J, Dall'Era J, Lewkowicz D, Cohen I and Smith-McCune K (2003): Aqueous extract of herba *Scutellaria barbatae*, a chinese herb used for ovarian cancer, induces apoptosis of ovarian cancer cell lines. *Gynecol Oncol* **91**, 332-340.
- Poyurovsky MV & Prives C (2010): P53 and aging: A fresh look at an old paradigm. *Aging (Albany NY)* **2**, 380-382.

Prat J, Ribe A and Gallardo A (2005): Hereditary ovarian cancer. *Hum Pathol* **36**, 861-870.

## R

Reichert S, Rodel C, Mirsch J, Harter PN, Tomicic MT, Mittelbronn M, Kaina B and Rodel F (2011): Survivin inhibition and DNA double-strand break repair: a molecular mechanism to overcome radioresistance in glioblastoma. *Radiother Oncol* **101**, 51-58.

Rodel F, Hoffmann J, Distel L, Herrmann M, Noisternig T, Papadopoulos T, *et al.* (2005): Survivin as a radioresistance factor, and prognostic and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer. *Cancer Res* **65**, 4881-4887.

Rodenburg RJ, Raats JM, Pruijn GJ and van Venrooij WJ (2000): Cell death: a trigger of autoimmunity? *Bioessays* **22**, 627-636.

Roett MA & Evans P (2009): Ovarian cancer: an overview. *Am Fam Physician* **80**, 609-616.

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS and Bonner WM (1998): DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**, 5858-5868.

Roh JL, Kang SK, Minn I, Califano JA, Sidransky D and Koch WM (2011): p53-Reactivating small molecules induce apoptosis and enhance chemotherapeutic cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **47**, 8-15.

Ronnov-Jessen L, Celis JE, Van Deurs B and Petersen OW (1992): A fibroblast-associated antigen: characterization in fibroblasts and immunoreactivity in smooth muscle differentiated stromal cells. *J Histochem Cytochem* **40**, 475-486.

Roos WP & Kaina B (2012): DNA damage-induced apoptosis: From specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett.*

Rouette A, Parent S, Girouard J, Leblanc V and Asselin E (2011): Cisplatin increases B-cell lymphoma 2 expression via activation of protein kinase C and AKT2 in endometrial cancer cells. *Int J Cancer.*



Ryan BM, O'Donovan N and Duffy MJ (2009): Survivin: a new target for anti-cancer therapy. *Cancer Treat Rev* **35**, 553-562.

## S

Safaei R, Holzer AK, Katano K, Samimi G and Howell SB (2004): The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs. *J Inorg Biochem* **98**, 1607-1613.

Safaei R & Howell SB (2005): Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs. *Crit Rev Oncol Hematol* **53**, 13-23.

Salvesen GS & Duckett CS (2002): IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 401-410.

Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K and Linn S (2004): Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* **73**, 39-85.

Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, Davies CL, Markham AF and Guillou PJ (2002): Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* **86**, 886-892.

Satoh T, Okamoto I, Miyazaki M, Morinaga R, Tsuya A, Hasegawa Y, *et al.* (2009): Phase I study of YM155, a novel survivin suppressant, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* **15**, 3872-3880.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F and Pals G (2002): Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* **30**, e57.

Secchiero P, Zerbinati C, di Iasio MG, Melloni E, Tiribelli M, Grill V and Zauli G (2007): Synergistic cytotoxic activity of recombinant TRAIL plus the non-genotoxic activator of the p53 pathway nutlin-3 in acute myeloid leukemia cells. *Curr Drug Metab* **8**, 395-403.

Secchiero P, Bosco R, Celeghini C and Zauli G (2011): Recent advances in the therapeutic perspectives of Nutlin-3. *Curr Pharm Des* **17**, 569-577.

S.E.G.O (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia): <http://www.sego.es>

- Sengupta S & Harris CC (2005): p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 44-55.
- Serrano M (2010): Shifting senescence into quiescence by turning up p53. *Cell Cycle* **9**, 4256-4257.
- Shachar S, Ziv O, Avkin S, Adar S, Wittschieben J, Reissner T, *et al.* (2009): Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals. *EMBO J* **28**, 383-393.
- Shangary S & Wang S (2008): Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy. *Clin Cancer Res* **14**, 5318-5324.
- Shen H & Maki CG (2011): Pharmacologic activation of p53 by small-molecule MDM2 antagonists. *Curr Pharm Des* **17**, 560-568.
- Shepherd TG, Theriault BL, Campbell EJ and Nachtigal MW (2006): Primary culture of ovarian surface epithelial cells and ascites-derived ovarian cancer cells from patients. *Nat Protoc* **1**, 2643-2649.
- Shih Ie M & Kurman RJ (2005): Molecular pathogenesis of ovarian borderline tumors: new insights and old challenges. *Clin Cancer Res* **11**, 7273-7279.
- Shiloh Y & Kastan MB (2001): ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv Cancer Res* **83**, 209-254.
- Shu KX, Li B and Wu LX (2007): The p53 network: p53 and its downstream genes. *Colloids Surf B Biointerfaces* **55**, 10-18.
- Siddik ZH (2003): Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**, 7265-7279.
- Siegel R, Naishadham D and Jemal A (2012): Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* **62**, 10-29.
- Singer KH, Scarce RM, Tuck DT, Whichard LP, Denning SM and Haynes BF (1989): Removal of fibroblasts from human epithelial cell cultures with use of a complement fixing monoclonal antibody reactive with human fibroblasts and monocytes/macrophages. *J Invest Dermatol* **92**, 166-170.
- Smedts F, Ramaekers F, Robben H, Pruszczynski M, van Muijen G, Lane B, *et al.* (1990): Changing patterns of keratin expression during progression of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol* **136**, 657-668.

- Spurgers KB, Chari NS, Bohnenstiehl NL and McDonnell TJ (2006): Molecular mediators of cell death in multistep carcinogenesis: a path to targeted therapy. *Cell Death Differ* **13**, 1360-1370.
- Stakleff KD & Von Gruenigen VE (2003): Rodent models for ovarian cancer research. *Int J Gynecol Cancer* **13**, 405-412.
- Stephenson RA, Dinney CP, Gohji K, Ordonez NG, Killion JJ and Fidler IJ (1992): Metastatic model for human prostate cancer using orthotopic implantation in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **84**, 951-957.
- Sullivan A, Syed N, Gasco M, Bergamaschi D, Trigiante G, Attard M, *et al.* (2004): Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene* **23**, 3328-3337.
- Surowiak P, Materna V, Maciejczyk A, Pudelko M, Markwitz E, Spaczynski M, *et al.* (2007): Nuclear metallothionein expression correlates with cisplatin resistance of ovarian cancer cells and poor clinical outcome. *Virchows Arch* **450**, 279-285.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, *et al.* (1999): Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446.

## T

- Tabe Y, Sebasigari D, Jin L, Rudelius M, Davies-Hill T, Miyake K, *et al.* (2009): MDM2 antagonist nutlin-3 displays antiproliferative and proapoptotic activity in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* **15**, 933-942.
- Tabernero J, Dirix L, Schoffski P, Cervantes A, Lopez-Martin JA, Capdevila J, *et al.* (2011): A phase I first-in-human pharmacokinetic and pharmacodynamic study of serdemetan in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* **17**, 6313-6321.
- Taguchi T, Nazneen A, Abid MR and Razzaque MS (2005): Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib Nephrol* **148**, 107-121.
- Tait SW i Green DR (2010): Cell survival in tough times: The mitochondrial recovery plan. *Cell Cycle* **9**, 4254-4255.

- Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M and Tanigawa N (2000): Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* **6**, 127-134.
- Taneja N, Davis M, Choy JS, Beckett MA, Singh R, Kron SJ and Weichselbaum RR (2004): Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy. *J Biol Chem* **279**, 2273-2280.
- Tang H, Shao H, Yu C and Hou J (2011): Mcl-1 downregulation by YM155 contributes to its synergistic anti-tumor activities with ABT-263. *Biochem Pharmacol* **82**, 1066-1072.
- Taylor CF, Charlton RS, Burn J, Sheridan E and Taylor GR (2003): Genomic deletions in MSH2 or MLH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of novel and recurrent deletions by MLPA. *Hum Mutat* **22**, 428-433.
- Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, *et al.* (2012): Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol* **9**, 338-350.
- The Cancer Genome Atlas Research Network, (2011): Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* **474**, 609-615.
- Thompson T, Tovar C, Yang H, Carvajal D, Vu BT, Xu Q, *et al.* (2004): Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis. *J Biol Chem* **279**, 53015-53022.
- Thornberry NA & Lazebnik Y (1998): Caspases: enemies within. *Science* **281**, 1312-1316.
- Tirro E, Consoli ML, Massimino M, Manzella L, Frasca F, Sciacca L, *et al.* (2006): Altered expression of c-IAP1, survivin, and Smac contributes to chemotherapy resistance in thyroid cancer cells. *Cancer Res* **66**, 4263-4272.
- Tolcher AW, Mita A, Lewis LD, Garrett CR, Till E, Daud AI, Patnaik A, *et al.* (2008): Phase I and pharmacokinetic study of YM155, a small-molecule inhibitor of survivin. *J Clin Oncol* **26**, 5198-5203.

- Tolcher AW, Quinn DI, Ferrari A, Ahmann F, Giaccone G, Drake T, *et al.* (2012): A phase II study of YM155, a novel small-molecule suppressor of survivin, in castration-resistant taxane-pretreated prostate cancer. *Ann Oncol* **23**, 968-973.
- Toledo F & Wahl GM (2006): Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* **6**, 909-923.
- Tortora G, Caputo R, Damiano V, Bianco R, Chen J, Agrawal S, Bianco AR and Ciardiello F (2000): A novel MDM2 anti-sense oligonucleotide has anti-tumor activity and potentiates cytotoxic drugs acting by different mechanisms in human colon cancer. *Int J Cancer* **88**, 804-809.
- Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, Higgins B, Kolinsky K, Hilton H, *et al.* (2006): Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1888-1893.
- Trope C & Sigurdsson K (1982): Use of tissue culture in predictive testing of drug sensitivity in human ovarian cancer. Correlation between in vitro results and the response in vivo. *Neoplasma* **29**, 309-314

## U

- Uchida H, Tanaka T, Sasaki K, Kato K, Dehari H, Ito Y, *et al.* (2004): Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin induced apoptosis and attenuated tumor cell growth in vitro and in vivo. *Mol Ther* **10**, 162-171.

## V

- van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ and Vandenabeele P (2002): The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* **9**, 1031-1042.
- Vanderhyden BC, Shaw TJ and Ethier JF (2003): Animal models of ovarian cancer. *Reprod Biol Endocrinol* **1**, 67.

- Vasey PA, Atkinson R, Coleman R, Crawford M, Cruickshank M, Eggleton P, *et al.* (2001): Docetaxel-carboplatin as first line chemotherapy for epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* **84**, 170-178.
- Vassilev LT (2004): Small-molecule antagonists of p53-MDM2 binding: research tools and potential therapeutics. *Cell Cycle* **3**, 419-421.
- Vassilev LT (2005): p53 Activation by small molecules: application in oncology. *J Med Chem* **48**, 4491-4499.
- Vassilev LT (2007): MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol Med* **13**, 23-31.
- Villalonga-Planells R, Coll-Mulet L, Martinez-Soler F, Castano E, Acebes JJ, Gimenez-Bonafe P, Gil J i Tortosa A (2011): Activation of p53 by nutlin-3a induces apoptosis and cellular senescence in human glioblastoma multiforme. *PLoS One* **6**, e18588.
- Virrey JJ, Guan S, Li W, Schonthal AH, Chen TC and Hofman FM (2008): Increased survivin expression confers chemoresistance to tumor-associated endothelial cells. *Am J Pathol* **173**, 575-585.
- Vivas-Mejia PE, Rodriguez-Aguayo C, Han HD, Shahzad MM, Valiyeva F, Shibayama M, *et al.* (2011): Silencing survivin splice variant 2B leads to antitumor activity in taxane-resistant ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **17**, 3716-3726.
- Vogelstein B, Lane D and Levine AJ (2000): Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310.
- Voltan R, Celeghini C, Melloni E, Secchiero P and Zauli G (2010): Perifosine plus nutlin-3 combination shows a synergistic anti-leukaemic activity. *Br J Haematol* **148**, 957-961.
- Vousden KH & Lu X (2002): Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* **2**, 594-604.

## W

- Wahl AF, Donaldson KL, Fairchild C, Lee FY, Foster SA, Demers GW and Galloway DA (1996): Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis. *Nat Med* **2**, 72-79.

- Wang D & Lippard SJ (2005): Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 307-320.
- Wang H, Zeng X, Oliver P, Le LP, Chen J, Chen L, Zhou W, Agrawal S and Zhang R (1999): MDM2 oncogene as a target for cancer therapy: An antisense approach. *Int J Oncol* **15**, 653-660.
- Wang RH, Zheng Y, Kim HS, Xu X, Cao L, Luhasen T, *et al.* (2008): Interplay among BRCA1, SIRT1, and Survivin during BRCA1-associated tumorigenesis. *Mol Cell* **32**, 11-20.
- Wang Z, Fukuda S and Pelus LM (2004): Survivin regulates the p53 tumor suppressor gene family. *Oncogene* **23**, 8146-8153.
- Wang Z, Xie Y and Wang H (2005): Changes in survivin messenger RNA level during chemotherapy treatment in ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther* **4**, 716-719.
- Wawrzynow B, Zylicz A, Wallace M, Hupp T and Zylicz M (2007): MDM2 chaperones the p53 tumor suppressor. *J Biol Chem* **282**, 32603-32612.
- Wheatley SP & McNeish IA (2005): Survivin: a protein with dual roles in mitosis and apoptosis. *Int Rev Cytol* **247**, 35-88.
- Wilmanns C, Fan D, O'Brian CA, Bucana CD i Fidler IJ (1992): Orthotopic and ectopic òrgan environments differentially influence the sensitivity of murine colon carcinoma cells to doxorubicin and 5-fluorouracil. *Int J Cancer* **52**, 98-104.
- Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, Zeng T, *et al.* (2010): ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med* **363**, 1532-1543.
- Wu X, Bayle JH, Olson D and Levine AJ (1993): The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* **7**, 1126-1132.
- Wyllie AH, Kerr JF and Currie AR (1980): Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**, 251-306.

## X

- Xing J, Jia CR, Wang Y, Guo J and Cai Y (2012): Effect of shRNA targeting survivin on ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **138**, 1221-1229.

Xu JH, Wang AX, Huang HZ, Wang JG, Pan CB and Zhang B (2010): Survivin shRNA induces caspase-3-dependent apoptosis and enhances cisplatin sensitivity in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oncol Res* **18**, 377-385.

## Y

Yamamoto H, Ngan CY and Monden M (2008): Cancer cells survive with survivin. *Cancer Sci* **99**, 1709-1714.

Yamanaka K, Nakahara T, Yamauchi T, Kita A, Takeuchi M, Kiyonaga F, Kaneko N and Sasamata M (2011): Antitumor activity of YM155, a selective small-molecule survivin suppressant, alone and in combination with docetaxel in human malignant melanoma models. *Clin Cancer Res* **17**, 5423-5431.

Yamauchi T, Nakamura N, Hiramoto M, Yuri M, Yokota H, Naitou M, *et al.* (2012): YM155 induces disruption of the ILF3/p54(nrb) complex, which is required for survivin expression. *Biochem Biophys Res Commun*.

Yasmeen A, Beauchamp MC, Piura E, Segal E, Pollak M and Gotlieb WH (2011): Induction of apoptosis by metformin in epithelial ovarian cancer: involvement of the Bcl-2 family proteins. *Gynecol Oncol* **121**, 492-498.

Yoon DH, Shin JS, Jin DH, Hong SW, Jung KA, Kim SM, *et al.* (2012): The survivin suppressant YM155 potentiates chemosensitivity to gemcitabine in the human pancreatic cancer cell line MiaPaCa-2. *Anticancer Res* **32**, 1681-1688.

Yuan Y, Liao YM, Hsueh CT and Mirshahidi HR (2011): Novel targeted therapeutics: inhibitors of MDM2, ALK and PARP. *J Hematol Oncol* **4**, 16.

## Z

Zaffaroni N & Daidone MG (2002): Survivin expression and resistance to anticancer treatments: perspectives for new therapeutic interventions. *Drug Resist Updat* **5**, 65-72.



- Zaffaroni N, Costa A, Pennati M, De Marco C, Affini E, Madeo M, *et al.* (2007): Survivin is highly expressed and promotes cell survival in malignant peritoneal mesothelioma. *Cell Oncol* **29**, 453-466.
- Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ and Boman BM (2001): Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* **61**, 8664-8667.
- Zangemeister-Wittke U & Simon HU (2004): An IAP in action: the multiple roles of survivin in differentiation, immunity and malignancy. *Cell Cycle* **3**, 1121-1123.
- Zhao H, Spitz MR, Tomlinson GE, Zhang H, Minna JD and Wu X (2001): Gamma-radiation-induced G2 delay, apoptosis, and p53 response as potential susceptibility markers for lung cancer. *Cancer Res* **61**, 7819-7824.
- Zhao H & Piwnicka-Worms H (2001): ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* **21**, 4129-4139.
- Zhen HN, Zhang X, Hu PZ, Yang TT, Fei Z, Zhang JN, *et al.* (2005): Survivin expression and its relation with proliferation, apoptosis, and angiogenesis in brain gliomas. *Cancer* **104**, 2775-2783.
- Zhou BB & Elledge SJ (2000): The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433-439.
- Zhu N, Gu L, Li F and Zhou M (2008): Inhibition of the Akt/survivin pathway synergizes the antileukemia effect of nutlin-3 in acute lymphoblastic leukemia cells. *Mol Cancer Ther* **7**, 1101-1109

## ABREVIACIONES



## ABREVIACIONS

ABC	<i>ATP Binding Cassette transporters</i>
AKT	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>
ADK	Adenocarcinoma
AIF	<i>Apoptosi Inducing factor</i>
AnV	Anexina V
APAF1	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
ATM	Ataxia telangiectasia
ATP	Adenosina trifosfat
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related</i>
BAD	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>
BAK	<i>Bcl-2 antagonist killer</i>
BAX	<i>Bcl-2 associated x protein</i>
BCL-2	<i>B cell leukemia/limphoma-2</i>
Bcl-XL	<i>B-cell lymphoma extra large</i>
Bid	<i>Bh3 interacting-domain death agonist</i>
BIM	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
BIR	<i>Baculoviral IAP repeat</i>
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1</i>
BRCA2	<i>Breast cancer 2</i>
CaOV	Càncer d'ovari
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
C.E.E.A	Comitè ètic d'Experimentació Animal
CDDP	Cisplatí (cis-diamminedichloroplatinum(II))
CdK	Ciclina dependent de quinasa
CHK1	<i>Checkpoint homolog 1</i>
CHK2	<i>Checkpoint homolog 2</i>
CI	Índex de Combinació
CK	Citoqueratina
CPC	<i>Chromosome passenger complex</i>
CTNNB1	$\beta$ -Catenina
CTR1	Transportador de coure 1
DAB	3,3-Diaminobenzidine
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dubelco's modified eagle media</i>
DMSO	Dimetilsulfòxid
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DSB	<i>Double Strand Break</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Àcid etilendiaminotetraacètic
EOC	<i>Epithelial ovarian cancer</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERCC1	<i>Excision repair cross-complementing 1</i>

ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FIGO	Federació Internacional de Ginecologia i Ostetrícia
FISH	<i>Fluorescence in situ</i>
FITC	Isotiocianat de fluoresceïna
GF	Factor de creixement
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GSH	Glutatió
GST	Glutatió sintetasa
HBSS	<i>Hank's balanced Salt Solution</i>
HBXIP	<i>Hepatitis B virus X-Interaction Protein</i>
HER2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
HGSC	Carcinoma serós d'alt grau
HMG1	Proteïna d'alta mobilitat 1
HMG2	Proteïna d'alta mobilitat 2
HNPCC	Cancer de colon hereditari no polipós
HR	<i>Homologous recombination</i>
HRP	<i>Horse raddish peroxidase</i>
HUB	Hospital Universitari de Bellvitge
hUBF	RNA polimerasa 1 humà
IAPs	Proteïnes inhibidores de l'apoptosi ; <i>Inhibitor of Apoptosi Protein</i>
ICO	Institut Català d'Oncologia
ILF3	Factor de transcripció d'interleucina potenciador d'unió factor 3
IRS	<i>Immunoreactivity Score</i>
IP	Iodur de propidi
JNK	<i>N-terminal c-JUN kinase</i>
KDa	Kilodalton
KRAS	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LASC	Líquid ascític
LMP	Tumors de baix potencial maligne; <i>Low Malignant Potencial</i>
LOH	Pèrdua d'heterozigositat
LGSC	Carcinoma serós de baix grau
MAP	Proteïna associada als microtúbuls
MAPK	<i>ERK/Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCL-1	<i>Myeloid Cell Leukemia 1</i>
MDM2	<i>Murine double minute</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
MMR	<i>Missmatch repair</i>
MOMP	Permeabilització de la membrana mitocondrial externa
MRP	<i>Multidrug resistance-associated protein</i>
MTT	Bromur de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltretrazol
MLH1	MutL Homoleg 1
MLH2	MutL Homoleg 2
MSH6	MutS Homoleg 6
MSI-H	Alta inestabilitat de microsatèl·lits; <i>High Microsatellite Inestability</i>
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
NHS	<i>Normal Horse Serum</i>

NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
nM	Nanomolar
μM	Micromolar
NOXA	<i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
Nut3a	Nutlina-3a
Nut3b	Nutlina-3b
NSCLC	<i>Non-Small cell lung cancer</i>
OCT	Transportador orgànic de cations ; <i>Organic Cation Transporter</i>
OMS	Òrganització Mundial de la Salut
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	<i>Phosphate buffered solution</i>
PDK1	Fosfoinosítids dependents de 3-quinasa 1
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa; <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PIK3CA	<i>Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>
PIP2	Fosfatidilinositols-3,4 difosfat
PIP3	Fosfatidilinositols-2,4,5 trifosfats
PR	Domini ric en prolines
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
PTEN	<i>Phosphatase with tensin homology</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
QR	Quimioresistència
QVD	Q-VD-OPh
RAS	<i>Rat Sarcoma</i>
RB	Retinoblastoma
RNA	Àcid ribonuclèic
MLPA	<i>Multiplex ligation probe amplification</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SAPK	<i>Stress-activated kinase</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
TAD	Domini de transactivació
TBP	<i>TATA Binding protein</i>
TLS	<i>Translesion DNA Synthesis</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis- inducing ligand</i>
Tx	Taxol
UV	Llum ultraviolada
VDAC	Canal aniònic dependent de voltatge
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
X-Gal:	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside</i>



**ARTICLE**

---





# Mdm2 antagonists induce apoptosis and synergize with cisplatin overcoming chemoresistance in *TP53* wild-type ovarian cancer cells

Roser Mir<sup>1</sup>, Avelina Tortosa<sup>2</sup>, Fina Martinez-Soler<sup>1,2</sup>, August Vidal<sup>3,4</sup>, Enric Condom<sup>3,4</sup>, Alba Pérez-Perarnau<sup>1</sup>, Tatiana Ruiz-Larroya<sup>5</sup>, Joan Gil<sup>1</sup> and Pepita Giménez-Bonafé<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departament de Ciències Fisiològiques II, Faculty of Medicine, Campus of Health Sciences of Bellvitge, Universitat de Barcelona, IDIBELL, Spain

<sup>2</sup> Department of Basic Nursing, School of Nursing of the Health Campus of Bellvitge, Universitat de Barcelona, IDIBELL, Spain

<sup>3</sup> Department of Pathology, Hospital de Bellvitge, Universitat de Barcelona, IDIBELL, Spain

<sup>4</sup> Department of Pathology and Experimental Therapeutics, Universitat de Barcelona, IDIBELL, Spain

<sup>5</sup> Institute of Predictive and Personalized Medicine (IMPPC), Barcelona, Spain

Ovarian cancer (OVCA) is the leading cause of death from gynecological malignancies. Although treatment for advanced OVCA has improved with the introduction of taxane–platinum chemotherapy, the majority of patients will develop resistance to the treatment, leading to poor prognosis. One of the causes of chemoresistance is the reduced ability to undergo apoptosis. Cisplatin is a genotoxic drug that leads cells to apoptosis through the activation of the p53 pathway. Defective signaling in this pathway compromises p53 function, and thus cisplatin does not induce apoptosis. A new group of nongenotoxic small molecules called Nutlins have been developed to inhibit p53-Mdm2 binding, inducing apoptosis in chemoresistant tumors through the activation of the p53 pathway. The wild-type p53 cisplatin-resistant ovarian cancer cell-line A2780cis was used to test the effect of Nutlin-3a (Nut3a) on apoptosis response. The results showed that Nut3a synergized with cisplatin, inducing cell-cycle arrest in G2/M and potentiating apoptotic cell death. Increased apoptosis was also induced in wild-type *TP53* primary OVCA cultures by double cisplatin–Nut3a treatment. In conclusion, Nut3a appears to sensitize chemoresistant OVCA cells to cisplatin, inducing apoptosis. As increased response was generalized in primary tumors, this cisplatin–Nut3a combination could be useful for the treatment of patients harboring wild-type *TP53* who do not respond to standard chemotherapy.

**Key words:** chemoresistance, Mdm2, Nut3a, ovarian cancer, apoptosis, Survivin

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

**Grant sponsor:** AGAUR; **Grant number:** FI-2010-2013; **Grant sponsor:** Ministerio de Ciencia e Innovación; **Grant sponsor:** Instituto de Salud Carlos III; **Grant numbers:** FIS 11/1377, FIS 09/0244, RETIC RD06/0020/0097; **Grant sponsor:** Ministerio de Ciencia e Innovación; **Grant sponsor:** FEDER; **Grant number:** SAF2010-20519; **Grant sponsor:** AGAUR-Generalitat de Catalunya; **Grant number:** 2009SGR-00395

**DOI:** 10.1002/ijc.27832

**History:** Received 4 Nov 2011; Accepted 23 Aug 2012; Online 10 Sep 2012

**Correspondence to:** Pepita Giménez-Bonafé, Departament de Ciències Fisiològiques II, Faculty of Medicine, Campus of Health Sciences of Bellvitge, Universitat de Barcelona, IDIBELL, Spain, Tel: +34-934-039-727, Fax: +34-934-024-268 or Avelina Tortosa, Department of Basic Nursing, School of Nursing of the Health Campus of Bellvitge, Universitat de Barcelona, IDIBELL, Spain, Tel: +34-934-039-727, Fax: +34-934-024-268, E-mail: atortosa@ub.edu or pgimenez@ub.edu

Ovarian cancer (OVCA) kills 115,000 women annually worldwide. The majority of patients with OVCA are diagnosed with advanced disease and managed with surgical cytoreduction followed by platinum and taxane-based chemotherapy,<sup>1</sup> but the majority of them will eventually recur and die as a consequence of metastatic spread. Crystalline cis-dichloro-diammine platinum (II) [cisplatin (CDDP)] is the cytotoxic agent used as therapy, but it leads to chemoresistance, the largest obstacle in treating patients with recurrent disease. Multidrug resistance, DNA mismatch repair and alterations in the p53 pathway are examples of tumor-cell features that may lead to CDDP resistance.<sup>2</sup>

Defects in apoptosis are one of the mechanisms that can lead to chemoresistance. The p53 protein is recognized as an important cell-regulatory element that arrests the growth of cells containing damaged DNA. Cell-cycle control and activation of apoptosis appear to be tightly linked functions of p53. The importance of p53 in human malignancies was highlighted by the detection of abnormal p53 in more than 50% of human cancers.<sup>3,4</sup> Mutations in *TP53* are associated with a lack of response to high-dose CDDP therapy in OVCA patients.<sup>5</sup>

The short-lived protein p53 and its cellular levels are controlled by the rate at which it is degraded. Although several U3 ubiquitin ligases have been implicated in p53

**What's new?**

Ovarian cancer is the leading cause of death from gynecological malignancies, with the majority of patients developing resistance to the treatment, leading to poor prognosis. While the chemotherapeutic drug cisplatin initially leads tumor cells to apoptosis through activation of the p53 pathway, over time defective signaling compromises p53 function, resulting in reduced apoptosis. The study shows that non-genotoxic Nut3a can sensitize chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin by potentiating apoptosis. The results also suggest that cisplatin and Nut3a could be used in combination for the treatment of patients harboring wild type TP53 who do not respond to standard chemotherapy.

ubiquitination and degradation, Mdm2 appears to function as a master regulator of p53.<sup>6,7</sup> Mdm2 not only mediates p53 degradation, but also binds p53 and inhibits its transcriptional activity. Studies have shown that p53-activating compounds that prevent disruption of the p53 pathway by blocking the p53–Mdm2 interaction are effective in preclinical models.<sup>8</sup> One of the most promising wild-type TP53 reactivating agents is Nutlin (whose active form is Nutlin-3a; Nut3a) a highly specific, nongenotoxic Mdm2 antagonist that functions as a competitive inhibitor of the p53–Mdm2 interaction.<sup>8</sup> Nut3a is a cis-imidazoline analogue that binds Mdm2 in the p53 pocket, thus preventing p53 degradation. In preclinical studies, Nut3a displayed increased potential for the treatment of human cancer cells harboring wild-type TP53 in<sup>6–9</sup> which the downstream p53-dependent signaling is preserved. Nut3a appears cytostatic to proliferating normal cells and induces p53-dependent apoptosis in human cancer cells such as osteosarcoma<sup>9</sup> and colon cancer,<sup>8</sup> acute myelogenous leukemia,<sup>10</sup> lung cancer,<sup>11</sup> chronic lymphocytic leukemia,<sup>12</sup> glioblastoma<sup>13</sup> and head and neck squamous cell carcinoma.<sup>14</sup>

Chemotherapy based on CDDP has been hindered by its nephrotoxicity, neurotoxicity and myelotoxicity,<sup>15</sup> and so lower doses of the drug are needed to palliate the secondary effects. Therein lies the importance of finding new compounds that synergize in combination with CDDP to lower the doses of the drug. The identification of new drugs or novel therapeutic strategies with the ability to resensitize OVCa cells to existing chemotherapy has become a major challenge. Nongenotoxic p53 activation induced by Mdm2 antagonists might represent an alternative to the current cytotoxic treatment with CDDP. The aim of the present study was to analyze the combination of Mdm2 antagonists with CDDP to sensitize OVCa-resistant cells to the chemotherapeutic agent that is nowadays still in use and causes chemoresistance. Studies have been performed using a CDDP-resistant OVCa cell line and primary tissue cultures. The results of the present study strongly suggest that the combination of Nut3a with CDDP could be a novel treatment option to overcome CDDP resistance in ovarian cancer patients harboring wild-type TP53 who do not respond to the standard chemotherapy.

**Material and Methods****Cell lines**

The human ovarian cancer cell lines A2780p and their cisplatin-resistant derivative A2780cis were purchased from the Eu-

ropean Collection of Cell Culture and the OV90 cell line from the American Type Culture Collection. A2780p/A2780cis cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Biological Industries, Israel) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Biological Industries), 2 mM glutamine and penicillin-streptomycin (100 U/ml–100 µg/ml; Biological Industries). OV90 cell line was cultured in MCDB105:M199 (1:1; Biological Industries) with 15% FBS and penicillin-streptomycin (100 U/ml–100 µg/ml). All cell lines were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cells were tested to determine that they were mycoplasma free.

**Drugs**

Cisplatin (CDDP; Sigma) was dissolved in sterile water to a final stock solution concentration of 3.3 mM. Nut3a was provided by Cayman Chemical and dissolved with DMSO to a final stock solution concentration of 10 mM.

**Patient samples**

Human tumors belonged to patients with ovarian cancer that were diagnosed according to clinical standards and laboratory criteria, obtained from the Hospital Universitari de Bellvitge, Barcelona, Spain. Written informed consent was obtained from all patients in accordance with the Hospital of Bellvitge Ethics Committee. Histological subtypes: high-grade serous OVCa: LASC #9, #13, #17 and #18; high-grade endometrioid: #9 and #34; high-grade mucinous: #10 and #33. Techniques to isolate epithelial ovarian cancer cells (EOC) from tumors and ascites were used directly from the samples, propagating the primary cells in culture (described in Supporting Information, Section 1). The analysis performed with primary cell cultures depended on availability of the sample. Wild-type p53 tumors have been chosen, so that Nut3a could be effective.

**MTT chemosensitivity**

The viability of cultured cells was determined by assaying the reduction of MTT (3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma Chemical Co.) to formazan. EOC cell lines were seeded at  $10 \times 10^3$  cell/well in 96-well plates in a final volume of 100 µl, incubated overnight and then treated. Ten microliters of MTT reagent [diluted in phosphate-buffered saline (PBS)] was added to each well and cells were incubated for 2 hr at 37°C in the dark. The blue MTT

formazan precipitate was then dissolved in 100  $\mu$ l of DMSO, and the absorbance was measured at 540 nm on a multiwell plate reader.

#### Analysis of apoptosis by flow cytometry

After the treatment, apoptosis was measured on both the floating and attached cells by surface Annexin V staining and flow cytometry. Treated and untreated cells were washed in PBS, trypsinized and incubated with Annexin V-FITC (Bender MedSystems, Burlingame, CA) for 10 min. Cells were then diluted with Annexin-binding buffer to a volume of 400  $\mu$ l with propidium iodide (PI). Samples were analyzed with FACSCalibur and BD CellQuest Pro software (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Apoptosis was considered positive for AnV+/PI- cells.

#### Analysis of cell cycle and subdiploid peak by flow cytometry

After the treatments, cells were collected and fixed in chilled 70% ethanol, resuspended in PBS/1% FBS and treated with RNaseA. PI was added to cells, and samples were analyzed by flow cytometry in FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Cell-cycle profile analysis of DNA histograms of integrated red fluorescence was performed with ModFit LT software (Verity Software, Inc, Topsham, ME).

#### Senescence-associated $\beta$ -galactosidase staining

Primary cell-culture cells were plated in six-well plates, and when they were 30% confluent, they were treated with DMSO vehicle (untreated cells), CDDP (3.5  $\mu$ M), Nut3a (5  $\mu$ M) and combined treatment for 72 hr. Then senescence was measured on the attached cells. Senescence  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ Gal) staining was performed using the SA- $\beta$ Gal Staining Kit (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) following the manufacturer's instructions. Cells were considered positive when the cytoplasm was stained with SA- $\beta$ Gal. To verify that senescence was irreversible, after 72 hr of treatment, cells were washed to remove the drugs and incubated for additional 4 days in fresh media, and senescence was again measured as described earlier.

#### RT-MLPA

RNA was analyzed by reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification (RT-MLPA) using SALSA MLPA KIT R011 Apoptosis mRNA from MRC-Holland (Amsterdam, The Netherlands) for the simultaneous detection of 38 messenger RNA molecules<sup>16</sup> (described in Supporting Information, Section 2).

#### Cell transfections and RNA interfering assays

**Survivin transfection.** OVCa cell lines were seeded at 1.5–2.0  $\times 10^5$  cells per well in six-well plates in a final volume of 3,000- $\mu$ l incubated overnight, and then the transfection was performed at a 30–35% cell confluence using FuGENE<sup>®</sup> 6 Reagent (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) at a ratio of 1:4

(1  $\mu$ g DNA: 4  $\mu$ l FuGENE<sup>®</sup> according to the manufacturer's recommendations) diluted with OPTIMEM (GIBCO, Invitrogen). The liposome–DNA complex was allowed to incubate with the cells for 4–6 hr before removal and replenishing with fresh culture medium supplemented with antibiotics. Cells were transfected with PC3DNA-empty (negative control) or plasmid expression vector PC3DNA-Survivin (kindly provided by Dr.D.C Altieri, New Haven, CT), and 24 hr following Survivin transfection, cells were treated with drugs.

**TP53 and Survivin siRNA transfection.** OVCa cell lines were seeded as described earlier and then incubated overnight. In both cases, transfections were performed using Oligofectamine Reagent (Invitrogen). For TP53 transfection, the concentration used was 100 nmol/l nontargeting negative-siRNA (Negative Universal Control siRNA, Invitrogen) or 100 nmol/l human p53 siRNA (TP53 UHS40367 siRNA, Invitrogen) with the same volume of oligofectamine (1:1), diluted with OPTIMEM. Four to six hours later, transfection medium was removed, and cells were treated with drugs and then incubated overnight. For Survivin transfection, the concentration used was 200 nmol/l nontargeting negative-siRNA (Negative Universal Control siRNA, Invitrogen) or 200 nmol/l human Survivin siRNA (BIRC5HSS179403 siRNA, Invitrogen), diluted with OPTIMEM. Twenty-four hours later, cells were treated with drugs.

#### Statistical analysis

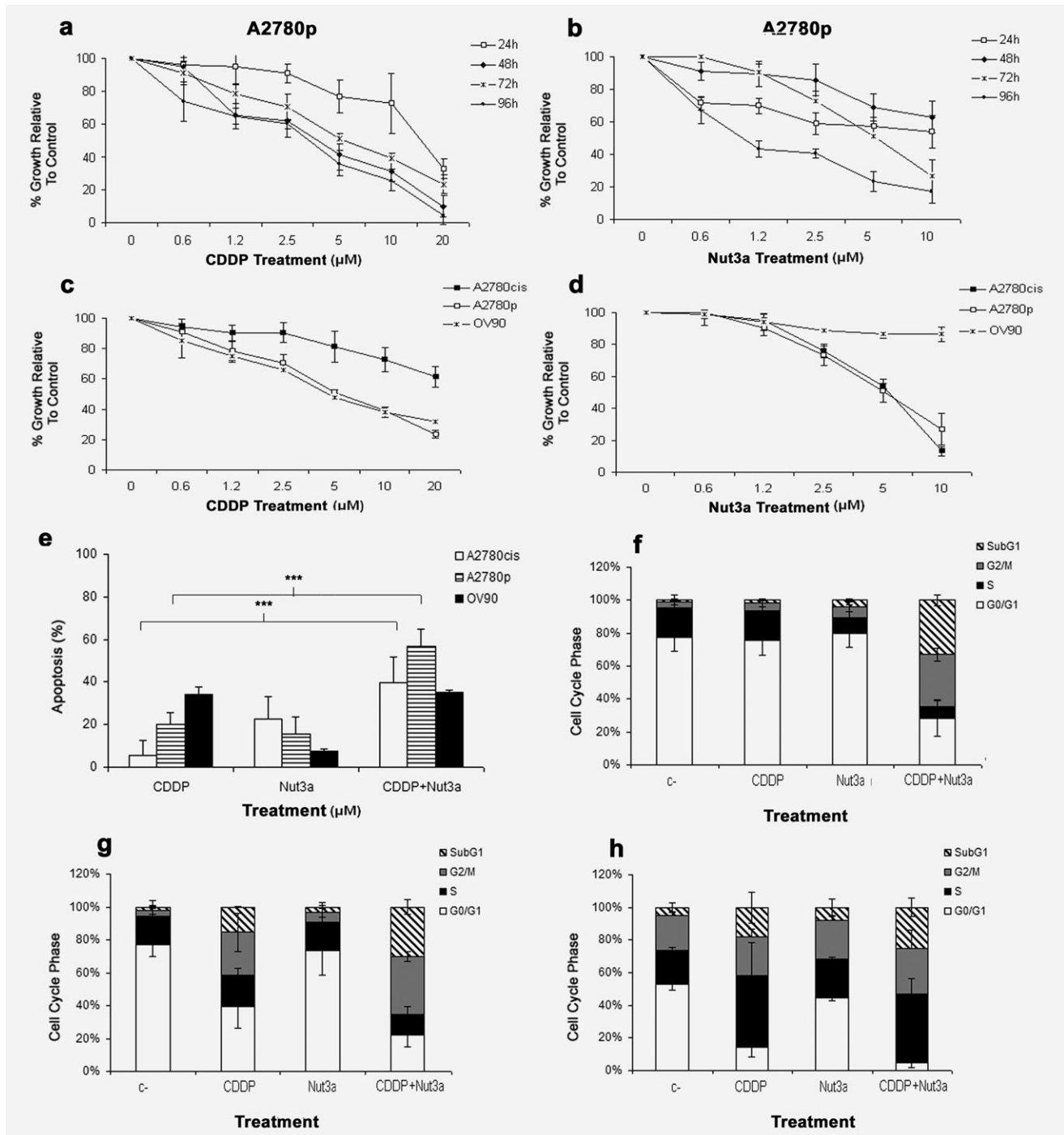
All experiments were repeated independently at least three times. Data were analyzed using GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software). Results are shown as mean plus or minus standard deviation of values obtained in independent experiments. The paired Student's *t*-test was used to compare the differences between paired samples. Differences were considered significant at *p* value below 0.05. Median dose-effect analysis was used to assess the interaction between agents. The combination index (CI) was calculated for a two-drug combination using Biosoft CalcuSyn program (Ferguson, MO). A CI of one indicates an additive effect; a CI above one, antagonistic effect; and a CI below one, synergistic effect.

## Results

### Nutlin-3a potentiates cisplatin-induced apoptosis and G2/M cell-cycle arrest

To analyze the effect of Nut3a on cisplatin (CDDP) chemosensitization, the CDDP-resistant and wild-type TP53 A2780cis cell line was used. As controls, two CDDP sensitive cell lines were used: the wild-type TP53 A2780p cells, positive control for CDDP sensitivity and TP53-mutated OV90 cells, negative control for the Nut3a treatments.

To determine the most effective incubation time and dose of both CDDP and Nut3a causing a decrease in cell viability, a time course followed by a dose response was performed. The time course from 24 to 96 hr was performed in the A2780p cells, and from the results observed (Figs. 1a and



**Figure 1.** Response of cell lines to CDDP and Nut3a treatments. (a) Growth inhibitory effects of A2780p cells incubated for 24, 48, 72 and 96 hr with DMSO (vehicle control) and increasing doses of CDDP and (b) Nut3a, examined by MTT assay. (c) Growth inhibitory effects examined by MTT assay after incubating A2780cis, A2780p and OV90 cell lines with DMSO (vehicle control) and increasing doses of CDDP and (d) Nut3a, for 72 hr. (e) Apoptosis and (f-h) cell-cycle analyses after Nut3a + CDDP combined treatment. Cell lines were incubated with DMSO vehicle (untreated cells), CDDP (3.5 μM), Nut3a (5 μM) and combined treatment: Nut-3a (5 μM) and 2 hr later CDDP (3.5 μM). Apoptosis was analyzed after 72 hr of treatment and measured by surface AnV<sup>+</sup> staining and flow cytometry. Results were expressed as the percentage compared to DMSO-treated controls and represented as the mean ± standard deviation (SD) for five distinct experiments. Cell-cycle distribution was calculated from flow cytograms (data not shown) and expressed as the percentage of untreated cells. Data are shown as the mean of at least three independent assays ± SD. \**p* < 0.05; \*\*\**p* < 0.0001 significance (Student's *t*-test) between CDDP treatment and CDDP plus Nut3a combination.

1b), the incubation time that showed a decrease in cell growth of 50% was between 48 and 72 hr for CDDP and 72 hr for Nut3a. Cells treated for 96 hr showed a necrotic state when observed under the microscope (data not shown). So, 72 hr was the usual incubation time that was chosen to perform the incubation with both drugs. Next, a dose response ranging from 0.5 to 20  $\mu\text{M}$  for CDDP and from 0.5 to 10  $\mu\text{M}$  for Nut-3a using the three cell lines was performed (Figs. 1c and 1d). MTT results showed that the  $\text{IC}_{50}$  for 72 hr was 3.5  $\mu\text{M}$  for CDDP and 5  $\mu\text{M}$  for Nut3a. To confirm these results, these doses were used to check apoptosis and cell-cycle status in A2780p and A2780cis cells in a time course from 24 to 96 hr (Supporting Information Fig. S1) where 72 hr using the  $\text{IC}_{50}$  doses was shown to be the optimum incubation time causing cell-cycle arrest and apoptosis. To demonstrate the specificity of Nut3a, the inactive enantiomer (Nut3b) was used. All experiments performed showed that the inactive enantiomer Nut3b did not modify cell viability nor did it induce apoptosis (data not shown).

To explore in more detail whether Nut3a and CDDP acted together in an additive or synergistic manner, the inhibitory effect of the combination of Nut3a plus CDDP was calculated through the CI, where  $\text{CI} < 1$  indicated a synergistic effect and  $\text{CI} = 1$ , an additive effect. Two doses of Nut3a (2 and 5  $\mu\text{M}$ ) were used in combination with three doses of CDDP (2, 3.5 and 5  $\mu\text{M}$ ) using the three cell lines. The combination of 3.5  $\mu\text{M}$  CDDP plus 5  $\mu\text{M}$  Nut3a was found to be synergistic in the A2780cis cells ( $\text{CI} = 0.714$ ) and in the A2780p cells ( $\text{CI} = 0.8$ ), causing around 50% of cell death in the two wild-type *TP53* cell lines (Supporting Information Fig. S2).

Next, to evaluate the induction of apoptosis of the combined treatment, cell lines were incubated with CDDP (3.5  $\mu\text{M}$ ) in the absence or presence of Nut3a (5  $\mu\text{M}$ ) for 72 hr. Apoptosis was measured as AnnexinV-positive cells (Fig. 1e). CDDP by itself induced only 5% apoptosis in A2780cis cells and 22.8% when incubated with Nut3a. It was of note that when the combined treatment was applied, apoptosis increased by up to 40%, with statistically significant results ( $p < 0.0001$ ). In the same way, CDDP led to apoptosis in A2780p cells (20%), and such induction was lower with Nut3a alone (15.5%) and higher with the combined treatment (56.7%). As expected, no effect of Nut3a was found in the mutated *TP53* OV90 cell line ( $p = 0.630$ ).

To further analyze the effects of the combined treatment in OVCa cells, cell-cycle analyses were performed after 72 hr. In resistant A2780cis cells, while CDDP alone, as expected, had no effect in the percent of cells in G2/M compared to untreated cells, the combined treatment increased the G2/M phase to 31.8% ( $p = 0.025$ ). Similarly, the subdiploid peak increased to 33% by the combined treatment ( $p < 0.0001$ ; Fig. 1f). However, in sensitive A2780p cells, the percentage of cells in G2/M phase showed an increase to 26% by CDDP alone, which further increased to 35% by the combined treatment ( $p = 0.394$ ). The subdiploid peak increased from 15.4% (CDDP) to 30% (combined treatment;  $p = 0.003$ ; Fig. 1g).

No significant variation in cell-cycle profile was observed in OV90 cells ( $p = 0.9$ ; Fig. 1h). Nut3a by itself did not significantly induce G2/M arrest in any of the three cell lines when compared with untreated cells (Figs. 1f–1h).

#### Apoptosis-related gene expression profile induced by CDDP plus Nut3a combined treatment

Changes in the overall apoptosis expression profile by RT-MLPA were analyzed in the two wild-type *TP53* cell lines. A2780cis cells incubated with the double treatment and compared to the single treatment with CDDP showed an increase in the proapoptotic p53 target genes *NOXA*, *PUMA*, *BAX*, *APAF-1*, the proapoptotic gene *BIM* and the cell-cycle arrest gene *CDKN1A*; this last one increasing up to more than two times (Fig. 2a and Supporting Information Fig. S3). Interestingly, there was a decrease in the antiapoptotic gene *SURVIVIN* in the double treatment of eight times compared to the CDDP treatment alone and a decrease in the antiapoptotic gene *BCL-2*. The decrease in *SURVIVIN* occurred simultaneously with an increase in apoptosis found in the double treatment compared to the single treatment of CDDP (Fig. 1e).

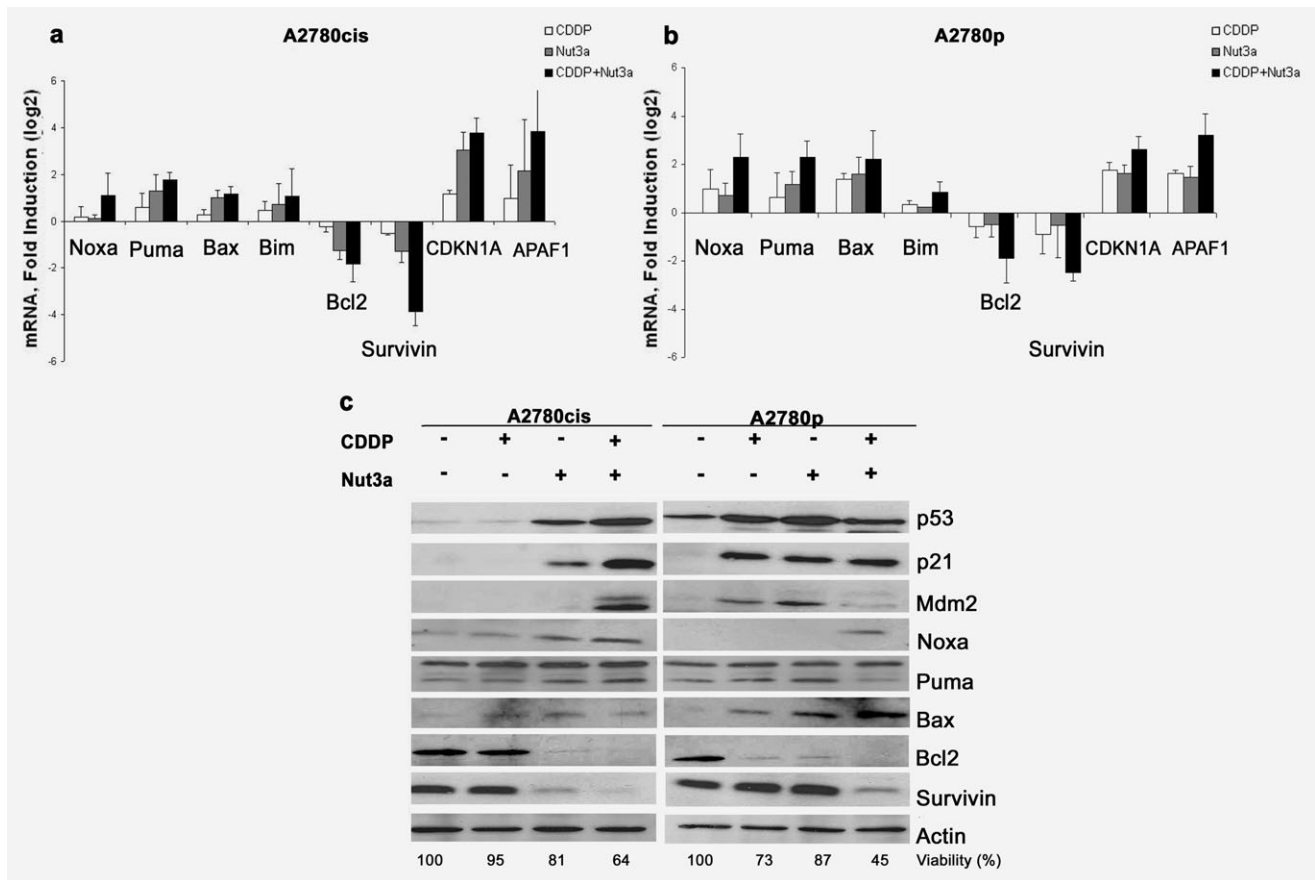
In the case of A2780p cells (Fig. 2b), the single treatment with CDDP already increased the proapoptotic genes *NOXA*, *PUMA*, *BAX*, *BIM* and *APAF-1*, as well as *CDKN1A*, confirming the sensitivity of these cells to CDDP, and the double treatment made this increase greater. With the double treatment, *CDKN1A* also increased but not as much as in A2780cis cells. *BCL-2* and *SURVIVIN* also decreased with the double treatment compared to the CDDP treatment alone.

The mRNA profile found in both cell lines was in agreement with the induction of apoptosis observed in Figure 1e. Interestingly, *SURVIVIN* only decreased in the double treatment in A2780cis cells and not with the CDDP single treatment, whereas in the A2780p, it decreased both with CDDP alone and the double treatment.

#### Nut3a induces p53 stabilization and accumulation of p53 target proteins in wild-type *TP53* cell lines

The CDDP treatment alone in A2780p cells induced p53 together with its targets p21, Puma and Bax, as well as Mdm2 accumulation (Fig. 2c); there was a decrease in the antiapoptotic protein Bcl-2, coinciding with a decrease in cell viability going from 100% in the control treatment to a 73% with CDDP alone. The same treatment had no effect in A2780cis cells, where changes in these proteins were not observed. In both cell lines, CDDP treatment maintained the levels of Survivin as in the control.

When the double-treatment CDDP plus Nut3a was applied, in A2780p cells, the proapoptotic proteins Noxa and Bax were also upregulated, and the levels of Survivin decreased considerably, together with cell viability, which descended from 73% (CDDP treatment) to 45% (double treatment). In A2780cis cells, Nut3a induced p53 protein and its targets p21, Noxa and Bax and decreased the levels of Bcl-2, and all these changes



**Figure 2.** Apoptosis-related gene and protein expression induced by Nut3a plus CDDP combined treatment. (a) A2780cis and (b) A2780p cell lines were treated with DMSO vehicle (untreated cells), CDDP (3.5  $\mu$ M), Nut3a (5  $\mu$ M) and combined treatment: Nut3a (5  $\mu$ M) and 2 hr later CDDP (3.5  $\mu$ M) for 48 hr. Cells were lysed, and apoptosis-related gene expression was analyzed by MLPA as described in “Material and Methods” section. The plot is the representation of the mean value of three independent experiments. The results are shown as logarithmic fold induction relative to untreated cells and normalized with GUSB (for row data plots, address to Supporting Information Fig. S4). (c) Total levels of p53, p21, Mdm2, Noxa, Puma, Bax, Bcl-2 and Survivin were analyzed by western blot. Actin was used as loading control. Viability analyzed by flow cytometry was measured as nonapoptotic and non-necrotic cells and expressed as the percentage of the viability of untreated cells. Immunoblots are representative of at least three independent experiments.

were enhanced in the presence of CDDP. In the same way, there was a decrease in Survivin levels, which was much more marked in the double treatment, together with a decrease in cell viability, going from 95% (CDDP treatment) to 64% (double treatment). Of note, with Nut3a treatment alone, the decrease of Survivin expression was lower in A2780p cells compared to that of A2780cis cells (Fig. 2c).

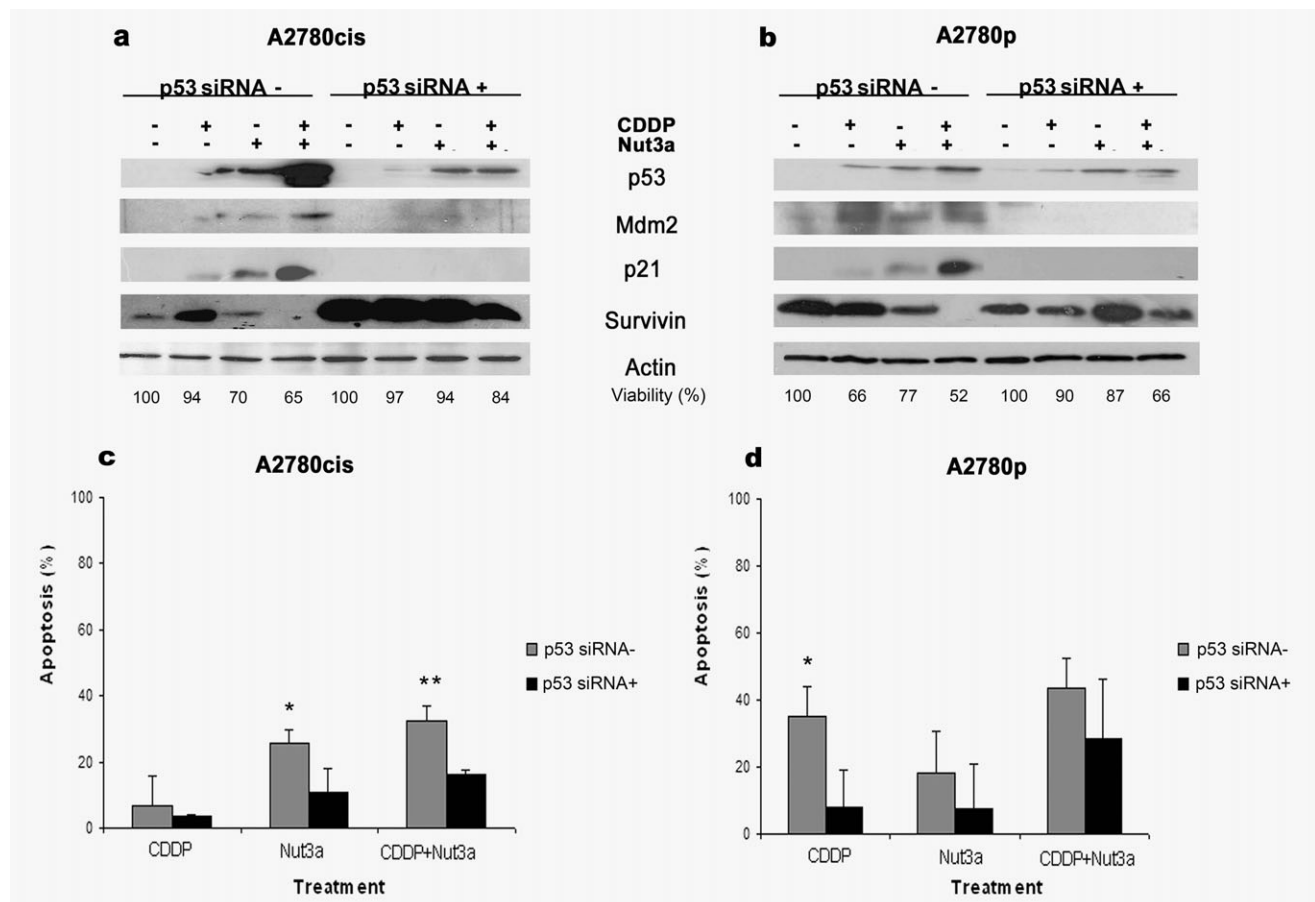
The results suggest that the double treatment in the CDDP-resistant A2780cis cell line had similar effect as CDDP treatment alone of the sensitive counterpart A2780p cells.

To test whether the observed downregulation of Survivin upon the Nut3a–CDDP double treatment was mediated by upregulation of p53, we performed knockdown of p53 by siRNA. In wild-type *TP53* cell lines, siRNA treatment decreased p53 levels as well as its targets Mdm2 and p21 upon treatment showing the effectiveness of the siRNA. In both cell lines, Survivin was decreased when p53 was active (siRNA–), whereas by the double treatment (Figs. 3a and 3b), it did not decrease in the silenced p53 cells (siRNA+).

Apoptosis was lower in both cell lines when p53 was inactivated (Figs. 3c and 3d). Comparing knocked down *versus* mock-treated cells, in A2780cis, apoptosis did not decrease with the CDDP treatment ( $p = 0.279$ ), while significantly decreased with Nut3a ( $p = 0.035$ ) and the double treatment ( $p = 0.003$ ). In A2780p cells, apoptosis also appeared to decrease in the p53-silenced cells with the CDDP treatment ( $p = 0.032$ ) and in a lesser extent with Nut3a and the double treatment. Altogether, these results suggest that the A2780cis cells were more sensitive to Nut3a than the A2780p cells.

#### Overexpression of Survivin does not suppress cytotoxicity caused by Nut3a + CDDP combination

Owing to the potential antiapoptotic role of Survivin, we wondered whether overexpression of ectopic Survivin would protect OVCa cell lines from Nut3a-induced apoptosis. Western blot analysis showed substantial elevation of Survivin levels in the cells transfected with ectopic Survivin after double treatment for 72 hr. Restoration of Survivin did not prevent cells



**Figure 3.** Apoptosis induction and protein expression analysis after Nut3a plus CDDP combined treatment in knockdown *TP53* cell lines. Cell lines were transfected with negative-control human small interference RNA (siRNA) or human p53 siRNA. Four to six hours later, cells were treated with DMSO vehicle (untreated cells), CDDP (3.5  $\mu$ M), Nut3a (5  $\mu$ M) and the combined treatment for 72 hr. Total levels of p53, Mdm2, p21 and Survivin were analyzed in a 12% polyacrilamide gel in (a) the A2780cis and (b) A2780p cell lines by western blot. Immunoblots are representative of at least five independent experiments. Viability was measured as nonapoptotic (AnV<sup>-</sup>) and non-necrotic (PI<sup>-</sup>) cells, referred to the percentage of the viability of untreated cells. Apoptosis of (c) A2780cis and (d) A2780p cell lines was measured as AnV<sup>+</sup> and expressed as the percentage of the apoptosis of untreated cells. Data are shown as the mean of at least five independent assays  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , statistical significance (Student's *t*-test) between siRNA<sup>-</sup> and siRNA<sup>+</sup> for each treatment.

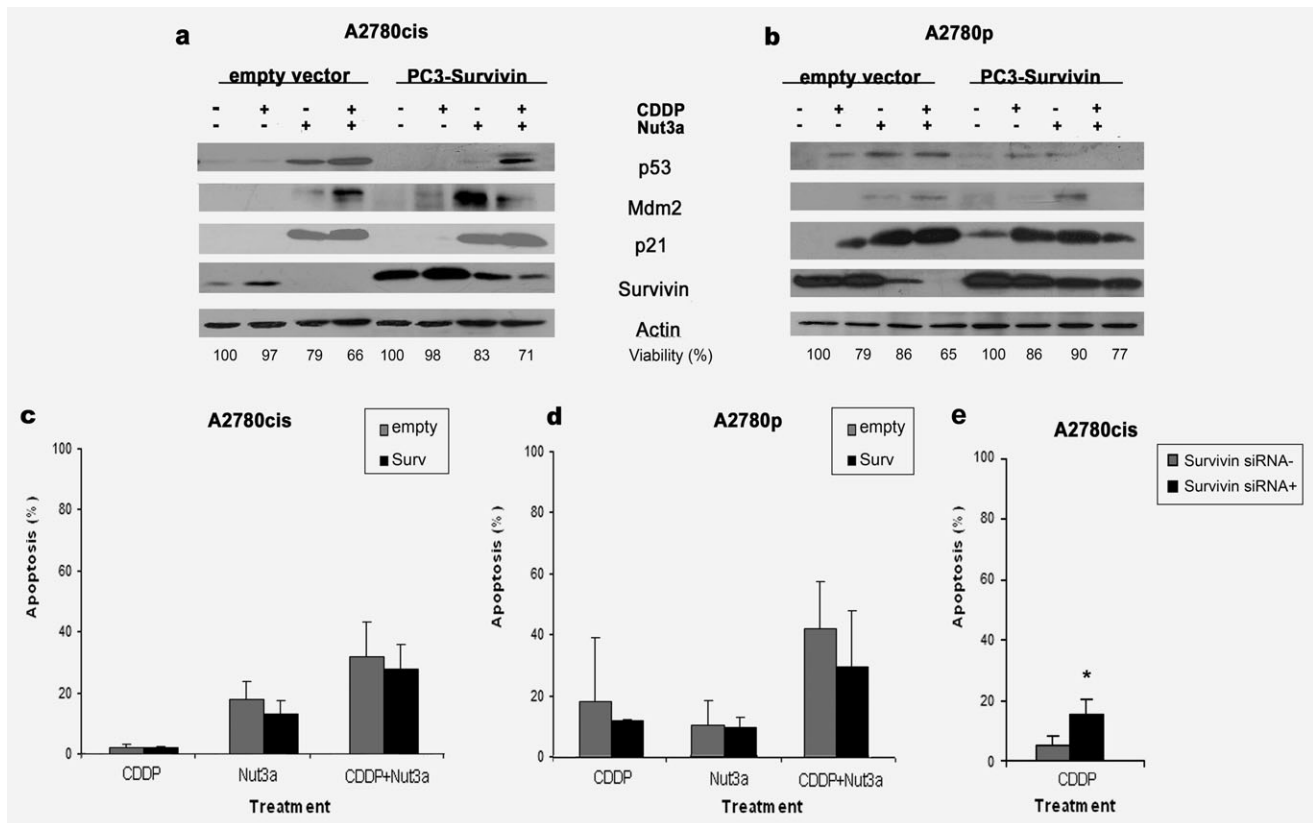
to activate p53, as it was seen by its accumulation after Nut3a and the double treatments, especially in the CDDP-resistant A2780cis cells (Figs. 4a and 4b). Restoration of Survivin slightly protected cells from apoptosis, although it was not statistically significant (Figs. 4c and 4d). Similar results were observed after 48-hr treatments (data not shown). On the other hand, in the CDDP-resistant A2780cis cells, when Survivin was knocked down by siRNA and cells were treated with CDDP, apoptosis was higher, suggesting that the downregulation of Survivin sensitized cells to CDDP ( $p = 0.025$ ; Fig. 4e).

#### The double treatment Nut3a plus CDDP induces apoptosis and senescence in EOC primary cell cultures

Epithelial ovarian cancer (EOC) cells were isolated both from solid tumor patients (#9, 10, 13, 17, 18, 33 and 34) and ascites [Ascitic liquids (LASC); LASC #9]. The *TP53* status was analyzed by sequencing, and those that were wild-type *TP53* were chosen to analyze whether Nut3a sensitized to CDDP. EOC cultures were treated following the cell-line procedure,

and all the experiments were performed twice in two independent assays. The EOC derived from different patients responded to different degrees depending on the patient (Fig. 5a): there was a decrease on cell number in the double treatment compared to the CDDP treatment alone that could not be explained by the induction of apoptosis, because in general, cell count diminished around 50% with the double treatment (Fig. 5a), whereas the mean of apoptosis induction was 36%, where 20% of it was due to the CDDP treatment alone (Fig. 5b). On the other hand, none of the treatments caused more than 10% of necrosis (data not shown). To elucidate whether double treatment induces permanent cell-cycle arrest and senescence besides apoptosis, EOC cells were incubated with DMSO vehicle (untreated cells), CDDP (3.5  $\mu$ M), Nut3a (5  $\mu$ M) or combined treatment for 72 hr. EOC cells acquired an enlarged and flat morphology and expressed the senescence-associated SA- $\beta$ Gal after 72 hr of the double treatment incubation (Fig. 5d). The mean percentage of positive cells with combined treatment when compared with CDDP





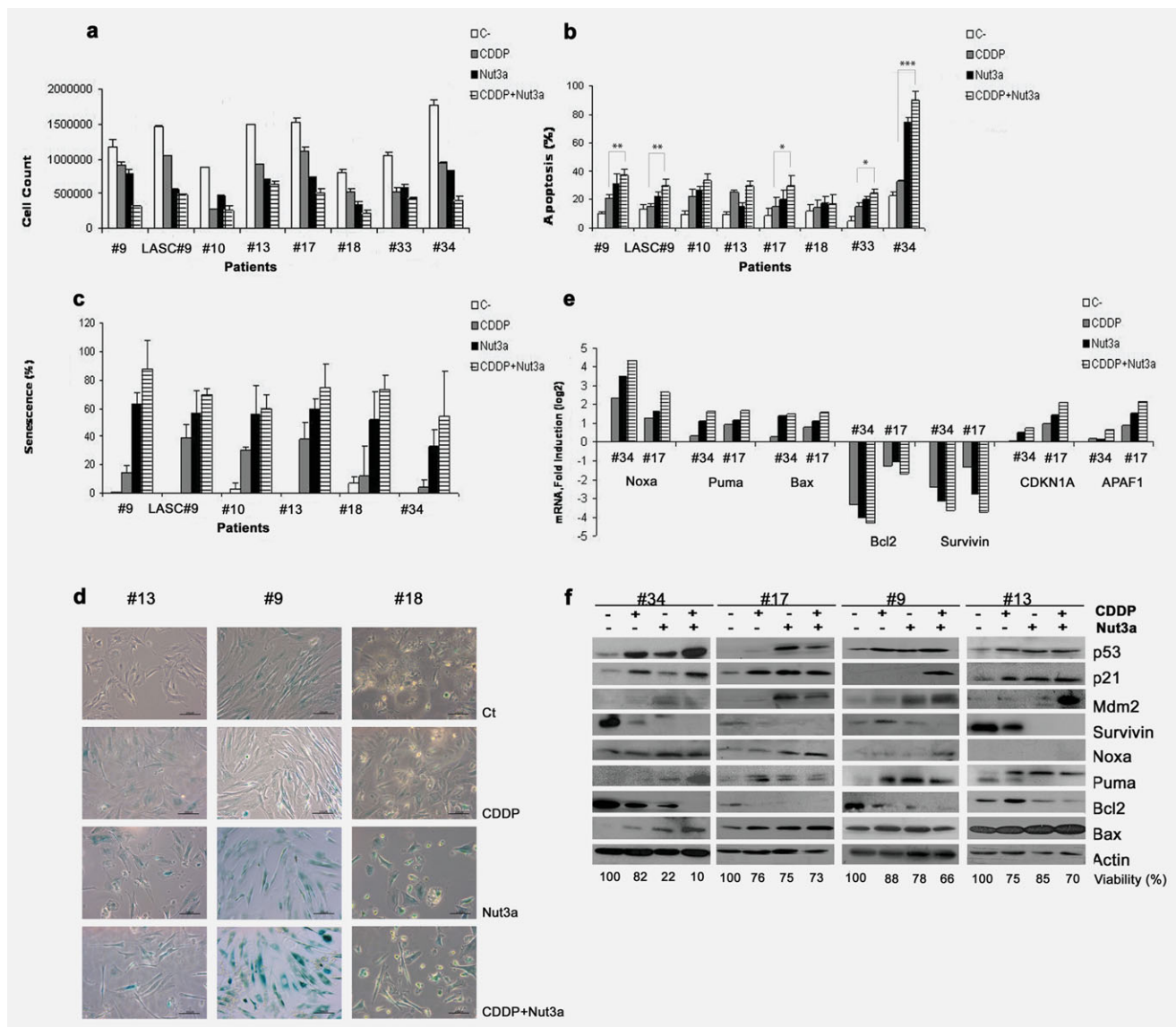
**Figure 4.** Apoptosis induction and protein expression analysis after Nut3a plus CDDP and CDDP treatments. Cell lines were transfected with PC3DNA-empty and PC3DNA-Survivin vectors and after 24 hr cells were treated with DMSO vehicle (untreated cells), CDDP (3.5  $\mu$ M), Nut3a (5  $\mu$ M) and the combined treatment for 72 hr. (a) A2780cis and (b) A2780p-treated cells were lysed and analyzed by western blot. Total levels of p53, Mdm2, p21 and Survivin were analyzed in a 12% polyacrilamide gel. Actin was used as loading control. Immunoblots are representative of at least five independent experiments. Viability was measured as nonapoptotic (AnV<sup>-</sup>) and non-necrotic (PI<sup>-</sup>) cells, referred to the percentage of the viability of untreated cells. (c) Apoptosis of A2780cis and (d) A2780p cell lines was measured as AnV<sup>+</sup> and expressed as the percentage of the apoptosis of untreated cells. Data are shown as the mean of at least five independent assays  $\pm$  SD. (e) A2780cis cell line was transfected with negative-control human small interference RNA (siRNA) or human Survivin siRNA. Twenty-four hours later, cells were treated with water vehicle (untreated cells) or CDDP (3.5  $\mu$ M) for 48 hr. Apoptosis was measured as AnV<sup>+</sup> and expressed as the percentage of the apoptosis of untreated cells. Data are shown as the mean of at least four independent assays  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  statistical significance (Student's *t*-test) between siRNA<sup>-</sup> and siRNA<sup>+</sup> for CDDP treatment.

treatment increased from 23%  $\pm$  6% to 70%  $\pm$  5%, respectively (Student's *t*-test,  $p = 0.0001$ ). To further demonstrate that the senescence was irreversible, EOC cells treated for 72 hr were washed to remove the drugs and incubated for additional 4 days in fresh media. EOC cells continued expressing SA- $\beta$ Gal and showed morphological features of senescence upon removal of the drugs (Supporting Information Fig. S4). The mean percentage of positive cells with combined treatment when compared with CDDP treatment increased from 17%  $\pm$  9% to 93%  $\pm$  2.3%, respectively (Student's *t*-test,  $p < 0.0001$ ). Thus, in primary cell cultures, the double treatment Nut3a plus CDDP induced apoptosis and irreversible senescence.

Among all the wild-type *TP53* patient samples, established EOC cultures were chosen to perform MLPA and western blot analysis. When RT-MLPA was performed at 48 hr, *CDKN1A* increased in the double treatment compared to the CDDP treatment as well as proapoptotic genes such as

*NOXA*, *PUMA*, *BAX* and *APAF-1*. The antiapoptotic gene *BCL-2* decreased, as also did *SURVIVIN* (Fig. 5e and Supporting Information Fig. S5).

The results obtained at mRNA level were confirmed at the protein level by western blot (Fig. 5f). Wild-type *TP53* tumors responded to treatments inducing p53 accumulation, p21 induction and Mdm2 stabilization. Proapoptotic proteins such as Noxa, Puma and Bax tended to increase, and the antiapoptotic protein Bcl-2 disappeared with the double treatment. Most interestingly, the combined treatment CDDP plus Nut3a markedly decreased Survivin levels, concomitantly with a reduction in cell viability, especially in patient #34: 82% (CDDP alone) to 10% (combined treatment). In conclusion, the results of the present study strongly suggest that the combination of Nut3a with CDDP could be a novel treatment option to overcome CDDP resistance in ovarian cancer patients harboring wild-type *TP53* who do not respond to the standard chemotherapy.



**Figure 5.** Apoptosis and senescence induced by Nut3a plus CDDP combined treatment in epithelial OVCA (EOC) cells isolated from solid tumors and ascitic liquids. EOC cells from patients with wild-type *TP53* (#9, 10, 13, 17, 18, 33 and 34) were treated with DMSO vehicle (untreated cells), CDDP (3.5  $\mu$ M), Nut3a (5  $\mu$ M) and combined treatment for 72 hr, and (a) cells were counted in a Neubauer chamber slide. (b) Induction of apoptosis was analyzed through flow cytometry. Data are shown as the mean of two independent assays  $\pm$  SD. \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.005 statistical significance (Student's *t*-test) between the CDDP and the double treatment. (c) SA- $\beta$ Gal-positive cells of DMSO vehicle, CDDP (3.5  $\mu$ M), Nut3a (5  $\mu$ M) and combined treatment conditions were counted from five fields and referred to the total number of cells. (d) Representative photomicrographs of EOC cells stained with SA- $\beta$ Gal after 72-hr treatment with DMSO vehicle, CDDP (3.5  $\mu$ M), Nut3a (5  $\mu$ M) and combined treatment. Data are shown as the mean of two independent assays  $\pm$  SD. (e) From patients #34 and #17, cells were lysed, and expression of apoptosis-related genes was analyzed by RT-MLPA. The results are shown as logarithmic fold induction relative to untreated cells and normalized with GUSB. For row data plots, refer to Supporting Information Fig. S6. (f) From patients #34, #17, #9 and #13, protein levels of p53, p21, Mdm2, Survivin, Noxa, Puma, Bcl-2 and Bax were analyzed by western blot. Actin was used as loading control. Viability was measured as nonapoptotic (AnV-) and non-necrotic (PI-) cells, referred to the percentage of the viability of untreated cells. Bar 200  $\mu$ m. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

**Discussion**

The main result of our study is that in cisplatin-resistant cells, the combination of cisplatin with Nutlin3a enhances the cytotoxic effect of CDDP by inducing G2/M cell-cycle arrest and apoptosis. The results with established OVCA tumor-cell lines were confirmed in EOC primary cell cultures.

The A2780p cells treated with CDDP alone had a decrease in cell viability and increased G2/M from 48 hr and forward, whereas no changes occurred in the A2780cis cells. When CDDP was combined with Nut3a, viability considerably decreased at 72 hr, and cells underwent G2/M arrest.

Nut3a single treatment differently stabilized and activated p53 in the two OVCa cell lines. A2780cis cells seemed to be more sensitive to Nut3a than the A2780p cells as reflected on their higher apoptosis. This was also reflected in the gene expression profile. At the protein level, Nut3a alone decreased Survivin levels only in the resistant A2780cis cells. As these cells were derived from the sensitive A2780p cell line after exposure to increasing doses of CDDP, the different behavior of both cell lines toward Nut3a could be explained as result of the acquisition of their chemoresistant phenotype.

Both A2780cis and A2780p cell lines treated with CDDP plus Nut3a showed an increase in the proapoptotic genes *NOXA*, *PUMA*, *BAX* and *APAF-1* and a decrease in the anti-apoptotic genes *BCL-2* and *SURVIVIN*. The decrease of Bcl-2 induced by CDDP has already been described by Liu *et al.*<sup>17</sup> It is known that in OVCa, there is an inverse correlation between Bcl-2 and p53 expression<sup>18</sup> and that Bcl-2 overexpression results in protection against apoptosis.<sup>19</sup> An increase in the expression of Bcl-2 mRNA and protein is associated with resistance to CDDP in CDDP-resistant endometrial cancer cell lines, but not in CDDP-sensitive cell lines.<sup>20</sup> Our results show that in the CDDP-resistant A2780cis cells, CDDP did not downregulate Bcl-2 but Nut3a and CDDP plus Nut3a did. Finally, CDDP alone does not decrease Bcl-2 levels, but in combination with metformin, Bcl-2 is downregulated in OVCa cells.<sup>21</sup> In the present study, in A2780p cells and primary tissue cultures, CDDP treatment decreased Bcl-2 mRNA and protein levels. Likely, the downregulation of Bcl-2 is enhanced by proteasomal degradation.<sup>22</sup>

Besides Bcl-2 decrease, combined treatment was found to downregulate Survivin in OVCa cell lines and primary tissue cultures with wild-type *TP53*. Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis protein family, is implicated in carcinogenesis and cancer progression through its promoter and STAT3, NFkB and, potentially, Myc, to stimulate vigorous transcription selectively in tumor cells,<sup>23</sup> thus inhibiting apoptosis and inducing cell proliferation. The expression of Survivin in tumor tissues including OVCa has been associated with tumor progression and unfavorable clinical pathologic variables, such as poor prognosis, short patient survival rates and chemoresistance.<sup>24</sup> Wang *et al.*<sup>25</sup> show that expression of Survivin increases upon the exposure of the CDDP in resistant A2780cis cells. Thus, Survivin could be considered as a biological indicator of chemoresistance in OVCa.

Interestingly, the present work shows a decrease in Survivin in the CDDP-resistant A2780cis cells concomitantly with an increase in apoptosis induction. A synergic effect was found when the treatment of Nut3a alone and the double treatment were compared. Such decrease was not reflected in the sensitive A2780p cell line, where, in contrast to the resistant cell line, Survivin did not decrease with Nut3a alone, but it did with the double treatment. The decrease in Survivin could be responsible for the activation of apoptosis as reported in previous studies on other tumor cells.<sup>26,27</sup> Survi-

vin gene expression is transcriptionally repressed by wild-type p53,<sup>23</sup> and downregulation of Survivin has been reported to induce a block of cell entry into S phase and cell-cycle arrest in G2/M phase.<sup>28</sup>

Our cell lines responded to Nut3a by increasing the p53 levels, but only in the Nut3a-treated A2780cis cells, there was a decrease in Survivin levels. This may be related to the fact that the A2780cis cell line is more sensitive to Nut3a than its CDDP sensitive parental cell-line A2780p. When p53 was knocked down, there was more Survivin induction in A2780cis than in A2780p cells. Because p53 inhibits Survivin expression, Survivin higher induction in A2780cis cells is in agreement with their higher response to p53 activation/inhibition. The different behavior of both cell lines toward Nut3a could be explained by the divergence of the A2780cis cells from its parental cells during their acquisition of chemoresistance.

Our experiments showed that knocking down p53 expression using siRNA decreased p21 and Mdm2 to normal levels in both cell lines treated with CDDP, Nut3a or double treatment. In A2780cis cells, p53 inhibition resulted in a high induction of Survivin in all treatments, but A2780p cells showed less induction of Survivin. In conclusion, the A2780cis cell line was more responsive to activation of p53 by Nut3a (*i.e.*, Survivin decrease) than the A2780p cells while the reverse effect was obtained by the inhibition of p53 by siRNA. Moreover, p53 knockdown diminished apoptosis in both cell lines treated with Nut3a, thus demonstrating that Nut3a and therefore the double treatment induced cell-cycle arrest and apoptosis p53 dependent.

To further investigate the role of Survivin in apoptosis induction, Survivin was overexpressed, and cells underwent single and double treatments to revert apoptosis. The results suggested that upon single Nut3a and double Nut3a-CDDP treatment, cells overexpressing Survivin showed decreased apoptosis compared to cells expressing basal levels of Survivin, although the differences were not statistically significant, which is in accordance with the previously published data.<sup>13,29</sup> Thus, overexpression of Survivin would be unable by itself to abolish apoptosis completely in OVCa cells. Nevertheless, downregulation of Survivin still may play a role in apoptosis induction in concert with other changes induced by Nut3a.

Downregulation of Survivin by siRNA in the CDDP-resistant A2780cis cells treated with CDDP led to an increase in apoptosis, as did Nut3a. Thus, one of the possible effects of Survivin downregulation, either by Nut3a or by siRNA, could be chemosensitization of the resistant cells to CDDP. However, the mechanism by which Nut3a leads to Survivin downregulation remains unknown. Nevertheless, anti-Survivin therapies may be good options for chemoresistant OVCa. Several studies have demonstrated that downregulation of Survivin induces apoptosis *in vitro*<sup>26,30</sup> and *in vivo*<sup>31</sup> in other tumor-cell lines, and, recently, it has been described how it even reduces tumor growth in chemoresistant OVCa

orthotropic models.<sup>32</sup> There are several inhibitory strategies to downregulate Survivin like the use of molecular antagonists (siRNAs, antisense oligonucleotides and ribozymes), dominant negative mutants able to inhibit Survivin dimerization or Survivin activation through phosphorylation of Thr34 residue and small-molecule antagonists able to inhibit Survivin phosphorylation on Thr34 residue (CDK inhibitors) or to counteract Survivin-Hsp90 interaction (Hsp90 inhibitors).<sup>33</sup>

The results found in cell lines were confirmed in primary tissue cultures, with the use of primary cell cultures of EOC cells. Primary tissue cultures confirmed that wild-type *TP53* cells responded to Nut3a increasing apoptosis with the combined treatment. In cell lines, the double treatment caused induction of apoptosis with no induction of senescence (data not shown). In contrast, in primary cell cultures, Nut3a plus CDDP mainly caused senescence, which was irreversible. The induction of senescence by Nut3a has already been described by our group in the human glioblastoma multiforme model.<sup>13</sup> The double treatment caused cell lines enter into cell-cycle arrest in G2/M phase, and, in primary cell cultures, the persistent induction of p21 protein observed suggested that cell-cycle arrest exceeded the duration of treatment. Arrested cells would go senescent (majority of primary cell cultures) or apoptotic (primary cell cultures and mainly cell lines), thus decreasing the growth of tumor cells.

Recently, it has been described how high-grade serous OVCA harbors *TP53* mutations in 96% of tumors.<sup>34,35</sup> This histological type represents 70% of OVCA.<sup>36</sup> Thus, in principle, the other 30% of histological types and the 4% high-grade serous OVCA left (all of them wild-type *TP53*) would be suitable for the combined CDDP plus Nut3a treatment. Of the primary tissue cultures treated in the present work, four of them were wild-type *TP53* high-grade serous OVCA, two endometrioid and two mucinous histological subtypes. Endometrioid OVCA represents 10–20% of OVCA cases and the mucinous subtype,

3%.<sup>36</sup> Both endometrioid and mucinous subtypes have been reported to have low rates of *TP53* mutations,<sup>37–39</sup> which is in accordance with our primary tissue-culture analysis. Thus, 34% of the wild-type *TP53* OVCA patient population could benefit from the combined treatment.

There have been recent advances in the development of small-molecule Mdm2 antagonists as potential cancer therapeutics, with special emphasis on Nut3.<sup>40,41</sup> RO5045337 (RG7112), an oral formulation of a derivative molecule of Nut3a, is currently in phase I studies for patients with advanced solid tumors (clinicaltrials.gov identifier: NCT00559533) and refractory acute leukemia and chronic lymphocytic leukemia (NCT00623870). The aim of both studies is to determine the maximum tolerated dose and the optimal dosing schedule of RO5045337, administered as monotherapy. Preliminary data have shown acceptable safety profiles with responses in patients with liposarcoma, acute myelogenous leukemia and chronic lymphocytic leukemia.<sup>32,42</sup>

Our study shows that the combination of Nutlin3a with cisplatin induced increased apoptosis in the A2780cis-resistant cell line, thus showing the capability of Nut3a to revert their chemoresistance to CDDP. Because similar results of increased response were generalized in primary tumors, the population of advanced stage OVCA patients harboring wild-type *TP53* (around one third of cases) could benefit from such a combined therapy, thus addressing the clinically serious problem of acquisition of chemoresistance resulting from currently used therapies.

### Acknowledgements

Roser Mir Cantos and Alba Pérez-Perarnau are recipients of fellowships from AGAUR (FI-2010-2013) and Ministerio de Ciencia e Innovación, respectively. The authors thank Tom Yohannan for language assistance and Anne Ruiz de Angulo for her technical help. We also thank Esther Castaño from the Scientific and Technological Centers (CCI/TUB) of the Health Sciences Campus of Bellvitge, Universitat de Barcelona. The authors assure that there is not conflict of interest.

### References

- Pignata S, Cannella L, Leopardo D, et al. Chemotherapy in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett* 2011;303:73–83.
- Vasey PA. Resistance to chemotherapy in advanced ovarian cancer: mechanisms and current strategies. *Br J Cancer* 2003;89 (Suppl 3): S23–8.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307–10.
- Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002;2: 594–604.
- Kigawa J, Sato S, Shimada M, et al. p53 gene status and chemosensitivity in ovarian cancer. *Hum Cell* 2001;14:165–71.
- Chene P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:102–9.
- Vassilev LT. p53 activation by small molecules: application in oncology. *J Med Chem* 2005;48: 4491–9.
- Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004;303: 844–8.
- Tovar C, Rosinski J, Filipovic Z, et al. Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:1888–93.
- Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, et al. MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy. *Blood* 2005;106:3150–9.
- Cao C, Shinohara ET, Subhawong TK, et al. Radiosensitization of lung cancer by nutlin, an inhibitor of murine double minute 2. *Mol Cancer Ther* 2006;5:411–17.
- Coll-Mulet L, Iglesias-Serret D, Santidrian AF, et al. MDM2 antagonists activate p53 and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2006;107: 4109–114.
- Villalonga-Planells R, Coll-Mulet L, Martinez-Soler F, et al. Activation of p53 by nutlin-3a induces apoptosis and cellular senescence in human glioblastoma multiforme. *PLoS One* 2011; 6:e18588.
- Roh JL, Kang SK, Minn I, et al. p53-reactivating small molecules induce apoptosis and enhance chemotherapeutic cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2011;47: 8–15.
- McWhinney SR, Goldberg RM, McLeod HL. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics. *Mol Cancer Ther* 2009;8:10–16.
- Eldering E, Spek CA, Abernethy HL, et al. Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e153.
- Liu T, Peng H, Zhang M, et al. A small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell

- carcinoma cells to cisplatin. *Eur J Pharmacol* 2010;641:15–22.
18. Chan WY, Cheung KK, Schorge JO, et al. Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. *Am J Pathol* 2000;156:409–17.
  19. Powell CB, Fung P, Jackson J, et al. Aqueous extract of herba *Scutellaria barbatae*, a chinese herb used for ovarian cancer, induces apoptosis of ovarian cancer cell lines. *Gynecol Oncol* 2003; 91:332–40.
  20. Rouette A, Parent S, Girouard J, et al. Cisplatin increases B-cell lymphoma 2 expression via activation of protein kinase C and AKT2 in endometrial cancer cells. *Int J Cancer* 2012;130: 1755–67.
  21. Yasmeen A, Beauchamp MC, Piura E, et al. Induction of apoptosis by metformin in epithelial ovarian cancer: involvement of the Bcl-2 family proteins. *Gynecol Oncol* 2011;121:492–8.
  22. Luanpitpong S, Nimmannit U, Chanvorachote P, et al. Hydroxyl radical mediates cisplatin-induced apoptosis in human hair follicle dermal papilla cells and keratinocytes through Bcl-2-dependent mechanism. *Apoptosis* 2011;16:769–82.
  23. Guha M, Altieri DC. Survivin as a global target of intrinsic tumor suppression networks. *Cell Cycle* 2009;8:2708–10.
  24. Liguang Z, Peishu L, Hongluan M, et al. Survivin expression in ovarian cancer. *Exp Oncol* 2007;29: 121–5.
  25. Wang Z, Xie Y, Wang H. Changes in survivin messenger RNA level during chemotherapy treatment in ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2005;4:716–19.
  26. Uchida H, Tanaka T, Sasaki K, et al. Adenovirus-mediated transfer of siRNA against survivin induced apoptosis and attenuated tumor cell growth in vitro and in vivo. *Mol Ther* 2004;10: 162–71.
  27. Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003; 22:8581–9.
  28. Sullivan A, Syed N, Gasco M, et al. Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene* 2004;23:3328–37.
  29. Jacob NK, Cooley JV, Shirai K, et al. Survivin splice variants are not essential for mitotic progression or inhibition of apoptosis induced by doxorubicin and radiation. *Oncol Targets Ther* 2012;5:7–20.
  30. Huang Y, Jin H, Liu Y, et al. FSH inhibits ovarian cancer cell apoptosis by up-regulating survivin and down-regulating PDCD6 and DR5. *Endocr Relat Cancer* 2011;18: 13–26.
  31. Kanwar JR, Shen WP, Kanwar RK, et al. Effects of survivin antagonists on growth of established tumors and B7-1 immunogene therapy. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1541–52.
  32. Vivas-Mejia PE, Rodriguez-Aguayo C, Han HD, et al. Silencing survivin splice variant 2B leads to antitumor activity in taxane-resistant ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17: 3716–26.
  33. Pennati M, Folini M, Zaffaroni N. Targeting survivin in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2008;12:463–76.
  34. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011;474:609–15.
  35. Durinck S, Ho C, Wang NJ, et al. Temporal dissection of tumorigenesis in primary cancers. *Cancer Discov* 2011;1:137–43.
  36. Cho KR, Ie MS. Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol* 2009;4:287–313.
  37. Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, et al. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med* 2010;363: 1532–43.
  38. Kuo KT, Mao TL, Jones S, et al. Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol* 2009;174: 1597–601.
  39. Cuatrecasas M, Villanueva A, Matias-Guiu X, et al. K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: a clinicopathologic and molecular study of 95 cases. *Cancer* 1997;79:1581–6.
  40. Shen H, Maki CG. Pharmacologic activation of p53 by small-molecule MDM2 antagonists. *Curr Pharm Des* 2011;17:560–8.
  41. Secchiero P, Bosco R, Celeghini C, et al. Recent advances in the therapeutic perspectives of Nutlin-3. *Curr Pharm Des* 2011;17: 569–77.
  42. Yuan Y, Liao YM, Hsueh CT, et al. Novel targeted therapeutics: inhibitors of MDM2, ALK and PARP. *J Hematol Oncol* 2011; 4:16.