



Universitat
de les Illes Balears

TESI DOCTORAL

**NOVES ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES EN
LIMFOMA DE CÈL·LULES DEL MANTELL:
PAPER DE L'EIX FOXO3a-FOXM1**

Margalida Serra Sitjar

2017



Universitat
de les Illes Balears

TESI DOCTORAL

**NOVES ESTRATÈGIES TERAPÈUTIQUES EN
LIMFOMA DE CÈL·LULES DEL MANTELL:
PAPER DE L'EIX FOXO3a-FOXM1**

Margalida Serra Sitjar

Directors

Dra. Silvia Fernández de Mattos

Dr. Priam de Villalonga Smith

**Programa de Doctorat de Ciències Biosociosanitàries
2017**

Doctora per la Universitat de les Illes Balears

Amb el vist-i-plau dels Directors

Dra. Silvia Fernández de Mattos
Professora Titular d'Universitat
Universitat de les Illes Balears

Dr. Priam de Villalonga Smith
Professor Contractat Doctor
Universitat de les Illes Balears

Programa de Doctorat de Ciències Biosociosanitàries
Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS)

La interessada

Margalida Serra Sitjar

Palma, Juliol de 2017

A mon pare i a ma mare,

Toni i Margalida

*Take a day plant some trees
May they shade you from me
May your children play beneath*

*Blank Page
The Smashing Pumpkins*

AGRAÏMENTS

No sé si hi ha paraules suficients que puguin expressar la meva gratitud cap a tots els que me heu acompanyat al llarg d'aquest procés. Intentaré fer menció a tots amb qui hem fet plegats un trosset de camí.

Aquesta tesi ha estat possible gràcies al suport i a les ensenyances de la Dra. Silvia Fernández i del Dr. Priam Villalonga, qui em van obrir les portes del seu laboratori farà ja 9 anys. Durant tots aquests anys han aguantat les meves paranoies, malalties, absències i rareses, i sempre amb un somriure a la cara. Moltes gràcies per guiar-me al llarg de tot el camí que ens ha duit fins aquí i per la immensa paciència que heu tengut amb jo, tant a nivell científic com a nivell personal.

Els dies al laboratori passen molt més ràpid si tens uns bons companys de feina de qui aprendre, amb qui riure i, també, amb qui discutir de tan en tan. Amb el temps han passat pel grup multitud d'estudiants, doctorants i post-docs, agrair sobretot a Lamiae, Clara, Ruth, Sònia, Cristina i Elena, amb qui vaig compartir més anys d'aquesta aventura. Una especial menció a nen Fernando, amb qui vam escriure dues temporades del nostre particular culebrón "What a crew, what a cross". A les recent incorporades Bea i Julia, qui m'han conegut en una etapa una mica histèrica i així i tot me demanen consell i ofereixen ajuda.

Gràcies a la meva primera post-doc, la Dra. Antònia Obrador, qui em va facilitar els meus primers dies al laboratori. Amb el temps, n'Antònia s'ha convertit amb un referent a seguir a nivell professional i a nivell humà. Sempre que ho he necessitat ha trobat temps per escoltar-me i fer teràpia. Gràcies per compartir èxits i fracassos científics, desesperos i cotis!

Al meu company de camí doctoral, el ja Dr. Guillem Ramis, amb qui hem pipetejat colze a colze tots aquests anys, creixent i aprenent de manera conjunta. Encara que solem tenir punts de vista oposats, innovador versus tradicional, i acabarm discutint, no hagués pogut tenir millor company de viatge. Gràcies per tots els ànims i ajuda que sempre m'has donat, especialment en aquests darrers mesos quan ja tot se feia costa amunt.

Si una cosa no ha faltat al laboratori C12 han estat rialles, especialment la dels membres del grup TERCIT. Gràcies a la Dra. Marta Monjo i la Dra. Joana Ramis per ajudar-me amb els meus dubtes existencials de protocols i per animar-me a seguir endavant, i a tots els estudiants que he vist doctorar-se durant aquest temps: Manu, Maria i Alba, i a les estudiants actuals Marian Llopis i Marian Forteza.

I com no, a la Dra. Marina Rubert, companya d'aventures nòrdiques i de inseguretats científiques. La teva actitud ha estat un exemple que m'ha motivat a seguir millorant dia a dia. Gràcies per compartir tots aquests anys de confidències, grans moments i petits drames.

Als altres habitants de l'edifici, Adri, Clara, Marga Mateu, Maribel, Juanmi, Paco i Maria del Mar, amb qui hem compartit dia a dia dinars, cafès, herbes, penes i alegries. Gràcies per les xerradetes de passadís i de les rialles del menjador. Estic convençuda que encara anirem plegats, com a mínim, a Bora-Bora.

A la resta de personal d'administració i dels serveis científicotècnics, especialment a na Trinitat, amb qui hem fet molt de quilòmetres, i a na Magdalena Mas, per trobar sempre temps per ajudar-me.

A les amigues de la carrera, "bioamigues", Joana Ferrer, JuanaMari, Bàrbara, Aina, i a les que hem seguit per la UIB un temps més i que han viscut aquest procés un poc més d'aprop, Joana Cursach, Laura, Yoli i Alicia. Gràcies per creure en jo i animar-me a seguir endavant.

Als "biomachos", Miki, Pedro, Joseph i Ricardo, amb qui hem fet molts de saltos de barra i les ja tradicionals trobades estivals que acaben en un "y que fue de...?". Gràcies per tots aquests moments irreals que ens fan carregar les piles.

Molt fabulós Dr. Miki, sense els seus consells encara estaria estudiant bioquímica. Després de tots aquests anys, et segueixo considerant una amiga més, encara que segueixis sense saber que significa.

Al PAF: Cristina, Sebastià Z, Magdalena, Sebastià C., Maria, Miquel Corraler, Tomeu, Laura, Miquel M. Encara que hem passat de fer grans-hermanos i “fa-suars” a ser uns top-mantas, sempre acabam amb un plat ple de tallades damunt la taula i amb un tassó d’herbes a la mà.

Agrair a na Laura Vidal i a nen Miquel aquesta adopció dels divendres en règim de sopar i el que vengui, sempre disposats a donar-me la mà per seguir endavant.

A na Magdalena Gayà, Victòria Lerma i Margalida Grimalt, per ser les estrelles que m’acompanyen al llarg del temps i per fer-me veure les coses des de perspectives molt diverses. Plegades em travessat mig món i nedat un oceà. I a nen Pato, qui m’ha ajudat amb la portada d’aquesta tesi, i a na Pilar, que s’han afegit amb els anys. Gràcies per fer que aquest camí sigui molt més fàcil.

A na Catalina Vallbona, que va tenir el valor d’acompanyar-me a Rússia de congrés, no sé si sense voltros hagués sobreviscut!. Gràcies per tots els teus consells i per confiar sempre en jo.

A na Margalida Burguera, amb qui compartim amistat des de fa més de 30 anys. Encara que no ens podem veure tan com ens agradaria, sempre ens tenim present i ens preocupam una per l’altre.

A nen Toni Mira, que m’ha donat forces i energies cada pic que ens hem trobat i amb qui hem compartit i seguirem compartint molts anys de primavera i trinaranjus.

A nen Lluís López, per tots aquests anys de constant inconstància que ja no me sorprèn i que m’han fet valorar cada minut que passam. Gràcies pel teu continu suport.

A la família, que sempre m’ha recolzat encara que no estassin d’acord amb les meves decisions. M’agradaria tenir un record pels meus padrins Serres, Jaume i Margalida, i Patrons, Tomeu i Maria, que em van veure començar aquesta aventura des de la terra i l’han vista acabar des del cel. Al meu padrí jove Tomeu, que m’ha vist hores i hores asseguda a una cadira escrivint aquest manuscrit. A la meva cosina Margalida, que sempre s’ha preocupat per jo com una germana més. A la resta de cosins, fills de cosins i tiets i tietes, gràcies pel vostres ànims.

Al meu germà Jaume, per preocupar-se i estar pendent de jo com a bon germà gran, i que, de tan en tan, me dona lliçons per anar per enmig. “N’has d’aprendre!”. A la meva cunyada M^aAntònia i els seus sermonets motivadors i consells per posar-me les piles a l’hora de començar l’escriptura. Als meus dos nebots, Aina i Toni, que són dos Sols que il·luminen els dies més obscurs amb un simple somriure.

Als meus pares, Toni i Margalida, que han tengut l’habilitat d’aixecar-me totes les vegades que he caigut. M’han ajudat, recolzat, animat i posat els peus en terra quan ha estat necessari. Gràcies per estar sempre al meu costat i per fer-me veure que, agafi el camí que agafi, el més important és que sigui feliç.

Dins aquesta tesi hi ha una part de tots vosaltres. Gràcies de tot cor.

Caló d’en Boira

13 de Juliol de 2017

ÍNDEX

RESUM / RESUMEN / ABSTRACT

ÍNDIX DE FIGURES

ÍNDIX DE TAULES

ABREVIATURES

INTRODUCCIÓ

1. El càncer, conceptes generals	3
1.1. Oncogens i supressors tumorals	5
2. Biologia cel·lular	6
2.1. El cicle cel·lular	6
2.2. Resposta al dany al DNA	8
2.3. Apoptosi	10
2.4. Vies de senyalització : La via PI3K/AKT	12
3. La família de proteïnes Forkhead Box	14
3.1. La subfamília Forkhead Box classe O: FOXO3a	15
3.1.1. Estructura i funció de FOXO3a	16
3.1.2. Modulació de l'activitat i de l'expressió de FOXO3a	18
3.1.3. Paper de FOXO en el sistema immunitari	21
3.2. La subfamília Forkhead Box classe M: FOXM1	22
3.2.1. Estructura i funció de FOXM1	22
3.2.2. Regulació de l'activitat de FOXM1	25
3.2.3. Inhibició de l'activitat de FOXM1: siomicina-A i thiostrepton	26
4. El supressor tumoral p53	27
4.1. Estructura i funció	28
4.2. Inactivació de p53 per mutacions	29
4.3. Regulació per MDM2 i inhibició per nutlin-3a	30
5. L'eix FOXO3a-FOXM1: relació amb p53	32
6. Els limfomes.	34
6.1. Maduració de les cèl·lules B i origen de les neoplàsies	36
6.2. Els limfomes	38

6.2.1. Limfoma de cèl·lules del mantell	40
OBJETIUS	49
MATERIALS I MÈTODES	
1. Cultius cel·lulars	53
1.1. Línies cel·lulars	54
1.1.1. Característiques	54
1.1.2. Condicions de cultiu	55
1.1.3. Descongelació i criopreservació	56
1.2. Cultius primaris	57
1.2.1. Aïllament de cèl·lules primàries de pacients	57
1.2.2. Descongelació i criopreservació	58
1.2.3. Condicions de cultiu	59
1.2.4. Seqüenciació de TP53	60
2. Anàlisis cel·lular	61
2.1. Mesura de la viabilitat cel·lular	61
2.2. Determinació de l'activitat caspasa	61
2.3. Sinèrgies	62
2.4. Fàrmacs i composts químics	65
3. Anàlisis molecular	67
3.1. Tècniques d'estudi de l'expressió gènica	67
3.1.1. Extracció de l'RNA	68
3.1.2. Retrotranscripció	69
3.1.3. PCR en temps real	70
3.2. Tècniques d'estudi de les proteïnes	74
3.2.1. Western blot	74
3.2.2. Co-Immunoprecipitació	81
3.2.3. Immunofluorescència	83
4. Anàlisi estadístic	85

RESULTATS

Capítol 1. Anàlisi de l'activació de p53	89
Capítol 2. Anàlisi de la inhibició de FOXM1	111
Capítol 3. Noves estratègies terapèutiques en LCM	127
DISCUSSIÓ	139
CONCLUSIONS	161
BIBLIOGRAFIA	165

ANNEX 1. Classificació de les neoplàsies limfàtiques madures, histiocítiques i dendrítiques

ANNEX 2. Aprovació Comitè Ètic

ANNEX 3. Anàlisi complet de la seqüenciació dels pacients P002 i P006

ANNEX 4. Publicació

Obrador-Hevia, A., Serra-Sitjar, M., Rodríguez, J., Belayachi, L., Bento, L., García-Recio, M., Sánchez, J. M., Villalonga, P., Gutiérrez, A. i Fernández de Mattos, S. (2016) «Efficacy of the GemOx-R regimen leads to the identification of Oxaliplatin as a highly effective drug against Mantle Cell Lymphoma», *British Journal of Haematology*, 174(6), p. 899-910.

RESUM

El supressor tumoral FOXO3a i l'oncogen FOXM1 són dos factors de transcripció de la família *Forkhead* amb funcions antagòniques. La desregulació de l'eix FOXO3a-FOXM1 està implicada en el desenvolupament i progressió dels tumors hematològics i en l'adquisició de resistència a quimioteràpia. El limfoma de cèl·lules del mantell (LCM) és un subtipus de limfoma no-Hodgking de cèl·lula B poc freqüent però amb un comportament clínic molt agressiu. Es caracteritza per la translocació cromosòmica t(11;14) (q13;q32), que causa una sobre-expressió de ciclina D1 i una desregulació del cycle cel·lular. En l'actualitat, es considera una condició incurable donada la alta incidència de recaigudes i la resistència dels pacients als tractaments. És necessari per tant aprofundir en la recerca de noves dianes terapèutiques i nous fàrmacs per tal de establir una teràpia eficaç pel tractament del LCM. Aquest treball ha estudiat la resposta de les cèl·lules de LCM a nous agents així com a fàrmacs usats de manera rutinària a la pràctica clínic, analitzant la modulació de l'eix FOXO3a-FOXM1 en resposta als diferents tractaments.

L'activació de p53 amb nutlin-3a o amb agents de dany al DNA produeix una disminució de la viabilitat cel·lular i un augment de l'apoptosi a línies cel·lulars i a cultius primaris de LCM. Aquesta inducció de p53 va acompanyada per una activació de FOXO3a. A més, s'observa una disminució de l'expressió i la fosforilació de FOXM1, suggerint que la inducció de p53 i FOXO3a podrien estar conduint a la inhibició d'aquest oncogen. Aquests efectes són dependents de p53, donat que a les cèl·lules que presenten mutacions o delecions a p53 els diferents tractaments no afecten a les proteïnes de l'eix FOXO3a-FOXM1, d'acord amb la manca d'efecte sobre la proliferació cel·lular.

Per altra banda, la inhibició de FOXM1 amb thiostrepton o siomicina-A produeix una disminució de la viabilitat cel·lular i promou la mort per apoptosi a cèl·lules de LCM, independentment de l'estat de p53. En resposta a thiostrepton, s'activa FOXO3a i es produeix una disminució dels nivells de FOXM1 i de les seves dianes. La inhibició de FOXM1 pot constituir un tractament interessant per aquelles cèl·lules que presenten mutacions a p53 i que no responen de manera efectiva als tractaments habituals.

L'oxaliplatí és un fàrmac clínicament actiu inclòs dins el règim GemOx-R, el qual ha demostrat bons resultats a pacients de LCM. En aquest treball, s'ha comprovat la major eficàcia de l'oxaliplatí respecte al seu anàleg cisplatí en el tractament de cèl·lules de LCM. A més, en estudis de combinació hem demostrat l'existència d'un efecte sinèrgic entre l'oxaliplatí (i no el cisplatí) i la citarabina, un dels principals

fàrmacs utilitzats en el tractament del LCM. L'administració d'oxaliplatí, ja sigui en monoteràpia com en combinació amb citarabina, podria suposar una millora en l'eficàcia del tractament del LCM.

A nivell molecular, hem comprovat que el tractament amb oxaliplatí modula l'eix FOXO3a-FOXM1 en funció de l'estat de p53, ja que només a les cèl·lules amb p53-wt l'oxaliplatí activa a FOXO3a i reprimeix l'expressió de FOXM1.

Els resultats obtinguts indiquen la rellevància de l'eix FOXO3a-FOXM1 en la resposta de cèl·lules de LCM a nous agents i fàrmacs quimioterapèutics, suggerint que la modulació d'aquest eix podria ajudar a millorar les teràpies actuals i la resposta dels pacients d'aquest subtipus de limfoma. Seria per tant interessant considerar l'eix FOXO3a-FOXM1 a l'hora de plantejar possibles sinèrgies a avaluar en el tractament de LCM

RESUMEN

El supresor tumoral FOXO3a y el oncogén FOXM1 son dos factores de transcripción de la familia *Forkhead* con funciones antagónicas. La desregulación del eje FOXO3a-FOXM1 está implicada en el desarrollo y la progresión de los tumores hematológicos y en la adquisición de resistencia a la quimioterapia. El linfoma de células del manto (MCL) es un subtipo de linfoma no-Hodgking de célula B, poco frecuente pero con un comportamiento clínico muy agresivo. Se caracteriza por la translocación cromosómica t(11;14) (q13;q32), que causa una sobre-expresión de ciclina D1 y una desregulación del ciclo celular. Actualmente, se considera una condición incurable dada la alta incidencia de recaídas y la resistencia de los pacientes a los tratamientos. Es necesario por tanto profundizar en la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y nuevos fármacos con el fin de establecer una terapia eficaz para el tratamiento del LCM. Este trabajo ha estudiado la respuesta de las células de LCM a nuevos agentes y a fármacos utilizados de manera rutinaria en la práctica clínica, analizando la modulación del eje FOXO3a-FOXM1 en respuesta a los distintos tratamientos.

La activación de p53 con nutlin-3a o con agentes de daño al DNA produce una disminución de la viabilidad celular y un incremento de la apoptosis en líneas celulares y en cultivos primarios de LCM. Esta inducción de p53 va acompañada de una activación de FOXO3a. Además, se observa una disminución de la expresión y la fosforilación de FOXM1, sugiriendo que la inducción de p53 y FOXO3a podrían estar conduciendo a la inhibición de este oncogén. Estos efectos son dependientes de p53, dado que en las células que presentan mutaciones o deleciones de p53 los diferentes tratamientos no afectan a las proteínas del eje FOXO3a-FOXM1, de acuerdo con la falta de efecto sobre la proliferación celular.

Por otra parte, la inhibición de FOXM1 con thiostrepton o siomicina-A produce una disminución de la viabilidad celular y promueve la muerte por apoptosis, en células de LCM, independientemente del estado de p53. En respuesta a thiostrepton, se activa FOXO3a y se produce una disminución de los niveles de FOXM1 y de sus dianas. La inhibición de FOXM1 puede constituir un tratamiento interesante para aquellas células que presentan mutaciones de p53 y que no responden de manera efectiva a los tratamientos habituales.

El oxaliplatino es un fármaco clínicamente activo incluido en el régimen GemOx-R, que ha demostrado buenos resultados en pacientes de LCM. En este trabajo, se ha comprobado la mayor eficacia del oxaliplatino respecto a su análogo cisplatino en el tratamiento de células de LCM. Además, en estudios de combinación hemos demostrado la existencia de un efecto sinérgico entre el oxaliplatino (pero no el

cisplatino) y la citarabina, uno de los principales fármacos utilizados en el tratamiento del LCM. La administración de oxaliplatino, ya sea en monoterapia como en combinación con citarabina, puede suponer una mejora en la eficacia del tratamiento del LCM.

A nivel molecular, hemos comprobado que el tratamiento con oxaliplatino modula el eje FOXO3a-FOXM1 en función del estado de p53, ya que sólo en las células con p53-wt el oxaliplatino activa a FOXO3a y reprime la expresión de FOXM1.

Los resultados obtenidos indican la relevancia del eje FOXO3a-FOXM1 en la respuesta de células de LCM a nuevos agentes y a fármacos quimioterapéuticos, sugiriendo que la modulación de este eje podría ayudar a mejorar las terapias actuales y la respuesta de los pacientes de este subtipo de linfoma. Sería por tanto interesante considerar el eje FOXO3a-FOXM1 a la hora de plantear posibles sinergias a evaluar en el tratamiento de LCM.

ABSTRACT

FOXO3a tumour suppressor and FOXM1 oncogene are two transcription factors of the *Forkhead* family with antagonistic roles. Deregulation of the FOXO3a-FOXM1 axis is involved in the development and progression of haematological tumours and in the acquisition of resistance to chemotherapy. Mantle cell lymphoma (MCL) is a rare but very aggressive type of B-cell non-Hodgkin lymphoma. It is characterized by the t(11;14) (q13;q32) chromosomal translocation, which results in over-expression of cyclin D1 and cell cycle deregulation. It is currently considered an incurable condition given the high incidence of relapse and the patient resistance to conventional treatments. It is thus necessary to search for new therapeutic targets and new drugs in order to establish an effective therapy for treatment of MCL. In this work we have studied the response of MCL cells to new agents and to drugs conventionally used in clinical practice, analyzing the modulation of the FOXO3a-FOXM1 axis in response to the various treatments. Activation of p53 with nutlin-3a or DNA damaging agents decreases cellular viability and increases apoptosis in MCL cell lines and primary cultures. Induction of p53 is accompanied by activation of FOXO3a. Also, expression and phosphorylation of FOXM1 is reduced, suggesting that p53 and FOXO3a induction could be leading to the inhibition of the FOXM1 oncogene. These effects are p53-dependent, as these agents do not affect the FOXO3a-FOXM1 axis in cells with either mutant or deleted p53, in correlation with the lack of effect on cell viability.

Inhibition of FOXM1 with thiostrepton or siomicin-A decreases cell viability and induces apoptosis in MCL cells, regardless of its p53 status. In response to thiostrepton FOXO3a is activated and expression of FOXM1 and its targets is downregulated. FOXM1 inhibition could thus constitute an interesting therapy in mutant p53 cells, which do not respond effectively to conventional treatments.

Oxaliplatin is a clinically active drug included in the GemOX-R regime, which has shown good results in MCL patients. In this thesis we have confirmed that efficacy of oxaliplatin is higher than that of its analog cisplatin in MCL cell treatment. Combination studies prove the synergistic effect of oxaliplatin (but not cisplatin) and citarabine, one of the main drugs for MCL treatment. Administration of oxaliplatin, either in monotherapy or in combination with citarabine, could improve efficiency of MCL therapy.

At the molecular level we have confirmed that oxaliplatin treatment modulates the FOXO3a-FOXM1 axis in a p53-dependent way, given that only p53-wt cells activate FOXO3a and downregulate FOXM1 in response to oxaliplatin.

In summary, the results obtained highlight the relevance of the FOXO3a-FOXM1 axis in the response of MCL cells to new agents and chemotherapeutic drugs, suggesting that modulation of this axis could help to improve current therapies and patient response of this lymphoma subtype. For this reason it would be interesting to take the FOXO3a-FOXM1 axis into consideration when examining possible synergies for LCM treatment.

ÍNDEX DE FIGURES

INTRODUCCIÓ

Figura 1. Característiques distintives del càncer.

Figura 2. Regulació de la progressió del cicle cel·lular.

Figura 3. Mecanisme de resposta del dany al DNA.

Figura 4. Vies intrínseca i extrínseca de mort cel·lular per apoptosi.

Figura 5. Via de proliferació PI3K/Akt.

Figura 6. Representació esquemàtica de l'estructura dels factors de transcripció FOXO.

Figura 7. Activació transcripcional i processos regulats per FOXO3a.

Figura 8. Regulació de l'activitat de FOXO3a a través de la via PI3K/Akt.

Figura 9. Representació esquemàtica de l'estructura del factor de transcripció FOXM1.

Figura 10. Processos regulats per FOXM1.

Figura 11. Estructura química de thiostrepton i de siomicina-A.

Figura 12. Representació esquemàtica de l'estructura del supressor tumoral p53.

Figura 13. Regulació de l'activitat de p53 per MDM2.

Figura 14. Inhibició de la interacció de p53-MDM2 per part de nutlin-3a.

Figura 15. Relació entre p53-FOXO3a-FOXM1.

Figura 16. Estructura d'un nòdul limfàtic.

Figura 17. Maduració dels limfòcits i origen cel·lular de les neoplàsies de cèl·lules B.

Figura 18. Morfologia de les variants histològiques de LCM.

Figura 19. Translocació cromosòmica t(11;14)(q13;32) característica del LCM.

Figura 20. Vies moleculars alterades a LCM.

MATERIALS I MÈTODES

Figura 21. Fases obtingudes amb el gradient de Ficoll.

Figura 22. Representació esquemàtica de la construcció d'un isoblograma.

Figura 23. Resum dels punts per realitzar una PCR en temps real.

Figura 24. Components dels reactius per la retrotranscripció i programa de PCR utilitzat.

Figura 25. Construcció del banc de dilucions per realitzar la corba patró i fórmula utilitzada per calcular l'eficiència de la PCR en temps real.

Figura 26. Esquema dels passos a seguir per realitzar un *western blot*.

Figura 27. Esquema del Sandwich de transferència i direcció del moviment de les proteïnes.

Figura 28. Esquema del complex que es forma durant la immunoprecipitació.

RESULTATS

Capítol 1

Figura 29. Efecte de nutlin-3a sobre la viabilitat cel·lular i l'activitat caspasa a línies cel·lulars de LCM.

Figura 30. Efecte de nutlin-3a sobre la viabilitat cel·lular a cultius primaris de LCM.

Figura 31. Canvis en l'expressió gènica en resposta al tractament amb nutlin-3a.

Figura 32. Anàlisi molecular per *western blot* dels efectes de nutlin-3a sobre línies de LCM.

Figura 33. Anàlisi molecular per *western blot* dels efectes de nutlin-3a sobre cèl·lules primàries.

Figura 34. Co-immunoprecipitació de p53-FOXO3a i p53-FOXM1 en resposta a nutlin-3a.

Figura 35. Localització subcel·lular de FOXO3a a línies cel·lulars i a cultius primaris en resposta a nutlin-3a.

Figura 36. Efecte de l'etopòsid sobre la viabilitat cel·lular a línies cel·lulars de LCM.

Figura 37. Canvis en l'expressió gènica de les línies Jeko-1 i Z-138 en resposta al tractament amb etopòsid.

Figura 38. Anàlisi molecular per *western blot* dels efectes d'etopòsid sobre línies de LCM.

Figura 39. Anàlisi molecular per *western blot* dels efectes de doxorubicina sobre l'eix p53-FOXM1.

Figura 40. Co-immunoprecipitació de p53-FOXO3a i p53-FOXM1 en resposta a etopòsid.

Capítol 2

Figura 41. Efecte de thioestrepton sobre la viabilitat cel·lular i l'activitat caspasa de línies de LCM.

Figura 42. Efecte de siomicina-A sobre la viabilitat cel·lular i l'activitat caspasa a línies de LCM.

Figura 43. Efecte de thioestrepton i siomicina-A sobre la viabilitat cel·lular i l'activitat caspasa a cultius primaris de LCM.

Figura 44. Canvis en l'expressió gènica a línies cel·lulars i a cultiu primaris en resposta a thioestrepton.

Figura 45. Anàlisi molecular per *western blot* dels efectes de thioestrepton sobre cèl·lules de LCM.

Figura 46. Localització subcel·lular de FOXO3a a línies cel·lulars i a cultius primaris en resposta a thioestrepton.

Capítol 3

Figura 47. Efecte d'oxaliplatí, cisplatí i citarabina sobre la viabilitat cel·lular a LCM.

Figura 48. Efecte de la combinació de cisplatí o oxaliplatí amb citarabina a línies de LCM.

Figura 49. Anàlisi molecular per *western blot* dels efectes de cisplatí i oxaliplatí sobre línies de LCM.

Figura 50. Localització subcel·lular de FOXO3a a línies cel·lulars en resposta a oxaliplatí.

DISCUSSIÓ

Figura 51. Proposta de la modulació de l'eix FOXO3a-FOXM1 en LCM en resposta als diferents tractaments.

ÍNDEX DE TAULES

INTRODUCCIÓ

Taula 1. Classificació dels limfomes Hodgkins i no –Hodgkins.

MATERIALS I MÈTODES

Taula 2. Línies de LCM utilitzades.

Taula 3. Gens inclosos en el TruSight Tumor 15.

Taula 4. Concentracions de citarabina, cisplatí i oxaliplatí utilitzades per realitzar els isobologrames.

Taula 5. Composts químics i agents citoestàtics utilitzats.

Taula 6. Seqüències dels encebadors utilitzar en la PCRq.

Taula 7. Components de la reacció de PCRq.

Taula 8. Components del tampó de lisis per a extreure les proteïnes d'un pèl·let cel·lular.

Taula 9. Composició del tampó de càrrega 4X per a la preparació de les mostres de proteïnes.

Taula 10. Composició dels gels resolutiu i concentrador.

Taula 11. Composició del tampó d'electroforesi 10X.

Taula 12. Composició del tampó de transferència 10X.

Taula 13. Composició del TBS 20X.

Taula 14. Anticossos primaris emprats en la immunodetecció per *western blot*.

Taula 15. Composició de tampó de rentat per immunoprecipitació.

RESULTATS

Capítol 1

Taula 16. Línies cel·lulars de LCM i estat dels dos al·lels de p53.

Taula 17. Resultat de la seqüenciació per NGS dels pacients P002 i P006.

Taula 18. Valors d' IC₅₀ de oxaliplatí, cisplatí i citarabina de les línies Jeko-1 i SP-53 i del pacient P006.

ABREVIATURES

Akt/PKB: *Protein Kinase B*

ATM: *Ataxia Telangectasia Mutated*

ATR: *Ataxia Telangectasia and Rad3-related protein*

ARF19: *Auxin Response Factor 19*

BL: *Burkkit's Lymphoma*

BM: *Bone Marrow*

CDC25: *Cell division Cycle 25*

CDK: *Cyclin Dedendent Kinase*

CDKI: *Cyclin Dedendent Kinase Inhibitor*

Chk1 i Chk 2: *Checkpoint kinsase 1/2*

cDNA : *DNA complementari*

CG: *Centre Germinal*

CHOP: *Ciclofosfamida, Hidroxidaunorubicina, Oncovin i Prednisona*

DLBCL : *Diffuse Large B Cell Lymphoma*

DNA: *Desoxyribonucleic Acid*

DSB: *double strand break*

FADD: *Fas-Associated protein with dead domain*

FHRE: *Forkhead Response Element*

FL: *Follicular Lymphoma*

GADD45: *Growth Arrest and DNA Damage 45*

IC₅₀: *half maximal inhibitory concentration*

ICAD : *Inhibitor of Caspase Activated DNase*

LCC-T: *Limfoma Cutani de Cèl·lula T*

LCM : *Limfoma de Cèl·lula de Mantell*

LLA-T : *Leucèmia Limfoblàstica Aguda de Cèl·lula T*

LLC-B: Leucèmia Limfocítica Crònica de Cèl·lula B

LMA: Leucèmia Mieloide Aguda

LNH: Limfoma no-Hodgkin

MALT: *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*

MDM2: *Murine Double Minute 2*

MM: Mieloma Múltiple

mRNA: *Messenger Ribonucleic Acid*

mTOR: *Mammalian Target of Rapamycin*

MZL: *Mantle Zone Lymphoma*

NGS : *Next Generation Sequence*

NRS: *Normal Rabbit Serum*

PB: *Peripheral Blood*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PI3K: *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphatase-3-kinase*

PIP2: *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphatase*

PIP3: *phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphatase*

PLK : *Polo Like Kinase*

pRB: protein Retinoblastoma

PTEN: *phosphatase and tensin homolog*

RTK : *Receptor Tyrosine Kinase*

SGK: *Serum and Glucocorticoid Regulated Kinase*

SKP-2: *S-Phase Associated Protein Kinase*

SSB: *single strand break*

TCL: *total cell lysat*

INTRODUCCIÓ

1. El càncer, conceptes generals

La paraula càncer prové del terme grec *karkinoma*, “relatiu al cranc”. Encara que les primeres referències a la malaltia daten de l’any 1600 aC al document mèdic anomenat Papir d’Edwin Smith, es creu que va ser el metge grec Hipòcrates (460- 375 aC), considerat com el pare de la medicina, qui es va referir per primera vegada al terme *carcinoma* (Hajdu 2010).

Avui en dia, el càncer és uns dels principals problemes de salut al món, amb 14 milions de nous casos diagnosticats l’any 2012 i 8.8 milions de morts l’any 2015, segons la Organització Mundial de la Salut (OMS). Segons el darrer informe de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), l’any 2015 es van diagnosticar 247.771 casos nous de càncer a l’estat espanyol i durant l’any 2014 van morir 106.039 pacients.

El càncer es desenvolupa quan un grup de cèl·lules normals comencen a créixer de manera descontrolada i es transformen en cèl·lules tumorals en un procés que implica múltiples etapes. A cada etapa la cèl·lula adquireix noves capacitats que representen una avantatge per evadir els mecanismes de defensa de la cèl·lula i de l’organisme (Sudhakar 2010). Aquesta transformació de cèl·lules normals en cèl·lules tumorals és el resultat de la interacció entre els factors genètics de l’individu i els agents externs als quals s’exposa. Aquestes cèl·lules poden envair altres parts de l’organisme i colonitzar altres òrgans, en un procés conegut com a metàstasi. La majoria de morts a causa del càncer es produeixen per processos de metàstasi.

Actualment s’han descrit més de 100 tipus de càncers, amb els seus respectius subtipus òrgan-específic. Entre tota aquesta complexitat, existeixen unes característiques distintives que regeixen la transformació de cèl·lules normals en tumorals (Hanahan i Weinberg 2000; Hanahan i Weinberg 2011). Aquestes marques identificatives o *hallmarks* (figura 1) estan compartits per la majoria, inclús per tots, els tipus de càncer i van ser descrites per Hanahan i Weinberg (2000):

- Capacitat de les cèl·lules per créixer indefinidament, al mantenir constitutivament actives les vies de senyalització proliferatives.
- Resistència a les senyals antiproliferatives, les qual suprimeixen el creixement cel·lular.
- Capacitat d’evasió de la mort programada o apoptosi.

- Potencial replicatiu il·limitat, deguda a fusions cromosòmiques i al manteniment de l'activitat telomerasa.
- Inducció de l'angiogènesi.
- Invasió dels teixits adjacents i metàstasi d'òrgans distants, on les cèl·lules formaran petits nòduls de cèl·lules tumorals que aniran creixent.

En una revisió posterior, Hanahan i Weinberg (2011) van afegir dues característiques emergents i dues característiques de permissivitat:

- Reprogramació del metabolisme energètic de les cèl·lules tumorals, per tal d'obtenir l'energia necessària per créixer de manera constant.
- Evasió del sistema immunitari, de manera que les cèl·lules tumorals tenen la capacitat d'evitar ser detectades i destruïdes pel sistema immune.
- Inestabilitat genòmica, que resulta en un augment en la taxa de mutacions que proporcionen a les cèl·lules noves propietats que permeten la progressió tumoral.
- Augment de la inflamació, al augmentar la presència de cèl·lules del sistema immune que creen un entorn inflamatori.

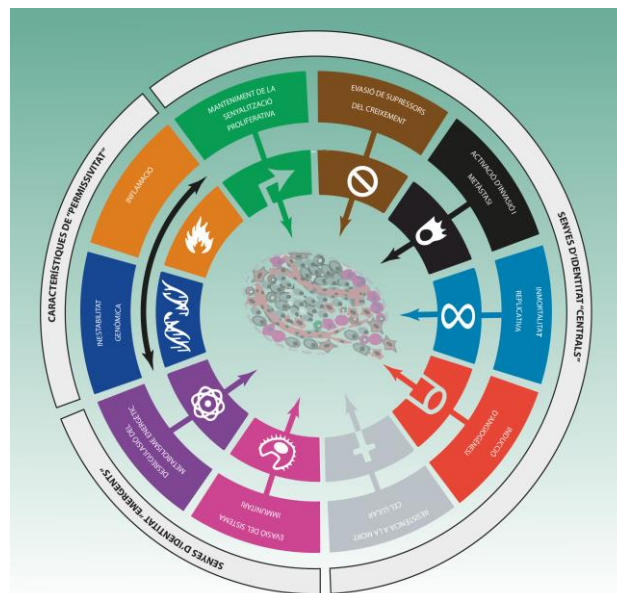


Figura 1. Característiques distintives o *hallmarks* del càncer, on s'indiquen les senyes d'identitat i les característiques de permissivitat (adaptada de Hanahan i Weinberg 2011).

1.1. Oncogens i supressors tumorals

El desenvolupament del càncer es pot atribuir a alteracions que es produeixen a un reduït nombre de gens i que alteren el seu normal funcionament. Es necessària l'acumulació de dues o més mutacions per obtenir un fenotip tumoral (Vogelstein et al. 2004; Vogelstein et al. 2013). Aquests gens relacionats amb el desenvolupament tumoral són els oncogens i els supressors tumorals. La primera evidència de que una alteració genètica podia desenvolupar un càncer es va obtenir en un estudi realitzat en limfoma de Burkitt, on es va comprovar que la mutació de l'oncogen *MYC* induïa l'inici d'un procés tumoral (Croce et al. 1983).

- **Oncogens**

Els proto-oncogens són gens que al mutar es converteixen en oncogens. Aquestes mutacions poden ser causades per mutacions puntals, amplificacions gèniques o reagrupaments cromosòmics (Todd i Wong 1999). A través d'aquestes mutacions, l'oncogen adquireix noves funcions o incrementa la seva activitat, promovent la transformació de cèl·lules sanes en canceroses (Bishop, 1991). La mutació que dona lloc a aquest tipus de gen té un efecte dominant, de manera que basta que el canvi afecti a un dels dos al·lels perquè la cèl·lula adquireixi una avantatge pel creixement.

Els oncogens codifiquen per les oncoproteïnes, les quals es classifiquen en sis tipus: reguladors de l'apoptosi, traductors de senyals, factors de creixement, receptors de factors de creixement, remodeladors de la cromatina i factors de transcripció (Croce 2008). Entre els oncogens més coneguts es troba la família RAS de GTPases petites (KRAS, NRAS i HRAS), HER2/neu i el factor de transcripció c-MYC.

- **Supressors tumorals:**

Els supressors tumorals són factors de transcripció o molècules implicades en la senyalització que inhibeixen la proliferació cel·lular en front a una situació d'estrès, com hipòxia, radiació ultraviolada o estrès oxidatiu (Papazoglu i Mills 2007), de manera que en situacions normals eviten que les cèl·lules es converteixin en tumorals. Regulen els punts de control del cicle cel·lular, la reparació del dany al DNA, la transcripció, l'apoptosi i la diferenciació. La mutació o deleció d'un supressor tumoral provoca que el gen perdi la seva funció i s'afavoreix el desenvolupament tumoral (Lai et al. 2012; Osborne et al. 2004). Entre els supressors tumorals més coneguts trobem la proteïna del retinoblastoma (pRB) i el factor de transcripció p53.

Els mecanismes moleculars exactes de les cèl·lules tumorals varien entre els diferents tipus de càncer i inclús entre individus, demostrant la complexitat de la malaltia. Els nous mètodes d'estudi han permès determinar que les múltiples vies que participen en el procés de transformació tumoral no s'han d'entendre com a vies aïllades, sinó que formen part d'una complicada xarxa d'interacció amb altres cèl·lules i amb el medi que les envolta. Per exemple, un sol oncogen pot alterar a vàries vies de senyalització que a l'hora afecten a vàries de les característiques distintives. L'estudi del càncer s'ha de realitzar des d'un punt de vista integrador, considerant que les cèl·lules tumorals poden funcionar com un òrgan que estableix relacions entre les seves cèl·lules, el medi que les envolta i amb la resta de l'organisme (Rhodes i Chinnaiyan 2005; Werb 2010).

2. Biologia cel·lular

2.1. El cicle cel·lular

El cicle cel·lular és el procés pel qual una cèl·lula prolifera i dona lloc a dues cèl·lules filles amb una dotació cromosòmica idèntica. Aquest cicle es divideix en quatre fases anomenades G1, S, G2 i M. A la fase S (síntesi) es duplica el material genètic i a la fase M (mitosi) s'obtenen dues cèl·lules filles. Aquestes dues fases van seguides d'un període de transició (gap) G1 i G2. (Berckmans i De Veylder 2009). Davant la presència de senyals antimitòtiques específiques, les cèl·lules poden sortir del cicle cel·lular i entrar en un estat quiescent o fase G0 (Park i Lee 2003).

La progressió del cicle cel·lular es realitza a través de l'activació seqüencial de diferents elements que permeten la transició entre les distintes fases del cicle. Aquestes elements són les proteïnes ciclines i les cinases dependents de ciclina (CDK). Les CDK s'activen al associar-se de manera específica amb una o vàries ciclines i realitzen la seva funció en un punt concret del cicle cel·lular. De les nou CDK identificades, només les CDK1, CDK2, CDK4 i CDK6 participen al cicle cel·lular (Vermeulen et al. 2003). Durant el cicle cel·lular, els nivells de CDK són estables, en canvi, els nivells de ciclines (A, B, D i E) va fluctuant i activant la CDK corresponent. Quan la CDK s'ha activat, activa les seves dianes per fosforilació a llocs específics (Park i Lee, 2003). La regulació anormal d'aquestes proteïnes, que provoca un augment en la divisió cel·lular, és típica de les cèl·lules canceroses.

Cada fase del cicle té al manco un punt de control, en el qual unes proteïnes reguladores anomenades inhibidores de CDK (CDKIs) poden aturar el cicle cel·lular (Lukas et al. 2004). Les proteïnes CDKI es classifiquen en dues famílies : Cip/Kip i INK4 (*inhibidor of kinase 4*). La família INK4 està formada per les proteïnes p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p19^{INK4D}, p18^{INK4C} i inhibeix específicament a CDK4 i CDK6, de manera que sols actuen a la fase G1. La família Cip/Kip està integrada per les proteïnes p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} i p57^{Kip2} i es capaç d'inhibir a les CDK durant totes les fases del cicle cel·lular (Vidal i Koff 2000) (figura 2).

El mecanisme de control del cicle cel·lular està molt regulat, ja que qualsevol desregulació pot tenir sèries conseqüències per l'organisme, com per exemple, l'inici d'un procés tumoral (Berckmans i De Veylder 2009). El cicle cel·lular es pot aturar als punts de control de G1/S , S i G2/M, per avaluar els estímuls extracel·lulars que estimulen el creixement cel·lular, la integritat del DNA i la mida de la cèl·lula (Park i Lee 2003). Al final de la fase G1 hi ha un punt d control anomenat punt de restricció (punt R), el qual és controlat pel supressor tumoral pRB. Aquest punt de control és molt important, ja que alteracions en la transició de la fase G1 a la S poden provocar una proliferació cel·lular independent dels estímuls mitòtics (Lapenna i Giordano 2009). Quan les cèl·lules entren al cicle cel·lular, les proteïnes CDK4/6 s'uneixen amb les ciclins D1, D2 i D3, de manera que es fosforila Rb i s'inactiva la seva funció. Aquesta inhibició de pRB provoca l'alliberació del factor de transcripció E2F, el qual incrementarà la transcripció de les ciclins E1 i E2. Al final de la fase G1, els complexos CDK2-ciclina també fosforilen a pRB, afavorint la transcripció dels gens necessaris per l'entrada a la fase S, com la ciclina A (Lapenna i Giordano 2009; Park i Lee 2003). El factor de transcripció E2F també activa la transcripció de gens implicats en la reparació del dany al DNA i en la dinàmica de la cromatina (Berckmans i De Veylder 2009). Un cop les cèl·lules han superat el punt de restricció, la proteïna pRB continua hiperfosforilada per l'acció dels complexos CDK1/2-ciclina A per assegurar l'entrada a la fase G2.

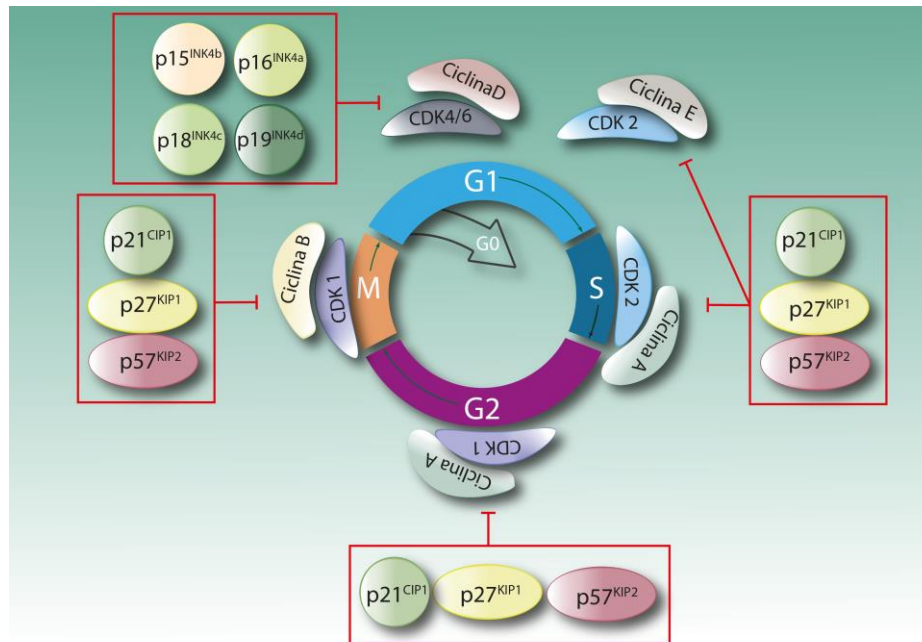


Figura 2. Regulació de la progressió del cicle cel·lular.

El dany al DNA es pot produir durant la fase S o posteriorment. Per aquest motiu es troben altres punts de control durant la fase S i a la transició G2/M, que eviten que les cèl·lules que presenten dany al DNA entrin en mitosi. Al final de la fase G2, el cicle cel·lular és arrestat al punt de control G2/M per comprovar que el DNA de les cèl·lules filles no està danyat. Un component important d'aquest punt de control és el complex CDK1-ciclina B, el qual promou la mitosi (Lukas et al. 2004). Si es detecta dany al DNA, varies proteïnes, com ATM, ATR, CHK1 o CHK2, inhibeixen l'activació d'aquest complex CDK1-ciclina B, i s'activa la reparació del dany al DNA. Si el dany és molt gran, s'activa la maquinària de mort cel·lular per apoptosi.

2.2. Resposta al dany al DNA

La resposta al dany al DNA és un procés molt complex. El mecanisme inclou proteïnes sensors que detecten la lesió al DNA, proteïnes que transmeten el missatge del tipus de dany i proteïnes efectores que reben la senyal i inicien la resposta (Schmitt et al. 2007). Cada dia es produeixen a les cèl·lules multitud d'esdeveniments que provoquen un dany al DNA, conseqüència tan de factors exògens com endògens.

El dany al DNA pot interferir amb la replicació i transcripció del DNA, provocant mutacions o aberracions cromosòmiques (Polo i Jackson 2011). La senyalització del

dany al DNA i les respostes de reparació són molt importants per mantenir la integritat del genoma i per evitar que aquestes lesions del DNA es transmetin a les cèl·lules filles (Hoeijmakers 2001). Es dany es DNA es pot provocar per ruptures de cadena simple (de l'anglès, single-strand break, SSB) o per ruptures de doble cadena (de l'anglès, double-strand break, DSB).

Les SSB no són tan perilloses com les DSB, però són molt més freqüents, de manera que cada dia se'n produeixen més d'un miler per cèl·lula. Aquestes SSB són conseqüències de l'atac directe de metabòlits intracel·lulars. Les espècies reactives d'oxigen (ROS) també poden causar SSB (Caldecott 2008). En canvi, les DSB són més agressives, ja que al afectar a les dues cadenes, no queda cap cadena motle intacte per realitzar la replicació i del DNA i eliminar aquets dany. El dany al DNA per DSB pot tenir lloc per varis motius, com en resposta dels inhibidors de la topoisomerasa II (per exemple, etopòsid o doxorubicina).

La resposta del dany al DNA (DDR , de l'anglès, DNA damage response) es una via de senyalització complexa que detecta una lesió i la transmet a la un receptor per tal que s'iniciï una resposta (Ciccio i Elledge 2011). La reparació del dany al DNA està molt relacionada amb els punts de control del cicle cel·lular, els quals aturen la progressió del cicle si detecten un estímul de dany al DNA. Aquests punts de control eviten la progressió de la fase G1 a S i de G2 a M. També es troben punts de control dins de la fase S (Jeggo et al. 2015).

Els mecanismes de DDR també poden conduir a la mort programada per apoptosi o la senescència si aquest estímul de dany al DNA persisteix o si el dany provocat és molt important (Jackson i Bartek 2010). La via de resposta al dany al DNA permet la transducció de la senyal des de un sensor que reconeix la DSB cap als seus efectors *downstream* a través d'una cascada de senyalització (figura 3) (Khanna i Jackson 2001).

En detectar-se una lesió al DNA, les proteïnes cinases ATM/ATR s'activen i fosforilen a CHK1 i CHK2, que a l'hora fosforilen i activen a la fosfatasa cdc25A, la qual inhibeix els complexos CDK2-ciclina E i eviten la progressió de la fase G1 a S (Falck et al. 2005). Les proteïnes CDKI (p21, p27, p57, p16) també s'activen en resposta al dany al DNA i provoquen l'aturada del cicle (Hunter et al. 1994).

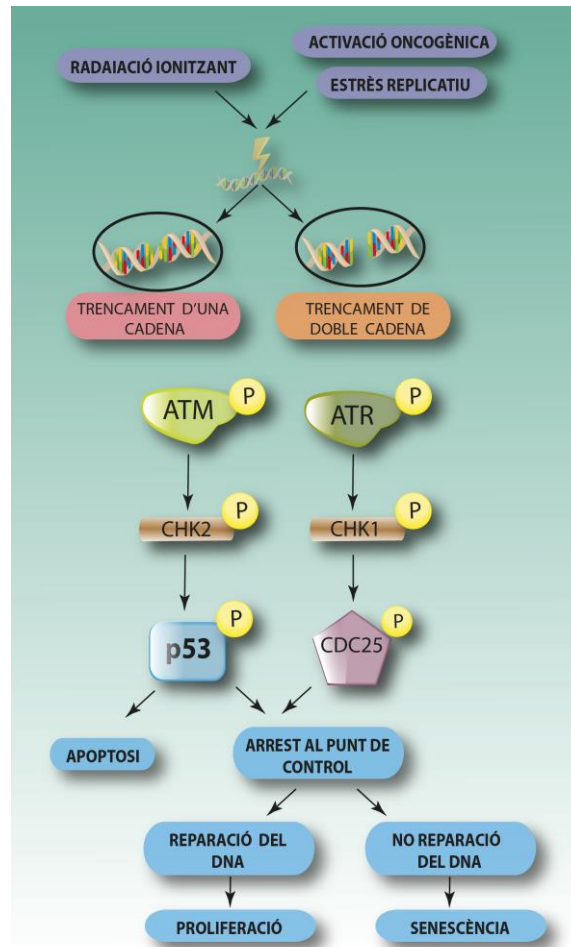


Figura 3. Mecanisme de resposta del dany al DNA (adaptada de Sulli et al. 2012)

El factor de transcripció p53 és molt important en la resposta al dany al DNA. Aquesta proteïna és molt inestable, ja que la es ubiquitinitzada per part de MDM2 i degradada al proteosoma. ATM/ATR i CHK1/CHK2 fosforilen a p53 al lloc d'unió a MDM2, de manera que p53 s'estabilitza i transcriu a altres gens implicats en la resposta al dany al DNA, com el CDKI p21, quedant així aturat el cicle cel·lular als punts de transició entre G1/S o G2/M (Shiloh 2001). Si el dany al DNA és molt important, p53 activa a gens implicats en l'apoptosi.

2.3. Apoptosi

L'apoptosi és un procés de mort cel·lular mitjançant el qual les cèl·lules s'eliminen en resposta a distints estímuls. La desregulació d'aquest programa de mort cel·lular és una característica diferencial de les cèl·lules tumorals (Hanahan i Weinberg 2011). L'apoptosi es desencadena per varis estímuls d'estrès cel·lulars, com l'estrès oxidatiu,

la desorganització dels microtúbuls o fus mitòtic, agents de dany al DNA o una infecció viral (Igney i Krammer 2002; Sunters et al. 2003). A mamífers, l'apoptosi es pot desencadenar per la via intrínseca o per la via extrínseca.

- **Via intrínseca**

Aquesta via no depèn d'estímuls externs per produir la mort cel·lular, si no que tots els processos s'inicien a la mitocòndria cel·lular a través del citocrom C. En condicions normals, el citocrom C es troba a l'espai intermembranal de la mitocòndria. En resposta a una senyal apoptòtica, la membrana mitocondrial externa es despolaritza i s'allibera el citocrom al citoplasma on desencadena la cascada de mort per apoptosi (Brenner i Mak 2009). El flux de citocrom C cap al citoplasma es controla la traves de la proteïna Bcl-2 i altres membres de la seva família (Hengarten 2000). Aquestes proteïnes tenen diferents papers a l'hora d'alliberar el citocrom C. Bcl-2 i Bcl-XL mantenen tancats els canals per on s'allibera el citocrom C, mentre que altres membres amb funcions pro-apoptòtiques com Bax, Bad, Bak i Bid actuen de manera oposada, desplaçant a Bcl-2 i permetent la sortida de citocrom C al citosol. Un cop al citosol, el citocrom C s'uneix amb Apaf-1 i forma l'apoptosoma, el qual activa la caspasa 9, la qual escindeix la caspasa 3 i s'inicia la via de senyalització de les caspases fins arribar a l'activació de substrats com ICAD, el qual fragmenta el DNA i produeix la formació de cossos apoptòtics (Igney i Krammer 2002). De manera paral·lela a l'alliberació del citocrom C al citoplasma, també s'allibera una proteïna anomenada Smac/Diablo que inhibirà a les proteïnes anti-apoptòtiques. Aquestes proteïnes anti-apoptòtiques bloquegen l'acció de les caspases unint-se a elles i evitant la seva escissió, o bé les marquen amb ubiquitina i són degradades al proteasoma (Danial et al. 2004).

- **Via extrínseca**

Una altra manera per desencadenar l'apoptosi és a través d'estímuls externs que estimulen a receptors situats a la membrana. Entre aquests receptors de mort s'inclouen els membres de la família de proteïnes dels Factors de Necrosis Tumoral (TNF) TNF- α , FAS/CD95 i TRAIL (Locksley et al. 2001). La unió d'un lligand al seu receptor, per exemple Fas, activa a una proteïna anomenada FADD que es troba associada al receptor. Es forma un complex anomenat "complex senyalitzador d'inducció de mort", el qual escindeix i activa a les caspases 8 i 10, les quals escindeixen a les caspases efectores 3, 6 i 7. A partir d'aquests punt, es segueixen els

mateixos passos que a la via extrínseca. S'ha vist que la proteïna c-FLIP pot interaccionar amb FADD i inhibir l'apoptosi per aquesta via (Elastic et al. 1997).

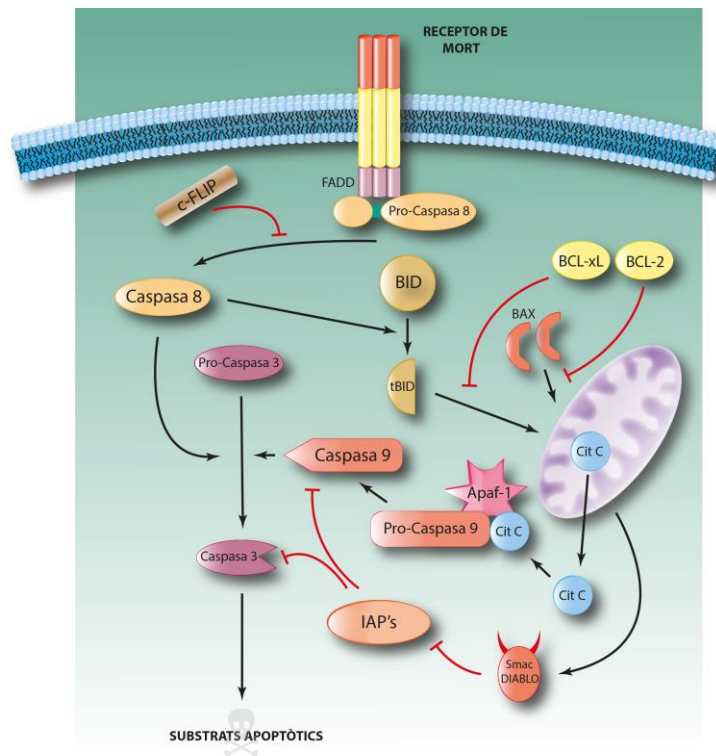


Figura 4. Vies intrínseca i extrínseca de mort cel·lular per apoptosi (adaptat de Hengartner 2000).

2.4. Vies de proliferació cel·lular: la via PI3K/Akt

La proliferació cel·lular té lloc a través de l'activació de diferents vies que es donen dins la cèl·lula. Entre elles trobem la via de PI3K on la serina/threonina cinasa Akt (o PKB) ocupa un lloc central (Song et al. 2005).

La via de senyalització PI3K/Akt intervé en la transducció de senyals extracel·lulars que regulen processos fonamentals com la progressió del cicle cel·lular, la proliferació i creixement cel·lular, l'apoptosi i la supervivència (Cantley 2002; Chang et al. 2003).

La via PI3K s'activa per la unió d'un lligand a un receptor amb activitat tirosina cinasa (TK) situat a la membrana cel·lular. Aquesta unió al receptor TK (RTK) provoca una autofosforilació en els residus de tirosina i en resposta, PI3K és reclutada a la membrana per unió a aquest residu de fosfotirosina, provocant una activació de la subunitat catalítica de PI3K. Aquesta activació provoca que PI3K transformi PIP2 en

PIP3, fet que suposa l'inici de cascada de senyalització. Aquest PIP3 actua com a segon missatger que atreu a la membrana a una sèrie de proteïnes que contenen un domini PH, com PDK1 i Akt. La interacció del domini PH d'Akt amb PIP3 provoca uns canvis conformacionals a Akt, deixant exposats els seus dos llocs principals de fosforilació. PDK1, que es troba actiu de manera constitutiva, fosforila a Akt al residu T308, de manera que Akt queda en la seva conformació activa. La fosforilació al residu S473 es necessària per la seva activació completa (Fresno Vara et al. 2004). En un pas posterior, Akt es transloca al nucli, on es troben localitzats la majoria de les seves dianes. Aquest mecanisme de translocació encara no es coneix (Martelli et al. 2012). Entre les principals dianes d'Akt es troben proteïnes que intervenen en la regulació del cicle cel·lular, la via apoptòtica i la maquinària de translació i traducció (Fresno Vara et al. 2004). Un cop activat, Akt es alliberat al citoplasma, on pot actuar fosforilant les seves múltiples dianes, entre els quals es troben la proteïna proapoptòtica Bad, l'inhibidor de CDK $p27^{kip1}$, membres de la família *forkhead* (com FOXO3a) i mTOR (Hay et al. 2005; Herna et al. 1999; Liang i Slingerland 2003) (Figura 5).

L'activitat de PI3K pot ser inhibida per la lipíd fosfatasa PTEN, que desfosforila PIP3 i forma PIP2 (Vanhaesebroeck et al. 2010). De manera similar, la fosfatasa SHIP1 també pot hidrolitzar PIP3 a PIP2.

La desregulació de la via PI3K s'ha associat amb l'oncogènesi i amb la progressió de la malaltia, tan a tumors sòlids com hematològics. L'activació oncogènica de la via PI3K es pot donar a varis nivells, com mutacions *upstream* que activen al receptor RTK, mutacions que activin a la proteïna efectora Akt o mutacions que inactivin o produeixin la pèrdua de la fosfatasa PTEN (Samuels et al. 2004). Encara que les mutacions al gen de PI3K no es freqüent als tumors hematològics, és molt comú que la via PI3K es trobi constitutivament activa, i que certes isoformes de PI3K es sobreexpressin a cèl·lules hematopoètiques (Bousquet et al. 2005).

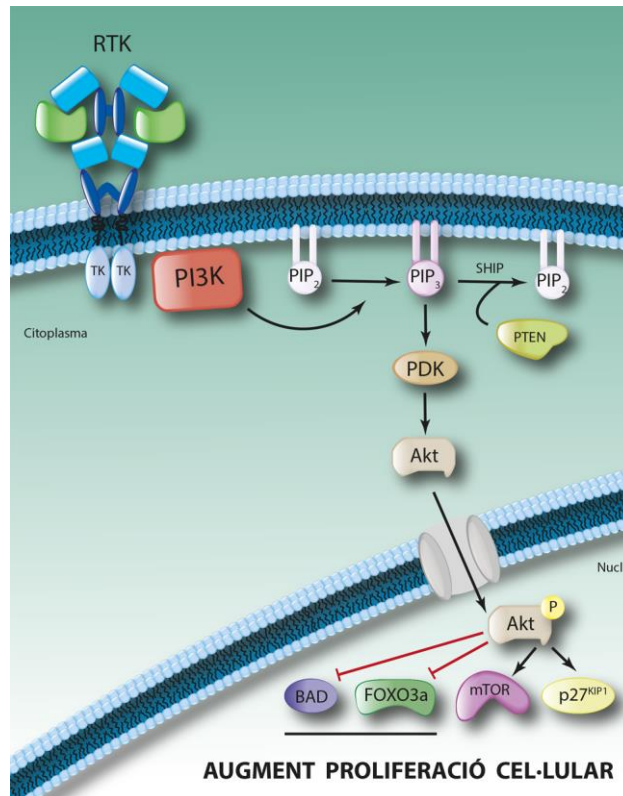


Figura 5. Via de proliferació PI3K/Akt (adaptat de Polak et al. 2012).

3. La família de factors de transcripció FOX

La família de gens *Forkhead Box* (Fox) està formada per un gran nombre de factors de transcripció que es caracteritzen per presentar un domini d'unió al DNA, anomenat domini *forkhead*, molt conservat a tots els seus membres (Weigel i Jackle H, 1990). Aquest domini *forkhead* consta d'uns 100 aminoàcids i la seva estructura tridimensional està formada per tres hèlix alfa, tres cintes beta i dos grans loops que semblen dues ales de papallona (regions alades) (Hannenhalli i Kaestner 2009).

El primer membre de la família *Forkhead* va ser identificat l'any 1989 a *Drosophila melanogaster*, com un factor nuclear implicat en el desenvolupament embrionari. (Weigel et al. 1989) Mutacions a aquesta proteïna causaven defectes embrionaris al plegament del cap de de la *Drosophila*, resultant en una estructura en forma de forca. D'aquí el nom *Forkhead*. Des de les hores, s'ha identificat més de 100 membres d'aquesta família, presents al llarg de tota la filogènia, des de *Saccharomyces cerevisiae* fins als humans (Golson i Kaestner 2016).

Segons els anàlisis filogenètics, als mamífers la família FOX es classifica en 19 subclasses que s'anomenen amb el sufix FOX seguit d'una lletra per anomenar la subclasse, des de la A fins a la S (FOXA, FOXB, FOXC...), i d'un número per anomenar cada proteïna de la subclasse (FOXA1, FOXA2, FOXA3...) (Hannenhalli i Kaestner 2009). A molts de casos, la deleció homozigòtica d'un sol gen *FOX* s'ha associat amb letalitat embrionària o perinatal. A humans, mutacions als gens *FOX* o alteracions a la seva regulació s'han associat amb alteracions del desenvolupament, càncer (Halasi i Gartel 2013), Parkinson (Kittappa et al. 2007), autisme (Bowers i Konopka 2012), i defectes en la resposta immunològica (Hinman et al. 2009).

La família Fox participa en processos molt diversos, a pesar de compartir un domini d'unió al DNA altament conservat. Les seqüències que es troben a fora d'aquest domini d'unió són les que determinen aquestes funcions tan diverses. A més, els gens de la família Fox també tenen un patró temporal i espacial d'activació que permet aquesta diversitat de funcions (Hannenhalli i Kaestner 2009). Entre aquesta diversitat de funcions es troba la regulació del desenvolupament, el metabolisme, processos cognitius i la tumorigènesi (Benayoun et al. 2011). La característica que comparteixen tots els factors de transcripció *forkhead* és el seu mecanisme d'unió a la cromatina, la interacció amb co-activadors i amb la maquinària transcripcional i regulats la seva regulació per modificacions post-traduccional.

De dins aquesta família *Forkhead*, ens centrarem en un membre de la classe O, el supressor tumoral FOXO3a i en un membre de la classe M, l'oncogen FOXM1.

3.1. La subfamília *Forkhead Box* Classe O: FOXO3a

El primer membre de la subfamília FOXO va ser identificat a *Caenorhabditis elegans* i es va anomenar DAF-16 (Thomas 1993). Posteriorment es van identificar a *Drosophila melanogaster* (dFOXO), peix zebra (*Danio rerio*), ratolins i humans (Arden 2006).

La característica comuna dels membres de la subfamília FOXO és la inserció de 5 aminoàcids (GDSNS) just abans de la hèlix H3 del domini forkhead. Aquests 5 aminoàcids no es troben presents a la resta de factors FOX (Arden 2006). A mamífers, la subfamília FOXO està integrada per 4 membres: FOXO1 (FKHR), FOXO3a (FKHR1), FOXO4 (AFX) i FOXO6 (Katoh i Katoh 2004), els quals difereixen en la seva expressió als diferents teixits.

La subfamília FOXO es important per multitud de processos biològics com el metabolisme, el desenvolupament, la diferenciació, la proliferació, l'apoptosi, la migració, la invasió i la longevitat. Donat que són essencials al desenvolupament i per mantenir l'homeòstasi, no es d'estranyar que canvis a la funció de FOX produeixin malalties o condueixin a la tumorigènesi (Myatt i Lam 2007).

El gen de FOXO3a es troba al cromosoma 6q2 i s'ha trobat expressat al cor, melsa, pulmó, ronyó, ovari, teixit adipós o cervell (Zhu et al.2004). FOXO3a també es la isoforma més expressada a limfòcits i té un rol molt important dins la limfomagènesi (Vandenberg et al. 2016).

3.1.1. Estructura i funció de FOXO3a

Els factors de transcripció FOXO3a, així com la resta de FOXOs, estan formats per 4 dominis, anomenats de l'extrem N terminal al C terminal (figura 6):

1. un domini d'unió al DNA o Forkhead Box (DBE: DNA binding element), altament conservat.
2. un senyal de localització nuclear (NLS Nuclear Localisation Signal).
3. una seqüència d'export nuclear (NES Nuclear Export Signal).
4. un domini de transactivació (TAD) a l'extrem C terminal que estimula l'activitat del promotor.

Els anàlisis d'alineament a múltiples seqüències demostren que aquestes regions es troben altament conservades (Obsil i Obsilova 2008).

Tots els FOXOs modulen l'expressió gènica al interaccionar amb el DNA a través de la seqüència consens al DNA GATAAA(C/T)A-3', anomenada FHRE (Element de Resposta a Forkhead) i que es troba altament conservada (Greer i Brunnet 2005). Multitud de gens contenen llocs d'unió a FOXO als seus promotors (Xuan i Zhang,2005). Un cop unit al DNA, FOXO3a actua coma un potent activador transcripcional (Brunet et al. 1999).

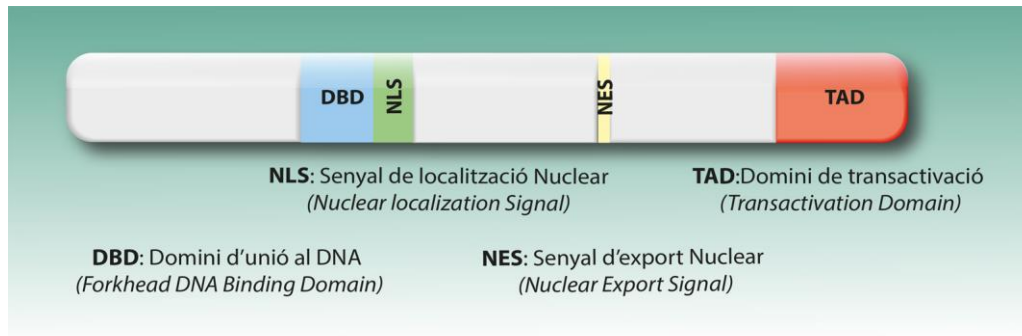


Figura 6. Representació esquemàtica de l'estructura del factors de transcripció FOXO.

El factor FOXO3a en estat desfosforilat es troba en la seva forma activa, entra a l'interior nuclear i s'uneix als elements de resposta *forkhead* (FHRE) situats al promotor dels seus gens dianes. Seguidament, es forma un complex amb el co-activador histona acetil-transferasa CBP/p300, relaxant l'estructura de la cromatina i afavorint la unió de la maquinaria transcripcional (Wang et al. 2009). Aquesta activitat transcripcional s'inhibeix quan, es resposta a senyals de creixement, FOXO3a és fosforilat i exportat des del nucli cap al citoplasma (Brunet et al. 1999).

Un cop activat, el supressor tumoral FOXO3a actua com un potent factor de transcripció que regula l'expressió de gens que participen en multitud de processos cel·lulars. FOXO3a promou l'aturada del cycle cel·lular al transcriure els inhibidors del cycle cel·lular p21^{cip1} (Hauck et al. 2007), p27^{kip1} (Medema et al. 2000) o en reprimir reprimeix l'expressió de la ciclina D1 i D2 (Schmidt et al. 2002), provocant una aturada a la fase G1. Participa en la resposta al dany al DNA al induir l'expressió de ciclina G2 i de GADD45 (Tran 2002), produint una aturada del cycle en fase G2. També activa la transcripció de gens implicats en l'apoptosi com TRAIL i FasL, Bim, Noxa o PUMA (Brunet et al. 1999; Obexer et al. 2007; Stahl et al. 2002; You et al. 2006).

Al estar implicats en la regulació del cycle cel·lular, reparació del dany cel·lular i apoptosi, no és d'estranyar que el factors de transcripció FOXO3a tinguin un paper molt important a la carcinogènesi. A més, les vies moleculars que regulen l'activitat de FOXO3a estan implicades en la proliferació cel·lular i tumorigènesi, com la via PI3K/Akt. L'activitat de de FOXO3a dins una via d'aquestes vies desregulades poden conduir a la tumorigènesi.

Altres processos on també participa FOXO3a estan relacionats amb el metabolisme, al induir l'expressió de gens implicats el control del metabolisme de la glucosa, com la glucosa-6-fostafasa (G6Pase) i la fosfoenolpiruvat carboxicinas (PEPCK), i en la resposta a l'estrès oxidatiu, al promoure la transcripció dels enzims manganès superòxid dismutasa (MnSOS) i catalasa, protegint així a les cèl·lules l'estrès oxidatiu (van der Horst i Burgering 2007).

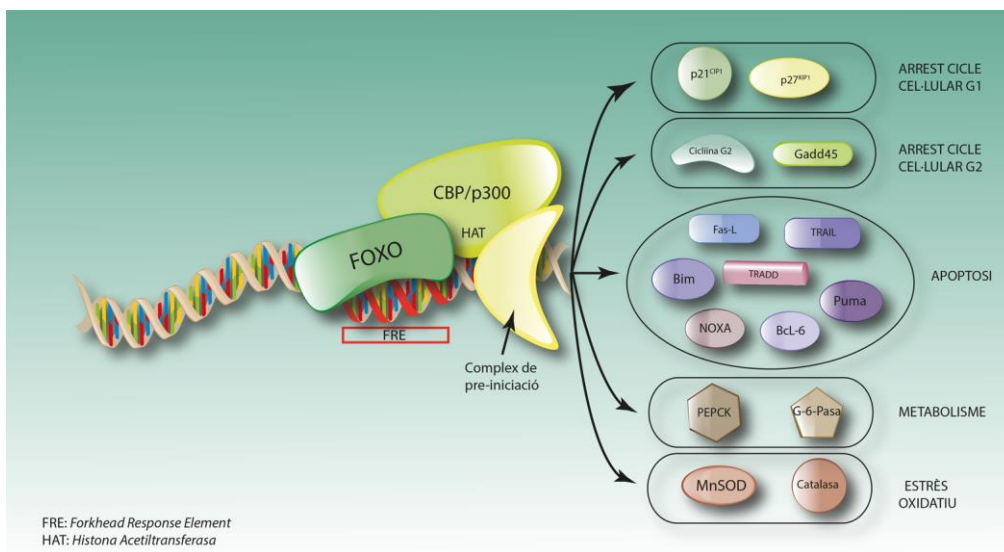


Figura 7. Activació transcripcional i processos regulats per FOXO3a.

3.1.2. Modulació de l'activitat i de l'expressió de FOXO3a

Els factors de transcripció FOXO son modulats en resposta a varies modificacions post-traduccionals, tals com acetilació, ubiquitinització i fosforilació que provoquen una alteració en la seva localització subcel·lular, un canvi en la modulació de l'activitat transcripcional i un canvi en la estabilitat de la proteïna (Greer i Brunet 2005). La combinació d'aquests mecanismes s'han descrit com "el codi FOXO" i son essencials pel funcionament de FOXO3a (Calnan i Brunet 2008).

- **Regulació per fosforilació**

El principal mecanisme de regulació de FOXO3a és la fosforilació per part de diverses cinases, com Akt o SGK (Serum and Glucocorticoid Inducible Kinase), provocant la inactivació de FOXO3a i la seva exclusió nuclear (Burgering i Kops 2002). De manera general, es considera a Akt com el principal regulador de FOXO3a (Reagan-Shaw i Ahmad 2007).

L'activació de la via PI3K per part de factors de creixement, insulina o qualque altre estímul de proliferació produeix l'activació de diverses cinases, com Akt o SGK (Brunet et al. 2002), els quals actuen fosforilant a FOXO3a a tres residus conservats (threonina 24, serina 253 i serina 316). Un cop fosforilat, FOXO3a s'uneix a les xaperones 14-3-3 i és translocat del nucli cap al citoplasma, quedant així inactivada la seva capacitat de regular l'expressió gènica (Brunet et al. 1999). La fosforilació de FOXO3a dins el domini forkhead (serina 253) disminueix la seva capacitat d'unir-se al DNA i per tant, inhibint la seva capacitat transcripcional (Obsil i Obsilova 2008).

Altres cinases importants que modulen l'activitat de FOXO3a són ERK i IKK, les quals fosforilen a FOXO3a a diversos residus de serina, de manera que es promou la seva exclusió dels nuclis. Aquestes fosforilacions afavoreixen la interacció amb la proteïna E3 ubiquitin lligasa MDM2 i la seva posterior degradació (Yang et al. 2008).

En canvi, en resposta a estímuls d'estrès cel·lular o en presència d'elevats nivells de ROS, s'activen les cinases AMPK o JNK, les quals fosforilen a FOXO3a a uns altres residus, provocant en aquest cas la seva localització a l'interior del nucli i el restabliment de la seva activitat transcripcional (Greer i Brunet, 2009; Eijkelenboom i Burgering 2013).

La regulació de FOXO3a per fosforilació és reversible. Recentment s'ha identificat a la fosfatasa PP2A (Protein Phosphatase 2) com la proteïna que provoca la desfosforilació de FOXO3a (Singh et al. 2010).

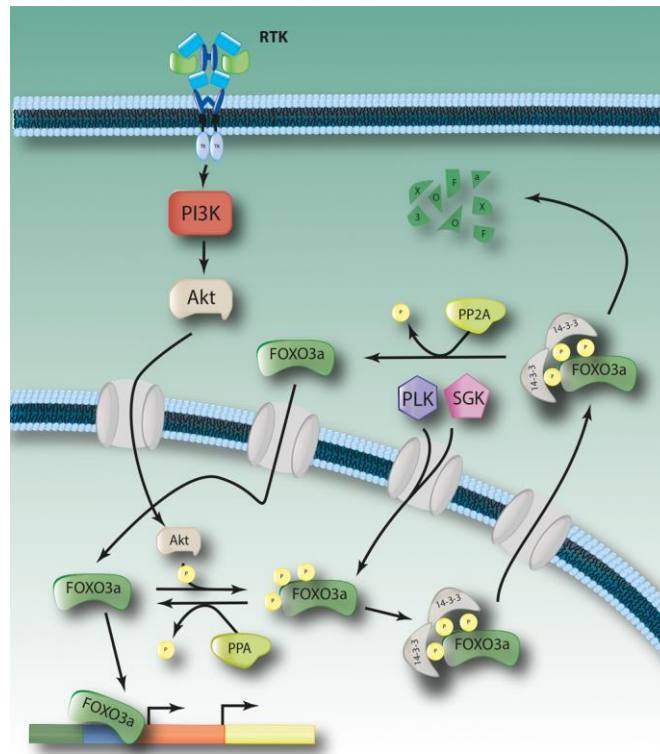


Figura 8. Regulació de l'activitat de FOXO3a a través de la via PI3K/Akt.

- **Regulació de l'expressió de FOXO3a**

FOXO3a s'expressa de forma ubiqua a tots els tipus cel·lulars, però els seus nivells d'expressió varien en funció del tipus cel·lulars i de les condicions fisiològiques, de manera que la regulació de la seva expressió és complexa i regulada a diferents nivells.

A nivell transcripcional, s'ha vist que E2F-1 i STAT3 s'uneixen als promotors de FOXO3a i indueixen la seva expressió (Nowak et al. 2007; Oh et al. 2011). A més, els factors de transcripció FOXO poden produir la seva pròpia transcripció en un sistema de *feedback loop* positiu amb FOXO3a (Essaghir et al. 2009).

Recentment, s'ha descrit una regulació per interacció de FOXO3a amb altres proteïnes. Entre elles, destaca el factor de transcripció p53 com activador de la transcripció de FOXO3a (Kurinna et al. 2010; Renault et al. 2011), de manera que p53 (o el seu homòleg TA-p73) s'uneixen al promotor de FOXO3a i promouen la seva transcripció. Tant p53 com TA-p73 s'uneixen a un element de resposta a p53 situat al promotor de FOXO3a. Dins el segon intró de FOXO3a hi ha un altre d'unió per p53. (Kurinna et al. 2010).

Un altre mecanisme de regulació de l'expressió de FOXO3a és a través de micro RNA (miRNA). Els miRNA són un tipus de RNA endogen no codificant que, de forma post-traducciona, suprimeix el mRNA del gen i reprimeix la seva expressió (Bartel 2009; Lau 2001). El primer mirRNA diana de FOXO3a, identificat a càncer de mama, és el miR-155 i suprimeix l'expressió de FOXO3a, induint la supervivència de la cèl·lula tumoral i la seva quimioresistència (Kong et al. 2010).

3.1.3. Paper de FOXO en el sistema immunitari

En el context del sistema immunitari, FOXO actua a diferents nivells limitant l'expansió o activació de les cèl·lules hematopoètiques madures (Tothova et al. 2007). La deleció de FOXO3a a experiments *in vivo* causa la proliferació i hiperactivitat de les cèl·lules T, provocant una síndrome inflamatòria multi-sistèmica (Lin et al. 2004). Per tant, FOXO3a intervé en la supressió de la inflamació a mamífers. Aquests estudis assenyalen que els factors FOXO són importants per controlar la funció i desenvolupament dels limfòcits T i B (Dejean et al. 2009).

La via PI3K és essencial per la proliferació de les cèl·lules B. L'activació del receptor de cèl·lules B (BCR) produeix una activació de la via PI3K. El principal efector d'aquesta via, Akt, té un paper essencial en determinar el destí de les cèl·lules B, ja que pot promoure l'activació o inhibició de varies vies de senyalització. La via PI3K es troba constitutivament activada durant el creixement de cèl·lules B i l'expansió clonal. FOXO3a és uns dels principals substrats de Akt, de manera que la inactivació de FOXO3a és important per la proliferació de les cèl·lules B (Yusuf et al. 2004).

A més, l'eix Akt-FOXO3a és important per la supervivència de les cèl·lules B perifèriques (Ramadani et al. 2010) i per la seva diferenciació, determinant el seu pas per la zona marginal del nòdul limfàtic i la diferenciació cap a cèl·lules plasmàtiques o cèl·lules de memòria (Limon i Fruman 2012).

3.2. El factor de transcripció FOXM1

L'any 1997 es va identificar a FOXM1, també conegut com a MPP2, HFH11, FKHL16, WIN o trident, com a un nou membre de la superfamília de factors de transcripció forkhead (Korver et al.1997). A diferència dels altres membres de la família *forkhead*, FOXM1 és dels pocs que està associat a la proliferació i al que se li adjudiquen funcions oncogèniques.

3.2.1. Estructura i funció de FOXM1

El gen humà de FOXM1 està format per 10 exons, situats en el cromosoma 12p13-3 (Korver et al. 1997). A través de l'*splicing* alternatiu dels exons Va i VIIa , s'obtenen 3 isoformes: FOXM1a, FOXM1b i FOXM1c. Només les isoformes FOXM1b i FOXM1c són transcripcionalment actives (Sha et al. 1997). Aquestes isoformes reconeixen la mateixa seqüència consens de DNA 5'-A-C/T-AAA-C/T-AA-3' (Littler et al. 2010).

La seva estructura és molt semblant a la dels factors FOXO, amb regions diferenciades que desenvolupen diferents funcions:

1. Un extrem N-terminal, on es troba un autorepressor anomenat NRD-N (N-terminal regulatory domain)
2. Un domini forkhead d'unió al DNA (DBD), en el centre de FOXM1
3. Una zona central, on es troben dos dominis:
 - Un domini de transrepressió (TRD).
 - Un domini negatiu de regulació (NRD-C), també anomenat de reclutament Rb (retinoblastoma).
4. Un extrem C-terminal, amb el domini de transactivació (TAD).

El domini *forkhead* d'unió al DNA (DBD) reconeix el seu lloc d'unió al promotor del seu gen diana i el domini de transactivació (TAD) activa la transcripció. El domini de transrepressió (TRD) i el domini negatiu de repressió (NRD-N) reprimeixen la transcripció realitzada pel TAD, mantenint a FOXM1 en estat inactiu. El domini de repressió NRD-C recluta a pRB com a co-repressor i reprimeix al TAD de manera indirecta (Wierstra 2013).

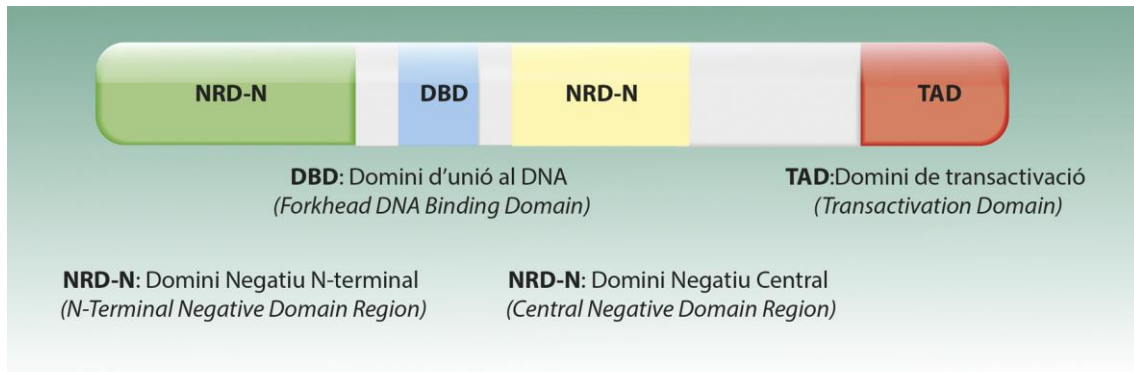


Figura 9. Representació esquemàtica de l'estructura del factor de transcripció FOXM1.

FOXM1 presenta un patró d'expressió típicament associat a estats proliferatius. S'expressa de forma ubíqua durant el desenvolupament embrionari, però a cèl·lules adultes normals la seva expressió queda restringida a cèl·lules que es divideixen de manera activa o a teixits que s'autoregeneren. L'expressió de FOXM1 és baixa o nul·la a cèl·lules en estat quiescent, senescent o diferenciades (Bolte et al. 2011). Generalment, l'augment de l'expressió de FOXM1 està associat a un avançat estadi tumoral, un elevat rati de proliferació i una mala prognosi (Uddin et al. 2012).

FOXM1 regula multitud de processos biològics, entre els quals es troben la proliferació cel·lular, la regulació del cicle cel·lular, la diferenciació, la resposta del dany al DNA, la homeòstasi dels teixits, l'angiogènesi, l'apoptosi i la resistència a fàrmacs.

En general FOXM1 regula l'expressió de proteïnes relacionades amb el control del cicle cel·lular. FOXM1 és un regulador clau de la transició de les fases G1/S i G2/M i de la progressió mitòtica. FOXM1 regula l'expressió de varis gens implicats en aquests processos, com ciclina B, aurora kinasa PLK-1 i survivina. Altres gens dianes de FOXM1 codifiquen per proteïnes implicades en la replicació del DNA i l'execució de la mitosi, o per components de les vies de senyalització proliferatives. FOXM1 estimula la proliferació cel·lular i la progressió del cicle cel·lular promovent l'entrada a la fase S i a la fase M (Barsoti i Prives 2009, Halasi i Gartel 2011).

Uns dels processos més importants per la tumorigènesi i la progressió del càncer és l'angiogènesi (Hanahan i Weinberg 2000; Hanahan i Weinberg 2011). El factor de creixement endotelial vascular VEGF, clau per la angiogènesi, és una diana directe de FOXM1. La sobre-expressió de FOXM1 induïx l'angiogènesi a cèl·lules de glioma (Zhang et al. 2008). A cèl·lules pancreàtiques s'ha vist que la inhibició de FOXM1 redueix l'expressió de la metaloproteïna de matriu-2 MMP-2, MMP-9 i VEGF, inhibint

la migració cel·lular, la invasió i l'angiogènesi (Wang et al. 2007).

FOXM1 també pot inhibir la senescència. La delecio de FOXM1 a cèl·lules gàstriques disminueix c-MYC i Skp-2 i produeix un increment de p27^{Kip1}. A més, el silenciament de FOXM1 inhibeix l'enzim telomerasa, important per la immortalitat cel·lular (Zeng et al. 2009). La sobre-expressió de FOXM1 suprimeix la senescència cel·lular i l'expressió de p53 i p21 (Li et al. 2008).

Una de les funcions més interessants de FOXM1 és la seva implicació en el desenvolupament de la resistència a la quimioteràpia. Estudis recents demostren que FOXM1 està implicat en la resistència al cisplatí (Kwok et al. 2010; Wang et al. 2013). A càncer de mama, les cèl·lules resistents a cisplatí expressen elevats nivells de FOXM1 tan a nivell de proteïna com de mRNA. A càncer de mama, la depleció de FOXM1 millora la sensibilitat de les cèl·lules al tractament amb epirubicina (Monteiro et al. 2013). També s'ha vist el paper de FOXM1 a la resistència a altres fàrmacs com les antraciclines doxorubina i epirubicina (Halasai i Gartel 2012; Millour et al. 2011, Park et al. 2012) o a teràpia molecular dirigida amb gefitinib o trastuzumab, els quals inhibeixen a FOXM1 de manera indirecta a través de l'activació de FOXO3a (Koo et al. 2012).

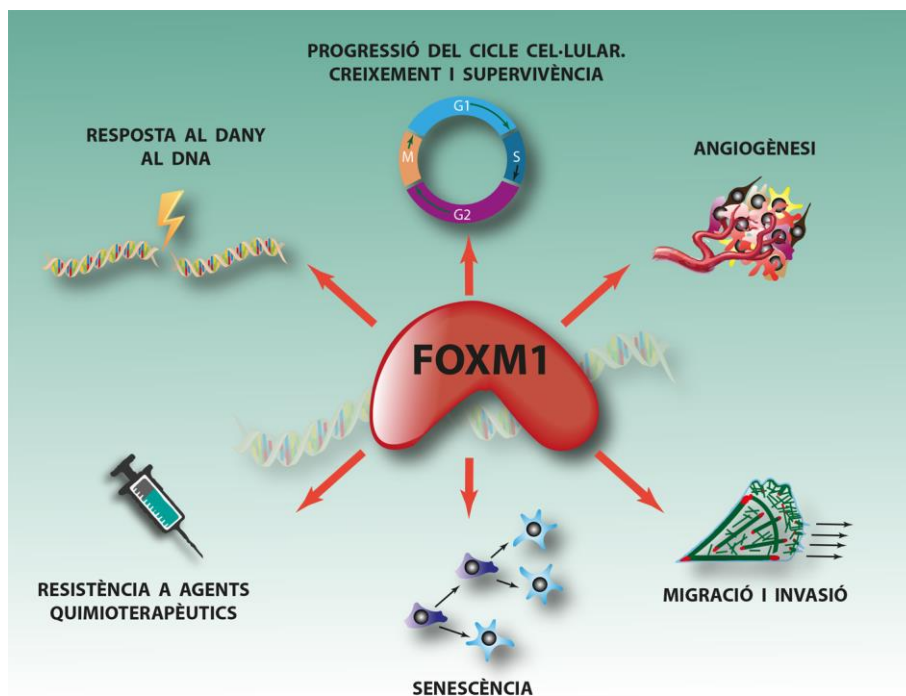


Figura 10. Processos regulats per FOXM1 (adaptat de Koo et al. 2012).

3.2.2. Control de l'activitat de FOXM1

La activitat transcripcional de FOXM1 es correlaciona amb el seu estat de fosforilació, de manera que en estat inactiu es troba en forma hipofosfilat i a mesura que augmenta el seu estat de fosforilació, també augmenta la seva activitat.

FOXM1 és un regulador crític del cicle cel·lular i presenta un patró d'expressió diferencial al llarg el cicle cel·lular, per tant, no es d'estranyar que la seva activitat estigui molt controlada per modificacions post-traduccionals durant el cicle cel·lular, permetent així una expressió ordenada dels seus efectors diana i la prevenció d'una proliferació descontrolada. Múltiples cinases, com Plk-1 o CDK1, intervenen en la fosforilació de FOXM1 a l'inici del cicle cel·lular, arribant a un màxim de fosforilació a la transició G2/M (Fu et al. 2008; Chen et al. 2009).

Els supressors tumoral pRB i p53 controlen a FOXM1. Estudis demostren que pRB s'uneix directament a al domini de regulació negatiu de FOXM1 i inhibeix la seva activitat transcripcional (Wierstra i Alves 2006).

S'ha descrit com el supressor tumoral p53 és un inhibidor de FOXM1, existint una correlació inversa entre els nivells de p53 i FOXM1. L'expressió de FOXM1, tan a nivell de mRNA com de proteïna, estan augmentats quan s'inactiva o elimina p53, suggerint que p53 regula de manera negativa a FOXM1 (Pandit et al. 2009; Barsotti i Prives 2009, Zhang et al. 2014). Aquests resultats impliquen que la mutació o inactivació de p53 que es troben en el 50% dels càncers humans podria ser una de les causes majoritàries de la sobreexpressió de FOXM1 que presenten les cèl·lules tumorals.

Un altre regulador negatiu de FOXM1 és el supressor tumoral ARF. Estudis realitzats a carcinoma hepatocel·lular (Gurasova et al. 2007) o a leucèmia limfoblàstica aguda (Buchner et al. 2015) han demostrat com el tractament dirigit amb el pèptid ARF s'uneix a FOXM1 i promou la seva degradació, inhibint així la seva funció (Kalinichenko et al. 2004; Lam et al. 2013).

augmenta l'activitat apoptòtica (Uddin et al. 2012). Pareix que thiostrepton pot inhibir específicament a FOXM1 sense interactuar amb altres proteïnes (Bhat et al. 2009). El mecanisme exacte d'acció d'aquests compostos encara no està ben definit, però es creu que està relacionat amb l'habilitat d'aquests antibiòtics per inhibir el proteosoma (Gartel 2011; Gartel 2013). A més, s'ha vist que aquests compostos no tenen cap efecte antiproliferatiu o antiapoptòtic a cèl·lules normals, de manera que són molècules molt atractives per l'estudi de fàrmacs anticancerígens (Myatt et al 2007; Bhat et al. 2009).

Aquests antibiòtics no afecten a l'activitat transcripcional *per se*, sinó que inhibeixen la expressió de FOXM1 tan a nivell de mRNA com a nivell proteic, el mecanisme exacte pel qual actua encara es desconeix, encara que podria estar relacionat amb la seva capacitat d'inhibir el proteosoma (Gartel 2011). Això suggereix que FOXM1 podria estar involucrat en un *loop* d'autoregulació positiva, és a dir, regula la seva pròpia transcripció. El significat funcional d'aquesta autoregulació encara no està elucidat.

4. El supressor tumoral p53

El supressor tumoral p53 està considerat el guardià del genoma i té un paper central en la supressió tumoral. És l'encarregada de coordinar la resposta cel·lular produïdes per estímuls com ruptures a la cadena del DNA, per radiacions UV o per activitats oncogèniques, entre altres. Segons el tipus i nivell de l'estímul, p53 pot evitar mecanismes d'apoptosi, senescència, parada del cicle cel·lular, reparació del dany al DNA, metabolisme cel·lular o autofàgia (Volgestein et al. 2000). Per realitzar qualsevol d'aquestes accions, p53 actua com a factor de transcripció activant o reprimint la transcripció de gens essencials per a cada tipus de resposta. La proteïna p53 es troba molt ben regulada per una sèrie de modificacions postraduccionals durant l'homeòstasi en cèl·lules normals i en resposta a un estímul d'estrès (Kruse et al. 2009).

4.1. Estructura i funció de p53

El factor de transcripció p53 està codificat pel gen *TP53*, que es troba situat al cromosoma 17 (17p13.1). El gen *TP53* està format per 11 exons amb dos llocs alternatius de traducció, un situat a l'exó 2 i l'altre a l'exó 11. La proteïna p53 es pot dividir varis dominis, cada un dels quals té una funció específica (Shu et al. 2006).

1. Un domini N-terminal, format per de 2 domini de transactivació (TAD), i a través del qual interacciona amb el seu inhibidor MDM2, seguida d'una regió rica en prolins.
2. Una regió central on es troba el domini d'unió al DNA, el domini *core*, on es produeixen el 90% de les mutacions.
3. Un domini d'oligomerització, que permet la tetramerització de p53, essencial per la seva activitat. En aquest domini també es localitza la senyal d'exportació nuclear (NES).
4. Un domini regulador C-terminal, amb 3 senyals de localització nuclear (NLS).

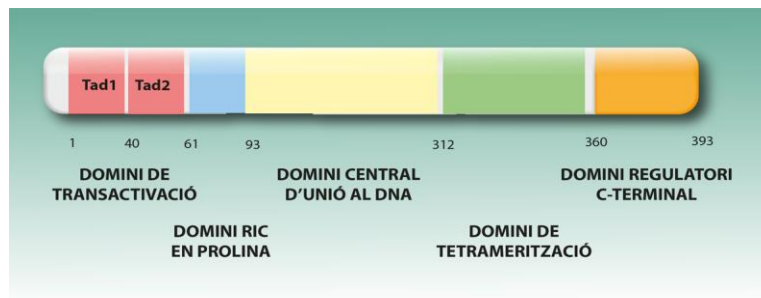


Figura 12. Representació esquemàtica de l'estructura del supressor tumoral p53.

En condicions normals, els nivells de p53 són baixos, però en resposta a un estímul o a un estrès (anòxia, llum UV, dany al DNA o canvis en la regulació del creixement) es produeix una inducció de la seva expressió (Levine i Oren 2009). Aquesta inducció provoca la seva ràpida acumulació al nucli i el canvi en la seva conformació que facilita la seva activitat transcripcional. L'estímul més important per la seva activació es la fosforilació al domini de transactivació N-terminal, que pot ser produït per múltiples cinases, com ATR, ATM o CHK1/2 (Toledo i Wahl 2006). Altres modificacions inclouen acetilacions, sumoilacions i metilacions (Harris i Levine 2005; Lavin i Gueven 2006). Aquestes modificacions són importants en la interacció entre p53 i MDM2, al disminuir la afinitat entre aquestes dues proteïnes.

La proteïna p53 funciona com un factor de transcripció que s'uneix directament a una seqüència de DNA del seus ges dianes (Pietenpol et al. 1994). Després de la seva activació, p53 actua regulant l'expressió de gens que participen a multitud de processos com en l'aturada del cicle cel·lular (p21, 14-3-3 σ) l'apoptosi (Bax, Bid, Noxa, Puma), la senescència, la reparació del dany al DNA (GADD45, PCNA), l'anti-angiogènesi (Maspin, BAI1, TSP1), evitant que la cèl·lula pateixi una transformació neoplàsica (Joerger i Fersht 2008; Krusse et al. 2009).

La resposta de l'activació p53 es complexa i depèn del tipus cel·lular o del context cel·lular. Les conseqüències de l'activació de p53 depenen del grau de l'estímul. Estímuls intensos produeixen apoptosi i senescència, mentre que estímuls més dèbils causa arrest cel·lular mentre la cèl·lula intenta arreglar el dany (Levine i Oren 2009).

4.2. Inactivació de p53 per mutacions

Els dos principals mecanismes d'inactivació de p53 consisteixen en mutacions, especialment substitucions d'una base, i pèrdua d'al·lels. La majoria d'aquestes mutacions son de canvi de sentit (*missense*) i causen substitucions simples de nucleòtids. En canvi, les mutacions sense sentit (*nonsense*) o que produeixen un desplaçament del març de lectura (*frameshift*) i no són tan freqüents (Olivier et al. 2010). Quasi el 90% de les mutacions es troben entre els codons 125 i 300, corresponent a la zona del domini d'unió al DNA. La mutació simple més comuna és la substitució C:G>T:A als llocs CpG. Una tercera part de les mutacions *missense* al gen *TP53* es troben localitzades a 6 codons hotspot; 175,245,248,249,273 i 282 (Brosh i Rotter 2009). L'efecte de les mutacions de p53 poden variar. Qualque mutació *hotspot* ha demostrat una adquisició de noves funcions a un al·lel específic, que atorga noves propietats a la proteïna mutant p53, com activitats oncogèniques. Per una altre banda, la unió d'un monòmer de p53 mutat a un p53 *wild type* pot comprometre la funció de tot el tetràmer. Els efectes dominants negatius poden explicar el perquè, encara q no hi hagi més TSGs, TP53 està afectat tan freqüentment per mutacions *missense* (Olivier et al. 2010).

4.3. Regulació per MDM2 i inhibició per nutlin-3a

En condicions normals, p53 és una proteïna molt inestable, amb una vida mitjana curta de 5-30 minuts i sense activitat transcripcional evident (Yuan et al. 1996). En presència d'un estrès, es bloqueja la degradació de p53, la qual s'estabilitza i activa (Caspari et al. 2000). El principal mecanisme que explica aquesta vida mitjana curta consisteix en un bucle de retroalimentació autoregadora, en el qual MDM2 hi participa de forma molt important (Barak et al. 1993).

Les proteïnes p53 i MDM2 forma un bucle de retroalimentació autoregulada. Quan els nivells de p53 nuclears són alts, p53 promou la transcripció de MDM2 i augmenta els seus nivells (Barak, 1993). MDM2 regula de manera negativa l'activitat de p53 per diferents vies (Vassilev 2005):

1. MDM2 s'uneix directament al domini de transactivació de p53 i inhibeix la seva activitat transcripcional (Kussie et al. 1996).
2. MDM2 actua com una E3 ubiquitin lligasa per p53, marcant amb ubiquïtina a p53 per la seva degradació via proteasoma (Lohrum et al. 2000),
3. MDM2 promou l'export nuclear de p53 des del nucli cap al citoplasma, promovent la seva degradació (Li et al, 2003a).

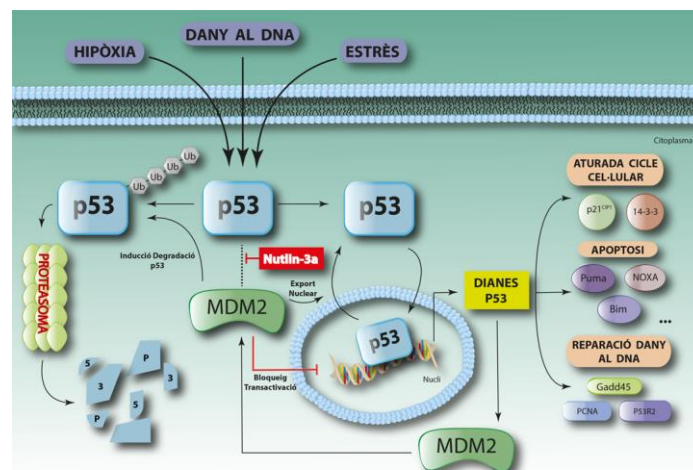


Figura13. Regulació de l'activitat de p53 per MDM2. (Adaptat de Chene 2003).

- **Inhibició de la interacció de p53-MDM2: Nutlin-3a**

La interacció entre p53-MDM2 té lloc a través de només tres residus aminoacídics presents a p53, els quals interactuen amb MDM2 a través d'un petit solc, de manera que inhibint de manera específica aquesta unió es pot establir a p53 (Chen et al. 1993).

Els primers inhibidors específics que impedeixen la unió p53-MDM2 són unes petites molècules anomenades nutlins (Vassilev 2004). Aquests composts són anàlegs a les cis-imidazolines i s'uneixen de manera específica a la butxaca d'unió per p53 present a MDM2, impedit la interacció entre p53-MDM2 al imitar els tres residus aminoacídics de p53 essencials per a la interacció entre MDM2 i p53.

S'han descrit 3 variants de nutlin: nutlin-1, nutlin-2 i nutlin-3, el qual es pot subdividir en nutlin-3a i nutlin-3b. La forma nutlin-3a és 150 més activa que la forma nutlin-3b (Vassilev 2004).

En resposta a nutlin, p53 s'estabilitza i acumula a l'interior cel·lular, activant la transcripció dels seus gens diana, com per exemple p21^{cip1} o MDM2. L'efecte de nutlin-3a només té lloc a les cèl·lules que presenten p53-wt, mentre que les cèl·lules que presenten mutacions o delecions de p53 no responen al tractament.

El tractament in vitro amb nutlin-3a pot induir, segons el tipus cel·lular, processos com l'aturada del cicle cel·lular, disminució de la proliferació cel·lular, inducció de l'apoptosi i en alguns casos, senescència. (Tabe et al. 2009, Drakos et al. 2007, Coll-Mulet et al. 2006).

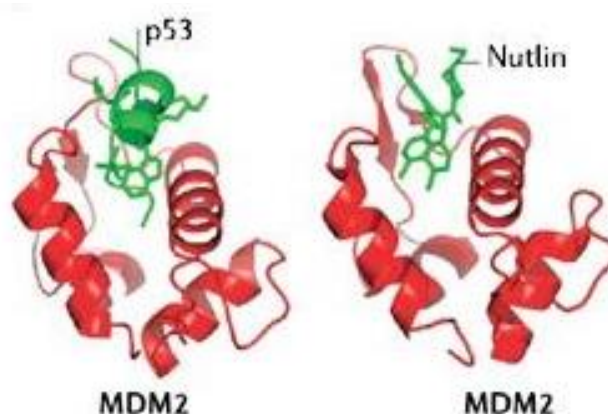


Figura 14. Inhibició de la interacció de p53-MDM2 per part de nutlin-3a (adaptat de Nalepa et al. 2006).

5. L'eix FOXO3a-FOXM1: relació amb p53

FOXO3a i FOXM1 són dos factors de transcripció de la família *forkhead* amb funcions antagòniques. FOXO3a actua com a supressor tumoral, mentre que FOXM1 és un potent oncogen que es troba sobre-expressat a molts tumors. FOXO3a i FOXM1 ténen un paper central en la reparació del dany al DNA, en la senescència i en control del cicle i la mort cel·lular. Es creu que l'eix FOXO3a-FOXM1 també té la clau per decidir en destí cel·lular en resposta als agents genotòxics, controlant l'equilibri entre la reparació del dany al DNA o la mort cel·lular o senescència. La inhibició de FOXM1 o la reactivació de FOXO3a a cèl·lules tumorals pot millorar l'eficàcia de teràpies que causen dany al DNA mitjançant la disminució de la reparació del dany al DNA i de la supervivència cel·lular i incrementant la senescència i la mort cel·lular.

FOXO3a antagonitza la funció de FOXM1 de diferent maneres (Karadedou et al. 2012). La primera és a través del desplaçament directe de FOXM1 del seu FHRE provocat per FOXO3a, de manera que FOXM1 es després del promotor i baixa la seva activitat transcripcional. FOXO3a antagonitza de manera transcripcional a FOXM1, de manera FOXO3a reprimeix la transcripció dels gens activats per FOXM1 i que estan implicats en la proliferació cel·lular i la reparació del dany al DNA (Francis et al. 2009; McGovern et al. 2009; Koo et al. 2012). L'altre mecanisme és a través de la repressió transcripcional directe de FOXO3a sobre FOXM1, ja que FOXM1 s'ha postulat com una diana de FOXO3a (McGovern et al. 2009). Finalment, FOXO3a té la capacitat de reclutar proteïnes remodeladores de la cromatina, com les HDAC, les quals promouen la condensació de la cromatina i limiten la unió d'altres factors de transcripció, com FOXM1.

FOXO3a participa en la resposta a varis agents quimioterapèutics, de manera que la seva activació produeix la transcripció de gens implicats en l'arrest del cicle cel·lular i l'apoptosi (Ho et al. 2012). A molts de tipus tumorals, FOXM1 es troba sobre-expressat i FOXO3 reprimit, afavorint la progressió del desenvolupament tumoral. La reactivació de l'eix FOXO3a-FOXM1 constitueix una estratègia terapèutica molt atractiva per al tractament del càncer. Ja s'han explorat varies vies per modular aquest eix a través de fàrmacs convencionals que activen a FOXO3a o a través de composts més recents, com thiostrepton, que inhibeixen l'expressió i l'activitat de FOXM1 (Gartel 2011).

La repressió de FOXM1 induïda per FOXO3a resulta important per al control de mecanismes implicats en l'inici de la tumorigènesi, la resistència a quimioteràpia i la reparació del dany al DNA (Delpuech et al. 2007).

La desregulació de l'eix FOXO3a-FOXM1 té un paper molt important en el desenvolupament de tumors hematològics. Així, s'ha vist com a les leucèmies té lloc una sobre-expressió de FOXM1, mentre que FOXO3a es troba inactivat per fosforilacions i es degradat. Fins al moment, no hi ha estudis del paper de l'eix FOXO3a-FOXM1 en el context de LCM.

Vistes les evidències i la importància de l'eix FOXO3a-FOXM1 en la tumorigènesi, la modulació de l'eix FOXO3a-FOXM1 representa una diana terapèutica atractiva, al poder obtenir una disminució del creixement cel·lular i una millor resposta als agents quimioterapèutics (Moraes et al. 2015).

- **Relació amb p53**

FOXO3a i FOXM1 estan relacionats amb el supressor tumoral p53, de manera que existeix un eix de regulació entre ells, molt important per determinar el destí cel·lular i la progressió de la tumorigènesi.

p53 i FOXO3a comparteixen una sèrie de característiques que fa pensar que existeix un mecanisme de regulació i actuació en com. Així, els dos es troben implicats en la resposta a estrès, indueixen l'arrest del cicle cel·lular i l'apoptosi, i poden ser modificats de manera postranscripcional per fosforilació i acetilació. També comparteixen una sèrie de dianes, com el lligand Fas, GADD45, PA21 (Greer i Brunet 2005), p21 (Seoane et al. 2004) i puma (You et al. 2006). A més, FOXO3a és una diana directe de p53. Existeix per tant una relació funcional entre aquests dos factors de transcripció, que conjuntament poden controlar processos implicats en la supressió tumoral (Renault et al. 2011).

Per la seva part, el supressor tumoral p53 inhibeix a FOXM1. Estudis recents indiquen l'existència d'una correlació inversa entre els nivells d'expressió de p53-FOXM. (Pandit et al. 2009; Qu et al. 2013; Gartel 2014). Les línies cel·lulars que no presenten p53 no poden inhibir l'expressió de FOXM1 (Lok et al. 2011).

Entre les característiques que comparteixen els supressors tumorals p53 i FOXO3a trobem la inhibició de FOXM1. Tant l'activació de p53 com la de FOXO3a provoquen la inhibició de FOXM1 (Barsotti i Prives 2009; McGovern et al. 2009). A l'hora, p53 també regula l'activitat de FOXO3a, formant un eix transcripcional molt important per a la tumorigènesi i la resposta a fàrmacs.

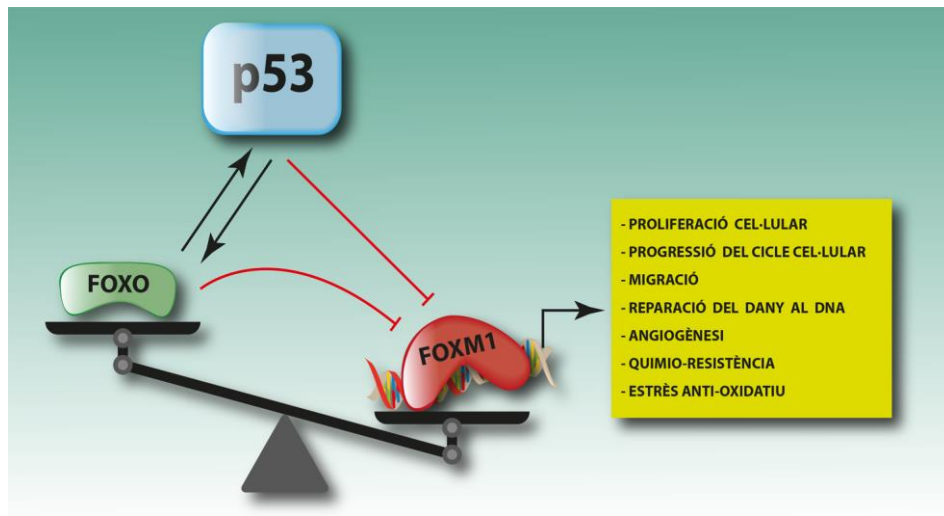


Figura 15. Relació entre p53-FOXO3a-FOXM1(adaptat de Gomes et al.2013).

6. El sistema limfàtic

El sistema limfàtic constitueix un sistema de transport que funciona de manera conjunta amb el sistema circulatori. Forma part del sistema immunitari i és un important mecanisme de defensa de l'organisme. Està format per una sèrie de vasos i nòduls limfàtics repartits per tot l'organisme .

Una de les funcions del sistema limfàtic és facilitar la resposta immunitària, ja que a través del vasos limfàtics es transporten les cèl·lules immunes, els limfòcits(Schwartz i Simons 2012). Els fluids intersticials i les substàncies provinents dels teixits son recollits per la limfa i circulen a través dels vasos limfàtics. El ganglis limfàtics que es troben al llarg d' aquesta xarxa de vasos filtren els líquids intersticials, eliminant virus, bacteries i altres productes de rebuig, constituint així un important mecanisme de defensa contra la infecció i el càncer (Margaris i Black 2012).

- Els nòduls limfàtics i els limfòcits

Un nòdul limfàtic és una estructura formada per una medul·la interior i una còrtex exterior, la qual pot estar recoberta d'una càpsula fibrosa formant un gangli limfàtic. A l'hora, el còrtex es divideix en una part externa que conté limfòcits B organitzats en fol·licles limfàtics primaris, i una part interna o paracortical, formada per limfòcits T. Quan es produeix una resposta immune, es produeix una forta proliferació dels limfòcits B a una part dels fol·licles primaris, formant unes àrees que s'anomenen centres germinals (CG) o fol·licles limfàtics secundaris (Mesin et al. 2016).

Els centres germinals estan formats per una zona obscura i una zona clara, per la qual transiten i es diferencien els limfòcits B (De Silva i Klein 2015). Envoltant aquest centre germinal hi ha la **zona del mantell**, on es troba una gran quantitat de cèl·lules B *naïve*, la majoria dels quals expressa el marcador CD5 a la superfície cel·lular. Entre la zona dels fol·licles, rica en cèl·lules B, i la zona rica en cèl·lules T hi ha la zona marginal, la qual no es sol trobar present als ganglis limfàtics (Küppers 2005). Els limfòcits B transiten a través de les distintes zones del centre germinal, esdevenint cèl·lules especialitzades (cèl·lules B *naïve* → centroblasts → centrocits → cèl·lules B de memòria).

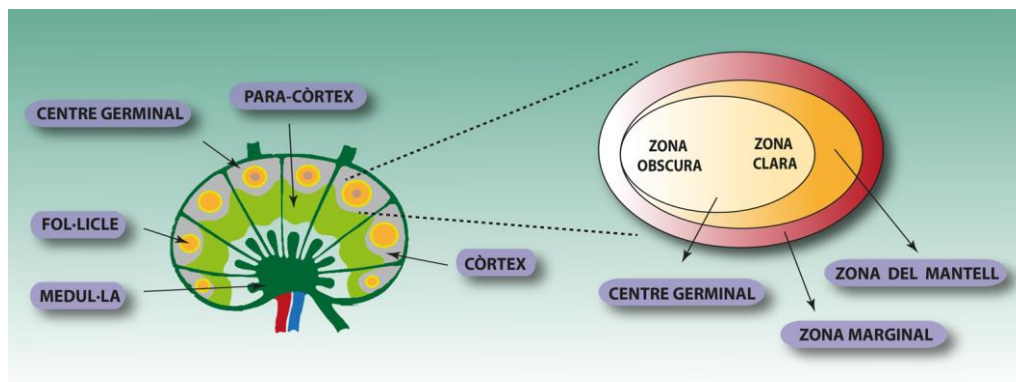


Figura 16. Estructura d'un nòdul limfàtic. A l'ampliació es detallen les parts que conformen un fol·licle limfàtic.

6.1. Maduració de les cèl·lules B i origen de les neoplàsies

El creixement i diferenciació dels limfòcits esta format per una sèrie d'etapes de desenvolupament. Aquesta diferenciació comença a la medul·la òssia i acaba en el tim, en el cas de les cèl·lules T, o els teixits limfàtics perifèrics, en el cas de les cèl·lules B (Carding i Egan 2002). El procés de desenvolupament comença a la medul·la òssia a partir d'una cèl·lula mare pluripotent, la qual es va diferenciant en cèl·lula pro-B, cèl·lula pre-B i cèl·lula B immadura a través de varies estadis de maduració. Durant aquesta diferenciació, es produeixen uns re-agrupament dels gens de la cadena lleugeres i pesades de les Ig, que si es realitza amb èxit, dona lloc als receptors de cèl·lula B (BCR), que s'expressarà a la superfície cel·lular (Cambier et al. 2007).

Les cèl·lules que expressin un BCR funcional es diferenciaran a cèl·lules B *naïve* madures, les quals abandonaran la medul·la òssia i aniran cap als nòduls limfàtics o la melsa, on formaran els fol·licles primaris abans de seguir pels següents estadis de diferenciació (Lebien i Tedder 2008).

La darrera etapa de diferenciació dels limfòcits B té lloc al centres germinals (CG) dels fol·licles dels nòduls limfàtics, on els limfòcits B *naïve* s'activen i experimenten un procés d'expansió clonal. A mesura que aquest procés té lloc, canvia la histologia del fol·licle. Les cèl·lules B que no responen a l'expansió es situen a una part externa anomenada **zona del mantell**, la qual envolta les cèl·lules B que proliferen al centre germinal. Es poden distingir dues zones del CG: una zona obscura, on es troben les cèl·lules B en proliferació o centroblasts, i una zona clara, formada per cèl·lules que no proliferen o centrocits. Parts d'aquests centrocits es transformaran en cèl·lules B de memòria, i altre en cèl·lules plasmàtiques (Küppers 2005). A la figura 17 es detalla el procés de maduració.

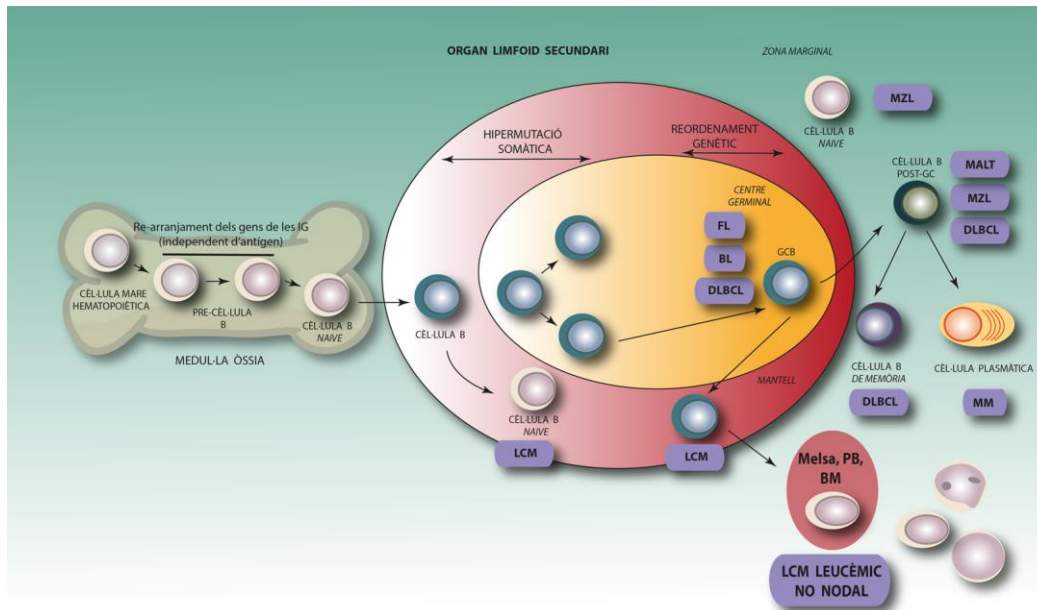


Figura 17. Maduració dels limfòcits i origen cel·lular de les neoplàsies de cèl·lules B. Es detalla els dos orígens del LCM proposats, una població de cèl·lules B colonitza la zona del mantell, mentre que una part de la població transita a través del centre germinal (adaptat de Malcolm, 2016).

- **Origen de les neoplàsies de cèl·lula B i events transformadors**

Els distints estadis de la diferenciació de les cèl·lules B estan caracteritzats per l'estructura del BCR i per l'expressió dels diferents marcadors de la superfície cel·lular, i a més, cada procés té lloc a una determinada estructura histològica. Tots aquests factors es tenen en compte per determinar l'origen de les neoplàsies de cèl·lula B i realitzar la seva classificació en diferents subclasses (figura 17) (Stevenson et al. 2001).

El principal event determinant que condueixen a les neoplàsies de cèl·lules B són les hipermutacions somàtiques i les recombinacions gèniques que tenen lloc als gens de les Ig durant el procés de maduració, els quals són potencialment oncogènics. Durant aquest procés pot passar que un oncogen quedi sota el control d'un locus d'una Ig, obtenint una expressió constitutivament activa d'aquest oncogen (Küppers 2005). La majoria d'aquestes translocacions tenen lloc al CG, per aquest motiu l'origen de la majoria dels limfomes de cèl·lules B el trobem al CG o als seus descendents (Koues et al. 2015).

Altres events transformadors inclouen mutacions a supressors tumorals, com *TP53*, amplifícacions gèniques i translocacions que no afectin als loci de les Ig (Küppers 2005). Finalment, un altre factor que pot contribuir a les neoplàsies de cèl·lules B són

els virus, com l'Epstein-Barr (EBV) (Federica Alberghini et al. 2015) o la proteïna viral FLIP (Guasparri et al. 2004).

6.2. Els limfomes: Limfoma de cèl·lules del mantell

Els limfomes són els tumors de les cèl·lules dels teixits limfàtics que formen part del sistema immunitari. La seva gran heterogeneïtat ha implicat que en els darrers 50 anys s'hagin realitzat diverses classificacions dels diferents tipus de limfomes (Nancy et al. 1994). La OMS va realitzar una classificació de les neoplàsies dels teixits hematopoètics i limfoides l'any 2001, la qual va ser revisada l'any 2008 (Campo et al. 2008). La darrera actualització data de l'any 2016 (Swerdlow et al. 2016) i és el resultat dels darrers avenços realitzats amb significants implicacions tan clíniques com biològiques. A la taula 1 es mostra una part de la classificació. A l'annex-1 es pot trobar la classificació completa.

Els grans grups en els que es classifiquen els limfomes agafen el nom de Thomas Hodgkin, primera persona que va descriure la malaltia devers l'any 1832, i es divideixen en:

- **Limfoma de Hodgkin:** es caracteritza per la producció descontrolada de cèl·lules Reed-Sternberg, que solen provocar un augment dels ganglis d'una regió de l'organisme i després es poden estendre a ganglis veïns, a la medulla òssia o a la melsa. Normalment s'origina als ganglis limfàtics de la part superior del cos, com tòrax, coll i aixelles. Representen un 10% dels limfomes i el seu pronòstic sol ser favorable.
- **Limfoma no-Hodgkin: deriva de cèl·lules T, cèl·lules B i cèl·lules NK.** Normalment es desenvolupa als nòduls limfàtics, però també pot sorgir a altres òrgans. Els limfomes no-Hodgkin engloben un grup heterogeni de tumors. Un 85-90% dels casos deriven de cèl·lules B, mentre que el 15-10% restants corresponen a cèl·lules T o NK (Shankland et al. 2012).

Limfoma No-Hodgkin		Limfoma de Hodgkin
Limfoma de cèl·lula B	Limfoma de cèl·lula T i NK	
Leucèmia limfoblàstica precursora aguda de cèl·lules B (B-ALL)	Leucèmia limfoblàstica aguda precursora de cèl·lules T (T-ALL)	Limfoma de Hodgkin nodular abundant en limfòcits
Limfoma limfoblàtic precursor de cèl·lules B (LBL)	Limfoma limfoblàtic precursor de cèl·lules T (LBL)	
Leucèmia limfocítica crònica de cèl·lules B i limfoma limfocític petit de cèl·lules B	Leucèmia limfocítica i leucèmia prolimfocítica crònica de cèl·lules T	
Leucèmia prolimfocítica de celules B	Leucèmia limfocítica granular de cèl·lules T	Limfoma de Hodgkin clàssic
Limfoma de cèl·lules del mantell	Limfoma anaplàsic de celules grans, tipus cutani primari	Limfoma de Hodgkin amb esclerosi nodular
Limfoma folicular	Leucèmia agressiva de cèl·lules NK	Limfoma de Hodgkin clàssic ric en limfòcits
Limfoma difús de celules B gran (DLBCL)	Limfoma extranodal de celules T i de celules NK, sense cap altre caracterització	Limfoma de Hodgkin de celularitat mixta
Limfoma de Burkkit	Limfoma extranodal de cèl·lules T i de cèl·lules NK, tipus nasal	Limfoma de Hodgkin amb depleció de limfòcits

Taula 1. Classificació dels limfomes Hodgkins i no –Hodgkins, segons la OMS. A la taula només s'indica una part de la classificació (adaptat de (Swerdlow, 2016).

6.2.1. Limfoma de cèl·lules del mantell

EL LCM s'inclou dins les neoplàsia de limfomes perifèrics de cèl·lula B i el seu nom deriva del seu patró de creixement primerenc, situat a la zona del mantell que envolta el centre germinal (Tiemann et al. 2005). Les cèl·lules que el formen són limfòcits B madurs, caracteritzats per la translocació cromosòmica t(11;14)(q13;q32) que produeix una sobreexpressió de ciclina D1, i per la presència a la superfície cel·lular de l'antigen CD5 com a característica específica.

Es un tipus de limfoma poc freqüent, representa entre un 3-10% dels limfomes no Hodgkin, amb una incidència anual d'aproximadament 0.51–0.5/100.000 habitants/any. Afecta de manera més freqüent a homes caucàsics amb una mitjana d'edat de 68 anys (Dreylin et al. 2009). Presenta un comportament clínic molt agressiu i amb mala prognosi, ja que la supervivència mitjana dels pacients es situa al voltant dels 3 o 4 anys (Ghielmini i Zucca 2009).

- **Morfologia**

Les cèl·lules del LCM poden proliferar seguint dos patrons distints: nodular o difós, i poden derivar cap a dues variants citològiques: clàssica i blastoide. La variant clàssica es caracteritza per tenir una mida petita o intermèdia i un nucli irregular, mentre que la blastoide es caracteritza per tenir una mida intermèdia o gran i amb la cromatina més dispersa. La blastoide pot evolucionar cap a una variant pleomòrfica, amb un nucli irregular i un nuclèol amb distintes mides (figura 18). Les variants blastoides i pleomòrfiques són més agressives, al presentar mutacions als gens que regulen el cicle cel·lular i la reparació del dany al DNA (Jares et al. 2007).

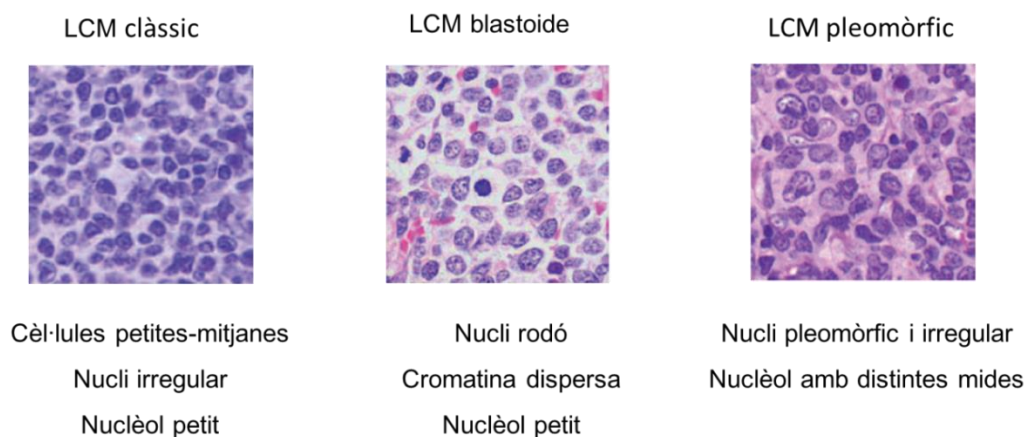


Figura 18. Morfologia de les variants histològiques de LCM (adaptat de Jares et al.2007).

- **Patogènesi**

La teoria sobre l'origen cel·lular del LCM ha canviat amb els darrers anys, a causa dels resultats obtinguts amb l'ús de les noves tècniques experimentals. La nova hipòtesi postula que el LCM es desenvolupa per dues vies diferents (Jares et al. 2012; Sweedlow et al. 2016).

En els dos casos, el LCM s'inicia a partir de cèl·lules pre-B, la majoria de les quals presenta el reagrupament cromosòmic del gen de la ciclina D1, encara que una petita població és ciclina D1 negatiu. Les dues poblacions maduren donant lloc a una cèl·lula B *naïve*, la qual colonitza les zones internes del mantell i dona lloc a una neoplàsia de cèl·lules del mantell in situ (INMCN, segons la nova classificació de la OMS) (Sweedlow et al. 2016). Aquestes cèl·lules B progressen i maduren a través de la zona del mantell, donant lloc a les variants més agressives, com al blastoide o la pleomòrfica. Recentment, s'ha descrit com una part de les cèl·lules B transiten a través del CG i surten del nòdul limfàtic, donant lloc a una variant leucèmica extranodal. A la figura 17 es pot observar els dos orígens proposats.

- **Mecanismes transformants del limfoma de cèl·lules del mantell**

El mecanisme oncogènic primari que caracteritza al LCM consisteix en la translocació cromosòmica $t(11;14)(q13;q32)$, la qual situa al promotor del gen de les cadenes pesades de les Ig del cromosoma 14q32 davant el proto-oncogen CCND1 al cromosoma 11q13, el qual codifica per ciclina D1 (Bertoni et al. 2006). Aquesta translocació provoca una sobre-expressió constitutiva de ciclina-D1, la qual no s'expressa a limfòcits sans, causant la progressió descontrolada del cycle cel·lular (revisat a Obrador-Hevia et al. 2009).

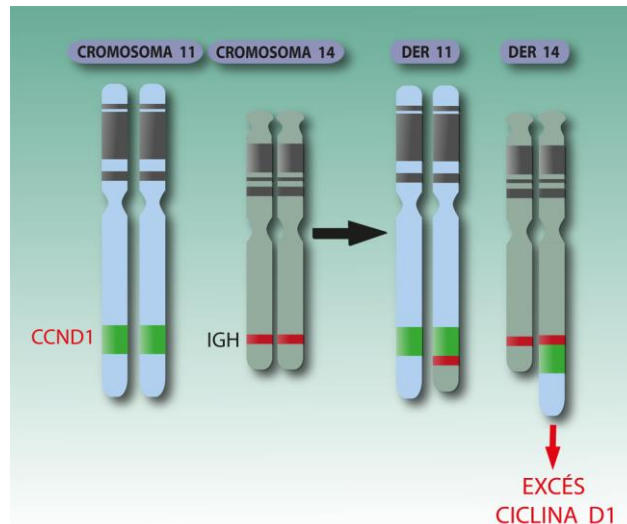


Figura 19. Translocació cromosòmica t(11;14)(q13;32) característica del LCM.

Una petita part dels limfomes són ciclina D1 negatius, i en ells s'ha observat una sobre-expressió de ciclina D2 i D3, amb funcions homòlogues a la ciclina D1 a l'hora de promoure el cicle cel·lular (Fu et al. 2005). En aquests casos, s'ha proposat la detecció del factor de transcripció SOX11 per diagnosticar els casos de LCM. Aquest factor és útil però no és detecta de manera exclusiva al LCM, sinó que també es troba al limfoma de Burkitt o al limfoma B difós de cèl·lula gran (DLBCL), entre altres (Mozos et al. 2009, Navarro et al. 2012, Salaverria et al. 2013). A nivell clínic, no s'observen diferències de comportament entre els LCM ciclina D1 positius o negatius.

- **Vies moleculars implicades en la patogènia del LCM**

Encara que la ciclina D1 és un oncogen molt important a les cèl·lules B, no és suficient per causar la transformació cel·lular ni per explicar el comportament tan agressiu del LCM (Lovec et al. 1994). Són necessàries alteracions a altres components que participen en el control del cicle cel·lular, en la resposta al dany al DNA, en la apoptosi i en les vies de proliferació cel·lular (figura20) (revisat a Obrador-Hevia et al. 2009).

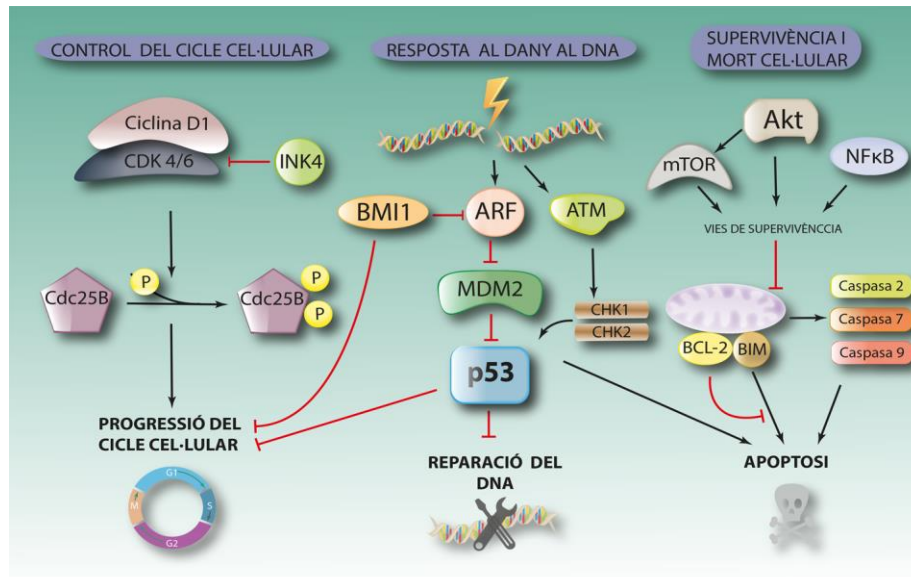


Figura20. Vies moleculars alterades a LCM (adaptat de Obrador-Hevia et al. 2009).

Desregulació del cicle cel·lular al LCM

La sobre-expressió de ciclina D1 accelera la transició de la fase G1 a la fase S a través de dues vies. Per una part, la ciclina D1 s'uneix a les CDK4 i CDK6, formant els complexos que fosforilen i inhibeixen pRB, permetent així el progrés del cicle cel·lular (Hunter et al. 1994). Per una altra banda, els nivells elevats dels complexos CDK/ciclina D1 actuen sobre els inhibidors de CDK p21^{Waf1/Cip1} i p27^{Kip1}, separant-los dels complexos ciclina E/CDK2. L'augment de l'activitat cinasa d'aquets complexos facilita l'entrada a la fase S a través de la fosforilació de pRB (Sherr et al. 2002). En resum, la desregulació de la ciclina D1 és molt important en la patogènesi del LCM al neutralitzar els efectes inhibidors de p27^{Kip1} i pRB sobre el cicle cel·lular.

Una altre alteració que s'observa de manera freqüent a LCM és al locus CDKN2A, localitzat al cromosoma 9q21 (Sekulic et al. 2008), el qual codifica pels supressors tumorals, *INK4a* i *ARF*. Altres mutacions importants impliquen la amplifiquació de BMI1 (Rosenwald et al. 2003; Rinaldi et al. 2006), les amplifiquacions de MDM2 i CDK4 (Hernández et al. 2005), mutacions a p53 o delecions a pRB (Pinyol et al. 2007).

Alteracions en la resposta del dany al DNA a cèl·lules de LCM

Una de les principals causes de l'elevada inestabilitat cromosòmica que presenta el LCM ve donada per els defectes de la maquinaria de resposta al dany al DNA.

Una de les delecions més freqüents és la del gen d'*ATM*, a la regió 11q22-23. *ATM* té un paper central en la resposta al dany al DNA durant la recombinació de les Ig (Perkins et al. 2002) i la seva expressió es habitual a les cèl·lules B *naïve* de la zona del mantell. Es creu que la seva pèrdua provoca un augment en la inestabilitat cromosòmica (Camacho et al. 2002). Les dianes d'*ATM*, *CHK1* i *CHK2*, també es poden trobar mutades o infraexpressades.

TP53 es troba alterat o deletat a la majoria de tumors. En casos de LCM clàssic aquesta mutació és poc freqüent, però es troba mutada a un 30% de LCM blastoides, amb elevada proliferació, de manera que s'associa a un mal pronòstic (Greiner et al. 1996, Halldórsdóttir et al. 2011). La inactivació de *p53* promou divisions cel·lulars anormals i afavoreix la inestabilitat genòmica (Volgenstein et al. 2000). La inactivació de *p53* també es pot donar per l'amplificació dels seus inhibidors *MDM2* o *MDM4* o bé per deleció de l'inhibidor de *MDM2*, *p14^{ARF}* (Pomerantz et al. 1998).

Alteracions a les vies de supervivència i mort cel·lular a LCM

Al LCM, s'han trobat alteracions en l'expressió de proteïnes implicades en l'apoptosi, especialment en els membres de la família *BCL-2*, que dona com a resultat una sobre-expressió de *BCL-2*, *MCL-1* i *BCL-XL*. Un altre membre de la família *BCL-2*, *BIM*, sovint presenta delecions homozigòtiques (Tagawa et al. 2005; Pérez-Galán et al. 2011). També s'ha observat que l'expressió de determinades caspases es troba reprimida (Akiyama et al. 1994) afavorint la supervivència cel·lular (Rummel et al. 2004).

Les vies de senyalització *NFκB* i *AKT*, molt importants en la proliferació cel·lular i la supervivència, es troben activades de manera constitutiva (Ghobrial et al. 2011). L'activació de *NFκB* produeix una sobre-expressió de les seves dianes, com *FADD-like apoptosis regulator (FLIP)*. La via *AKT* contribueix a la patogènesis i supervivència de les cèl·lules del LCM (Rudelius et al. 2006) i varies membres d'aquesta via es troben alterats (Rizzati et al. 2007).

- **Perspectives terapèutiques**

En l'actualitat no existeix cap tractament que pugui ser considerat estàndard pel tractament del LCM tan en primera línia com en recaiguda (Campo i Rule 2015). El LCM sol aparèixer a pacients en edats avançades. L'estat de salut del pacient és el que determina el règim a aplicar, i és un dels motius més limitants per establir un règim estàndard.

Varis règims han demostrat la seva capacitat per induir una resposta però a la majoria de casos, tot i que s'han introduït noves modalitats terapèutiques, es produeix una recaiguda i els pacients acaben morint. Cal fer feina en la recerca de noves estratègies que millorin la resposta dels règims actuals o bé que disminueixin la toxicitat del tractament (Campo i Rule 2015). La combinació d'aquestes noves estratègies amb altres agents terapèutics pot significar una millora en la prognosi i supervivència dels pacients amb LCM.

Anticossos monoclonals: El rituximab és un anticòs monoclonal anti-CD20 que s'ha utilitzat com a monoteràpia en el LCM, amb una resposta del 35% (Foran et al. 2000). La seva utilització en combinació amb règims poliquimioteràpics ha donat bon resultat, de manera que s'administra en combinació amb la majoria de règims (Howard et al. 2002). La inclusió del rituximab a aquests règims ha millorat la resposta dels tractaments, però no s'ha aconseguit allargar la supervivència del pacient. La nova generació de monoclonals poden millorar aquesta resposta. Entre ells, es troben l'obinutuzumab i l'ofatumumab, amb unes respostes del 27% i del 8.3% respectivament (Morschhauser et al. 2013; Furtado et al. 2014).

Citarabina: Pel tractaments en monoteràpia, un dels principals fàrmacs d'elecció és la citarabina o AraC, especialment a pacients joves. Al ser un règim molt agressiu no tots els pacients són adequats per la seva administració. La citarabina es sol donar junt amb altres fàrmacs, realitzant cicles d'administració.

Règims poliquimioterapèutics: El tractament més comú en els darrers anys han estat els règims de poliquimioteràpia, els quals es poden agrupar en tres categories: el règim d'intensitat convencional amb antraciclins CHOP (ciclosfosfamida, adriamicina, vincristina i prednisona), el règim intensiu amb antimetabòlits HyperCVAD, consistent en una dosi intensa hiperfraccionada de ciclosfosfamida en un regim CHOP, més

metotrexat i citarabina) i el règims amb anàlegs de les purines FCM. (fludarabina, ciclofosfamida i mitoxantrona) La inclusió del rituximab a aquests règims ha millorat la resposta dels tractaments, però no s'ha aconseguit allargar la supervivència dels pacients (Howard et al. 2002).

Radioimmunoteràpia: L'ús de radioimmunoteràpia (RIT) en el tractament del LCM no està molt estès. La RIT afectaria a antígens específics del tumor, evitant en la mesura possible a les cèl·lules sanes. Actualment hi ha dos radiofàrmacs aprovats per usar en limfomes de cèl·lula B: ¹³¹I-tositumomab i ⁹⁰Y-ibritumomab, que actuen sobre CD20. Els pacients que es sotmeten a aquests règims es seleccionen seguint uns criteris molt estrictes, com el % de medul·la òssia afectada per el limfoma o el nombre de cel·lularitat, de manera que no tots els pacients poden rebre aquests tractaments (Skarbnik i Smith 2012). L'incorporació de RIT als règims quimioteràpics actuals està per determinar al LCM. La RIT és actiu en LCM, però el seu ús com agent simple no està aprovat.

Transplantament de progenitors hematopoètics: En pacients joves i en estadis primerencs de la malaltia, es realitzen transplantaments autòlegs de cèl·lules mare (ASCT) seguit de règims quimioteràpics i rituximab, amb una alta taxa de resposta. De totes formes, els pacients poden tornar a recaure al cap d'uns anys del ASCT, encara que estudis recents indiquen que el tractament amb rituximab pot prevenir aquesta recaiguda (Graf et al. 2015).

El transplantament al·logènic és actualment l'únic tractament amb potencial curatiu al LCM, el qual sembla que millora el pronòstic dels malalts al allargar la duració de la resposta obtinguda, fins i tot en pacients en recaiguda després d'un transplantament autòleg (Martínez et al. 2000).

OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquesta tesi és estudiar el paper de les proteïnes FOXO3a i FOXM1 en la resposta de cèl·lules de LCM a nous agents i a fàrmacs quimioterapèutics, analitzant els efectes obtinguts en funció de l'estat de p53 als diferents models cel·lulars. Aquest objectiu general es concreta en els següents objectius específics:

1. Avaluar els efectes de l'activació de p53 sobre la viabilitat cel·lular i la inducció de l'apoptosi en línies cel·lulars i cultius primaris de LCM que presenten diferents estats de p53, analitzant la modulació de l'eix FOXO3a-FOXM1 pels diferents tractaments.
2. Analitzar els efectes de la inhibició de FOXM1 sobre la viabilitat cel·lular i la inducció de l'apoptosi en cèl·lules de LCM, determinant la relació de la resposta amb l'estat de p53 i l'efecte sobre l'activitat de FOXO3a.
3. Avaluar el potencial del fàrmac oxaliplatí en models cel·lulars de LCM, comparant la seva eficàcia amb components de la quimioteràpia habitual per aquest limfoma. Analitzar el paper de l'eix FOXO3a-FOXM1 en les respostes observades.

MATERIALS i MÈTODES

1. Cultius cel·lulars

El cultiu cel·lular fa referència al conjunt de tècniques que permeten el creixement de cèl·lules fora del seu medi original, mantenint les seves característiques fisiològiques, bioquímiques i genètiques.

Els cultius primaris són aquells que provenen directament d'un teixit, del qual s'aïllen les cèl·lules i es mantenen en unes condicions adequades pel seu creixement. Els cultius primaris tenen un temps de vida limitat, de manera que passat un temps entren en senescència i moren. Aquest cultiu es pot transformar; ja sigui de manera espontània com induïda amb virus o agents químics, de manera que les cèl·lules adquireixen la capacitat de créixer indefinidament i tornen immortals, obtenint el que es coneix com a línia cel·lular. Gràcies a aquesta capacitat de multiplicació il·limitada al laboratori, les línies cel·lulars són una eina bàsica a l'hora de realitzar experiments *in vitro*.

A l'hora de manipular els cultius cel·lulars, s'han de mantenir unes condicions de seguretat i esterilitat molt estrictes. El cultiu s'ha de realitzar en una campana de seguretat biològica del nivell necessari pel material biològic que utilitzem. Aquesta campana s'ha d'esterilitzar amb radiació ultraviolada abans del seu ús. La superfície de la campana, el material que s'hi introdueix i les mans dels treballadors es renten amb etanol al 70%. Tot el material que haguem d'utilitzar ha d'estar autoclavat per assegurar la seva esterilitat. Els medis i reactius que s'emprin al cultiu no es poden obrir fora de la campana per tal d'evitar la seva contaminació.

L'equipament de la sala de cultius on s'ha treballat és:

- Campana de flux laminar d'un nivell II de bioseguretat
- Incubador amb unes condicions de 37 °C de temperatura, 98% d'humitat relativa i 5% de CO₂.
- Bomba d'aspiració.
- Microscopi òptic invertit.
- Bany d'aigua per temperar els medis.
- Gelera i congelador de -20 °C.
- Congelador de -80°C.
- Tanc de nitrogen líquid.
- Autoclau.

1.1. Línies cel·lulars.

Les línies de limfoma de cèl·lules del mantell (o LCM) utilitzades en aquest estudi han estat: Granta-519 (cedida per la Dra. Dolores Colomer, Hospital Clínic, Barcelona) , Jeko-1 (cedida per la Dra. Beatriz Martínez, Centro Nacional de Investigaciones Oncologicas, Madrid), UPN-2, SP-53 i Z-138 (cedides per la Dra. Eva Ortega-Paino, Lund University, Lund, Suècia).

1.1.1 Característiques.

Totes les línies de LCM es caracteritzen per la translocació cromosòmica $t(11;14)(q13;q32)$, que causa una sobreexpressió de ciclina D1.

La línia Granta-519 deriva d'una dona caucàsica de 58 any amb un historial previ de carcinoma cervical (Jadawel et al. 1997). S'establí l'any 1991 d'una mostra de sang perifèrica en la recaiguda d'una transformació leucèmica de LCM de grau IV. L'estudi citogenètic indica que presenten una deleció bial·lèlica de $p16^{CDKN2}$ i $p15^{CDKN2B}$. Presenta una pèrdua monoal·lèlica del gen TP53, encara que no s'observen mutacions als exons 5-9 (Rudolph et al. 2004).

La línia Jeko-1 es va establir d'una mostra de sang perifèrica mononuclear d'una pacient de 78 anys amb una variant de cèl·lula gran de LCM en conversió leucèmica (Jeon et al. 1998). Presenta una deleció del gen TP53 a l'exó 4, codó 58 i 59, que produeix un codó de parada a la posició 122-123 (Camps et al. 2006).

La línia SP-53 deriva d'una mostra de sang perifèrica d'una dona de 58 anys diagnosticada amb limfoma limfocític intermedi en fase leucèmica, antic terme per denominar el LCM (Daibata et al.1989). Posteriors estudis de seqüenciació van demostrar que el gen TP53 no presenta cap mutació (Amin et al. 2003).

La línia Z-138 deriva d'una mostra de medul·la òssia d'un home caucàsic de 70 anys, que va ser diagnosticat de leucèmia limfocítica crònica (CLL) l'any 1987, que va derivar en una leucèmia agressiva (Estrov et al. 1998). Posteriorment, es van classificar com a limfoma de cèl·lules del mantell, observant-se sobre-expressió de ciclina D1 (Medeiros et al. 2006) i el gen TP53 no presenta cap mutació (Amin et al. 2003).

La línia UPN-2 es va establir l'any 1999 d'un pacient de 57 anys amb un diagnòstic inicial de leucèmia limfocítica crònica (CLL) (M'kacher et al. 2003). Presenta la deleció d'un locus del gen TP53 i la seva seqüenciació revela la mutació 175C (Arg-His), que resulta en un status no funcional .

	Mostra	Pacient	Any	Diagnòstic inicial	Ciclina D1	Estat de p53
Granta-519	SP	Dona/58	1991	MCL	+	del/wt
SP-53	SP	Dona/58	1989	ILL	+	wt/wt
Z-138	MO	Home/70	1987	MCL blastoide	++	wt/wt
Jeko-1	SP	Home/78	1998	MCL	+	del/mut
UPN-2	EP	Home/57	1999	MCL	+	del/mut

Taula 2. Línies de LCM utilitzades. SP= sang perifèrica; MO= medul·la òssia; EP= efusió pleural; ILL= limfoma limfocític intermedi.

1.1.2 Condicions de cultiu.

Tots els cultius es van realitzar dins una cabina de Bioseguretat tipus II seguint els protocols establerts pel comitè de Bioseguretat i el Servei de Prevenció de Riscos Laborals de la UIB.

Les línies es van mantenir en medi RPMI 1640 (L-glutamina i 25mM HEPES), suplementat amb 10% de sèrum boví fetal inactivat (FBSi) i un 0.5% de penicil·lina-estreptomicina (Sigma Aldrich, St.Louis, CO, USA). En el cas de la línia SP-53, el medi es va suplementar amb un 20% de FBSi. Per inactivar el sèrum, es va escalfar durant 30 minuts a un bany de 56 °C. Els cultius es van mantenir a un incubador en les condicions de temperatura, humitat relativa i CO₂ indicades anteriorment.

Cada línia es duplica a un ritme diferent, que oscil·la entre les 24 i 72 hores. Tres pics a la setmana es van comptar les cèl·lules amb Blau de Tripà (Sigma Aldrich, St. Louis, CO, USA). Pel recompte cel·lular, es van mesclar 10 µl de cèl·lules amb 10 µl de blau de tripà. Es va posar 10 µl de la mescla a una càmera de Neubauer i es va observar al microscopi òptic. Les cèl·lules vives mantenen la capacitat d'expulsar el colorant del seu interior i es veuen refringents i brillants, mentre que les mortes incorporen el blau de tripà i es tornen de color blau. Es van comptar les cèl·lules vives presents en un camp i es van realitzar els càlculs pertinents per deixar les cèl·lules a una densitat de

400.000 cel/ml. Per rutina, es va mantenir el cultiu a un volum final de 30 ml, el qual s'anava modificant si s'havia de realitzar un experiment.

Un dels principals problemes dels cultius cel·lulars és la contaminació per microorganismes, com ara el micoplasma. Aquest paràsit intracel·lular pot provocar alteracions tan en el creixement de les cèl·lules com en els resultats obtinguts. Per comprovar que els nostres cultius estaven lliures de micoplasma, periòdicament es va realitzar un control de contaminació de micoplasma amb el kit *MycoAlert*TM PLUS Mycoplasma Detection Kit (Lonza, Rockland, ME, USA). En el cas d'obtenir un resultat positiu de contaminació amb micoplasma, el cultiu es va tractar amb *Plasmocin*TM (InvivoGen, San Diego, CA, USA) utilitzant les dosis recomanades pel fabricant. Per evitar possibles contaminacions, la cabina de seguretat biològica es va rentar amb *MycoZap*TM Spray (Lonza, Colonia, Alemanya) després de cada ús.

1.1.3 Descongelació i criopreservació.

Els estocs de les línies es conserven en un tanc de nitrogen líquid. Per descongelar un vial de cèl·lules es va seguir el següent protocol:

- Posar 15 ml de medi RPMI temperat a un tub de 50 ml.
- Amb l'ajuda d'una micropipeta de 1000 µl, afegir un poc d'aquest medi al criovial per anar descongelant les cèl·lules. El volum descongelat es va introduint al tub de 50 ml. Repetir fins que el criovial queda buit.
- Centrifugar els tubs durant 5 minuts a 1800 rpm.
- Aspirar el sobrenedant i resuspendre el pellet amb 5 ml de medi. Introduir a un flascó de 25 ml i deixar a l'incubador.

Un cop les cèl·lules han crescut, s'han de preparar més estocs per tal d'assegurar uns reservoris per futurs experiments. Per aquest motiu es va seguir aquest protocol de criopreservació:

- A un tub de 50 ml, introduir 15 ml de cultiu amb una densitat de 400.000 cel/ml, de manera que es congelaran un total de $1 \cdot 10^6$ cèl·lules.
- Centrifugar els tubs a 1800 rpm durant 5 minuts a temperatura ambient.
- Aspirar el sobrenedant i suspendre el precipitat de cèl·lules en un mililitre de medi de congelació (90% FBSi + 10% DMSO).
- Passar aquestes cèl·lules a un criovial i deixar al congelador de -80°C dins un contenidor d'isopropanol tipus Mr. Froosty (Nalgene), el qual permetrà

baixar la temperatura de les cèl·lules a un ritme d'1°C/minut. Al cap d'uns dies, posar els criovials al tanc de nitrogen líquid.

1.2. Cultius primaris.

1.2.1 Aïllament de cèl·lules primàries de pacients.

Els cultius primaris es van obtenir de mostres de sang perifèrica de pacients diagnosticats amb limfoma de cèl·lules del mantell segons la classificació realitzada per l'Organització Mundial de la Salut (OMS) (Swerdlow et al. 2008). El procediment d'obtenció i ús de les mostres va ser aprovat pel Comitè Ètic de Recerca Clínica de les Illes Balears, detallat al annex-2.(CEIC-IB, referencia #IB 1098/08 PI). Els pacients van donar el seu consentiment informat seguint els criteris del CEIC-IB i de la Declaració de Helsinki. Les mostres es van agafar abans que els pacients rebessin tractament.

La mostra de sang perifèrica venosa es va obtenir mitjançant punció i es va recollir en un tub que contenia heparina de liti o ACD com a anticoagulant. El protocol d'obtenció de cèl·lules mononucleades és el següent:

- Mesurar el volum de sang i passar-ho a un nou tub de 15 ml. Diluir amb PBS estèril fins a 8 ml i mesclar.
- Afegir 4 ml de Ficoll-Paque™PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suècia) a un nou tub. El Ficoll-Paque™PLUS permetrà crear un gradient de densitat per separar les distintes fraccions cel·lulars.
- Abocar la mescla de sang i PBS lentament sobre la paret del tub amb Ficoll-Paque™PLUS inclinat de manera que no es mesclin les dues fases.
- Centrifugar a 2000 rpm durant 20' a la centrifuga sense fre a temperatura ambient.
- Al tub es poden observar diferents fases (figura 21): al sediment trobam els eritròcits i les cèl·lules polinucleades i entre el Ficoll-Paque™PLUS i el plasma es forma un anell on hi ha les cèl·lules mononucleades. Aspirar l'anell de limfòcits amb una pipeta Pasteur estèril i passar-lo a un nou tub de 50 ml.
- Omplir el tub amb PBS estèril fins a 50 ml.
- Centrifugar a 1500 rpm durant 10' a la centrifuga a temperatura ambient.

- Decantar el sobrenedant i resuspendre el precipitat amb 1 ml de PBS estèril.
- Omplir el tub amb PBS estèril fins a 50 ml.
- Centrifugar a 1500 rpm durant 10' a la centrífuga a temperatura ambient.
- Decantar el sobrenedant i resuspendre les cèl·lules en 1ml de medi RPMI suplementat amb 20% FBS i penicil·lina-estreptomicina prèviament filtrat.
- Contar els limfòcits que s'han obtingut i afegir medi complet fins a deixar una densitat de $10 \cdot 10^6$ cel/ml. En aquest punt es poden deixar els limfòcits a l'incubador per realitzar els experiments o congelar per un ús posterior.

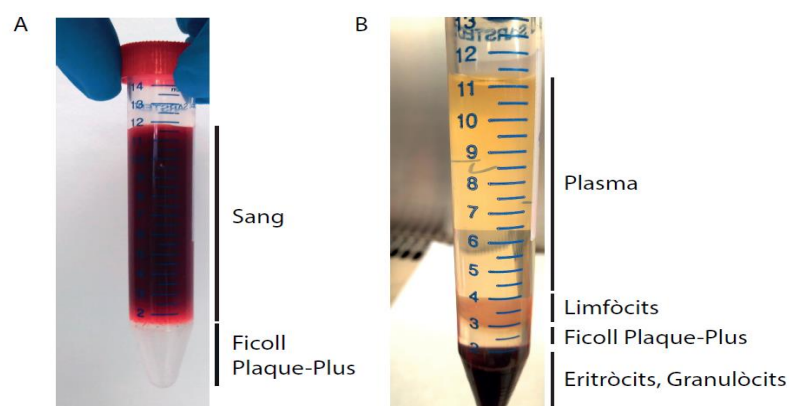


Figura 21. A) Mostra de sang del pacient abans de centrifugar, s'observa el Ficoll-Paque™ PLUS a la part inferior del tub. B) Fases obtingudes després de centrifugar en gradient de densitat.

1.2.2 Descongelació i criopreservació.

Els limfòcits obtinguts es poden congelar per un posterior ús. El medi de congelació està compost per un 90% FBSi i un 10% DMSO i es van realitzar estocs que contenen $20 \cdot 10^6$ cèl·lules. El procés de criopreservació ha de ser ràpid i es detalla a continuació:

- Centrifugar les cèl·lules a 1500 rpm durant 10' a temperatura ambient. Mentre, preparar el medi de congelació necessari.
- Decantar el sobrenedant i resuspendre el precipitat amb 500 µl de FBSi per cada estoc que s'hagi de fer. Afegir la mateixa quantitat de medi de congelació com FBSi tinguem (proporció 1:1) fins arribar a un volum final d'1 ml per criotub. El medi de congelació s'afegeix molt lentament, gota a gota.
- Repartir, el més aviat possible, 1 ml de cèl·lules en cada un dels criotubs.

- Introduir els estocs en el contenidor d'isopropanol per la congelació progressiva de les cèl·lules i deixar al congelador de -80 un mínim de 16 hores.
- Passar els criotubs al tanc de nitrogen líquid per una correcta conservació.

El protocol de descongelació dels cultius primaris és molt similar al que es va seguir amb les línies cel·lulars, però amb qualche variació:

- Treure els criotubs del nitrogen líquid i resuspendre el contingut dins volum dins 20 ml de RPMI 1640 suplementat amb 20% FBSi .
- Centrifugar 10' a 1800 rpm a temperatura ambient.
- Decantar el sobrenedant i resuspendre en 1 ml de medi.
- Contar amb blau de tripà els limfòcits que obtenim.
- Afegir amb el medi necessari per tenir una concentració final d' $1 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml.
- Deixar 1-2 hores dins l'incubador abans de començar qualsevol experiment.

1.2.3 Condicions de cultiu.

La manipulació dels cultius primaris es va realitzar a una cabina de seguretat biològica nivell II, prèviament esterilitzada amb radiació ultraviolada i netejada amb etanol al 70%.

Els limfòcits es van mantenir en medi RPMI 1640 suplementat amb 20% de FBSi i un 0.5% de penicil·lina-estreptomina i es van posar a l' incubador a una temperatura de 37°C ,5% CO₂ i 98% d'humitat relativa.

Els cultius primaris es van deixar a una densitat de $1 \cdot 10^6$ cèl·lules/ml, com a mínim dues hores abans de començar l'experiment. Abans de realitzar els experiments, es van diluir amb medi fins a una concentració de 500.000 cèl·lules/ml. Cada pic que es va realitzar una dilució es van comptar les cèl·lules amb blau de tripà per verificar el seu estat i el nombre de cèl·lules que hi havia al cultiu.

Les cèl·lules es van mantenir en cultiu fins un màxim de cinc dies. Entre la seva descongelació i realització dels distints tractaments es va deixar passar el mínim temps possible, ja que a mesura que avança el temps es perd el bon estat de les cèl·lules.

1.2.4 Seqüenciació de TP53.

Per conèixer l'estat de p53 de les mostres dels pacients, es va realitzar una seqüenciació massiva de nova generació (NGS, de l'anglès, Next Generation Sequencing). Aquesta nova tècnica permet detectar variacions d'un únic nucleòtid o mutacions puntuals d'un fragment d'ADN.

Les cèl·lules dels pacients es van centrifugar fins obtenir un pellet amb $5 \cdot 10^6$ cèl·lules, el qual es va resuspendre amb 200 μ l de PBS i es va procedir a l'extracció d'ADN utilitzant el kit QIAamp® (Qiagen, Venlo, Holanda), seguint les instruccions del fabricant. La seqüenciació es va realitzar amb el panell TruSightTumor (Illumina) a la Fundació Instituto Valenciano de Oncología (IVO). Aquest kit permet la detecció de les variants somàtiques que s'indiquen a la taula 3.

AKT1	PDGFRA	KRAS
GNA11	EGFR	RET
NRAS	KIT	FOXL2
BRAF	PIK3CA	MET
GNAQ	ERBB2	TP53

Taula 3. Gens inclosos en el TruSight Tumor 15.

2. Anàlisi cel·lular

2.1. Estudi de la viabilitat cel·lular.

La viabilitat cel·lular fa referència al nombre de cèl·lules vives que hi ha al cultiu, ja sigui per observar de manera rutinària el seu estat com per comprovar com afecta una substància determinada a les cèl·lules.

La resposta de les cèl·lules als diferents tractaments es va analitzar amb una corba dosi-resposta, el qual consisteix en tractar les cèl·lules amb diverses concentracions creixents d'un fàrmac. La viabilitat cel·lular es va mesurar amb el reactiu CellTiter-Glo Luminiscent Assay Kit® (Promega, Madison, WI, USA), el qual es basa en la mesura de l'ATP que desprenen les cèl·lules metabòlicament actives, de manera que ens dona una mesura de luminescència proporcional al nombre de cèl·lules viables.

- A una placa de 12 pous, posar un mil·lilitre de cèl·lules a cada pou amb una densitat de 400.000 cèl·lules/ml.
- Tractar cada pou amb la concentració de fàrmac que pertoqui.
- Llegir la viabilitat un cop ha transcorregut el temps corresponent, normalment 24 i 48 hores. Per això, resuspendre les cèl·lules de cada pou amb una pipeta de 1000 µl, pujant i baixant suaument el volum del pou. Agafar 50 µl d'aquest pou i passar-ho a una placa de 96 pous Costar® (Corning, NY, USA). Cada pou es llegeix per duplicat.
- Afegir 50 µl del reactiu CellTiter-Glo®, prèviament temperat a temperatura ambient. Aquest reactiu provocarà una lisi de les cèl·lules i es generarà una senyal luminescent proporcional a la quantitat d'ATP present al medi.
- Introduir la placa a un luminòmetre *SynergyMix* (Biotek, Winooski, VT, USA) i realitzar la lectura.

2.2. Determinació de l'activitat caspasa.

L'activació de les caspases 3 i 7 produïda pels diferents tractaments es va mesurar amb el reactiu Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega, Madison, WI, USA). Al reaccionar amb les cèl·lules, aquest reactiu provoca una lisi cel·lular seguida d'un clivellament del substrat per les caspases i la emissió de la senyal luminescent. La luminescència obtinguda es proporcional a l'activitat caspasa.

- La sembra, tractament de les cèl·lules i la manera de resuspendre i passar les cèl·lules a la placa de 96 pous es realitza de la mateixa manera que per l'estudi de la viabilitat descrit al punt 2.1.
- En aquest cas, el volum de cèl·lules utilitzat per la lectura és de 25 μ l. Afegir 25 μ l del reactiu Caspase-Glo® 3/7 Assay i deixar incubar 30 minuts a temperatura ambient.
- Llegir la luminescència amb el SynergyMix (Biotek, Vinoski, VT, USA).

2.3. Sinèrgies.

El terme sinèrgia fa referència a l'efecte cooperatiu entre dos fàrmacs, de manera que l'efecte conjunt és major que la suma dels seus efectes de manera individual. Per determinar l'efecte es calcula l'índex de combinació (CI) (de l'anglès, Combination Index) proposat per Chou i Talalay (1984).

El mètode més comú per analitzar quin efecte tenen dues drogues juntes són els isobologrames. Els isobologrames són representacions gràfiques en dos eixos de coordenades de dosis isoefectives de dos o més fàrmacs. Els valors de IC_{50} dels compostos estudiats (D_a) i (D_b) es grafiquen als eixos x i y de l'isobolograma, i s'uneixen amb una línia recta que s'anomena isobol o línia d'additivitat. A continuació es representen els valors de la dosi de la combinació dels dos fàrmacs (d_a , d_b). Si el punt cau a sobre la recta, la combinació és additiva ($CI=1$). Si el punt es troba per davall l'isobol, la combinació és sinèrgica ($CI<1$) i si el punt cau per damunt l'isobol, la combinació és antagònica ($CI>1$).

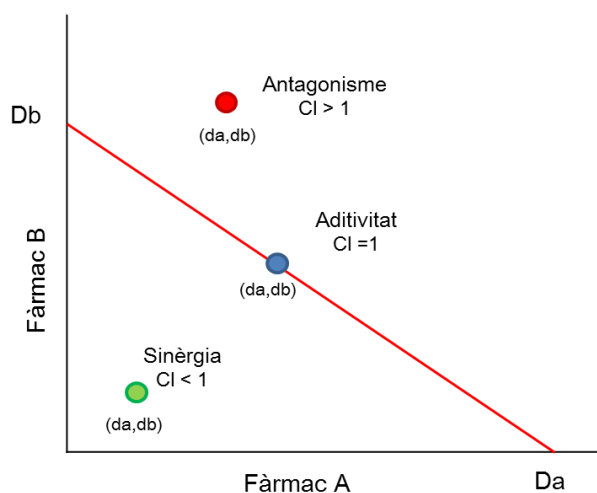


Figura 22. Representació esquemàtica de la construcció d'un isobolograma.

A partir de les corbes dosis resposta explicades a l'apartat 2.1, es van obtenir les IC_{50} dels fàrmacs per separat . La mescla de les dues drogues es va preparar seguint un ratis fixats (per exemple, 1:1, 1:2, 2:1) segons la IC_{50} dels fàrmacs, i es van realitzar unes dilucions seriadades (en el nostre cas, es van realitzar 7 dilucions per cada rati) per obtenir una rang ampli de valors de viabilitat. A la taula 4 s'indiquen les concentracions usades als distints ratis. La metodologia seguida va ser igual a la realitzada per l'estudi de les corbes dosis-resposta (apartat 2.1). La lectura de la viabilitat es va realitzar a les 48 hores utilitzant el reactiu CellTiter-Glo®.

Les dades obtingudes es van analitzar amb el programa *GraphpadPrism5.0*. Aquest programa ens va donar el valor del CI obtingut i ens va dibuixar l'isoblograma.

Jeko-1	Rati 1:1		Rati 1:2		Rati 1:3	
	Citarabina	Oxaliplatí	Citarabina	Oxaliplatí	Citarabina	Oxaliplatí
Dosi 1	0,0125 μ M	0,40625 μ M	0,01 μ M	0,4875 μ M	0,00625 μ M	0,609375 μ M
Dosi 2	0,025 μ M	0,8125 μ M	0,02 μ M	0,975 μ M	0,0125 μ M	1,21875 μ M
Dosi 3	0,05 μ M	1,625 μ M	0,04 μ M	1,95 μ M	0,025 μ M	2,4375 μ M
Dosi 4	0,1 μ M	3,25 μ M	0,08 μ M	3,9 μ M	0,05 μ M	4,875 μ M
Dosi 5	0,2 μ M	6,5 μ M	0,16 μ M	7,8 μ M	0,1 μ M	9,75 μ M
Dosi 6	0,4 μ M	13 μ M	0,32 μ M	15,6 μ M	0,2 μ M	19,5 μ M
Dosi 7	0,8 μ M	26 μ M	0,64 μ M	31,2 μ M	0,4 μ M	39 μ M

Jeko-1	Rati 1:1		Rati 1:2		Rati 1:3	
	Citarabina	Cisplatí	Citarabina	Cisplatí	Citarabina	Cisplatí
Dosi 1	0,0125 μ M	0,545 μ M	0,01 μ M	0,654 μ M	0,00625 μ M	52,32 μ M
Dosi 2	0,025 μ M	1,09 μ M	0,02 μ M	1,308 μ M	0,0125 μ M	26,16 μ M
Dosi 3	0,05 μ M	2,18 μ M	0,04 μ M	2,616 μ M	0,025 μ M	13,08 μ M
Dosi 4	0,1 μ M	4,36 μ M	0,08 μ M	5,232 μ M	0,05 μ M	6,54 μ M
Dosi 5	0,2 μ M	8,72 μ M	0,16 μ M	10,464 μ M	0,1 μ M	3,27 μ M
Dosi 6	0,4 μ M	17,44 μ M	0,32 μ M	20,928 μ M	0,2 μ M	1,635 μ M
Dosi 7	0,8 μ M	34,88 μ M	0,64 μ M	41,856 μ M	0,4 μ M	0,8175 μ M

SP-53	Rati 1:1		Rati 1:2		Rati 1:3	
	Citarabina	Cisplatí	Citarabina	Cisplatí	Citarabina	Cisplatí
Dosi 1	0,0049 µM	0,07375 µM	0,0049 µM	0,0885 µM	0,0030625µM	0,110625µM
Dosi 2	0,0098 µM	0,1475 µM	0,0098 µM	0,177 µM	0,0061 µM	0,22125 µM
Dosi 3	0,0196 µM	0,295 µM	0,0196 µM	0,354 µM	0,01225 µM	0,4425 µM
Dosi 4	0,0392 µM	0,59 µM	0,0392 µM	0,708 µM	0,0245 µM	0,885 µM
Dosi 5	0,0784 µM	1,18 µM	0,0784 µM	1,416 µM	0,049 µM	1,77 µM
Dosi 6	0,1568 µM	2,36 µM	0,1568 µM	2,832 µM	0,098 µM	3,54 µM
Dosi 7	0,3136 µM	4,72 µM	0,3136 µM	5,6641 µM	0,196 µM	7,08 µM

SP-53	Rati 1:1		Rati 1:2		Rati 1:3	
	Citarabina	Oxaliplatí	Citarabina	Oxaliplatí	Citarabina	Oxaliplatí
Dosi 1	0,0049 µM	0,019375µM	0,0049 µM	0,02325 µM	0,0030625µM	0,0290625µM
Dosi 2	0,0098 µM	0,03875 µM	0,0098 µM	0,0465 µM	0,0061 µM	0,058125 µM
Dosi 3	0,0196 µM	0,0775 µM	0,0196 µM	0,093 µM	0,01225 µM	0,11625 µM
Dosi 4	0,0392 µM	0,155 µM	0,0392 µM	0,186 µM	0,0245 µM	0,2325 µM
Dosi 5	0,0784 µM	0,31 µM	0,0784 µM	0,372 µM	0,049 µM	0,465 µM
Dosi 6	0,1568 µM	0,62 µM	0,1568 µM	0,744 µM	0,098 µM	0,93 µM
Dosi 7	0,3136 µM	1,24 µM	0,3136 µM	1,488 µM	0,196 µM	1,86 µM

P006	Rati 1:1		Rati 1:2		Rati 1:3	
	Citarabina	Oxaliplatí	Citarabina	Oxaliplatí	Citarabina	Oxaliplatí
Dosi 1	0,12875 µM	1,3375 µM	0,193125µM	0,66875 µM	0,064375µM	2,00625 µM
Dosi 2	0,2575 µM	2,675 µM	0,38625 µM	1,3375 µM	0,12875 µM	4,0125 µM
Dosi 3	0,515 µM	5,35 µM	0,7725 µM	2,675 µM	0,2575 µM	8,025 µM
Dosi 4	1,03 µM	10,7 µM	1,545 µM	5,35 µM	0,515 µM	16,05 µM
Dosi 5	2,06 µM	21,4 µM	3,09 µM	10,7 µM	1,03 µM	32,1 µM
Dosi 6	4,12 µM	42,8 µM	6,18 µM	21,4 µM	2,06 µM	64,2 µM
Dosi 7	8,24 µM	85,6 µM	12,36 µM	42,8 µM	4,12 µM	128,4 µM

Taula 4. Concentracions de citarabina, cisplatí i oxaliplatí presents a les diferents dosis dels tres ratis utilitzats per realitzar els isoblogrames, essent 1 la dosi més diluïda i 7 la dosi més concentrada.

2.4. Fàrmacs i composts químics.

Per la realització d'aquest estudi s'han utilitzat varis fàrmacs administrats de manera habitual com a quimioteràpia, i tota una sèrie de moduladors químics que actuen a diferents nivells de les vies de senyalització cel·lular. La majoria dels composts químics es subministren en pols i es van resuspendre seguint les recomanacions del fabricant. Tot el procés es va realitzar en condicions d'esterilitat i es va evitar sotmetre les solucions de treballs a cicles repetits de descongelació. A la taula 5 es mostra el resum de les drogues utilitzades.

- **Activador de p53**

Nutlin-3a (Sigma-Aldrich, St.Louis, CO, USA) és un antagonista de MDM-2 que interacciona amb el lloc d'unió del supressor tumoral p53 a MDM2, impedit la seva unió. Aquesta inhibició impedeix la ubiquitinització i posterior degradació de TP53, de manera que p53 s'estabilitza i s'activa, podent realitzar la seva funció de supressor tumoral.

- **Inhibidors de FOXM1**

Els antibiòtics tiazòlics thioestrepton i siomicina-A (Sigma-Aldrich, St. Louis, CO, USA) són inhibidors de l'activitat transcripcional de FOXM1. Thioestrepton reprimeix el promotor de *FOXM1*, disminuint els seus nivells de mRNA i de proteïna. També disminueix la seva activitat transcripcional al impedir la unió de FOXM1 al DNA. Siomicina A redueix la fosforilació de FOXM1 i, per tant, la seva activitat transcripcional, i també redueix el nivell de mRNA i de proteïna de FOXM1.

- **Agents de dany al DNA**

Per veure els efectes del dany al DNA, s'han utilitzat dos agents químics: etopòsid i doxorubicina (Sigma Aldrich, St.Louis, CO, USA). Aquests dos agents són inhibidors de topoisomerases, impedit la correcta síntesi de DNA i provocant ruptures a les cadenes de DNA.

- **Fàrmacs quimioterapèutics**

Com a agents quimioterapèutics administrats de manera habitual a pacients amb limfoma, s'han utilitzat citarabina, cisplatí i oxaliplatí, tots d'ells cedits pel servei de farmàcia de l'Hospital Universitari Son Espases (HUSE).

La citarabina és un antimetabòlit que inhibeix la síntesi del DNA, actuant durant la fase S del cicle cel·lular. A l'interior cel·lular, es metabolitza en nucleòsids que s'incorporen al DNA i impedeix la síntesi de la cadena de DNA, provocant la mort cel·lular.

El cisplatí i l'oxaliplatí son fàrmacs alquilants que formen ponts intra- i intercatenaris, inhibint la síntesi de DNA. El cisplatí és actiu a la fase S del cicle cel·lular, produeix una aturada a la fase G2, seguida d'apoptosi. L'oxaliplatí pertany a la tercera generació de derivats del platí i actua de manera similar al cisplatí, amb la diferència que també inhibeix la síntesi de RNA.

Fàrmac	Fabricant	Mecanisme d'acció	Estocs	Dissolvent
Nulin-3a	Sigma-Aldrich	Inhibidor MDM2	10 mM	DMSO
Thiostrepton	Sigma-Aldrich	Inhibidor FOXM1	10 mM	DMSO
Siomicina-A	Sigma-Aldrich	Inhibidor FOXM1	10 mM	DMSO
Etopòsid	Sigma-Aldrich	Dany DNA	30 mM	DMSO
Doxorubicina	Sigma-Aldrich	Dany DNA	1 mM	DMSO
Citarabina	Servei de Farmàcia HUSE	Antimetabòlit	411 mM	PBS
Cisplatí	Servei de Farmàcia HUSE	Platí alquilant del DNA	3.33 mM	PBS
Oxaliplatí	Servei de Farmàcia HUSE	Platí alquilant del DNA	12.58 mM	PBS

Taula 5. Composts químics i agents citostàtics utilitzats.

3. Anàlisi molecular

Els diferents tractament utilitzats produeixen un efecte a varies vies de senyalització de la cèl·lula, ja sigui a nivell gènic com a nivell d'expressió de proteïnes. Per veure els canvis en l'expressió es van realitzar tota una sèrie de tècniques que permeten determinar els canvis moleculars.

3.1. Tècniques d'estudi de l'expressió gènica.

El resultat dels diferents tractaments sobre l'expressió gènica es va determinar amb la PCR quantitativa a temps real (PCRq). Aquesta tècnica permet la detecció de seqüències específiques de mRNA i la quantificació absoluta del nombre de còpies del gen d'interès presents en una mostra d'una manera molt sensible i fiable.

El primer pas consisteix en extreure el mRNA de la cèl·lula i quantificar-ho. Un cop aïllat, la mateixa quantitat de RNA es retrotranscriu a la seva cadena de DNA complementaria (cDNA) i finalment, es realitza l'amplificació del fragment d'interès per PCRq utilitzant uns encebadors específics.

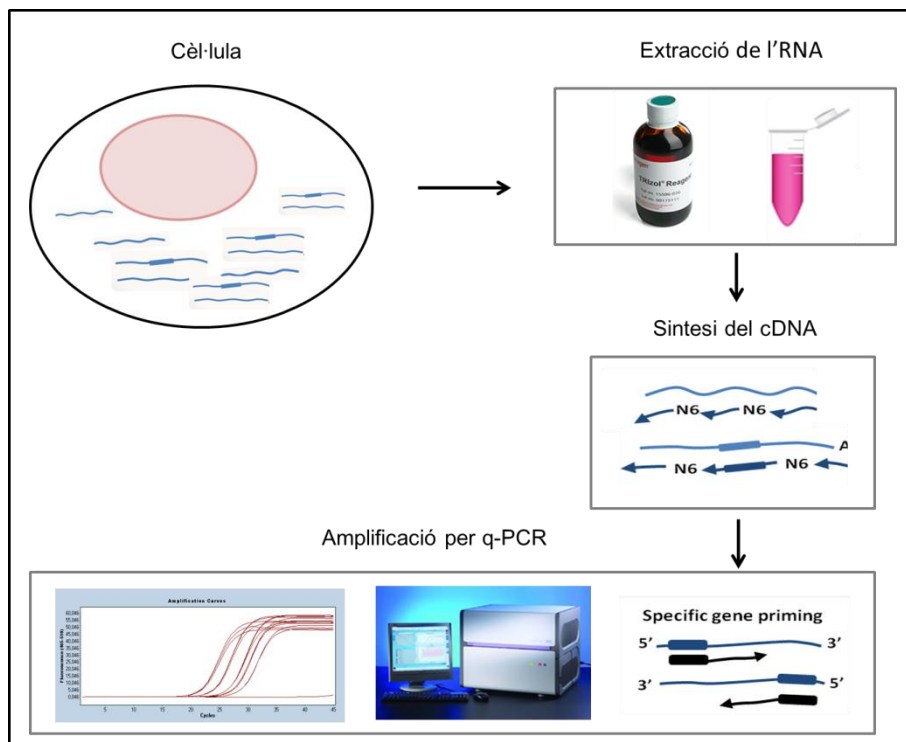


Figura 23. Resum dels punts per realitzar una PCR en temps real.

3.1.1. Extracció de l'RNA.

Les cèl·lules es van tractar amb un determinant compost i es van recollir diferents punts per comparar el canvi en l'expressió gènica al llarg del temps. Per extreure l'RNA es van seguir els següents passos:

- Quan ha passat el temps de tractament desitjat, centrifugar 10 ml de cèl·lules a 1800 rpm durant 5 minuts a temperatura ambient, aspirar el sobrenedant, de manera que s'obté un pèl·let cel·lular.
- Lisar les cèl·lules amb el reactiu Trizol® (Ambion Life Technologies™, Paisley, Escòcia). Afegir 500 µl de Trizol® i pipetejar amunt i avall fins que el pèl·let quedi desfet i resuspès. Passar el volum a un tub de 1.5 ml i congelar a -80°C. Es recomana processar les mostres dins les tres setmanes següents.
- Descongelar el lisat i incubar els tubs 5 minuts a temperatura ambient.
- Afegir 200 µl de cloroform fred i agitar manualment durant 15 segons.
- Incubar a temperatura ambient durant 2-3 minuts.
- Centrifugar a 12.000 rpm durant 15 minuts a 4°C. Amb aquest pas es separa el lisat en tres fases: una inferior de color roig (fase fenol-cloroform), on es troba la fracció proteica, una interfase blanquinosa on hi ha el DNA i una fase superior aquosa transparent amb l'RNA.
- Amb l'ajuda d'una pipeta, traspasar la fase aquosa a un nou tub. S'ha d'evitar agafar la interfase o part de la fase fenòlica, fet que ens contaminaria la mostra i ens inhibiria els següents passos de la reacció. Es recomana no apurar la fase aquosa i descartar la mes propera a la interfase.
- Afegir 500 µl d'isopropanol i mesclar durant 10 segons per inversió (amb aquest pas l'RNA precipita).
- Incubar 10 minuts a temperatura ambient.
- Centrifugar a 12.000 rpm durant 10 minuts a 4°C. Obtindrem un precipitat molt petit, que és on es troba l'RNA.
- Descartar el sobrenedant, anant alerta a no perdre el pèl·let.
- Afegir 1 ml d'etanol 75% fred per rentar i centrifugar a 7500 rpm durant 5 minuts a 4°C.
- Descartar el sobrenedant i deixar que el pèl·let s'eixugui. Les restes d'alcohol que puguin quedar disminuiran la puresa de l'RNA.

- Resuspendre en H₂O lliure de RNases (Sigma Aldrich, St.Louis, CO, USA). El volum d'aigua dependrà de la mida del pèl·let, normalment afegim entre 15 µl i 40 µl. Per ajudar a dissoldre el pèl·let, posar les mostres al bloc tèrmic a 55-60°C durant 10 minuts.
- Guardar les mostres a -80°C o quantificar la quantitat d'RNA que hem obtingut.

La concentració d'RNA es va determinar amb un espectrofotòmetre *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), amb el qual es va mesurar l'absorbància d'1 µl de mostra a 260 nM, longitud d'ona a la qual absorbeixen els àcids nucleics, obtenint una concentració expressada en ng/µl.

Per una altre banda, amb el *Nanodrop 2000* també es va determinar la puresa de l'RNA utilitzant el rati d'absorció a 260 nM i 280 nM. Si el rati 260/280 és de 2 la mostra d'RNA es considera pura. Un rati menor a 2 indica que la mostra està contaminada amb restes de fenol o proteïnes, amb la qual cosa els processos de retrotranscripció o de PCR poden perdre eficiència.

3.1.2. Retrotranscripció.

Mitjançant una PCR convencional i utilitzant un enzim transcriptasa inversa, l'RNA obtingut es va retrotranscriure a DNA complementari (cDNA). Durant aquest procés, s'eliminen els introns i s'obté el cDNA de doble cadena, el qual servirà de motle per a la reacció de la PCRq.

En aquest punt, cada mostra conté una concentració de RNA diferent. El primer pas va consistir en igualar totes les mostres a la mateixa concentració final, en el nostre cas a 500 ng/µl, afegint a la mostra H₂O lliure d'RNases. En el cas que no sigui possible, es van igualar totes les mostres a la concentració més baixa.

La retrotranscripció es va realitzar amb el kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems, Los Angeles, CA, USA), el qual consta de dos reactius: RT Buffer 2x (dNTPs, random octàmers i oligo dT-16) i Enzyme Mix 20x (Multiscribe™ MuLV). El volum final de cada reacció va ser de 20 µl i es va retrotranscriure 1 µg de RNA. Si la mostra d'RNA no es trobava a 500 ng/µl, es va calcular el volum necessari per retrotranscriure 1 µg de RNA, ajustant l'H₂O necessària per arribar al volum final de 20 µl.

Es van introduir 18 µl de Mix de retrotranscripció i 2 µl de RNA a un microtub i es va posar al termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). El programa utilitzat per la reacció és el recomanat pel fabricant i que es detalla a la figura 24. Un cop tenim el cDNA, es va realitzar una dilució 1:7 amb H₂O lliure d'RNAses per eliminar els productes resultants de la retrotranscripció que puguin inhibir la PCR en temps real.

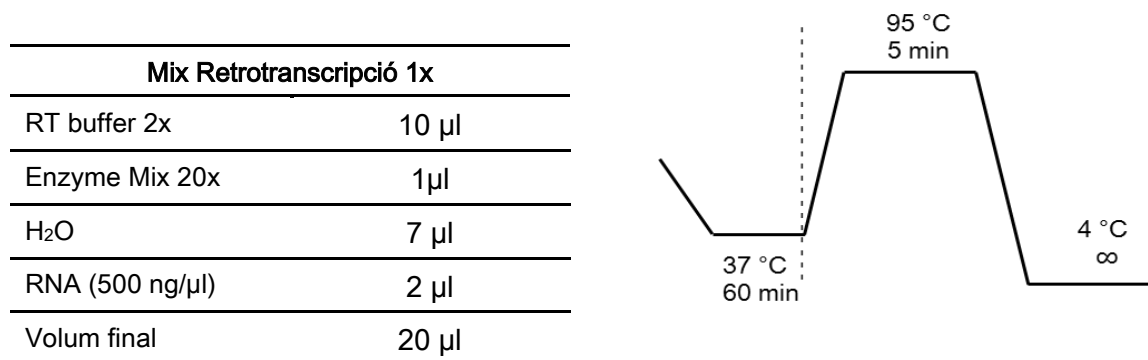


Figura 24. Components dels reactius per la retrotranscripció i esquema del programa de PCR utilitzat.

3.1.3. PCR en temps real.

Mitjançant la tècnica de la PCRq es poden quantificar i monitoritzar a temps real els canvis en l'expressió de la nostra seqüència diana. S'utilitzen uns encebadors específics pel nostre gen i un fluorocrom intercalant o una sonda fluorescent. En el nostre cas, vam utilitzar el fluorocrom SYBR® Green (Roche, Basel, Suïssa), el qual s'incorpora al DNA de manera inespecífica i proporciona fluorescència, la qual es proporcional a la quantitat de cDNA amplificat a cada cicle.

Els encebadors es van dissenyar utilitzant el programa on-line *Primer Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). És important elegir uns bons encebadors per tal de que la reacció sigui específica. S'han de considerar els següents factors:

- La longitud dels encebadors ha de ser d'entre 18-24 parells de bases: suficient llarg per ser específic i suficient curt per unir-se fàcilment a la cadena motle.

- L'amplicó ha de tenir una longitud de 100-200 parells de bases, així la polimerasa tindrà temps d'actuar a cada cicle d'amplificació.
- El contingut màxim de G+C ha de ser d'un 40-60%.
- Els encebadors s'han d'unir a dos introns diferents per tal d'evitar falsos positius i assegurar l'especificitat.

Les seqüències dels encebadors utilitzats es detallen a la taula 6, on el GAPDH i la β 2M es van utilitzar com a control normalitzador.

Gen	Direcció	Seqüència 5'-3'
GAPDH	Forward	TGCACCACCAACTGCTTAGC
	Reverse	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
β 2M	Forward	CCAGCAGAGAATGGAAAGTC
	Reverse	GATGCTGCTTACATGTCTCG
FOXO3a	Forward	GGGGAACCTTCACTGGTGCTA
	Reverse	TGTCCACTTGCTGAGAGCAG
FOXM1	Forward	ACTTTAAGCACATTGCCAAGC
	Reverse	CGTGCAGGGAAAGGTTGT
Bnip3L	Forward	GTGGAAATGCACACCAGCAG
	Reverse	CTTGGGTGGAATGTTTTCCGG
Noxa	Forward	GCAGAGCTGGAAGTCGAGTG
	Reverse	GAGCAGAAGAGTTTGGATATCAG
Puma	Forward	GACGACCTCAACGCACAGTA
	Reverse	AGGAGTCCCATGATGAGATTGT
p27	Forward	TCCGGCTAACTCTGAGGACA
	Reverse	GAAGAATCGTCGGTTGCAGG
PLK-1	Forward	CCATCACCTGCCTGACCATT
	Reverse	GGGGTTCTCCAAGCCTTTA
Survivina	Forward	AGGACCACCGCATCTCTACA.
	Reverse	TGTTCTCTATGGGGTCGTCA
GADD45A	Forward	GCAGAAGACCGAAAGGATGGATA
	Reverse	GCACAACACCACGTTATCGG

Taula 6. Seqüències dels encebadors utilitzats en la PCRq.

La reacció de PCRq es va realitzar en una placa de 96 pous específica pel al sistema *Light Cycler 480*[®] (Roche, Basel, Suïssa) i en un volum final de 10 µl (taula 7). Es van realitzar 40 cicles d'amplificació a una temperatura de 60°C.

Components PCRq	
H ₂ O	1.2 µl
SYBR [®] Green	5 µl
Encebador Forward 10 µM	0.4 µl
Encebador Reverse 10 µM	0.4 µl
cDNA	3 µl
Volum final	10 µl

Taula 7. Components de la reacció de PCRq (volums per pouet).

El *Light Cycler 480*[®] dona lectures de fluorescència expressades com a valors de *Crossing Point* (Cp), que indica el cicle de reacció a partir del qual la senyal de fluorescència comença a ser exponencial. D'aquesta manera, a major quantitat de cDNA inicial, menys cicles es necessiten per assolir el Cp. Per obtenir una quantificació relativa s'ha de realitzar per a cada encebador una recta patró amb concentracions conegudes de cDNA. Es parteix d'un pool de tots el cDNA utilitzats i es fa un banc de dilucions amb 5 punts, dels quals obtindrem la recta patró. L'eficiència de la PCR es calcula utilitzant la fórmula que s'indica a la figura 25, on *slope* és la pendent de la recta patró. El valor d'eficiència varia entre 1.9 i 2.1, essent 2 una eficiència del 100%.

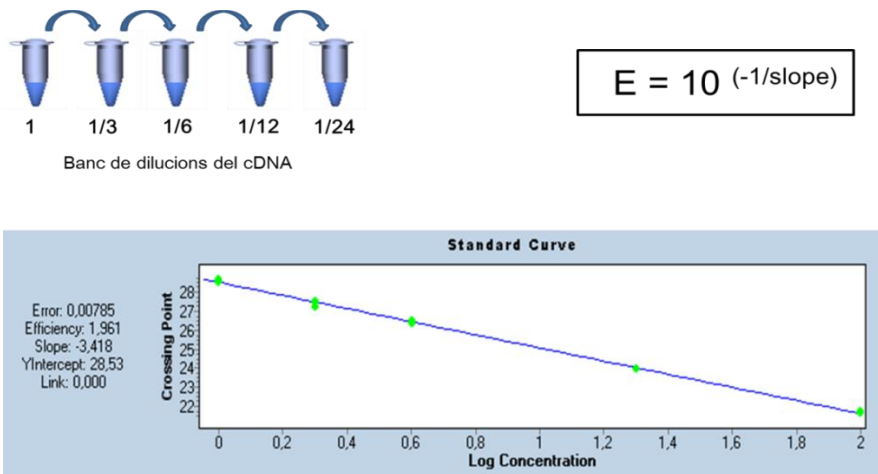


Figura 25. Construcció del banc de dilucions per realitzar la corba patró i fórmula utilitzada per calcular l'eficiència de la PCR en temps real.

Per a realitzar correctament els càlculs cal normalitzar el valor del gen d'interès amb el valor d'un gen de referència o *House-keeping*, el qual presenta uns valors de Cp constant al llarg del tractament. En aquesta tesis, es varen utilitzar com a *House-keeping* GAPDH i $\beta 2M$. És important elegir bé aquest *House-keeping* per tal de minimitzar diferències entre mostres i per dur un control sobre el procés i l'eficiència de la PCRq. No tots els *House-keeping* es poden usar a tots els experiments, per això s'ha de comprovar que els valors de Cp no varien amb el nostre tractament.

Amb el valor d'eficiència i el Cp obtingut de les mostres, es calcula la quantitat relativa d'un transcrit entre dues mostres utilitzant el mètode proposat per Pfaffl (2001). Els nivells relatius de mRNA es calculen com el rati de la concentració relativa dels gens d'interès i del gen de referència. Els nivells d'expressió es representen com a Log2 d'aquests quocients.

$$[(E_{\text{target}})^{\Delta C_p \text{ target (control-sample)}}] / [(E_{\text{referència}})^{\Delta C_p \text{ referència (control-sample)}}]$$

On:

- target és el gen d'interès que volem estudiar (per exemple, FOXO3a)
- referència és el *House-keeping* (GADPH).
- control són les cèl·lules no tractades (untreated o 0h).
- sample és la mostra d'interès, les cèl·lules amb el tractament (per exemple, a les 16h o 24h).

3.2. Tècniques d'estudi de les proteïnes.

L'anàlisi de proteïnes ens permet avaluar l'estat d'activació o d'inhibició, així com quantificar l'expressió d'una determinada proteïna en un context determinat.

3.2.1. Western blot.

EL *western blot* és una tècnica utilitzada per detectar l'expressió d'una proteïna determinada. Es basa en les diferents velocitats de migració que tenen les proteïnes en una matriu d'acrilamida al sotmetre-la a l'acció d'un camp elèctric, fet que permet separar-les segons el seu pes molecular. Les proteïnes s'extreuen d'una mostra i es separaren amb un gel desnaturalitzant de poliàcrilamida (SPD-PAGE). Posteriorment es transfereixen a una membrana, la qual s'incubarà amb un anticòs primari específic per la proteïna d'interès. Aquesta unió es detecta amb un mètode determinat, en el nostre cas, mitjançant una senyal quimioluminiscent.

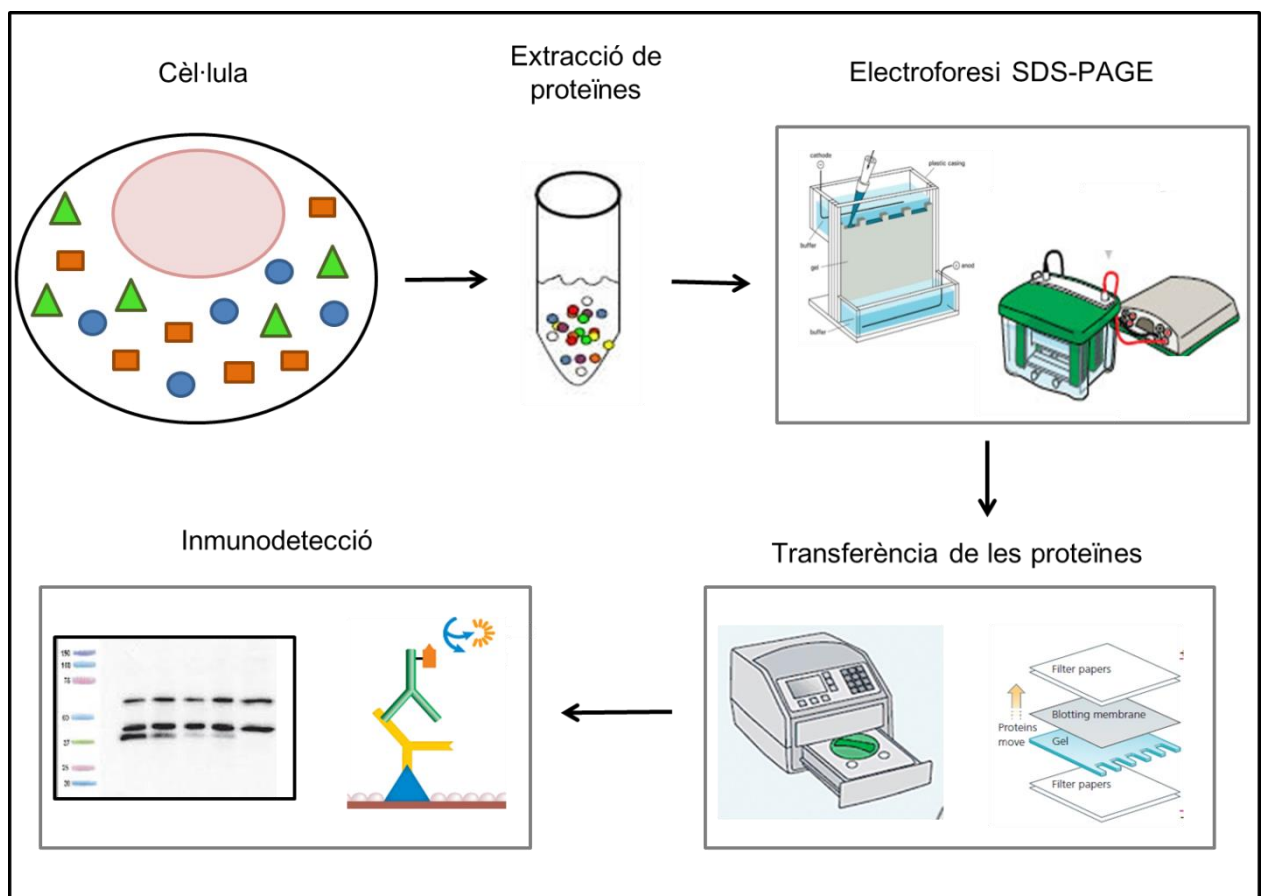


Figura 26. Esquema dels passos a seguir per realitzar un *western blot*.

Recollida de mostres

Es van tractar les cèl·lules amb un determinant compost i es van recollir diferents punts per comparar el canvi en l'expressió de les proteïnes al llarg del temps.

- Transcorregut el temps de tractament desitjat, centrifugar 15 ml de cèl·lules a 1800 rpm durant 5 minuts a temperatura ambient, s'aspira el sobrenedant i s'obté un pèl·let cel·lular. Posar el tub dins gel per evitar la degradació de proteïnes.
- Rentar el pellet amb 1 ml de PBS fred estèril, passar el volum a un tub de 1.5 ml i centrifugar a 2000 rpm durant 8 minuts a 4°C.
- Aspirar el sobrenedant i guardar el pèl·let a -80°C fins al moment de lisar.

Lisat de les cèl·lules

- Dins gel, descongelar el pèl·let i, segons la seva mida, afegir 3 vegades el volum de tampó de lisi. Es sol preparar 10 ml de tampó de lisi, el qual es reparteix en alíquotes i es manté congelat a -20 °C.

Tampó de lisi	<ul style="list-style-type: none"> ○ Tris 50 mM, pH 7.4 ○ NaCl 50mM ○ EDTA 1 mM ○ DTT 5 mM ○ 1% Tritó X-100 ○ Inhibidor de proteases Complete-Mini® (Roche) ○ Inhibidor de fosfatases Phospho-Stop® (Roche) ○ H₂O miliQ
--------------------------	--

Taula 8. Components del tampó de lisis per a extreure les proteïnes d'un pèl·let cel·lular.

- Pipetejar amunt i avall per tal de rompre les cèl·lules.
- Deixar 12 minuts en gel i anar donant cops de vòrtex de tant en tant.
- Centrifugar 13000 rpm durant 12 minuts a 4°C.
- Passar el sobrenedant, el qual conté la fracció proteica, a un nou tub eppendorf. El pèl·let amb les restes de fraccions cel·lulars es descarta.

Quantificació de les proteïnes

La concentració de proteïnes es va determinar amb el *kit Bio-Rad Dc Protein Assay Kit* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Aquest kit conté tres reactius i es basa en el mètode colorimètric de la reacció de Lowry.

- Preparar la mescla de reactius segons les instruccions del kit (20 µl de reactiu S per 1 ml de reactiu A).
- Posar 100 µl d'aquesta mescla a tubs eppendorfs, afegir 2 µl de mostra i 800 µl de reactiu B.
- Incubar 15 minuts a temperatura ambient.
- Passar el volum a una cubeta d'espectrometria .
- Realitzar la lectura a 750 nm amb un espectrofotòmetre (Amersham Biosciences, Amersham, UK). Utilitzar una cubeta amb aigua per fer el blanc. L'aparell ens dona un valor d'absorbància, el qual serà major com més concentrada estigui la mostra.
- Calcular la quantitat de proteïna de la mostra segons una recta patró de BSA. Preparar un banc de dilucions amb concentracions creixents de BSA: 2, 4,8,16 i 32 µg/ µl a partir d'una solució estoc de BSA d'1 mg/ml. Extrapolar els valors d'absorbància obtinguts de la mostra amb aquesta recta patró.
- Preparar les mostres amb 50 µg de proteïna. S'ha de mesclar amb tampó de càrrega 4X, el qual ajudarà al desnaturalitzat de la mostra. La composició es detalla a la taula 9. El volum de tampó de càrrega dependrà del volum de proteïna, seguint aquesta relació: volum lisat proteic/3.

Tampó de càrrega 4X	<ul style="list-style-type: none"> ○ Tris HCl 50 mM, pH 6.8 ○ 10 % Glicerol ○ 2.5% SDS ○ 5% β-mercaptoetanol ○ Blau de bromofenol ○ H₂O miliQ
----------------------------	--

Taula 9. Composició del tampó de càrrega 4X per a la preparació de les mostres de proteïnes per a SDS-PAGE.

Electroforesi en gels SDS-poliacrilamida

Els gels de poliactilamida estan formats per una fase superior concentradora i una fase inferior resolutive. La fase superior permet que totes les proteïnes es concentrin just damunt la fase inferior, on es separaran les proteïnes segons el seu pes molecular. Es va utilitzar el sistema *Mini-Protean III*[®] (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) i es van preparar gels d'una concentració de poliactilamida determinada segons el pes molecular de la proteïna que es volia determinar. La composició dels gels es detalla a la taula 10.

Gel resolutiu	7%	8%	10%	12%	15%
30% Acryl /Bis	2.3 ml	2.6 ml	3.2 ml	4 ml	5 ml
1M Tris pH 8.8	3.8 ml	3.8 ml	3.8 ml	3.8 ml	3.8 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
H₂O	3.8 ml	3.5 ml	2.85 ml	2.1 ml	1 ml
13% APS	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl	80 µl
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl

Taula 10. Composició dels gels resolutiu i concentrador.

Gel concentrador (4%)	5 ml
30% Acryl / Bis	0.67 µl
1M Tris pH 6.8	0.625 µl
10% SDS	50 µl
H₂O	3.63 ml
13% APS	25 µl
TEMED	10 µl

- El primer pas es rentar amb etanol 70% els vidres on es polimeritzarà el gel, i col·locar-ho al suport.
- Preparar la solució del gel resolutiu o Running del percentatge d'actilamida Ultra pure ProtoGel[®] (National Diagnostics, Hessele Hull, UK) desitjat.
- Ràpidament, abans que polimeritzi, introduir el líquid entre els dos vidres (un volum aproximat d'uns 7 ml) i cobrir amb aigua per anivellar el gel resultant, eliminar bombolles d'aire i facilitar la polimerització.
- Preparar el gel concentrador o Stacking.

- Quan ha polimeritzat el gel resolutiu, llevar l'aigua i abocar el gel concentrador. Col·locar les pintes de plàstics per fer els pous on es carregaran les mostres.
- Un cop polimeritzat el gel concentrador, llevar les pintes, posar els vidres al suport i introduir-los dins la cubeta.
- Preparar tampó d'electroforesi 1X amb H₂O destil·lada a partir de l'estoc 10X (taula 11) i posar-ho dins la cubeta de manera que tot el gel quedi cobert de tampó. Així ens assegurem que el corrent elèctric passi a través del gel.

Tampó	○ Tris-HCl 25 mM, pH 8.2
d'electroforesi	○ Glicina 0.192 M
10X	○ 0.1% SDS
	○ H ₂ O miliQ

Taula 11. Composició del tampó d'electroforesi 10X.

- Bullir les mostres amb el tampó de càrrega 4X a un bloc tèrmic a 95 °C durant 5 minuts. Un cop bullides, donar un cop de centrifuga per baixar el volum que hagi pogut condensar.
- Carregar les mostres als pous del gel concentrador. Deixar un pou per carregar 5 µl del marcador de pes molecular de proteïnes Full-Range Rainbow (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, UK). Si queden pous buits, posar-hi 5 µl de tampó de càrrega 1X per evitar que el front corri de manera descompensada.
- Aplicar un corrent elèctric de 60V fins que es veu que totes les mostres es concentren al final del gel i estan a punt d'entrar a la fase resolutiva, uns 10 o 15 minuts. Aleshores, pujar el corrent a 120V i esperar que tot el front avanci. Quan arriba a la part inferior dels vidres i es veu que el front està a punt de sortir dels vidres, aturar el corrent i treure el gel de la cubeta.

Electrotransferència de les proteïnes

Les proteïnes del gel es van transferir a un suport físic, ja sigui una membrana de Polifluorur de Vinilidè (PVDF) o de Nitrocel·lulosa. Es va aplicar un voltatge elèctric sobre el gel per permetre la migració de les proteïnes fins a la membrana escollida, que en el nostre cas va ser la de Nitrocel·lulosa (Millipore, Billerica, MA, USA).

- Separar els vidres que contenen el gel de poliacrilamida , tallar i eliminar es la zona del gel concentrador que conté els pous.
- Retallar paper Whatman™ (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) per muntar el Sandwich de transferència i posar-ho a una cubeta amb tampó de transferència 1X fred, el qual es prepara amb 100 ml de tampó 10X (taula 12), 200 ml de metanol i 700 ml d'aigua.

Tampó de transferència 10X	<ul style="list-style-type: none"> ○ Tris-HCl 25 mM, pH 8.2 ○ Glicina 0.192 M ○ H₂O miliQ
-----------------------------------	---

Taula 12. Composició del tampó de transferència 10X.

- Preparar el Sandwich amb dos trossos de paper Whatman™, la membrana de nitrocel·lulosa prèviament activada amb aigua, el gel de poliacrilamida i dos trossos més de paper Whatman™. La transferència es realitza amb el *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* (Bio-Rad, Hercules, CA, US). El Sandwich es posa a la palangana de transferència de manera que el gel quedi al costat del pol negatiu i la membrana al pol positiu. Al aplicar el corrent elèctric les proteïnes es desplacen cap a la membrana (de negatiu a positiu), on quedaran enganxades. Es va elegir el programa estàndard de transferència (30 minuts a 25 Volts i 0.1 Ampers).



Figura 27. Esquema del Sandwich de transferència i direcció del moviment de les proteïnes.

Immunodetecció

- Desmuntar el Sandwich de transferència i rentar la membrana amb TBS-T 1X (per un litre, posar 50 ml de TBS 20X i 5 ml de Tween-20® 10% en 945 ml d'aigua destil·lada). El pH del TBS 20X (taula 13) s'ajusta a 7.5 utilitzant HCl concentrat.

TBS	○ Tris-HCl 20 mM, pH 7.5
20X	○ NaCl 150mM
	○ H ₂ O miliQ

Taula 13. Composició del TBS 20X.

- Bloquejar la membrana una hora en agitació a temperatura ambient amb una solució de 5% de llet desnatada en pols dissolta en TBS-T.
- Fer dos rentats ràpids amb TBS-T per eliminar l'excés de llet.
- Preparar l'anticòs primari en una solució de 5% d'albumina sèrica bovina (BSA) dissolta en TBS-T i amb 0.05% d'azida sòdica. Els anticossos primaris utilitzats i la seva concentració d'ús es detallen a la taula 13.
- Incubar tot el vespre en agitació a 4 °C.
- Recuperar l'anticòs primari per reutilitzar-lo en altres incubacions i realitzar 3 rentats de 5 minuts amb TBS-T.
- Preparar l'anticòs secundari en una solució del 2% de llet desnatada en pols en TBS-T i incubar una hora en agitació a temperatura ambient. Els anticossos secundaris utilitzats son de casa comercial Dako (Glostrup, Dinamarca) i porten unit l'enzim peroxidasa del rave (HRP, *Horseadish Peroxidase*), que serà qui donarà la senyal quimioluminiscent per detectar la nostra proteïna.
- Realitzar tres rentats de 5 minuts a temperatura ambient amb TBS-T.
- Fer un darrer rentat de 5 minuts a temperatura ambient amb TBS.
- Preparar l'ECL (Millipore, Bellerica, MA, USA) seguint les instruccions del fabricant i incubar les membranes en aquesta solució durant un minut. Posar les membranes entre film transparent i s'introdueixen dins el cassetes de revelar per anar a la cambra fosca, on s'exposaran els films específics per a detecció quimioluminiscent (GE Healthcare life sciences, Buckinghamshire, UK). El film es revelen i es fixen amb líquids fotogràfics de Kodak.

- Les bandes obtingudes al film s'escanegen amb l'equip *Bio-Rad G-800* i quantifiquen amb el programa *Quantity One*[®] (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Anticòs	Fabricant	Hoste	Dilució
Akt	Santa Cruz	Goat	1:1000
p-AKT (Ser 473)	Cell Signaling	Rabbit	1:1000
FOXO3a	Cell Signaling	Rabbit	1:1000
p-FOXO3a (Ser 253)	Cell Signaling	Rabbit	1:1000
FOXM1	Cell Signaling	Rabbit	1:1000
p-FOXM1 (Ser 35)	Cell Signaling	Rabbit	1:1000
p53-DO1	Xin-Lu	Mouse	1:50000
MDM2	Santa Cruz	Mouse	1:1000
p21	Cell Signaling	Mouse	1:1000
PLK-1	Cell Signaling	Rabbit	1:1000
Survivina	Novus-Biological	Rabbit	1:1000
α -tubulina	Sigma-Aldrich	Mouse	1:5000

Taula 14. Anticossos primaris emprats en la immunodetecció per *western blot*.

3.2.2. Co-immunoprecipitació.

La co-immunoprecipitació (Co-IP) és una tècnica basada en la unió antígen-anticòs i s'utilitza per determinar la interacció entre proteïnes. S'utilitza un anticòs específic contra una proteïna coneguda, el qual forma un complex que precipita. Mitjançant la tècnica de *western blot* i utilitzant un anticòs primari contra la proteïna diana, es pot determinar si les dues proteïnes d'interès interaccionen entre elles. En aquest treball, es van utilitzar els anticossos primaris de FOXO3a i FOXM1 per realitzar la immunoprecipitació i es va realitzar el *western blot* i la immunodetecció contra p53.

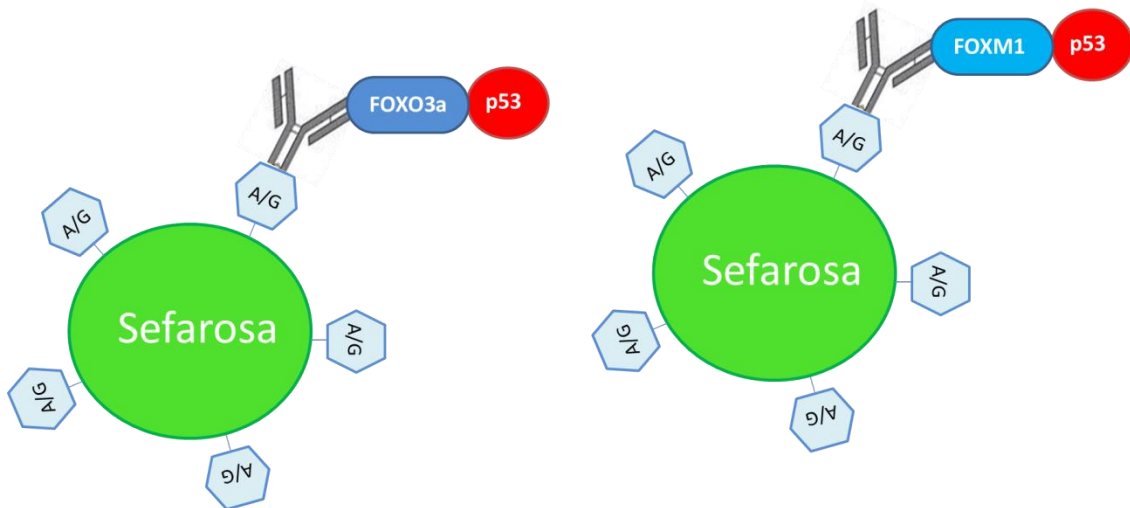


Figura 28. Esquema del complex que es forma durant la immunoprecipitació.

- El protocol de recollida, lisat i quantificació de les cèl·lules és el mateix que l'explicat a l'apartat anterior 3.2.1 del *western blot*. En aquest cas, però, s'afegeix més quantitat de lisis buffer, uns 300 µl per punt, segons la mida del precipitat cel·lular. Separar una part d'aquest TCL (Lisat cel·lular total), el qual ens servirà com a control per detectar la proteïna d'interès.
- Igualar amb lisis buffer el volum de mostra i la concentració de proteïna per tal de tenir 300 µg a cada punt.
- Afegir l'anticòs amb el que volem immunoprecipitar les proteïnes i deixar incubant 1 hora a 4 °C en rotació. Es fa un punt control, per tal de descartar unions inespecífiques, afegint a una mostra sèrum preimmune de conill (Normal Rabbit Serum, NRS). Posar 0.2 µg d'anticòs primari o de NRS, cal calcular el volum a afegir segons la concentració en que es troba cada anticòs.
- Posar 20 µl de beads de proteïna A-Sefarosa si l' anticòs és policlonal o proteïna G-Sefarosa si és monoclonal. D'aquesta manera el complex proteïnes-anticòs quedara unit a la resina. Deixar agitant en rotació 30 minuts a 4 °C.
- Centrifugar 1 minut a 13000 rpm a 4°C i aspirar el sobrenedant. Al pèl·let quedarà la resina amb l'immunoprecipitat.
- Afegir 300 µl de tampó de rentat (taula 15), centrifugar a 13000 rpm 4°C durant 1 minut i aspirar el sobrenedant. Repetir els rentats 6 vegades.

Tampó de rentat	○ Tris HCl 50mM , pH7.4
	○ NaCl 150 mM
	○ EDTA 5mM
	○ DTT 1mM
	○ Inhibidor de proteases Complete-Mini® (Roche)
	○ Tritó X-100 1%
	○ H ₂ O miliQ

Taula 15. Composició de tampó de rentat per immunoprecipitació.

- Afegir el tampó de càrrega 4X necessari i realitzar la separació electroforètica de les proteïnes i el *western blot* de la manera explicada a l'apartat 3.2.1.

3.2.3. Detecció immunocitoquímica.

Aquesta tècnica permet visualitzar, amb l'ajuda d'un microscopi, la localització de les molècules als diferents compartiments de l'interior cel·lular. La immunofluorescència utilitza anticossos marcats amb un fluoròfor, el qual emet llum després d'haver estat excitat amb una longitud d'ona determinada. Aquesta longitud d'ona d'emissió es captada per una sèrie de filtres i s'usarà per obtenir la imatge final. Per captar la imatge es va utilitzar un microscopi confocal TCS SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanya) el qual talla la mostra a diferents plans (seccions òptiques) i després els superposa per obtenir la imatge final, de manera que permet observar el que hi ha dins un determinat volum (de l'ordre de micròmetres) de la cèl·lula.

Per comprovar si els diferents tractaments utilitzats afectaven la localització nuclear o citoplasmàtica de FOXO3a, es va realitzar el següent protocol d'immunofluorescència:

- Les cèl·lules en suspensió s'han d'adherir a un cobreobjectes (Sarstedt, Alemanya) que permeti la visualització al microscopi. Per aquest motiu, posar el cobreobjectes a una placa de 24 pous i recobrir amb 300 µl de poli-lisina. Deixar 1h a 37°C.
- Aspirar la poli-lisina i rentar amb PBS 1X (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA).
- Aspirar el PBS i posar 350 µl de cèl·lules, control o amb el tractament corresponent, al pou on hi ha el cobreobjectes. Centrifugar la placa a 1200 rpm durant 5 minuts amb la centrifuga a temperatura ambient. Les cèl·lules precipitaran i es quedaran adherides al cobreobjectes gràcies a la poli-lisina. A

- la centrifuga es va programar una acceleració i desacceleració lentes per evitar que les cèl·lules perdessin la seva morfologia redona.
- Aspirar el medi i fixar les cèl·lules amb 400 µl de formaldehid al 4%. Incubar 30 minuts a temperatura ambient.
 - Eliminar el formaldehid i realitzar dos rentats amb PBS 1X.
 - Per permeabilitzar les cèl·lules, afegir 300 µl de Tritó X-100 al 0,2% (Sigma-Aldrich). La solució de Tritó es prepara amb el PBS 1X utilitzat als rentats. Incubar 10 minuts a temperatura ambient.
 - Aspirar el Tritó X-100 i fer dos rentats amb PBS 1X.
 - Bloquejar les cèl·lules amb 300 µl de BSA al 0.3% dissolta en PBS 1X. Incubar durant 30 minuts a temperatura ambient.
 - Realitzar dos rentats amb PBS 1X i posar el cobreobjectes damunt un tros de parafilm a una cambra humida i fosca. Això s'aconsegueix recobrint una placa de cultius cel·lulars amb paper d'alumini i posant al seu interior paper de filtre banyat amb aigua destil·lada. La part del cobreobjectes amb les cèl·lules ha de quedar a la part superior.
 - Realitzar una dilució 1:30 d'anticòs primari FOXO3a (Upstate) en BSA al 0.3%. Posar 30 µl d'aquest anticòs primari damunt el cobreobjectes, de manera que es totes les cèl·lules quedin cobertes. Deixar una hora a l'incubador (37°C i 5% CO₂).
 - Posar PBS 1X dins un tub de 50 ml i realitzar 30 rentats per immersió del cobreobjectes. El cobreobjectes s'agafa per una vorera amb l'ajuda d'unes pinces. Cal tenir sempre present en quin costat es troben les cèl·lules.
 - Preparar una dilució d'anticòs secundari 1:100 en BSA 0.3%, posar 30 µl damunt el cobreobjectes a la cambra humida i deixar una hora a l'incubador. Es va utilitzar l'anticòs secundari fluorescent anti-rabbit Alexa-488 (Life Technologies)
 - Rentar per immersió 30 vegades en PBS 1X.
 - Tenyir els nuclis amb una dilució 1:1000 de DAPI (Invitrogen, Eugene, OR, USA) en BSA al 0.3% i recobrir les cèl·lules. Incubar 5 minuts a la cambra humida a temperatura ambient.
 - Realitzar 30 rentats per immersió en PBS 1X.
 - Per muntar les preparacions, posar damunt un portaobjectes una gota de medi de muntatge per a preparacions fluorescents Fluorescent Mounting Media (Dako, Carpinteria, CA, USA) i posar el cobreobjectes amb les cèl·lules cap

avall, intentant que no quedin bombolles dins el medi de muntatge. Deixar eixugar fins al dia següent.

- Observar les preparacions amb el microscopi confocal.

4. Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic dels resultats obtinguts es va realitzar amb el programa informàtic SPSS 14.1 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Aquest anàlisi va consistir amb un test t-Student per tal de determinar diferències entre el grup control i el grup tractat, obtenint un p-valor que si era inferior o igual a 0.05 indicava que els resultats eren estadísticament significatius.

RESULTATS

Capítol 1

1.1. Activació del supressor tumoral p53 amb nutlin-3a

El supressor tumoral p53 intervé en la resposta cel·lular en front a múltiples estímuls, tals com dany al DNA, hipòxia o senyals oncogèniques. En front aquestes situacions d'estrès, p53 activa mecanisme d'aturada del cicle cel·lular, apoptosi o senescència.

Encara que les mutacions de p53 no són molt freqüents a LCM, es poden trobar alteracions als reguladors negatius de p53, com per exemple, a MDM2. Nutlin-3a és una petita molècula que inhibeix de manera específica la interacció entre p53-MDM2, estabilitzant i activant p53.

En aquest apartat, s'ha volgut determinar els efectes de nutlin-3a sobre la viabilitat cel·lular de LCM i dels seus efectes a nivell molecular sobre l'eix FOXO3a-FOXM1.

1.1. 1. Anàlisi de l'efecte de nutlin-3a sobre la viabilitat cel·lular i estudi de l'activitat caspasa.

Per tal d'avaluar els efectes de l'inhibidor de MDM2, nutlin-3a, sobre la proliferació de cèl·lules de LCM, es va utilitzar un panell de 5 línies cel·lulars de LCM, les quals presenten distints estatus del supressor tumoral p53. A la taula 16 s'indiquen les línies cel·lulars utilitzades i el seu estat de p53.

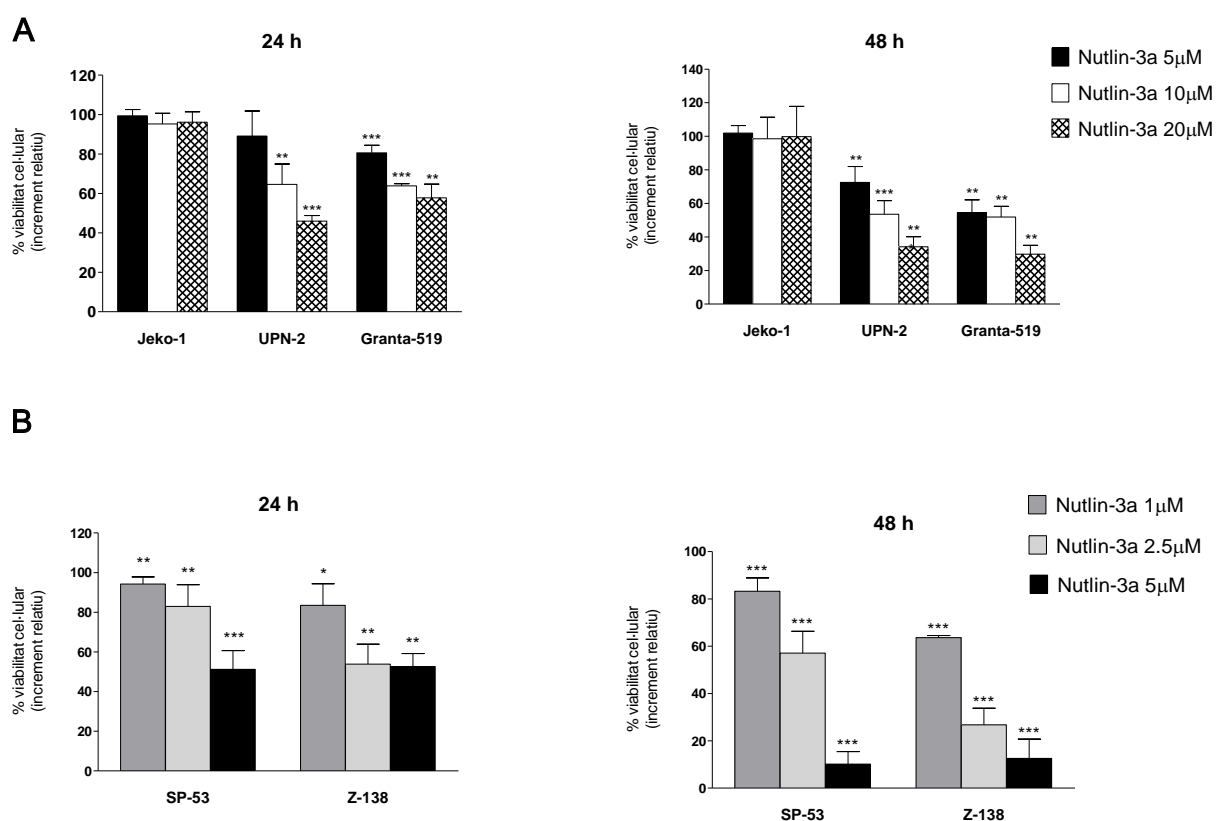
Línia cel·lular	Estat de p53
Jeko-1	del/del
Granta-519	del/wt
UPN-2	del/mt
SP-53	wt/wt
Z-138	wt/wt

Taula 16. Línies cel·lulars de LCM i estat dels dos al·lels de p53, on del: delecionat, mt: mutat, wt: *wild type*.

Les línies cel·lulars es van tractar amb dosis creixents de nutlin-3a i la viabilitat cel·lular es va analitzar a les 24 i 48 hores. Cal destacar que les dosis utilitzades es van ajustar en funció de l'estat de p53, de manera que les cèl·lules que presenten mutació (mut) o delecio (del) de p53 es van tractar amb dosis de 5, 10 i 20 μM , mentre que les que són

fenotip salvatge, (d'ara endavant *wild type* o wt), es van tractar amb 1, 2.5 i 5 μM de nutlin-3a.

Es va observar com les línies UPN-2 (p53 mut/del) i Granta-519 (p53 wt/del) responien de manera dosi-dependent a nutlin-3a, però demostrant certa resistència, de manera que a les 48 hores de tractament a 20 μM la viabilitat fou del 40% en el cas de les UPN-2 i del 30% en el cas de les Granta-519 (figura 29.A). La línia Jeko-1 (p53 del/del) mostrà una resistència total al tractament amb nutlin-3a, ja que a les 48 hores de tractament a 20 μM la seva viabilitat era del 100%. En canvi, la viabilitat de les línies SP-53 i Z-138 (ambdues p53 wt/wt) disminuïa de manera gradual, demostrant una gran sensibilitat a nutlin-3a, romanent un 10% de cèl·lules viables a les 48 hores de tractament a una dosi de 5 μM (figura 29.B).



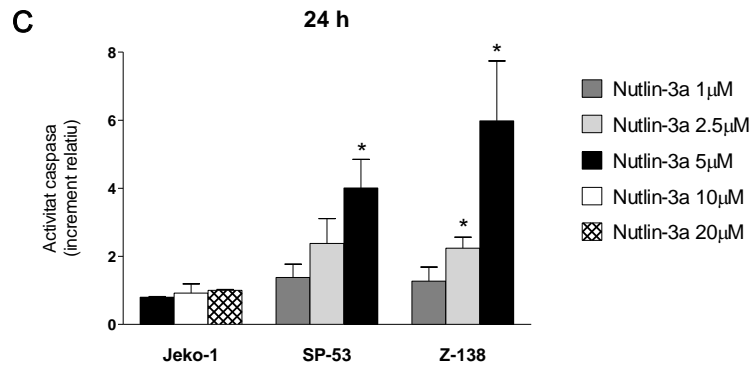


Figura 29. Efecte de nutlin-3a sobre la viabilitat cel·lular i l'activitat caspasa. **(A, B)** Les línies cel·lulars es van tractar amb les concentracions de nutlin-3a indicades durant 24 i 48 hores. La viabilitat cel·lular es va determinar i es representa com a percentatge relatiu respecte a les cèl·lules no tractades. Les dades són la mitja \pm SEM de tres determinacions independents realitzades en duplicat. Els asteriscs indiquen diferències significatives (T-Student: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) comparat amb el control. **(C)** Determinació de l'activitat caspasa. Les cèl·lules Jeko-1, SP-53 i Z-138 foren tractades amb les dosis de nutlin-3a indicades i es va mesurar l'activitat de les caspases 3 i 7 a les 24 hores. El resultat s'expressa en forma d'increment relatiu respecte al control, i les dades indiquen la mitja \pm SEM de tres experiments independents realitzades en duplicat. La inducció de l'activitat caspasa a les línies SP-53 i Z-138 és estadísticament significativa (T-Student: * $p < 0.05$).

Per tal de comprovar si aquesta disminució de la viabilitat cel·lular estava relacionada amb un augment de l'activitat caspasa, es van tractar les línies Jeko-1, SP-53 i Z-138 amb diverses dosis de nutlin-3a i es va mesurar l'activitat de les caspases efectores 3 i 7 a les 24 hores (Figura 29.C). Els resultats obtinguts indiquen que nutlin-3a no va induir l'activitat caspasa a la línia Jeko-1. En canvi, a les línies cel·lulars SP-53 i Z-138 l'activitat caspasa va augmentar de forma dosi-depenent en resposta al tractament amb nutlin-3a, amb una inducció relativa de entre 6 i 8 vegades respecte el control. Aquests resultats correlacionen amb els canvis en viabilitat observats a les tres línies, de manera que a mesura que disminueix la viabilitat, s'indueix l'activitat de les caspases 3 i 7, indicant mort cel·lular per apoptosi.

A continuació vàrem voler confirmar els resultats obtinguts en cultius primaris de LCM. Per això es van realitzar els mateixos experiments en cèl·lules primàries de dos pacients de LCM (P002 i P006). Donat que l'efecte de nutlin-3a és depenent de l'estat de p53, en primer lloc es van seqüenciar mostres d'ambdós pacients mitjançant la tecnologia *Next Generation Sequencing* (NGS). A la taula 17 es detalla el resultat de la seqüenciació, que va permetre concloure que P002 presenta una deleció de p53, mentre que en el cas de P006 p53 es troba en forma *wild type*. L'informe complet de la seqüenciació es detalla a l'annex-3.

	P002	P006
Polimorfismes <i>TP53</i>	rs 1042522 en homozigosis	rs1042522 en heterozigosis
Alteracions deletèries <i>TP53</i>	c637 C>T (p.R213*) Nonsense (COSM10654). Present en el 87% de les seqüències	No evidenciables

Taula 17. Resultat de la seqüenciació per NGS dels pacients P002 i P006. Es va extreure el DNA de $5 \cdot 10^6$ cèl·lules primàries amb el kit QIAamp® de Quiagen i es van seqüenciar per NGS utilitzant el panell TrueSightTumor (Illumina).

Les cèl·lules dels dos pacients es van tractar amb dosis creixents de nutlin-3a i la viabilitat cel·lular es va analitzar a les 24 i 48 hores. La viabilitat del pacient P002 no es va veure alterada ni a les 24 ni a les 48 hores, mantenint-se al voltant del 100%, fet que suggereix que el tractament amb nutlin-3a no causa cap efecte a cèl·lules primàries que presenten deleció de p53. En canvi, les cèl·lules del pacient P006 respongueren al tractament amb nutlin-3a, com indica la disminució de la seva viabilitat amb el temps i de forma dosi-depenent, assolint a les 48 hores uns valors de viabilitat del 10% a les concentracions de 10 i 20 μM (figura 30.A).

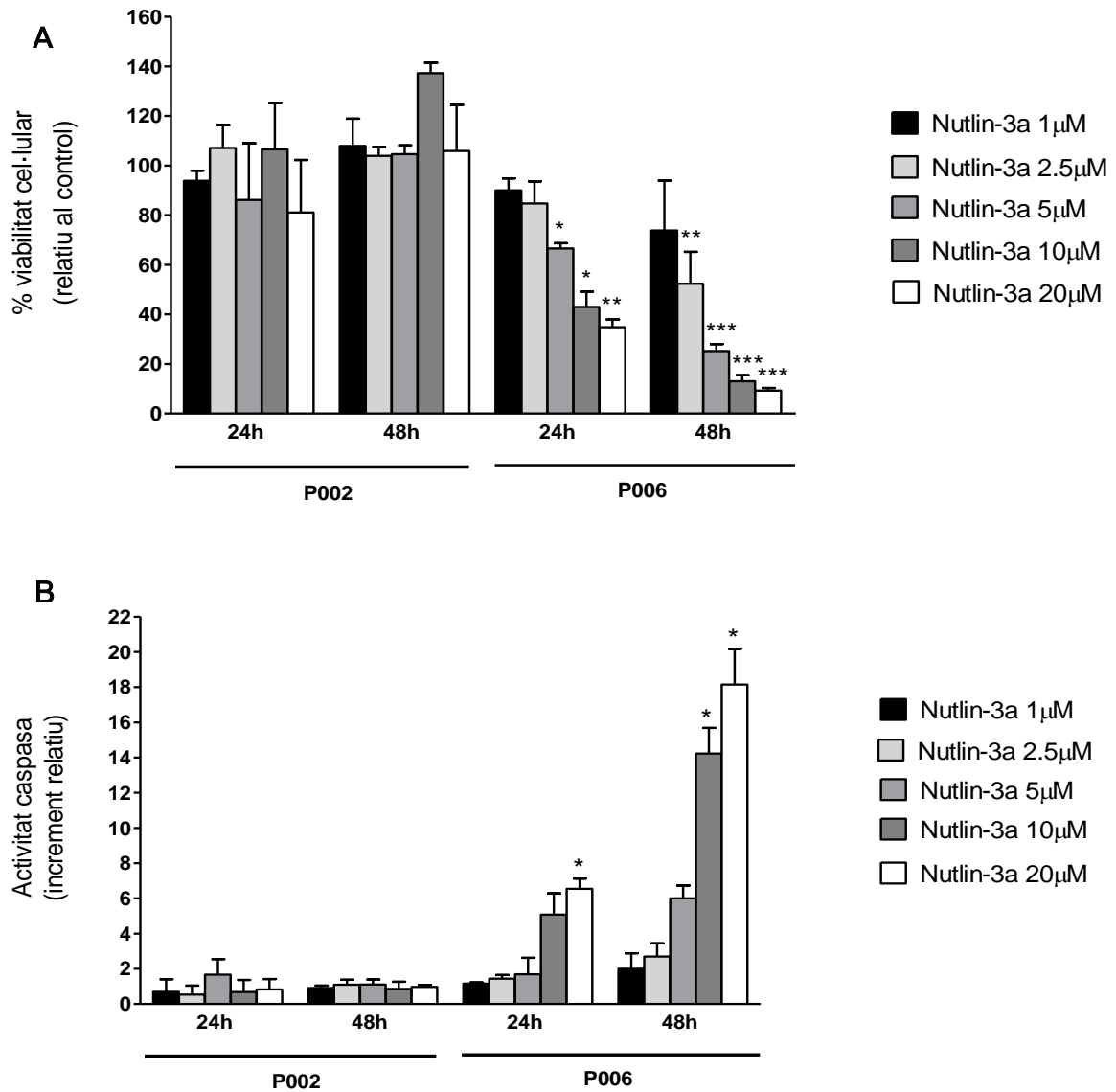


Figura 30.(A) Efecte de nutlin-3a sobre la viabilitat cel·lular a cultius primaris de LCM. Les cèl·lules primàries es van tractar durant 24 i 48 h amb les dosis de nutlin3-a indicades. El gràfic representa el percentatge relatiu de cèl·lules viables respecte a les cèl·lules no tractades.**(B)** Determinació de l'activitat de les caspases 3/7. Les cèl·lules primàries dels pacients P002 i P006 es van tractar amb les concentracions de nutlin-3a indicades i es va mesurar l'activitat caspasa a les 24 i 48 h. El resultat s'expressa en forma d'increment relatiu respecte al control. Els gràfics de viabilitat i d'activitat caspasa indiquen la mitjana \pm SEM de tres determinacions independents realitzades en duplicat. Els asteriscs indiquen diferències significatives (T-Student: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) respecte als controls.

En relació a l'anàlisi de l'activitat de les caspases efectores 3/7, no es va observar inducció significativa de l'activitat caspasa a les cèl·lules del pacient P002, ni a les 24 ni a les 48 hores a cap de les dosis de nutlin-3a utilitzades. En canvi, el pacient P006 mostrà una inducció en l'activitat caspasa de manera dosi-dependen, és a dir, a major concentració de nutlin-3a, es va detectar una major activació de les caspases 3 i 7 (figura 30.B).

Aquests resultats presenten una forta correlació amb els de viabilitat, de manera que a major disminució de la viabilitat cel·lular, s'observa una major inducció de l'activitat caspasa. En canvi, l'activació de les caspases no es produeix quan la viabilitat cel·lular no varia amb el tractament.

1.1.2. Efectes de nutlin 3-a sobre l'expressió gènica.

A continuació es van voler estudiar els efectes de l'activació de p53 amb nutlin-3a sobre els nivells de mRNA dels factors de transcripció FOXO3a i FOXM1, així com de les seves dianes. Donat que l'efecte de nutlin-3a sobre la viabilitat de les cèl·lules de LCM és dependent de l'estat de p53, l'expressió gènica es va estudiar també en línies cel·lulars amb diferent estat de p53.

Les cèl·lules es van tractar amb 10 μ M de nutlin-3a i a les 24 hores es va procedir a purificar el mRNA de les cèl·lules tractades. Després d'obtenir el corresponent DNA complementari (cDNA), es van analitzar els gens d'interès per PCR quantitativa a temps real.

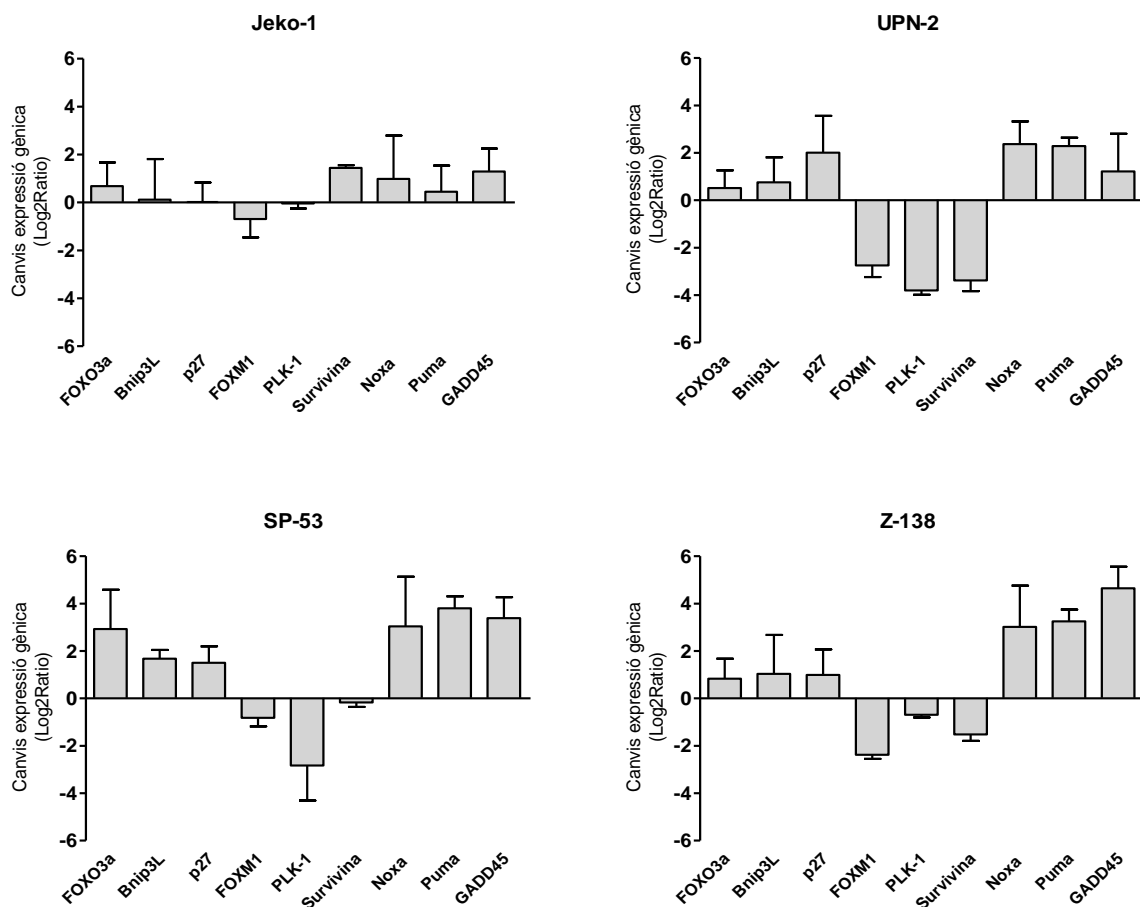
En resposta al tractament amb nutlin-3a, es va observar un increment dels nivells de mRNA del factor de transcripció FOXO3a a totes les línies de LCM utilitzades (figura 31.A), essent aquest increment major en el cas de les línies amb p53-wt (SP-53 i Z-138). Els nivells d'expressió del mRNA de BNIP3L i p27^{kip1}, dianes transcripcionals de FOXO3a, també es varen veure incrementats en les línies UPN-2, SP-53 i Z-138, mentre que aquesta inducció era inapreciable en el cas de la línia Jeko-1, suggerint que l'activitat transcripcional de FOXO3a semblava estar influenciada per la presència de p53.

Pel que fa al factor de transcripció FOXM1 i a les seves dianes transcripcionals PLK-1 i SURVIVINA, es va detectar una disminució dels seus nivells de mRNA en resposta a nutlina-3a a les línies UPN2, SP-53 i Z-138. A la línia Jeko-1 s'observà en canvi una modesta disminució dels nivells d'expressió de FOXM1, però què en aquest cas no anava acompanyada de canvis correlatius en els nivells d'expressió de les seves dianes PLK-1 i SURVIVINA. De fet en el cas de SURVIVINA es va detectar un increment de la seva expressió. Globalment, aquests resultats suggereixen que la repressió efectiva de FOXM1 per nutlin-3a depèn de la presència de p53.

L'anàlisi dels nivells dels mRNAs de NOXA, PUMA i GADD45, dianes transcripcionals de p53, va mostrar el seu increment en resposta a nutlin-3a. Aquest augment en l'expressió és molt més marcat a les línies SP-53 i Z-138 que en el cas de les línies Jeko-1 i UPN-2, on a causa de la deleció o la mutació de p53 aquesta inducció és menor.

En el cas dels cultius primaris analitzats, els canvis en l'expressió gènica també semblaven esser clarament dependents de p53 (Figura 31.B). El pacient P002 (p53-del) no experimentà canvis destacables en l'expressió dels gens analitzats en resposta a nutlin-3a, mentre que en el pacient P006 (p53-wt) es va observar inducció de l'expressió de l'mRNA de FOXO3a en resposta a nutlin-3a i, conseqüentment, de les seves dianes BNIP3L i p27^{kip1}. També es va detectar l'augment dels nivells de *NOXA*, *PUMA*, i *GADD45*, dianes de p53. L'expressió de FOXM1 disminueix en el cas del pacient P006, encara que no es va constatar la mateixa tendència en PLK-1. De forma interessant, es va detectar un increment de l'expressió de FOXM1 en el pacient P002, fet que es relaciona amb la mutació de p53.

A



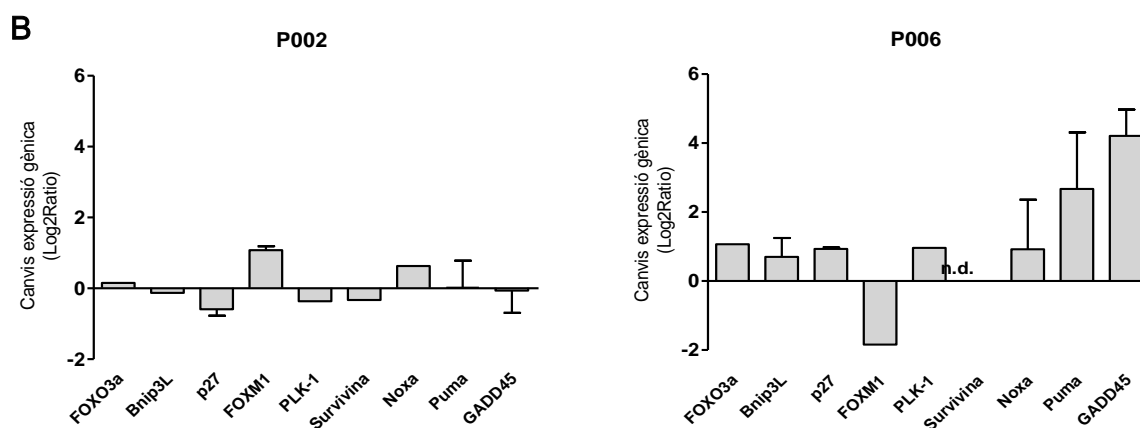


Figura 31. Canvis en l'expressió gènica en resposta al tractament amb nutlin-3a. **(A)** Les línies cel·lulars i **(B)** les cèl·lules primàries indicades es van tractar amb 10 μ M de nutlin-3a durant 24 h. L'RNA es va recollir amb Trizol i es va obtenir el cDNA corresponent. A la gràfica s'indiquen els canvis en l'expressió dels mRNA dels gens dianes normalitzats pels gens *housekeeping* control (GAPDH, B2M) i representen la mitjana \pm SEM de tres determinacions independents.

1.1.3. Efectes moleculars de nutlin-3a sobre els components de la via PI3K/Akt.

Per tal de comprovar els efectes de nutlin-3a sobre la via PI3K/Akt, es van tractar les línies SP-53, Z-138, Jeko-1 i UPN-2 amb nutlin-3a a una dosi de 10 μ M a diferents temps, analitzant els canvis en la fosforilació i expressió proteica dels components de la via de senyalització PI3K/Akt (figura 32).

A les cèl·lules SP-53 i Z-138 el tractament amb nutlin-3a va reduir els nivells de fosforilació d'Akt al residu Ser-473, indicant la inactivació d'aquesta cinasa. Conseqüentment, també es va observar la reducció dels nivells de fosforilació de FOXO3a al residu Ser-253 a aquestes dues línies cel·lulars. En canvi, no es varen detectar canvis rellevants en els nivells de fosforilació d'Akt ni de FOXO3a a les línies Jeko-1 i UPN-2, encara que a les cèl·lules UPN-2 es va observar una lleugera desfosforilació de FOXO3a. Aquestes observacions suggereixen que els canvis que nutlin-3a provoca sobre l'activació de FOXO3a depenen de l'estat de p53.

L'inhibidor de MDM2, nutlin-3a, inhibeix la unió de MDM2 a p53 impedit el marcatge de p53 amb ubiquitina per a la seva degradació al proteosoma, fet que condueix a la seva ràpida acumulació a l'interior cel·lular. A les línies SP-53 i Z-138 es produeix un augment ràpid dels nivells de p53 i de MDM2, augment que es manté fins a les 8 hores per després començar a disminuir fins a tornar a nivells bassals. A la línia UPN-2 també varen augmentar els nivells de p53 i MDM2 a partir de les 2 hores, però a

diferència de les altre dues línies, aquests nivells es mantenen elevats al llarg de temps, indicant que aquestes cèl·lules responen a nutlin-3a encara que presentin una mutació a p53. En canvi, les cèl·lules Jeko-1 no presenten canvis en els nivells de MDM2, donat que no expressen p53. Una de les principals dianes transcripcionals de p53 és p21^{cip1}, i es veu com la seva expressió varia de manera paral·lela a p53. A la línia Jeko-1, al no tenir expressió de p53, tampoc es detecta expressió de p21^{cip1}.

Es va voler avaluar si aquests canvis sobre l'expressió i activitat de p53 i FOXO3a tenien efecte sobre l'oncogen FOXM1. Es va observar que a totes les línies de LCM analitzades, excepte a la línia Jeko-1, tant l'expressió com la fosforilació de FOXM1 al residu Ser-35 disminueixen. Aquests canvis tenen lloc a partir de les 16 hores, de manera que les modificacions en l'expressió de FOXM1 no es donen de manera tan ràpida com en el cas de p53 o FOXO3a. Les dianes transcripcionals de FOXM1, PLK-1 i survivina, disminueixen lleugerament la seva expressió a les 24 hores en resposta a la baixada de FOXM1. Els nivells de FOXM1 no canvien en el cas de la línia Jeko-1, observant-se fins i tot un petit augment a les 24 hores, suggerint que a línies cel·lulars de LCM és necessari l'activació de FOXO3a i la presència de p53 per tal d'inhibir l'expressió de FOXM1.

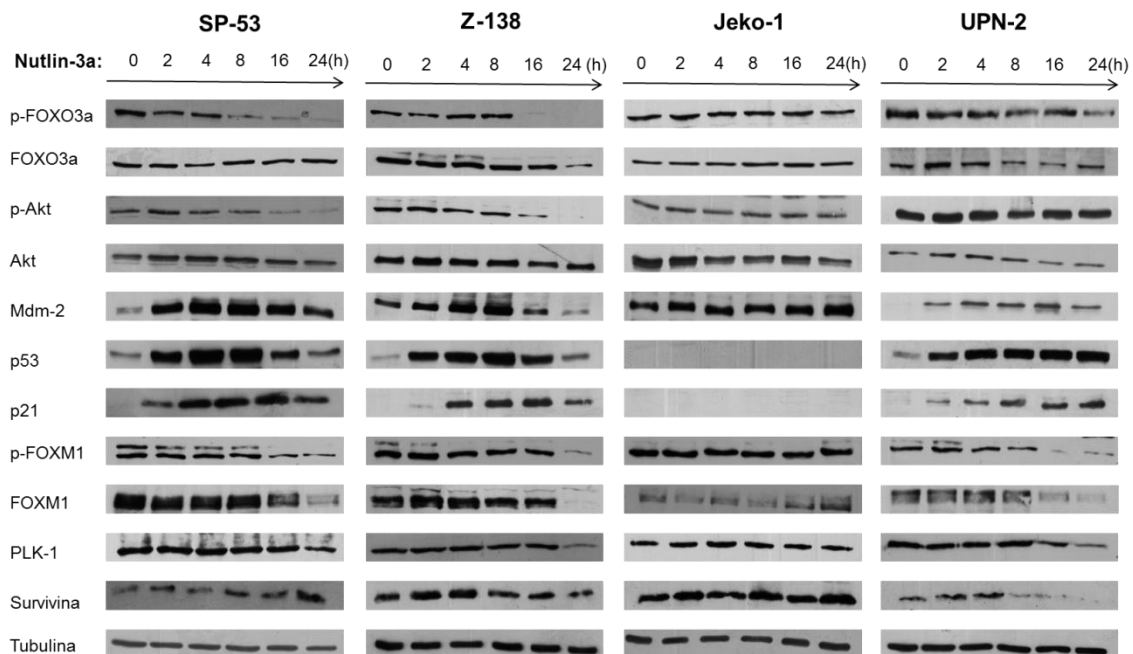


Figura 32. Anàlisi molecular dels efectes de nutlin-3a sobre línies de LCM. Les cèl·lules es van tractar amb 10 μ M de nutlin-3a i es van recollir a les hores indicades. Els extractes proteics es van lisar i es van analitzar per *western blot* amb anticossos específics. Es va utilitzar α -tubulina com a control de càrrega.

El següent pas va ser determinar si nutlin-3a produïa efectes semblants a cèl·lules primàries de LCM (figura 33) Per aquest motiu, es van tractar les cèl·lules dels pacients amb 10 μ M de nutlin-3a i es van analitzar els nivells de les proteïnes més rellevants. Al tractar-se de cultius primaris i disposar de poc material, es va limitar el temps de tractament així com el número de proteïnes analitzades.

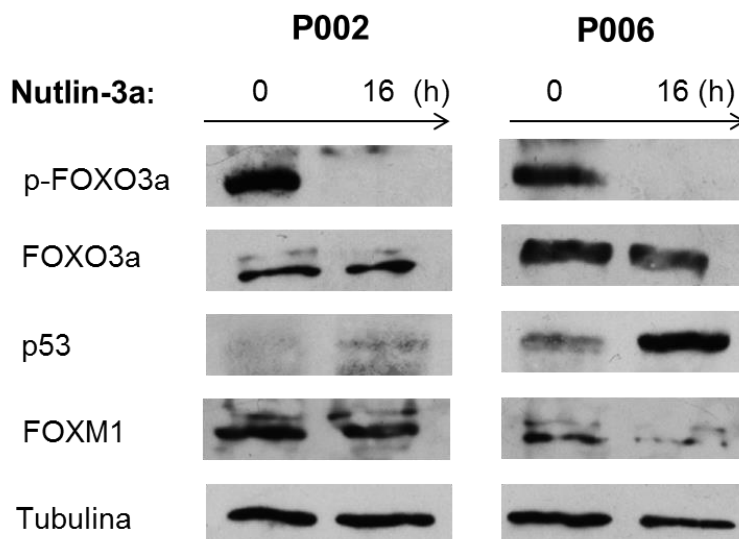


Figura 33. Efectes de nutlin-3a sobre cèl·lules primàries de LCM. Es varen preparar lisats proteics de cultius primaris de LCM tractats amb nutlin-3a durant 16h. L'expressió de les proteïnes indicades es va analitzar per *western blot* utilitzant anticossos específics. Es va utilitzar α -tubulina com a control de càrrega.

A diferència de les línies cel·lulars, els nivells de fosforilació de FOXO3a varen disminuir tant en el cas del pacient P002 com del pacient P006, de manera que els canvis no semblen estar condicionats per l'estat de p53 de les cèl·lules. Es va observar la inducció de p53 en el cas del pacient P006, mentre que, tal com s'esperava, el pacient P002 no induïx l'expressió de p53. De forma interessant, els nivells de FOXM1 no varien en el pacient P002, però sí que disminueix la seva expressió en el pacient P006, tal com passa a les línies cel·lulars. Aquests resultats indiquen que a cèl·lules primàries de LCM és necessari activar p53 per tal de reprimir l'expressió de FOXM1.

1.1.4. Anàlisi de la interacció entre els factors de transcripció p53 i FOXO3a/FOXM1 en resposta a nutlin-3a.

Els resultats obtinguts fins ara indiquen que hi ha una relació funcional entre els factors de transcripció p53, FOXO3a i FOXM1. Es va voler comprovar si aquesta relació funcional comportava una interacció física. Per aquest motiu, es van dur a terme assajos d'immunoprecipitació. Les cèl·lules es van tractar amb 10 μ M de nutlin-3a durant el temps indicat, i els extractes cel·lulars es van immunoprecipitar amb els anticossos anti-FOXO3a o anti-FOXM1 i es va analitzar la presència de p53 a l'immunoprecipitat per *western blot*.

A les tres línies cel·lulars utilitzades, es va observar la unió de p53 als factors FOXO3a i FOXM1 (figura 34). Aquesta interacció es produeix en paral·lel a la modulació dels nivells de p53 induïts en resposta a nutlin-3a. A les cèl·lules UPN-2 també s'observa una interacció entre p53-FOXO3a i p53-FOXM1, de manera que la mutació present a p53 no estaria afectant al lloc o llocs d'unió entre aquests factors de transcripció. De fet, tot i la disminució clara en l'expressió de FOXM1 en resposta al tractament, es pot observar interacció amb p53 a aquestes cèl·lules.

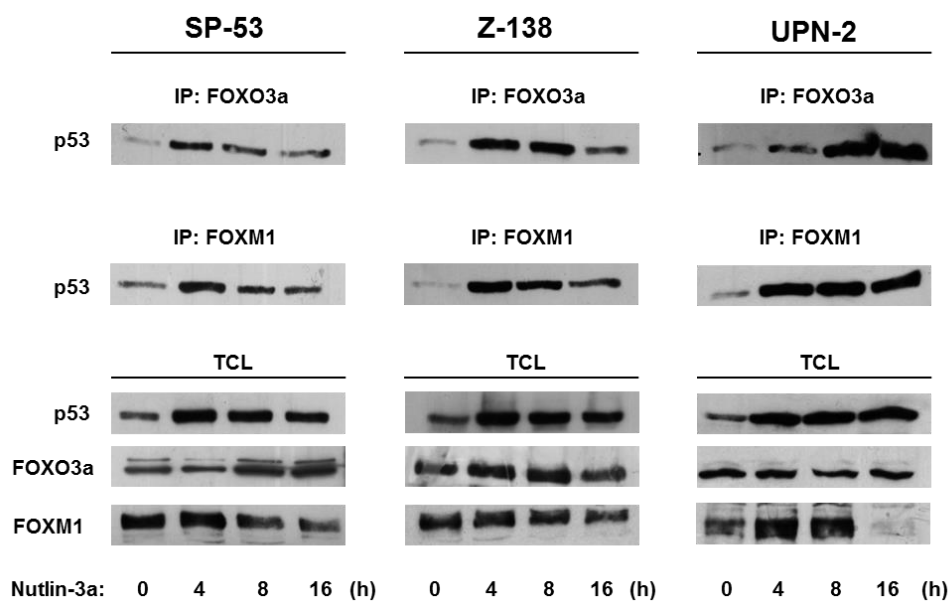


Figura 34. Co-immunoprecipitació de p53-FOXO3a i p53-FOXM1. Les cèl·lules es van tractar amb 10 μ M de nutlin-3a durant els temps indicats. Els extractes cel·lulars es van immunoprecipitar amb un anticòs contra FOXO3a (IP: FOXO3a) o contra FOXM1 (IP: FOXM1). Els nivells d'expressió de les proteïnes indicades a les fraccions immunoprecipitades i als extractes cel·lulars totals (TCL) van ésser analitzades per western blot amb anticossos específics.

1.1.5. Localització subcel·lular de FOXO3a en resposta a nutlin-3a .

Per tal de realitzar la seva funció, el factor de transcripció FOXO3a s'ha de trobar localitzat al nucli. Es va voler comprovar si el tractament amb nutlin-3a podia afectar la localització subcel·lular d'aquest factor de transcripció, tant en línies cel·lulars com en cèl·lules primàries de LCM. Per aquest motiu, les cèl·lules es van tractar amb nutlin-3a i es van realitzar tincions immunocitoquímiques amb un anticòs contra FOXO3a (figura 35).

Abans del tractament, FOXO3a es troba localitzat al citoplasma cel·lular tant a les cèl·lules Z-138 com a les Jeko-1 (Figura 35.A). En el cas de les cèl·lules Z-138, es va observar com FOXO3a translocava al nucli cel·lular després de 16 hores de tractament amb nutlin-3a. En canvi, a la línia Jeko-1 FOXO3a roman al citoplasma i no s'observava la seva translocació nuclear.

Per comprovar si els efectes eren semblants a cèl·lules primàries, es va realitzar el mateix procés amb el pacient P002 i el pacient P006 (Figura 35.B). Les cèl·lules control dels dos pacients presentaven FOXO3a localitzat al citoplasma. En el cas del pacient P006, el tractament induïa la translocació nuclear de FOXO3a, però aquesta translocació no es detectava en el cas del pacient P002 .

Aquests resultats indiquen que, tant a línies cel·lulars com a cèl·lules primàries de LCM, el tractament amb nutlin-3a condueix a la translocació nuclear de FOXO3a, essent aquesta translocació dependent de p53, ja que tant a la línia Jeko-1 com al pacient P002 no es detecta aquesta translocació.

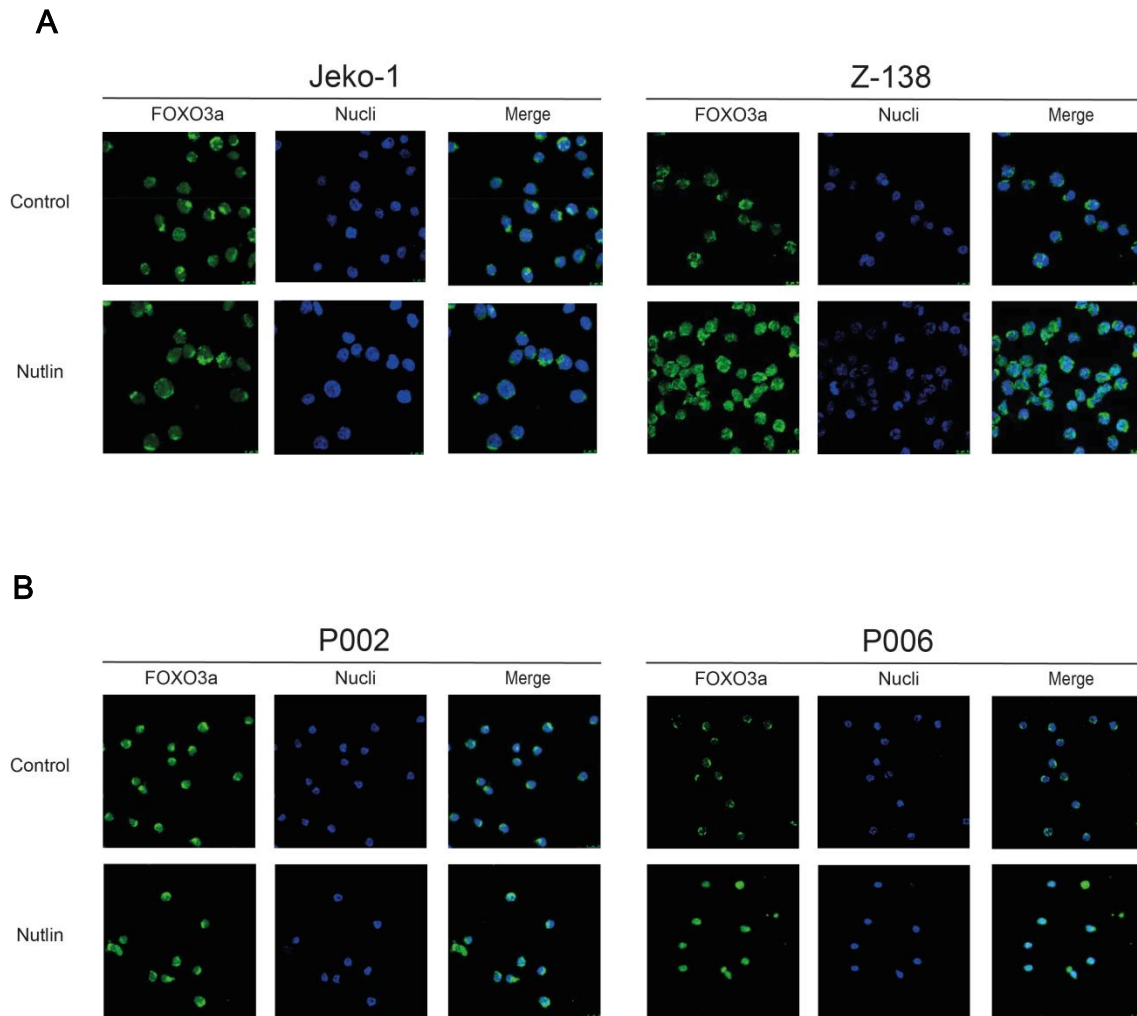


Figura 35. Localització subcel·lular de FOXO3a. Les cèl·lules Z-138 i Jeko-1 (A) i les cèl·lules dels pacients P002 i P006 (B) es van tractar amb 2.5 μ M de nutlin-3a durant 16 hores. Les cèl·lules van esser analitzades per immunofluorescència utilitzant un anticòs específic contra FOXO3a i les imatges foren adquirides mitjançant microscòpia confocal.

1.2. Activació del supressor tumoral p53 amb agents inductors de dany al DNA

El dany al DNA és un estímul que, a través de mediadors del *checkpoint* de dany al DNA, condueix a l'activació de p53 per mecanismes diferents al tractament amb l'antagonista de MDM2, nutlin-3a. Com a estratègia complementària per induir l'activació p53 es van utilitzar agents genotòxics que provoquen dany al DNA, amb la intenció de comprovar si els canvis cel·lulars i moleculars produïts per aquests agents eren similars als obtinguts amb nutlin-3a.

1.2.1. Efecte del tractament amb etopòsid sobre la viabilitat cel·lular.

Com a primer pas es van analitzar els efectes de l'inhibidor de la topoisomerasa etopòsid sobre la viabilitat cel·lular. Les cèl·lules es van tractar amb dosis creixents d'etopòsid i la viabilitat fou analitzada a les 24 i 48 hores (figura 36). A les 24 hores, la viabilitat de les cèl·lules Jeko-1, UPN-2 i Granta-519 va disminuir de manera discreta, de manera que a la dosi més alta (10 μ M) hi havia un 80% de viabilitat a les cèl·lules Jeko-1 i Granta-519, mentre que aquest valor era del 60% en el cas de la línia UPN-2. A les 48 hores de tractament, la viabilitat va disminuir fins a un 40% a la línia UPN-2, mentre que a les línies Jeko-1 i Granta-519 la viabilitat no va baixar del 50%. En canvi, a les línies SP-53 i Z-138 es va observar una notable reducció de la viabilitat a les 24 hores, ja que a una dosi de 10 μ M d'etopòsid la viabilitat era només del 20-30%, i a les 48 hores aquests valors es varen reduir fins a un 10 %. Les cèl·lules SP-53 són molt més sensibles a etopòsid que les cèl·lules Z-138, i de fet s'observa com la viabilitat presenta un *plateau* a les 48 hores, amb valors de viabilitat molt similars tant a 1 μ M com a 10 μ M.

En conclusió, totes les línies cel·lulars analitzades varen respondre a etopòsid, encara que les línies SP-53 i Z-138 eren molt més sensibles que les línies Jeko-1, UPN-2 i Granta-519, indicant que l'estat de p53 influeix sobre el grau de resposta aquest agent inductor de dany al DNA.

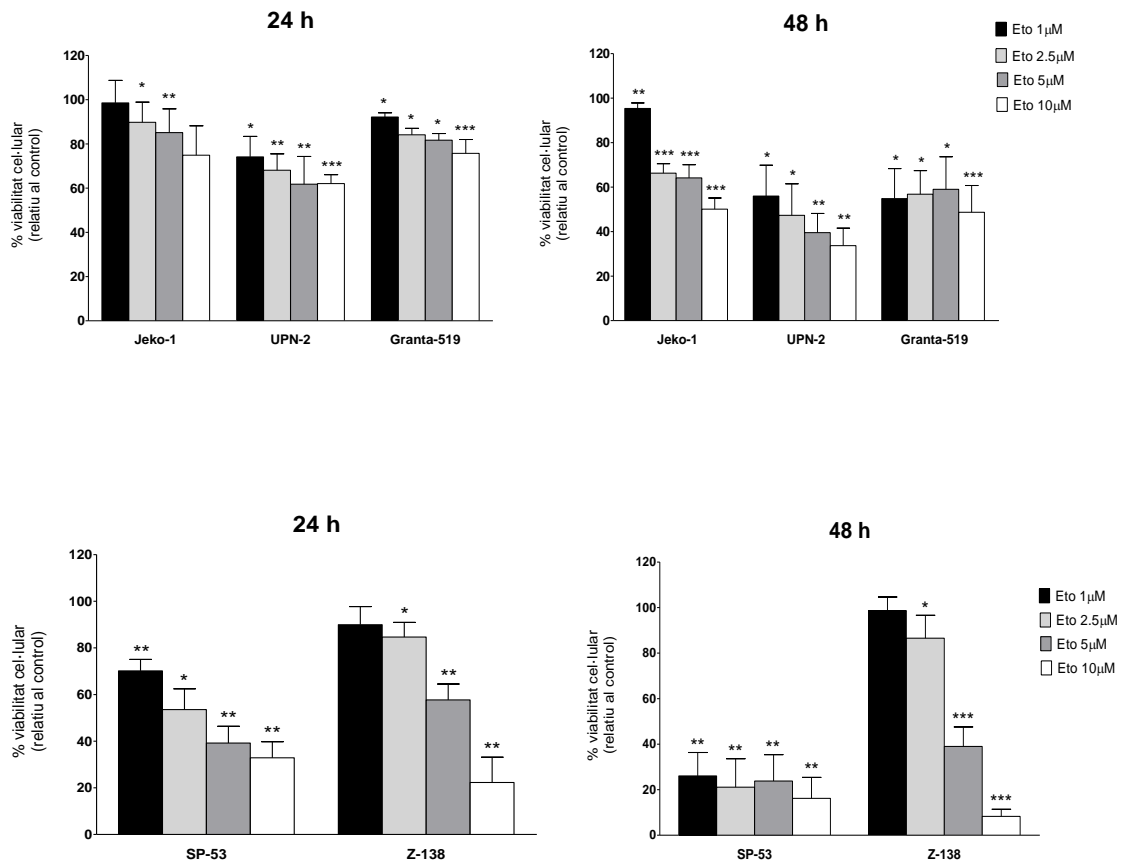


Figura 36. Efecte de l'etopòsid sobre la viabilitat cel·lular. Les línies cel·lulars es van tractar amb les concentracions d'etopòsid indicades i la viabilitat cel·lular es va determinar a les 24 i 48 hores. La gràfica indica els valors de viabilitat representats com a percentatge relatiu respecte a les cèl·lules no tractades. Les dades són la mitja \pm SEM de tres determinacions independents en duplicat. Els asteriscs indiquen diferències significatives (T-Student: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) comparat amb el control.

1.2.2. Efectes del tractament amb etopòsid sobre l'expressió gènica.

Donat que l'etopòsid és un agent inductor de dany al DNA que promou l'activació de p53, es van tractar dues línies cel·lulars, Jeko-1 i Z-138, amb diferent estat de p53 i es van analitzar els canvis en els nivells d'expressió gènica dels factors de transcripció FOXO3a i FOXM1, així com de les seves respectives dianes (figura 37).

Les cèl·lules Jeko-1 presenten pocs canvis a nivell d'expressió gènica en comparació amb les Z-138, a les quals, en resposta al dany al DNA es va observar un augment dels nivells de mRNA de FOXO3a, i de les seves dianes BNIP3L i p27^{kip1}. D'acord amb l'activació de p53 produïda per l'etopòsid, es va observar un notable augment dels nivells de mRNA de les dianes de p53 NOXA, PUMA i GADD45. En canvi, a les

cèl·lules Jeko-1 no es varen observar variacions en els nivells d'expressió de FOXO3a, BNIP3L i p27^{kip1}, així com tampoc en els de NOXA, PUMA i GADD45. Per altra banda, l'expressió del mRNA de FOXM1 es veu reprimida tant en cèl·lules Jeko-1 com a les Z-138, així com també les seves dianes PLK-1 i SURVIVINA. Aquests resultats suggereixen que els canvis moleculars produïts en resposta al tractament amb etopòsid només reproduïxen els observats en resposta a nutlina-3a de forma parcial, fet que indica que l'etopòsid activa altres vies independents de p53.

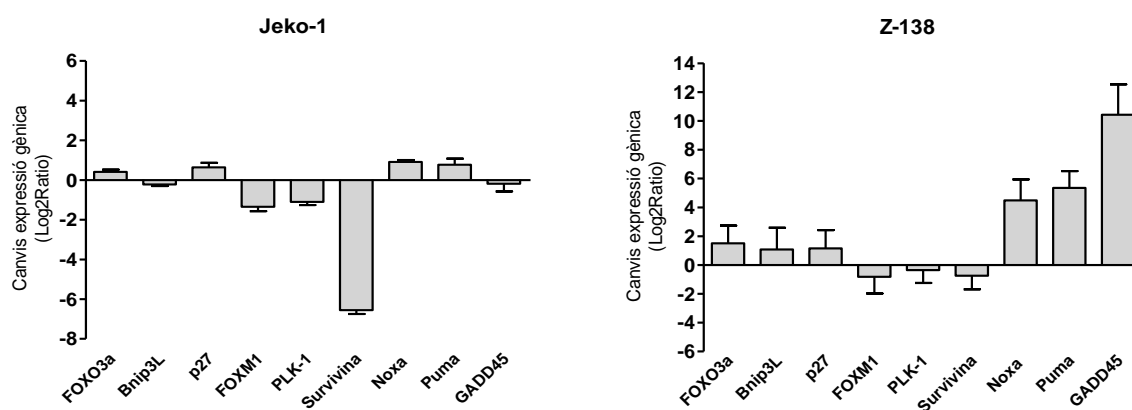


Figura 37. Canvis en l'expressió gènica en resposta al tractament amb etopòsid. Les cèl·lules Jeko-1 i Z-138 es van tractar amb etopòsid 20 μ M durant 24 h. L'RNA es va extreure amb Trizol i es va obtenir el cDNA corresponent. La PCR a temps real es va realitzar a un termociclador Light-Cycler 480 utilitzant SYBR green. A la gràfica s'indiquen els canvis en l'expressió del mRNA dels gens dianes normalitzats pels gens *housekeeping control* (GAPDH, B2M) i representen la mitjana i la desviació estàndard de tres experiments independents.

1.2.3. Efectes moleculars del tractament amb etopòsid sobre els components de l'eix FOXO3a-FOXM1.

Seguidament, es va comprovar si el tractament amb etopòsid afectava a nivell d'expressió proteica a FOXO3a i FOXM1. Per aquest propòsit, es van tractar les línies SP-53, Z-138, Jeko-1 i UPN-2 amb una dosi d'etopòsid de 20 μ M i es van analitzar els canvis en la fosforilació i expressió de proteïnes rellevants (figura 38).

El tractament amb etopòsid va provocar una inducció de l'expressió de p53 a les línies SP-53, Z-138 i UPN-2, que tot i presentar una mutació, és capaç de respondre a

aquest agent de dany al DNA. Els nivells de fosforilació de FOXO3 varen disminuir a les línies SP-53 i Z-138, indicant una activació d'aquest factor de transcripció, que sembla esser menor en el cas de les línies Jeko-1 i UPN-2. Pel que fa als nivells de FOXM1, varen disminuir en resposta a etopòsid a les línies SP-53 i Z-138, i en menor mesura a la línia UPN-2. Al contrari, a la línia Jeko-1 els nivells de FOXM1 romangueren inalterats, resultat que concorda amb la deleció de p53 que presenten aquestes cèl·lules. Els nivells d'expressió de les dianes de FOXM1, PLK-1 i survivina, també varen experimentar una disminució en resposta a etopòsid que varia entre les línies cel·lulars analitzades, però que igualment sembla requerir de la presència de p53 funcional.

Aquests resultats indiquen que el dany al DNA induït per etopòsid activa a FOXO3a en aquelles cèl·lules que tenen la capacitat d'induir p53, i que a més aquesta activació de FOXO3a correlaciona amb una inhibició dràstica de l'expressió de FOXM1.

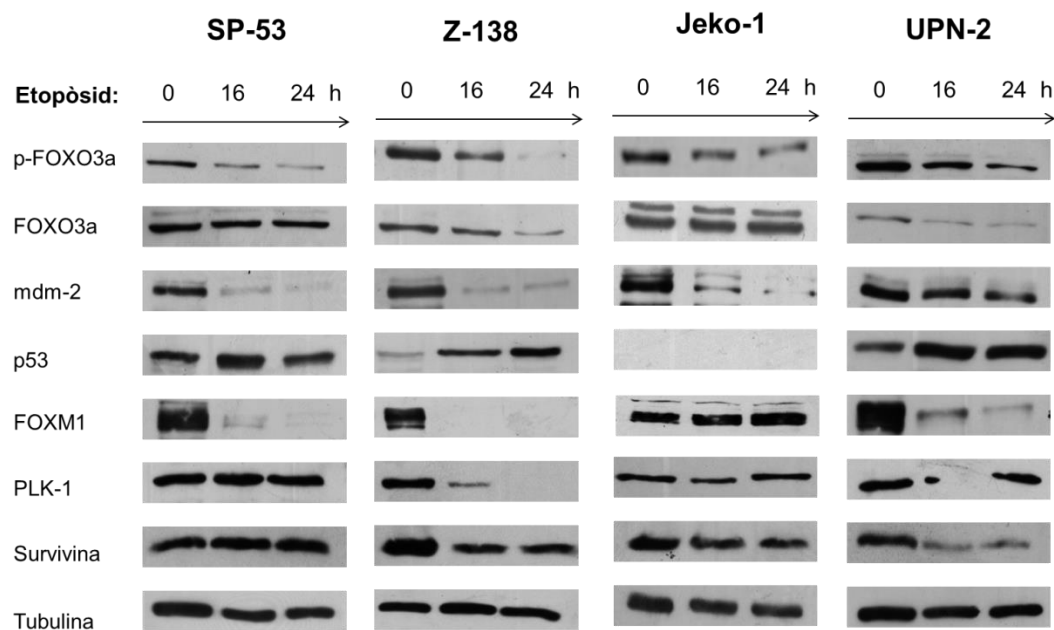


Figura 38. Anàlisi molecular dels efectes d'etopòsid sobre línies de LCM. Les cèl·lules es van tractar amb 20 μ M d'etopòsid i es van recollir a les hores indicades. Els extractes proteics es van lisar i es van analitzar per western-blot utilitzant els anticossos específics contra les proteïnes d'interès i α -tubulina com a control de càrrega.

Per tal de comprovar si un altre agent que produeix dany al DNA modula de manera semblant l'eix p53-FOXM1-FOXO3a, es va analitzar l'expressió de proteïnes d'aquest eix funcional en resposta a doxorubicina en el mateix panell de línies cel·lulars de LCM (figura 39).

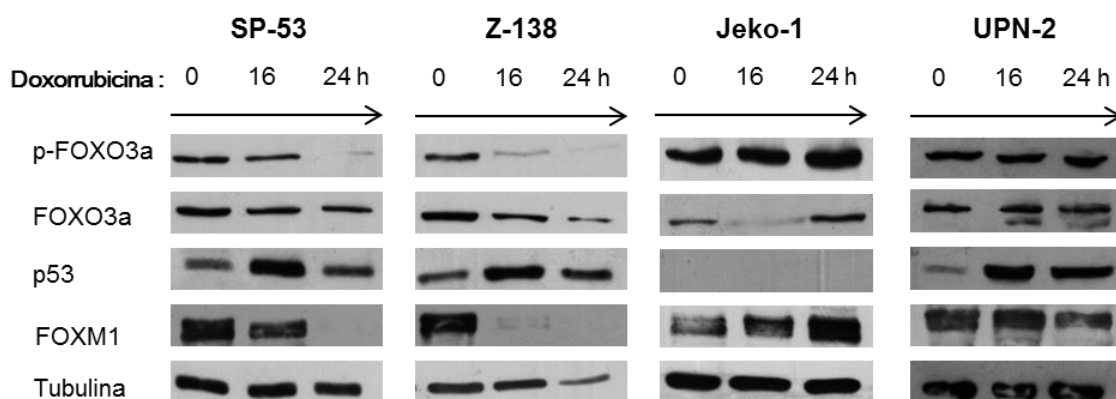


Figura 39. Anàlisi dels efectes de doxorubicina sobre l'eix p53-FOXM1-FOXO3a. Les cèl·lules indicades es varen tractar amb doxorubicina 1 μ M durant el temps indicat. Els extractes proteics es van lissar i es van analitzar per *western blot* utilitzant els anticossos específics contra les proteïnes d'interès i α -tubulina com a control de càrrega.

De forma semblant a l'etopòsid, el tractament amb doxorubicina va induir l'expressió de p53 a les cèl·lules SP-53 i Z-138. A més, els nivells de fosforilació de FOXO3a també varen disminuir a aquestes dues línies, indicant una activació d'aquest factor de transcripció. En correlació amb les nostres dades anteriors, els nivells de FOXM1 també es varen reduir a les línies SP-53 i Z-138, essent la seva expressió indetectable a les 24 hores. A la línia UPN-2 també es varen incrementar els nivells de p53 en resposta a doxorubicina, però en aquets cas no es va observar cap canvi en els nivells de fosforilació de FOXO3a ni en els nivells totals de FOXM1, suggerint que tot i la inducció observada de p53, a les cèl·lules UPN-2 es necessària l'activació de FOXO3a per tal d'inhibir l'expressió de FOXM1. Finalment, a les cèl·lules Jeko-1 es va observar un augment tant en els nivells de fosforilació de FOXO3a com en els nivells de FOXM1 en resposta a doxorubicina, indicant que la manca de p53 no permet l'activació de FOXO3a, ni inhibir l'expressió de FOXM1.

Globalment, els nostres resultats indiquen que la inducció de p53 per part d'agents de dany al DNA correlaciona amb l'activació de FOXO3a i amb la inhibició de l'expressió de FOXM1 a nivell proteic en cèl·lules de LCM.

1.2.4 . Anàlisi de la interacció entre els factors de transcripció p53 i FOXO3a/FOXM1 en resposta a etopòsid

A l'apartat 1.1.4 s'ha descrit la interacció de p53 amb FOXO3a i FOXM1 en cèl·lules de LCM i que a més, aquesta interacció augmenta en resposta a nutlin-3a. Per comprovar si el tractament amb etopòsid produeix un efecte semblant, es van realitzar experiments d'immunoprecipitació per analitzar si p53 podia ser precipitat amb anticossos anti-FOXO3a i anti-FOXM1.

Els resultats obtinguts varen indicar que la inducció de l'expressió de p53 per etopòsid anava acompanyada de la unió d'aquest factor a FOXO3a i FOXM1. De forma semblant al tractament amb nutlin-3a, la mutació de p53 present a UPN-2 no va afectar a la seva interacció amb FOXO3a i FOXM1 (figura 40).

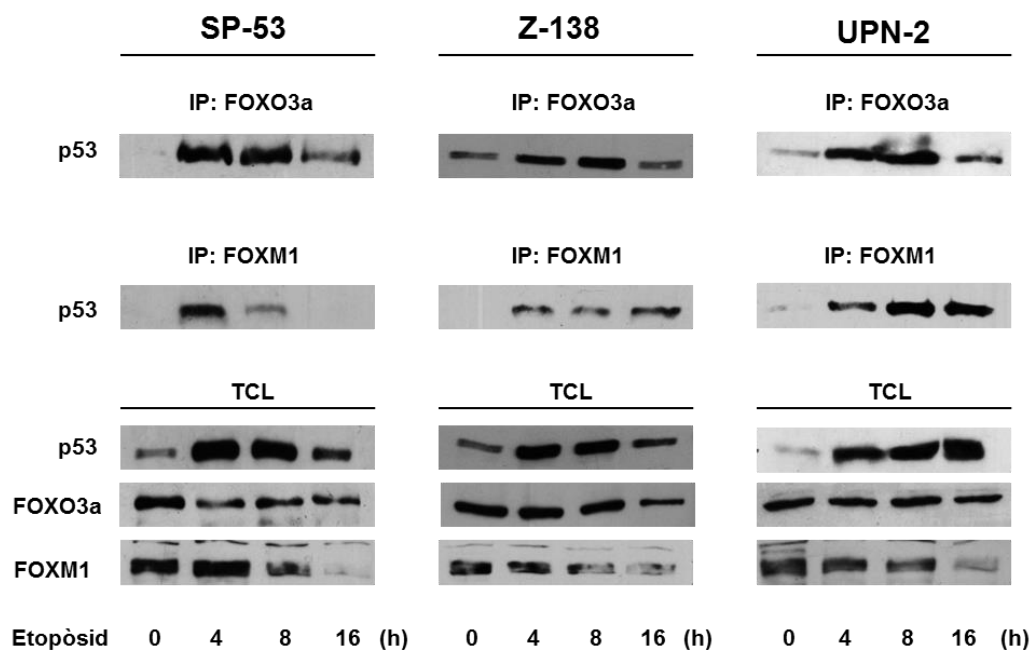


Figura 40. Co-immunoprecipitació de p53-FOXO3a i p53-FOXM1. Les cèl·lules SP-53, Z-138 i UPN-2 es van tractar amb 20 μ M d'etopòsid durant els temps indicats. Els extractes cel·lulars es van immunoprecipitar amb un anticòs contra FOXO3a (IP:FOXO3a) o contra FOXM1 (IP:FOXM1) i es va utilitzar un anticòs contra p53 per determinar la interacció entre les proteïnes. Es van analitzar per *western blot* els nivells d'expressió de FOXO3a/FOXM1 i p53 presents als extractes cel·lulars totals (TCL).

RESULTATS

Capítol 2

2. Inhibició de FOXM1 a Limfoma de Cèl·lules del Mantell

Els resultats obtinguts en el capítol 1 d'aquesta tesi suggereixen que l'estabilització o activació de p53 mitjançant diverses estratègies farmacològiques és un factor determinant per a l'activació de FOXO3a, la qual cosa condueix a una inhibició de la expressió i activitat de FOXM1. Per tal de continuar investigant en aquesta línia, es van analitzar els efectes cel·lulars i moleculars de inhibidors químics de FOXM1, i la seva relació amb l'estat funcional de p53 i sobre l'activitat de FOXO3a.

2.1. Efectes de la inhibició de FOXM1 en la viabilitat cel·lular i anàlisi de l'activitat caspasa.

Per tal d'avaluar els efectes de la inhibició de FOXM1 sobre la viabilitat cel·lular, es va tractar el panell de línies cel·lulars de LCM amb dosis creixents de l'antibiòtic peptídic thiostrepton, un inhibidor de FOXM1. Totes les línies cel·lulars tractades amb thiostrepton van experimentar una disminució de la viabilitat cel·lular de manera dosi-dependent (figura R41.A). A les 24 hores de tractament la viabilitat cel·lular es va reduir de manera gradual, essent l'efecte més moderat a les línies Granta-519 i UPN-2. A les 48 hores de tractament amb thiostrepton els efectes varen esser més dràstics, amb una viabilitat molt reduïda a totes les línies cel·lulars a partir de una dosi de 2.5 μ M. Es destacable l'elevada sensibilitat a thiostrepton que va presentar la línia SP-53, a la qual es varen observar uns efectes acusats sobre la viabilitat cel·lular a partir d'una dosi de 1 μ M.

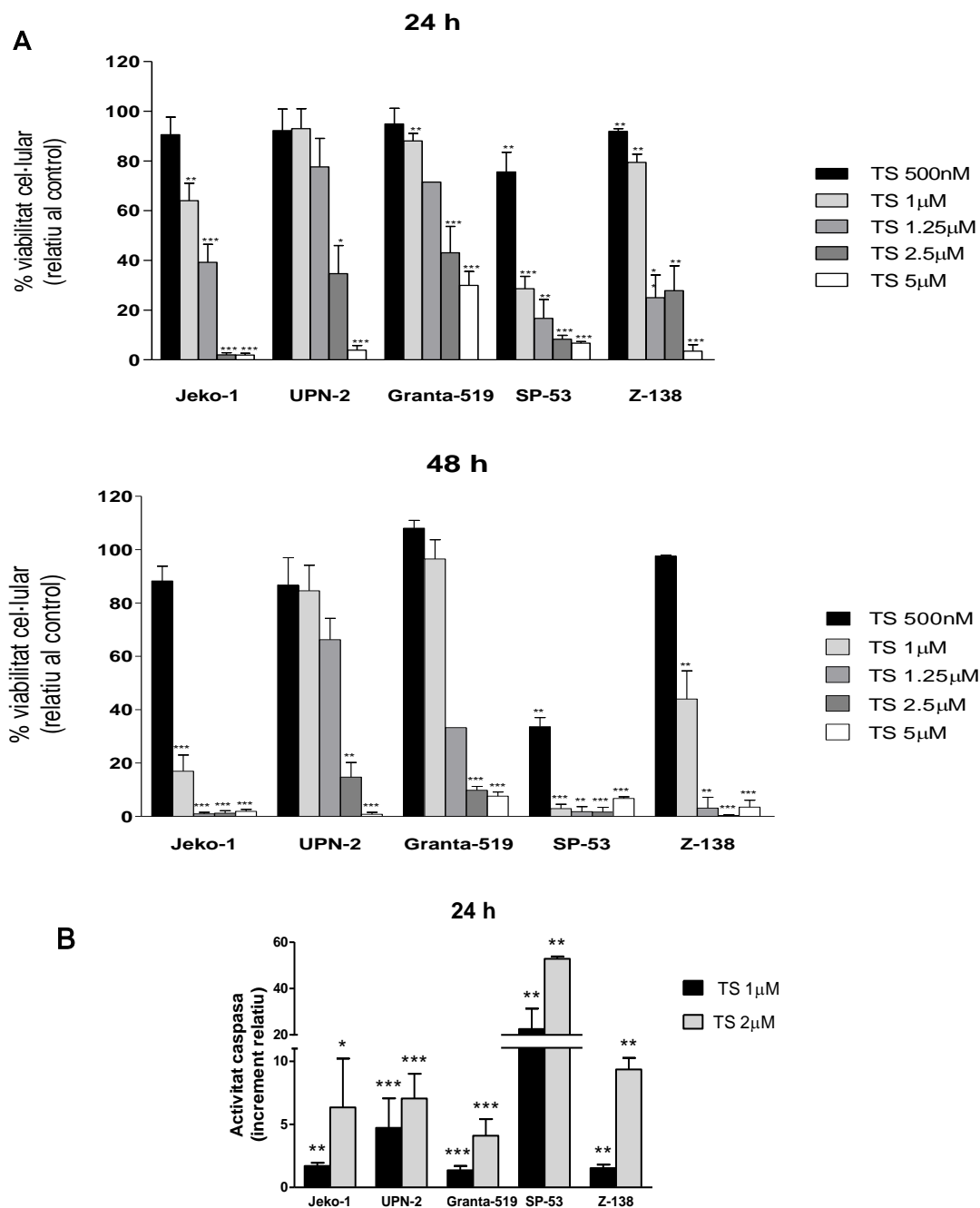


Figura 41. Efecte de thiothrepton sobre la viabilitat cel·lular i l'activitat caspasa de línies de LCM. **(A)** Les línies cel·lulars es van tractar amb les concentracions de thiothrepton indicades i la viabilitat cel·lular es va determinar a les 24 i 48 hores. La gràfica representa la viabilitat cel·lular com a percentatge relatiu respecte a les cèl·lules no tractades. Les dades són la mitja \pm SEM de tres determinacions independents en duplicat. Els asteriscs indiquen diferències significatives (T-Student: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) comparat amb el control. **(B)** Determinació de l'activitat caspasa. Les cèl·lules foren tractades amb les dosis de thiothrepton indicades i es va mesurar l'activitat de les caspases 3 i 7 a les 24 hores. El resultat s'expressa en forma d'increment relatiu respecte al control, i les dades indiquen la mitja \pm SEM de tres experiments independents en duplicat. Els asteriscs indiquen diferències significatives (T-Student: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) comparat amb el control.

Per tal de comprovar si aquesta disminució de la viabilitat cel·lular estava relacionada amb un increment de l'activitat caspasa, es van tractar les cèl·lules amb varies dosis de thiostrepton i es va mesurar l'activitat de les caspases efectores 3 i 7 (figura 41.B). Els resultats obtinguts indiquen que thiostrepton va induir en diferent grau l'activitat caspasa a totes les línies cel·lulars analitzades. Les cèl·lules Jeko-1, UPN-2 i Z-138 van presentar un comportament similar en la inducció de l'activitat caspasa, amb un major increment relatiu a la dosi de 2 μ M. La línia Granta-519 mostrà una resposta més moderada en la inducció de l'activitat caspasa, en concordança amb el resultat observats als assajos de viabilitat. En canvi, a les cèl·lules SP-53 la inducció de l'activitat caspasa fou marcadament més elevada, destacant respecte a les altres línies cel·lulars analitzades.

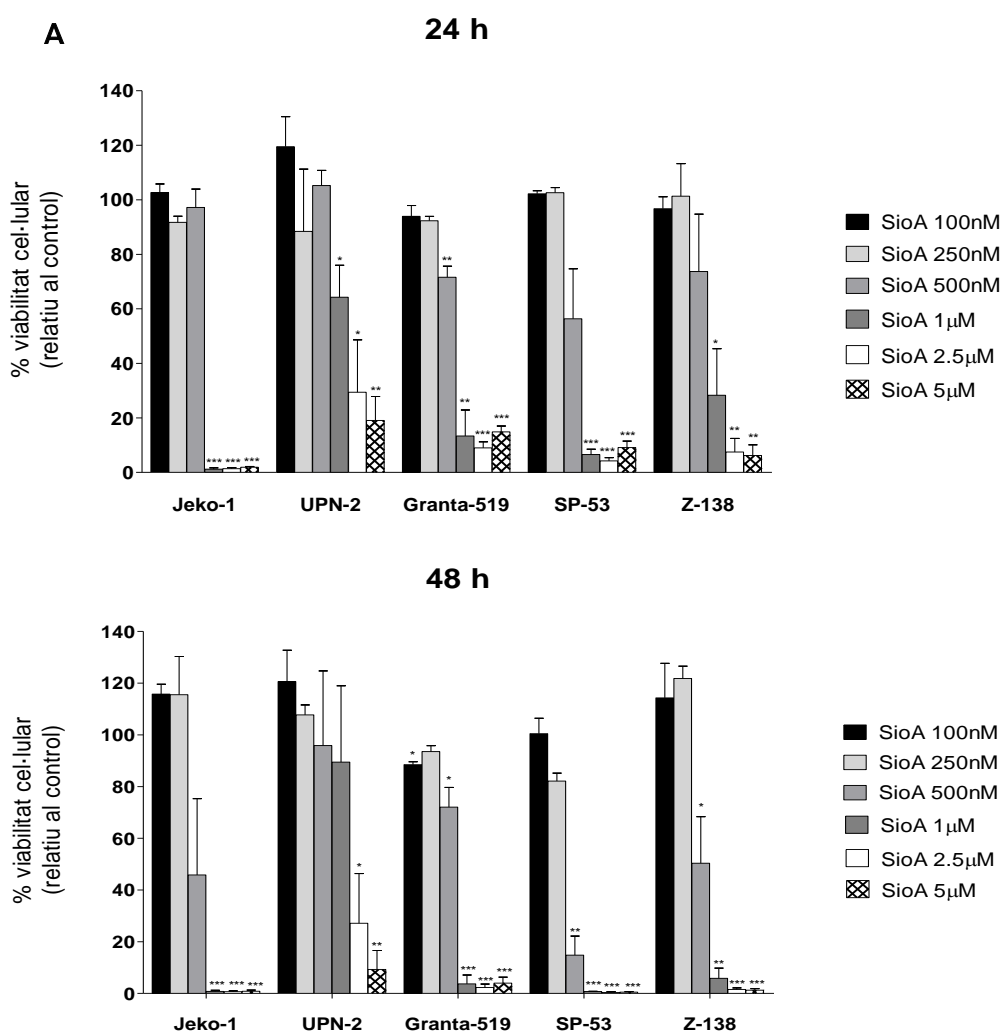
A continuació es va analitzar l'efecte de l'antibiòtic macrocíclic siomicina-A, inhibidor químic de FOXM1 amb una estructura que només difereix en dos residus de la de thiostrepton, sobre la viabilitat cel·lular i l'activitat caspasa de cèl·lules de LCM. El panell de línies de LCM es va tractar amb dosis creixents de siomicina-A i es va analitzar la viabilitat cel·lular. (figura 42.A). De forma semblant al thiostrepton, el tractament amb siomicina-A va provocar una disminució de la viabilitat cel·lular de manera dosi-depenent a totes les línies cel·lulars analitzades. A les 24 hores de tractament amb siomicina-A, la viabilitat cel·lular es va veure reduïda de forma considerable a partir de 1 μ M en totes les línies, excepte a la línia UPN-2, la qual va presentar una certa resistència al tractament. Destaca la forta disminució de la viabilitat cel·lular observada a la línia Jeko-1, essent aquesta inhibició absoluta a la dosi de 1 μ M. A partir de les 48 hores de tractament la disminució de la viabilitat fou més notable, obtenint a partir de la dosi de 1 μ M uns valors de viabilitat cel·lular inferiors al 10% a totes les línies excepte a la línia UPN-2, la qual va demostrar una major resistència a l'efecte de la siomicina-A.

Els resultats obtinguts van suggerir que les cèl·lules de LCM presentaven una major sensibilitat a siomicina-A que a thiostrepton, encara que els dos composts van inhibir la viabilitat cel·lular a dosis molt baixes. L'efecte de thiostrepton o siomicina-A sobre la viabilitat no es depenent de l'estat de p53 de la cèl·lula, de manera que tant les cèl·lules p53-mt com les p53-wt respongueren clarament als dos fàrmacs.

L'anàlisi de les caspases efectores 3/7 es va realitzar a les 24 hores de tractament amb siomicina-A. És destacable la forta inducció de l'activitat caspasa que van experimentar les cèl·lules Jeko-1, en correlació amb l'elevada disminució de viabilitat

observada a aquestes cèl·lules i a les mateixes dosis de siomicina-A. Per la seva banda, a les línies SP-53, Z-138 i UPN-2 l'activitat caspasa va augmentar de forma dosi-depenent en resposta al tractament amb siomicina-A. En canvi, l'activació de l'activitat caspasa a les cèl·lules UPN-2 fou més moderada, en concordança amb la menor disminució de la viabilitat cel·lular que experimentava aquesta línia.

Aquests resultat suggereixen que en resposta a la inhibició de FOXM1 per part de thioestrepton i siomicina-A s'indueix l'activació de les caspases 3 i 7, indicativa de mort cel·lular per apoptosi. Aquest mecanisme, a diferència dels resultats obtinguts amb el tractament amb nutlin-3a, sembla ser independent de l'estat de p53.



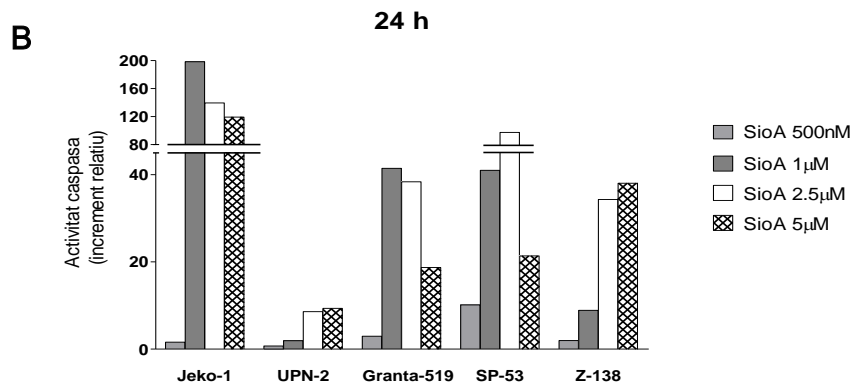


Figura 42. Efecte de siomicina-A sobre la viabilitat cel·lular i l'activitat caspasa. **(A)** Les línies cel·lulars es van tractar amb les concentracions de siomicina-A indicades i la viabilitat cel·lular es va analitzar a les 24 i 48 hores. La gràfica representa la viabilitat cel·lular expressada com a percentatge relatiu respecte a les cèl·lules no tractades. Les dades són la mitja \pm SEM de tres determinacions independents en duplicat. Els asteriscs indiquen diferències significatives (T-Student: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) comparat amb el control. **(B)** Determinació de l'activitat caspasa. Les cèl·lules foren tractades amb les dosis de siomicina-A indicades i es va mesurar l'activitat de les caspases 3 i 7 a les 24 hores. El resultat s'expressa en forma d'increment relatiu respecte al control.

Els resultats obtinguts a línies cel·lulars de LCM van indicar que la inhibició de FOXM1, tant amb thioestrepton com amb siomicina-A, produïa una disminució de la viabilitat cel·lular i un augment en l'activitat apoptòtica, de manera independent del seu estat de p53. Per tal de comprovar si obteníem la mateixa resposta en experiments *ex vivo*, es van tractar cèl·lules primàries de dos pacients de LCM (P002 i P006) amb thioestrepton i siomicina-A i es va mesurar la viabilitat cel·lular i l'activitat de les caspases efectores 3 i 7 a les 24 i 48 hores de tractament (figura 43.A).

Es resposta als dos tractaments es va observar un descens en la viabilitat de les cèl·lules dels pacients P002 i P006 a dosis molt baixes. En el cas de thioestrepton, a les 24 hores de tractament la viabilitat es va veure reduïda al 50% a unes dosis de thioestrepton entre 1 μ M i 2.5 μ M, mentre que en resposta al tractament amb siomicina-A la viabilitat va romandre al voltant del 50% a unes dosis entre 250-500 nM. A les 48 hores de tractament, la viabilitat de les cèl·lules dels dos pacients van assolir uns valors molt baixos, amb només un 10-20% de cèl·lules viables en resposta als dos fàrmacs.

En relació a l'activitat de les caspases efectores 3/7 (figura 43.B) es va produir un augment de l'activitat caspasa en resposta als dos tractaments. Aquest increment en l'activitat caspasa va ser observat a les cèl·lules del pacient P002 i també en les cèl·lules del pacient P006, i va mostrar una forta correlació amb la disminució de la

viabilitat cel·lular. De manera similar als resultats obtinguts a les línies cel·lulars, els cultius primaris van demostrar una major sensibilitat a siomicina-A que a thioestrepton, encara que els dos antibiòtics tiazòlics són altament efectius i provoquen una forta disminució de la viabilitat cel·lular i un increment en l'activitat caspasa de manera independent a l'estat de p53 de la cèl·lula.

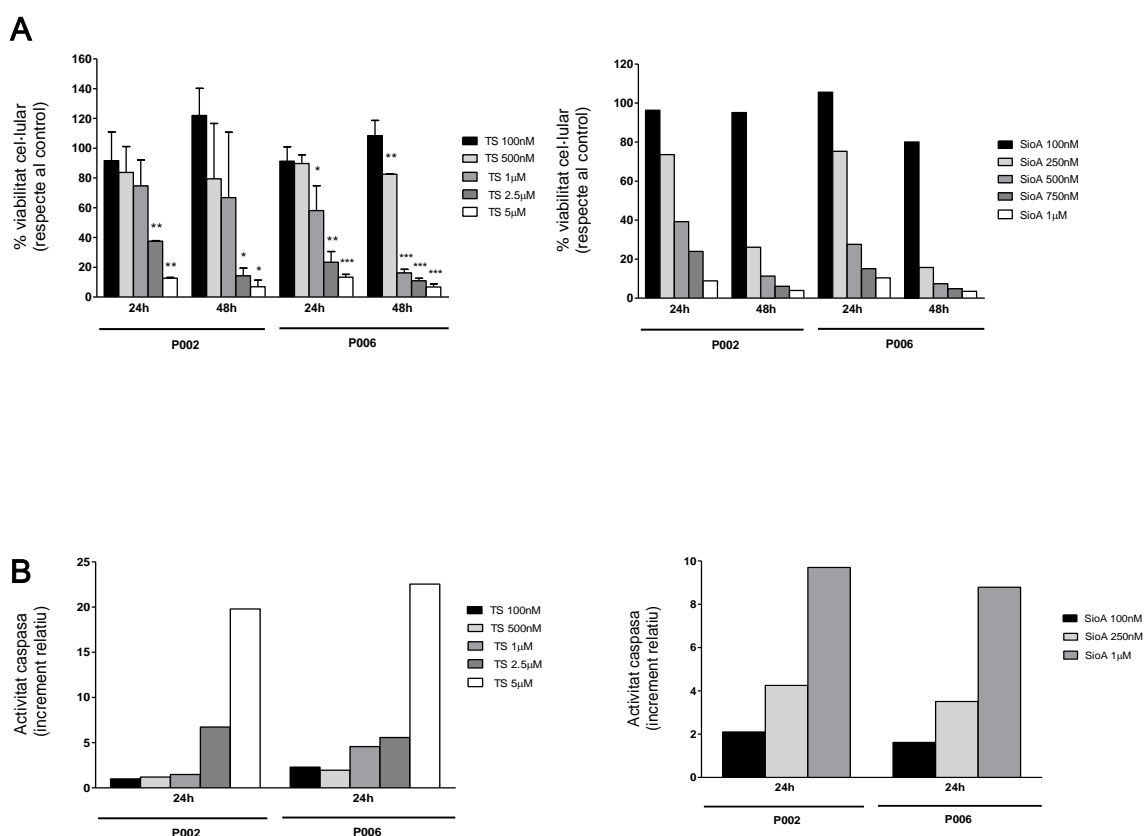


Figura 43. A) Efecte de thioestrepton i siomicina-A sobre la viabilitat cel·lular a cultius primaris de LCM. Les cèl·lules primàries es van tractar amb les dosis de thioestrepton i siomicina-A indicades i la viabilitat cel·lular es va analitzar a les 24 i 48 h. La gràfica representa la viabilitat cel·lular com a percentatge relatiu de cèl·lules viables respecte a les cèl·lules no tractades. Les dades representen la mitjana \pm SEM de dues determinacions independents realitzades en duplicat. Els asteriscs indiquen diferències significatives (T-Student: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$) respecte als controls. **(B)** Determinació de l'activitat de les caspases 3/7. Els cultius primaris de LCM es van tractar amb les concentracions de thioestrepton i siomicina-A indicades i es va mesurar l'activitat caspasa a les 24 i 48 h. El resultat s'expressa en forma d'increment relatiu respecte al control.

2.2. Efectes de thioestrepton sobre l'expressió gènica.

A continuació es va voler analitzar si el tractament amb thioestrepton produïa efectes sobre els nivells de mRNAs dels factors de transcripció FOXO3a i FOXM1, així com de les seves dianes. L'anàlisi de l'expressió gènica es va realitzar al panell de línies cel·lulars de LCM, per tal de relacionar possibles canvis en els nivells de mRNA dels gens d'interès amb l'estat de p53 de la línia cel·lular.

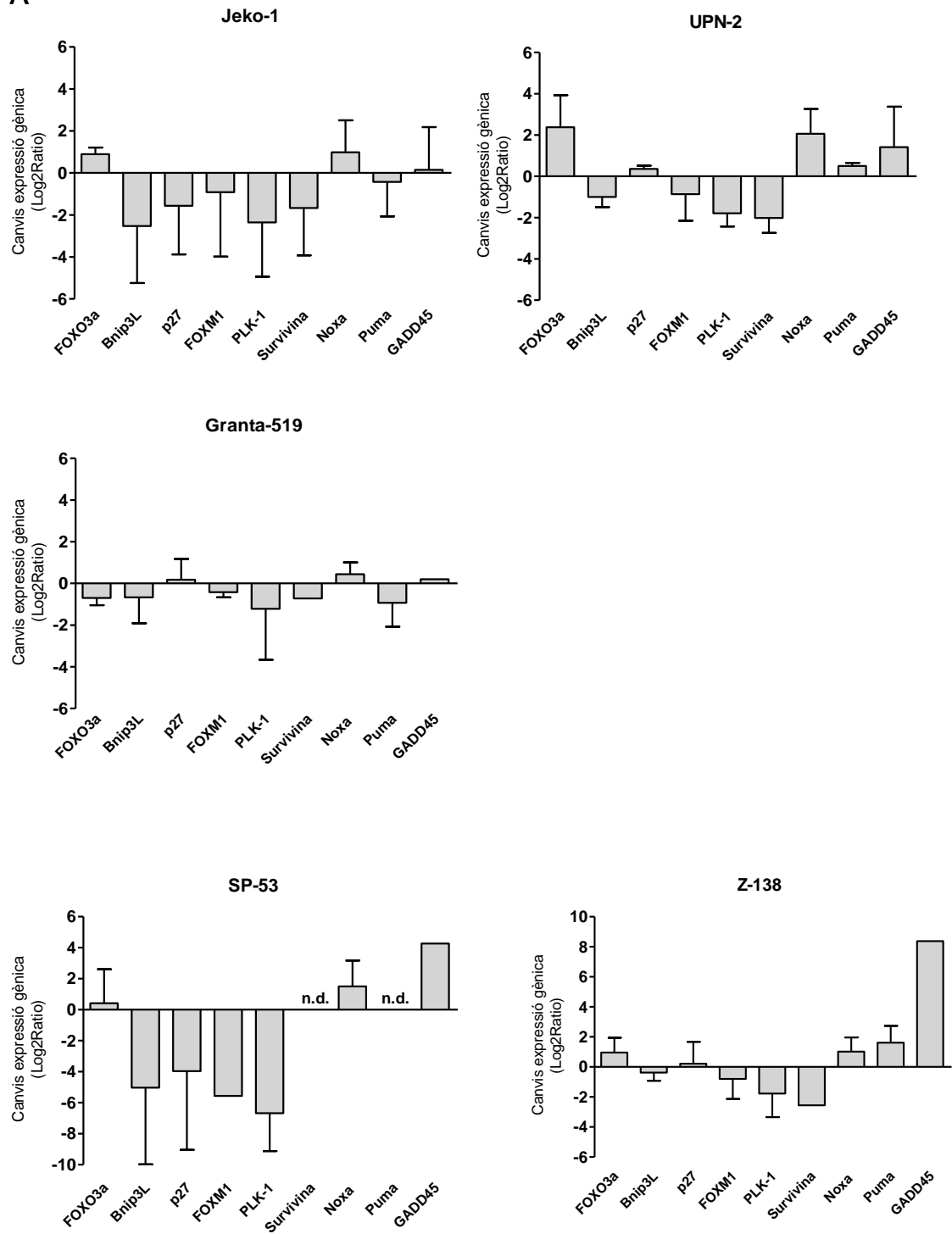
Les cèl·lules es van tractar amb una dosi de 2 µM de thioestrepton i a les 24 hores es va procedir a purificar el mRNA de les cèl·lules tractades. Després d'obtenir el corresponent DNA complementari (cDNA), es van analitzar els gens d'interès per PCR quantitativa a temps real (figura 44).

En resposta al tractament amb thioestrepton es va produir un increment del nivell d'expressió del mRNA de FOXO3a a totes les línies cel·lulars analitzades excepte a la línia Granta-519, a la qual es va observar una repressió en l'expressió del mRNA de FOXO3a. Contràriament al que s'esperava, es va detectar una reducció en els nivells dels mRNA de Bnip3L i p27^{kip1}, dianes transcripcionals de FOXO3a, en resposta al tractament amb thioestrepton.

En canvi, i tal com era esperable, es va detectar una reducció dels nivells de mRNA de FOXM1 i de les seves dianes transcripcionals, Plk-1 i Survivina a totes les línies cel·lulars, suggerint que la repressió de FOXM1 en resposta a thioestrepton és independent de l'estat de p53 de la cèl·lula.

Finalment, es van analitzar els nivells de mRNA de les dianes transcripcionals de p53, Noxa, Puma i GADD45. A les cèl·lules SP-53 i Z-138 es va detectar una clara inducció en l'expressió dels mRNAs d'aquests tres gens i, en menor grau, a la línia UPN-2. En canvi, els canvis en els nivells d'expressió a les línies Jeko-1 i Granta-519 foren més discrets.

A



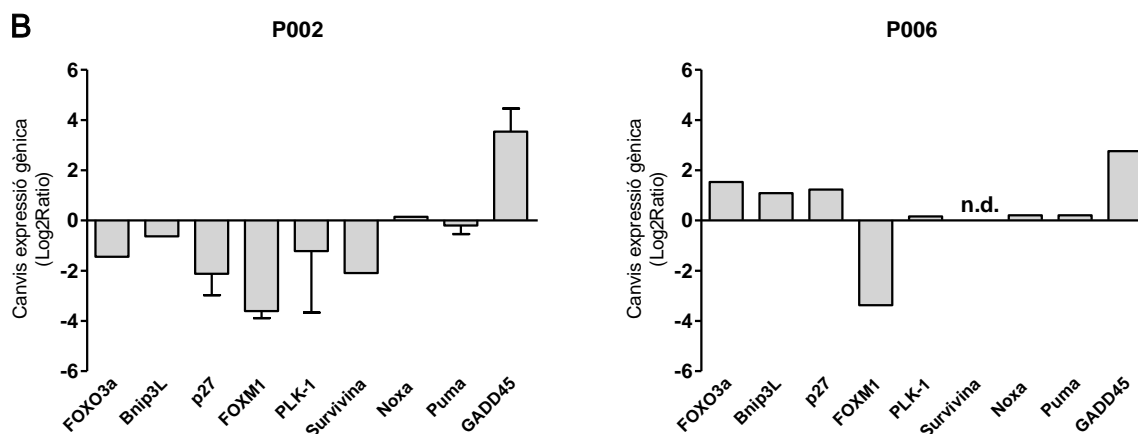


Figura 44. Canvis en l'expressió gènica en resposta al tractament amb thioestrepton. (A) Les línies cel·lulars i (B) les cèl·lules primàries indicades es van tractar amb 2 µM de thioestrepton durant 24 h. L'RNA es va recollir amb Trizol i es va obtenir el cDNA corresponent. A la gràfica s'indiquen els canvis en l'expressió dels mRNA dels gens dianes normalitzats pels gens *housekeeping* control (GAPDH, B2M) i representen la mitjana ± SEM de tres determinacions independents.

En el cas dels cultius primaris (figura 44.B), el pacient P002 va experimentar una disminució en el nivell d'expressió del mRNA de FOXO3a, així com en els de les seves dianes Bnip3L i p27^{kip}, mentre que en el pacient P006 es va detectar un increment en l'expressió del mRNA de FOXO3a, Bnip3L i p27^{kip}, suggerint que en aquest cas pot ésser necessària la presència de p53 en estat funcional per tal que FOXO3a pugui realitzar la seva activitat transcripcional.

L'anàlisi dels nivells dels mRNAs de FOXM1, Plk-1 i Survivina va demostrar que es troben infra-expressades a les cèl·lules primàries del pacient P002 en resposta al tractament amb thioestrepton. En el cas del pacient P006, només es va detectar una disminució dels nivells de FOXM1, en canvi, els nivells del mRNA de Plk-1 no va experimentar canvis destacables i no es varen poder obtenir dades de Survivina.

Respecte a les dianes de p53, no es van detectar variacions en els nivells dels mRNA de Puma i Noxa a cap dels dos pacients. En canvi, el mRNA de GADD45 augmentà de manera notable tant en el cas del pacient P002 com en el cas del pacient P006.

Els resultats obtinguts dels assajos d'expressió gènica suggereixen que thioestrepton pot inhibir la transcripció de FOXM1 i disminuir la seva activitat transcripcional, tal com indica la disminució dels mRNAs de Plk-1 i Survivina. Aquesta inhibició sembla no tenir relació amb l'estat de p53, observant-se tant a línies cel·lulars com a cultius primaris de LCM amb p53-wt i p53-mt.

2.3. Efectes moleculars de thioestrepton sobre els components de la via PI3K/Akt.

Els efectes moleculars de la inhibició de FOXM1 sobre la via PI3K/Akt estan molt poc estudiats, per aquets motiu es van analitzar els efectes del tractament amb thioestrepton sobre els principals components d'aquesta via de senyalització.

Les línies cel·lulars de LCM es van tractar amb thioestrepton i es van recollir mostres a diferents temps per tal d'analitzar els canvis en el nivell d'expressió i/o fosforilació de les proteïnes més rellevants d'aquesta via (figura 45).

A totes les línies de LCM analitzades, el tractament amb thioestrepton va reduir els nivells de fosforilació d'Akt al residu ser-473, indicant la inactivació d'aquesta cinasa. En conseqüència, també es va observar una reducció dels nivells de fosforilació de FOXO3a al residu 253, indicant una activació d'aquest factor de transcripció. També es va detectar una disminució en els nivells totals d'Akt i FOXO3a, més marcada a les cèl·lules Jeko-1, SP-53 i Z-138 i no tan acusada a les línies UPN-2 i Granta-519. Recordem que a l'anàlisi de viabilitat cel·lular aquestes dues línies també presentaven una major resistència al tractament amb thioestrepton.

Es va observar la inducció de l'expressió del supressor tumoral p53 a les línies SP-53 i Z-138. A la línia Granta-519 aquesta inducció no va ésser molt evident, mentre que va resultar indetectable a la línia UPN-2. De manera paral·lela a la inducció de p53, es va detectar a les cèl·lules SP-53 i Z-138 la inducció de p21^{cip1}. En canvi, els nivells de la proteïna p21^{cip1} no varen canviar de forma apreciable a les línies Granta-519 i UPN-2.

En resposta al tractament amb thioestrepton, totes les línies analitzades van reduir de manera clara els nivells de fosforilació de FOXM1 al residu ser-35, indicant que aquest oncogen s'està inactivant. Els nivells totals de FOXM1 també es van veure reduïts en resposta al tractament prolongat amb thioestrepton. Conseqüentment, els nivells de Plk-1 i survivina es van veure disminuïts en resposta a la baixada de FOXM1. Aquestes observacions suggereixen que els efectes de thioestrepton sobre l'expressió de FOXM1 no depenen de l'estat de p53.

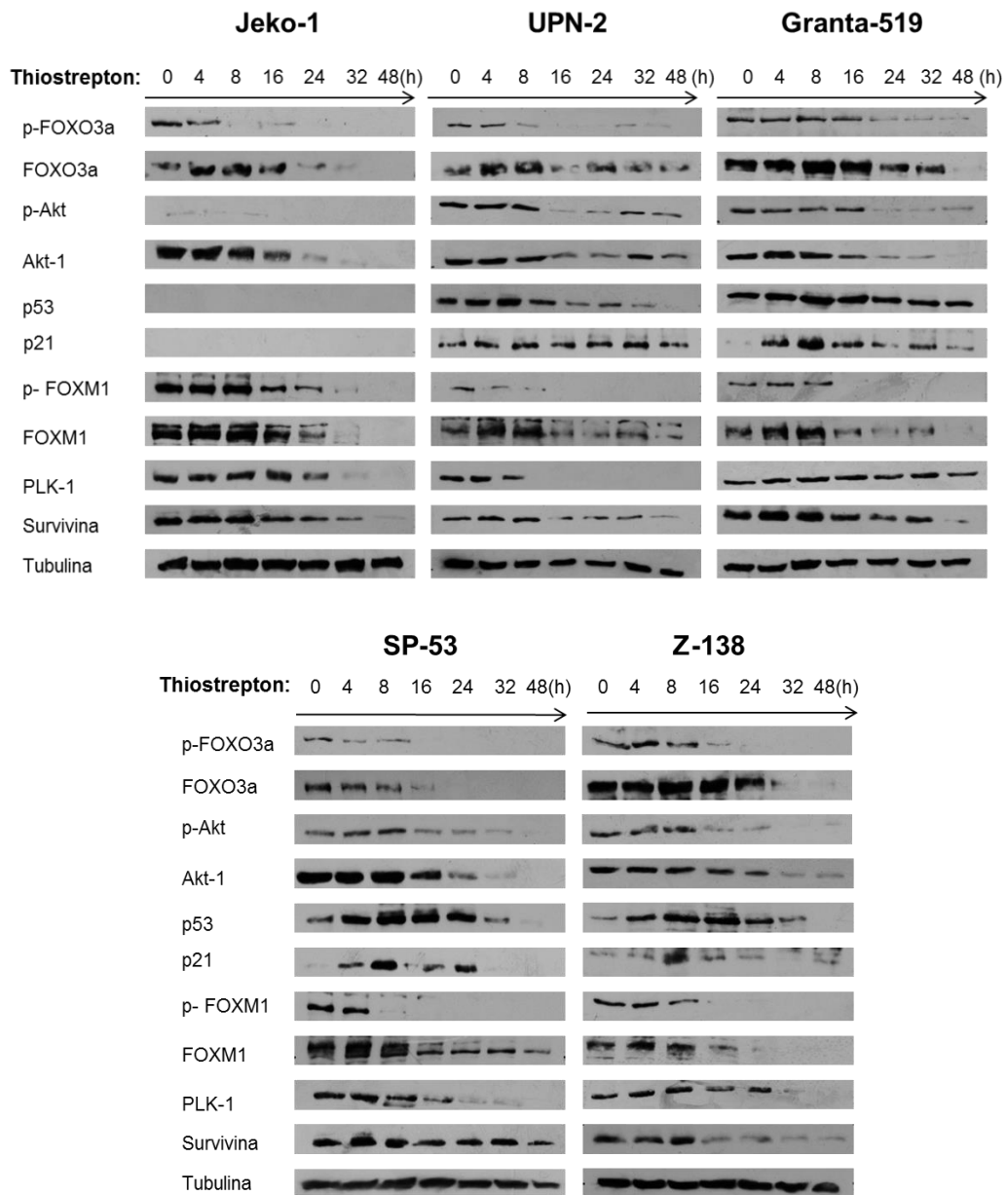


Figura 45. Anàlisi molecular dels efectes de thiostrepton sobre cèl·lules de LCM. Les cèl·lules es van tractar amb 2 μ M de thiostrepton i es van recollir a les hores indicades. Els extractes proteics es van lisar i es van analitzar per *western blot* amb anticossos específics. Es va utilitzar α -tubulina com a control de càrrega.

2.4. Anàlisi de la localització subcel·lular de FOXO3a en resposta al tractament amb thiostrepton.

A continuació, es va voler comprovar si els inhibidors de FOXM1 podien afectar la localització intracel·lular del factor de transcripció FOXO3a, i si el canvi de localització era dependent de l'estat funcional de p53. Per tal de dur a terme aquest anàlisi, les cèl·lules Jeko-1 i Z-138 i els cultius primaris dels pacients P002 i P006 es van tractar amb thiostrepton i amb siomicina-A i es van realitzar tincions immunocitoquímiques amb un anticòs específic contra FOXO3a.

A les cèl·lules sense tractar, el factor de transcripció FOXO3a es troba localitzat al citoplasma cel·lular tant a la línia Jeko-1 com a la línia Z-138 (figura 46.A). En canvi, es va observar una translocació de FOXO3a a l'interior del nucli cel·lular en resposta als dos tractaments i de forma consemblant tant a les cèl·lules Z-138 (p53-wt) com a les cèl·lules Jeko-1 (p53-del). Aquest efecte està en concordança amb la disminució dels nivells de fosforilació de FOXO3a observat per *western blot* a ambdues línies cel·lulars.

Per comprovar si es produïen efectes semblants a cèl·lules primàries, es van tractar les cèl·lules amb thiostrepton i es va realitzar el mateix procediment a les cèl·lules dels pacients P002 i P006 (figura 46.B). A les cèl·lules controls dels dos pacients es va observar com el factor de transcripció FOXO3a es trobava localitzat al citoplasma. En canvi, en resposta al tractament amb thiostrepton, el factor de transcripció FOXO3a es va translocar a l'interior del nucli de les cèl·lules primàries del pacient P006, mentre que en el cas del pacient P002, aquest factor de transcripció no va experimentar canvis en la seva localització subcel·lular, romanent citoplasmàtic. Podria ser que el pacient P002 presenti altres alteracions moleculars que interfereixin en aquesta translocació de FOXO3a a l'interior del nucli i per aquest motiu s'observa una resposta diferent a l'obtinguda a les línies cel·lulars.

El resultat obtingut a cèl·lules primàries suggereixen que, en el cas de la inhibició de FOXM1, es necessita la presència de p53 en estat funcional per permetre la translocació de FOXO3a cap a l'interior nuclear. En canvi, a les línies cel·lulars aquesta translocació té lloc de manera independent de p53, indicant que en aquests processos intervenen altres mecanismes encara no identificats.

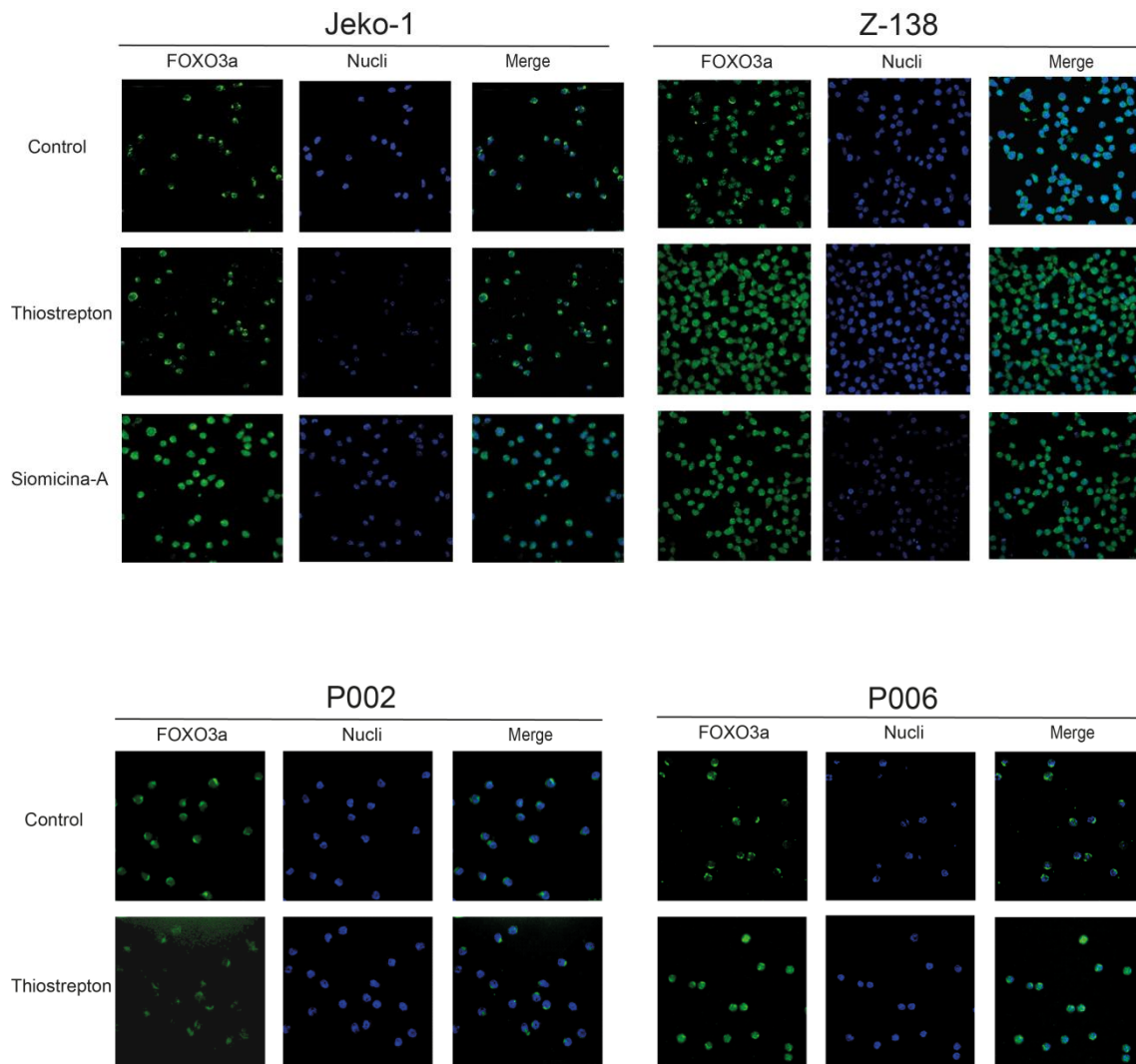


Figura 46. Localització subcel·lular de FOXO3a. **A)** Les línies Z-138 i Jeko-1 es van tractar amb $2\mu\text{M}$ de thiostrepton o amb 500nM de siomicina-A durant 16 hores. Les cèl·lules van esser analitzades per immunofluorescència utilitzant un anticòs específic contra FOXO3a i les imatges foren adquirides mitjançant microscòpia confocal **B)** Com s'indica a A), excepte pel fet que les cèl·lules dels pacients P002 i P006 es van tractar amb $1\mu\text{M}$ de thiostrepton durant 16 hores.

RESULTATS

Capítol 3

3. Noves estratègies terapèutiques en Limfoma de Cèl·lules del Mantell

Actualment no hi ha cap règim estàndard establert pel tractament del LCM i els que s'apliquen a l'àmbit clínic tenen una eficàcia limitada, ja que la majoria de casos acaben en recaiguda i morint a causa de la malaltia. Es necessari obtenir noves combinacions de fàrmacs que demostrin una major efectivitat i presentin una menor citotoxicitat per al pacient. Estudis previs han demostrat l'eficàcia del règim GemOx-R (Gemcitabina-Oxaliplatí-Rituximab) en pacients de LCM (Rodríguez et al. 2007) però el mecanisme pel qual aquest règim és tan eficaç en LCM encara no s'ha determinat. L'estudi per separat de l'efecte dels components del règim Gemox-R va determinar que la ni gemcitabina ni el rituximab produïen un efecte significatiu i assenyalava a l'oxaliplatí com el principal component actiu d'aquest règim (Obrador-Hevia et al. 2016).

Els prometedors resultats obtinguts amb l'oxaliplatí ens van dur a comparar l'eficàcia d'aquest fàrmac amb el seu anàleg cisplatí i amb la citarabina, un dels principals fàrmacs d'elecció per tractar el LCM. A més, es va voler determinar si els efectes d'aquests agents quimioteràpics es modulaven a través de l'eix FOXO3a-FOXO1.

3.1. Efecte d'oxaliplatí, cisplatí i citarabina en la viabilitat cel·lular de LCM.

Com a primer pas, es va determinar l'efecte del tractament amb oxaliplatí sobre la viabilitat de línies de LCM, i es va comparar els seus efectes amb els produïts per un anàleg, el cisplatí, i pel fàrmac clínicament més efectiu citarabina o Ara-C, el qual s'administra de forma rutinària a pacients de LCM. Les línies cel·lulars Jeko-1, Granta-519 i SP-53 es van tractar amb concentracions creixents d'oxaliplatí, cisplatí i citarabina i la viabilitat cel·lular va ser mesurada a les 48 hores.

La viabilitat de les línies de LCM es va reduir de manera notable en resposta al tractament amb oxaliplatí (figura 47.A). A les tres línies analitzades, la viabilitat cel·lular es va situar a valors inferiors al 40%. A partir de la dosi de 20 μ M, l'oxaliplatí va demostrar un efecte dramàtic sobre la viabilitat cel·lular a les línies Jeko-1 i SP-53. En canvi, la resposta de la línia Granta-519 a majors dosis d'oxaliplatí va ésser moderada, de manera que la seva viabilitat no va disminuir del 40%.

El tractament amb cisplatí, el qual s'ha inclòs en varis règims per tractar el LCM, va demostrar una resposta variada en funció de la línia cel·lular. La línia SP-53 va presentar una elevada sensibilitat a cisplatí mentre que la línia Granta-519 mostrà una resistència al tractament, i la resposta de la línia Jeko-1 va ser intermèdia. A la figura

47.B es pot observar com la viabilitat de la línia SP-53 es veu molt reduïda a concentracions baixes de cisplatí (entre 0.5-2.5 μM), mentre que les cèl·lules Jeko-1 veuen afectada la seva viabilitat a altes dosis de cisplatí, d'entre 10-20 μM . En canvi, la viabilitat de la línia Granta-519 no es va veure reduïda a valors inferiors del 50% amb cap de les dosis de cisplatí utilitzades.

En resposta al tractament amb citarabina, es va observar una disminució dràstica de la viabilitat cel·lular a les cèl·lules Jeko-1 i SP-53, assolint uns valors de viabilitat d'entre 10% i 20% a una concentració de citarabina d'1 μM . Per la seva part, la línia Granta-519 va demostrar una major resistència al tractament, situant-se la viabilitat al 40% a les dosis més altes de citarabina (figura 47.C). Aquesta resposta moderada de les Granta-519 coincideix amb els resultats observats a estudis previs (Hutter et al. 2012)

A continuació vàrem voler confirmar aquests resultats utilitzant cultius primaris de LCM. Per aquest motiu, es van tractar les cèl·lules primàries dels pacients P002 i P006 amb dosis creixents d'oxaliplatí, cisplatí i citarabina i es va mesurar la viabilitat a les 48 hores(figura 47.D).

Els tractament amb els tres fàrmacs va produir uns efectes molt moderats en la viabilitat de les cèl·lules del pacient P002. En resposta al tractament amb oxaliplatí, la viabilitat cel·lular del pacient P002 es va situar al 80% a una dosi de 10 μM d'oxaliplatí i a una dosi de 20 μM no va arribar a baixar del 50%. En canvi, el tractament amb cisplatí i amb citarabina no va produir cap efecte destacable sobre la viabilitat cel·lular del pacient P002, mantenint-se entre uns valors del 80-100% en resposta als dos tractaments. Cal assenyalar que en el pacient P002 es va utilitzar una concentració màxima de citarabina de 2.5 μM , ja que al no observar-se cap resposta sobre la viabilitat no es van analitzar dosis superiors.

El pacient P006 va demostrar una major sensibilitat al tractament amb oxaliplatí que al tractament amb cisplatí. La viabilitat cel·lular va disminuir de manera dosi-depenent en resposta al tractament amb oxaliplatí, quedant un 50% de cèl·lules viables a una concentració de 20 μM . En canvi, la viabilitat cel·lular no es veure tan reduïda en resposta al tractament amb cisplatí, de manera que a una dosi de 20 μM la viabilitat cel·lular es situà al 80%. Es va detectar una clara resposta del pacient P006 a citarabina, disminuint clarament la viabilitat de manera dosi-depenent. A dosis de 10 μM i 20 μM de citarabina els efectes sobre la viabilitat cel·lular varen esser clars, amb només un 10% de cèl·lules viables.

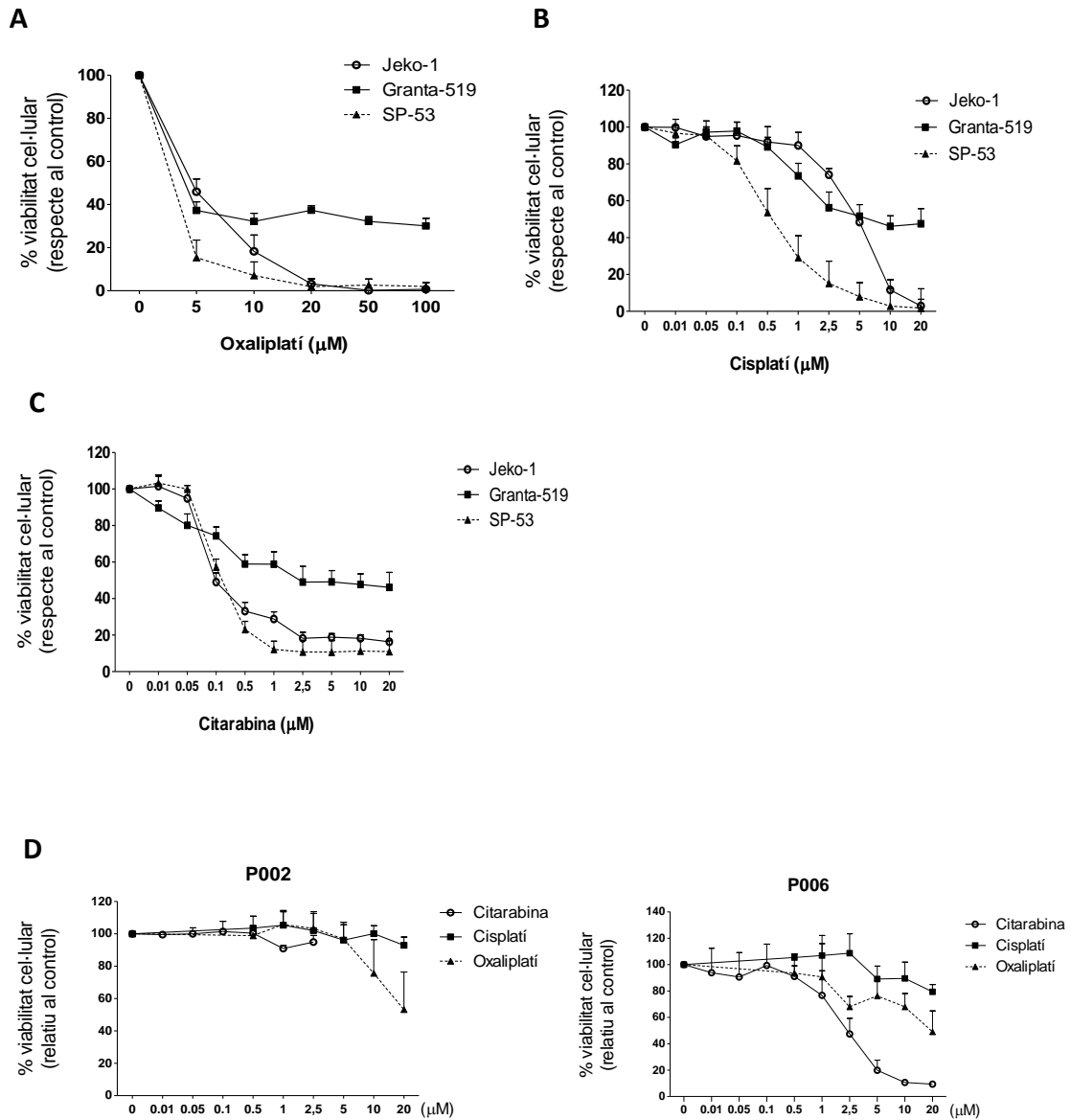


Figura 47. Efecte d'oxaliplatin, cisplatin i citarabina sobre la viabilitat cel·lular a LCM. Les línies cel·lulars (**A**, **B** i **C**) i les cèl·lules dels pacients P002 i P006 (**D**) van ésser tractades durant 48 h amb les dosis dels fàrmacs indicades. Els gràfics representen el percentatge relatiu de cèl·lules viables respecte a les cèl·lules no tractades. Les dades indiquen la mitjana ± SEM de quatre determinacions independents realitzades en duplicat.

A continuació es van calcular els valors de IC₅₀ per oxaliplatí, cisplatí i citarabina a les línies Jeko-1, Granta-519 i al pacient P006 (taula 18). Els valors de les IC₅₀ es van obtenir amb el programa informàtic *GraphpadPrism5.0* a partir de les dades obtingudes als assajos de viabilitat mitjançant regressió no lineal i ajustament de la corba. Els valors de les IC₅₀ a les cèl·lules del pacient P002 no es van poder calcular a causa de la baixa resposta als tres fàrmacs obtinguda en els experiments de viabilitat.

Es pot observar com a les línies Jeko-1 i SP-53 s'obtingueren uns valors d'IC₅₀ de oxaliplatí menors que els valors d'IC₅₀ de cisplatí. De manera interessant, les cèl·lules SP-53 presentaren uns valor d'IC₅₀ d'oxaliplatí i de citarabina molt similars. En canvi, a la línia Jeko-1 els valor d'IC₅₀ d'oxaliplatí i cisplatí van ser superiors que el valor d'IC₅₀ de citarabina.

En el cas del pacient P006, els valors d'IC₅₀ d'oxaliplatí també van ser més elevats que els valors de IC₅₀ de citarabina. En canvi, la resposta a l' oxaliplatí va esser molt més elevada que la del cisplatí, el qual no va produir un efecte destacable sobre la viabilitat cel·lular, impossibilitant així l'obtenció del valor d' IC₅₀.

D'aquesta manera, les comparacions *in vitro* entre l'oxaliplatí, el cisplatí i la citarabina van suggerir una major eficàcia de l' oxaliplatí respecte al cisplatí. De forma interessant, els efectes de l'oxaliplatí sobre la viabilitat es situaven dins un rang similar al de citarabina, el qual recordem és un dels fàrmacs d'elecció per tractar el limfoma de cèl·lules del mantell.

	Oxaliplatí	Cisplatí	Citarabina
Jeko-1	6.51 ± 0.70	8.72 ± 0.88	0.20 ± 0.03
SP-53	0.31 ± 0.04	1.18 ± 0.09	0.098 ± 0.01
P006	21.4 ± 3.51	n.d.(>100)	2.06 ± 0.34

Taula 18. Valors d' IC₅₀. Les concentracions màximes inhibidores (IC₅₀ en µmol/l) per oxaliplatí, cisplatí i citarabina van ser determinades a les línies Jeko-1 i SP-53 i a les cèl·lules del pacient P006 a partir de les dades de viabilitat cel·lular.

3.2. Efectes de les combinacions entre cisplatí, oxaliplatí i citarabina.

Com a següent pas es va voler comprovar si el cisplatí o l'oxaliplatí milloraven la sensibilitat de les cèl·lules als efectes de la citarabina. Per dur a terme aquest propòsit es van realitzar experiments de combinació entre citarabina i cisplatí/oxaliplatí a les cèl·lules Jeko-1 i SP-53. En el cas del pacient P006, aquestes combinacions només es van realitzar amb oxaliplatí, al no haver-se pogut determinar el valor d'IC₅₀ pel cisplatí. L'estudi d'aquestes combinacions permet determinar si el tractament conjunt dels dos fàrmacs té un efecte sinèrgic, antagònic o additiu sobre la viabilitat cel·lular.

Els estudis de combinació van consistir en el tractament de les cèl·lules amb tres ratis fixes (1:1, 1:2 i 1:3) de citarabina-cisplatí i citarabina-oxaliplatí.

Per a cada rati, es van combinar els dos fàrmacs a la proporció indicada amb dosis determinades a partir de les seves IC₅₀, i es realitzà un banc de dilucions seriadades (anomenades de 1 a 7, essent 1 la més diluïda i 7 la més concentrada) per tal d'obtenir una corba dosi-resposta per a cada combinació.

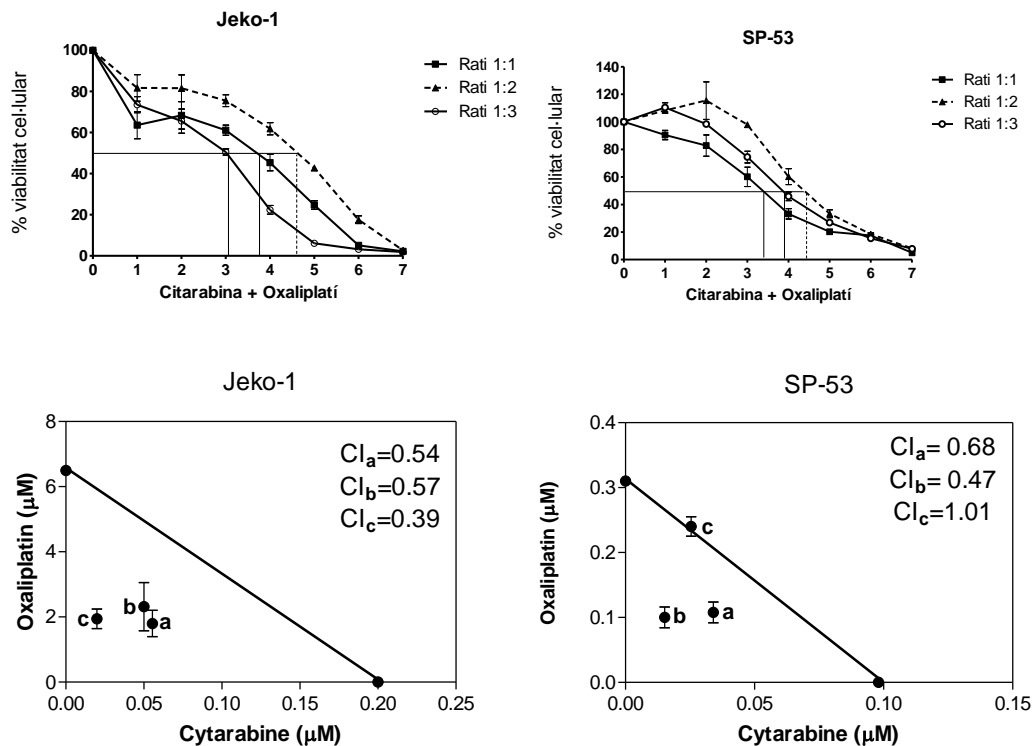
Els efectes sobre la viabilitat cel·lular en resposta a les combinacions indicades va esser determinada a les 48 hores de tractament. A la figura 48 es mostren les corbes de viabilitat per a cada combinació, així com els isobologrames obtinguts, als quals s'indica la línia d'isoeffectivitat que uneix els valors de les IC₅₀ de cada fàrmac per separat. Els valors d'IC₅₀ obtinguts es van utilitzar per tal d'obtenir el valor del índex de combinació (CI) (Chou i Talalay, 1984). Un valor de CI<1 indica un efecte sinèrgic entre els dos fàrmacs, un valor de CI>1 indica un efecte antagònic i un valor de CI~1 significa que la combinació dels fàrmacs produeix un efecte additiu.

La combinació entre oxaliplatí i citarabina a les cèl·lules Jeko-1 va demostrar un efecte sinèrgic (CI<1) amb els tres ratis realitzats, mentre que a la línia SP-53 dos dels ratis varen tenir un efecte sinèrgic i un rati va demostrar un efecte additiu (CI~1) (figura 48.A).

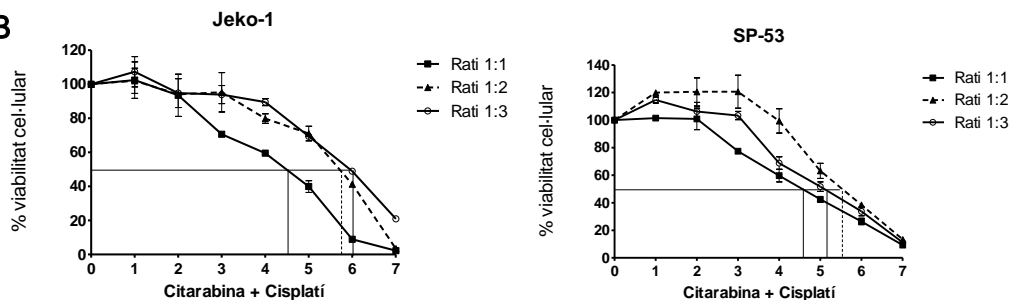
En canvi, els tres ratis utilitzats a la combinació entre cisplatí i citarabina a la línia Jeko-1 van donar un efecte antagònic (CI>1). Respecte a les cèl·lules SP-53, dos dels ratis utilitzats en la combinació entre cisplatí i citarabina va resultar en un efecte antagònic (CI>1) i un rati va determinar un efecte additiu (CI~1) (figura 48.B). A continuació es va voler comprovar si s'obtenien efectes semblants a les cèl·lules primàries de LCM. Per aquest propòsit, es va realitzar el mateix procediment

combinant oxaliplatí amb citarabina (figura 48.C), obtenint una resposta clarament sinèrgica entre oxaliplatí i citarabina amb les tres combinacions realitzades. Les combinacions de cisplatí amb citarabina no es van poder realitzar a causa de la baixa resposta al cisplatí que presentava el pacient P006.

A



B



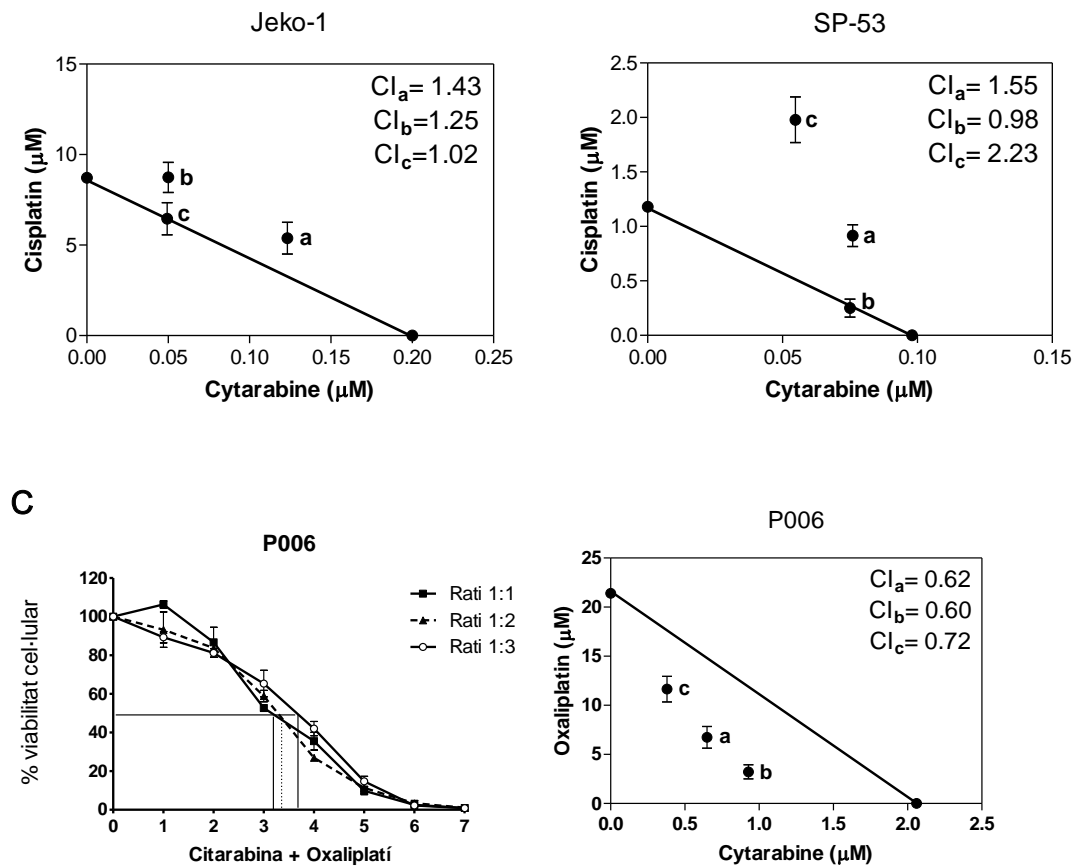


Figura 48. Efecte de la combinació de cisplatí o oxaliplatí amb citarabina a línies de LCM. Les línies Jeko-1 (A) i SP-53 (B) es van tractar amb uns ratis fixes de combinació de dosis (a = 1:1, b = 1:2, c = 1:3) de citarabina i cisplatí o citarabina i oxaliplatí. (C) Les cèl·lules del pacient P006 es varen tractar amb uns ratis fixes de combinació de dosis (a = 1:1, b = 1:2, c = 1:3) de citarabina i oxaliplatí. Les dades indicades als gràfics de viabilitat i a l'isoblograma representen la mitjana \pm SEM de tres determinacions independents per duplicat. A l'isoblograma s'indica el CI de cada rati de combinació.

3.3. Efectes moleculars del cisplatí i oxaliplatí sobre l'eixp53-FOXO3a-FOXM1.

Estudis recents assenyalen la importància de la via PI3K/AKT dins el LCM i a FOXO3a com a modulador clau (Obrador-Hevia et al. 2012). En els resultats dels capítols 1 i 2 d'aquesta tesi hem analitzat la importància del factor de transcripció FOXO3a en la proliferació cel·lular i en la inducció de l'apoptosi, processos condicionats per l'estat de p53 de la cèl·lula. A més, cal destacar que l'increment en l'activitat de FOXO3a provoca la inhibició de FOXM1, oncogen implicat en la progressió del cicle cel·lular i en la resistència a agents genotòxics.

Els resultats obtinguts en els experiments de viabilitat indiquen que les cèl·lules de LCM presenten major sensibilitat als efectes d'oxaliplatí en comparació als efectes del cisplatí. Considerant la importància de l'eix FOXO3a-FOXM1 en la supervivència cel·lular i la seva implicació en la resposta a agents genotòxics, es va voler determinar si aquests fàrmacs modulaven els components de l'eix FOXO3a-FOXM1, i si aquests efectes eren dependents de l'estat de p53.

Per aquest motiu, es van tractar les cèl·lules SP-53 i Jeko-1 amb cisplatí i amb oxaliplatí a diferents temps i es van analitzar els canvis en els nivells de fosforilació i expressió proteica dels components de l'eix FOXO3a-FOXM1 (figura 49).

A les cèl·lules SP-53, tant el tractament amb cisplatí com amb oxaliplatí va reduir els nivells de fosforilació de FOXO3a al residu Ser-253, indicant una activació d'aquest factor de transcripció. Els nivells de fosforilació de FOXM1 al residu Ser-35 també es van veure disminuïts en resposta als dos tractaments, indicant la possible inactivació d'aquest oncogen. A més, el tractament amb oxaliplatí va produir una disminució en els nivells de FOXM1 totals, mentre el tractament amb cisplatí no va alterar els nivells de proteïna de FOXM1, que varen romandre constants al llarg del tractament. En resposta als dos fàrmacs, es produeix un augment en els nivells de p53, i de manera paral·lela, un increment de la seva diana transcripcional p21^{cip1}. De forma interessant, els canvis a nivell molecular produïts en resposta al tractament amb oxaliplatí tenen lloc de manera més primerenca que els canvis produïts en resposta a cisplatí. Aquests resultats correlacionen amb la major sensibilitat a oxaliplatí observada a les cèl·lules SP-53 en els experiments de viabilitat.

En canvi, a la línia Jeko-1 el tractament amb aquests dos fàrmacs no va provocar cap efecte evident. En resposta tan a cisplatí com a oxaliplatí es produïa una disminució dels nivells de fosforilació de FOXO3a, però aquesta desfosforilació tenia lloc a partir de les 48 hores de tractament. En canvi, no es varen detectar canvis en els nivells totals de FOXO3a i FOXM1 ni en l'estat de fosforilació de FOXM1.

És remarcable el fet que les cèl·lules SP-53, amb p53-wt, modulen l'expressió dels components de l'eix FOXO3a-FOMX1, mentre que a la línia Jeko-1, amb deleció de p53, aquests canvis van esser indetectables. Els resultats obtinguts suggereixen que els efectes de cisplatí i d'oxaliplatí afecten als components de l'eix FOXO3a-FOXM1 depenent de l'estat del supressor tumoral p53. A més, l'oxaliplatí presenta una major eficàcia que el tractament amb cisplatí sobre l'eix FOXO3a-FOXM1 a línies cel·lulars

de LCM donat que els seus efectes es poden detectar en un menor període de temps abans que els del cisplatí.

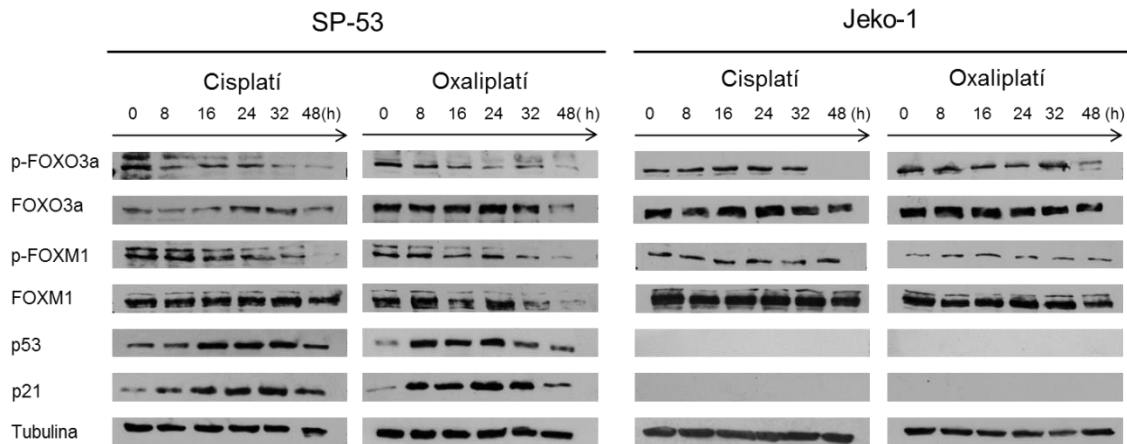


Figura 49. Anàlisi molecular dels efectes de cisplatí i oxaliplatí sobre línies de LCM. La línia SP-53 es va tractar amb dosis de cisplatí i oxaliplatí de 2 μ M i la línia Jeko-1 es va tractar amb dosis de cisplatí i oxaliplatí de 10 μ M i es van recollir les mostres a les hores indicades. Els extractes proteics es van lissar i foren analitzats per *western blot* utilitzant els anticossos específics contra les proteïnes d'interès i α -tubulina com a control de càrrega.

3.4.Efecte de l' oxaliplatí sobre la localització subcel·lular de FOXO3a.

Finalment, es va voler comprovar si la localització subcel·lular del factor de transcripció FOXO3a s'alterava en resposta al tractament amb oxaliplatí. Per aquest propòsit, es van tractar les línies Jeko-1 i SP-53 amb aquest fàrmac i es va realitzar una tinció immunocitoquímica amb un anticòs contra FOXO3a (figura 50).

En condicions control, el factor de transcripció FOXO3a es va detectar al citoplasma a les dues línies analitzades. En el cas de la línia SP-53 s'observà com FOXO3a es translocava a l'interior del nucli cel·lular en resposta al tractament amb oxaliplatí. En canvi, a les cèl·lules Jeko-1, FOXO3a romaní al citoplasma i no s'observava aquesta translocació nuclear.

De manera global, els resultats obtinguts suggereixen que l'oxaliplatí produeix l'activació de FOXO3a a línies de LCM. A més, aquesta activació es depenent de la presència de p53 en estat funcional. Conjuntament, aquestes dades reforcen la hipòtesi de la importància de l'eix p53-FOXO3a-FOXM1 com a diana terapèutica en el tractament del LCM.

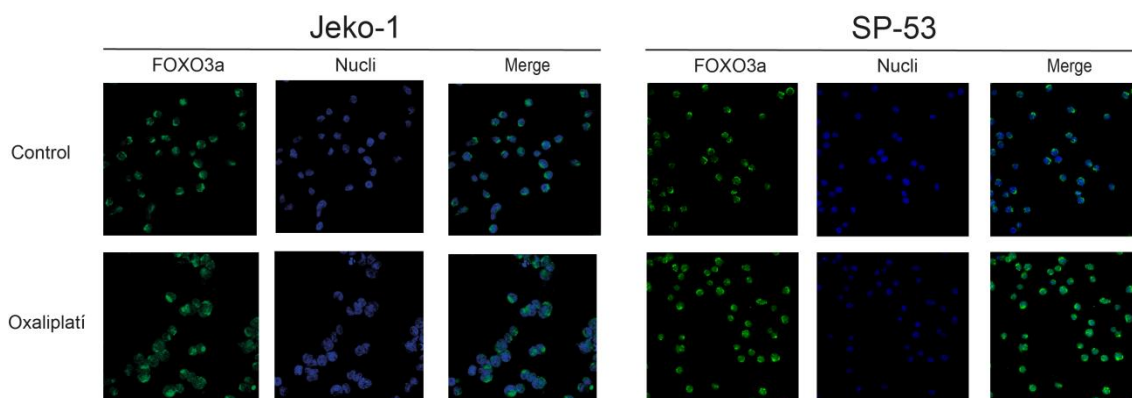


Figura 50. Localització subcel·lular de FOXO3a. Les cèl·lules SP-53 es va tractar amb 2 μM d'oxaliplatí i les cèl·lules Jeko-1 es va tractar amb 10 μM d'oxaliplatí durant 16 hores. Les cèl·lules van ser analitzades per immunofluorescència, utilitzant un anticòs específic contra FOXO3a i les imatges van ser adquirides mitjançant microscòpia confocal.

DISCUSSIÓ

El LCM és un subtipus de LNH de cèl·lula B poc freqüent però molt agressiu i amb molt mala prognosi, amb una supervivència mitjana entorn als 3-4 anys, i pel qual encara no hi ha un tractament curatiu. Per millorar la resposta als fàrmacs i aconseguir un tractament que resulti més efectiu és necessari aprofundir en els coneixements que regulen els mecanismes moleculars implicats en la patogènia del LCM.

El factor de transcripció FOXO3a és un regulador clau en la proliferació i supervivència de LCM (Obrador-Hevia et al. 2012). Recentment, s'ha descrit a FOXO3a com a regulador negatiu de FOXM1 (McGovern et al. 2009), un potent oncogen implicat en la progressió del cicle cel·lular i en la resposta als agents genotòxics. A més, tant FOXO3a com FOXM1 estan relacionats amb el supressor tumoral p53, el qual regula la seva expressió i amb el que interactuen a diferents nivells. Els mecanismes moleculars que determinen la seva interacció i la seva implicació en la biologia tumoral encara no es coneixen amb exactitud. Diferents estudis fan referència a la relació entre aquests factors de transcripció a altres models cel·lulars com a càncer de mama, cervical o d'ovari (Gomes et al. 2013; Ming et al. 2013; Jiang et al. 2013), però la implicació de l'eix FOXO3a-FOXM1 i la seva relació amb p53 en el context del LCM és fins ara desconeguda.

En aquest treball s'ha analitzat la resposta de cèl·lules de LCM a nous agents i a fàrmacs utilitzats pel tractament del LCM, avaluant la modulació de l'eix FOXO3a-FOXM1 pels diferents tractaments, així com la implicació de p53 en les respostes observades.

CAPÍTOL 1. Inducció de l'expressió de p53 a cèl·lules de LCM

Efectes de l'activació de p53 amb nutlin-3a

TP53 és el gen que es troba mutat de manera més freqüent als diferents càncers humans. En el cas de LCM, les mutacions o delecions al gen *TP53* es detecten en un 26% dels casos, amb una prevalença superior a les variants més agressives (Greiner et al. 2006). A més, es troben múltiples alteracions de les vies i proteïnes que regulen l'activitat de p53. Entre aquestes alteracions, destaca la sobre-expressió de la E3 ubiquitina ligasa MDM2, la qual interacciona amb la proteïna p53 i la marca amb ubiquitina per la seva degradació al proteosoma, inhibint així l'activitat de p53.

Nutlin-3a és una petita molècula que inhibeix la unió entre MDM2 i p53, estabilitzant la proteïna p53 i activant la seva via de senyalització *downstream*, tant *in vivo* com *in vitro* (Vassilev 2004). Els resultats obtinguts en el nostre estudi indiquen que nutlin-3a estabilitza i activa la proteïna p53 en línies de LCM i en cultius primaris de LCM que presenten p53-wt, en els que promou la disminució de la viabilitat cel·lular i la mort per apoptosi. Els nostres resultats correlacionen amb els descrits per altres grups a cèl·lules de LCM (Drakos et al. 2009; Tabe et al. 2009).

El mateix efecte de nutlin-3a sobre la viabilitat cel·lular s'ha descrit a altres tipus cel·lulars, ja siguin tumors sòlids (Logan et al. 2007; Villalonga-Planells et al. 2011) com tumors hematològics, incloent leucèmia limfocítica crònica (LLC) (Kojima et al. 2006), limfoma de Hodgkin (Drakos et al. 2007), limfoma d'efusió primària (Petre et al. 2007), o limfoma B difús de cèl·lula gran (DLBCL) (Drakos et al. 2011). Tots ells conclouen que la resposta de les cèl·lules al tractament amb nutlin-3a és dependent de l'estat de p53, confirmant així els nostres resultats.

Les línies cel·lulars de LCM amb el gen *TP53*-wt (SP-53 i Z-138) van demostrar una major sensibilitat als efectes de nutlin-3a que les línies que presenten mutació o deleció en els al·lels d'aquest gen (Granta-519, Jeko-1 i UPN-2). D'acord amb els nostres resultats, estudis realitzats a diferents models cel·lulars suggereixen que són necessàries elevades dosis de nutlin-3a (de l'ordre de 20-30 μ M) per induir citotoxicitat a cèl·lules que presenten la proteïna p53-mt, en contrast amb les menors dosis (1-10 μ M) requerides per les cèl·lules que presenten p53-wt (VanderBorghet et al. 2006, Lau et al. 2008).

Nutlin-3a produeix una estabilització i un augment dels nivells de la proteïna p53 a les cèl·lules p53-wt. Com s'observa a la figura 32, els nivells de proteïna p53 augmenten en resposta a nutlin-3a fins arribar a un màxim a les 8 hores de tractament, per després tornar a disminuir als nivells inicials. De manera paral·lela, té lloc un augment de p21^{Cip1}, proteïna relacionada amb l'aturada del cicle cel·lular. Igualment, augmenten els nivells del seu regulador negatiu MDM2, formant part de l'*autoloop* de regulació negativa de p53. Aquesta estabilització de p53 també produeix un augment de la seva activitat transcripcional, de manera que els mRNA de les proteïnes pro-apoptòtiques, Noxa, Puma i GADD45, incrementen. Aquest augment en l'expressió de les proteïnes d'aturada de cicle cel·lular i pro-apoptòtiques es relaciona amb l'augment de l'activitat caspasa observada en aquestes línies, de manera que nutlin-3a és capaç d'aturar el cicle cel·lular i induir la mort per apoptosi a cèl·lules de LCM amb p53-wt. Aquest resultat concorden amb els observats a altres tipus de tumors hematològics com

leucèmia mieloide aguda (LMA) (Kojima et al.2005), leucèmia limfocítica crònica (LLC) (Coll-Mulet et al. 2011) o mieloma múltiple (Saha et al. 2010).

Per la seva part, les línies cel·lulars que presenten una mutació o deleció a un al·lel del gen *TP53* disminueixen la viabilitat a dosis de nutlin-3a més elevades, d'entre 5 µM i 20 µM, demostrant certa resistència al tractament. Així, la línia Granta-519 presenta un al·lel del gen *TP53*-wt i experimenta una disminució de la viabilitat més moderada en comparació amb les línies SP-53 i Z-138, quedant a les 48 hores de tractament amb nutlin-3a un 40% de cèl·lules viables a unes dosis de 20 µM. Aquest fet fa pensar que la deleció de l'altre al·lel de *TP53* que presenta aquesta línia és la causant d'una major resistència a nutlin-3a, de manera que seria necessària la presència dels dos al·lells de *TP53* en estat *wild type* per poder reactivar a la proteïna p53 usant dosis baixes de nutlin-3a.

Determinades cèl·lules amb mutacions al gen *TP53* responen a dosis elevades de nutlin-3a. En el nostre cas, nutlin-3a provoca una disminució de la viabilitat cel·lular a la línia UPN-2. Aquesta línia presenta una mutació *hotspot* al 175C (Arg-His) (R175H), localitzada al domini d'unió del DNA de l'exó 5 donant com a resultat una proteïna p53 amb una activitat transcripcional no funcional (M'Kacher et al. 2003). A més, aquesta mutació comporta un efecte dominant negatiu i la proteïna només té un 12.41% d'activitat en comparació amb les cèl·lules p53-wt (Halldósdottir et al. 2011). Així i tot, la línia UPN-2 disminueix la seva viabilitat en resposta a nutlin-3a. En la imatge de *western blot*, s'observa com també es produeix una acumulació de la proteïna p53 en resposta al tractament, però a diferència de les línies p53-wt, els seus nivells romanen elevats al llarg del temps, igual que els del seu regulador negatiu MDM2, encara que la seva expressió sigui menor que a les cèl·lules p53-wt. Estudis realitzats per Manfé i col·laboradors (2012) a limfoma de cèl·lula T cutani (CTCL) indiquen que les cèl·lules amb el gen *TP53* en estat no funcional acumulen p53 en resposta a nutlin-3a, però la seva activitat transcripcional queda reprimida segons el tipus de mutacions que presenti. En el nostre cas, a nivell d'expressió gènica es detecta la inducció dels mRNA de Noxa, Puma i GADD45. Varis estudis realitzats a cèl·lules de carcinoma de pulmó, neuroblastoma, carcinoma de colon, osteosarcoma i hepatòcits han demostrat que existeix un mecanisme de resposta a nutlin-3a independent de p53 (VanderBorghet et al. 2006, Lau et al. 2008; Kurinna et al. 2010), produït a través del seu homòleg p73. Nutlin-3a també afectaria a la unió de MDM2 amb p73, activant l'activitat transcripcional de p73, de manera que s'induiria l'expressió de les seves dianes com ara p27^{kip1} (VanderBorghet et al. 2006), Puma i Noxa (Lau et al. 2008).

Per determinar els efectes de nutlin-3a en absència de la proteïna p53 es va analitzar la línia Jeko-1. Aquesta línia presenta una deleció dels dos al·lels de *TP53*, tal i com es pot comprovar en la imatge de *western blot*, on no es detecta expressió de la proteïna p53 ni de la seva diana p21^{cip1}. Aquesta línia és totalment insensible al tractament amb nutlin-3a, de manera que a les 48 hores de tractament a 20 µM la viabilitat cel·lular es manté al 100%. L'absència d'activitat p53 es va comprovar també a nivell d'expressió gènica, al no observar una inducció notable dels mRNAs de Noxa, Puma o GADD45. Aquesta manca d'inducció de proteïnes pro-apoptòtiques correlaciona amb la inexistent inducció de l'activitat caspasa obtinguda en resposta a nutlin-3a. Així, a cèl·lules de LCM amb els dos al·lels del gen *TP53* deletats, nutlin-3a no produeix cap efecte sobre la viabilitat cel·lular ni en la inducció de la mort per apoptosi.

En aquest estudi es va disposar de cèl·lules de dos pacients diagnosticats amb LCM, als quals es va realitzar la seqüenciació del gen *TP53* mitjançant la tecnologia de NGS. Aquesta seqüenciació va determinar que el pacient P002 presentava una mutació al gen *TP53*, mentre que el pacient P006 tenia el gen *TP53* en estat *wild type*. Aquest resultat es va corroborar per *western blot*, revelant que al pacient P002 no es detecta expressió de p53, mentre que al pacient P006 s'observa un augment en els nivells de la proteïna en resposta a nutlin-3a. D'aquesta manera, es van poder analitzar els efectes de nutlin-3a sobre cèl·lules primàries de pacients de LCM i determinar si aquests efectes també depenien de l'estat de p53. Com era d'esperar, les cèl·lules del pacient P006, amb p53-wt, disminueixen la viabilitat en resposta a nutlin-3a, resposta que va acompanyada d'una forta inducció de l'activat caspasa. En canvi, les cèl·lules del pacient P002, amb p53-mt, no experimenten cap variació en la viabilitat ni en la inducció de l'activitat caspasa en resposta a nutlin-3a. D'igual manera que s'ha observat a les línies cel·lulars, la inducció de la proteïna p53 per part de nutlin-3a produeix un augment de la seva activitat transcripcional a cultius primaris. Al cultiu primari del pacient P006 s'observa una clara inducció dels mRNAs de Noxa, Puma i GADD45, mentre que la seva inducció és indetectable en el cultiu del pacient P002. D'aquesta manera, nutlin-3a induïx la mort cel·lular per apoptosi a cèl·lules primàries de LCM que presenten el gen *TP53*-wt.

Els resultats obtinguts demostren que nutlin-3a estabilitza la proteïna p53 a les línies cel·lulars de LCM, així com també en cultius primaris de LCM que presenten el gen *TP53*-wt, on promou la mort cel·lular i l'apoptosi, mentre que a les cèl·lules que presenten deleció o mutació en un al·lel de *TP53*, nutlin-3a no produeix cap efecte o aquests tenen lloc a dosis molt elevades.

La via PI3K/Akt es troba constitutivament activa en la majoria de limfomes de cèl·lula B (Polak et al.2012). Uns dels principals efectors d'aquesta via és el factor de transcripció FOXO3a, el qual és un regulador clau en LCM (Obrador-Hevia et al.2012). FOXO3a s'ha relacionat amb la proteïna p53 a múltiples nivells. Aquests dos factors de transcripció comparteixen característiques comunes, i un estudi recent apunta que FOXO3a és una diana directe de p53 (Renault et al. 2011). A més, diferents publicacions demostren com p53 i FOXO3a es regulen un a l'altre en resposta a distints estímuls cel·lulars (You et al, 2004; Bouchard et al. 2007, Fu et al 2009, Miyaguchi et al 2009).

Es va analitzar si els efectes de nutlin-3a afectaven a l'activitat de FOXO3a i a components clau de la via PI3K/Akt. Els resultats publicats fins al moment són contradictoris, de manera que mentre Zauli i col·laboradors (2010) demostren que nutlin-3a és capaç de disminuir la fosforilació d'Akt independentment de l'estat de p53 a cèl·lules de LLC, Zhang i col·laboradors (2010) no observen canvis en la fosforilació d'Akt en resposta a nutlin-3a a cèl·lules de LMA.

Els nostres resultats indiquen que el tractament amb nutlin-3a produeix una inhibició de la via PI3K/Akt de manera depenent de p53. S'observa com disminueixen els nivells de fosforilació d'Akt i es modifica l'expressió dels components *downstream*, com FOXO3a, a les línies cel·lulars que presenten p53-*wt*, però no a les línies amb p53-*mt* o p53-*del*.

Múltiples reguladors d'Akt o mTOR són dianes de p53, de manera que l'augment de p53 en resposta a una senyal d'estrès indueix l'expressió de reguladors negatius de la via PI3K/AKT, com PTEN (Feng et al.2007). Aquest fet explica la desfosforilació d'Akt que té lloc a les línies SP-53 i Z-138. En el cas de la línia UPN-2, en la que es produeix una acumulació de p53, aquesta proteïna no té activitat transcripcional i els nivells de fosforilació d'AKT no varien.

Com a conseqüència de la disminució dels nivells de fosforilació d'Akt es produeix una disminució en els nivells de fosforilació de FOXO3a a les cèl·lules p53-*wt*, però no a les línies p53-*mt* o p53-*del*. Aquesta desfosforilació va acompanyada de la translocació de FOXO3a a l'interior del nucli cel·lular, com es va comprovar per experiments de immunolocalització. S'observa com FOXO3a es transloca des del citoplasma cap al nucli cel·lular a la línia Z-138, però no a la línia Jeko-1, on roman al citoplasma en resposta a nutlin-3a. Aquest mateix fet s'observa a les cèl·lules primàries, on la translocació de FOXO3a només s'observa en el pacient P006, però no en el cas del

pacient P002. Per tant, la translocació de FOXO3a a l'interior del nucli cel·lular en resposta a nutlin-3a depèn de l'estat de p53 tant en línies cel·lulars com en cultius primaris de LCM.

A més, la translocació de FOXO3a al nucli cel·lular suposa l'activació de la seva activitat transcripcional, al augmentar la transcripció de les seves dianes Bnip3L i p27^{Kip1}, tant a les línies cel·lulars com al cultiu primari del pacient P006, amb p53-wt. En canvi, ni a la línia Jeko-1 ni al cultiu del pacient P002 no s'observa cap canvi destacable en l'activitat transcripcional de FOXO3a, mentre que en cas de la línia UPN-2, crida l'atenció la inducció de p27^{Kip1}. Aquesta proteïna, implicada amb l'aturada del cicle cel·lular, també és una diana transcripcional de p53, i els efectes observats en aquest cas poden ser causats per l'activitat de p73, com hem comentat anteriorment.

En resposta a nutlin-3a, la inducció de p53 activa l'expressió de FOXO3a. Tant els nivells de mRNA de FOXO3a com de les seves dianes es veuen incrementats, tant a línies cel·lulars p53-wt com al pacient P006, mentre que a les cèl·lules amb p53-mt el nivell de transactivació és molt baix. Aquest resultat coincideix amb l'estudi que apunta a FOXO3a com a diana directe de p53 (Renault et al. 2011), suggerint que és necessari p53-wt per activar la funció de FOXO3a.

Els resultats obtinguts indiquen una relació funcional entre FOXO3a i p53. Es sap que aquests dos factors de transcripció interaccionen de manera física, al manco en situacions de sobre-expressió (Nemoto 2004; You, Pellegrini et al. 2006; Wang et al 2008), però els mecanismes moleculars que regulen la seva interacció no són molt coneguts. A més, FOXO3a i p53 estan implicats en la supressió de la proliferació cel·lular i comparteixen múltiples gens diana, com p21^{cip1}, WIP1 i PA26 (Zhang et al. 2011). Aquesta interacció podria alterar l'activitat d'aquests dos factors de transcripció.

En el context del LCM, s'observa com es produeix una interacció entre les proteïnes endògenes p53 i FOXO3a en resposta a nutlin-3a, la qual és reversible i es modula al llarg del temps. La interacció entre p53 i FOXO3a també s'observa a les cèl·lules UPN-2, de manera que la mutació present a aquesta línia cel·lular no afecta al lloc d'unió. El nivell de interacció no depèn dels nivells de proteïnes endògenes totals, ja que a les 16 hores s'observen uns elevats nivells tant de FOXO3a com de p53, però el seu nivell d'interacció és menor que a les 4 o 8 hores. Aquesta interacció podria modificar la funció o l'activitat d'aquests factors de transcripció, indicant que podria existir un mecanisme de co-activació entre ells, encara que són necessaris més estudis per determinar aquest mecanisme.

Uns resultats similars es van obtenir a cèl·lules de càncer de mama i pulmó, on es va observar que la interacció entre p53 i FOXO3a no depèn dels nivells totals d'aquestes proteïnes a la cèl·lula, indicant que la seva interacció és complexa i depèn de l'estat cel·lular i del microambient (Fuet et al. 2009, Chung et al. 2012). Cal destacar que la majoria d'estudis d'immunoprecipitació, es realitzen silenciant o sobre-expressant els nivells de les proteïnes d'interès, mentre que els nostres resultats són a nivell de proteïna endògena, és a dir, en una situació més similar a les condicions fisiològiques.

De totes formes, el mecanisme de interacció entre p53 i FOXO3a és complex i depèn del tipus cel·lular i de l'estímul al qual es sotmet la cèl·lula (Fu et al. 2009). Es necessari seguir investigant per comprendre com es comuniquen i coordinen per regular el destí de la cèl·lula, en funció de les condicions fisiològiques o en resposta a agents terapèutics.

Estudis recents assenyalen a FOXM1 com a diana transcripcional de FOXO3a i p53 (Barsotti i Prives 2009; Pandit et al. 2009; Gomes et al. 2013; Jiang et al. 2013), els quals regulen a FOXM1 de manera negativa. Els nostres resultats demostren que en resposta al tractament amb nutlin-3a es produeix una disminució tant en el nivell d'expressió com en la fosforilació de FOXM1a les línies SP-53, Z-138 i UPN-2, inhibint així l'activitat d'aquest oncogen. A nivell transcripcional, es produeix una forta repressió en l'expressió de FOXM1 i de les seves dianes PLK-1 i Survivina. PLK-1 és una diana de FOXM1 (Fu et al. 2008) que fosforila i inactiva a FOXO3a (Bucur et al. 2014), de manera que la disminució dels seus nivells permet mantenir FOXO3a en estat actiu exercint la seva funció de supressor tumoral. Aquest mecanisme podria formar part d'un *loop* de regulació entre FOXO3a i FOXM1.

En el cas de la línia Jeko-1, no es produeix cap canvi sobre els nivells de FOXM1, els quals fins i tot augmenten tan a nivell de mRNA com de proteïna. Aquest fet té sentit al ser FOXM1 un oncogen, el qual activa la proliferació cel·lular, i per l'efecte nul que té nutlin-3a sobre la viabilitat a aquesta línia cel·lular. Estudis previs realitzats per Zhang i col·laboradors (2014) demostren com nutlin-3a disminueix els nivells de FOXM1 a línies cel·lulars de carcinoma d'ovari i pulmó en funció de l'estat de p53. Aquests mateixos autors descriuen que nutlin-3a incrementa els nivells de p53 i redueix els de FOXM1 a cèl·lules amb la proteïna p53-wt, però no a cèl·lules amb p53-mt. Utilitzant un model *knockdown* per p53, s'observa com FOXM1 tampoc experimenta cap disminució en resposta a nutlin-3a, indicant que és necessària la presència de p53 en estat funcional per suprimir a FOXM1.

La regulació negativa de FOXM1 per part de p53 també s'observa a les cèl·lules primàries. Al contrari de l'observat a les línies cel·lulars, els nivells de fosforilació de FOXO3a disminueixen a les cèl·lules dels dos pacients, però els nivells de FOXM1 només es veuen afectats al pacient que presenta p53-wt, suggerint que p53 en estat funcional estaria inhibint a FOXM1 a cèl·lules primàries de LCM.

p53 i FOXO3a regulen l'expressió de FOXM1 a través de la unió al seu promotor i la consegüent repressió de la seva transcripció (Millor et al. 2011), però fins al moment no s'han publicat estudis d'interacció a nivell de proteïna. Es va pensar en la possibilitat de que, com en el cas de la interacció de p53 amb FOXO3a, també es produís una interacció directe entre FOXM1 i p53, alterant així la seva funció. En els estudis d'immunoprecipitació, es va comprovar que es produeix una interacció entre les proteïnes endògenes p53 i FOXM1 en resposta a nutlin-3a. La unió de p53 a FOXM1 podria estar provocant la inhibició i la repressió de la seva activitat. És interessant que també es produeixi una interacció a la línia UPN-2, ja que obri la porta a una nova estratègia terapèutica a través de la inhibició de FOXM1 a cèl·lules que presentin mutacions p53 i que no responen a la majoria dels tractaments actuals.

En resum, el tractament amb nutlin-3a produeix una dràstica disminució de la viabilitat cel·lular i un augment de l'activitat caspasa a les cèl·lules que presenten p53-wt. En canvi, aquest efecte sobre les cèl·lules que presenten una deleció o mutació de p53 és indetectable o es dona a altes dosis de nutlin-3a. L'activació de p53 per part de nutlin-3a produeix una desfosforilació de FOXO3a, el qual es transloca a l'interior del nucli cel·lular i activa la transcripció dels seus gens diana. A més, l'activació de p53 i de FOXO3a es relaciona amb la inhibició de l'oncogen FOXM1, implicat en múltiples processos tals com la progressió de la tumorigènesi i la resistència a fàrmacs. Les cèl·lules que presenten p53-mt/del no tenen la capacitat d'inhibir a FOXM1 en presència de nutlin-3a, pel que és necessari trobar una altra estratègia per reprimir aquest oncogen.

Efectes de l'activació de p53 amb agents de dany al DNA

Els resultats obtinguts ens indiquen que l'activació de p53 per part de nutlin-3a depèn de la presència de p53-wt, i que aquesta activació modula a FOXO3a i FOXM1. El supressor tumoral p53 es pot activar per moltes altres vies, com a per exemple, a través del dany al DNA. L'etopòsid és un fàrmac utilitzat de manera habitual a la quimioteràpia, induint dany al DNA a través de la interacció amb la topoisomerasa II (Burden et al. 1996). Cal recordar que p53 és uns dels principals efectors en la

resposta al dany a DNA. Per aquest motiu, es va voler comprovar si l'activació de p53 amb etopòsid produïa el mateix efecte sobre l'eix FOXO3a-FOXM1, i si en aquest cas la resposta també depenia de l'estat de p53.

El tractament amb etopòsid redueix la viabilitat cel·lular a totes les línies cel·lulars utilitzades, encara que les cèl·lules p53-wt són molt més sensibles. D'igual manera que l'observat amb el tractament amb nutlin-3a, la mutació o deleció d'un al·lel del gen *TP53* confereix resistència al tractament. En aquest cas, la línia Jeko-1 disminueix la viabilitat en resposta a etopòsid, donat que aquest agent de dany al DNA podria estar actuant a través d'altres vies diferents de la de p53. S'ha observat que a cèl·lules sense p53 es troben nivells de ATM i ATR més elevats, els quals actuen sobre Chk1, aturant el cycle cel·lular (Tian et al. 2013). L'ús d'etopòsid a baixes dosis pot produir la mort cel·lular de manera independent de p53, a través de la via mitocondrial i depenent dels membres de la família BCL-2 (Jamil et al. 2015).

El tractament amb etopòsid produeix una augment de la proteïna p53 a les cèl·lules p53-wt. Al igual que amb el tractament amb nutlin-3a, aquesta inducció de p53 també s'observa a la línia UPN-2. L'augment i estabilització dels nivells de p53 produeix un increment en els nivells de Noxa, Puma i GADD45, el qual és un marcador de dany al DNA, indicant que la disminució en la viabilitat va acompanyada de la inducció de l'apoptosi. Aquesta activitat transcripcional no s'observa a les cèl·lules p53-del.

A l'apartat anterior, hem observat l'existència d'una relació entre els nivells de p53, FOXO3a i FOXM1 en resposta a nutlin-3a. En el cas del tractament amb etopòsid, l'augment de la proteïna p53 observat a les cèl·lules p53-wt va acompanyat d'una activació de FOXO3a, com indica la disminució en els nivells de fosforilació de FOXO3a. L'expressió de FOXM1 queda totalment indetectable, de manera que es pot relacionar a p53 i a FOXO3a com a reguladors negatius de FOXM1. El tractament amb doxorubicina, un altre agent de dany al DNA usat a la pràctica clínica, també produeix una inducció de p53 acompanyada d'una activació de FOXO3a i una inhibició de FOXM1. Per tant, l'activació de p53 per part d'agents de dany al DNA produeix una inhibició de FOXM1 a cèl·lules de LCM, d'acord amb estudis anteriors a altres models cel·lulars (Gartel 2014). Amb els dos agents de dany al DNA, es confirma que la modulació d'aquest eix és depenent de p53, de manera que en absència de p53 es perd la capacitat d'activar a FOXO3a i d'inhibir a FOXM1, el qual augmenta en el cas del tractament amb doxorubicina a la línia Jeko-1. Un comportament similar s'ha descrit a la línia MCF-7, en la que després del silenciament de p53, doxorubicina produeix un increment dels nivells de FOXM1 (Pandit et al. 2009). La línia UPN-2 és la

que presenta un resultat més contradictori, ja que mentre doxorubicina no afecta els nivells de FOXO3a ni de FOXM1, el tractament amb etopòsid activa a FOXO3a i produeix una disminució de FOXM1. Recordem que aquests efectes poden ser donats per p73, el qual podria activar a FOXO3a, que a l'hora inhibiria l'expressió de FOXM1.

Amb el tractament amb nutlin-3a, s'observa una interacció entre els nivells endògens de p53-FOXO3a i de p53-FOXM1, indicant que podrien actuar com a cofactors transcripcionals o bé que la unió suposaria una activació o inhibició d'aquests factors de transcripció. Es va comprovar com en el cas de dany al DNA, aquests factors de transcripció també interactuen, de manera que es regulen i co-activen en resposta a diferents estímuls. Així, el tractament amb etopòsid també afavoreix la interacció de la proteïna endògena p53 amb FOXO3a i amb FOXM1. Aquesta interacció pot inactivar a FOXM1 per interacció directa, fet que explicaria la inhibició de FOXM1 observada a la línia UPN-2. A més, la unió de p53 a FOXO3a pot canviar l'afinitat d'aquests factors de transcripció pel DNA, modificant així la seva activitat transcripcional (You, Yamamoto, et al.2006).

L'activació de p53 mitjançant dues estratègies diferents, nutlin-3a i agents de dany al DNA, ens ha permès determinar que els efectes d'aquests agents sobre l'activitat cel·lular i la inducció de mort per apoptosi depenen de l'estat de p53. Només les cèl·lules que presenten p53-wt tenen la capacitat d'activar a un altre supressor tumoral, FOXO3a, el qual comparteix múltiples similituds amb p53. S'ha comprovat que aquests dos factors de transcripció interaccionen a nivell endogen de manera directa, suggerint que existeix un mecanisme d'actuació conjunt. Una de les dianes sobre les quals actuen és l'oncogen FOXM1, el qual quedaria inhibit per l'acció tant de p53 com de FOXO3a. Barsotti i Prives (2009) van confirmar que p53 reprimeix directament a FOXM1. Estudis posteriors postulen a FOXM1 com a diana de FOXO3a (McGovern et al. 2009; Jiang et al. 2013). FOXM1 és un oncogen molt important, el qual activa la proliferació cel·lular i està implicat en la resistència als fàrmacs, de manera que la seva inhibició és un punt clau en la tumorigènesi i en la resposta als tractaments quimioteràpics.

CAPÍTOL 2. Efectes de la inhibició de FOXM1 a LCM

El factor de transcripció FOXM1 es troba sobre-expressat a molts tipus tumorals (Pilarsky et al. 2004), contribuint a la tumorigènesi a través de l'estimulació de la proliferació cel·lular, la migració cel·lular o l'angiogènesi (Laoukili et al. 2007). FOXM1 es troba regulat de manera negativa per molts supressors tumorals, com p19-ARF, pRB, i p53.

Recentment, s'ha descrit com els antibiòtics thioestrepton i siomicina-A inhibeixen l'activitat transcripcional i els nivells de proteïna de FOXM1 (Radhakrishnan et al. 2006; Bath et al. 2009a, Baht et al. 2009b) a través d'un *loop* d'autoregulació (Halasi i Gartel 2009).

Els efectes de thioestrepton i siomicina-A s'han estudiat a altres dolències hematològiques, com a leucèmia limfoblàstica aguda (LLA) (Buchner et al. 2014; Consolaro et al. 2015), DLBCL (Uddin et al. 2012), però a hores d'ara no hi ha estudis publicats dels seus efectes a LCM.

Els estudis realitzats fins el moment són en part contradictoris. Per una banda, Halasi i col·laboradors (2009) van descriure com el silenciament de FOXM1 a fibroblasts BJ sensibilitzava a les cèl·lules als efectes de thioestrepton, suggerint que la falta de *TP53* en estat funcional provoca que les cèl·lules siguin més sensibles als antibiòtics tiazòlics. En canvi, aquests autors afirmen que les cèl·lules que presenten *TP53*-wt són resistents a l'acció de thioestrepton, ja que p53 protegeix a les cèl·lules de la mort causada per fàrmacs. Per una altra banda, Uddin i col·laboradors (2012) van determinar que el tractament amb thioestrepton inhibeix la viabilitat cel·lular i induïx l'apoptosi de manera independent de l'estat de p53 de la cèl·lula.

Els nostres resultats coincideixen en part amb cada autor. Així, d'acord amb els resultats obtinguts per Uddin i col·laboradors, tant les línies cel·lulars com els cultius primaris de LCM disminueixen la viabilitat cel·lular en resposta a thioestrepton i es produeix una inducció de l'apoptosi independentment de l'estat de p53. Cal destacar que la línia Jeko-1 (p53-del) és la que demostra major sensibilitat a la inhibició de FOXM1 en resposta als dos antibiòtics tiazòlics, resultats que coincideixen amb els de Halasi i col·laboradors (2009). Wang i col·laboradors (2013) van utilitzar el pèptid ARF per inhibir FOXM1 a cèl·lules de limfoma tímic i sarcoma de ratolí amb el gen *TP53* deletat, arribant a la conclusió que les cèl·lules sense p53 depenen de FOXM1 per sobreviure. En el seu estudi, les cèl·lules sense p53 eren molt més sensibles a la inhibició de FOXM1 i es produïa un augment de l'apoptosi. Es a dir, la inhibició de

FOXM1 a través de diverses estratègies dona lloc al mateix resultat i de manera independent de l'estat de p53.

En correlació amb la disminució de la viabilitat cel·lular observada, a les línies cel·lulars i als cultius primaris de LCM s'indueix l'activitat caspasa en resposta a thioestrepton i siomicina-A de manera dosi dependent. Una de les principals dianes de FOXM1 és la proteïna antiapoptòtica survivina. S'ha vist com a cèl·lules de càncer d'ovari, la depleció de FOXM1 produeix una inhibició en l'expressió de survivina i una activació de l'apoptosi (Wang et al. 2013). Els nostres resultats indiquen que la inhibició de FOXM1 amb thioestrepton produeix una disminució de survivina tant a nivell de mRNA com de proteïna, de manera que s'afavoreix la inducció de l'apoptosi. El mecanisme pel qual s'indueix apoptosi en resposta a thioestrepton no està totalment definit. Són necessaris més estudis per elucidar aquest mecanisme (Uddin et al. 2012; Ahmed et al. 2015)

Thioestrepton no sols inhibeix l'activitat transcripcional de FOXM1, sinó que també redueix els nivells de mRNA i proteïna, suggerint que FOXM1 regula de manera positiva la seva transcripció (Halasi i Gartel 2009). Aquesta disminució dels nivells de mRNA de FOXM1 en resposta a thioestrepton s'observa a totes les línies cel·lulars, així com als dos cultius primaris. Igualment, els nivells dels transcrits de PLK-1 i survivina també disminueix. En aquest cas, les dianes de p53 no incrementen significativament en cap dels casos, de manera que el mecanisme d'actuació de thioestrepton sembla ser selectiu. Destaca la inducció de GADD45, indicativa de dany al DNA i arrest del creixement (Tran 2002), que es troba augmentada a totes les cèl·lules excepte a la línia Jeko-1 (p53-del). En canvi a les cèl·lules del pacient P002 sí que es produeix una inducció dels nivells de GADD45. Els nivells del mRNA de FOXO3a s'incrementen lleugerament a la majoria de casos. Recordem que FOXO3a també es autoregula en forma de *feedback-loop*, gràcies al *Forkhead Response Element* (FRE) del seu promotor. Les seves dianes p27^{Kip1} i Bnip3L es veuen infraexpressades. p27^{Kip1} també s'ha descrit com a diana de FOXM1, relacionada amb l'aturada del cicle cel·lular (Millour et al. 2011). Consolaro i col·laboradors (2015) han descrit que el silenciament de FOXM1 a cèl·lules de LLA provoca una disminució en els nivells de p27^{Kip1}. Un altre opció possibilitat seria que thioestrepton inhibeixi també l'activitat transcripcional de FOXO3a, encara que aquest mecanisme no ha estat descrit en cap estudi.

És més, als experiments de immunocitoquímica es va observar com el tractament amb thioestrepton i siomicina-A provoca la translocació de FOXO3a al nucli a les línies cel·lulars de manera independent de l'estat de p53, encara que en aquest cas la

translocació a l'interior nuclear no es correspon amb un augment de la seva activitat transcripcional.

En canvi, als cultius primaris obtenim uns altres resultats. A les cèl·lules del pacient P002, FOXO3a no es transloca a l'interior del nucli en resposta a thioestrepton, i tampoc s'observa cap augment de la seva activitat transcripcional, com es pot observar en els nivells de mRNA de FOXO3a, BNIP3L i p27^{Kip1}. En canvi, en els cultius del pacient P006 sí que s'observa una translocació de FOXO3a i un augment en els nivells dels mRNA de FOXO3a, Bnip3L i p27^{Kip1}. En aquest cas, els canvis es podrien atribuir als efectes de p53, de manera que es necessària la presència de p53-wt per activar a FOXO3a en resposta a thioestrepton, encara que la inhibició sobre FOXM1 no depèn de l'estat de p53. L'existència d'altres alteracions moleculars o d'un mecanisme de regulació encara no descrit podria explicar la diferència de comportament entre les línies cel·lulars i els cultius primaris.

La via PI3K/Akt està relacionada amb FOXM1 (Major et al. 2004) i s'ha descrit que les cèl·lules amb Akt constitutivament actiu depenen de FOXM1 per sobreviure (Park et al. 2009). Es va considerar interessant comprovar els efectes de la inhibició de FOXM1 sobre la via PI3K/AKT, partint de la hipòtesi que la inhibició d'aquesta via de proliferació cel·lular està relacionada amb la supressió de l'oncogen FOXM1, formant un mecanisme d'aturada del creixement cel·lular.

Els estudis publicats fins al moment són contradictoris. Uddin i col·laboradors (2012) han descrit que el tractament amb thioestrepton provoca la desfosforilació d'Akt a cèl·lules de DLBCL, però en canvi Kwok i col·laboradors (2008), a estudis realitzats a cèl·lules de càncer de mama, han observat que ni thioestrepton ni siomicina-A provoquen canvis en els nivells de fosforilació d'Akt o FOXO3a.

Els nostres resultats indiquen que thioestrepton produeix una inactivació d'Akt, tal com demostra la disminució dels nivells de fosforilació d'Akt a totes les línies tractades, amb la corresponent desfosforilació de FOXO3a, en correlació amb els resultats obtinguts per Uddin (2012). A més, aquest efecte és independent de p53. La disminució dels nivells i de la fosforilació de FOXO3a contradiuen els estudis realitzats per Bhat i col·laboradors (2009), que indiquen que thioestrepton i siomicina-A actuen directament sobre FOXM1, i no afecten a altres membres de la família *forkhead*.

Per altra part, es produeix una inducció de p53 i p21^{Cip1} a les cèl·lules amb p53-wt en resposta a thioestrepton, però aquest efecte no és tan evident a les cèl·lules p53-mt/del. Els nivells de p53 i FOXM1 es correlacionen de manera inversa, d'acord amb els

estudis que relacionen a p53 com a inhibidor de FOXM1 (Pandit et al. 2009; Qu et al. 2013; Gartel 2014).

Lok i col·laboradors (2011) també van postular que la falta de p53 desregula l'expressió de FOXM1, de manera que les cèl·lules amb el gen *TP53* deletat presenten una elevada expressió de FOXM1. A cèl·lules de càncer d'ovari amb p53-del, no veuen variacions de FOXM1 en resposta a thioestrepton. Un dels motius és que en aquest estudi analitzen els canvis a un temps màxim de 6 hores, quan la nostra experiència ens indica que la regulació de FOXM1 té lloc a temps llargs, a partir de 8 hores de tractament. Recordem que en el cas de nutlin-3a, la disminució de FOXM1 tenia lloc a partir de les 16 hores de tractament, indicant que FOXM1 necessita un cert temps per modular la seva expressió.

Els nostres resultats demostren que en resposta al tractament amb thioestrepton es produeix una disminució de l'expressió i de la fosforilació de FOXM1, indicant que es suprimeix la seva activitat, com s'observa amb la disminució de PLK-1 i Survivina. Aquesta inhibició no depèn de l'estat de p53, obtenint una disminució de FOXM1 tan a cèl·lules amb p53-wt com a cèl·lules p53-mt/del. Per tant, la modulació de FOXM1 no sols seria una estratègia terapèutica interessant a cèl·lules que presenten una proteïna p53 en estat funcional, sinó que també es podria aplicar a les cèl·lules amb alteracions a p53, les quals no solen respondre als tractaments quimioteràpics convencionals.

Els nostres resultats indiquen que la inhibició de FOXM1 usant thioestrepton i siomicina-A redueix la viabilitat cel·lular i indueix l'apoptosi tant a línies cel·lulars com a cultius primaris de LCM. Aquesta inhibició de FOXM1 en resposta a thioestrepton i siomicina-A té lloc de manera independent de p53. En resposta a thioestrepton s'activa el supressor tumoral FOXO3a, el qual estaria inhibint a FOXM1, afavorint la supressió de la viabilitat cel·lular i la mort cel·lular per apoptosi. La inhibició de FOXM1 per part de thioestrepton pot facilitar el seu desplaçament del promotor, facilitant la unió de FOXO3a i l'activació de l'expressió de proteïnes d'aturada de cicle i de mort cel·lular. La modulació de FOXM1 de manera independent de l'estat de p53 obri la possibilitat a noves estratègies terapèutiques basades en la inhibició d'aquest oncogen.

CAPÍTOL 3. Eficàcia de l'oxaliplatí en LCM

L'oxaliplatí forma part del règim GemOx-R, el qual ha donat uns resultats positius a pacients amb LCM, segons un estudi realitzat per Rodríguez i col·laboradors (2007). Les bones dades clíniques obtingudes amb aquest règim ens van dur a estudiar l'eficàcia dels diferents components de GemOx-R a cèl·lules de LCM (Obrador-Hevia et al. 2016), i en particular a analitzar l'efectivitat de l'oxaliplatí en comparació amb el seu anàleg cisplatí i amb citarabina, que constitueix un dels principals fàrmacs d'elecció per tractar el LCM.

La citarabina és un fàrmac que forma part de règim intensius on s'alternen combinacions amb doxorubicina, com R-HyperCVAD/R-AM (rituximab+ciclofosfamida hiperfraccionada, vincristina, doxorubicina, dexametasona+metotrexat, alta dosi de citarabina) o R-maxi-CHOP/R-HD AraC (rituximab+CHOP intens alternat amb rituximab+alta dosi de citarabina), consolidat o no amb quimioteràpia que contengui altes dosis de citarabina seguit de transplantament autòleg de cèl·lules mare (Romaguera et al. 2010; Geisler et al. 2012). Altres combinacions basades en règims que alternen doxorubicina i citarabina han donat resultats positius (Delarue et al. 2013). Uns dels principals inconvenients d'aquests règims és la seva elevada toxicitat, de manera que el seu ús en el tractament de LCM queda molt limitat a causa de l'avançada edat que solen tenir els pacients.

Al ser la citarabina un dels principals fàrmacs utilitzats per tractar els pacients amb LCM, es va comparar la seva activitat amb la de l'oxaliplatí, tant a línies cel·lulars com a cultius primaris. Els resultats indiquen que els valors de IC_{50} de l'oxaliplatí i de citarabina són similars a la línia SP-53, mentre que la línia Jeko-1 presenta una millor resposta a citarabina. Les cèl·lules primàries del pacient P006 responen clarament a citarabina i de manera moderada a oxaliplatí, a diferència de les cèl·lules del pacient P002, que són insensibles a citarabina però responen a altes dosis d'oxaliplatí. D'aquesta manera, es podria plantejar l'oxaliplatí com a teràpia alternativa a la citarabina, la qual és més tòxica i no es pot administrar als pacients de certa edat o en determinades condicions físiques.

També es va comparar l'activitat de l'oxaliplatí amb un altre compost derivat del platí, el cisplatí, el qual s'utilitza en combinació amb la citarabina com a part del règim DHAP (dexametasona, alta dosi de citarabina, cisplatí) (Delarue et al. 2013). A pesar de que són composts similars, diversos estudis assenyalen que l'oxaliplatí causa major citotoxicitat i inhibició de la síntesi del DNA en comparació amb cisplatí o carboplatí. Es

necessita menor dosi d'oxaliplatí per provocar adductes del DNA i inhibició del creixement cel·lular en comparació amb el cisplatí (Wojnarowski et al.2000). A més, l'oxaliplatí té un major espectre d'activitat que altres agents derivats del platí i és actiu tant a cèl·lules sensibles com resistents al cisplatí (Rixe et al. 1996; Raymond et al. 2002). Un altre avantatge de l'oxaliplatí és la falta de toxicitat renal en comparació amb el cisplatí, i el fet que es pot administrar a pacients amb edat avançada amb problemes renals o cardíacs (Haiouni Mondor 2005). En un estudi recent s'ha descrit un nou mecanisme d'actuació de l' oxaliplatí, relacionat amb la maquinaria de traducció. L'oxaliplatí, però no el cisplatí, provoca un estrès a la biogènesi ribosomal, la qual és important per produir la mort cel·lular. Aquest nou mecanisme ajuda a entendre la major efectivitat de l'oxaliplatí respecte al cisplatí (Bruno et al.2017). Els nostres resultats correlacionen amb els estudis realitzats fins al moment, demostrant que l'oxaliplatí produeix un major efecte sobre la viabilitat cel·lular que el cisplatí. És interessant notar que aquest efecte té lloc tan a línies cel·lulars com a cultius primaris de LCM, i a cèl·lules que presenten tan p53-wt com p53-del/mut.

L'aparent menor toxicitat de l'oxaliplatí en comparació en el cisplatí planteja la possibilitat de substituir el cisplatí inclòs en règims poliquimioteràpics, com el DHAP, per oxaliplatí. De fet, existeixen dos estudis europeus en fase II per assajar l'eficàcia i seguretat de la substitució del cisplatí per oxaliplatí en el règim DAHOx (Machover et al.2001; Rupolo et al.2004).

Per aquest motiu, ens vam plantejar realitzar estudis de sinergia entre la citarabina i aquests dos platins. Els resultats dels nostres estudis demostren un efecte sinèrgic entre la citarabina i l'oxaliplatí, però no amb el cisplatí. Cal destacar que aquesta sinèrgia s'observa tan a les línies Jeko-1 com SP-53, així com al cultiu primari del pacient P006.

Els resultats obtinguts indiquen que l'oxaliplatí es podria considerar el fàrmac d'elecció en els casos on el cisplatí no produeix efecte. A més, al presentar una menor toxicitat que la citarabina, es podria administrar a pacients d'avançada edat (Oki et al.2005). L'oxaliplatí, en monoteràpia o en combinació amb citarabina, pot constituir una opció eficaç i prometedora per tractar el LCM, pel qual, recordem, encara no s'ha establert un tractament definitiu i efectiu.

Paper de l'eix FOXO3a-FOXM1 en la resposta a oxaliplatí

L'eix FOXO3a-FOXM1 està relacionat amb la resposta als tractaments quimioteràpics (Zhao i Lam 2012). Nombrosos estudis han descrit el paper essencial de FOXO3a en la resposta a fàrmacs com paclitaxel (Sunters et al. 2003; Sunters et al. 2006), imatinib (Fernández de Mattos et al.2004; Essafi et al. 2005), doxorubicina (Hui et al. 2008), cisplatí (Fernandez de Mattos et al. 2008) o tamoxifè (Myatt i Lam 2007). FOXM1 està implicat a múltiples processos, entre ells la resistència a fàrmacs (Wang et al.2007; Myatt i Lam 2007; Francis et al. 2009; Khongkow et al. 2014). Per exemple, s'ha vist que una expressió desregulada de FOXM1 pot conferir resistència a fàrmacs quimioteràpics tals com cisplatí i epirubicina (Kwok et al.2010; Millour et al. 2011).

Tant l'activació de FOXO3a com la regulació per part de p53 provoca la inhibició de FOXM1. A cèl·lules de càncer de mama s'ha descrit que gefitinib, un inhibidor de la tirosina cinasa EGFR, inhibeix FOXM1 a través de FOXO3a (McGovern et al. 2009, 2009). Estudis realitzats a cèl·lules de càncer d'ovari (Zhou et al.2014) o de mama (Kwok et al.2010), relacionen aquesta inhibició de FOXM1 amb una millora de la resposta de les cèl·lules al cisplatí. En menor nombre, hi ha també estudis que relacionen la inhibició de FOXM1 amb la millora de la sensibilitat a oxaliplatí a cèl·lules de càncer gàstric (Hu et al.2015) i carcinoma hepatocel·lular (Qu et al. 2013).

Fins al moment, no existeix cap estudi en LCM on s'analitzi la modulació de l'eix FOXO3a-FOXM1 en resposta a oxaliplatí. Donats els resultats obtinguts en els dos primers capítols d'aquesta tesi, i un cop comprovat que l'oxaliplatí era més eficaç que el cisplatí a LCM, es va analitzar si aquests efecte diferencial dels dos platins es modulava a través de l'eix FOXO3a-FOXM1, i si depenia de l'estat de p53.

Els resultats obtinguts demostren que tan l'efecte de cisplatí com d'oxaliplatí depenen de l'estat de p53, ja que a la línia Jeko-1 no s'observen canvis en els nivells de les proteïnes estudiades. Aquest resultat van en correlació amb els obtinguts anteriorment en els assajos de viabilitat i sinèrgies, en els quals la línia Jeko-1 era més resistent als efectes d'oxaliplatí. Un efecte es similar s'ha descrit a cèl·lules de càncer colorectal (Yang et al. 2016), on s'observa una menor inhibició del creixement cel·lular a les cèl·lules que presenten p53 delecionat, fet que suggereix que els efectes d'oxaliplatí poden estar relacionats amb l'estat de p53.

En canvi, a la línia SP-53 s'observa un canvi a nivell molecular dels components de l'eix FOXO3a-FOXM1 en resposta tan a cisplatí com oxaliplatí. Es pot observar com amb els dos tractaments els nivells de p53 augmenten i s'activa FOXO3a, tal com indica la seva desfosforilació.

Els nostres experiments d'immunolocalització indiquen que la desfosforilació de FOXO3a va acompanyada de la seva translocació al nucli en el cas de la línia SP-53, però no el cas de la línia Jeko-1, de manera que l'activació de FOXO3a en resposta a cisplatí i oxaliplatí depèn de p53. Aquesta activació de FOXO3a va acompanyada d'una disminució de FOXM1, de manera que FOXO3a estaria reprimint l'expressió de FOXM1, en correlació amb els resultats obtinguts a cèl·lules de càncer de mama, on es va descriure com la localització nuclear de FOXO3a en resposta a gefitinib correlacionava amb una disminució de FOXM1 (Millour et al. 2009).

La major eficàcia de l'oxaliplatí respecte al cisplatí també s'observa a nivell molecular sobre l'eix p53-FOXO3a-FOXM1, de manera que els canvis produïts en els components d'aquets eix tenen lloc a un temps menor de tractament amb oxaliplatí.

En resposta a l'oxaliplatí, l'estabilització i activació de p53 i de FOXO3a produeix una disminució en els nivells de FOXM1 a cèl·lules p53-wt, facilitant la sensibilització de les cèl·lules al fàrmac, tal com es desprèn dels resultats obtinguts en els experiments de viabilitat. En canvi, l'oxaliplatí no produeix cap efecte sobre l'eix FOXO3a-FOXM1 a les cèl·lules p53-mt.

El cisplatí també afecta a l'eix FOXO3a-FOXM1 a través de p53, però en aquest cas la disminució en els nivells de FOXM1 no és tan evident com en el tractament amb oxaliplatí, i la desfosforilació de FOXM1 té lloc a les 48 hores, reafirmant els resultats de la major efectivitat de l'oxaliplatí respecte al cisplatí. D'igual manera que a l'observat amb oxaliplatí, a les cèl·lules p53-mt el cisplatí no provoca cap canvi sobre l'eix FOXO3a-FOXM1.

Conjuntament, els resultats obtinguts indiquen que l'oxaliplatí demostra una major eficàcia en comparació al cisplatí en el tractament de LCM, tant en monoteràpia com en combinació amb citarabina, essent un fàrmac prometedor per tractar aquest limfoma, pel qual, recordem, encara no s'ha establert cap teràpia eficaç.

A més, els efectes de l'oxaliplatí es poden explicar a través de la modulació de l'eix FOXO3a-FOXM1, el qual presenta una activitat dependent de l'estat de p53 d'acord amb els resultats obtinguts en el primer capítol d'aquesta tesi.

Discussió general

Els resultats obtinguts en la realització d'aquesta tesi ens han permès constatar que la modulació de l'eix p53-FOXO3a-FOXM1 a través de diverses estratègies constitueix una estratègia interessant pel tractament de cèl·lules de LCM.

Es poden plantejar dues situacions: a) cèl·lules que presenten p53-wt, en les quals l'estabilització i activació de p53 produirà un augment i activació de FOXO3a, que juntament amb p53 reprimirà l'expressió de FOXM1, facilitant l'aturada del cicle cel·lular, la disminució de la viabilitat i una major resposta als tractaments quimioteràpics; b) cèl·lules que presenten p53-mt/del, en les que no es produeix la modulació de FOXO3a ni de FOXM1 a través de p53, i en les que s'haurà d'actuar directament sobre FOXM1, amb inhibidors com thiostrepton i siomicina-A. En aquest darrer cas, s'induirà l'expressió de FOXO3a, el qual inhibirà a FOXM1. D'aquesta manera, es disminuiria la viabilitat cel·lular i es sensibilitzaria les cèl·lules a la quimioteràpia, tal com s'ha descrit en el segon capítol d'aquest treball.

Per altra banda, s'ha comprovat que l'oxaliplatí és un fàrmac efectiu en el tractament del LCM, ja sigui en monoteràpia com en combinació amb la citarabina, i que els seus efectes es modulen a través de l'eix FOXO3a-FOXM1 en funció de l'estat de p53.

Així, els resultats obtinguts en l'anàlisi dels diferents objectius ens indiquen la rellevància de l'eix FOXO3a-FOXM1 en la resposta a nous agents i fàrmacs en cèl·lules de LCM. suggerint que la modulació d'aquest eix podria ajudar a millorar les teràpies actuals i la resposta dels pacients d'aquest subtipus de limfoma. Seria per tant interessant considerar l'eix FOXO3a-FOXM1 a l'hora de plantejar possibles sinèrgies a avaluar en el tractament de LCM.

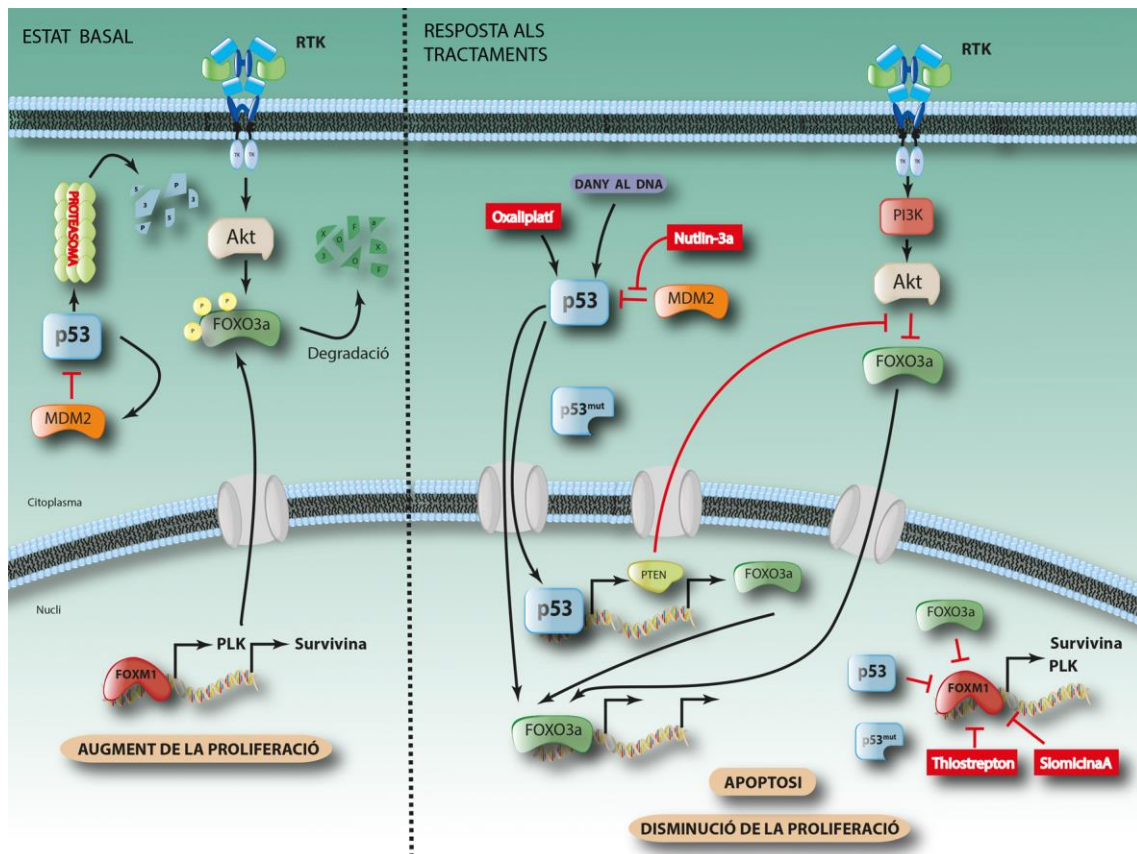


Figura 51. Model proposat de la modulació de l'eix FOXO3a-FOXM1 en LCM en resposta als distints tractaments utilitzats en aquesta tesi. A l'esquerra es representa la via de senyalització en una cèl·lula en estat basal. A la dreta es representa els canvis moleculars que es produeixen en resposta a nutlin-3a, oxaliplatí, thiostrepton i siomicina-A

CONCLUSIONS

1. Nutlin-3a induïx l'expressió de la proteïna p53 a línies cel·lulars i cultius primaris de LCM que presenten el supressor tumoral p53-wt, produint una disminució de la viabilitat cel·lular i un augment de la mort cel·lular per apoptosi. En canvi, a les cèl·lules que presenten una deleció o mutació a p53, els efectes de nutlin-3a tenen lloc a dosis molt elevades o són indetectables.
2. La inducció de p53 per nutlin-3a produeix una activació del supressor tumoral FOXO3a i una inhibició de l'expressió de l'oncogen FOXM1, fet que no s'observa a cèl·lules amb p53 mutat o deletat.
3. El tractament amb etopòsid disminueix la viabilitat cel·lular de forma dependent de l'estat de p53, essent les línies amb p53-wt molt més sensibles als efectes d'aquest agent de dany al DNA.
4. Els agents de dany al DNA etopòsid i doxorubicina activen a FOXO3a en aquelles cèl·lules que tenen la capacitat d'induir p53. L'activació de p53 i de FOXO3a correlaciona amb una inhibició de l'expressió de FOXM1.
5. L'activació de p53 a través de diferents estratègies es correlaciona amb la disminució dels nivells de FOXM1 i de les seves dianes transcripcionals.
6. En resposta a nutlin-3a i a etopòsid, s'observa una interacció física de p53 amb FOXO3a i amb FOXM1 a nivell endogen, la qual es modula en paral·lel als nivells de p53.
7. Els antibiòtics tiazòlics thiostrepton i siomicina-A redueixen la viabilitat cel·lular i induïxen l'apoptosi independentment de l'estat de p53, tant a línies cel·lulars com a cultius primaris de LCM.
8. El tractament amb thiostrepton produeix una disminució en els nivells de FOXM1 i en l'expressió de les seves dianes a línies cel·lulars de LCM de manera independent de p53.

9. El supressor tumoral FOXO3a s'activa i es transloca al nucli cel·lular en resposta a thiostrepton.
10. L'oxaliplatí mostra una major eficàcia que el cisplatí en el tractament de cèl·lules de LCM, tant en monoteràpia com en combinació amb citarabina, essent un fàrmac prometedor per tractar aquest tipus de limfoma.
11. El tractament amb oxaliplatí modula l'eix FOXO3a-FOXM1 en cèl·lules que presenten p53-wt, observant-se una activació de FOXO3a i una repressió de FOXM1 en resposta al fàrmac.
12. L'eix FOXO3a-FOXM1 té un paper important en la resposta de cèl·lules de LCM als agents i fàrmacs quimioterapèutics assajats, la qual cosa suggereix que la modulació d'aquest eix podria ajudar a millorar les teràpies actuals front aquest subtipus de limfoma.

BIBLIOGRAFIA

A

- Ahmed, Maqbool et al. 2015. «Co-targeting of Cyclooxygenase-2 and FoxM1 is a viable strategy in inducing anticancer effects in colorectal cancer cells.» *Molecular cancer* 14:131.
- Akiyama, Nobu et al. 1994. «Messenger RNA levels of five genes located at chromosome 11q13 in B-cell tumors with chromosome translocation t(11;14)(q13;q32)». *Cancer Research* 54(2):377-79.
- Alberghini, Federica, Valentina Petrocelli, Mahshid Rahmat, i Stefano Casola. 2015. «An epigenetic view of B-cell disorders». *Immunology and Cell Biology* 93(3):253-60.
- Amin, H. M. et al. 2003. «Characterization of 4 mantle cell lymphoma cell lines». *Archives of pathology & laboratory medicine* 127(4):424-431.
- Arden, Karen C. 2006. «Multiple roles of FOXO transcription factors in mammalian cells point to multiple roles in cancer». *Experimental Gerontology* 41(8):709-17.

B

- Barak, Y., T. Juven, R. Haffner, i M. Oren. 1993. «Mdm2 Expression Is Induced By Wild Type P53 Activity.» *The EMBO journal* 12(2):461-68.
- Barsotti, A. M. i C. Prives. 2009. «Pro-proliferative FoxM1 is a target of p53-mediated repression». *Oncogene* 28(48):4295-4305.
- Bartel, David P. 2009. «MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions». *Cell* 136(2):215-33.
- Benayoun, Bérénice A., Sandrine Caburet, i Reiner A. Veitia. 2011. «Forkhead transcription factors: key players in health and disease.» *Trends in genetics: TIG* 27(6):224-32.
- Berckmans, Barbara i Lieven De Veylder. 2009. «Transcriptional control of the cell cycle». *Current Opinion in Plant Biology* 12(5):599-605.

- Bertoni, Francesco, Andrea Rinaldi, Emanuele Zucca, i Franco Cavalli. 2006. «Update on the molecular biology of mantle cell lymphoma». *Hematological Oncology* 24(1):22-27.
- Bhat, Uppoor G., Marianna Halasi, i Andrei L. Gartel. 2009. «Thiazole antibiotics target FoxM1 and induce apoptosis in human cancer cells». *PLoS ONE* 4(5):1-7.
- Bhat, Uppoor G., Marianna Halasi, i Andrei L. Gartel. 2009. «FoxM1 is a general target for proteasome inhibitors». *PLoS ONE* 4(8):1-5.
- Bouchard, Caroline et al. 2007. «FoxO transcription factors suppress Myc-driven lymphomagenesis via direct activation of Arf». *Genes and Development* 21(21):2775-87.
- Bousquet, M. et al. 2005. «Assessment of somatic mutations in phosphatidylinositol 3-kinase gene in human lymphoma and acute leukaemia». *Br J Haematol* 131(3):411-13.
- Bowers, J. Michael i Genevieve Konopka. 2012. «The role of the FOXP family of transcription factors in ASD». *Disease Markers* 33(5):251-60.
- Brenner, Dirk i Tak W. Mak. 2009. «Mitochondrial cell death effectors» *Current Opinion in Cell Biology* 21(10):871-877.
- Brosh, Ran i Varda Rotter. 2009. «When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field». *Nature Reviews Cancer* 9(10):701-13.
- Brunet, Anne et al. 1999. «Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor». *Cell* 96(6):857-68.
- Brunet, Anne et al. 2002. «14-3-3 Transits To the Nucleus and Participates in Dynamic Nucleocytoplasmic Transport». *Journal of Cell Biology* 156(5):817-28.
- Bruno, Peter M. et al. 2017. «A subset of platinum-containing chemotherapeutic agents kills cells by inducing ribosome biogenesis stress». *Nature Medicine* (August 2016):1-13.
- Buchner, Maik et al. 2015. «Identification of FOXM1 as a therapeutic target in B-cell lineage acute lymphoblastic leukaemia.» *Nature communications* 6:6471.
- Bucur, Octavian et al. 2014. «PLK1 is a binding partner and a negative regulator of FOXO3 tumor suppressor». *Discoveries* 2(2):e16.

Burden, D. A. et al. 1996. «Topoisomerase II Etoposide Interactions Direct the Formation of Drug-induced Enzyme-DNA Cleavage Complexes». *Journal of Biological Chemistry* 271(46):29238-44.

Burgering, Boudewijn M. .. i Geert J. P. .. Kops. 2002. «Cell cycle and death control: long live Forkheads». *Trends in Biochemical Sciences* 27(7):352-60.

C

Caldecott, Keith W. 2008. «Single-strand break repair and genetic disease». *Nature Reviews Genetics* 9(8):619-31.

Calnan, D. R. i A. Brunet. 2008. «The FoxO code». *Oncogene* 27(16):2276-88.

Camacho, Emma et al. 2002. «ATM gene inactivation in mantle cell lymphoma mainly occurs by truncating mutations and missense mutations involving the phosphatidylinositol-3 kinase domain and is associated with increasing numbers of chromosomal imbalances». *Blood* 99(1):238-44.

Cambier, John C., Stephen B. Gauld, Kevin T. Merrell, i Barbara J. Vilen. 2007. «B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells?» *Nature Reviews Immunology* 7(8):633-43.

Campo, Elias et al. 2011. «The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: Evolving concepts and practical applications». *Blood* 117(19):5019-32.

Campo, Elias i Simon Rule. 2015. «Mantle cell lymphoma: evolving management strategies». *Blood Journal* 125(1):48-56.

Camps, Jordi et al. 2006. «Genomic imbalances and patterns of karyotypic variability in mantle-cell lymphoma cell lines». *Leukemia Research* 30(8):923-34.

Cantley, L. 2002. «The phosphoinositide 3-kinase pathway». *Science* 296(5573):1655-57.

Carding, Simon R. i Paul J. Egan. 2002. « $\gamma\delta$ T Cells: Functional Plasticity and Heterogeneity». *Nature Reviews Immunology* 2(5):336-45.

Caspari, T. et al. 2000. «How to activate p53.» *Current biology CB* 10(8):R315-7.

- Chang, F. et al. 2003. «MOLECULAR TARGETS FOR THERAPY (MTT) Involvement of PI3K / Akt pathway in cell cycle progression , apoptosis , and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy». (September 2002):590-603.
- Chen, J., V. Marechal, i a J. Levine. 1993. «Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains.» *Molecular and cellular biology* 13(7):4107-14.
- Chen, Yi Ju et al. 2009. «A conserved phosphorylation site within the forkhead domain of FoxM1B is required for its activation by cyclin-CDK1». *Journal of Biological Chemistry* 284(44):30695-707.
- Chou, Ting-chao i Paul Talalay. s.d. «Dose-Effect Relationships: the Combined Effects of Multiple».
- Chung, Young Min et al. 2012. «FOXO3 signalling links ATM to the p53 apoptotic pathway following DNA damage». *Nature Communications* 3:1000.
- Ciccia, Alberto i Stephen J. Elledge. 2011. «The DNA Damage Response : Making it safe to play with knives». 40(2):179-204.
- Coll-Mulet, Llorenç et al. 2006. «MDM2 antagonists activate p53 and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells». *Blood* 107(10):4109-14.
- Consolaro, Francesca, Giuseppe Basso, Sadaf Ghaem-Magami, Eric W. F. Lam, i Giampietro Viola. 2015. «FOXO1 is overexpressed in B-acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) and its inhibition sensitizes B-ALL cells to chemotherapeutic drugs». *International Journal of Oncology* 47(4):1230-40.
- Croce, C. M. et al. 1983. «Transcriptional activation of an unrearranged and untranslocated c-myc oncogene by translocation of a C lambda locus in Burkitt.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80(22):6922-26.

D

- Daibata, M. et al. 1989. «The establishment of Epstein-Barr virus nuclear antigen-positive (SP-50B) and Epstein-Barr virus nuclear antigen-negative (SP-53) cell lines with t(11;14)(q13;q32) chromosome abnormality from an intermediate lymphocytic lymphoma.» *Cancer* 64(6):1248-53.

- Dalla-Favera, R. et al. 1982. «Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(24):7824-27.
- Danial, Nika N. et al. 2004. «Cell death: critical control points.» *Cell* 116(2):205-19.
- Dejean, Anne S. et al. 2009. «Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells». *Nature Immunology* 10(5):504-13.
- Delarue, Richard et al. 2013. «CHOP and DHAP plus rituximab followed by autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a phase 2 study from the Groupe d' Etude des Lymphomes de l' Adulte». *Blood* 121(1):48-53.
- Delpuech, O. et al. 2007. «Induction of Mxi1-SR by FOXO3a Contributes to Repression of Myc-Dependent Gene Expression». *Molecular and Cellular Biology* 27(13):4917-30.
- Drakos, Elias et al. 2007. «Inhibition of p53-murine double minute 2 interaction by nutlin-3A stabilizes p53 and induces cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma». *Clinical Cancer Research* 13(11):3380-87
- Drakos, E. et al. 2009. «Stabilization and activation of p53 downregulates mTOR signaling through AMPK in mantle cell lymphoma». *Leukemia* 23:784-90.
- Drakos, E. et al. 2011. «Activation of the p53 pathway by the MDM2 inhibitor nutlin-3a overcomes BCL2 overexpression in a preclinical model of diffuse large B-cell lymphoma associated with t(14;18)(q32;q21).» *Leukemia* 25:856-67.
- Dreyling, M., S. Ferrero, i O. Hermine. 2014. «How to manage mantle cell lymphoma». *Leukemia* 28(11):2117-30.

E

- Eijkelenboom, Astrid i Boudewijn M. T. Burgering. 2013. «FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance.» *Nature reviews. Molecular cell biology* 14(2):83-97.
- Elastic, M., Martin Irmeler, Margot Thome, i Michael Hahne. 1997. «Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP». 388(July):553-55.

Essafi, Abdelkader et al. 2005. «Direct transcriptional regulation of Bim by FoxO3a mediates STI571-induced apoptosis in Bcr-Abl-expressing cells». *Oncogene* 24(14):2317-29.

Essaghir, Ahmed, Nicolas Dif, Catherine Y. Marbehant, Paul J. Coffey, i Jean Baptiste Demoulin. 2009. «The transcription of FOXO genes is stimulated by FOXO3 and repressed by growth factors». *Journal of Biological Chemistry* 284(16):10334-42.

Estrov, Z. et al. 1998. «Leukemia from a patient with transformed chronic lymphocytic leukemia». 22:341-53.

F

Falck, Jacob, Julia Coates, i Stephen P. Jackson. 2005. «Conserved modes of recruitment of ATM , ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage». 434(March).

Feng, Zhaohui et al. 2007. «The regulation of AMPK α 1, TSC2, and PTEN expression by p53: Stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways». *Cancer Research* 67(7):3043-53.

Fernández de Mattos, Silvia et al. 2004. «FoxO3a and BCR-ABL Regulate». *Society* 24(22):10058-71.

Fernández de Mattos, Silvia, Priam Villalonga, Jon Clardy, i Eric W. F. Lam. 2008. «FOXO3a mediates the cytotoxic effects of cisplatin in colon cancer cells.» *Molecular cancer therapeutics* 7(10):3237-46.

Foran, James M. et al. 2000. «European Phase II Study of Rituximab (Chimeric Anti-CD20 Monoclonal Antibody) for Patients With Newly Diagnosed Mantle-Cell Lymphoma and Previously Treated Mantle-Cell Lymphoma, Immunocytoma, and Small B-Cell Lymphocytic Lymphoma». *Journal of Clinical Oncology* 18(2):317.

Francis, Richard E. et al. 2009. *International journal of oncology*. University of Crete, Faculty of Medicine, Laboratory of Clinical Virology.

Fresno Vara, J. A. et al. 2004. «PI3K/Akt signalling pathway and cancer». *Cancer Treat Rev* 30(2):193-204.

- Fu, Kai et al. 2005. «Cyclin D1–negative mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study based on gene expression profiling». *Blood* 106(13):4315 LP-4321.
- Fu, Zheng et al. 2008. «Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression». *Nature Cell Biology* 10(9):1076-82.
- Fu, Wei et al. 2009. «MDM2 acts downstream of p53 as an E3 ligase to promote FOXO ubiquitination and degradation». *Journal of Biological Chemistry* 284(21):13987-0.
- Furtado, Michelle, Martin J. S. Dyer, Rod Johnson, Margie Berrow, i Simon Rule. 2014. «Ofatumumab monotherapy in relapsed/refractory mantle cell lymphoma – a phase II trial». *British Journal of Haematology* 165(4):575-78.

G

- Gartel, Andrei L. 2011. «Thiostrepton, proteasome inhibitors and FOXM1». *Cell Cycle* 10(24):4341-42.
- Gartel, Andrei L. 2014. «Suppression of the Oncogenic Transcription Factor FOXM1 by Proteasome Inhibitors». *Scientifica* 2014:1-5.
- Geisler, Christian H. et al. 2012. «Nordic MCL2 trial update: six-year follow-up after intensive immunochemotherapy for untreated mantle cell lymphoma followed by BEAM or BEAC + autologous stem-cell support: still very long survival but late relapses do occur». *British Journal of Haematology* 158(3):355-62.
- Genetics, Human, Molecular Medicine, i Tel Aviv. 2001. «ATM and ATR : networking cellular responses to DNA damage Yosef Shiloh». 71-77.
- Ghielmini, Michele i Emanuele Zucca. 2009. «How I treat mantle cell lymphoma». *Blood* 114(8):1469 LP-1476.
- Ghobrial, Irene M. et al. 2011. «Proteomic analysis of mantle-cell lymphoma by protein microarray Proteomic analysis of mantle-cell lymphoma by protein microarray». 105(9):3722-30.
- Golson, Maria L. i Klaus H. Kaestner. 2016. «Fox transcription factors : from development to disease». 4558-70

- Gomes, Ana R., Fung Zhao, i Eric W. F. Lam. 2013. «Role and regulation of the forkhead transcription factors FOXO3a and FOXM1 in carcinogenesis and drug resistance». *Chinese Journal of Cancer* 32(7):365-70.
- Graf, S. A. et al. 2015. «Maintenance rituximab after autologous stem cell transplantation in patients with mantle cell lymphoma». *Annals of Oncology* 26(11):2323-28.
- Greer, Eric L. i Anne Brunet. 2005. «FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression.» *Oncogene* 24(50):7410-25.
- Greer, Eric L. i Anne Brunet. 2009. «Different dietary restriction regimens extend lifespan by both independent and overlapping genetic pathways in *C. elegans*». *Aging Cell* 8(2):113-27.
- Greiner, By Timothy C. et al. 2016. «p53 Mutations in Mantle Cell Lymphoma Are Associated With Variant Cytology and Predict a Poor Prognosis». 87(10):4302-10.
- Greiner, Timothy C. et al. 2006. «Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(7):2352-57.
- Guasparri, Ilaria, Shannon A. Keller, i Ethel Cesarman. 2004. «KSHV vFLIP Is Essential for the Survival of Infected Lymphoma Cells». *The Journal of Experimental Medicine* 199(7):993-1003.
- Gusarova, Galina A. et al. 2007. «A cell-penetrating ARF peptide inhibitor of FoxM1 in mouse hepatocellular carcinoma treatment». *Journal of Clinical Investigation* 117(1):99-111.

H

- Haioun, C., Mondor, CH. 2005. «Oxaliplatin in lymphoma». *Haematologica reports* 1(8):106-7.
- Hajdu, Steven I. 2011. «A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1». *Cancer* 117(5):1097-1102.

- Halasi, Marianna i Andrei L. Gartel. 2013. «Targeting FOXM1 in cancer». *Biochemical Pharmacology* 85(5):644-52.
- Halldórsdóttir, a M. et al. 2011. «Impact of TP53 mutation and 17p deletion in mantle cell lymphoma». *Leukemia* 25(12):1904-8.
- Hanahan, Douglas i Robert A. Weinberg. 2000. «The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco». 100:57-70.
- Hanahan, Douglas i Robert A. Weinberg. 2011. «Hallmarks of cancer: The next generation». *Cell* 144(5):646-74.
- Hannenhalli, Sridhar i Klaus H. Kaestner. 2009. «The evolution of Fox genes and their role in development and disease». *Nat Rev Genet* 10(4):233-40.
- Harris, Sandra L. i Arnold J. Levine. 2005. «The p53 pathway: positive and negative feedback loops». *Oncogene* 24(17):2899-2908.
- Hauck, Ludger et al. 2007. «Critical role for FoxO3a-dependent regulation of p21CIP1/WAF1 in response to statin signaling in cardiac myocytes». *Circulation Research* 100(1):50-60.
- Hay, Nissim et al. 2005. «The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer.» *Cancer cell* 8(3):179-83.
- Hengartner, Michael O. 2000. «The biochemistry of apoptosis». *Nature* 407(6805):770-76.
- Herna, Â., Frederic G. Barr, Gabriel Nu, Luis Peso, i Vöâ M. Gonza. 1999. «Regulation of the forkhead transcription factor FKHR , but not the PAX3-FKHR fusion protein , by the serine / threonine kinase Akt». (August):7328-33.
- Hernández, Luis et al. 2005. « Gene Alterations Mainly Occur in Highly Proliferative and Aggressive Mantle Cell Lymphomas with Wild-type INK4a/ARF Locus». *Cancer Research* 65(6):2199 LP-2206.
- Hinman, Rochelle M. et al. 2009. «Foxo3^{-/-} mice demonstrate reduced numbers of pre-B and recirculating B cells but normal splenic B cell sub-population distribution». *International Immunology* 21(7):831-42.

- Ho, Ka Kei et al. 2012. «Phosphorylation of FOXO3a on Ser-7 by p38 promotes its nuclear localization in response to doxorubicin». *Journal of Biological Chemistry* 287(2):1545-55.
- Hoeijmakers, Jan H. J. 2001. «Genome maintenance mechanisms for preventing cancer». *Nature Reviews* 411(8) (366-74).
- van der Horst, Armando i Boudewijn M. T. Burgering. 2007. «Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease.» *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(6):440-50.
- Howard, Orion M. et al. 2002. «Rituximab and CHOP Induction Therapy for Newly Diagnosed Mantle-Cell Lymphoma: Molecular Complete Responses Are Not Predictive of Progression-Free Survival». *Journal of Clinical Oncology* 20(5):1288-94.
- Hu, Chang Jiang et al. 2015. «The FOXM1-induced resistance to oxaliplatin is partially mediated by its novel target gene Mcl-1 in gastric cancer cells». *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1849(3):290-99.
- Hu, Mickey C. T. et al. 2004. «IkkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a.» *Cell* 117(2):225-37.
- Hui, R. C. Y. et al. 2008. «Doxorubicin activates FOXO3a to induce the expression of multidrug resistance gene ABCB1 (MDR1) in K562 leukemic cells». *Molecular Cancer Therapeutics* 7(3):670-78.
- Hunter, Tony et al. 1994. «Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age». *Cell* 79(4):573-82.
- Hutter, Grit et al. 2012. «The proteasome inhibitor bortezomib targets cell cycle and apoptosis and acts synergistically in a sequence-dependent way with chemotherapeutic agents in mantle cell lymphoma». *Annals of Hematology* 91(6):847-56.

I

Igney, Frederik H. i Peter H. Krammer. 2002. «DEATH AND ANTI-DEATH: TUMOUR RESISTANCE TO APOPTOSIS». *Nature Reviews Cancer* 2(4):277-88.

J

Jackson, Stephen P. i Jiri Bartek. 2010. «Europe PMC Funders Group The DNA-damage response in human biology and disease». 461(7267):1071-78.

Jadayel, D. M. et al. 1997. «Potential role for concurrent abnormalities of the cyclin D1, p16CDKN2 and p15CDKN2B genes in certain B cell non-Hodgkin's lymphomas. Functional studies in a cell line (Granta 519)». *Leukemia* 11(1):0-64.

Jamil, Sarwat, Irene Lam, Maryam Majd, Shu-Huei Tsai, i Vincent Duronio. 2015. «Etoposide induces cell death via mitochondrial-dependent actions of p53». *Cancer Cell International* 15(1):79.

Jares, Pedro, Dolors Colomer, i Elias Campo. 2007. «Genetic and molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma: perspectives for new targeted therapeutics.» *Nature reviews. Cancer* 7(10):750-62.

Jares, Pedro, Dolors Colomer, i Elias Campo. 2012. «Review series Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma». *Jci* 122(10).

Jeggo, Penny A., Laurence H. Pearl, i Antony M. Carr. 2015. «cancer: a historical perspective». *Nature Publishing Group* 1-8.

Jeon, HO Jong, Chul Woo Kim, Tadashi Yoshino, i Tadaatsu Akagi. 1998. «Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line». *British Journal of Haematology* 102(5):1323-26.

Jiang, Ling et al. 2013. «Casticin induces ovarian cancer cell apoptosis by repressing FoxM1 through the activation of FOXO3a». *Oncology Letters* 5(5):1605-10.

Joerger, A. C. i A. R. Fersht. 2008. «Structural biology of the tumor suppressor p53». *Annual Reviews Biochemistry* 77:557-82.

K

- Kalinichenko, Vladimir V et al. 2004. «Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19 ARF tumor suppressor». *Genes & Development* 830-50.
- Karadedou, C. T. et al. 2012. «FOXO3a represses VEGF expression through FOXM1-dependent and -independent mechanisms in breast cancer». *Oncogene* 31(14):1845-58.
- Katoh, Masuko i Masaru Katoh. 2004. «Human FOX gene family (Review).» *International journal of oncology* 25(5):1495-1500.
- Khanna, Kum Kum i Stephen P. Jackson. 2001. «DNA double-strand breaks: signaling , repair and the cancer connection». 27(march):247-54.
- Khongkow, P. et al. 2013. «FOXM1 targets NBS1 to regulate DNA damage-induced senescence and epirubicin resistance.» *Oncogene* 33(32):1-12.
- Khongkow, P. et al. 2014. «FOXM1 targets NBS1 to regulate DNA damage-induced senescence and epirubicin resistance». *Oncogene* 33(32):4144-55.
- Kittappa, Raja, Wendy W. Chang, Rajeshwar B. Awatramani, i Ronald D. G. McKay. 2007. «The foxa2 gene controls the birth and spontaneous degeneration of dopamine neurons in old age». *PLoS Biology* 5(12):2875-84.
- Kojima, Kensuke et al. 2005. «MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: Implications for leukemia therapy». *Blood* 106(9):3150-59.
- Kojima, Kensuke et al. 2006. «Mdm2 inhibitor Nutlin-3a induces p53-mediated apoptosis by transcription-dependent and transcription-independent mechanisms and may overcome Atm-mediated resistance to fludarabine in chronic lymphocytic leukemia». *Blood* 108(3):993-1000.
- Koo, Chuay Yeng, Kyle W. Muir, i Eric W. F. Lam. 2012. «FOXM1: From cancer initiation to progression and treatment». *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1819(1):28-37.
- Korver, Wouter et al. 1997. «The Human TRIDENT / HFH-11 / FKHL16 Gene: Structure , Localization , and Promoter Characterization». 442(46):435-42.

Koues, Olivia I. et al. 2015. «Enhancer Sequence Variants and Transcription-Factor Deregulation Synergize to Construct Pathogenic Regulatory Circuits in B-Cell Lymphoma». *Immunity* 42(1):186-98.

Kruse, Jan-Philipp et al. 2009. «Modes of p53 regulation.» *Cell* 137(4):609-22.

Küppers, Ralf. 2005. «Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis.» *Nature reviews. Cancer* 5(4):251-62.

Kurinna, Svitlana et al. 2010. «Direct activation of forkhead box O3 by tumor suppressors p53 and p73 is disrupted during liver regeneration in mice». *Hepatology* 52(3):1023-32.

Kussie, P. H. et al. 1996. «Structure of the MDM2 Oncoprotein Bound to the p53 Tumor Suppressor Transactivation Domain». *Science* 274(5289):948-53.

Kwok, Jimmy M. et al. 2010. «FOXO1 Confers Acquired Cisplatin Resistance in Breast Cancer Cells». 1(January):24-34.

Kwok, Jimmy M. M. et al. 2008. «Thiostrepton selectively targets breast cancer cells through inhibition of forkhead box M1 expression.» *Molecular cancer therapeutics* 7(7):2022-32.

L

Lam, E. W., J. J. Brosens, A. R. Gomes, i C. Y. Koo. 2013. «Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony». *Nature Reviews: Cancer* 13(7):482-95.

Lam, E.Wf. 2006. «Frontiers | FOXO transcription factors: key regulators of cell fate». *Science* 34:722-26.

Lam, Eric W. F., Jan J. Brosens, Ana R. Gomes, i Chuay-Yeng Koo. 2013. «Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony». *Nature Reviews Cancer* 13(7):482-95.

Laoukili, Jamila, Marie Stahl, i René H. Medema. 2007. «FoxM1: At the crossroads of ageing and cancer». *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1775(1):92-102.

Lapenna, Silvia i Antonio Giordano. 2009. «Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer». *Nature Reviews Drug Discovery* 8(7):547-66.

- Lau, L. M. S., J. K. Nugent, X. Zhao, i M. S. Irwin. 2008. «HDM2 antagonist Nutlin-3 disrupts p73-HDM2 binding and enhances p73 function.» *Oncogene* 27(7):997-1003.
- Lau, N. C. 2001. «An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*». *Science* 294(5543):858-62.
- Lavin, M. F. i N. Gueven. 2006. «The complexity of p53 stabilization and activation». *Cell Death and Differentiation* 13(6):941-50.
- Lebien, Tucker W. i Thomas F. Tedder. 2008. «B lymphocytes: How they develop and function». *Blood* 112(5):1570-80.
- Levine, Arnold J. i Moshe Oren. 2009. «The first 30 years of p53: growing ever more complex». *Nature Reviews Cancer* 9(10):749-58.
- Li, M. 2003. «Mono- Versus Polyubiquitination: Differential Control of p53 Fate by Mdm2». *Science* 302(5652):1972-75.
- Li, Samuel K. M. et al. 2008. «FoxM1c counteracts oxidative stress-induced senescence and stimulates Bmi-1 expression». *Journal of Biological Chemistry* 283(24):16545-53.
- Liang, Jiyong i Joyce M. Slingerland. 2003. «Multiple Roles of the PI3K/PKB (Akt) Pathway in Cell Cycle Progression». *Cell Cycle* 2(4):336-42.
- Limon, Jose J. i David A. Fruman. 2012. «Akt and mTOR in B cell activation and differentiation». *Frontiers in Immunology* 3(AUG):1-12.
- Lin, Ling et al. 2004. «Regulation of NF-kappaB, Th activation, and autoinflammation by the forkhead transcription factor Foxo3a.» *Immunity* 21(2):203-13.
- Littler, D. R. et al. 2010. «Structure of the FoxM1 DNA-recognition domain bound to a promoter sequence». *Nucleic Acids Research* 38(13):4527-38.
- Locksley, R. M. et al. 2001. «The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology.» *Cell* 104(4):487-501.
- Logan, Ian R. et al. 2007. «Analysis of the MDM2 antagonist nutlin-3 in human prostate cancer cells». *The Prostate* 67(8):900-906.

- Lohrum, Marion A. E., Margaret Ashcroft, Michael H. G. Kubbutat, i Karen H. Vousden. 2000. «Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2». *Nat Cell Biol* 2(3):179-81.
- Lok, Gabriel T. M. et al. 2011. «Aberrant activation of ERK/FOXO1 signaling cascade triggers the cell migration/invasion in ovarian cancer cells». *PLoS ONE* 6(8).
- Lovec, Heike, Antje Grzeschiczek, Maria-bettina Kowalski, i Tarik Moroy. 1994. «Cyclin D1 / bcl-1 Cooperates with Myc Genes in the Generation of B-cell Lymphoma in Transgenic Mice». *European Molecular Biology Organization Journal* 13(15):3487-95.
- Lukas, Jiri, Claudia Lukas, i Jiri Bartek. 2004. «Mammalian cell cycle checkpoints: Signalling pathways and their organization in space and time». *DNA Repair* 3(8-9):997-1007.

M

- M'kacher, R. et al. 2003. «Multiple molecular mechanisms contribute to radiation sensitivity in mantle cell lymphoma.» *Oncogene* 22(39):7905-12.
- Major, Michael L., Rita Lepe, i Robert H. Costa. 2004. «Forkhead box M1B transcriptional activity requires binding of Cdk-cyclin complexes for phosphorylation-dependent recruitment of p300/CBP coactivators.» *Molecular and cellular biology* 24(7):2649-61.
- Malcolm, T. I. M., D. J. Hodson, E. A. Macintyre, i S. D. Turner. 2016. «Challenging perspectives on the cellular origins of lymphoma». *Open Biology* 6(9).
- Manfé, Valentina et al. 2012. «MDM2 Inhibitor Nutlin-3a Induces Apoptosis and Senescence in Cutaneous T-Cell Lymphoma: Role of p53». *Journal of Investigative Dermatology* 132(5):1487-96.
- Margaris, K. N. i R. a Black. 2012. «Modelling the lymphatic system: challenges and opportunities». *J R Soc Interface* 9(69):601-12.
- Martelli, Alberto M. et al. 2012. «Two hits are better than one: targeting both phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin as a therapeutic strategy for acute leukemia treatment ABSTRACT»: 3(4):371-94.

- Martínez, C. et al. 2000. «Patients with mantle-cell lymphoma relapsing after autologous stem cell transplantation may be rescued by allogeneic transplantation.» *Bone marrow transplantation* 26(6):677-79.
- McGovern, Ursula B. et al. 2009. «Gefitinib (Iressa) represses FOXM1 expression via FOXO3a in breast cancer.» *Molecular Cancer Therapeutics* 8(3):582-91.
- Medeiros, L. Jeffrey, Zeev Estrov, i George Z. Rassidakis. 2006. «Z-138 cell line was derived from a patient with blastoid variant mantle cell lymphoma». *Leukemia Research* 30(4):497-501.
- Medema, R. H., G. J. Kops, J. L. Bos, i B. M. Burgering. 2000. «AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1.» *Nature* 404(6779):782-87.
- Mesin, Luka, Jonatan Ersching, i Gabriel D. Victora. 2016. «Germinal Center B Cell Dynamics». *Immunity* 45(3):471-82.
- Millour, Julie et al. 2011. «ATM and p53 regulate FOXM1 expression via E2F in breast cancer epirubicin treatment and resistance.» *Molecular cancer therapeutics* 10(6):1046-58.
- Ming, Mingo et al. 2013. «Activation of AMPK inhibits cervical cancer cell growth through AKT / FOXO3a / FOXM1 signaling cascade». *BMC Cancer* 13(1):1.
- Miyaguchi, Yasuo, Keita Tsuchiya, i Kazuichi Sakamoto. 2009. «P53 negatively regulates the transcriptional activity of FOXO3a under oxidative stress». *Cell Biology International* 33(8):853-60.
- Monteiro, Lara J. et al. 2014. «Europe PMC Funders Group The Forkhead Box M1 protein regulates BRIP1 expression and DNA damage repair in epirubicin treatment». 32(39):1-26.
- Moraes, Gabriela Nestal De, Laura Bella, Stefania Zona, Matthew J. Burton, i Eric W. Lam. 2015. «Insights into a Critical Role of the FOXO3a-FOXM1 Axis in DNA Damage Response and Genotoxic Drug Resistance». 1-14.
- Morschhauser, Franck Andre et al. 2013. «Obinutuzumab (GA101) Monotherapy in Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma or Mantle-Cell Lymphoma: Results From the Phase II GAUGUIN Study». *Journal of Clinical Oncology* 31(23):2912-19.

Mozos, Ana et al. 2009. «SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype». *Haematologica* 94(11):1555-62.

Myatt, Stephen S. i Eric W. F. Lam. 2007. «The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer». *Nature Reviews Cancer* 7(11):847-59.

N

Nancy, By et al. 2015. «A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms»: 1361-92.

Navarro, Alba et al. 2012. «Molecular subsets of mantle cell lymphoma defined by the IGHV mutational status and SOX11 expression have distinct biologic and clinical features». *Cancer Research* 72(20):5307-16.

Nemoto, S. 2004. «Nutrient Availability Regulates SIRT1 Through a Forkhead-Dependent Pathway». *Science* 306(5704):2105-8.

Nowak, Katrin, Katrin Killmer, Christine Gessner, i Werner Lutz. 2007. «E2F-1 regulates expression of FOXO1 and FOXO3a». *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* 1769(4):244-52.

O

Obexer, P., K. Geiger, P. F. Ambros, B. Meister, i M. J. Ausserlechner. 2007. «FKHRL1-mediated expression of Noxa and Bim induces apoptosis via the mitochondria in neuroblastoma cells». *Cell Death and Differentiation* 14(3):534-47.

Obrador-Hevia, Antònia, Margalida Serra-Sitjar, José Rodríguez, Priam Villalonga, i Silvia Fernández de Mattos. 2012. «The tumour suppressor FOXO3 is a key regulator of mantle cell lymphoma proliferation and survival». *British Journal of Haematology* 156(3):334-45.

Obrador-Hevia, Antònia, Silvia Fernández de Mattos, Priam Villalonga, i José Rodríguez. 2009. «Molecular biology of mantle cell lymphoma: From profiling studies to new therapeutic strategies». *Blood Reviews* 23(5):205-16.

- Obrador-Hevia, Antònia et al. 2016. «Efficacy of the GemOx-R regimen leads to the identification of Oxaliplatin as a highly effective drug against Mantle Cell Lymphoma». *British Journal of Haematology* 174(6):899-910
- Obsil, T. i V. Obsilova. 2008. «Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors». *Oncogene* 27(16):2263-75.
- Oh, Hyun Mee et al. 2011. «STAT3 protein promotes T-cell survival and inhibits interleukin-2 production through up-regulation of class O forkhead transcription factors». *Journal of Biological Chemistry* 286(35):30888-97.
- Oki, Yasuhiro et al. 2005. «Phase II study of oxaliplatin in patients with recurrent or refractory non-Hodgkin lymphoma». *Cancer* 104(4):781-87.
- Olivier, M., M. Hollstein, i P. Hainaut. 2010. «TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use». *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(1):a001008.

P

- Pandit, Bulbul, Marianna Halasi, i Andrei L. Gartel. 2009. «p53 negatively regulates expression of FoxM1». *Cell Cycle* 8(20):3425-27.
- Park, H. J. et al. 2009. «FoxM1, a critical regulator of oxidative stress during oncogenesis». *Embo J* 28(19):2908-18.
- Park, M. T., Lee S. J. 2003. «Cell cycle and cancer». *J Biochem Mol Biol* 36(1):60-5
- Pérez-galán, Patricia, Martin Dreyling, Adrian Wiestner, Washington Dc, i Patricia Pe. 2011. «of treatment in the genomic era Review article Mantle cell lymphoma: biology , pathogenesis , and the molecular basis of treatment in the genomic era». *Blood* 117(1):26-38.
- Perkins, Eric J. et al. 2002. «Sensing of intermediates in V (D) J recombination by ATM». *Genes & Development* (D):159-64.
- Petre, C. E., S. H. Sin, i D. P. Dittmer. 2007. «Functional p53 Signaling in Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Lymphomas: Implications for Therapy». *Journal of Virology* 81(4):1912-22.

- Pietenpol, J. A. et al. 1994. «Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(6):1998-2002.
- Pilarsky, Christian, Michael Wenzig, Thomas Specht, Hans Detlev Saeger, i Robert Grützmann. 2004. «Identification and validation of commonly overexpressed genes in solid tumors by comparison of microarray data.» *Neoplasia (New York, N.Y.)* 6(6):744-50.
- Pinyol, Magda et al. 2007. «Inactivation of RB1 in mantle-cell lymphoma detected by nonsense-mediated mRNA decay pathway inhibition and microarray analysis». *Blood* 109(12):5422 LP-5429.
- Polak, Roel, Miranda Buitenhuis, Washington Dc, Roel Polak, i Miranda Buitenhuis. 2012. «The PI3K / PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis : implications for therapeutic strategies in leukemia The PI3K / PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis: implications for therapeutic strategies in leukemia». *Blood* 119(4):911-23.
- Polo, Sophie E. i Stephen P. Jackson. 2011. «Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications». 409-33.
- Pomerantz, J. et al. 1998. «The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53.» *Cell* 92(6):713-23.

Q

- Qu, Kai et al. 2013. «Negative regulation of transcription factor FoxM1 by p53 enhances oxaliplatin-induced senescence in hepatocellular carcinoma». *Cancer Letters* 331(1).

R

- Radhakrishnan, Senthil K. et al. 2006. «Identification of a chemical inhibitor of the oncogenic transcription factor forkhead box M1». *Cancer Research* 66(19):9731-35.

- Ramadani, Faruk et al. 2010. «The PI3K isoforms p110alpha and p110delta are essential for pre-B cell receptor signaling and B cell development.» *Science signaling* 3(134):ra60.
- Raymond, Eric, Sandrine Faivre, Stephen Chaney, Jan Woynarowski, i Esteban Cvitkovic. 2002. «Cellular and Molecular Pharmacology of Oxaliplatin1 Cellular and Molecular Pharmacology of Oxaliplatin 1». *Molecular cancer therapeutics* 1(January):227-35.
- Reagan-Shaw, Shannon i Nihal Ahmad. 2007. «The role of Forkhead-box Class O (FoxO) transcription factors in cancer: A target for the management of cancer». *Toxicology and Applied Pharmacology* 224(3):360-68.
- Renault, V. M. et al. 2011. «The pro-longevity gene FoxO3 is a direct target of the p53 tumor suppressor». *Oncogene* 30(29):3207-21.
- Rinaldi, Andrea et al. 2006. «Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma». *British Journal of Haematology* 132(3):303-16.
- Rixe, Olivier et al. 1996. «Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: Spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the national cancer institute's anticancer drug screen panel». *Biochemical Pharmacology* 52(12):1855-65.
- Rizzatti, Edgar Gil et al. 2005. «Gene expression profiling of mantle cell lymphoma cells reveals aberrant expression of genes from the PI3K-AKT, WNT and TGFbeta signalling pathways». *British Journal of Haematology* 130(4):516-26.
- Rodríguez, José et al. 2007. «Rituximab, gemcitabine and oxaliplatin: an effective regimen in patients with refractory and relapsing mantle cell lymphoma.» *Leukemia & lymphoma* 48(11):2172-78.
- Romaguera, Jorge E. et al. 2010. «Ten-year follow-up after intense chemoimmunotherapy with Rituximab-HyperCVAD alternating with Rituximab-high dose methotrexate/cytarabine (R-MA) and without stem cell transplantation in patients with untreated aggressive mantle cell lymphoma». *British Journal of Haematology* 150(2):200-208.

Rosenwald, Andreas et al. 2003. «The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma.» *Cancer cell* 3(2):185-97.

Rudelius, Martina et al. 2006. «Constitutive Activation of AKT Contributes to the Pathogenesis and Survival of Blastoid Variants of Mantle Cell Lymphoma.» *Blood* 108(5):1668-76.

Rummel, M., S. De Vos, D. Hoelzer, H. P. Koeffler, i W. K. Hofmann. 2004. «Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma». *Leukemia Lymphoma* 45(3):49-54.

S

Saha, Manujendra N., Hua Jiang, i Hong Chang. 2010. «Molecular mechanisms of nutlin-induced apoptosis in multiple myeloma: Evidence for p53-transcription-dependent and -independent pathways». *Cancer Biology and Therapy* 10(6):567-78.

Salaverria, Itziar et al. 2013. «CCND2 rearrangements are the most frequent genetic events in cyclin D1 - mantle cell lymphoma». *Blood* 121(8):1394-1402.

Sampol, a, J. Rodriguez, B. Galmés, a Gutierrez, i J. Besalduch. 2004. «Gemcitabine and oxaliplatin: an effective regimen in a patient with progressive refractory mantle cell lymphoma.» *Leukemia lymphoma* 45(6):1289-91.

Samuels, Yarden et al. s.d. «High Frequency of Mutations of the PIK3CA Gene in Human Cancers». 3.

Schmidt, Marc et al. 2002. «Cell Cycle Inhibition by FoxO Forkhead Transcription Factors Involves Downregulation of Cyclin D Cell Cycle Inhibition by FoxO Forkhead Transcription Factors Involves Downregulation of Cyclin D». 22(22):7842-52.

Schmitt, Estelle, Claudie Paquet, Myriam Beauchemin, i Richard Bertrand. 2007. «DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis». *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 8(6):377-97.

Schwartz, Martin A. i Michael Simons. 2012. «Lymphatics thrive on stress: mechanical force in lymphatic development». *The EMBO Journal* 31(4):781-82.

- Sekulic, Aleksandar et al. 2008. «Malignant Melanoma in the 21st Century: The Emerging Molecular Landscape». *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic* 83(7):825-46.
- Seoane, Joan et al. 2004. «Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation.» *Cell* 117(2):211-23.
- Sha, Kwok-ming Yao Mi et al. 1997. «Molecular Analysis of a Novel Winged Helix Protein, WIN». *Molecular Biology* 272(32):19827-36.
- Shankland, Kate R., James O. Armitage, i Barry W. Hancock. 2012. «Non-Hodgkin lymphoma». *The Lancet* 380(9844):848-57.
- Sherr, Charles J. et al. 2002. «The RB and p53 pathways in cancer». *Cancer Cell* 2(2):103-12.
- Shu, Kun Xian, Biao Li, i Li Xiang Wu. 2007. «The p53 network: p53 and its downstream genes». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 55(1):10-18.
- De Silva, Nilushi S. i Ulf Klein. 2015. «Dynamics of B cells in germinal centres». *Nature Reviews Immunology* 15(3):137-48.
- Singh, Amrik et al. 2010. «Protein Phosphatase 2A Reactivates FOXO3a through a Dynamic Interplay with 14-3-3 and AKT» editat per D. D. Newmeyer. *Molecular Biology of the Cell* 21(6):1140-52.
- Skarbnik, Alan P. i Mitchell R. Smith. 2012. «Radioimmunotherapy in mantle cell lymphoma.» *Best practice & research. Clinical haematology* 25(2):201-10.
- Song, G., G. Ouyang, i S. Bao. 2005. «The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival». *J Cell Mol Med* 9(1):59-71.
- Stahl, M. et al. 2002. «The Forkhead Transcription Factor FoxO Regulates Transcription of p27Kip1 and Bim in Response to IL-2». *The Journal of Immunology* 168(10):5024-31.
- Stevenson, Freda K. et al. 2001. «The occurrence and significance of V gene mutations in B cell—Derived human malignancy». P. 81-116 en.
- Sudhakar, a. 2010. «History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods Akulapalli». *J Cancer Sci Ther.* 1(2):1-4.

- Sulli, Gabriele, Raffaella Di Micco, i Fabrizio d'Adda di Fagagna. 2012. «Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer». *Nat Rev Cancer* 12(10):709-20.
- Sunters, Andrew et al. 2003. «FoxO3a Transcriptional Regulation of Bim Controls Apoptosis in Paclitaxel-treated Breast Cancer Cell Lines *». 278(50):49795-805.
- Sunters, Andrew et al. 2006. «Paclitaxel-induced nuclear translocation of FOXO3a in breast cancer cells is mediated by c-Jun NH2-terminal kinase and Akt». *Cancer Research* 66(1):212-20.
- Swerdlow, Steven H. et al. 2016. «THE UPDATED WHO CLASSIFICATION OF HEMATOLOGICAL MALIGNANCIES The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms». *Blood* 127(20):2375-91.

T

- Tabe, Yoko et al. 2009. «MDM2 antagonist Nutlin-3 displays antiproliferative and proapoptotic activity in mantle cell lymphoma». *Clinical Cancer Research* 15(3):933-42.
- Tagawa, Hiroyuki et al. 2005. «Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM». *Oncogene* 24(8):1348-58.
- Tian, Kun, Ramkumar Rajendran, Manjula Doddananjaiah, Marija Krstic-Demonacos, i Jean Marc Schwartz. 2013. «Dynamics of DNA Damage Induced Pathways to Cancer». *PLoS ONE* 8(9).
- Tiemann, Markus et al. 2005. «Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network». *British Journal of Haematology* 131(1):29-38.
- Toledo, Franck i Geoffrey M. Wahl. 2006. «Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas». *Nature Reviews Cancer* 6(12):909-23.
- Tothova, Zuzana et al. 2007. «FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system.» *Cell stem cell* 1(2):140-52.

Tran, H. 2002. «DNA Repair Pathway Stimulated by the Forkhead Transcription Factor FOXO3a Through the Gadd45 Protein». *Science* 296(5567):530-34.

U

Uddin, Shahab et al. 2012. «Overexpression of FoxM1 offers a promising therapeutic target in diffuse large B-cell lymphoma». *Haematologica* 97(7):1092-1100.

V

Vandenberg, CJ, N. Motoyama, i S. Cory. 2016. «FoxO3 suppresses Myc-driven lymphomagenesis». *Cell death & disease* 6(1):e2046-9.

VanderBorgh, a et al. 2006. «Effect of an hdm-2 antagonist peptide inhibitor on cell cycle progression in p53-deficient H1299 human lung carcinoma cells.» *Oncogene* 25(50):6672-77.

Vanhaesebroeck, Bart, Julie Guillermet-Guibert, Mariona Graupera, i Benoit Bilanges. 2010. «The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(5):329-41.

Vassilev, L. T. 2004. «In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2». *Science* 303(5659):844-48.

Vassilev, L. T. 2005. «p53 Activation by small molecules: application in oncology». *J Med Chem* 48(14):4491-99.

Vermeulen,K.,Van Bockstaele,D.R.,Berneman, Z. N., Katrien Vermeulen, Dirk R. Van Bockstaele, i Zwi N. Berneman. 2003. «The cell cycle:a review of regulation,deregulation and therapeutic targets in cancer». *Cell Proliferation* 36(3):131-49.

Vidal, Anxo i Andrew Koff. 2000. «Cell-cycle inhibitors: Three families united by a common cause». *Gene* 247(1-2):1-15.

Villalonga-Planells, Ruth et al. 2011. «Activation of p53 by nutlin-3a induces apoptosis and cellular senescence in human glioblastoma multiforme». *PLoS ONE* 6(4):e18588).

- Vogelstein, B., D. Lane, i A. J. Levine. 2000. «Surfing the p53 network.» *Nature* 408(6810):307-10.
- Vogelstein, Bert et al. 2013. «Cancer Genome Landscapes». *Science* 339(6127):1546-58.
- Vogelstein, Bert i Kenneth W. Kinzler. 2004. «Cancer genes and the pathways they control». *Nat Med* 10(8):789-99.
- Vowels, Jennifer J. i James H. Thomas. 1994. «Multiple Chemosensory Defects in daf-11 and daf-21 Mutants of *Caenorhabditis elegans*» *Genetics* 138 (11):303-316.

W

- Wang, Feng et al. 2008. «Biochemical and Structural Characterization of an Intramolecular Interaction in FOXO3a and Its Binding with p53». *Journal of Molecular Biology* 384(3):590-603.
- Wang, Jian Yong et al. 2015. «Inhibition of Forkhead box protein M1 by thiostrepton increases chemosensitivity to doxorubicin in T-cell acute lymphoblastic leukemia». *Molecular Medicine Reports* 12(1):1457-64.
- Wang, Zebin et al. 2013. «Targeting FoxM1 effectively retards p53-null lymphoma and sarcoma.» *Molecular cancer therapeutics* 12(5):759-67.
- Wang, Zhiwei, Sanjeev Banerjee, Dejuan Kong, Yiwei Li, i Fazlul H. Sarkar. 2007. «Down-regulation of Forkhead Box M1 transcription factor leads to the inhibition of invasion and angiogenesis of pancreatic cancer cells». *Cancer Research* 67(17):8293-8300.
- Webb, Ashley E. i Anne Brunet. 2014. «FOXO transcription factors: Key regulators of cellular quality control». *Trends in Biochemical Sciences* 39(4):159-69.
- Weigel, D. i H. Jackle. 1990. «The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors?» *Cell* 63:455-56.
- Weigel, D., G. Jurgens, F. Kuttner, E. Seifert, i H. Jackle. 1989. «The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo». *Cell* 57:645-58.

Wierstra, Inken i Jürgen Alves. 2006. «Despite its strong transactivation domain, transcription factor FOXM1c is kept almost inactive by two different inhibitory domains». *Biological Chemistry* 387(7):963-76.

Wierstra, Inken. 2013. «FOXM1 (Forkhead box M1) in tumorigenesis. Overexpression in human cancer, implication in tumorigenesis, oncogenic functions, tumor-suppressive properties, and target of anticancer therapy». *Advances in Cancer Research* 119.

Woynarowski, J. M. et al. 2000. «Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA.» *Molecular pharmacology* 58(5):920-27.

X

Xuan, Zhenyu i Michael Q. Zhang. 2005. «From worm to human: Bioinformatics approaches to identify FOXO target genes». *Mechanisms of Ageing and Development* 126(1):209-15.

Y

Yang, Chao et al. 2016. «Upregulation of CYP2S1 by oxaliplatin is associated with p53 status in colorectal cancer cell lines». *Scientific Reports* 6:33078.

Yang, Jer-Yen et al. 2008. «ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation». *Nature Cell Biology* 10(2):138-48.

You, Han et al. 2004. «p53-dependent inhibition of FKHL1 in response to DNA damage through protein kinase SGK1.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(39):14057-62.

You, Han, Marc Pellegrini, et al. 2006. «FOXO3a-dependent regulation of Puma in response to cytokine/growth factor withdrawal». *The Journal of Experimental Medicine* 203(7):1657-63.

You, Han, Kazuo Yamamoto, i Tak Wah Mak. 2006. «Regulation of transactivation-independent proapoptotic activity of p53 by FOXO3a.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(24):9051-56.

Yuan, Zhi Min et al. 1996. «Genotoxic drugs induce interaction of the c-Abl tyrosine kinase and the tumor suppressor protein p53». *Journal of Biological Chemistry* 271(43):26457-60.

Z

Zauli, Giorgio et al. 2011. «Dasatinib plus nutlin-3 shows synergistic antileukemic activity in both p53wild-type and p53mutated B chronic lymphocytic leukemias by inhibiting the Akt pathway». *Clinical Cancer Research* 17(4):762-70.

Zeng, Jiping et al. 2009. «FoxM1 is up-regulated in gastric cancer and its inhibition leads to cellular senescence, partially dependent on p 27 kip 1». *The Journal of Pathology* 218(4):419-27.

Zhang, Weiguo, Marina Konopleva, Jared K. Burks, et al. 2010. «Blockade of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase and murine double minute synergistically induces apoptosis in acute myeloid leukemia via BH3-only proteins Puma and Bim». *Cancer Research* 70(6):2424-34.

Zhang, Weiguo, Marina Konopleva, Jared K. Burks, et al. 2010. «NIH Public Access». *Cancer Res.* 70(6):2424-34.

Zhang, Xinbo, Naimei Tang, Timothy J. Hadden, i Arun K. Rishi. 2011. «Akt, FoxO and regulation of apoptosis». *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1813(11):1978-86.

Zhang, Xuan et al. 2014. «Targeting of mutant p53-induced FoxM1 with thiostrepton induces cytotoxicity and enhances carboplatin sensitivity in cancer cells.» *Oncotarget* 5(22):11365-80.

Zhang, Yujian et al. 2008. «FoxM1B transcriptionally regulates vascular endothelial growth factor expression and promotes the angiogenesis and growth of glioma cells». *Cancer Research* 68(21):8733-42.

Zhao, Fung i Eric W. F. Lam. 2012. «Role of the forkhead transcription factor FOXO-FOXM1 axis in cancer and drug resistance». *Frontiers of Medicine in China* 6(4):376-80.

Zhou, Jinhua et al. 2014. «FOXM1 modulates cisplatin sensitivity by regulating EXO1 in ovarian cancer». *PLoS ONE* 9(5).

- Zhu, Wawa, Gautam N. Bijur, Nathan A. Styles, i Xiaohua Li. 2004. «Regulation of FOXO3a by brain-derived neurotrophic factor in differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells». *Molecular Brain Research* 126(1):45-56.
- Zikherman, J. et al. 2012. «Endogenous antigen tunes the responsiveness of naive B cells but not T cells». *Nature* 489(3):160-64.
- Zona, Stefania, Laura Bella, Matthew J. Burton, Gabriela Nestal de Moraes, i Eric W. F. Lam. 2014. «FOXO1: An emerging master regulator of DNA damage response and genotoxic agent resistance». *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1839(11):1316-22.

ANNEX 1

ANNEX 1. Classificació de les neoplàsies limfàtiques madures, histiocítiques i dendrítiques, segons la WHO (2016)

Mature B-cell neoplasms

Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma

Monoclonal B-cell lymphocytosis*

B-cell prolymphocytic leukemia

Splenic marginal zone lymphoma

Hairy cell leukemia

Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable

Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma

Hairy cell leukemia-variant

Lymphoplasmacytic lymphoma

Waldenström macroglobulinemia

Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgM*

μ heavy-chain disease

γ heavy-chain disease

α heavy-chain disease

Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgG/A*

Plasma cell myeloma

Solitary plasmacytoma of bone

Extrasosseous plasmacytoma

Monoclonal immunoglobulin deposition diseases*

Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)

Nodal marginal zone lymphoma

Pediatric nodal marginal zone lymphoma

Follicular lymphoma

In situ follicular neoplasia*

Duodenal-type follicular lymphoma*

Pediatric-type follicular lymphoma*

Large B-cell lymphoma with IRF4 rearrangement

Primary cutaneous follicle center lymphoma
Mantle cell lymphoma
 In situ mantle cell neoplasia*
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS
 Germinal center B-cell type*
 Activated B-cell type*
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma
Primary DLBCL of the central nervous system (CNS)
Primary cutaneous DLBCL, leg type
EBV+ DLBCL, NOS*
*EBV+ mucocutaneous ulcer**
DLBCL associated with chronic inflammation
Lymphomatoid granulomatosis
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
Intravascular large B-cell lymphoma
ALK+ large B-cell lymphoma
Plasmablastic lymphoma
Primary effusion lymphoma
HHV8+ DLBCL, NOS
Burkitt lymphoma
*Burkitt-like lymphoma with 11q aberration**
High-grade B-cell lymphoma, with *MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* rearrangements*
High-grade B-cell lymphoma, NOS*
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and classical
Hodgkin lymphoma

Mature T and NK neoplasms

T-cell prolymphocytic leukemia
T-cell large granular lymphocytic leukemia
Chronic lymphoproliferative disorder of NK cells
Aggressive NK-cell leukemia
Systemic EBV+ T-cell lymphoma of childhood*
Hydroa vacciniforme–like lymphoproliferative disorder*
Adult T-cell leukemia/lymphoma

Extranodal NK-/T-cell lymphoma, nasal type
Enteropathy-associated T-cell lymphoma
Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma^{*}
Indolent T-cell lymphoproliferative disorder of the GI tract^{*}
Hepatosplenic T-cell lymphoma
Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma
Mycosis fungoides
Sézary syndrome
Primary cutaneous CD30⁺ T-cell lymphoproliferative disorders
 Lymphomatoid papulosis
 Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma
Primary cutaneous $\gamma\delta$ T-cell lymphoma
Primary cutaneous CD8⁺ aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma
Primary cutaneous acral CD8⁺ T-cell lymphoma^{*}
Primary cutaneous CD4⁺ small/medium T-cell lymphoproliferative disorder^{*}
Peripheral T-cell lymphoma, NOS
Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
Follicular T-cell lymphoma^{*}
Nodal peripheral T-cell lymphoma with TFH phenotype^{*}
Anaplastic large-cell lymphoma, ALK⁺
Anaplastic large-cell lymphoma, ALK⁻^{*}
Breast implant-associated anaplastic large-cell lymphoma^{*}

Hodgkin lymphoma

Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma
Classical Hodgkin lymphoma
 Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma
 Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma
 Mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma
 Lymphocyte-depleted classical Hodgkin lymphoma

Posttransplant lymphoproliferative disorders (PTLD)

Plasmacytic hyperplasia PTLD
Infectious mononucleosis PTLD

Florid follicular hyperplasia PTLD*

Polymorphic PTLD

Monomorphic PTLD (B- and T-/NK-cell types)

Classical Hodgkin lymphoma PTLD

Histiocytic and dendritic cell neoplasms

Histiocytic sarcoma

Langerhans cell histiocytosis

Langerhans cell sarcoma

Indeterminate dendritic cell tumor

Interdigitating dendritic cell sarcoma

Follicular dendritic cell sarcoma

Fibroblastic reticular cell tumor

Disseminated juvenile xanthogranuloma

Erdheim-Chester disease*

Els noms en cursiven indiquen les entrades provisionals.

Els * indiquen els canvis respecte a la classificació del 2008.

ANNEX 2

Dra. Silvia Fernández de Mattos
Grupo de biología celular del cáncer
IUNICS-UIB

Palma, 25 de febrero de 2009


El Comité Ético de Investigación Clínica de les Illes Balears, en su reunión 02/09 de día 25 de febrero de 2009, evaluó las aclaraciones del estudio N° IB 1098/08 PI, denominado **PROTOCOL D'OBTENCIO DE CEL·LULES PRIMARIES DERIVADES DE NEOPLASIES HEMATOLOGIQUES** de la investigadora principal Dra. Silvia Fernández de Mattos del grupo de biología celular del cáncer del IUNICS-UIB..

Una vez presentadas y evaluadas, este Comité acuerda emitir informe favorable.

Lo que le comunica a los efectos oportunos.

Atentamente,

ceic | comitè ètic
d'investigació
clínica
I L L E S B A L E A R S
Conselleria de Salut i Consum



Isabel Mª Borrás Rosselló
Secretaria en funciones del CEIC Illes Balears

ANNEX 3

Nombre :		Nº Historia :	
Sexo :	Edad :	Nº Laboratorio :	BM14289
Médico :		Servicio:	
Procedencia :	NO PUBLICAR WEB	Fecha :	10/03/2015
Muestra :		Otros datos :	
Nº de Biopsia :		Id Externo :	P0002
Hospital Externo:	HOSPITAL SON ESPASES	Médico Externo :	DRA. ANTONIA OBRADOR HEJIA

BIOLOGIA MOLECULAR

Prueba Externa (BM)

Resultado

Se ha llevado a cabo la secuenciación mediante NGS (miSeq) con el panel TruSightTumor (Illumina) y se han identificado las siguientes alteraciones:

Polimorfismos:

- APC: rs41115 en homocigosis.
- EGFR: rs1050171 en homocigosis.
- MET: rs2023748 en heterocigosis; rs41737 en heterocigosis.
- TP53: rs1042522 en homocigosis.

Alteraciones deletereas:

- APC: c.4366-4369delAAAG; p. K1456fs*16 (presente en el 50%)
- TP53: c.637C>T (p. R213*) Nonsense (COSM10654) (presente en el 87% de las secuencias).

Médico responsable Dr. J. A. López-Guerrero

Validado por:


Dr. José Antonio López Guerrero

Nombre :		Nº Historia :	
Sexo :	Edad :	Nº Laboratorio :	BM14290
Médico :		Servicio:	
Procedencia :	NO PUBLICAR WEB	Fecha :	10/03/2015
Muestra :		Otros datos :	
Nº de Biopsia :		Id Externo :	P0006
Hospital Externo:	HOSP. SON ESPASES	Médico Externo :	DRA. ANTONIA OBRADOR HEJIA

BIOLOGIA MOLECULAR

Prueba Externa (BM)

Resultado

Se ha llevado a cabo la secuenciación mediante NGS (MiSeq) con el panel TruSightTumor (Illumina) y se han identificado las siguientes alteraciones en la muestra remitida para estudio:

Polimorfismos:

- APC: rs41115 en heterocigosis en el 8% de las lecturas (podría ser indicativo de un CNV en algunas células)
- EGFR: rs1050171 en homocigosis.
- MET: rs2023748 en heterocigosis; rs41737 en heterocigosis
- PDGFRA: rs1873778 en homocigosis; rs2228230 en heterocigosis.
- TP53: rs1042522 en heterocigosis

Alteraciones deletéreas:

- No evidenciables.

Médico responsable Dr. J. A. López-Guerrero

Validado por:


Dr. José Antonio López Guerrero

ANNEX 4

Efficacy of the GemOx-R regimen leads to the identification of Oxaliplatin as a highly effective drug against Mantle Cell Lymphoma

Antònia Obrador-Hevia,^{1,2,3,*}
 Margalida Serra-Sitjar,^{1,3,*}
 José Rodríguez,⁴ Lamiae Belayachi,¹
 Leyre Bento,^{3,5} Marta García-Recio,⁵
 Jose María Sánchez,^{3,5} Priam
 Villalonga,^{1,2,3} Antonio Gutiérrez^{3,5} and
 Silvia Fernández de Mattos^{1,2,3}

¹Cancer Cell Biology Group, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de La Salut (IUNICS),
²Departament de Biologia Fonamental, Universitat de les Illes Balears, ³Institut de Investigació Sanitària de Palma (IdISPa), Palma, Illes Balears, ⁴MD Anderson Cancer Centre, Madrid, and ⁵Service of Hematology, Son Espases University Hospital, Palma, Illes Balears, Spain

Received 22 December 2015; accepted for publication 20 March 2016

Correspondence: Silvia Fernández de Mattos, Cancer Cell Biology Group, Edifici Científicotècnic, Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Universitat de les Illes Balears, Crta. Valldemossa km 7.5, Palma, Illes Balears 07122, Spain.

E-mail: silvia.fernandez@uib.es

Antonio Gutiérrez, Clinical Lymphoma. Haematology Service. Son Espases University Hospital. Ctra. Valldemossa 79, Palma, Illes Balears 07010, Spain.

E-mail: antoniom.gutierrez@ssib.es

*These authors contributed equally to this work.

Mantle cell lymphoma (MCL) is a distinct biological and clinical subtype of B-cell lymphoma that accounts for 6% to 8% of non-Hodgkin lymphomas (NHL). Despite its low frequency, it is one of the most challenging lymphomas to treat, with a median overall survival (OS) of 3–4 years. Mantle cell lymphoma is generally an incurable condition that tends to relapse after standard immunochemotherapy regimens, and develops resistance to further therapies (Swerdlow *et al*, 2008). These patients have therefore been considered for first-line treatment with more aggressive or experimental

Summary

Mantle Cell Lymphoma (MCL) is an aggressive lymphoma subtype that accounts for 6–8% of non-Hodgkin lymphomas. The disease is mostly incurable and characterized by a continuous pattern of relapse. Major changes have recently been implemented in the management of MCL, but continuous relapses still mark this disease as a challenge for clinicians. We previously reported the efficacy of GemOx-R (Gemcitabine, Oxaliplatin and Rituximab) in patients with refractory and relapsing MCL. We present results for a larger series with longer follow-up and including high-risk frontline patients, showing an overall response rate of 83%. The efficacy of each component of GemOx-R was evaluated in a panel of MCL cell lines. Also, patient-derived primary cells were used in *ex vivo* experiments. The results show that oxaliplatin has a profound effect on cellular viability and is the most effective drug within this regimen. We further present synergistic efficacy of oxaliplatin combined with cytarabine in MCL cells. Interestingly, this synergistic effect was not seen when cisplatin and cytarabine were combined, indicating that among the platinum-derived agents oxaliplatin may be the preferred approach. Taken together our findings suggest that oxaliplatin alone or combined with cytarabine could constitute an alternative backbone for MCL regimens.

Keywords: mantle cell lymphoma, GemOx-R, oxaliplatin, cisplatin, cytarabine.

strategies, making this disease an attractive model for novel drug development (Rodríguez *et al*, 2010).

Conventional CHOP regimens (cyclophosphamide, hydroxydaunorubicin, vincristine and prednisone) have been the standard treatment for MCL and have proved to be insufficient. The use of more intensive approaches followed by autologous stem cell transplantation may offer better long-term disease control (Romaguera *et al*, 2010) but, as MCL affects mainly elderly people, most patients are not eligible. The recent incorporation of the anti-CD20 monoclonal

antibody rituximab significantly improves response but not long-term outcome in MCL patients (Lenz *et al*, 2005). Also, the antimetabolite cytarabine has been shown to be an important drug in MCL and constitutes the backbone of several regimens that have shown improved responses (Romaguera *et al*, 2005; Delarue *et al*, 2013).

Recently, significant developments have occurred in the management of MCL, including the incorporation of new chemotherapeutic drugs, such as the alkylating agent bendamustine (Rummel *et al*, 2013), and new approaches targeting key molecular pathways of major relevance in this malignancy such as Bruton tyrosine kinase (BTK) or phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT (Obrador-Hevia *et al*, 2009; Campo & Rule, 2015). However the optimal combination of conventional and new drugs that will define a standard therapy for MCL is yet to be determined.

We have previously reported encouraging results in the salvage setting in MCL in a preliminary study with the GemOx-R regimen that combines both the activity and tolerability of gemcitabine and oxaliplatin with rituximab (Rodriguez *et al*, 2007). This study revealed a remarkable 85% overall response rate (ORR) in a small, heavily pre-treated, high-risk MCL cohort (Rodriguez *et al*, 2007).

We present here the results of an extended study of GemOx-R-treated patients, reporting an overall relapse rate (ORR) of 86%. Based on this clinical outcome, we further investigated the contribution of each drug to the efficacy of the GemOx-R regimen using MCL cell lines. Our results show that oxaliplatin is clearly the most effective drug within this regimen, measured by MCL cell viability and induction of caspase activity. Cytotoxic activity of oxaliplatin is also superior to that of cisplatin in MCL cells and, importantly, shows synergistic activity in combination with cytarabine. We conclude that oxaliplatin is an active and promising drug for MCL treatment, thus allowing the design of oxaliplatin-based regimens that could open new avenues for the treatment of MCL patients.

Materials and methods

Patient and study design

Between 2003 and 2015, 30 patients with MCL were included in a retrospective study of treatment with GemOx-R from Son Espases University Hospital (Palma, Spain). Approval was obtained from the hospital Haematology Research Review Board and all patients gave written informed consent. Patients were eligible for this study according to the following criteria: diagnosis of MCL and frontline or salvage therapy with GemOx-R. Patients with severe concomitant medical or psychiatric illnesses or who were seropositive for human immunodeficiency virus (HIV) were excluded. Other exclusion criteria included: bilirubin levels above 25-65 $\mu\text{mol/l}$, a cardiac ejection fraction less than 50% and a pulmonary function test and diffusing lung capacity less than

50% of predictive value. To avoid selection bias, patients were obtained from the pharmacy database, which ensured that all patients receiving GemOx-R regimen in this 11-year period were included. Primary and secondary endpoints were ORR and progression-free survival (PFS), respectively. Staging, response assessment and follow-up were performed following the Cheson criteria (Cheson *et al*, 1999). Cases achieving less than a partial response (stable disease) or progressive disease were considered as refractory. GemOx-R regimen consisted of gemcitabine 1000 mg/m^2 , oxaliplatin 100 mg/m^2 and rituximab 375 mg/m^2 on day 1. Treatment was given every 21 days.

Cell lines and reagents

Cell lines Jeko-1 (Jeon *et al*, 1998) and Rec-1 (Rimokh *et al*, 1994) were a gift from Dr. Beatriz Martínez (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Spain). Granta-519 (Rudolph *et al*, 2004) and JVM-2 (Melo *et al*, 1986) cells were a gift from Dr. Dolors Colomer (Hospital Clínic, Barcelona, Spain). SP-53 (Amin *et al*, 2003) cells were a gift from Dr. Eva Ortega-Paino (Lund University, Lund, Sweden). All cell lines were routinely tested for mycoplasma contamination and subjected to frequent morphological tests and growth curve analysis as quality-control assessments. Cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% foetal bovine serum in a humidified incubator of 5% CO_2 at 37°C. Gemcitabine, rituximab, oxaliplatin, cisplatin and cytarabine were kindly provided by Servei de Farmàcia, Son Espases University Hospital.

Isolation of MCL primary cells

Tumour cells from peripheral blood from MCL patients diagnosed according to the World Health Organization classification (Swerdlow *et al*, 2008) were studied. Cyclin D1 overexpression was demonstrated by immunohistochemistry. Approval was obtained from the Clinical Research Ethics Committee (CEIC-IB, Spain; reference #IB 1098/08 PI). Informed consent was obtained from each patient in accordance with the guidelines of the CEIC-IB and the Declaration of Helsinki. Peripheral blood samples were obtained from patients before treatment. Tumour cells from peripheral blood samples were isolated by density gradient centrifugation using Ficoll/Hypaque (Seromed, Berlin, Germany). Cells were cryopreserved in liquid nitrogen in the presence of 10% dimethyl sulfoxide and 20% heat-inactivated fetal calf serum. Upon reconstitution, mononuclear cells were maintained for up to 5 days in growth media at a density of $0.5\text{--}1 \times 10^6$ cells/ml, at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 .

Cell viability assay

The number of viable cells in culture was determined based on quantification of ATP, which signals the presence of

metabolically active cells, using the Cell Titer-Glo Luminiscent assay kit (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, cells (4×10^5 cells/ml) were treated with drugs for the indicated times followed by addition of Cell Titer-Glo reagent. Luminiscence was detected using a multi-well scanning spectrophotometer (Plate Chameleon; Hidex, Turku, Finland).

Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was performed using propidium iodide staining (Fernández de Mattos *et al*, 2004). Briefly, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in 90% ethanol. Fixed cells were then washed twice in PBS and stained in 50 μ mol/l propidium iodide containing 5 μ g/ml DNase-free RNase for 1 h, then analysed by flow cytometry using a FACScan (Coulter Epics XL-MSL, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) and winMDI (The Scripps Institute, La Jolla, CA, USA) software.

Apoptosis analysis

Cellular apoptosis was determined by measurement of caspase 3 and 7 activity by means of the luminometric Caspase-Glo 3/7 assay (Promega) according to the manufacturer's protocol, using a SynergyHT multidetection microplate reader (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

Western blot analysis and antibodies

Western blot whole-cell extracts were prepared by lysing cells with lysis buffer (1% Nonidet P-40, 20 mmol/l Tris-HCl pH 7.4, 100 mmol/l NaCl, 10 mmol/l NaF, 1 mmol/l Na_3VO_4 and protease inhibitors 'Complete', Roche, Basel, Switzerland) on ice for 15 min. Protein yield was quantified by Bio-Rad Dc protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). An aliquot of lysate (40 μ g) was separated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes (Immobilon-NC, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and antibodies were applied to recognize specific proteins. The following antibodies were used: phospho-Bcl2-Ser70 (#2827), Bcl-2 (#2870), MCL-1 (#4572), Bcl-xL (#2764), Caspase-3 (#9661) and PARP (#9542) from Cell Signaling (Danvers, MA, USA); α -tubulin (#T9026) from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). The antibodies were detected using horseradish peroxidase-linked secondary antibodies (Dako, Glostrup, Denmark), and visualized by the enhanced chemiluminescence (ECL) detection system.

Analysis of combined drug effects

Drug synergy was determined by the isobologram and combination-index (CI) methods, derived from the median-effect principle of Chou and Talalay (1984). Combinations with $\text{CI} > 1$ are considered as antagonistic, those with $\text{CI} = 1$ are

additive, and those with $\text{CI} < 1$ are synergistic. Data obtained from cell viability experiments were subjected to curve fitting analysis using the GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) to determine the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) values of each combination represented on the isobologram. Each isobologram shows the IC_{50} of cisplatin or oxaliplatin on the Y-axis and the IC_{50} of cytarabine on the X-axis, connected by the line of theoretical additivity.

Statistical analysis

PFS and OS were measured from the date of GemOx-R and were estimated according to the Kaplan–Meier method (Kaplan & Meier, 1958). Comparisons among those interest variables were performed by the log-rank test (Peto *et al*, 1977). Comparison between categorical variables was done using Chi-square of Fisher exact test as appropriate. In biological studies, the statistical significance of differences was assessed by Student's *t* test. Statistically significant differences are indicated by $***P < 0.001$, $**P < 0.01$ and $*P < 0.05$. IC_{50} values were calculated by non-linear regression with GraphPad Prism software.

Results

Clinical results in first line and salvage GemOx-R

A total of 30 MCL patients were included in this study between 2003 and 2015. Patients were treated as frontline ($n = 10$), and for relapsed ($n = 9$), chemosensitive ($n = 2$) or refractory ($n = 9$) disease. Drugs were administered for compassionate use. The clinical characteristics and outcome of the patients are reflected in Table I. Median age was 70 years (38–82), and most patients were included in the high risk category of the Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index (MIPI) (Hoster *et al*, 2008). The mean number of previous lines in the salvage cohort was 1.8 with 40% receiving more than 1 previous line (range: 1 to 5). Median follow-up for surviving patients was 24 months (4–147).

The ORR for the entire study group and the frontline and salvage cohorts was 83%, 80% and 83%, respectively, with no differences in CR rates (60%) ($P = 0.92$). Median PFS was 28 months in the entire series, and 66 and 22 months respectively for the frontline and salvage cohorts ($P = 0.22$). Median OS was 37 months in the entire series: not reached and 20 months respectively for the frontline and salvage cohorts ($P = 0.05$).

Effect of GemOx-R components on viability of MCL cell lines

In order to investigate the effects of GemOx-R in MCL cells, we first analysed the effect of its components on cell viability in a panel of MCL cell lines corresponding to different stages

Table I. Main characteristics and outcome of patients included in the retrospective studies.

Characteristics	Global group N (%) (n = 30)	Frontline group N (%) (n = 10)	Salvage group N (%) (n = 20)	P
Median age (range), years	70 (38–82)	71 (56–75)	68 (38–82)	0.76
Sex (male/female) (%)	24 (80%)/6 (20%)	7 (70%)/3 (30%)	17 (85%)/3 (15%)	0.37
ECOG PS > 1	3 (11%)	1 (12%)	2 (10%)	1
Ann Arbor stage III–IV	28 (93%)	10 (100%)	19 (95%)	1
B-symptoms	4 (13%)	2 (20%)	2 (10%)	0.58
>1 extranodal site	14 (48%)	7 (70%)	7 (37%)	0.13
Bulky disease	4 (15%)	0 (0%)	4 (21%)	0.28
MIPI				
Low	4 (14%)	0 (0%)	4 (22%)	0.27
Intermediate	8 (29%)	3 (30%)	4 (22%)	
High	16 (57%)	7 (70%)	10 (56%)	
Mean previous lines	–	–	1.8	–
> 1 previous lines	–	–	8 (40%)	–
Response				
ORR	25 (83%)	8 (80%)	17 (85%)	1
CR	18 (60%)	6 (60%)	12 (60%)	0.92
PR	7 (23%)	2 (20%)	5 (25%)	
Refractory	5 (17%)	2 (20%)	3 (15%)	
Survival				
Median PFS (range), months	28 (18–37)	66 (NA)	22 (7–36)	0.22
Median OS (range), months	37 (7–67)	NR	20 (11–29)	0.05

ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance score; MIPI, Mantle cell lymphoma International Prognostic Index; ORR, overall response rate; CR, complete response; PR, partial response; PFS, progression-free survival; OS, overall survival; NR, not reached; NA, not available.

of disease progression. Cell lines Jeko-1, Granta-519, SP-53, Rec-1 and JVM-2 were treated with increasing concentrations of gemcitabine, rituximab or oxaliplatin and cell viability was analysed 48 h after treatment. Gemcitabine had a moderate effect on all cell lines, because high concentrations were required to significantly affect cell viability (Fig 1A). Rituximab treatment also induced very modest effects on cell viability, as only the viability of SP-53 cells was reduced to 65% after a prolonged exposure to mid-to-high concentrations of the drug (Fig 1B). In sharp contrast, oxaliplatin elicited a robust response in MCL cells, with viability levels under 40% in most cell lines upon treatment with a concentration of 10 µmol/l (Fig 1C). At 20 µmol/l oxaliplatin had dramatic effects, with cell viability lower than 10% in three out of five cell lines tested (Fig 1C). Taken together, these results indicate that oxaliplatin is the most effective drug of the regimen and that it significantly affects MCL cell viability.

In order to assess the effects of concomitant treatment with these drugs on MCL cells, we treated Jeko-1 cells with increasing concentrations of gemcitabine or rituximab alone or in the presence of a sub-optimal (1 µmol/l) concentration of oxaliplatin. Neither the poor response of Jeko-1 cells to gemcitabine (Fig 1D) nor that of rituximab (Fig 1E) was significantly altered when 1 µmol/l oxaliplatin was added to the treatment. Conversely, we next tested the ability of gemcitabine or rituximab to improve the cellular response to oxaliplatin. Jeko-1 cells were treated with increasing concentrations of oxaliplatin in the absence or in the presence of

10 nmol/l gemcitabine (Fig 1F) or 10 µmol/l rituximab (Fig 1G). The results clearly indicated that the effect of oxaliplatin on cell viability did not benefit from concomitant treatment with gemcitabine or rituximab. These results suggest that the effects of the GemOx-R regimen on MCL cells are mainly due to oxaliplatin-induced cytotoxicity, and that oxaliplatin is the most active component of GemOx-R *in vitro* and thus deserves further characterization.

Analysis of cell cycle profile and apoptosis in response to oxaliplatin

We next investigated the cell cycle phase distribution of oxaliplatin-treated MCL cells by flow cytometry upon propidium iodide staining. Treatment of Jeko-1 and Granta-519 cells with 20 µmol/l oxaliplatin induced a clear time-dependent increase in the apoptotic sub-G1 cell population, reaching ~40% of cells in the sub-G1 fraction after 48 h of oxaliplatin treatment (Fig 2A).

In order to assess whether the observed effects of oxaliplatin on cellular viability and increased sub-G1 population were related to apoptotic caspase activity, we measured the activity of caspases 3/7 in oxaliplatin-treated Jeko-1, Rec-1 and SP-53 cells. Interestingly, oxaliplatin clearly induced caspase activation, ranging from 3- to 18-fold in Jeko-1 and SP-53 cells, respectively (Fig 2B). Importantly, when MCL cells were pre-incubated with the caspase inhibitor Q-VD-Oph non-O-methylated (Q-VD-Oph; Caserta *et al*, 2003) the

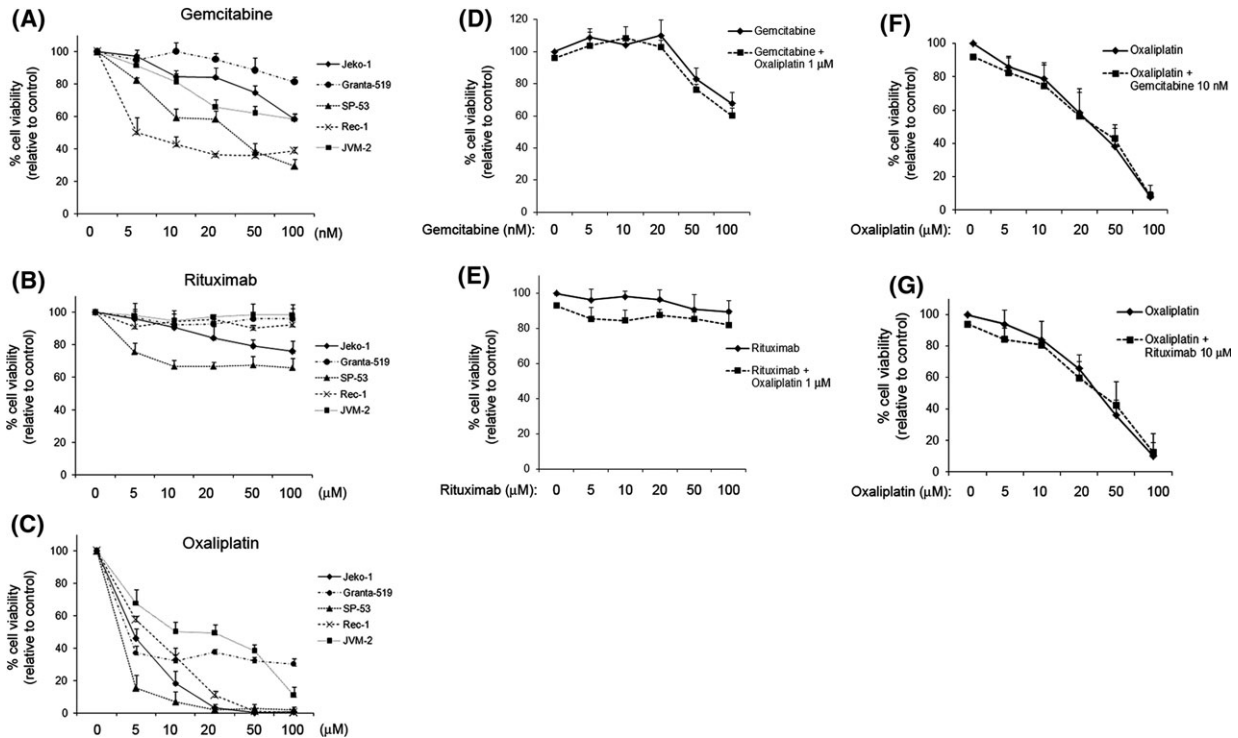


Fig 1. Cell viability analysis of MCL cells after treatment with GemOx-R components. (A, B, C) MCL cell lines were treated with the indicated concentrations of gemcitabine (A), rituximab (B) or oxaliplatin (C) and incubated for 48 h. Each graph represents the percentage of viable cells at each concentration relative to untreated conditions. (D, E) Jeko-1 cells were treated for 48 h with the indicated concentrations of gemcitabine (D) or rituximab (E) alone (solid lines) or in combination with 1 μmol/l oxaliplatin (dashed line). Cell viability was measured and represented as described above. (F, G) Jeko-1 cells were treated for 48 h with the indicated concentrations of oxaliplatin alone (solid lines) or in combination with 10 nmol/l gemcitabine (F) or 10 μmol/l rituximab (G) (dashed lines). Cell viability was measured and represented as described above. For all panels, data are means ± SEM from four independent determinations performed in duplicate.

effect of oxaliplatin on cell viability was significantly blocked (Fig 2C). These results suggest that oxaliplatin induces caspase-dependent apoptosis in MCL cells, and that caspase inhibitors can protect MCL cells from oxaliplatin-induced apoptosis.

To further investigate the effects of oxaliplatin on MCL cells, we monitored alterations on relevant pro-survival proteins and apoptotic markers following treatment of Jeko-1 cells with 20 μmol/l oxaliplatin. Interestingly, oxaliplatin led to the downregulation of the pro-survival Bcl-2-family members Bcl-2 and Mcl-1, together with the inhibition of Bcl-2 phosphorylation, while no changes were observed for Bcl-XL (Fig 2D). Accordingly, cleavage of both caspase 3 and PARP were clearly detected upon 24 h of oxaliplatin treatment (Fig 2D). These results confirm that oxaliplatin induces apoptosis in MCL cells, and implicate key regulators of the intrinsic apoptotic pathway in oxaliplatin-mediated cytotoxicity.

Effect of oxaliplatin treatment on viability of MCL primary cultures

We next sought to confirm our results in clinical samples of MCL. To this end, we performed *ex vivo* viability assays, treating primary cell cultures derived from three MCL

patients with different doses (10, 20 and 50 μmol/l) of oxaliplatin. Interestingly, cell viability analysis revealed that oxaliplatin reduced the number of viable cells in all patient-derived primary cultures, and also that the samples displayed a differential response to oxaliplatin, with viability levels ranging from 20% (Patient two) to 44% (Patient one) upon 48 h oxaliplatin treatment (Fig 3). Thus, patient-derived cells mimic the different sensitivity to oxaliplatin previously observed in our panel of cell lines. Taken together, these *in vitro* and *ex vivo* results further indicate that oxaliplatin is an effective agent for MCL treatment.

Comparison of the response of MCL cells to cytarabine, cisplatin, oxaliplatin and its combinations

We next compared the cellular response to oxaliplatin with the response to other effective and clinically established cytostatic agents routinely used for MCL patients. For this purpose, the effect on cell viability of the antimetabolite cytarabine (Ara-C) was investigated in Jeko-1, Granta-519 and SP-53 MCL cell lines. A dose-response experiment with cytarabine showed a dramatic reduction of viability for Jeko-1 and SP-53 cells, but a moderate response for Granta-519 cells (Fig 4A). This moderate response of Granta-519 cells to

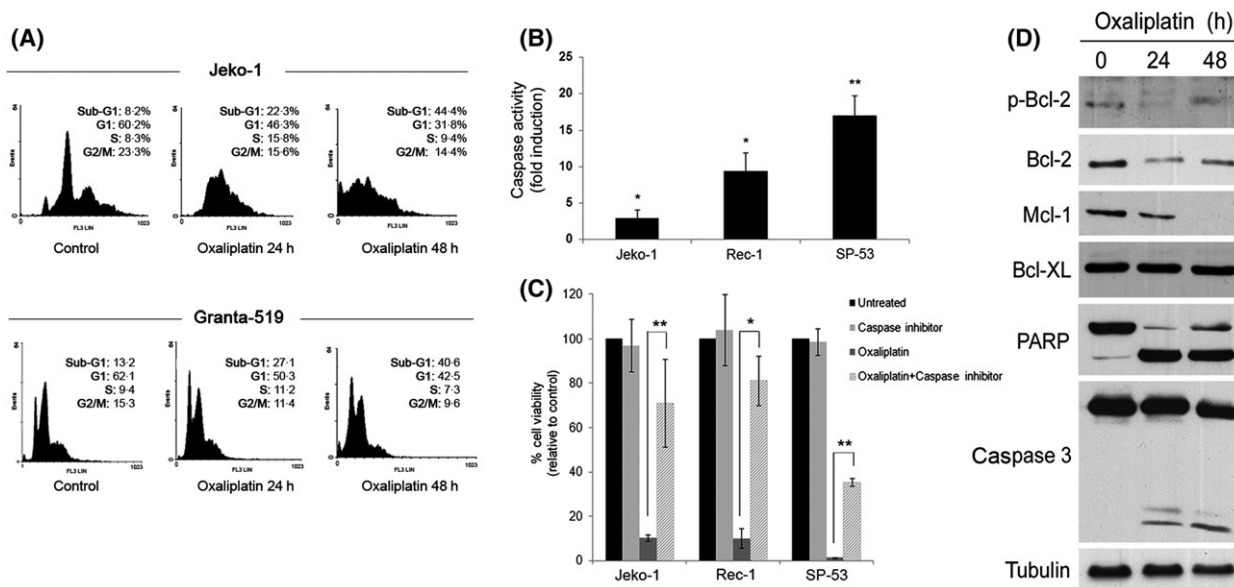


Fig 2. Cell cycle and apoptosis analysis after oxaliplatin treatment. (A) Cell cycle analysis of MCL cell lines. Jeko-1 (top) and Granta-519 (bottom) cells were treated with 20 $\mu\text{mol/l}$ oxaliplatin for the indicated times and their DNA content analysed by flow cytometry upon propidium iodide staining. Representative histograms are shown, indicating the percentage of cells in each phase of the cell cycle (sub G1, G0/G1, S, and G2/M). (B) Caspase activity determination. The indicated MCL cell lines were treated with 20 $\mu\text{mol/l}$ oxaliplatin for 24 h and caspase activity was determined using the Caspase-Glo 3/7 assay kit. Caspase activity is represented as fold induction relative to untreated cells, and data are means \pm SEM from three independent determinations performed in duplicate. The differences between caspase activity in untreated and oxaliplatin-treated cells are statistically significant (Student's *t*-test: **P* < 0.05 and ***P* < 0.01). (C) Effect of caspase inhibitor Q-VD-Oph. Cells were pre-treated with Q-VD-Oph (5 $\mu\text{mol/l}$) for 1 h, followed by the addition of 20 $\mu\text{mol/l}$ oxaliplatin for 24 h and cell viability measured and represented as the percentage relative to untreated cells. Data are means \pm SEM from three independent determinations performed in duplicate. The differences between Q-VD-Oph-pretreated cells compared with cells treated with oxaliplatin alone are statistically significant (Student's *t*-test: **P* < 0.05 and ***P* < 0.01). (D) Expression of anti-apoptotic proteins and apoptotic markers in oxaliplatin-treated cells. Whole cell lysates were prepared from Jeko-1 cells treated with 20 $\mu\text{mol/l}$ oxaliplatin for the indicated times. The expression of Bcl-2, Mcl-1, Bcl-XL, phosphorylated Bcl-2, caspase 3 and PARP was analysed by Western blotting using specific antibodies. A α -tubulin immunoblot was performed as a loading control.

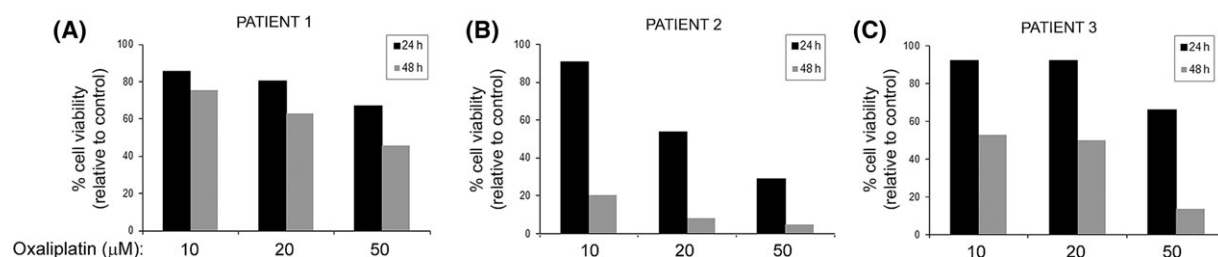


Fig 3. Cell viability assay of MCL primary cultures after treatment with oxaliplatin. Patient cells were treated with the indicated concentrations of oxaliplatin and incubated for the indicated times. Cell viability was measured and represented as a percentage relative to untreated cells.

cytarabine is in agreement with previous reports (Hutter *et al*, 2012).

We also compared oxaliplatin with other platinum-containing drugs, such as cisplatin, which has been included in some MCL regimes. Cell viability assays were performed in Jeko-1, Granta-519 and SP-53 cells treated with increasing concentrations of cisplatin. Results indicated a mixed response; SP-53 cells were sensitive to cisplatin, whereas Granta-519 cells were relatively resistant and Jeko-1 cells showed an intermediate response (Fig 4B). Whilst SP-53 cell viability was significantly reduced at low cisplatin

concentrations (0.5–2.5 $\mu\text{mol/l}$), Jeko-1 cells were affected at higher concentrations (5–20 $\mu\text{mol/l}$) and Granta-519 cell viability remained over 50% for all tested concentrations (Fig 4B).

Comparison of the IC_{50} values indicated that oxaliplatin had a lower IC_{50} than that of cisplatin for both cell lines Jeko-1 and SP-53 (Fig 4C). Interestingly, the IC_{50} value of oxaliplatin is close to that of cytarabine for SP-53 cells. As mentioned, Granta-519 cells were relatively resistant to oxaliplatin, cisplatin and cytarabine and thus the IC_{50} values in this cell line were not sufficiently reliable. Altogether, the

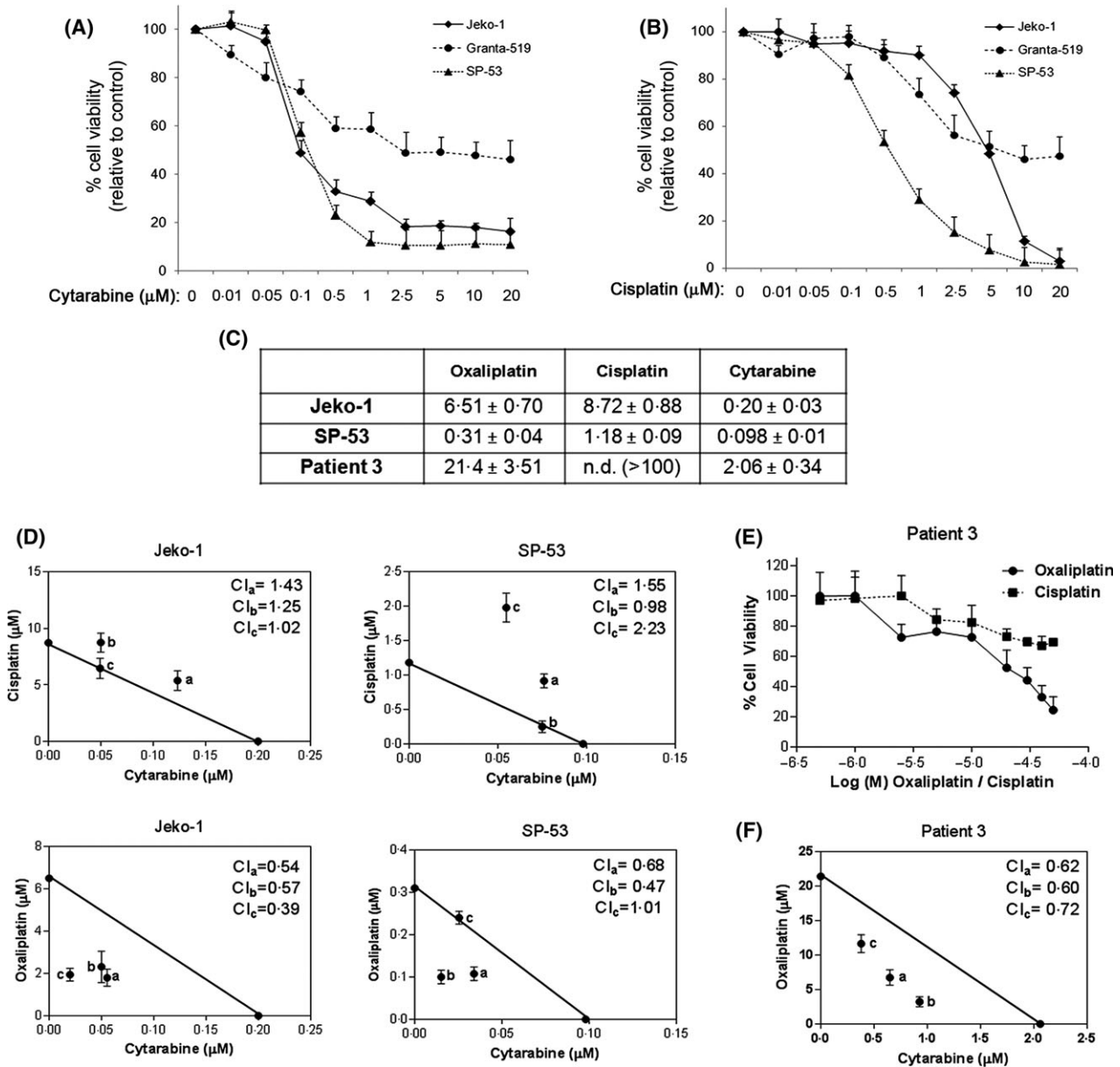


Fig 4. Effect of cytarabine and cisplatin alone or in combination with oxaliplatin in MCL cell lines. (A, B) Dose-response curves of cytarabine and cisplatin. The indicated MCL cell lines were treated with the indicated concentrations of cytarabine (A) or cisplatin (B) for 48 h. The graph represents the percentage of viable cells at each concentration relative to untreated conditions. Data are means \pm SEM from three independent determinations performed in duplicate. (C) Determination of IC_{50} values. Half-maximal inhibitory concentrations (IC_{50} in $\mu\text{mol/l}$) for oxaliplatin, cisplatin and cytarabine were determined and are shown for Jeko-1, SP-53 cells and for primary cells from Patient 3. (D) Effect of combination of oxaliplatin or cisplatin with cytarabine in MCL cells. Jeko-1 and SP-53 cells were treated with fixed dose ratio combinations (a = 1:1, b = 1:2, c = 1:3) of cytarabine and cisplatin (top) or oxaliplatin (bottom). Data shown in the isobolograms are means \pm SEM from three independent determinations performed in duplicate. The CI for each combination is indicated. (E) Dose-response curves of oxaliplatin and cisplatin in patient-derived cells. Primary cells from Patient three were treated with the indicated concentrations of oxaliplatin or cisplatin for 48 h. The graph represents the percentage of viable cells at each concentration relative to untreated conditions. Data are means \pm SEM from three independent determinations performed in duplicate. (F) Effect of combination of cytarabine and oxaliplatin in patient-derived cells. Primary cells from Patient three were treated with fixed dose ratio combinations (a = 1:1, b = 1:2, c = 1:3) of cytarabine and oxaliplatin. Data in the isobologram are means \pm SEM from three independent determinations performed in duplicate. The CI for each combination is indicated.

in vitro comparisons between oxaliplatin, cytarabine and cisplatin reveal that the efficacy of oxaliplatin falls within a similar range to that of active agents used for MCL therapy.

We finally investigated whether oxaliplatin or cisplatin could improve cell susceptibility to cytarabine. To analyse the potential of such combinations between oxaliplatin/cisplatin

and cytarabine, Jeko-1 and SP-53 cells were treated with different fixed dose ratio combinations of cytarabine and either cisplatin or oxaliplatin. Isobolographic analyses were subsequently performed and the CI determined for each combination (Fig 4D). Remarkably, results for cytarabine and oxaliplatin showed that all combinations in Jeko-1 cells were synergistic (CI < 1) whereas two combinations were synergistic and one was additive (CI~1) in SP-53 cells. In sharp contrast, cytarabine and cisplatin showed antagonism (CI > 1) for all combinations tested in Jeko-1 cells, and for two combinations in SP-53 cells.

We also wanted to confirm these results in patient-derived primary cells. To do so, IC₅₀ values were obtained for cytarabine and oxaliplatin in primary cultures from Patient three (Fig 4C). As revealed by dose-response experiments (Fig 4E), the effect of oxaliplatin in primary cells was clearly superior to that of cisplatin. This limited response to cisplatin (IC₅₀ not determined, >100 µmol/l) prevented us from performing isobolographic analyses with this drug. Synergy experiments in patient-derived cells were thus performed with cytarabine and oxaliplatin. Primary cultures were treated with fixed dose ratio combinations of both drugs, isobolographic analyses were performed and the CI determined for each combination. As shown in Fig 4F, all combinations tested demonstrated clear synergism (CI < 1) between cytarabine and oxaliplatin.

Taken together, these results suggest that the combination of cytarabine with oxaliplatin might enhance the clinical activity of both drugs in MCL. They also indicate that, between both platinum-containing drugs, oxaliplatin is clearly superior to cisplatin in the context of MCL cellular responses.

Discussion

Our previous results with GemOx-R (85% ORR with 64% CR) in heavily-pretreated, relapsed or chemoresistant MCL patients (Rodriguez *et al*, 2007) have been extended herein (83% ORR with 60% rate of CR) in a larger series with longer follow-up and including high-risk frontline treated patients. In fact, all frontline and 78% of relapsed/refractory patients had intermediate or high MIPI scores. These remarkable clinical results prompted us to investigate the efficacy of the components of the GemOx-R regimen in MCL cells.

Our data clearly indicate that oxaliplatin is the most effective drug of this regimen in terms of viability reduction in MCL cell lines with IC₅₀ values in the low micromolar range (from 0.3 to 6.5 µmol/l), in contrast to the poor effect induced by gemcitabine and rituximab. Such poor activities do not improve even when combined with sub-optimal doses of oxaliplatin. Oppositely, the robust cytotoxic effect of oxaliplatin alone does not benefit from concomitant treatment with gemcitabine or rituximab. A short exposure to oxaliplatin followed by prolonged treatment with

gemcitabine yielded synergistic effects in the acute lymphoblastic leukaemia cell line, CEM (Faivre *et al*, 1999). Our data showing lack of *in vitro* efficacy of gemcitabine and rituximab is not surprising because poor results with gemcitabine have been described both in monotherapy (ORR lower than 30%) (Savage *et al*, 2000; Dumontet *et al*, 2001) and in combination with cisplatin and dexamethasone (ORR lower than 45%) (Morschhauser *et al*, 2007). Similarly, rituximab has limited single agent activity in MCL, although the combination with active drugs may improve results (Tobinai, 2002). Our results strongly suggest that oxaliplatin is the main, if not the only, drug responsible for the positive clinical effects of the GemOx-R regimen.

Flow cytometric studies, caspase activity assays and analysis of apoptosis markers confirm that oxaliplatin induces caspase-dependent apoptosis in MCL cells. This is in accordance with the activity of oxaliplatin reported in human cancer cell lines, including colon, ovarian and lung cancer (Pendyala & Creaven, 1993; Pendyala *et al*, 1995; Rixe *et al*, 1996). Oxaliplatin also exerts potent *in vitro* cytotoxic activity against a large variety of human tumour colony-forming units (Raymond *et al*, 1998), and *in vivo* against several human tumour xenografts, including leukaemia and lymphoma (Mathe *et al*, 1989; Tashiro *et al*, 1989). Furthermore, we have confirmed the effect of oxaliplatin in an *ex vivo* setting with clinical samples of MCL. Remarkably, oxaliplatin reduces the viability of primary cells derived from three different MCL patients in a time and dose-dependent manner. Although peripheral blood tumour cells do not retain full characteristics of lymph node MCL cells, the positive response of these *ex vivo* samples mimics the results and variability already seen in our panel of cell lines, and confirms the potential of oxaliplatin treatment. To our knowledge, this is the first study demonstrating the cytotoxic activity of oxaliplatin in MCL cells.

We also investigated the activity of oxaliplatin compared with cytarabine, a key drug for the treatment of MCL patients. Cytarabine is included in intensive regimens alternating with doxorubicin-based combinations, such as R-HyperCVAD/R-AM (rituximab + hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, dexamethasone + methotrexate, cytarabine alternating with rituximab + high dose methotrexate, high dose cytarabine) or R-maxi-CHOP/R-HD AraC (rituximab + dose-intensified CHOP alternating with rituximab + high dose cytarabine), consolidated or not with cytarabine-containing high-dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation (Romaguera *et al*, 2010; Geisler *et al*, 2012). Also, conventional doses of alternating doxorubicin- and cytarabine-based regimens have been tested with similar positive outcomes and lower toxicity (Delarue *et al*, 2013). However, an important drawback of these approaches is the high toxicity rate, precluding their use in most MCL patients due to age limitations. As cytarabine is a major backbone in MCL treatment, we compared its activity with that of oxaliplatin in MCL cell lines. Our

results show that the IC₅₀ values of oxaliplatin are within a similar range to that of cytarabine in SP-53 cells. Interestingly, cytarabine elicits a similar effect to oxaliplatin but a stronger effect compared with that of gemcitabine. Cytarabine and gemcitabine are nucleoside antimetabolites of deoxycytidine and share cellular uptake pathways and intracellular phosphorylation to active metabolites. Gemcitabine inhibits ribonucleotide reductase while cytarabine does not (Mini *et al*, 2006), but despite this mechanistic advantage the effect of gemcitabine on MCL cells is clearly lower than that of cytarabine.

We also compared the activity of oxaliplatin to that of the classical platinum-based compound cisplatin, which is used with cytarabine as part of the DHAP (dexamethasone, high-dose cytarabine, cisplatin) regimen (Delarue *et al*, 2013). Despite their similarities, a number of studies have shown that oxaliplatin is associated with greater cytotoxicity and inhibition of DNA synthesis compared with both cisplatin and carboplatin. Oxaliplatin requires fewer platinum-DNA adducts than cisplatin to achieve equivalent cell growth inhibition (Woynarowski *et al*, 2000). It also appears to possess a wider spectrum of activity than other platinum agents and is active against both cisplatin-sensitive and -resistant cell lines and those cross-resistant to carboplatin (Rixe *et al*, 1996; Raymond *et al*, 2002). It has been proposed that this might be a result of the differential recognition of DNA polymerases and damage recognition proteins for oxaliplatin-DNA adducts *versus* cisplatin-DNA adducts (Chaney *et al*, 2005). In this line of evidence it has been shown that the diaminocyclohexane (DACH) carrier ligand, which is present in oxaliplatin and not in cisplatin, induces DNA lesions that are poorly recognized by the mismatch repair (MMR) pathway (Fink *et al*, 1996). Interestingly, our results in MCL cells confirm and extend the notion that oxaliplatin is superior to cisplatin. Importantly, our data also demonstrate that oxaliplatin, but not cisplatin, induces a significant synergism with cytarabine in MCL cells.

The clinical translation of these results is that oxaliplatin may achieve responses where cisplatin fails and may have a particular efficacy in MCL (Oki *et al*, 2005), thus placing oxaliplatin as a backbone drug in MCL suitable for elderly patients. We therefore hypothesize that substituting cisplatin with oxaliplatin in the DHAP regimen could yield largely improved results. Experience with a similar combination (rituximab, cytarabine, dexamethasone and oxaliplatin, R-ADOx) in 12 heavily pre-treated MCL patients showed a 75% ORR and a 33% CR rate, suggesting the need for further clinical investigation (Lamm *et al*, 2013).

There is very limited experience on the efficacy of oxaliplatin in MCL. Its activity as single agent was evaluated in a Phase II study in patients with recurrent or refractory NHL, reporting 60% of ORR with 40% CR in five patients with MCL (Lorusso, 2000; Oki *et al*, 2005). The few studies that have analysed regimens incorporating oxaliplatin show promising results, but include NHL other than MCL (Chau

et al, 2001; Corazzelli *et al*, 2006; El Gnaoui *et al*, 2007; Park *et al*, 2011). Only two reports refer specifically to regimens including oxaliplatin in MCL: our study with GemOx-R (Rodriguez *et al*, 2007), and the above-mentioned retrospective analysis of the R-ADOx regimen (Lamm *et al*, 2013), both with ORRs around 80% in a relapsed or refractory population of elderly patients not eligible for stem cell transplantation.

Oxaliplatin might also be combined in regimens with novel promising drugs recently incorporated to the MCL armamentarium. For instance, bendamustine has shown good results in combination with rituximab (Rummel *et al*, 2013) or with cytarabine and rituximab (R-BAC) in MCL patients not eligible for intensive therapy (Visco *et al*, 2013) (100% ORR, 95% CR). The combination of oxaliplatin with bendamustine, or with bendamustine and cytarabine [similar to the MD Anderson Cancer Center OFAR regimen (oxaliplatin, fludarabine, cytarabine, rituximab) (Tsimberidou *et al*, 2013) but with bendamustine] could result in high ORR in MCL patients. The synergy of the proteasome inhibitor bortezomib and cytarabine has been reported in two case reports (Weigert *et al*, 2007) and in MCL cell lines (Weigert *et al*, 2007; Hutter *et al*, 2012). Interestingly, the combination of bortezomib and a high-dose cytarabine-containing regimen has activity in heavily pre-treated patients with relapsed or refractory MCL (Weigert *et al*, 2009). Similarly, a recent study evaluating the replacement of vincristine with bortezomib in the R-CHOP regimen has shown improved outcome in patients with newly diagnosed MCL (Robak *et al*, 2015). Other drugs, such as lenalidomide, temsirolimus and, particularly, ibrutinib, may have a significant role and change the treatment paradigm of MCL in future years (Campo & Rule, 2015), and might achieve improved effects in oxaliplatin-containing regimens. On-going and future trials will be required to further optimize the use of each of these drugs within a global comprehensive approach including induction, consolidation and maintenance phases (Rodriguez *et al*, 2010).

We conclude that oxaliplatin is the most active drug within the GemOx-R regimen, and the main component responsible for the clinical effects of GemOx-R in MCL patients. Oxaliplatin has a robust *in vitro* activity comparable to that of cytarabine, the major drug for MCL treatment, and the combination of both oxaliplatin and cytarabine shows a significant synergism. On the basis of our observations, we conclude that oxaliplatin alone or in combination with cytarabine could constitute an alternative backbone for promising new regimens in MCL.

Acknowledgements

This work was supported by Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación (PI09/00058 to SfdM). A. O.-H. was recipient of a postdoctoral fellowship from Fundació Internacional Josep Carreras-Fundación Caja Madrid (FIJC-08/ESP-FCAJAMADRID). M. S.-S. was

recipient of a predoctoral fellowship from Conselleria d'Educació, Cultura i Universitats, Govern de les Illes Balears (FPI10) co-financed by Fondo Social Europeo. L.B. was a recipient of a fellowship from the Averroes Programme (European Commission). We thank the Haematology Services at Hospital Universitari Son Espases, Hospital Son Llàtzer and Hospital de Manacor (Illes Balears, Spain) for providing patient samples, and Carlos Ordinas for his invaluable help with the laboratory work.

Author contributions

SFdM, JR, PV and AG participated in the conception of the study. AO-H, MS-S and LaB performed the laboratory work,

and LeB, MG-R and JMS obtained clinical data. SFdM, PV and AG coordinated the research. SFdM, AG, PV and JR wrote the paper, with input from AO-H and LeB. SFdM, AG, PV, JR, AO-H and LeB participated in data interpretation and discussion.

Disclosure of conflicts of interest

The authors declare no potential conflict of interest.

References

- Amin, H.M., McDonnell, T.J., Medeiros, L.J., Rasidakis, G.Z., Leventaki, V., O'Connor, S.L., Keating, M.J. & Lai, R. (2003) Characterization of 4 mantle cell lymphoma cell lines. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, **127**, 424–431.
- Campo, E. & Rule, S. (2015) Mantle cell lymphoma: evolving management strategies. *Blood*, **125**, 48–55.
- Caserta, T.M., Smith, A.N., Gultice, A.D., Reedy, M.A. & Brown, T.L. (2003) Q-VD-OPH, a broad spectrum caspase inhibitor with potent anti-apoptotic properties. *Apoptosis*, **8**, 345–352.
- Chaney, S.G., Campbell, S.L., Bassett, E. & Wu, Y. (2005) Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, **53**, 3–11.
- Chau, I., Webb, A., Cunningham, D., Hill, M., Rao, S., Ageli, S., Norman, A., Gill, K., Howard, A. & Catovsky, D. (2001) An oxaliplatin-based chemotherapy in patients with relapsed or refractory intermediate and high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *British Journal of Haematology*, **115**, 786–792.
- Cheson, B.D., Horning, S.J., Coiffier, B., Shipp, M.A., Fisher, R.I., Connors, J.M., Lister, T.A., Vose, J., Grillo-Lopez, A., Hagenbeek, A., Cabanillas, F., Klippensten, D., Hiddemann, W., Castellino, R., Harris, N.L., Armitage, J.O., Carter, W., Hoppe, R. & Canellos, G.P. (1999) Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *Journal of Clinical Oncology*, **17**, 1244.
- Chou, T.C. & Talalay, P. (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation*, **22**, 27–55.
- Corazzelli, G., Russo, F., Capobianco, G., Maracci, G., Della Cioppa, P. & Pinto, A. (2006) Gemcitabine, ifosfamide, oxaliplatin and rituximab (R-GIFOX), a new effective cytoreductive/mobilizing salvage regimen for relapsed and refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma: results of a pilot study. *Annals of Oncology*, **17** (Suppl. 4), iv18–iv24.
- Delarue, R., Haioun, C., Ribrag, V., Brice, P., Delmer, A., Tilly, H., Salles, G., Van Hoof, A., Casasnovas, O., Brousse, N., Lefrere, F. & Hermine, O. (2013) CHOP and DHAP plus rituximab followed by autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a phase 2 study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*, **121**, 48–53.
- Dumontet, C., Morschhauser, F., Solal-Celigny, P., Bouafia, F., Bourgeois, E., Thieblemont, C., Leleu, X., Hequet, O., Salles, G. & Coiffier, B. (2001) Gemcitabine as a single agent in the treatment of relapsed or refractory low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *British Journal of Haematology*, **113**, 772–778.
- El Gnaoui, T., Dupuis, J., Belhadj, K., Jais, J.P., Rahmouni, A., Copie-Bergman, C., Gaillard, I., Divine, M., Tabah-Fisch, I., Reyes, F. & Haioun, C. (2007) Rituximab, gemcitabine and oxaliplatin: an effective salvage regimen for patients with relapsed or refractory B-cell lymphoma not candidates for high-dose therapy. *Annals of Oncology*, **18**, 1363–1368.
- Faivre, S., Raymond, E., Woynarowski, J.M. & Cvitkovic, E. (1999) Supraadditive effect of 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) in combination with oxaliplatin in human cancer cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, **44**, 117–123.
- Fernández de Mattos, S., Essafi, A., Soeiro, I., Pietersen, A.M., Birkenkamp, K.U., Edwards, C.S., Martino, A., Nelson, B.H., Francis, J.M., Jones, M.C., Brosens, J.J., Coffey, P.J. & Lam, E.W. (2004) FoxO3a and BCR-ABL regulate cyclin D2 transcription through a STAT5/BCL6-dependent mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, **24**, 10058–10071.
- Fink, D., Nebel, S., Aebi, S., Zheng, H., Cenni, B., Nehme, A., Christen, R.D. & Howell, S.B. (1996) The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Research*, **56**, 4881–4886.
- Geisler, C.H., Kolstad, A., Laurell, A., Jerkeman, M., Raty, R., Andersen, N.S., Pedersen, L.B., Eriksson, M., Nordstrom, M., Kimby, E., Bentzen, H., Kuittinen, O., Lauritzen, G.F., Nilsson-Ehle, H., Ralfkiaer, E., Ehinger, M., Sundstrom, C., Delabie, J., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Brown, P. & Elonen, E. (2012) Nordic MCL2 trial update: six-year follow-up after intensive immunochemotherapy for untreated mantle cell lymphoma followed by BEAM or BEAM + autologous stem-cell support: still very long survival but late relapses do occur. *British Journal of Haematology*, **158**, 355–362.
- Hoster, E., Dreyling, M., Klapper, W., Gisselbrecht, C., vanHoof, A., Kluijn-Nelemans, H.C., Pfreundschuh, M., Reiser, M., Metzner, B., Einsele, H., Peter, N., Jung, W., Wörmann, B., Ludwig, W.D., Dührsen, U., Eimermacher, H., Wandt, H., Hasford, J., Hiddemann, W. & Unterhalt, M.; German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG); European Mantle Cell Lymphoma Network. (2008) A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood*, **111**, 558–565.
- Hutter, G., Rieken, M., Pastore, A., Weigert, O., Zimmermann, Y., Weinkauff, M., Hiddemann, W. & Dreyling, M. (2012) The proteasome inhibitor bortezomib targets cell cycle and apoptosis and acts synergistically in a sequence-dependent way with chemotherapeutic agents in mantle cell lymphoma. *Annals of Hematology*, **91**, 847–856.
- Jeon, H.J., Kim, C.W., Yoshino, T. & Akagi, T. (1998) Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line. *British Journal of Haematology*, **102**, 1323–1326.
- Kaplan, E. & Meier, P. (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of American Statistical Association*, **53**, 457–481.
- Lamm, W., Drach, J., Kiesewetter, B., Zielinski, C.C., Mayerhofer, M.E., Mullauer, L. & Raderer, M. (2013) Rituximab, Ara-C, dexamethasone and oxaliplatin (R-ADOx) is effective for treatment of elderly patients with relapsed mantle cell lymphoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **139**, 1771–1775.
- Lenz, G., Dreyling, M., Hoster, E., Wörmann, B., Dührsen, U., Metzner, B., Eimermacher, H., Neubauer, A., Wandt, H., Steinhilber, H., Martin, S., Heidemann, E., Aldaoud, A., Parwaresch, R., Hasford, J., Unterhalt, M. & Hiddemann, W.

- (2005) Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Journal of Clinical Oncology*, **23**, 1984–1992.
- Lorusso, P.M. (2000) Oxaliplatin in tumors other than colorectal cancer. *Oncology (Williston Park)*, **14**, 33–37.
- Mathe, G., Kidani, Y., Segiguchi, M., Eriguchi, M., Fredj, G., Peytavin, G., Misset, J.L., Brienza, S., de Vassals, F., Chenu, E. (1989) Oxalato-platinum or 1-OHP, a third-generation platinum complex: an experimental and clinical appraisal and preliminary comparison with cis-platinum and carboplatinum. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **43**, 237–250.
- Melo, J.V., Brito-Babapulle, V., Foroni, L., Robinson, D.S., Luzzatto, L. & Catovsky, D. (1986) Two new cell lines from B-prolymphocytic leukaemia: characterization by morphology, immunological markers, karyotype and Ig gene rearrangement. *International Journal of Cancer*, **38**, 531–538.
- Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I. & Mazzei, T. (2006) Cellular pharmacology of gemcitabine. *Annals of Oncology*, **17**(Suppl. 5), v7–v12.
- Morschhauser, F., Depil, S., Jourdan, E., Wetterwald, M., Bouabdallah, R., Marit, G., Solal-Celigny, P., Sebban, C., Coiffier, B., Chouaki, N., Bauters, F. & Dumontet, C. (2007) Phase II study of gemcitabine-dexamethasone with or without cisplatin in relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Annals of Oncology*, **18**, 370–375.
- Obrador-Hevia, A., Fernández de Mattos, S., Villalonga, P. & Rodríguez, J. (2009) Molecular biology of mantle cell lymphoma: from profiling studies to new therapeutic strategies. *Blood Reviews*, **23**, 205–216.
- Oki, Y., McLaughlin, P., Pro, B., Hagemester, F.B., Bleyer, A., Loyer, E. & Younes, A. (2005) Phase II study of oxaliplatin in patients with recurrent or refractory non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*, **104**, 781–787.
- Park, B.B., Kim, W.S., Eom, H.S., Kim, J.S., Lee, Y.Y., Oh, S.J., Lee, D.H. & Suh, C. (2011) Salvage therapy with gemcitabine, ifosfamide, dexamethasone, and oxaliplatin (GIDOX) for B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a consortium for improving survival of lymphoma (CISL) trial. *Investigational New Drugs*, **29**, 154–160.
- Pendyala, L. & Creaven, P.J. (1993) In vitro cytotoxicity, protein binding, red blood cell partitioning, and biotransformation of oxaliplatin. *Cancer Research*, **53**, 5970–5976.
- Pendyala, L., Kidani, Y., Perez, R., Wilkes, J., Bernacki, R.J. & Creaven, P.J. (1995) Cytotoxicity, cellular accumulation and DNA binding of oxaliplatin isomers. *Cancer Letters*, **97**, 177–184.
- Peto, R., Pike, M.C., Armitage, P., Breslow, N.E., Cox, D.R., Howard, S.V., Mantel, N., McPheron, K., Peto, J. & Smith, P.G. (1977) Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. analysis and examples. *British Journal of Cancer*, **35**, 1–39.
- Raymond, E., Lawrence, R., Izbicka, E., Faivre, S. & Von Hoff, D.D. (1998) Activity of oxaliplatin against human tumor colony-forming units. *Clinical Cancer Research*, **4**, 1021–1029.
- Raymond, E., Faivre, S., Chaney, S., Woynarowski, J. & Cvitkovic, E. (2002) Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Molecular Cancer Therapeutics*, **1**, 227–235.
- Rimokh, R., Berger, F., Bastard, C., Klein, B., French, M., Archimbaud, E., Rouault, J.P., Santa Lucia, B., Duret, L., Vuillaume, M., Coiffier, B., Bryon, P.A. & Magaud, J.P. (1994) Rearrangement of CCND1 (BCL1/PRAD1) 3' untranslated region in mantle-cell lymphomas and t(11q13)-associated leukemias. *Blood*, **83**, 3689–3696.
- Rixe, O., Ortuzar, W., Alvarez, M., Parker, R., Reed, E., Paull, K. & Fojo, T. (1996) Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochemical Pharmacology*, **52**, 1855–1865.
- Robak, T., Huang, H., Jin, J., Zhu, J., Liu, T., Samoilova, O., Pylypenko, H., Verhoef, G., Siritanaratkul, N., Osmanov, E., Alexeeva, J., Pereira, J., Drach, J., Mayer, J., Hong, X., Okamoto, R., Pei, L., Rooney, B., van de Velde, H., Cavalli, F. & LYM-3002 Investigators (2015) Bortezomib-based therapy for newly diagnosed mantle-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*, **372**, 944–953.
- Rodríguez, J., Gutierrez, A., Palacios, A., Navarrete, M., Blancas, I., Alarcon, J., Caballero, M.D., De Mattos, S.F., Gines, J., Martinez, J. & Lopez, A. (2007) Rituximab, gemcitabine and oxaliplatin: an effective regimen in patients with refractory and relapsing mantle cell lymphoma. *Leukaemia & Lymphoma*, **48**, 2172–2178.
- Rodríguez, J., Gutierrez, A., Obrador-Hevia, A., Fernández de Mattos, S. & Cabanillas, F. (2010) Therapeutic concepts in mantle cell lymphoma. *European Journal of Haematology*, **85**, 371–386.
- Romaguera, J.E., Fayad, L., Rodríguez, M.A., Broglio, K.R., Hagemester, F.B., Pro, B., McLaughlin, P., Younes, A., Samaniego, F., Goy, A., Sarris, A.H., Dang, N.H., Wang, M., Beasley, V., Medeiros, L.J., Katz, R.L., Gagneja, H., Samuels, B.I., Smith, T.L. & Cabanillas, F.F. (2005) High rate of durable remissions after treatment of newly diagnosed aggressive mantle-cell lymphoma with rituximab plus hyper-CVAD alternating with rituximab plus high-dose methotrexate and cytarabine. *Journal of Clinical Oncology*, **23**, 7013–7023.
- Romaguera, J.E., Fayad, L.E., Feng, L., Hartig, K., Weaver, P., Rodríguez, M.A., Hagemester, F.B., Pro, B., McLaughlin, P., Younes, A., Samaniego, F., Goy, A., Cabanillas, F., Kantarjian, H., Kwak, L. & Wang, M. (2010) Ten-year follow-up after intense chemoimmunotherapy with Rituximab-HyperCVAD alternating with Rituximab-high dose methotrexate/cytarabine (R-MA) and without stem cell transplantation in patients with untreated aggressive mantle cell lymphoma. *British Journal of Haematology*, **150**, 200–208.
- Rudolph, C., Steinemann, D., Von Neuhoff, N., Gadzicki, D., Ripperger, T., Drexler, H.G., Mrašek, K., Liehr, T., Claussen, U., Emura, M., Schrock, E. & Schlegelberger, B. (2004) Molecular cytogenetic characterization of the mantle cell lymphoma cell line GRANTA-519. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, **153**, 144–150.
- Rummel, M.J., Niederle, N., Maschmeyer, G., Banat, G.A., von Grunhagen, U., Losen, C., Kofahl-Krause, D., Heil, G., Welslau, M., Balsler, C., Kaiser, U., Weidmann, E., Durk, H., Ballo, H., Stauch, M., Roller, F., Barth, J., Hoelzer, D., Hinke, A. & Brugger, W. (2013) Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: an open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*, **381**, 1203–1210.
- Savage, D.G., Rule, S.A., Tighe, M., Garrett, T.J., Oster, M.W., Lee, R.T., Ruiz, J., Heitjan, D., Keohan, M.L., Flamm, M. & Johnson, S.A. (2000) Gemcitabine for relapsed or resistant lymphoma. *Annals of Oncology*, **11**, 595–597.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J. & Vardiman, J.W. (2008) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 4th edn. International Agency for Research on Cancer Press, Lyon.
- Tashiro, T., Kawada, Y., Sakurai, Y. & Kidani, Y. (1989) Antitumor activity of a new platinum complex, oxalato (trans-1,2-diaminocyclohexane)platinum (II): new experimental data. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **43**, 251–260.
- Tobinai, K. (2002) Monoclonal antibody therapy for B-cell lymphoma: clinical trials of an anti-CD20 monoclonal antibody for B-cell lymphoma in Japan. *International Journal of Hematology*, **76**, 411–419.
- Tsimberidou, A.M., Wierda, W.G., Wen, S., Plunkett, W., O'Brien, S., Kipps, T.J., Jones, J.A., Badoux, X., Kantarjian, H. & Keating, M.J. (2013) Phase I-II clinical trial of oxaliplatin, fludarabine, cytarabine, and rituximab therapy in aggressive relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia or Richter syndrome. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, **13**, 568–574.
- Visco, C., Finotto, S., Zambello, R., Paolini, R., Menin, A., Zanotti, R., Zaja, F., Semenzato, G., Pizzolo, G., D'Amore, E.S. & Rodeghiero, F. (2013) Combination of rituximab, bendamustine, and cytarabine for patients with mantle-cell non-Hodgkin lymphoma ineligible for intensive regimens or autologous transplantation. *Journal of Clinical Oncology*, **31**, 1442–1449.

Weigert, O., Pastore, A., Rieken, M., Lang, N., Hiddemann, W. & Dreyling, M. (2007) Sequence-dependent synergy of the proteasome inhibitor bortezomib and cytarabine in mantle cell lymphoma. *Leukemia*, **21**, 524–528.

Weigert, O., Weidmann, E., Mueck, R., Bentz, M., von Schilling, C., Rohrberg, R., Jentsch-

Ullrich, K., Hiddemann, W. & Dreyling, M. (2009) A novel regimen combining high dose cytarabine and bortezomib has activity in multiply relapsed and refractory mantle cell lymphoma - long-term results of a multicenter observation study. *Leukaemia & Lymphoma*, **50**, 716–722.

Woynarowski, J.M., Faivre, S., Herzig, M.C., Arnett, B., Chapman, W.G., Trevino, A.V., Raymond, E., Chaney, S.G., Vaisman, A., Varchenko, M. & Juniewicz, P.E. (2000) Oxaliplatin-induced damage of cellular DNA. *Molecular Pharmacology*, **58**, 920–927.

Aquesta tesi s'ha realitzat amb l'ajuda de la Direcció General d'Innovació de la Conselleria d'Innovació, Recerca i Turisme i al Fons Social Europeu



G VICEPRESIDÈNCIA
O I CONSELLERIA
I INNOVACIÓ,
B RECERCA I TURISME
/ DIRECCIÓ GENERAL
INNOVACIÓ I RECERCA



Unió Europea

