



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**TESI DOCTORAL**

**Programa de doctorat en Medicina**

**Departament de Medicina**

**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Estudi de l'efecte de la curcumina en la reversió de la  
resistència adquirida a oxaliplatí mitjançant la inhibició de la  
via de senyalització de NF- $\kappa$ B en models cel·lulars de càncer  
colorectal**

**Vicente Ruiz de Porras Fondevila**

**Directors de tesi :**

**Dra. Eva Martinez Balibrea**

**Dr. Albert Abad Esteve**

**Dr. Josep Maria Ribera Santasusana**

Badalona, 2016

Eva Martinez Balibrea, cap del grup en Resistència, Quimioteràpia i Biomarcadors predictius del programa ProCURE (*Program against Cancer Resistance*) de l'Institut Català d'Oncologia i l'Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol; Albert Abad Esteve, cap del servei d'oncologia de l'Hospital CIMA Sanitas i Josep Maria Ribera Santasusana, professor titular del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i cap del Servei d'Hematologia Clínica de l'Hospital Germans Trias i Pujol (Institut Català d'Oncologia), certifiquen que la tesi titulada:

**Estudi de l'efecte de la curcumina en la reversió de la resistència  
adquirida a oxaliplatí mitjançant la inhibició de la via de senyalització de  
NF- $\kappa$ B en models cel·lulars de càncer colorectal**

Ha estat realitzada per Vicente Ruiz de Porras Fondevila sota la seva direcció i és apta per a ser defensada davant d'un tribunal per a optar al grau de doctor.

Vicente Ruiz de Porras Fondevila  
(doctorand)

Eva Martinez Balibrea  
(directora)

Albert Abad Esteve  
(director)

Josep Maria Ribera Santasusana  
(director)

Badalona, Setembre 2016

**ALS MEUS PARES,**

**ALS PADRINS,**

**A LES TIETES,**

**A LA VERO**

**“Tengo un sistema nada científico para medir el impacto social de lo que hago: se lo cuento a mi abuela de Jerez. Lo llevo haciendo desde el día que, tras pasar dos horas explicándole lo fascinante que era mi investigación en biología molecular y lo duro que era el doctorado, ella me miró con pena y me dijo “muy interesante, y así, en qué trabajas hijo?”. Descubrí entonces que había una fractura sutil entre lo que yo consideraba lo más importante del universo y lo que la sociedad en general consideraba una actividad productiva digna de ser calificada como trabajo”**

**Luis Ruiz Avila**  
*El negocio de la Biotecnología*

**AGRAÏMENTS**

---

Ja fa més de 6 anys que vaig arribar a l'IGTP i sembla que no tingui que arribar mai aquest moment però finalment arriba, arriba el moment en que poses punt i final al difícil recorregut de la tesi i inevitablement penses en totes les persones que t'han acompanyat en aquest camí i que sense elles no hagués estat possible recórrer. Ara que s'acaba aquesta etapa, miro enrere i me'n adono de la gran sort que he tingut en comptar amb el suport i l'ajuda de tots, i és per aquest motiu que us ho vull agrair.

En primer lloc vull agrair als meus directors de tesi, la Dra. Eva Martínez Balibrea i el Dr. Albert Abad la confiança dipositada en mi i per la oportunitat que em van oferir per incorporar-me al seu grup d'investigació i poder dur a terme aquesta tesi doctoral. Estic totalment convençut de que ha sigut una gran sort haver treballat i après amb vosaltres. Eva, vull agrair-te tot el que m'has ensenyat durant aquests anys, els teus consells, i tot el recolzament professional però sobretot personal que m'has ofert tant en els bons com en els mals moments. Gràcies pel teu positivisme i optimisme que tant admiro i que tant m'ha ajudat a superar els reptes i a no enfonsar-me quan les coses no han anat com esperàvem. Gràcies també per deixar-me participar activament en tots els projectes del laboratori, per comptar amb la meua opinió sempre i per transmetre'm la passió per la ciència.

Albert, moltes gràcies pel teu recolzament durant tot aquest procés, per la teua energia i bon humor i sobretot per la teua gran capacitat de transmetre coneixement.

Vull agrair també al Dr. Josep Maria Ribera Santasuna la seva col·laboració i disponibilitat en tot moment quan l'he necessitat.

Al Jose Luis, la Cris i la Laura per totes les reunions dels divendres i pels nostres dinars. Gràcies per les xerrades científiques i les no científiques, i sobretot pel vostre recolzament personal sempre que ho he necessitat.

Vull agrair també a l'Alba i a l'Anna per acollir-me tant bé quan vaig arribar al grup sis anys enrere. Alba, gracias por tu paciencia y por dejarme ser tu pequeño saltamontes en el complejo mundo de los westerns, fuiste una gran maestra i recuerdo con mucho cariño mis primeros pasos junto a ti en el laboratorio. Gracias por todo!

A les noies del meu grup, la Sara B i la Sara C, pel seu companyerisme, la seva amistat, la seva gran ajuda i per tots els bons moments que em passat i que espero que passem plegats! I perquè encara que a vegades us ho passeu molt bé parlant de la meua alçada... us apreciï-ho

moltíssim i treballar amb vosaltres ha sigut un plaer! No puc oblidar-me tampoc de la Cris, la Clara, la Sussanna i la Sheila que malgrat que ja no estan amb nosaltres al laboratori hem passat molts bons moments plegats!

Al moreno Eudald, perquè encara que això de la tesi en ocasions ha sigut un bon fill em sabut treure-li sempre la part positiva amb els nostres gin tonics i els nostres soparets explicant-nos les penes, veient Juego de Tronos i parlant de que la pedra *mos u chafarie tot*. Al petao Arce, per les *risas*, les xerrades, las "*gozaderas*" i per tots els bons moments que hem passat junts tant al lab com fora. A tots dos us vull agrair molt especialment la vostra amistat i la vostra ajuda i recolzament sempre que ho he necessitat. De tots aquests anys al laboratori no només m'emporto una gran experiència professional sinó que també puc dir que he pogut conèixer a dos grans persones i a dos grans amics.

Lucia, muchíssimas gracias por ayudarme siempre en todo lo que he necesitado durante todo éste tiempo. Gracias por tus sabios consejos y por aguantar siempre con paciencia y buena cara mis incansables preguntas sobre NF-kB, las qPCR i los ELISAS! Te debo unos cuantos pasteles de esos que a ti te gustan!

Nuria, *amija*, gràcies per totes les bones estones en els nostres dinars i sobretot gràcies pels teus consells i recomanacions sempre que ho he necessitat.

També a la resta de companys que han estat amb mi durant tots aquests anys i amb els que he compartit molts bons moments: Jovita, Marc, Quim, Josep Maria, Santi, Marina, Alfonsina, Gisela, Gemma, Sara, Anas, Kerry, Bernat, Pepe (niño), Ramon , Josep i Eugeni. Gràcies a tots per fer que venir a treballar sigui tot un plaer!

Al Guille i la Sara, gràcies per ser com sou, i per animar-me sempre, sobretot en aquesta última etapa. Gràcies per ser dos persones molt importants en la meva vida i per la vostra amistat incondicional. Gràcies també pels nostres dinars/sopars al poble amb bons caldos i grans converses, per fer d'aquests petits moments, moments inoblidables!

Als meus pares, gràcies per la vostra confiança, per recolzar-me en totes les decisions que he pres, ja fossin o no les correctes i per estar sempre disposats a ajudar-me i aconsellar-me quan us necessito. Sé que sempre podré comptar amb vosaltres tant en els bons com en els mals moments! Gràcies pel vostre amor incondicional.



A la meva família. A ells els hi dec gran part del que sóc ara. A la padrina, a la tieta Aurelia, a l'abuela, a l'Antonio, la Montse, l'Adrià, la Maria i als que ja no hi són però que sempre m'acompanyen, el padrí, la tieta Pilar i l'abuelo. Sé del cert que estarien molt orgullosos del meu esforç i la meva perseverança per tirar endavant i assolir les fites que em proposo.

Finalment, a qui més vull agrair el seu suport incondicional és a la persona amb la que comparteixo la meva vida. Vero, saps millor que ningú com de difícils han sigut aquests últims mesos per mi i tot i així has estat sempre al meu costat, ajudant-me, animant-me, recolzant-me, consolant-me i sobretot estimant-me. Sense tu aquesta tesi no hagués estat possible, m'has ajudat a tirar endavant quan no em quedaven forces, a no rendir-me i a veure les coses positivament encara que a vegades ha sigut difícil. T'agraeixo de tot cor la paciència que has tingut i per això crec que mai podré agrair-te suficient tot el que has fet per mi. Per tot això i molt més, vull dedicar-te aquesta tesi.

Moltes gràcies a tots !



<b>5-FU:</b>	<i>5-fluorouracil</i>
<b>ADN:</b>	Àcid desoxiribonucleic
<b>ADNc:</b>	Àcid desoxiribonucleic complementari
<b>AINEs:</b>	Antiinflamatoris no esteroideus
<b>ARN:</b>	Àcid ribonucleic
<b>ARNm:</b>	ARN missatger
<b>ATM:</b>	<i>Atàxia-telangiectasia mutated</i>
<b>BER:</b>	<i>Base excission repair</i>
<b>CAC:</b>	Càncer colorectal associat a colitis
<b>CCR:</b>	Càncer colorectal
<b>CCRa:</b>	Càncer colorectal avançat
<b>CI:</b>	Índex de combinació
<b>CIMP:</b>	Fenotip d'hipermetilació de les illes CpG dels promotors gènics
<b>CIN:</b>	Fenotip d'inestabilitats cromosòmiques
<b>COX-2:</b>	Ciclooxigenasa 2
<b>CPT-11:</b>	Irinotecan
<b>CURC:</b>	Curcumina
<b>DMEM:</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO:</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>EGF:</b>	Factor de creixement epidèrmic
<b>EGFR:</b>	<i>Receptor del factor de creixement epidèrmic</i>
<b>ELAM-1:</b>	<i>Endothelial leucocyte adhesion molecule 1</i>
<b>EMT:</b>	Transició cel·lular epiteli-mesènquima
<b>FBS:</b>	Sèrum fetal boví
<b>FDA:</b>	<i>Food and drug administration</i>
<b>GSEA:</b>	<i>Gene set enrichment analysis</i>
<b>IAPs:</b>	Proteïnes inhibidores de l'apoptosi
<b>IC50:</b>	Dosi inhibidora del 50% del creixement cel·lular
<b>ICAM-1:</b>	<i>Intracellular adhesion molecule-1</i>
<b>ICF:</b>	Immunocitofluorescència
<b>IKKs:</b>	IKB quinases
<b>IL-8:</b>	Interleuquina 8
<b>IL-1β:</b>	Interleuquina 1 beta
<b>IL-1R:</b>	Receptor de la interleuquina 1
<b>JNK:</b>	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>

<b>LPS:</b>	Lipopolisacàrid bacterià
<b>LTβR:</b>	Receptor de limfotoxina beta
<b>LV:</b>	Leucovorin
<b>Lys:</b>	Lisina
<b>MAPK:</b>	<i>Mitogen activated protein kinases</i>
<b>miRNA:</b>	<i>microRNA</i>
<b>MMPs:</b>	Metal·loproteïnases de matriu
<b>MMR:</b>	<i>Mismatch repair</i>
<b>NEMO:</b>	<i>NF-κB essential regulator</i>
<b>NER:</b>	<i>Nucleotide excision repair</i>
<b>NES:</b>	Seqüència d'exportació nuclear
<b>NF-κB:</b>	Factor de transcripció nuclear kappa B
<b>NIK:</b>	<i>NF-κB inducing kinase</i>
<b>NLS:</b>	<i>Nuclear localization sequences</i>
<b>OD:</b>	Densitat òptica
<b>O.N.:</b>	<i>Overnight</i>
<b>OXA:</b>	Oxaliplatí
<b>PBS:</b>	Solució salina tamponada amb fosfat
<b>PFA:</b>	Paraformaldehid
<b>PI:</b>	Iodur de propidi
<b>RHD:</b>	<i>Rel Homology Domain</i>
<b>ROS:</b>	Radicals lliures d'oxigen
<b>rpm:</b>	Revolucions per minut
<b>RR:</b>	Taxa de resposta
<b>RT:</b>	Retrotranscripció
<b>SD:</b>	Desviació estàndard
<b>SEM:</b>	Error estàndard de la mitjana
<b>Ser:</b>	Serina
<b>SG:</b>	Supervivència global
<b>SHH:</b>	<i>Sonic hedgehog</i>
<b>siRNA:</b>	<i>small interference RNA</i>
<b>SLM:</b>	Supervivència lliure de malaltia
<b>SLP:</b>	Supervivència lliure de progressió
<b>SM:</b>	Supervivència mitjana
<b>TA:</b>	Temperatura ambient

<b>TAD:</b>	<i>Transcription activation domain</i>
<b>TBS:</b>	Solució salina tamponada amb tris
<b>TLRs:</b>	<i>Toll-like receptors</i>
<b>TNF<math>\alpha</math>:</b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TNFR:</b>	Receptor de la família del TNF
<b>TNM:</b>	Tumor-nòdul-metàstasi
<b>TP:</b>	Temps a la progressió
<b>Thr:</b>	Treonina
<b>TS:</b>	Timidilat sintasa
<b>Tyr:</b>	Tirosina
<b>VCAM-1:</b>	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
<b>VEGF:</b>	Factor de creixement vascular endotelial
<b>VEGFR:</b>	Receptor del factor de creixement endotelial
<b>WB:</b>	Western blot
<b>WT:</b>	<i>Wild type</i>



<b>1. INTRODUCCIÓ</b> .....	1
<b>1.1. El càncer colorectal</b> .....	2
1.1.1. Epidemiologia .....	2
1.1.2. Etiologia i factors de risc .....	2
1.1.3. Carcinogènesi i bases moleculars .....	3
1.1.4. Estadificació.....	6
1.1.5. Tractament quimioterapèutic del CCR.....	9
1.1.5.1. Tractament del CCRa o metastàtic .....	9
<b>1.2. L'Oxaliplatí</b> .....	12
1.2.1. Aspectes generals .....	12
1.2.2. Farmacocinètica i biotransformació .....	13
1.2.3. Mecanismes d'acció.....	14
1.2.4. Toxicitat de l'oxaliplatí .....	17
<b>1.3. Resistència a la quimioteràpia</b> .....	18
1.3.1. Resistència a oxaliplatí .....	20
<b>1.4. El factor de transcripció Nuclear kappaB (NF-κB)</b> .....	24
1.4.1. Família de NF-κB.....	24
1.4.2. Inhibidors de NF-κB: Proteïnes IκB.....	26
1.4.3. IκB quinases (IKKs).....	28
1.4.4. Senyalització de la via NF-κB.....	28
1.4.4.1. Via canònica d'activació de NF-κB.....	29
1.4.4.2. Via no canònica d'activació de NF-κB.....	29
1.4.4.3. Via atípica d'activació de NF-κB .....	30
1.4.5. Regulació de l'activació transcripcional de NF-κB mitjançant les modificacions post-traduccionals de p65 .....	31
1.4.6. Paper de NF-κB en inflamació i càncer .....	31
1.4.6.1. Paper de NF-κB en la proliferació cel·lular i l'apoptosi .....	33
1.4.6.2. Paper de NF-κB en l'angiogènesi.....	34
1.4.6.3. Paper de NF-κB en migració, invasió i metàstasi .....	35
1.4.7. Activació de NF-κB i quimioteràpia .....	35
1.4.8. NF-κB com a diana terapèutica en càncer .....	36
<b>1.5. Curcumina</b> .....	37
1.5.1. Aspectes generals .....	37
1.5.2. Biodisponibilitat de la Curcumina .....	39
1.5.3. Curcumina i càncer. Mecanismes d'acció .....	41
1.5.3.1. Paper de la Curcumina en l'estrès oxidatiu.....	41
1.5.3.2. Activitat antiinflamatòria de la curcumina.....	41
1.5.3.3. Paper de la curcumina en l'apoptosi i la proliferació cel·lular .....	42
1.5.3.4. Paper de la curcumina en l'angiogènesi .....	43
1.5.3.5. Paper de la curcumina en invasió i metàstasi .....	44
1.5.3.6. Curcumina i vies de senyalització de cèl·lules mare tumorals .....	44
1.5.4. Especificitat tumoral de la Curcumina .....	45
1.5.5. Assajos clínics amb curcumina.....	45

1.5.6. Curcumina i quimioteràpia.....	46
<b>2. HIPÒTESI I OBJECTIUS.....</b>	<b>48</b>
<b>3. MATERIAL I MÈTODES .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1. Línies cel·lulars .....</b>	<b>51</b>
<b>3.2. Mostres d'explants de metàstasis hepàtiques derivades de pacients amb CCRa .....</b>	<b>54</b>
<b>3.3. Fàrmacs .....</b>	<b>55</b>
<b>3.4. Assaig de viabilitat cel·lular MTT .....</b>	<b>55</b>
3.4.1. Anàlisi de combinació de fàrmacs .....	57
<b>3.5. Assaig de formació de colònies .....</b>	<b>58</b>
<b>3.6. Extracció i determinació de la concentració de proteïnes .....</b>	<b>59</b>
3.6.1. Extracció de proteïna total .....	59
3.6.2. Extracció de proteïnes nuclears.....	59
3.6.3. Determinació de la concentració de proteïnes .....	60
<b>3.7. Western Blot (WB) .....</b>	<b>60</b>
<b>3.8. Immunocitofluorescència (ICF).....</b>	<b>63</b>
3.8.1. Adquisició de les imatges .....	64
<b>3.9. Determinació de la mort cel·lular per iodur de propidi .....</b>	<b>65</b>
<b>3.10. Anàlisi de l'expressió gènica.....</b>	<b>66</b>
3.10.1. Extracció d'ARN de línies cel·lulars .....	66
3.10.2. Extracció d'ARN parafinat .....	67
3.10.2.1. Desparafinització i digestió .....	67
3.10.2.2. Extracció de l'ARN.....	67
3.10.3. Quantificació de les mostres d'ARN.....	68
3.10.4. Retrotranscripció .....	70
3.10.5. Expressió d'ARNm a temps real (qPCR).....	70
<b>3.11. Anàlisi de l'expressió per tecnologia Microarray .....</b>	<b>74</b>
3.11.1. Anàlisi d'enriquiment funcional.....	75
<b>3.12. Silenciament gènic amb siRNAs.....</b>	<b>75</b>
<b>3.13. Assaig ELISA.....</b>	<b>76</b>
3.13.1. Detecció de CXCL8 .....	77
3.13.2. Detecció de CXCL1 .....	78
<b>3.14. Anàlisi estadístic.....</b>	<b>78</b>
<b>4. RESULTATS .....</b>	<b>80</b>
<b>4.1. Resultats de l'objectiu 1 .....</b>	<b>81</b>
4.1.1. Estudi de l'activació de NF- $\kappa$ B en línies cel·lulars de CCR sensibles i amb resistència adquirida a oxaliplatí .....	81
4.1.2. Estudi de l'activació de la via de senyalització de NF- $\kappa$ B en resposta al tractament amb oxaliplatí.....	84
<b>4.2. Resultats de l'objectiu 2 .....</b>	<b>89</b>
4.2.1 Estudi de l'efecte de la curcumina en la proliferació de línies de CCR sensibles i amb resistència adquirida a oxaliplatí.....	89
4.2.2. Avaluació del sinergisme del tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina.....	90



4.2.3. Estudi de l'efecte del tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina en la proliferació de línies de CCR sensibles i amb resistència adquirida a oxaliplatí .....	90
4.2.4. Estudi de l'efecte del tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina en la capacitat clonogènica de línies de CCR sensibles i amb resistència adquirida a oxaliplatí.....	97
4.2.5. Estudi de l'efecte del tractament concomitant d'oxaliplatí i curcumina en la mort de cèl·lules sensibles i resistents a oxaliplatí .....	99
4.2.6. Efecte de la curcumina sobre l'activació de la via de NF- $\kappa$ B induïda per oxaliplatí.....	102
<b>4.3. Resultats objectiu 3</b> .....	106
4.3.1. Efecte diferencial del tractament concomitant d'oxaliplatí i curcumina en el patró d'expressió gènica dels models cel·lulars HT29 i HTOXAR3.....	106
4.3.2. Validació dels resultats obtinguts en l'anàlisi de <i>microarrays</i> per a CXCL1, CXCL2 i CXCL8 .....	112
4.3.3. Estudi del paper de CXCL8 i CXCL1 en la reversió de resistència a oxaliplatí .....	115
<b>4.4. Resultats de l'objectiu 4</b> .....	119
4.4.1. Estudi dels nivells d'expressió de CXCL8 i CXCL1 en explants de metàstasis de pacients de CCR i associació amb l'eficàcia del tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina .....	119
<b>5. DISCUSSIÓ</b> .....	123
<b>6. CONCLUSIONS</b> .....	144
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	147
<b>8. ANNEX</b> .....	173

## **1. INTRODUCCIÓ**

---

## 1.1. El càncer colorectal

---

### 1.1.1. Epidemiologia

El càncer colorectal (CCR) representa un important problema de salut pública en els països desenvolupats degut a la seva elevada taxa d'incidència i mortalitat. A nivell mundial, representa la tercera causa més freqüent de diagnòstic de càncer en homes ( 746.000 nous casos anuals) per darrere del càncer de pulmó i pròstata i la segona en dones (614.000 nous casos anuals) per darrere del càncer de mama. Englobant ambdós sexes, el CCR és responsable d'aproximadament 600.000 morts anuals amb una incidència de més de 1,2 milions de nous casos (Font: IARC/GLOBOCAN [www.globocan.iarc.fr](http://www.globocan.iarc.fr)). Concretament a l'estat espanyol, el CCR representa el tumor més freqüent (25.600 casos nous/any) i la setena causa de mort amb més de 13.000 defuncions anuals. Amb un increment anual de la incidència del 2,6%, la tendència d'aparició de nous casos s'ha duplicat en els darrers deu anys (Font: INE-ISCII [www.iscii.es](http://www.iscii.es)). L'edat té un gran impacte en la incidència del CCR, superior a qualsevol altre factor demogràfic. Així, l'edat mitjana en el moment del diagnòstic és de 70 anys i, en el 90% dels casos, es presenta en persones de més de 50 anys (1).

D'altra banda, la supervivència global (SG) a 5 anys varia segons l'estadi del tumor en el moment de la seva detecció, essent superior al 90% en estadis I, del 72-85% en estadis II i de només el 27% en pacients d'estadis II d'alt risc i estadi III, que no han estat tractats amb teràpia adjuvant. Estadísticament, aproximadament el 20% dels pacients presentaran metàstasis en el moment del diagnòstic, essent el fetge i els pulmons les localitzacions més freqüents. De la mateixa manera, entre el 30 i el 60% dels pacients amb CCR localitzat desenvoluparà metàstasi. En aquests casos, la supervivència a 5 anys no supera el 10%. Tanmateix, la recaiguda dels pacients després de la cirurgia en la malaltia localitzada es produeix aproximadament als 3 anys i el temps a la progressió del tumor en els malalts metastàtics es troba al voltant dels 10 mesos (1)

### 1.1.2. Etiologia i factors de risc

L'etiologia del CCR és complexa i implica la interacció de factors genètics i factors mediambientals. Entre el 85 i el 90% dels CCRs es produeixen de manera esporàdica i són secundaris a factors ambientals i d'estil de vida. Així doncs, a banda de l'edat i el sexe, els factors de risc modificables del CCR inclouen el tabaquisme, el sedentarisme, l'alcoholisme, el

sobrepès, l'obesitat i el consum de carn vermella i processada, entre d'altres. Pel contrari, dietes amb un alt contingut en fibra, calci i vitamina D han estat descrites com a factors preventius del CCR. De la mateixa manera, certs fàrmacs com els antiinflamatoris no esteroideus (AINEs) o les estatines, han demostrat la capacitat de reduir l'aparició de lesions premalignes i la seva transformació tumoral (1).

Aproximadament el 35% dels pacients amb CCR esporàdic presenten components de risc familiar però no compleixen estrictament els criteris de Bethesda, criteris necessaris per a ser considerats síndromes hereditaris (2). D'altra banda, entre un 5 i un 10% dels casos de CCR estan causats per alteracions genètiques heretables en gens de susceptibilitat al càncer. Dins d'aquest grup de neoplàsies hereditàries existeixen dues formes de CCR clarament definides: la poliposis adenomatosa familiar (PAF) i el càncer colorectal hereditari no polipòsic (HNPCC) o Síndrome de Lynch (3). Paral·lelament, s'ha demostrat un augment de la incidència de CCR en pacients amb malalties inflamatòries cròniques del colon, com la Colitis ulcerosa i la Malaltia de Crohn. De fet, els casos de CCR associats a aquestes malalties inflamatòries cròniques representen entre l'1 i el 2% del total de casos [Revisat a (4)].

### 1.1.3. Carcinogènesi i bases moleculars

El CCR esporàdic es produeix com a resultat de l'acumulació gradual de mutacions gèniques, epigenètiques i alteracions cromosòmiques que conduiran a la transformació de la mucosa colònica normal en un càncer invasiu (5). En general, aquestes mutacions es produeixen en tres grans grups de gens: els oncogens (responsables de la proliferació cel·lular), els gens supressors tumorals (responsables del control del creixement cel·lular) i els gens de la via de reparació d'aparellament erroni de bases o via *Mismatch Repair* (MMR).

L'any 1990 Fearon i Vogelstein van proposar per primera vegada un model de carcinogènesi colorectal que considerava l'acumulació de mutacions en les etapes de transició epiteli normal-adenoma-carcinoma com a base del desenvolupament tumoral (6). Posteriorment, l'any 1997 van ser descrites dues classes de gens de susceptibilitat al càncer: els gens *gatekeeper* i els gens *caretaker* (7). Els gens *gatekeeper* són gens implicats en el creixement i la divisió cel·lular; els gens *caretaker*, en canvi, tenen la funció principal de controlar i mantenir la integritat del genoma de la cèl·lula. Més tard, Michor i col·laboradors van definir un nou subgrup de gens de predisposició al càncer anomenats gens *landscaper*, els quals estan

representats per molècules de matriu extracel·lular i d'adhesió, marcadors i receptors de superfície cel·lular i factors de creixement essencials per al control del microambient cel·lular (8).

Segons el model adenoma-carcinoma de Vogelstein i Fearon (6), el primer pas en el procés de carcinogènesi del colon és la mutació del gen *gatekeeper APC*. Una de les funcions principals del gen *APC* és la regulació de la via de senyalització de Wnt mitjançant el control de la quantitat de  $\beta$ -catenina disponible en el citoplasma. Així doncs, un cop el gen *APC* ha mutat, la  $\beta$ -catenina es transloca al nucli de la cèl·lula (9) i activa la via de Wnt que inclou els proto-oncogens *Myc* i *CCND1* (Ciclina D1) (10, 11). Aquesta activació es tradueix en un increment de la proliferació cel·lular. A continuació, són necessàries mutacions addicionals en gens que codifiquen per proteïnes implicades en la via de les MAP quinases (MAPK, *Mitogen activated protein kinases*), com *KRAS*, *DCC* i *TP53* i que contribuiran a la pèrdua del control de la regulació del cicle cel·lular (12) (Figura 1).

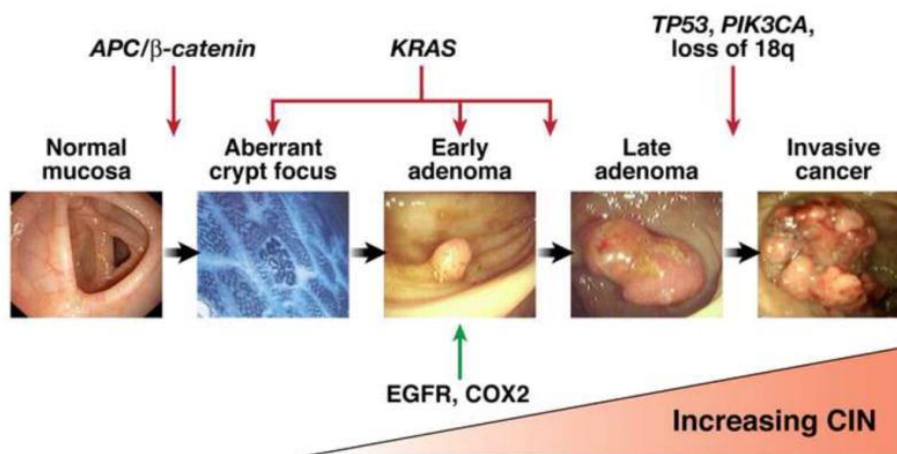


Figura 1. Esquema del model adenoma-carcinoma de Fearon i Vogelstein. Pino MS, Chung DC. *Gastroenterology* (2010) (13)

Amb posterioritat, han estat descrites altres vies alternatives de carcinogènesi que resulten en una inactivació de gens supressors tumorals, activació d'oncogens o inestabilitat genòmica. En aquest sentit, els tumors poden agrupar-se en funció de si presenten inestabilitat cromosòmica (fenotip CIN), inestabilitat de microsatèl·lits (fenotip MSI) o hipermetil·lació de les illes CpG dels promotors gènics (fenotip CIMP) [Revisat a (14)]. El fenotip CIN és el més comú (70% dels tumors esporàdics) i es caracteritza per una acumulació d'aberracions estructurals i numèriques en els cromosomes que es tradueix en una elevada variabilitat cariotípica i en una pèrdua d'heterozigositat (LOH). Els tumors CIN presenten tota una sèrie

d'amplificacions en regions genòmiques que comporten la sobreexpressió d'oncogens com *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* i *PI3K*. A més, es caracteritzen per la translocació i/o pèrdua de fragments cromosòmics que contenen importants gens supressors tumorals *gatekeeper*; com per exemple, el cromosoma 5q (gen *APC*), 17p (gen *TP53*) i 18q (gens *DCC* i *SMAD4*). Les vies de senyalització principalment activades en aquests tipus de tumors inclouen la via Wnt/ $\beta$ -catenina, la via del factor de creixement transformant beta 1 (TGF- $\beta$ , *Transforming growth factor beta*), la via del receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR, *Epidermal growth factor receptor*), la via de les MAPKs i la via de PI3K. A banda dels tumors esporàdics, un petit nombre de tumors hereditaris en els quals la inestabilitat cromosòmica és secundària a les mutacions en el gen *APC* (PAF) o en el gen *MYH* (PAF atenuada) també es desenvolupen a través d'aquesta via de carcinogènesi [Revisat a (13)]

D'altra banda, aproximadament el 15% dels tumors esporàdics i les formes hereditàries no polipòsiques presenten el fenotip MSI. Aquest fenotip, es basa en l'acumulació de mutacions en petites seqüències d'àcid desoxiribonucleic (ADN) no codificant anomenades microsatèl·lits o en el silenciament epigenètic produït per la metilació aberrant de regions promotores de gens *caretaker* implicats en la via de reparació de l'ADN MMR, com *MLH1*, *MLH3*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6* o *PMS2*. Aquests tumors acostumen a ser poc diferenciats, mucinosos, amb infiltració limfocitària i de progressió ràpida. En general, els pacients amb fenotip MSI presenten un millor pronòstic i una major supervivència en comparació amb aquells pacients amb tumors positius per al fenotip CIN (15).

A banda dels fenotips CIN i MSI; entre un 15 i un 20% dels tumors colorectals presenten una tercera via d'inestabilitat epigenètica basada en l'estat de metilació de les illes CpG en regions promotores de diversos gens marcadors (fenotip CIMP). En base al nombre de gens marcadors metilats, el fenotip CIMP pot diferenciar-se en CIMP-alt i CIMP-baix. Les mutacions en l'oncogen *BRAF* han estat habitualment aïllades en el fenotip CIMP-alt i associades amb un increment del creixement cel·lular i la progressió de la carcinogènesi (16). Cal destacar que, en els darrers anys, han estat definits altres mecanismes implicats en la carcinogènesi del CCR. En són bons exemples, les alteracions en l'expressió o el funcionament de certs microRNA (miRNA) o les vies de senyalització proinflamatories [Revisat a (14)].

En el transcurs de l'última dècada, diversos treballs han intentat definir una classificació molecular dels diferents subtipus de CCR basada en conjunts de dades d'expressió gènica. Els resultats de cadascun d'aquests estudis coincideixen en la definició d'alguns subgrups; així per

exemple, tots els treballs identifiquen un subtipus basat en el fenotip MSI i un altre caracteritzat per l'elevada expressió de gens mesenquimals, però presenten poca homogeneïtat en la resta de grups proposats. Per tal d'arribar a un consens, el *CRC Subtyping Consortium* (CRCSC) va proposar una nova classificació basada en l'anàlisi conjunt de totes les dades. El resultat és la definició de 4 subtipus moleculars (CMS) diferenciats: CMS1 (subtipus d'inestabilitat de microsatèl·lits immune, 14% dels casos), CMS2 (subtipus canònic, 37% dels casos), CMS3 (subtipus metabòlic, 13% dels casos) i CMS4 (subtipus mesenquimal, 23% dels casos). Les característiques biològiques de cada un d'aquests subtipus es troben detallades a la Figura 2. Aquesta classificació es considera el sistema taxonòmic més robust del CCR i representa la base per una futura estratificació clínica dels pacients en base al subtipus molecular del seu tumor (17).

CMS1 MSI immune	CMS2 Canònic	CMS3 Metabòlic	CMS4 Mesenquimal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP alt, hipermutació	SCNA alt	Estat MSI mixte, SCNA baix, CIMP baix	SCNA alt
Mutacions en BRAF		Mutacions en KRAS	
Infiltració i activació immunitària	Activació de WNT i MYC	Desregulació metabòlica	Infiltració estromal, activació de TGF- $\beta$ , angiogènesi
Pitjor supervivència després de la recaiguda			Pitjor supervivència global i supervivència lliure de recaiguda

**Figura 2. Característiques biològiques dels quatre subtipus moleculars de CCR proposats pel CRCSC.** Adaptat de *Guinney J i col. Nat Med (2015) (17)*.

### 1.1.4. Estadificació

En el diagnòstic del CCR, paral·lelament a l'avaluació clínica del pacient es realitza l'avaluació patològica de la malaltia. Històricament, el sistema d'estadificació de Dukes i la seva posterior modificació per Astler i Coller han estat els mètodes més utilitzats per a la classificació dels tumors colorectals (18). Actualment però, el sistema de classificació TNM (tumor-nòdul-metàstasi) és el més utilitzat en el diagnòstic del CCR i ha estat definit i aprovat per la UICC (*International Union Against Cancer*) i la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) (19). El sistema TNM es basa en l'extensió del tumor primari (T), el grau de disseminació als ganglis limfàtics locorregionals (N) i la presència de metàstasi a distància (M) (Taula 1). La combinació

de les categories T, N i M, permet la classificació del CCR en diferents estadis de pronòstic que serveixen de base per a establir el tractament més adequat en cada cas (Taula2).

Tx	El tumor primari no pot ser avaluat
T0	No hi ha evidència de tumor primari
Tis	Carcinoma in situ: intraepitelial o invasió de la làmina pròpia
T1	El tumor envaeix la submucosa
T2	El tumor envaeix la <i>muscularis propia</i>
T3	El tumor envaeix a través de la <i>muscularis propia</i> fins als teixits pericorectals
T4a	El tumor penetra la superfície del peritoneu visceral
T4b	El tumor envaeix directament o s'adhereix a altres òrgans o estructures
Nx	No es poden avaluar els ganglis limfàtics regionals
N0	No hi ha metàstasi als ganglis limfàtics regionals
N1	Existeixen metàstasis d' 1 a 3 ganglis limfàtics regionals
N1a	Existeix metàstasi a un gangli regional
N1b	Existeixen metàstasis de 2 a 3 ganglis limfàtics regionals
N1c	Hi ha depòsit(s) tumoral(s) a la subserosa o als teixits mesentèrics o pericòlics no peritonealitzats, o als teixits perirectals, sense metàstasi ganglionar regional
N2	Existeixen metàstasis a $\geq 4$ ganglis limfàtics regionals
N2a	Existeixen metàstasis de 4 a 6 ganglis limfàtics regionals
N2b	Existeixen metàstasis a $\geq 7$ ganglis limfàtics regionals
Mx	No es possible avaluar una metàstasi a distància
M0	No existeix metàstasi a distància
M1	Presència de metàstasi a distància
M1a	La metàstasi està confinada a un òrgan o lloc (és a dir, fetge, pulmó, ovari, gangli no regional,...)
M1b	Existeixen metàstasis a $> 1$ òrgan o lloc, o en peritoneu

Taula 1. Classificació TNM



Estadi	T	N	M	Dukes	MAC	Supervivència a 5 anys
<b>0</b>	Tis	N0	M0	-	-	90%
<b>I</b>	T1	N0	M0	A	A	
	T2	N0	M0	A	B1	
<b>IIA</b>	T3	N0	M0	B	B2	85%
<b>IIB</b>	T4a	N0	M0	B	B2	72%
<b>IIC</b>	T4b	N0	M0	B	B3	
<b>IIIA</b>	T1-T2	N1/N1c	M0	C	C1	60%
	T1	N2a	M0	C	C1	
<b>IIIB</b>	T3-T4a	N1/N1c	M0	C	C2	42%
	T2-T3	N2a	M0	C	C1/C2	
	T1-T2	N2b	M0	C	C1	
<b>IIIC</b>	T4a	N2a	M0	C	C2	27%
	T3-T4a	N2b	M0	C	C2	
	T4b	N1-N2	M0	C	C3	
<b>IVA</b>	Qualsevol T	Qualsevol N	M1a	-	-	10%
<b>IVB</b>	Qualsevol T	Qualsevol N	M1b	-	-	

Taula 2. Estadiatge del CCR segons la classificació TNM, la classificació de *Dukes*, la modificació d’Astler i Coller (MAC) i la supervivència a 5 anys

### 1.1.5. Tractament quimioterapèutic del CCR

Actualment, el tractament estàndard dels pacients amb CCR localitzat continua essent l'extirpació quirúrgica del tumor i dels ganglis limfàtics primaris i regionals. L'aplicació de tractaments de quimioteràpia o de radioteràpia ha resultat ser especialment beneficiosa en pacients amb tumors colorectals en estadis localment avançats (estadis III) i avançats (estadis IV) així com en alguns casos d'estadis II d'alt risc. El descobriment de nous fàrmacs citotòxics i, més recentment, d'anticossos monoclonals dirigits contra dianes moleculars específiques, ha contribuït a una millora significativa de la supervivència i la qualitat de vida dels pacients. A continuació es fa un repàs de les estratègies terapèutiques en el CCR avançat (CCRa) ja que és en aquest subgrup de pacients on es focalitza aquest treball de tesi.

#### 1.1.5.1. Tractament del CCRa o metastàtic

L'objectiu principal del tractament en la malaltia metastàtica és l'increment de la supervivència, la reducció dels símptomes i la millora de la qualitat de vida dels pacients. En efecte, per als pacients amb malaltia amb recurrència local o metastàtica localitzada únicament en fetge o pulmó, l'extirpació del tumor mitjançant cirurgia representa l'única opció curativa possible. Com veurem en aquest apartat, en els darrers 20 anys s'han assolit importants avenços en el tractament quimioterapèutic del CCRa que han permès una millora significativa de la supervivència i la qualitat de vida dels pacients. Així, després de gairebé quatre dècades en les que la fluoropirimidina 5-fluorouracil (5-FU) constituïa l'únic agent quimioterapèutic disponible, el desenvolupament d'altres agents citotòxics com l'irinotecan (CPT-11) o l'oxaliplatí (OXA) van millorar significativament els resultats terapèutics i la supervivència dels pacients ja que permetien, en determinats casos, fer operables lesions metastàtiques inicialment considerades inabordables quirúrgicament (20). Aquest fet, lligat a la recent aparició de nous fàrmacs antidiana ha contribuït a una millora significativa de la supervivència mitjana (SM) actual dels pacients amb CCRa, arribant a ser de 24 mesos o més en funció de la possibilitat de cirurgia de les metàstasis (21).

El 5-FU és un anàleg de l'uracil al que se li ha substituït un àtom d'hidrogen per un de fluor en el carboni 5 de l'anell pirimidínic. Un cop entra dins la cèl·lula, el 5-FU és transformat en diferents metabòlits actius: el fluorodesoxiuridin monofosfat (FdUMP) que inhibeix directament l'enzim Timidilat sintasa (TS); el fluorodesoxiuracil trifosfat (FdUTP) que pot unir-se a l'ADN aturant el seu procés de replicació i el fluorouridin trifosfat (FUTP) que ho fa a l'àcid ribonucleic (ARN), evitant la seva transcripció. El 5-FU s'administra juntament amb el metabòlit

de l'àcid fòlic leucovorin (LV), el qual, estabilitza la unió entre la TS i la forma activa del 5-FU, augmentant així el període d'activitat d'aquest últim (22). El CPT-11 és un derivat soluble de la camptotecina el mecanisme d'acció del qual, es basa en la inhibició de l'enzim Topoisomerasa I, enzim que actua unint-se a l'ADN i col·laborant en l'eliminació dels impediments estèrics derivats de l'estructura helicoidal de l'ADN que impedeixen el procés de replicació d'aquest (23). Finalment, l'oxaliplatí, com veurem amb detall en l'apartat següent, és un derivat del platí de tercera generació que actua unint-se a la cadena d'ADN i formant adductes Platí-ADN que impediran la síntesi i replicació d'aquest (24).

Així doncs, els esquemes de tractament en primera línia del CCRa es basen en l'administració de 5-FU per via intravenosa, o de la fluoropirimidina oral capecitabina, en diverses combinacions com ara el FOLFOX (5-FU/LV/OXA) o el FOLFIRI (5-FU/LV/CPT-11) les quals han demostrat augmentar les taxes de resposta (RR) més enllà del 50%, la supervivència lliure de progressió (SLP) i la SG en comparació amb la monoteràpia amb 5-FU/LV (25, 26). Actualment, tant el FOLFOX com el FOLFIRI representen els tractaments d'elecció en primera línia de tractament del CCRa. L'elecció d'un o altre esquema determina quin dels dos s'escullirà en segona línia. L'administració de FOLFOX o FOLFIRI en primera línia de tractament es tradueix en una millora de la supervivència i en un major percentatge de malalts subsidiaris de cirurgia secundària per a l'extirpació de metàstasis hepàtiques considerades no extirpables abans de la quimioteràpia (27-29). També, la combinació de capecitabina i OXA (XELOX) ha demostrat ser una alternativa eficaç a la combinació de 5-FU i OXA (30, 31). Els triplets basats en la combinació de 5-FU/LV, OXA i CPT-11 (FOLFOXIRI) resulten molt tòxics però alhora molt efectius sobretot quan hi ha una intenció de convertir en operables aquelles metàstasis que no ho eren d'inici (32, 33).

En els darrers anys, s'han desenvolupat tota una sèrie de nous agents farmacològics dirigits a dianes terapèutiques específiques i destinats a millorar l'eficàcia dels fàrmacs quimioterapèutics existents. Actualment, els agents antidiana aprovats per a ús clínic en CCRa es basen principalment en la supressió de l'angiogènesi i en el bloqueig del receptor EGFR.

El Bevacizumab és un anticòs monoclonal que actua bloquejant el factor de creixement vascular endotelial A (VEGF-A, *Vascular endothelial growth factor A*) i per tant, interferint en la neoformació de vasculatura. La incorporació del Bevacizumab als règims estàndards de primera i segona línia de quimioteràpia millora la SG, la SLP i la RR en comparació a la quimioteràpia sola (34-36). A banda del Bevacizumab; s'ha avaluat l'eficàcia del ziv-aflibercept (un inhibidor del VEGF) i el Regorafenib (un inhibidor multiquinasa) en combinació amb

quimioteràpia estàndard en el tractament del CCRa. El Ziv-aflibercept representa una alternativa eficaç al Bevacizumab en combinació amb FOLFIRI, únicament en segona línia de tractament. L'ús del Regorafenib, en canvi, està limitat a aquells pacients que han progressat a totes les línies de tractament estàndard [Revisat a (37)]. A més a més, l'any 2015 va ser aprovat l'ús del Ramucirumab, un inhibidor del receptor de VEGF VEGFR2 (*Vascular endothelial growth factor receptor 2*), en combinació amb FOLFIRI en aquells pacients que havien progressat durant o després del tractament amb FOLFOX més Bevacizumab (38).

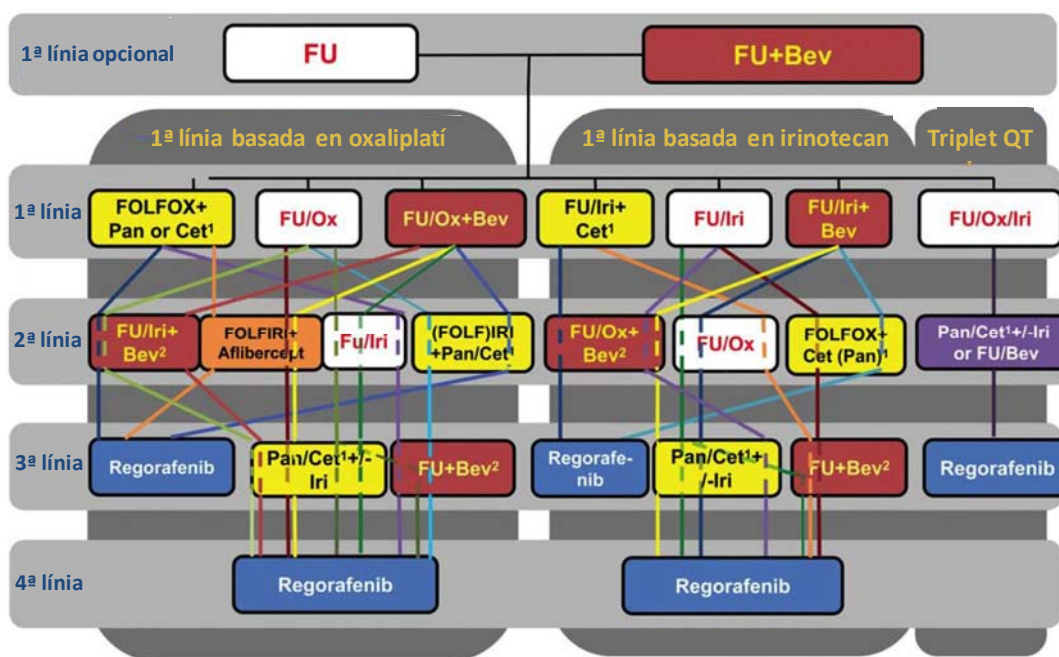
El Cetuximab és un anticòs monoclonal IgG1 que s'uneix específicament al receptor del factor de creixement epidèrmic (EGF, *Epidermal growth factor*) i que va ser aprovat en base als resultats de l'estudi clínic BOND, en el qual es comparava l'esquema de tractament Cetuximab + CPT-11 amb Cetuximab sol en pacients amb CCRa que havien progressat davant el tractament de primera línia amb fluoropirimidines i CPT-11. Aquest estudi va mostrar un augment de la RR i del temps a la progressió (TP) en la branca de Cetuximab + CPT-11, encara que no es van obtenir diferències significatives en relació a la SG (39). Posteriorment, l'assaig clínic de fase III CRYSTAL va demostrar que el tractament de primera línia amb Cetuximab + FOLFIRI reduïa el risc de progressió del CCR metastàtic en comparació al tractament amb FOLFIRI sol i també que només els pacients amb tumors que no presentaven mutacions en el gen *KRAS*, podien beneficiar-se del tractament amb Cetuximab (40). Pel que fa a la combinació de cetuximab i oxaliplatí no queda clar el benefici en pacients *KRAS wild type* (WT) comparat amb FOLFOX (41-43). La mutació V600F en *BRAF* (present en el 5-10% dels tumors colorectals) sembla tenir un valor pronòstic en les línies inicials de tractament amb fàrmacs anti-EGFR.

Un segon fàrmac anti-EGFR utilitzat en el tractament del CCRa és el Panitumumab, un anticòs monoclonal IgG2 totalment humanitzat que va ser aprovat en monoteràpia de tercera línia en pacients amb tumors *KRAS* WT que havien desenvolupat resistència a CPT-11, oxaliplatí i fluoropirimidines (44). Posteriorment es va demostrar un benefici en la SLP dels pacients amb CCRa (*KRAS* WT) tractats en primera línia amb la combinació FOLFOX-Panitumumab i en segona línia amb FOLFIRI-Panitumumab (45, 46).

Els estudis clínics CAIRO-2, PACCE i BOND 2 van avaluar el benefici d'incorporar un fàrmac anti-EGFR (Cetuximab o Panitumumab) als règims de tractament estàndard basats en CPT-11 o OXA més Bevacizumab (47, 48). Els resultats obtinguts no van reportar cap benefici significatiu però sí un augment de la toxicitat i per consegüent, l'ús conjunt dels anticòs anti-EGFR amb Bevacizumab no està recomanat actualment en la pràctica clínica.

Per últim, cal esmentar la recent aprovació per part de la *U.S. Food and Drug administration* (FDA) i l'agència europea del medicament (EMA), d'un nou fàrmac oral per al tractament del CCRa, el TAS-102. L'estudi de Fase III RECURSE va demostrar que la utilització de l'agent antitumoral TAS-102 en pacients amb CCRa resistent a tots els règims de tractament estàndard, permetia una millora de 2 mesos en la SG (49).

A la figura 3 estan representats els diferents esquemes de tractament del CCRa a partir d'una primera línia basada en l'oxaliplatí, l'irinotecan o el triplet 5-FU/OXA/CPT-11.



**Figura 3. Diagrama dels diferents esquemes de tractament del CCRa.** (¹) només en pacients KRAS wt. La primera línia opcional amb FU o FU+Bev està indicada en aquells pacients que no presenten símptomes o risc d'una ràpida progressió de la malaltia. **FU** : fluoropirimidines; **Iri** : Irinotecan; **Ox** : oxaliplatí; **Bev**: bevacizumab; **Afli**: aflibercept; **Cet**: cetuximab; **Pan**: panitumumab. Adaptat de *Schmoll i col. Ann Oncol* (2012) (50)

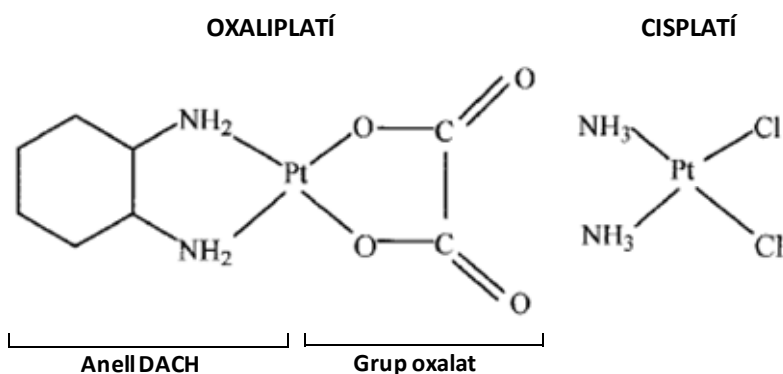
## 1.2. L'Oxaliplatí

### 1.2.1. Aspectes generals

Tal i com es desprèn de l'apartat anterior, l'oxaliplatí és un fàrmac essencial en el tractament del CCRa i a més a més, també ho és en el tractament de la malaltia localitzada (51-53).

L'oxaliplatí (1,2-diaminociclohexà-oxalat-platí II) és un compost platinat de tercera generació que ha demostrat tenir un perfil d'activitat i toxicitat diferent a la dels seus anàlegs platinats, cisplatí i carboplatí. L'oxaliplatí va ser descobert l'any 1976 pel professor Yoshinori Kidani i fou patentat tres anys més tard. L'any 1994, la farmacèutica Sanofi-Aventis va adquirir la seva llicència i el va comercialitzar sota el nom d'Eloxatin®. Aquest fàrmac, va ser aprovat a Europa l'any 1999 i posteriorment als Estats Units per la FDA l'any 2004.

La fórmula química de l'oxaliplatí és  $C_8H_{14}N_2O_4Pt$  i el seu pes molecular és de 397,28 g/mol. Estructuralment, està format per un grup oxalat, una molècula de platí (Pt) i un anell diaminociclohexà (DACH). La presència d'aquest anell DACH provoca un augment de la mida de la molècula d'oxaliplatí respecte la de cisplatí, conferint-li una estructura diferent (Figura 4). Aquestes diferències estructurals proporcionen a l'oxaliplatí un espectre diferent d'acció i d'activació de vies de reparació del dany a l'ADN en comparació als seus anàlegs platinats (54).



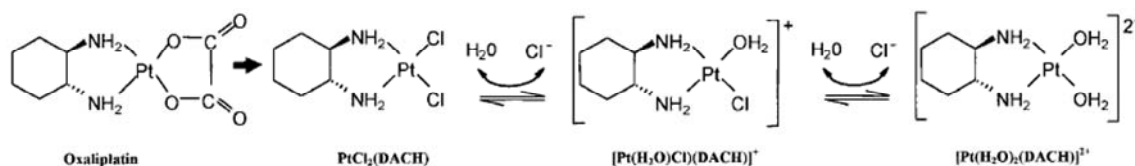
**Figura 4. Esquema de l'estructura de les molècules d'oxaliplatí i cisplatí.** Adaptat de Raymond E. i col. *Mol. Cancer Ther.* (2002) (55).

S'ha demostrat l'activitat citotòxica de l'oxaliplatí tant a nivell *in vitro* com *in vivo* en diferents tumors, com els de colon i recte, mama, estòmac, ovari, pulmó de cèl·lula no petita i el limfoma de Hodking, entre d'altres. A més, l'oxaliplatí ha demostrat ser efectiu en aquells tumors intrínsecament resistent a altres compostos platinats com el cisplatí o el carboplatí [Revisat a (55)]. L'ús de l'oxaliplatí està aprovat per al tractament no només del CCR, sinó també del càncer gàstric i el càncer de pàncrees.

### 1.2.2. Farmacocinètica i biotransformació

L'oxaliplatí s'administra per via intravenosa mitjançant infusió continua durant 2 a 6 hores. En contacte amb la sang, l'oxaliplatí perd el grup oxalat i incorpora dos molècules de clor (DACH-

Pt-Cl<sub>2</sub>). Aquesta molècula penetra a la cèl·lula principalment per difusió passiva encara que en determinats casos també ho pot fer mitjançant proteïnes transportadores. Un cop a l'interior de la cèl·lula, degut a la baixa concentració de clor intracel·lular, la molècula d'oxaliplatí substitueix els ions clor per dues molècules d'aigua i es transforma en una molècula de DACH-Pt-*diaqua* carregada positivament capaç d'interaccionar principalment amb l'ADN, però també amb ARN i proteïnes, i produir el seu efecte citotòxic (Figura 5) [Revisat a (55, 56)]. El complex DACH-Pt pot presentar tres conformacions isomèriques que interaccionen de manera diferent amb l'ADN essent la forma TRANS-L la conformació més efectiva [Revisat (54)].



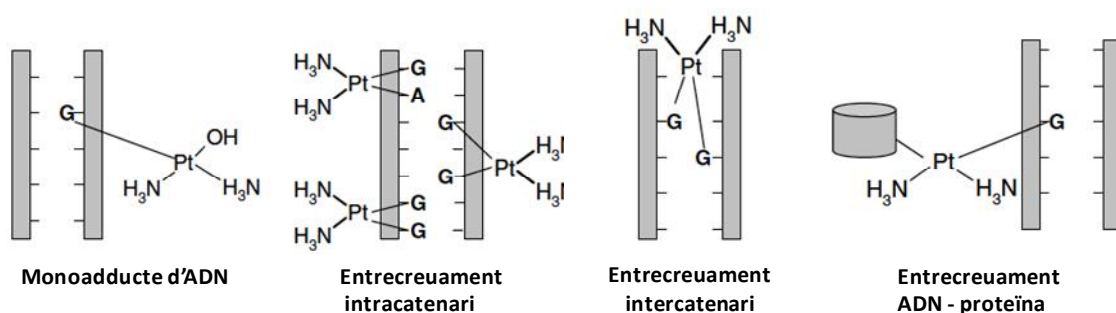
**Figura 5. Procés de biotransformació de l'oxaliplatí.** Adaptat de *Raymond E. i col. Mol Cancer Ther (2002)(55)*.

La farmacocinètica de l'oxaliplatí es caracteritza per presentar una curta fase inicial de distribució i una fase final més llarga d'eliminació del fàrmac. A les 2 hores d'infusió, el 15% de l'oxaliplatí es troba present a la sang i el 85% restant és ràpidament distribuït als teixits o eliminat. L'eliminació del fàrmac es produeix principalment per via renal amb aclariment màxim a les 48 hores post-administració [Revisat a (56)].

### 1.2.3. Mecanismes d'acció

La formació d'adductes d'ADN representa el mecanisme determinant de l'activitat antitumoral dels agents platinats [Revisat a (54)]. A l'interior de la cèl·lula, la molècula d'oxaliplatí (DACH-Pt-*diaqua*) és capaç d'interaccionar amb molècules nucleofíliques com l'ADN, l'ARN i proteïnes, essent l'ADN la molècula diana preferent. La unió d'aquest agent platinat a l'ADN es produeix mitjançant enllaços covalents amb els nitrògens en posició 7 dels anells imidazol de les bases puríniques guanina (G) i adenosina (A) de l'ADN. Els adductes formats poden ser intracatenaris, intercatenaris i en forma de monoadductes. Els entrecreuaments intracatenaris representen les lesions més freqüents i es produeixen majoritàriament entre dues bases de guanina consecutives (1,2d-CpG), una guanina i una adenosina (1,2d-ApG) o entre guanina, base, guanina (1,3d-GpXpG). Els entrecreuaments intercatenaris, en canvi, es generen per la unió entre bases de guanina de les dues cadenes d'ADN. Per últim, la majoria dels monoadductes d'ADN reaccionen i es converteixen en adductes intracatenaris. La formació d'aquests adductes es tradueix en el bloqueig de la transcripció i replicació de l'ADN així com

en la consegüent inhibició de les vies de reparació del dany a l'ADN i l'activació de vies de senyalització de mort cel·lular (57). Els adductes d'oxaliplatí produeixen el seu efecte en el bloqueig de la transcripció gènica mitjançant tres mecanismes d'acció: en primer lloc, evitant la unió dels factors de transcripció a les regions promotores de l'ADN i per tant impedit-ne la seva transcripció; en segon lloc, bloquejant l'accés de l'enzim polimerasa a la cadena d'ADN i per últim, alterant l'estructura i mobilitat de la cromatina i els nucleosomes [Revisat a (58)]. L'oxaliplatí també pot unir-se a certes proteïnes que actuen com a sensors del dany genòmic, segrestant factors de transcripció, aturant el cicle cel·lular i activant diverses cascades de senyalització [Revisat a (55)] (Figura 6).



**Figura 6.**Tipus d'adductes generats entre l'oxaliplatí i l'ADN. Adaptat de Rabik CA i col., *Cancer Treat Rev* (2007)(57)

En resposta al dany a l'ADN causat per l'oxaliplatí, s'activen les proteïnes quinasa ATM (*Ataxia-telangiectasia mutated*)/ATR (*ATM-Rad3-related*) i DNA-PK (*DNA-dependent kinase*) les quals poden activar, directa o indirectament, la proteïna supressora tumoral p53. Per la seva banda, p53 activa la transcripció de tota una sèrie de gens, com p21, GADD45 i 14.3.3, responsables de l'aturada del cicle cel·lular en les transicions G1-S i/o G2-M i l'activació de les vies de reparació del dany a l'ADN (59).

Per tant, el següent pas de la resposta cel·lular a l'estrès genotòxic és l'activació de les vies reparadores de l'ADN. Les principals vies activades per acció dels agents platinats són les que s'encarreguen de la reparació de danys intracatenaris distorsionadors de la doble hèlix d'ADN, com la via de reparació per escissió de nucleòtids o NER (*Nucleotide excision repair*) i de manera secundària, la via de reparació per escissió de bases o BER (*Base excision repair*). Altres vies de reparació, com el sistema MMR i la via de recombinació homòloga (HR/NHEJ), han estat relacionades amb el cisplatí però no sembla que participin en el reconeixement i reparació dels adductes produïts per l'oxaliplatí. S'ha hipotetitzat que aquest podria ser un dels motius pels quals els tumors amb alteracions en la via de de MMR, com el CCR, són intrínsecament resistent a cisplatí i carboplatí però sensibles a l'acció de l'oxaliplatí (57, 60).



L'acumulació de lesions a l'ADN causades pels adductes platinats acaben superant la capacitat de reparació de la cèl·lula, fet que provoca l'activació de les vies de senyalització de mort. L'oxaliplatí pot provocar la mort cel·lular a través de diferents mecanismes, com l'apoptosi, la necrosi, la catàstrofe mitòtica i/o la senescència.

L'apoptosi pot activar-se a través de dues vies de senyalització: la via intrínseca i la via extrínseca. Sembla ser que la via intrínseca és la que predomina després del tractament amb oxaliplatí (61). Aquesta via està regulada per diverses proteïnes pro- i antiapoptòtiques de la família Bcl-2 (*B cell lymphoma 2*). Així, el balanç entre Bax (proapoptòtica) i Bcl-2 (antiapoptòtica) provoca un canvi de permeabilitat en la membrana mitocondrial que permet l'alliberament del citocrom c al citosol, la formació de l'apoptosoma i l'activació de les caspases 9 i 3 respectivament [Revisat a (62)]. La proteïna p53 regula positivament l'expressió de Bax i ambdues proteïnes han demostrat tenir un paper determinant en la resposta citotòxica de diversos fàrmacs, entre ells l'oxaliplatí (63, 64). A més a més, Rakitina i col·laboradors van demostrar que el tractament amb oxaliplatí induïa l'apoptosi a través de la fosforilació i activació de la via de p38-MAPKs i la consegüent activació de les caspases 9 i 3 en línies cel·lulars de CCR (65). En la via extrínseca, en canvi, l'activació de les caspases 8 i 3 està produïda per l'activació de receptors de mort localitzats en la membrana cel·lular, com TNFR1, Fas/CD95, TRAIL, DR4 i DR5 [Revisat a (62)]. Marchetti i col·laboradors van reportar l'activació de la via extrínseca en resposta a oxaliplatí en la línia de CCR HCT15 (66) (Figura 7).

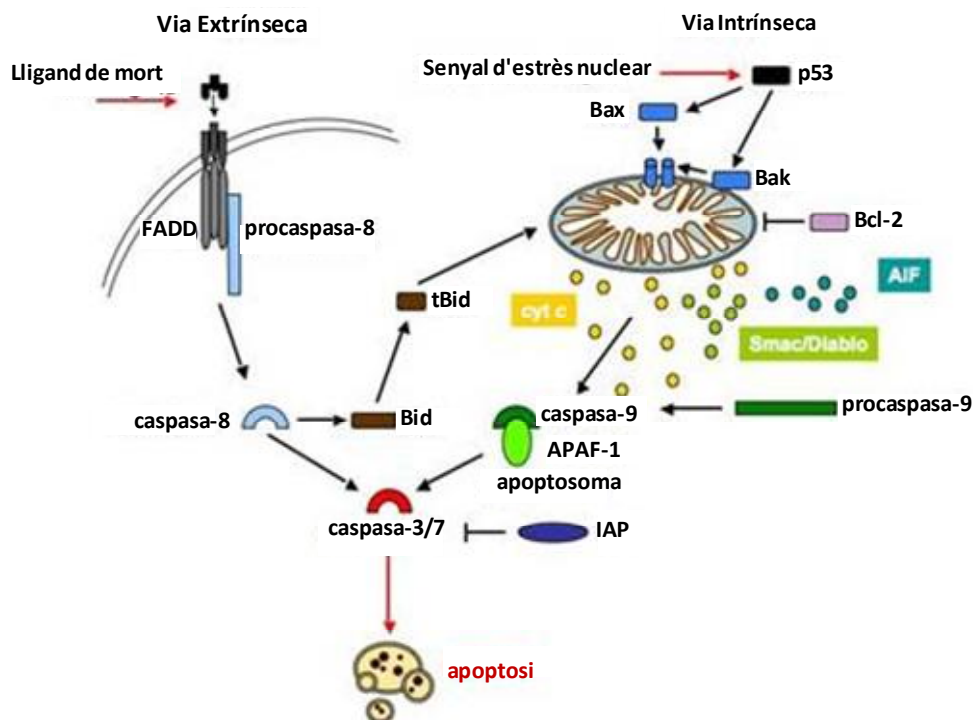


Figura 7. Representació dels processos que condueixen a l'activació de la via intrínseca i extrínseca d'apoptosi.

Per últim, és important mencionar que l'oxaliplatí també pot activar la necrosi degut en part a la producció de radicals lliures d'oxigen (ROS) i estrès oxidatiu (67, 68). Un estudi realitzat pel nostre grup va demostrar que el tractament amb oxaliplatí produïa un augment de l'expressió de gens implicats en els processos de necroptosis (necrosi cel·lular programada) i autofàgia, entre ells, *BMF* (69). A més a més, també s'ha reportat que la producció de ROS per part de l'oxaliplatí pot activar mecanismes de senescència en línies de carcinoma hepatocel·lular (70). Treballs realitzats amb línies cel·lulars d'adenocarcinoma gàstric i esofàgic van mostrar que el tractament amb oxaliplatí produïa una disminució dels nivells de la proteïna antiapoptòtica Survivina i en conseqüència l'activació de la mort cel·lular per catàstrofe mitòtica (71). En conclusió, la capacitat de l'oxaliplatí per induir diferents formes de mort cel·lular contribueix a la seva eficàcia com a agent citotòxic i antineoplàsic.

### 1.2.4. Toxicitat de l'oxaliplatí

En general, el tractament quimioterapèutic amb oxaliplatí indueix toxicitat a nivell del sistema hematopoiètic, tracte gastrointestinal i sistema nerviós. Els símptomes més característics són: neutropènia, trombocitopènia, nàusees, vòmits, diarrea i neuropatia perifèrica. La severitat de la toxicitat hematopoiètica i gastrointestinal és moderada i remet un cop s'atura el tractament amb oxaliplatí [Revisat a (72)]. La neuropatia sensorial perifèrica, en canvi, és la principal toxicitat limitant de dosi i una important causa d'interrupció del tractament. Aquesta

neurotoxicitat apareix en el 95% dels pacients i pot diferenciar-se en neuropatia aguda i neuropatia crònica. La neuropatia aguda es caracteritza per parestèsies i disestèsies en extremitats, boca i gola. Aquests símptomes remeten en qüestió d'hores o dies i estan causats com a conseqüència de la inhibició de les bombes de sodi per efecte de l'acció quelant de l'oxalat sobre les molècules de calci i magnesi [Revisat a (73)]. El tractament administrat per a controlar aquesta simptomatologia es basa en l'administració de gluconat de calci i/o sulfat de magnesi (74). D'altra banda, la neuropatia crònica apareix de manera progressiva per efecte de l'acumulació del fàrmac a l'organisme i la consegüent atrofia i mort neuronal. Els principals símptomes són parestèsies i formigueig en dits i peus, propiocepció reduïda, pèrdua dels reflexes perifèrics i atàxia sensorial [Revisat a (73)].

### **1.3. Resistència a la quimioteràpia**

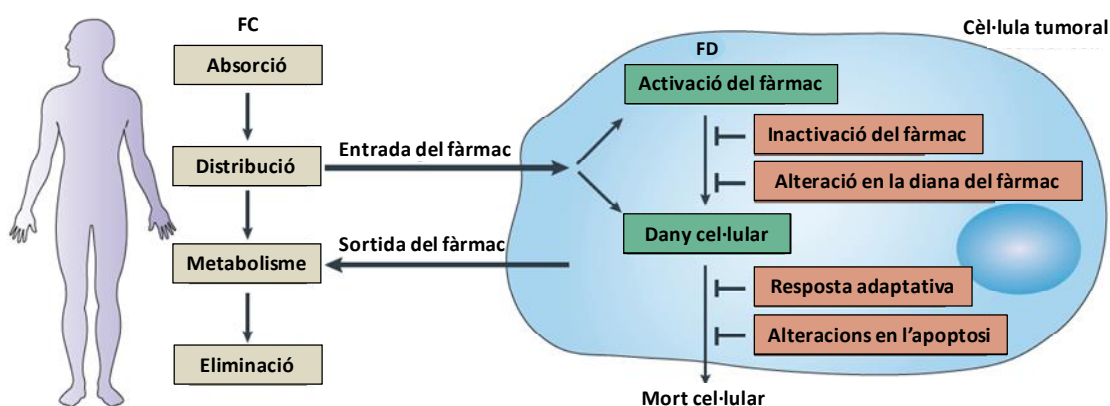
---

La quimioteràpia continua essent una eina essencial en el tractament dels pacients amb CCR metastàtic però la seva eficàcia es veu compromesa degut a l'aparició de resistències. Aquesta resistència pot dividir-se en dues categories: la resistència intrínseca i la resistència adquirida. La resistència intrínseca és aquella que ja és present en les cèl·lules abans de l'inici del tractament, i que per tant, és deguda a factors inherents a la cèl·lula tumoral. D'altra banda, la resistència adquirida és aquella que apareix durant l'exposició al fàrmac en tumors que inicialment responien al tractament i que es produeix per l'aparició de mutacions durant el tractament així com per altres respostes adaptatives com la sobreexpressió de dianes terapèutiques o l'activació de vies de senyalització alternatives compensatòries [Revisat a (75)]. A més a més, degut a la gran heterogeneïtat molecular dels tumors (76), la resistència adquirida als fàrmacs pot aparèixer també per l'efecte del tractament en la selecció d'una petita subpoblació de cèl·lules resistents que ja eren presents inicialment en el tumor. En general, en el tractament de primera línia del CCRa, la resistència intrínseca es dona en el 50% dels casos mentre que la resistència adquirida apareix aproximadament als 10 mesos de mediana després d'haver iniciat el tractament. La quimioresistència és un procés multifactorial i inclou una gran varietat de mecanismes complexes, com són [Revisat a (75)] (Figura 8):

**Factors intrínsecs al tumor:** limitació a l'accés de la droga, mala absorció del fàrmac degut a la mida de la massa tumoral o bé, fenòmens d'hipòxia.

**Factors farmacocinètics:** increment en la detoxificació de la droga i/o una distribució insuficient del fàrmac que implicaran una menor concentració intracel·lular d'aquest. També, una mala absorció, metabolització o bé una ràpida degradació del fàrmac per part de les cèl·lules tumorals que provocaran una disminució en la concentració del fàrmac i conduiran a una pèrdua d'efectivitat. A més a més, es produeixen fenòmens de resistència degut a la utilització d'una via d'administració incorrecta o una mala dosificació del fàrmac.

**Factors farmacodinàmics:** com els relacionats amb el transport de la droga (inhibició de l'entrada i/o increment dels mecanismes d'expulsió de la droga), alteracions en la metabolització, alteracions en les dianes terapèutiques, o bé, canvis relacionats amb el cicle cel·lular, els mecanismes de reparació, i les vies de protecció en front dels processos d'apoptosi.



**Figura 8. Principis generals de la resistència a fàrmacs.** FC: factors farmacocinètics. FD: factors farmacodinàmics. Adaptat de Holohan C i col. *Nat Rev Cancer* (2013)(75)

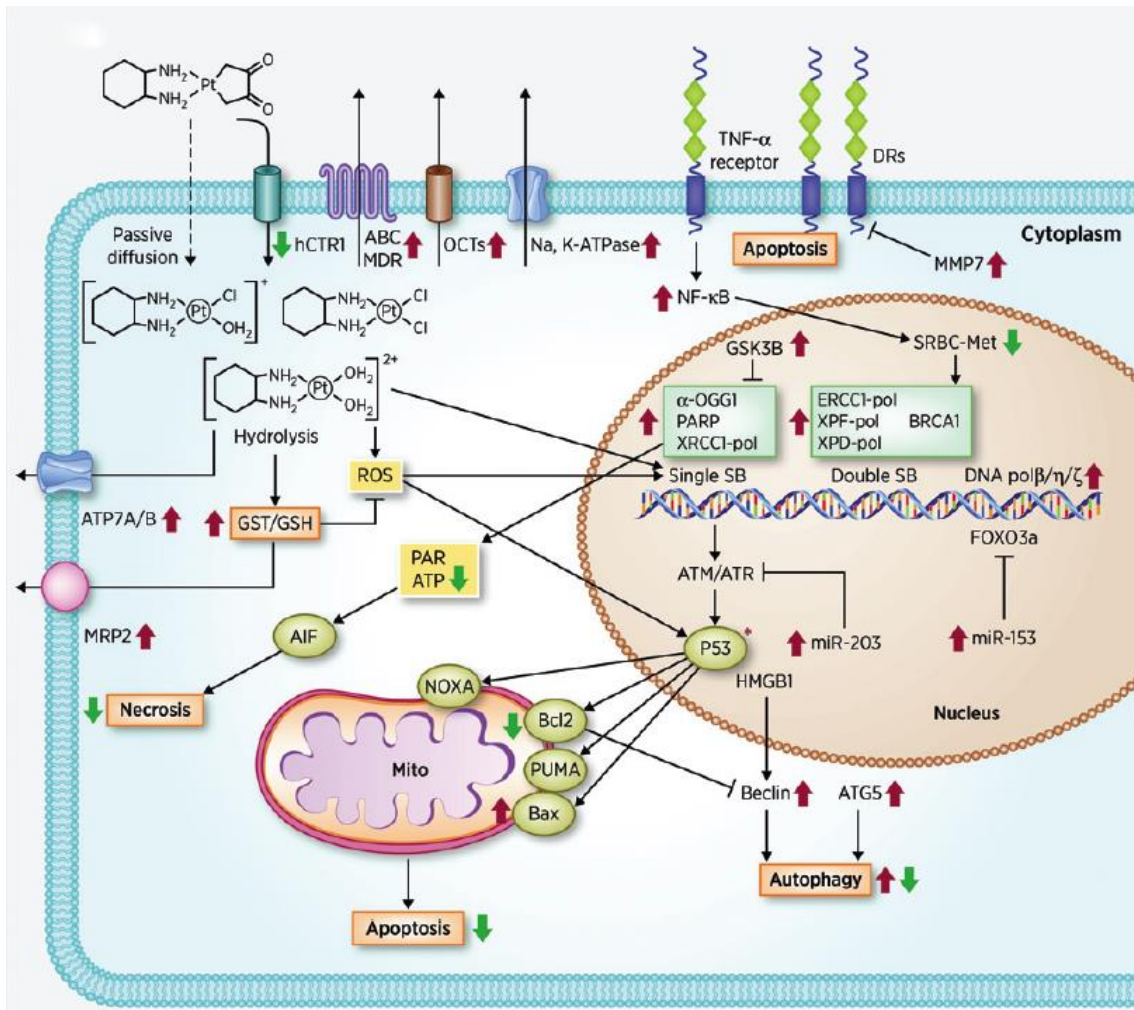
També la pròpia genètica individual pot influenciar en els processos de resistència fet que queda demostrat per l'evidència clínica de que no tots els pacients responen de la mateixa manera a la quimioteràpia. Aquestes diferències interindividuais poden ser degudes a canvis en les seqüències dels gens implicats en els mecanismes descrits anteriorment. Coneixent aquestes variacions, anomenades polimorfismes, es pot saber quin és el genotip del pacient i per tant, quina és la seva predisposició genètica a la resposta al fàrmac. Com detallarem més endavant, el nostre grup han demostrat que els polimorfismes en el gen de l'enzim TS juntament amb els de gens de reparació de l'ADN com *ERCC1*, *XRCC1* o *XPD* presenten valor predictiu de resposta a la quimioteràpia basada en 5-FU i OXA en pacients amb CCRa (77, 78).

A banda d'aquests factors, la resistència també pot venir donada per l'heterogeneïtat del tumor i del seu microambient, així com pels canvis epigenètics esdevinguts en les cèl·lules tumorals (79, 80). Paral·lelament, tots aquells canvis que provoquin alteracions en les vies implicades en la cinètica del cicle cel·lular així com en les vies d'activació de l'apoptosi tenen un pes important en el desenvolupament de la quimioresistència (81). Més recentment, la presència de cèl·lules mare en els tumors també ha estat relacionada amb un increment de la resistència a la quimioteràpia en diversos tipus de càncer (82).

En determinats casos, les cèl·lules tumorals poden esdevenir resistents a múltiples drogues alhora (fenotip *multidrug resistant*, MDR). Aquest fenomen apareix com a conseqüència de la sobreexpressió de proteïnes responsables del transport dels fàrmacs a la cèl·lula. Exemples d'aquestes proteïnes són: les proteïnes transportadores de la família ABC (*Adenosine-triphosphate binding cassette*), com MRP1, MRP2 i ABCG2 així com la Glicoproteïna P (83).

### **1.3.1. Resistència a oxaliplatí**

De la mateixa manera que succeeix amb altres agents quimioterapèutics, els tumors també poden presentar resistència a l'oxaliplatí. La resistència a oxaliplatí és un procés complex i multifactorial que implica un gran nombre de factors com ara alteracions en la captació, acumulació i eliminació del fàrmac, alteracions en la permeabilitat de les membranes cel·lulars, detoxificació del fàrmac per conjugació amb glutatió, alteracions en els sistemes de reparació del dany a l'ADN, alteració en les vies de mort cel·lular i canvis epigenètics. Els mecanismes moleculars de resistència a oxaliplatí han estat revisats recentment pel nostre grup (84) (Figura 9).



**Figura 9. Principals mecanismes associats a la resistència a oxaliplatí.** → activació; —| inhibició; ↑: augment de l'expressió; ↓: disminució de l'expressió; -pol: polimorfisme; -Met: metil·lat; Mito: mitocondria; DRs: receptors de mort; SB: trencaments de cadena simple. Adaptat de *Martinez-Balibrea i col., Mol. Cancer Ther. (2015) (84)*.

La reducció de la captació unida a un increment de l'eliminació es tradueix en una disminució dels nivells d'oxaliplatí presents a l'interior de la cèl·lula i per tant, en un decrement en el nombre d'adductes de platí-ADN formats. A tall d'exemple, diverses proteïnes transportadores de membrana encarregades de la captació de l'oxaliplatí com hCTR1 (*Human copper transporter 1*), o l'eliminació del mateix com ATP7A (*ATPase Cu transporting alpha polypeptide*) i ATP7B (*ATPase Cu transporting beta polypeptide*) han estat relacionades amb la resistència a oxaliplatí a nivell *in vitro* (85). També en pacients de CCRa tractats amb oxaliplatí, el nostre grup va demostrar que nivells elevats d'ATP7B s'associaven a un pitjor pronòstic (86). De la mateixa manera, la sobreexpressió de diferents transportadors de la família SLC (*solute carrier*) i ABC (*ATP-binding cassette*) ha estat associada a un augment de la resistència a oxaliplatí en diferents models cel·lulars (87, 88).

L'augment en la detoxificació dels fàrmacs platinats mitjançant la seva conjugació amb l'enzim Glutatió-S-Transferasa (GST) ha demostrat estar relacionat amb la resistència tot i que en el cas de l'oxaliplatí aquest efecte no està tan clar (89, 90). Pel contrari, diversos polimorfismes en el gen que codifica aquest enzim sí s'han relacionat amb la sensibilitat a l'oxaliplatí (91).

Les alteracions en les vies reparadores de l'ADN també constitueixen un important factor relacionat amb la resistència a l'oxaliplatí. Estudis realitzats en models *in vitro* han demostrat la implicació de certes proteïnes de la via NER, com ERCC1, XPF i XPG, en la sensibilitat a l'oxaliplatí [Revisat a (92)]. D'acord amb això, s'ha reportat un increment de l'expressió d'ERCC1 en línies de CCR i càncer d'ovari resistents a oxaliplatí (93) i també s'ha observat que la inhibició específica de XPF i XPG es tradueix en una disminució de la capacitat reparadora de l'ADN i un augment de la sensibilitat a oxaliplatí (94). A nivell clínic, s'ha descrit l'associació entre els nivells d'expressió d'ERCC1 en els tumors i la resposta al tractament en pacients tractats amb oxaliplatí [Revisat a (92)] i que la positivitat tumoral d'ERCC1 era un factor pronòstic en pacients amb CCR d'estadi III tractats amb esquemes basats en aquest derivat platinat (95). D'altra banda, alguns polimorfismes en els gens *ERCC1*, *XPD* i *XRCC1* s'han correlacionat amb la resposta i/o el TP dels pacients tractats amb esquemes de tractament que contenen oxaliplatí. Pel que fa als polimorfismes d'ERCC1, molts treballs s'han focalitzat en l'estudi de la mutació silenciosa [canvi de base citosina (C) per timina (T)] en el codó 118 d'ERCC1 en relació al pronòstic dels pacients tractats amb oxaliplatí. Així, mentre que resultats del nostre grup han demostrat el valor predictiu del genotip T/T, altres treballs han reportat una associació negativa o nul·la entre l'al·lel T i el pronòstic dels pacients tractats amb aquest agent platinat (77, 92). En relació a la via de reparació BER, s'ha demostrat que la substitució de l'aminoàcid arginina per àcid glutàmic en el codó 399 de la proteïna XRCC1 es correlaciona amb un menor TP i un pitjor pronòstic dels pacients amb CCRa tractats amb combinacions basades en oxaliplatí (78).

L'alteració dels mecanismes de mort cel·lular també representa un important mecanisme d'adquisició de resistència a l'oxaliplatí. Entre ells, el paper de la proteïna p53 ha estat focus d'atenció tot i que els resultats reportats són poc concloents. Així, la mutació de guany de funció de p53 (present en el 50% dels tumors humans) s'ha associat amb un increment de la resistència intrínseca a l'oxaliplatí (96). D'altra banda, certs estudis demostren que la inhibició de l'expressió de p53 mitjançant *siRNA* (*small interference RNA*) condueix a un increment de la resistència a oxaliplatí, però en canvi, en altres treballs aquesta correlació no queda

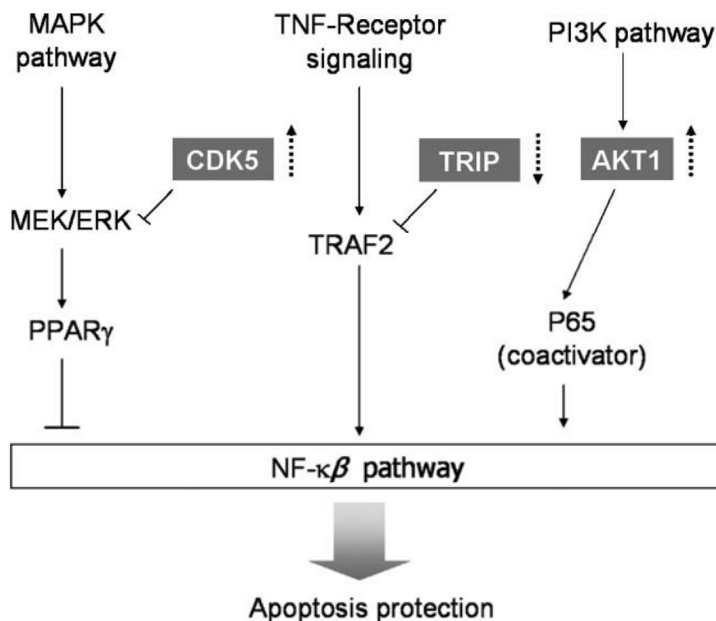
demostrada suggerint que l'estat mutacional de p53 representa un factor important, però no únic en la sensibilitat a oxaliplatí (87, 96).

En relació a la via apoptòtica intrínseca, la pèrdua del factor proapoptòtic Bax s'ha relacionat amb una disminució de la sensibilitat a oxaliplatí (97) i al contrari, la inhibició de l'expressió de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-xl produeix un efecte sensibilitzador (98, 99). La via extrínseca d'activació de l'apoptosi sembla que també pot afectar la resistència donat que el silenciament gènic de la metal·loproteasa 7 (MMP7) condueix a un augment de la sensibilitat a oxaliplatí mitjançant l'increment del receptor Fas i en conseqüència, l'activació de la mort cel·lular (100).

Tot i que menys estudiats, els mecanismes epigenètics com la metilació de l'ADN, la modificació d'histones i la presència de micro ARNs (*miRNAs*) també poden tenir un efecte en la resposta i resistència a oxaliplatí. Per exemple, com a conseqüència de l'adquisició de resistència a oxaliplatí, el gen *SRBC* s'hipermetila, silenciant-se la seva expressió i contribuint per mecanismes no descrits a la inefectivitat del platí en les línies resistents a aquest fàrmac. Aproximadament un 30% dels tumors primaris colorectals presenten aquesta alteració epigenètica el que es correlaciona amb un pitjor TP i SG quan els pacients són tractats amb esquemes de quimioteràpia basats en l'oxaliplatí (101).

Finalment, la hiperactivació de vies de senyalització intracel·lular que conflueixen en la transcripció de gens de supervivència i proliferació, com ara la via de Wnt o la de PI3K-Akt, també s'ha relacionat amb un increment en la resistència a oxaliplatí. En molts casos, el factor de transcripció nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), és un dels principals efectors d'aquestes vies [Revisat a (75)] i ha estat àmpliament associat amb fenòmens de resistència a fàrmacs. En aquest context, el nostre grup va analitzar les diferències a nivell transcriptòmic entre quatre línies de CCR sensibles i les seves corresponents línies derivades amb resistència adquirida a oxaliplatí, identificant 3 gens, *AKT1*, *CDK5* i *TRIP* les alteracions en l'expressió dels quals confluirien en una major activació de la via de senyalització NF- $\kappa$ B en les línies resistents (102) (Figura 10).





**Figura 10. Implicació d'AKT1, CDK5 i TRIP en la regulació de la via de senyalització de NF-κB.** Línies puntejades: estat de l'expressió d'aquests gens en les línies resistents a oxaliplatí en comparació a les línies sensibles; →: activació; —|: inhibició. *Martinez-Cardus i col. Mol Cancer Ther (2009)(102).*

NF-κB juga un paper molt important en el desenvolupament i la progressió del càncer, i la seva sobreactivació ha estat proposada com un important mecanisme de quimioresistència mitjançant la transcripció de gens antiapoptòtics i activadors de la proliferació cel·lular [Revisat a (103)]. Així doncs, aquest treball representa el punt de partida de la present tesi doctoral focalitzada en l'estudi de la implicació de NF-κB en el procés d'adquisició de resistència adquirida a oxaliplatí, així com de la possibilitat d'inhibir-lo farmacològicament com a estratègia de reversió d'aquest fenomen.

## 1.4. El factor de transcripció Nuclear kappaB (NF-κB)

### 1.4.1. Família de NF-κB

El factor de transcripció NF-κB fou descrit per primera vegada l'any 1986 per David Baltimore i Ranjan Sen com un factor modulador de la transcripció de la cadena lleugera de les immunoglobulines en els limfòcits B (104). Posteriorment s'ha evidenciat que NF-κB és un factor de transcripció nuclear dimèric d'expressió ubíqua implicat en la regulació de múltiples processos cel·lulars com inflamació, adhesió, proliferació, diferenciació, apoptosi i oncogènesi [Revisat a (105-107)].

NF- $\kappa$ B és un dímer constituït per proteïnes de la família Rel. En les cèl·lules dels mamífers, la família de NF- $\kappa$ B consta de 5 membres: RelA (p65), c-Rel, RelB, NF- $\kappa$ B1 (p50) i NF- $\kappa$ B2 (p52) (Figura 11), codificats pels gens: *RELA*, *REL*, *RELB*, *NFKB1* i *NFKB2*, respectivament. Aquestes proteïnes poden ser classificades en dues subfamílies o grups funcionals [Revisat a (108)]:

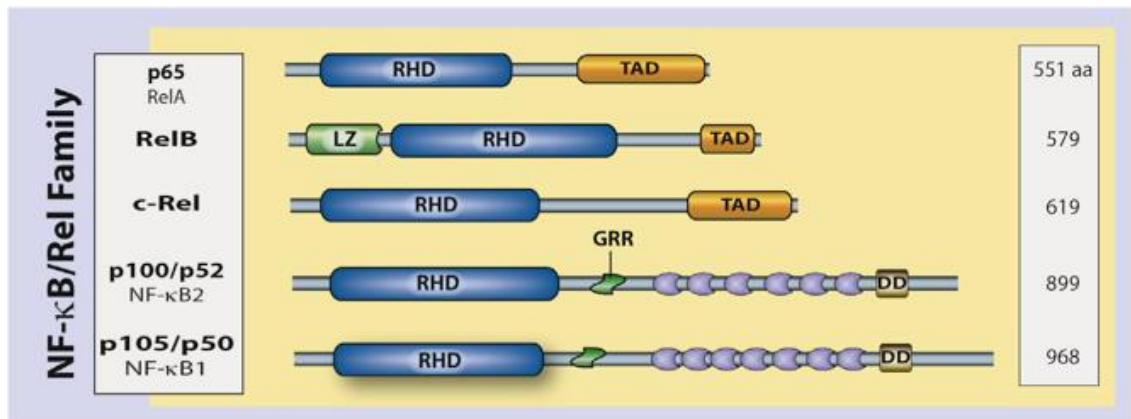
**Subfamília I** : inclou els membres amb domini TAD (*transcription activation domain*) en el seu extrem C-terminal: RelA, c-Rel i RelB. El domini TAD és necessari per a la regulació positiva de l'expressió gènica.

**Subfamília II** : inclou els membres sense domini TAD: NF- $\kappa$ B1 i NF- $\kappa$ B2. A diferència de la resta de membres de la família Rel, NF- $\kappa$ B1 i NF- $\kappa$ B2 són sintetitzats inicialment com a precursors, anomenats p105 i p100, essent posteriorment processats proteolíticament fins a generar les subunitats madures p50 i p52, respectivament. És per aquest motiu, que els membres d'aquesta subfamília no actuen com a activadors de la transcripció excepte en aquells casos en els que es troben formant dímers amb membres de la subfamília I.

En relació a la seva estructura, tots els membres de la família NF- $\kappa$ B presenten un domini N-terminal comú anomenat RHD (*Rel Homology Domain*). Aquest domini està format per 300 aminoàcids i és el responsable de la dimerització entre els diferents membres d'aquesta família així com de l'associació amb les proteïnes inhibidores I $\kappa$ B i la unió amb les seqüències consens  $\kappa$ B de l'ADN. El domini RHD conté també les seqüències de localització nuclear anomenades NLS (*Nuclear Localization Sequence*) necessàries per a la translocació nuclear de NF- $\kappa$ B. Malgrat que les funcions dels dominis RHD i TAD són diferents, ambdós dominis poden estar exposats a modificacions post-traduccionals que alhora poden afectar a l'activació transcripcional de NF- $\kappa$ B així com a la seva unió amb l'ADN [Revisat a (108)].

A la majoria de les cèl·lules, les proteïnes de la família de NF- $\kappa$ B es troben al citoplasma en forma inactiva formant homo i/o heterodímers. L'heterodímer p65/p50 constitueix la forma més abundant en les cèl·lules dels mamífers [Revisat a (109)] i en resposta a diferents estímuls, com ara un procés inflamatori o l'estrès oxidatiu, es transloca al nucli cel·lular. Un cop al nucli, els dímers poden unir-se a les regions promotores de gens que contenen les seqüències consens  $\kappa$ B (5'- GGGRNWYYCC - 3' on R representa bases puríniques, W representa adenina o timina, Y representa bases pirimidíniques i N representa qualsevol base), regulant-ne la transcripció [Revisat a (108)]. Malgrat que la majoria dels membres de la família actuen com a

activadors transcripcionals, certs dímers poden actuar també com a repressors. Així mentre que p65/p50, c-Rel/p50, p65/p65 i p65/c-Rel són complexes transcripcionalment actius, els homodímers de p50 i p52 es comporten com a repressors ja que en absència d'estímuls activadors, es troben units a les seqüències consens  $\kappa$ B, impedit la seva modificació [Revisat a (108)]. L'activació de la via promou el desplaçament d'aquests, permetent la unió dels dímers de NF- $\kappa$ B amb domini TAD (RelA, RelB o c-Rel) a les seqüències  $\kappa$ B de l'ADN [Revisat a (110)].

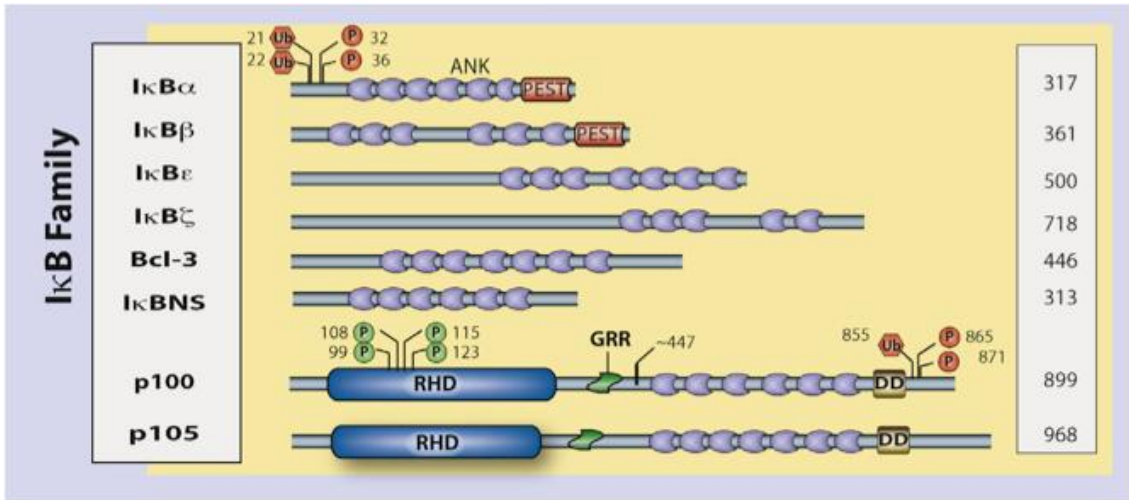


**Figura 11. Esquema dels membres de la família de NF- $\kappa$ B.** El nombre d'aminoàcids de cada proteïna es troba indicat a la dreta de la imatge. **RHD:** *Rel homology domain*; **TAD:** *transactivation domain*; **GRR:** *glycine rich region*; i **DD:** *death domain*. Hayden MS, Ghosh S. *Semin Immunol* (2014)(107)

#### 1.4.2. Inhibidors de NF- $\kappa$ B: Proteïnes I $\kappa$ B

L'activitat de NF- $\kappa$ B es troba regulada principalment per la interacció amb les proteïnes inhibidores I $\kappa$ B. En estat basal, els dímers de NF- $\kappa$ B es troben predominantment retenguts al citoplasma cel·lular mitjançant la formació de complexes amb les proteïnes I $\kappa$ B [Revisat a (108)].

En cèl·lules de mamífer, han estat descrites sis isoformes de la proteïna I $\kappa$ B: I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , I $\kappa$ B $\gamma$ , I $\kappa$ B $\delta$  i Bcl-3 (Figura 12). Totes elles tenen en comú la seva estructura tridimensional i difereixen en el nombre de repeticions dels dominis d'anquirina responsables de la interacció amb el domini RHD dels dímers de NF- $\kappa$ B. La unió de les proteïnes I $\kappa$ B amb els dímers de NF- $\kappa$ B produeix l'ocultació de la seqüència de localització nuclear NLS impedit, per tant, la translocació nuclear del factor de transcripció [Revisat a (110)].



**Figura 12. Esquema dels membres de la família IκB.** El nombre d'aminoàcids de cada proteïna es troba indicat a la dreta de la imatge. Les modificacions post-traduccionals que influeixen en l'activació i degradació de les IκB, així com fosforilacions i ubiquitinitzacions estan representades amb les lletres P i Ub, respectivament. **ANK**: regió amb repeticions d'anquirina; **DD**: death domain; **RHD**: Rel homology domain; **GRR**: glycine rich region. Hayden MS, Ghosh S. *Semin. Immunol.* (2014)(107)

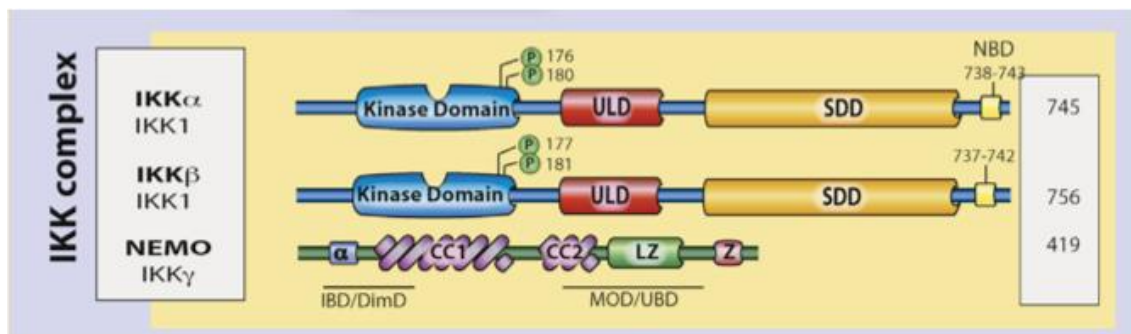
IκBα (*NFKBIA*) i IκBβ (*NFKBIB*) són les isoformes més abundants en la majoria de les cèl·lules i per tant, són les responsables de la regulació de gran part dels efectes de NF-κB. Concretament, IκBα és la isoforma millor caracteritzada i que presenta una cinètica de degradació més ràpida (111). En resposta a diferents estímuls, entre els quals destaquen citocines [p. ex. Factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) i Interleuquina 1 beta (IL-1β)], factors de creixement [p. ex. Factor de creixement epidèrmic (EGF)], lipopolisacàrids bacterians (LPS), productes virals, radiació ionitzant i llum ultravioleta (UV), ROS i dany a l'ADN [Revisat a (112)], IκBα és fosforilada en els residus Ser32 i Ser36 per un complex de serina-treonina quinases anomenat IKKs (IκB quinases), amb la consegüent alliberació del dímer de NF-κB, principalment p65/p50.

Un cop fosforilada, IκBα es poliubiquitinitza en el residu Lys21 i Lys22 i és degradada pel proteasoma 26S (113). Malgrat aquesta ràpida degradació, l'absència de IκBα a la cèl·lula és transitòria ja que l'activació de NF-κB induïx de forma ràpida la transcripció *de novo* de l'inhibidor a l'unir-se al motiu κB present en el seu promotor. S'ha observat que el tractament amb TNFα en línies cel·lulars de CCR es tradueix en una ràpida degradació de IκBα així com en la seva reexpressió al cap d'una hora post-estimulació (114). Un cop resintetitzada, IκBα pot unir-se als dímers de NF-κB, dissociar-los de l'ADN i, gràcies a la seqüència d'exportació nuclear (NES), translocar-los al citoplasma cel·lular on romandran de nou com a formes inactives (115). Així doncs, IκBα actua impedit una activació desmesurada del factor de transcripció, essent un dels primers gens que es transcriuen un cop NF-κB entra al nucli.

### 1.4.3. I $\kappa$ B quinases (IKKs)

Com s'ha indicat anteriorment, la fosforilació de les proteïnes I $\kappa$ B requereix l'activació catalítica d'una sèrie de serina-treonina quinases anomenades IKKs que es troben al citoplasma cel·lular formant un complex proteic. El complex IKK es troba constituït per tres subunitats: dos amb domini quinasa, IKK $\alpha$  (o IKK1) i IKK $\beta$  (o IKK2), i una tercera subunitat reguladora, IKK $\gamma$  també anomenada NEMO (*NF- $\kappa$ B essential regulator*) [Revisat a (116, 117)] (Figura 13).

Malgrat que tant IKK $\alpha$  com IKK $\beta$  poden fosforilar I $\kappa$ B $\alpha$  en els residus Ser32 i Ser36 així com I $\kappa$ B $\beta$  en els residus Ser19 i Ser23 totes dues presenten una afinitat superior per I $\kappa$ B $\alpha$ , fet que justifica les diferències observades en la cinètica de degradació entre les dues isoformes. L'activació de les IKKs es produeix per la fosforilació de dos residus de serina, el 176 i 180 per a IKK $\alpha$ , i el 177 i 181 en el cas de IKK $\beta$  (118). Aquesta fosforilació és produïda per efecte de diverses quinases, entre les que destaquen NIK, MEKK1, MEKK2, MEKK3, TAK1, GSK3b, PKC, PDK1 i AKT, o bé per autoactivació mediada per trans-fosforilació [Revisat a (119) i (103)].



**Figura 13. Esquema dels membres de la família IKK.** El nombre d'aminoàcids de cada proteïna es troba indicat a la dreta de la imatge. Les modificacions post-traduccional que influeixen en l'activació i degradació de les I $\kappa$ B, així com fosforilacions i ubiquitinacions estan representades amb les lletres P i Ub, respectivament. **ULD**: ubiquitin like domain; **SDD**: scaffolding and dimerization domain; **LZ**: leucine zipper domain; **CC**: coiled-coil domain. *Hayden MS, Ghosh S. Semin Immunol. (2014)(107)*

### 1.4.4. Senyalització de la via NF- $\kappa$ B

En cèl·lules de mamífer, s'han descrit tres mecanismes diferents d'activació de la via de NF- $\kappa$ B: la via clàssica (o canònica), la via no clàssica (o no canònica) i la via atípica:

#### 1.4.4.1. Via canònica d'activació de NF- $\kappa$ B

La via canònica o clàssica d'activació de NF- $\kappa$ B (Figura 14) representa la forma més comú d'activació en la majoria de tipus cel·lulars i participa en la iniciació dels processos de resposta immunitària innata i en la maduració de les cèl·lules que participaran en la resposta immunitària adaptativa. Es basa en l'activació de dímers de NF- $\kappa$ B formats per RelA (p65) o c-Rel i p50 essent p65/p50 l'heterodímer més abundant en cèl·lules de mamífer. Aquesta via s'activa per efecte de l'estimulació de diversos receptors proinflamatoris, com els receptors de la família del TNF (TNFR), els *Toll-Like receptor* (TLRs) o receptors d'interleuquines, com el de la interleuquina-1 (IL-1R). L'estimulació d'aquests receptors es tradueix en la fosforilació de la quinasa IKK $\beta$  en el residu Ser177 i 181 principalment per la quinasa TAK1 i la seva consegüent activació. Seguidament, IKK $\beta$  fosforila I $\kappa$ B $\alpha$  en els residus Ser32 i Ser36 i aquesta es poliubiquitinitza i és degradada pel proteasoma 26S amb la consegüent alliberació de l'heterodímer p65/p50 [Revisat a (120)].

#### 1.4.4.2. Via no canònica d'activació de NF- $\kappa$ B

La via no canònica o no clàssica (Figura 14) té com a efector l'heterodímer format per les subunitats RelB/p52 i s'activa a través de diferents tipus de receptors, entre els que podem destacar el de la limfotoxina  $\beta$  (LT $\beta$ R), el del factor d'activació de cèl·lules B (BAFFR), i el de CD40, TNFR2, RANK i Fn14. L'estimulació d'aquests receptors produeix l'activació de la quinasa NIK (*NF- $\kappa$ B inducing kinase*) que alhora fosforila i activa la quinasa IKK $\alpha$  en els residus Ser 176 i 180. IKK $\alpha$  fosforila la subunitat p100 que resulta en la seva ubiquitinització i parcial degradació donant lloc a la subunitat p52. Finalment aquesta última s'uneix a RelB i l'heterodímer p52/RelB es transloca al nucli cel·lular [Revisat a (121)].

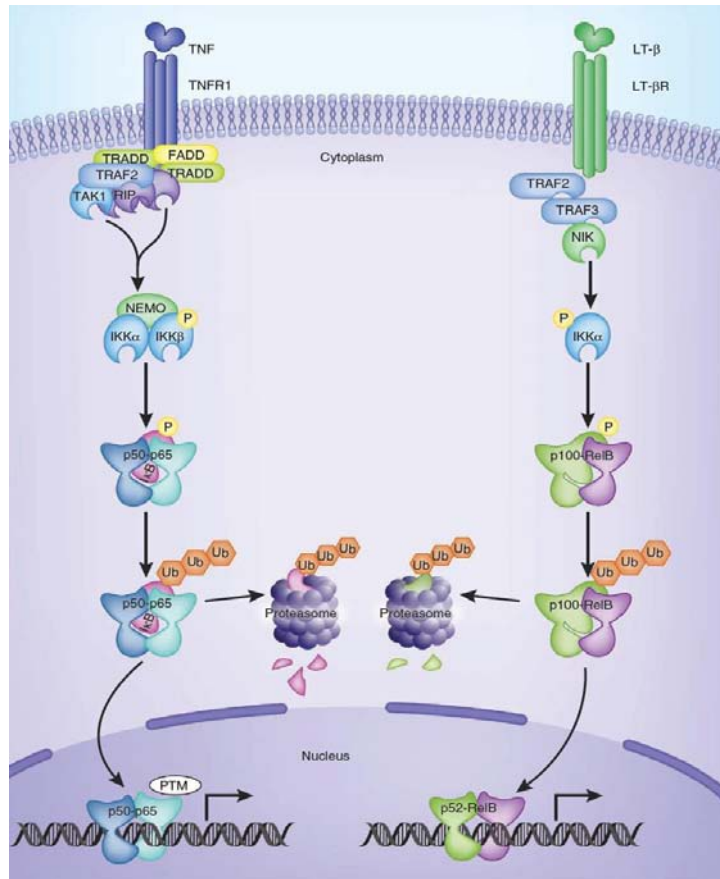


Figura 14. Vies d'activació canònica (esquerra) i no canònica (dreta) de NF-κB. *Oeckinghaus A Nat Immunol (2011)(120)*

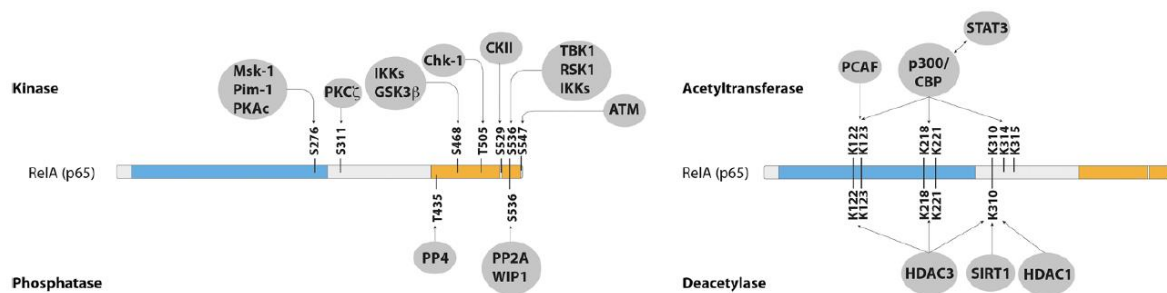
#### 1.4.4.3. Via atípica d'activació de NF-κB

A banda de la via canònica i no canònica, existeixen diverses rutes complementàries d'activació de NF-κB anomenades vies atípiques. Una d'aquestes, explicada amb detall més endavant, és la via d'activació iniciada per senyals genotòxics i conduïda per l'activació de la quinasa ATM i la ubiquitinització de la subunitat NEMO del complex IKK (122, 123). Una segona via atípica d'activació està basada en la fosforil·lació de IκBα en el residu Tyr42 en resposta a determinats estímuls com el peròxid d'hidrògen, la llum UV o l'eritropoietina. Aquesta fosforil·lació indueix la separació de IκBα del dímer de NF-κB però no implica la seva degradació per part del proteasoma com succeeix en resposta a la fosforil·lació en els residus de serina. Així doncs, en aquest cas la inducció de la via de NF-κB no implica la disminució dels nivells del seu inhibidor ni la seva conseqüent síntesi en les primeres hores post-activació (124-126).

### 1.4.5. Regulació de l'activació transcripcional de NF- $\kappa$ B mitjançant les modificacions post-traduccionals de p65

A banda de la fosforilació i la subsegüent degradació de I $\kappa$ B, s'ha descrit que calen una sèrie de modificacions post-traduccionals, especialment en p65, per tal de que es produeixi una activació completa de NF- $\kappa$ B. Així, p65 pot fosforilarse (a través de les IKKs, o per quinases d'altres vies de senyalització) en diferents residus Ser o Thr i acetil·lar-se en residus Lys, el que produeix canvis en la seva afinitat per l'inhibidor I $\kappa$ B o pels dominis  $\kappa$ B de l'ADN. Per exemple, en resposta a estímuls proinflamatoris les quinases IKK $\alpha$  i IKK $\beta$  participen en la regulació de l'activitat transcripcional de p65 mitjançant la fosforilació d'aquesta proteïna en els residus Ser468 i Ser536 (127-130).

A la Figura 15 es troben representades les principals modificacions post-traduccionals de p65:



**Figura 15. Modificacions post-traduccionals de p65.** S: Serina; T: Treonina; K: Lisina. *Hoesel B. Mol Cancer (2013)(119)*

### 1.4.6. Paper de NF- $\kappa$ B en inflamació i càncer

La inflamació és un mecanisme de resposta immunològica innata que s'activa en resposta a estrès físic, fisiològic i/o oxidatiu, i que es troba associat principalment a l'activació de la via canònica de senyalització de NF- $\kappa$ B. La inflamació crònica pot produir dany tissular, malalties autoimmunes, malalties degeneratives i càncer mitjançant l'increment de l'estrès cel·lular, la captació de factors proinflamatoris i l'acumulació del dany en l'ADN. En els processos tumorals, la inflamació juga un paper dual ja que per una banda inhabilita el reconeixement de les cèl·lules tumorals per part del sistema immunitari, i per altra promou la proliferació cel·lular descontrolada i la inestabilitat genètica que condueixen a l'aparició de mutacions oncogèniques [Revisat a (131)].



El factor de transcripció NF- $\kappa$ B ha estat proposat com un dels principals nexes entre els processos inflamatoris i la carcinogènesi, promovent la iniciació i el desenvolupament tumoral. En zones d'inflamació, els ROS i les citoquines com el TNF $\alpha$ , la IL-1, l'Interleuquina 6 (IL-6) i l'Interleuquina 8 (IL-8) alliberades per neutròfils i macròfags activen la via de NF- $\kappa$ B promovent la formació d'un cycle de retroalimentació positiva que promou l'activació d'aquesta via de senyalització en altres cèl·lules presents en el lloc d'inflamació i que contribueix a la formació d'un microambient protumorigènic que afavoreix la proliferació, supervivència i migració cel·lular, així com l'angiogènesi, la invasió i la metàstasi [Revisat a (132)].

L'estudi de l'activació de NF- $\kappa$ B en models murins de CCR associat a colitis (CAC) va demostrar el paper d'aquest factor de transcripció en la carcinogènesi intestinal. [Revisat a (4)].

La sobreactivació de la via de NF- $\kappa$ B s'ha observat en molts tumors, tant d'origen hematològic com en tumors sòlids com el càncer de mama (133), pròstata (134), ovari (135), pàncrees (136) i tiroides (137); i també en CCR (138), càncer gàstric (139), hepatocarcinoma (140) i melanoma (141), entre d'altres. En el cas concret del CCR, l'activació constitutiva de NF- $\kappa$ B ha estat observada en el 66% de les línies cel·lulars estudiades i entre el 40 i el 60% dels pacients amb aquesta patologia [Revisat a (142)] .

L'elevada activitat de NF- $\kappa$ B en els tumors pot tenir diferents causes com ara, les mutacions en els gens de la via de NF- $\kappa$ B, les quals s'han observat en diferents tipus de tumors, principalment en limfomes (143, 144) però també en alguns tumors sòlids (145). Tanmateix, l'amplificació gènica i la translocació cromosòmica de regions on es troben gens que codifiquen per a membres de la família NF- $\kappa$ B representen també dos importants mecanismes d'hiperactivació d'aquest factor de transcripció en diferents tipus de limfoma [Revisat a (146)].

Una altra causa és la hiperactivitat de la via de transducció PI3K/Akt la qual s'ha descrit en melanomes (147) o leucèmies mieloides (148). Akt pot activar NF- $\kappa$ B per fosforilació directa de les quinases IKK i de p65 o de manera indirecta estimulant l'activació del complex IKK a través de mTOR o MAP3K [Revisat a (103)]. Una darrera causa la constitueix la persistent i perllongada estimulació autocrina i/o paracrina amb factors de creixement i citoquines a la que es troben exposades les cèl·lules tumorals i que es tradueix en una activació constant de la via de senyalització de NF- $\kappa$ B [Revisat a (103)].

Segons Hanahan i Weinberg, la fisiologia de la cèl·lula tumoral està caracteritzada per alteracions essencials, entre les quals trobem: autosuficiència en el creixement, insensibilitat als senyals inhibitoris del mateix, evasió de l'apoptosi, potencial replicatiu il·limitat, capacitat angiogènica, capacitat invasiva i potencial metastàtic, inestabilitat genòmica i mutació (131). És important destacar que un gran nombre d'aquests processos estan orquestrats per l'acció de gens regulats pel factor de transcripció NF- $\kappa$ B (Figura 16).

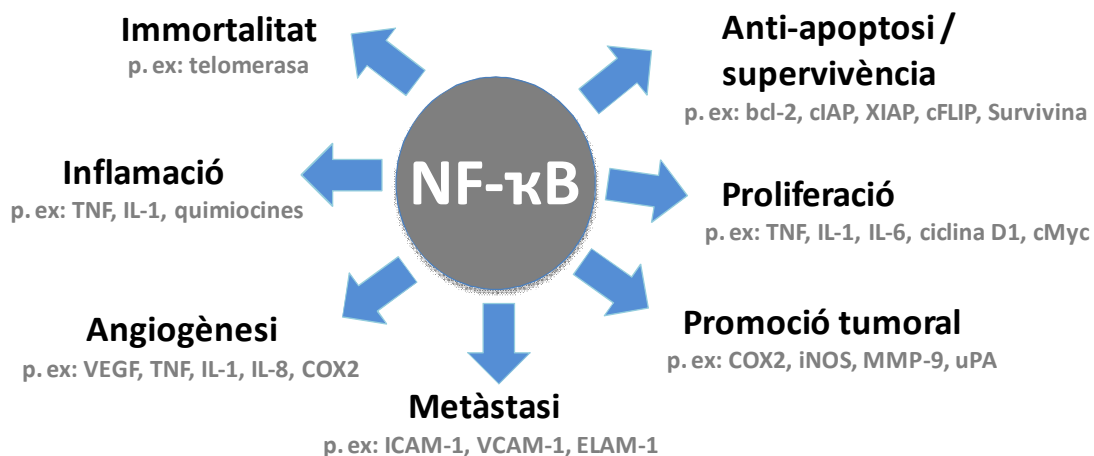


Figura 16. Gens protumorals induïts per l'activació de NF- $\kappa$ B involucrats en supervivència cel·lular, proliferació, angiogènesi, inflamació, invasió i metàstasi. Adaptat de Aggarwal B i col. *Cancer cell* (2004) (149)

#### 1.4.6.1. Paper de NF- $\kappa$ B en la proliferació cel·lular i l'apoptosi

NF- $\kappa$ B promou la transcripció de tota una sèrie de gens implicats en la supressió de la mort cel·lular entre els que destaquen els membres de la família de proto-oncogens Bcl-2 com el propi Bcl-2, Bcl-xL i Bfl-1/A1 [Revisat a (103)].

Un segon grup de proteïnes antiapoptòtiques regulades per NF- $\kappa$ B són les anomenades proteïnes inhibidores de l'apoptosi (IAPs, *Inhibitor of apoptosis proteins*), que actuen unint-se a les caspases i procaspases inhibint-ne la seva funció. Entre les més importants podem destacar c-IAP1, c-IAP2, XIAP i Survivina [Revisat a (150)]. L'expressió de Survivina en els tumors colorectals és un factor de mal pronòstic i s'associa amb la malaltia metastàtica (151, 152). En relació al tractament amb oxaliplatí, s'ha descrit que la inhibició específica de Survivina i Bcl-2 mitjançant *siRNA* incrementa la sensibilitat a aquest fàrmac en línies cel·lulars de càncer de pròstata metastàtic (99).

Cal fer referència a que en determinats tipus cel·lulars i sota estímuls concrets, NF- $\kappa$ B pot activar la transcripció de gens proapoptòtics. Concretament, aquest fenomen ha estat observat en limfòcits B, limfòcits T, neurones i cèl·lules endotelials [Revisat a (153)].

NF- $\kappa$ B pot controlar la proliferació cel·lular a través de l'activació de la transcripció de gens que codifiquen proteïnes reguladores del cicle cel·lular, com les Ciclines Ds (Ciclina D1, D2 i D3), la quinasa CDK2 i c-myc, entre d'altres [Revisat a (146)]. En concret, la Ciclina D1 juga un paper important en el desenvolupament tumoral, regulant el pas de la fase G1 a la fase S del cicle cel·lular mitjançant la fosforilació de la proteïna del Retinoblastoma (Rb). La sobreexpressió d'aquesta proteïna, així com l'amplificació o translocació de la regió cromosòmica on es troba situat el gen que la codifica (*CCND1*) ha estat observada en diferents tipus de tumor [Revisat a (103)]. També s'ha descrit que la inhibició de l'expressió de Ciclina D1 es tradueix en un augment de la sensibilitat a cisplatí i 5-FU en cèl·lules de càncer de pàncrees (154, 155).

#### 1.4.6.2. Paper de NF- $\kappa$ B en l'angiogènesi

La neovascularització dels tumors és un procés essencial per al seu desenvolupament i que requereix l'alliberació de factors proangiogènics per part de la pròpia cèl·lula tumoral i/o de les cèl·lules del microambient tumoral. En aquest sentit, NF- $\kappa$ B regula la transcripció de factors proangiogènics com el VEGF i de diverses quimiocines com la IL-8, CXCL1 (Gro- $\alpha$ ), CXCL2 (Gro- $\beta$ ) i MCP-1, entre d'altres [Revisat a (112) i (142)] i s'ha descrit que l'activació constitutiva de NF- $\kappa$ B en cèl·lules de CCR s'associa amb un increment en l'expressió d'algunes d'aquestes quimiocines (156). D'altra banda, el bloqueig de la via de NF- $\kappa$ B mitjançant la introducció d'una forma mutada de I $\kappa$ B $\alpha$  resistent a fosforilació i degradació en models de melanoma, càncer d'ovari i càncer de pròstata, suprimeix l'expressió de VEGF i IL-8 tant a nivell *in vivo* com *in vitro* (135, 157, 158).

Un altre gen regulat per NF- $\kappa$ B i que participa activament en el procés d'angiogènesi és la Ciclooxygenasa 2 (COX-2), un enzim proinflamatori responsable de la conversió de l'àcid araquidònic a prostaglandines. La sobreexpressió de COX-2 ha estat àmpliament observada en diferents tipus tumorals, inclòs el CCR [Revisat a (103)], en el que es tradueix en un augment en la síntesi de factors proangiogènics com VEGF o TGF- $\beta$  (159). A més a més, s'ha demostrat el paper de COX-2 en la quimioresistència a diversos fàrmacs utilitzats en la teràpia del CCR, com l'oxaliplatí (160) o el CPT-11 (161).

### 1.4.6.3. Paper de NF- $\kappa$ B en migració, invasió i metàstasi

NF- $\kappa$ B participa en la transcripció de tota una sèrie de gens implicats en processos de migració, invasió i metàstasi com ara aquells que codifiquen per a metal·loproteïnases de matriu (MMPs). Les MMPs, com MMP-2, MMP-3 o MMP-9, degraden la matriu extracel·lular facilitant la migració cel·lular i la invasió d'altres teixits [Revisat a (162)]. Alhora, l'activació de NF- $\kappa$ B també es tradueix en la transcripció de molècules d'adhesió que faciliten l'extravasació de les cèl·lules tumorals com VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule-1*), ELAM-1 (*Endothelial leukocyte adhesion molecule-1*) i ICAM-1 (*Intercellular adhesion molecule-1*) (163).

El procés de transició epiteli-mesènquima (EMT) és clau en la disseminació a distància dels tumors sòlids (i també en l'embriogènesi, carcinogènesi, recurrència tumoral i quimioresistència) i en ell hi juga un paper molt important NF- $\kappa$ B. Durant l'EMT, les cèl·lules epitelials perden les seves característiques i adquireixen propietats mesenquimals, com la pèrdua d'adhesió cel·lular, augment de la motilitat i invasivitat, resistència a l'apoptosi i canvis morfològics [Revisat a (164)]. S'ha demostrat que el tractament amb TNF $\alpha$  en cèl·lules de càncer de mama promou l'EMT mitjançant la sobreexpressió d'un gen diana de NF- $\kappa$ B, el repressor transcripcional Twist-1 (165) i que la inhibició de la via de NF- $\kappa$ B reverteix aquest procés, suggerint el paper central de NF- $\kappa$ B no només en la iniciació sinó també en el manteniment del EMT (166).

Per últim, NF- $\kappa$ B pot regular la migració i metàstasi a través de la transcripció d'altres gens com ara el receptor de quimiocines CXCR4 (167).

### 1.4.7. Activació de NF- $\kappa$ B i quimioteràpia

S'ha demostrat que els agents danyants de l'ADN com el paclitaxel, la vimblastina, la vincristina, la doxorubicina, la daunomicina, el tamoxifè, el 5-FU, el CPT-11, el cisplatí i l'oxaliplatí, entre d'altres poden activar la via de senyalització de NF- $\kappa$ B [Revisat a (168)].

Els mecanismes pels quals els fàrmacs quimioterapèutics indueixen l'activació de NF- $\kappa$ B són poc coneguts però s'ha demostrat que en resposta al dany genotòxic, la proteïna quinasa ATM s'activa i fosforila la proteïna NEMO en el residu Ser85 el que promou la seva mono-ubiquitinització i exportació al citoplasma formant un complex amb ATM. Ja al citoplasma, l'heterodímer NEMO-ATM pot associar-se amb el complex de quinases IKK, activar-lo i iniciar la cascada de senyalització de NF- $\kappa$ B (122, 123).

Diferents fàrmacs utilitzats en el tractament dels pacients amb CCR com el CPT-11 i el 5-FU han demostrat la capacitat d'activar aquesta via en diferents línies cel·lulars de CCR (169-172).

Els compostos platinats, com el cisplatí, el carboplatí o l'oxaliplatí, també poden activar la via de NF- $\kappa$ B mitjançant la producció de ROS i el consegüent dany oxidatiu en l'ADN [Revisat a (84)]. En relació a l'oxaliplatí, s'ha demostrat que l'administració d'aquest fàrmac indueix l'activació de NF- $\kappa$ B en models cel·lulars de càncer de pròstata (99) i CCR (173).

#### **1.4.8. NF- $\kappa$ B com a diana terapèutica en càncer**

Atès el paper de la via de senyalització de NF- $\kappa$ B en el desenvolupament i la progressió tumoral així com en els processos d'adquisició de quimioresistència, en les darreres dècades s'han explorat noves estratègies terapèutiques consistents en la supressió de l'activitat de NF- $\kappa$ B en les cèl·lules tumorals. La inhibició farmacològica de NF- $\kappa$ B es pot assolir actuant a diferents nivells en la seva via de senyalització, podem bloquejar la via per sobre del complex de quinases IKK (l·ligands, receptors, proteïnes adaptadores), a nivell del complex IKK (supressió de l'activació de les IKKs, estabilització de I $\kappa$ B) o per sota del complex IKK (translocació nuclear de NF- $\kappa$ B i unió a l'ADN). Dins de l'ampli ventall d'inhibidors de NF- $\kappa$ B (aproximadament uns 700 descrits) [Revisat a (174)] els millor caracteritzats poden agrupar-se en : inhibidors del complex de quinases IKK, AINEs, agents immunomoduladors, inhibidors del proteasoma i compostos d'origen natural [Revisat a (103)]. Malgrat que un gran nombre d'aquests compostos han demostrat resultats prometedors en models preclínic, la seva eficàcia clínica no ha estat ben establerta. De fet, actualment l'únic inhibidor farmacològic de NF- $\kappa$ B aprovat per la FDA per a ús clínic és el Bortezomib, un inhibidor del proteasoma que és utilitzat en el tractament de patologies hematològiques com el mieloma múltiple o la leucèmia de cèl·lules T [Revisat a (103)].

La inhibició de NF- $\kappa$ B es tradueix en una potenciació de l'efecte dels fàrmacs quimioterapèutics i de la radioteràpia, posant de relleu el potencial terapèutic de la combinació de la quimioteràpia clàssica amb inhibidors de NF- $\kappa$ B. Així, s'ha observat un efecte beneficiós del tractament combinat de FOLFOX i Bortezomib en pacients amb CCR (175), un increment de la sensibilitat cel·lular a oxaliplatí mitjançant la inhibició específica de p65 amb *siRNA* (176, 177) i un potenciament de l'efecte de l'oxaliplatí mitjançant inhibidors farmacològics de NF- $\kappa$ B en models cel·lulars de CCR (65, 99, 173) i càncer de pàncrees metastàtic (99).

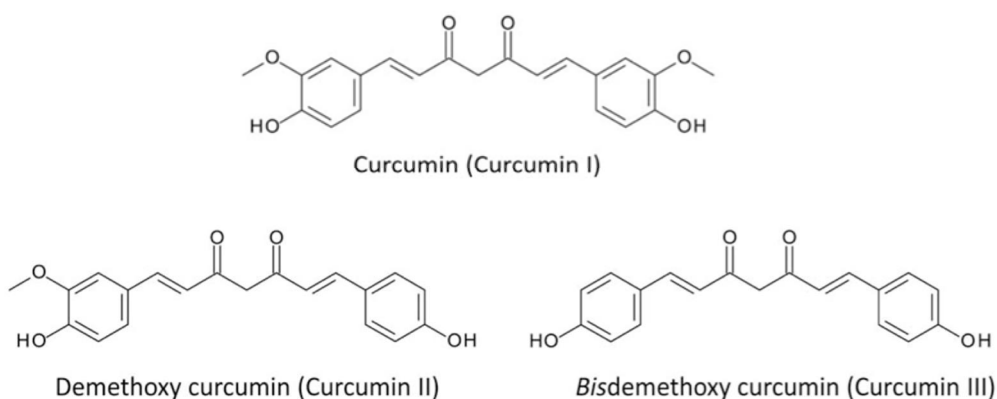
Un dels principals obstacles de la terapia antitumoral basada en la inhibició de NF-κB radica en la dificultat de trobar compostos farmacològics capaços de bloquejar l'activitat oncogènica de NF-κB sense interferir en les seves funcions fisiològiques.

Un gran nombre de compostos naturals amb activitat antitumoral han demostrat la capacitat d'inhibir la via de senyalització de NF-κB així com l'expressió dels seus gens diana. En aquest sentit, la present tesi doctoral està focalitzada en l'ús de la curcumina, un potent inhibidor de la via de senyalització de NF-κB, per tal d'avaluar l'efecte de la inhibició d'aquest factor de transcripció en la reversió de resistència a oxaliplatí.

## 1.5. Curcumina

### 1.5.1. Aspectes generals

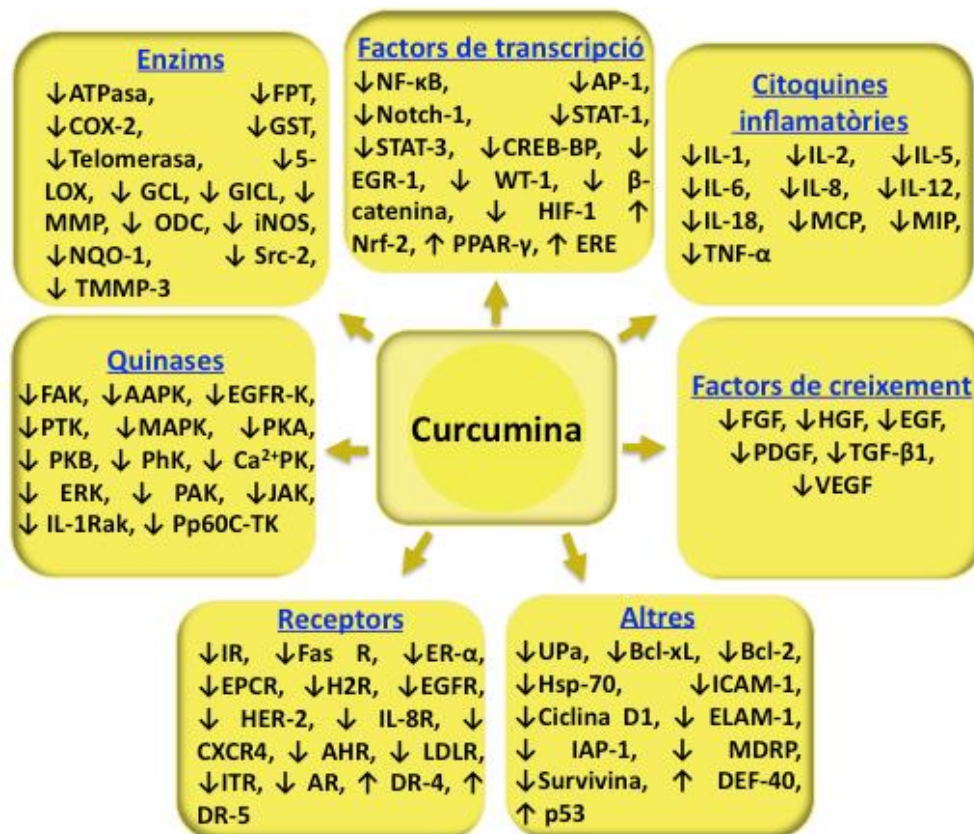
La curcumina (*diferuloylmethane*) és un polifenol natural hidrofòbic i un dels principals curcuminoids (77% curcumin, 17% demethoxycurcumin i 3% bis-demethoxycurcumin) derivats de l'arrel de la planta *Curcuma longa* (Figura 17).



**Figura 17.** Principals curcuminoids presents en l'arrel de la planta *Curcuma longa*. Kurita T., Makino Y. *Anticancer Res* (2013)(178).

La curcumina s'utilitza habitualment com a espècie o colorant en alimentació, però ha estat emprada durant molt segles en la medicina tradicional índia i xinesa degut a les seves propietats antioxidants, antisèptiques, analgèsiques, antimalàriques i antiinflamatòries. El potencial terapèutic de la curcumina s'ha demostrat en diferents malalties com la diabetis, l'artritis reumatoide, l'obesitat, la hipercolesterolèmia, l'arteriosclerosi, les malalties neurodegeneratives i autoimmunes, l'esclerosi múltiple i l'alzheimer, entre d'altres [Revisat a

(179)]. El potencial de la curcumina en la prevenció i tractament de diferents tipus de càncer ha estat demostrat tant a nivell *in vitro* com *in vivo* i s'ha correlacionat amb les seves propietats antiinflamatòries, antioxidants, antiapoptòtiques, antiproliferatives, antiangiogèniques i antimetastàsiques [Revisat a (180)]. L'evidència científica indica que els efectes pleiotròpics de la curcumina depenen de la seva capacitat d'interactuar i regular múltiples dianes moleculars. Així doncs, la curcumina és capaç de modular l'expressió de citokines inflamatòries, factors de creixement i els seus receptors, enzims, proteïnes quinasa, molècules d'adhesió, proteïnes apoptòtiques i proteïnes implicades en el cicle cel·lular. A més, pot modificar també l'activitat de diversos factors de transcripció alterant les vies de senyalització en les que estan implicats [Revisat a (181)] (Figura 18).



**Figura 18. Dianes moleculars modulades per la Curcumina.** ↑ Increment de l'expressió, ↓ disminució de l'expressió. Adaptat de Shanmugam i col. *Molecules* (2015) (182).

Estudis epidemiològics han demostrat una menor incidència de càncer (incloent el CCR) a la Índia, on tradicionalment s'ha utilitzat la cúrcuma a nivell gastronòmic (183). En un estudi dut a terme per la Universitat de Leicester sobre la incidència de càncer en la població del sud d'Àsia (Índia, Pakistan i Bangla Desh) es va demostrar que la relativa al CCR en individus d'edat avançada era menor en comparació als individus joves. Els autors d'aquest estudi van suggerir

que aquest fet podria estar relacionat amb el fet que la població de més edat manté un estil de vida i una dieta més tradicional basada en l'ús d'espècies com la cúrcuma (184).

### 1.5.2. Biodisponibilitat de la Curcumina

Un dels aspectes més discutits en relació al tractament amb curcumina oral és la seva baixa biodisponibilitat sistèmica degut a la seva baixa absorció i ràpida metabolització i eliminació. S'ha observat que la biodisponibilitat i els nivells de curcumina en sang són baixos després de l'administració oral d'aquest compost, tant en animals com en humans (185, 186). La curcumina absorbida es metabolitza principalment per glucoronidació i sulfatació al fetge, mucosa colònica i ronyons (187). La seva excreció es produeix bàsicament a través de les femtes (188). La seva metabolització produeix diversos metabòlits, com la tetrahydrocurcumina, l'hexahydrocurcumina, l'octahydrocurcumina i l'hexahydrocurcuminol, els quals han demostrat propietats antioxidants, antiinflamatòries i antitumorals [Revisat a (189)] (Figura 19).

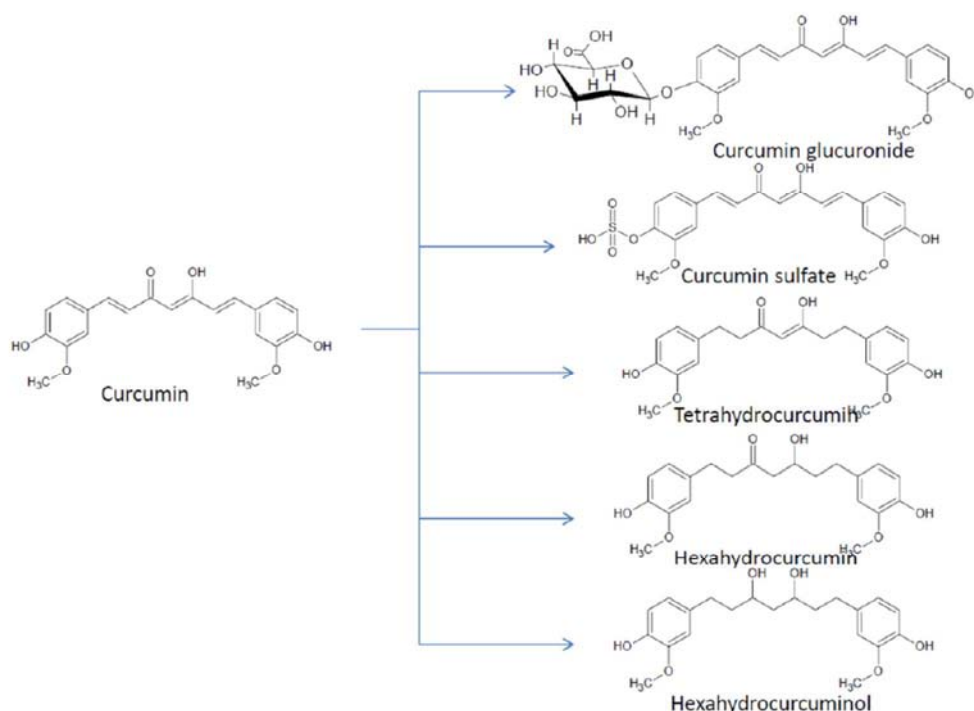


Figura 19. Estructura molecular de la curcumina i els seus metabòlits. Jordan i col. *Life Sci* (2016)(190).

Un altre factor limitant de la eficàcia de la curcumina a nivell *in vivo*, és la seva curta vida mitja. Carroll i col·laboradors van analitzar la concentració plasmàtica de curcumina i els seus metabòlits conjugats en 19 pacients de CCR tractats amb 4 g de curcumina diària durant 1



mes. Els resultats van mostrar nivells indetectables de curcumina lliure en plasma i nivells inferiors a 80 ng/ml dels seus conjugats. La concentració de curcumina en teixit colorectal també va ser analitzada, resultant en 370 ng/ml al final de l'estudi (191). Malgrat aquesta baixa biodisponibilitat, sembla ser que la curcumina es distribueix en major mesura en el tracte gastrointestinal i de manera independent a la distribució sistèmica corroborant el potencial d'aquest polifenol en la prevenció i tractament del CCR. Per exemple, l'estudi de Perkins i col·laboradors va demostrar que l'administració de curcumina oral en models murins de PAF es traduïa en una reducció del 40% en el nombre de pòlips (192). L'activitat antitumoral de la curcumina també s'ha descrit en models *in vivo* de càncer d'esòfag, fetge o estómac, entre d'altres (193, 194).

El creixent interès pel desenvolupament de noves formulacions de curcumina més biodisponibles queda palès pel gran nombre de noves estratègies farmacològiques descrites en els últims anys. Una possible estratègia és l'ús d'adjuvants que bloquegin vies metabòliques implicades en el metabolisme de la curcumina. N'és un bon exemple el compost natural piperina, que mitjançant la seva acció bloquejant sobre la glucoronidació hepàtica i intestinal permet un increment del 2000% en la biodisponibilitat de la curcumina quan ambdós compostos són administrats concomitantment (195). Altres estratègies consisteixen en incrementar la solubilitat de la curcumina mitjançant la formació de complexos de fosfolípids o augmentar-ne l'absorció mitjançant sistemes d'alliberament basats en molècules transportadores com nanopartícules, liposomes, fitosomes o micel·les surfactants [Revisat a (189)].

Pel que fa a la toxicitat, estudis clínics de fase I i II han demostrat que la curcumina és un compost segur en humans inclús a dosis de 12 g/dia (196). Estudis realitzats per grups de la Universitat de Leicester han demostrat la baixa toxicitat de la curcumina a dosis de 3,6 g/dia durant 4 mesos en pacients amb CCR refractari al tractament (197-199). Els principals efectes adversos descrits associats al tractament amb curcumina són: estrenyiment, flatulència, nàusees i diarrea encara que no s'ha pogut verificar que aquests efectes siguin dependents de la dosi de curcumina administrada (200). L'ús de la curcumina com a colorant alimentari ha estat aprovat per la FDA i l'Autoritat Europea per a la seguretat dels aliments (EFSA) i ha estat catalogada amb el codi alimentari de la Unió Europea, E100.

### 1.5.3. Curcumina i càncer. Mecanismes d'acció

Gran part de les propietats antitumorals de la curcumina estan associades al seu paper com a agent antioxidant i antiinflamatori així com a la seva capacitat d'aturar el cicle cel·lular i d'interferir en vies implicades en proliferació cel·lular, apoptosi, angiogènesi, invasió i metàstasi (Figura 20).

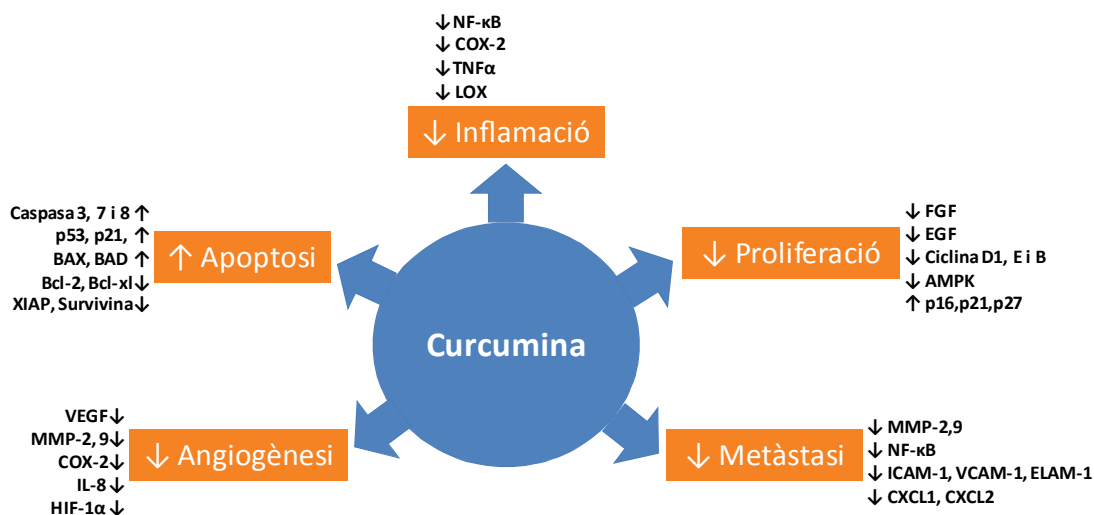


Figura 20. Principals mecanismes pels quals la curcumina exerceix les seves propietats antitumorals.

#### 1.5.3.1. Paper de la Curcumina en l'estrès oxidatiu

La curcumina és capaç d'inhibir la peroxidació lipídica, donant com a resultat la neutralització dels radicals lliures produïts en aquest procés. A més, pot actuar com a antioxidant mitjançant la sobreexpressió d'enzims antioxidants com dismutases, catalases i glutatió peroxidases (201). D'aquesta manera, la curcumina protegeix a les cèl·lules de les lesions de l'ADN que, de no ser reparades produiran mutacions i la conseqüent promoció tumoral. Contràriament, diversos estudis han demostrat que la curcumina és capaç d'induir la producció de ROS, resultant en la inducció del dany a l'ADN i l'activació de vies apoptòtiques (202). Aquestes diferències en la capacitat de la curcumina d'actuar tant com a antioxidant com a prooxidant han estat relacionades amb la dosi administrada; així, dosis altes de curcumina promouen la seva acció prooxidant (203).

#### 1.5.3.2. Activitat antiinflamatòria de la curcumina

Les propietats antiinflamatòries de la curcumina han estat relacionades principalment amb la seva capacitat d'inhibir la via de senyalització de NF-κB [Revisat a (180)]. L'efecte inhibitori de la curcumina sobre NF-κB és degut a la seva capacitat d'actuar sobre el complex de quinases IKK, inhibint la fosforilació i degradació de IκBα i la conseqüent translocació nuclear de NF-κB

(204, 205). La inhibició de NF- $\kappa$ B es tradueix en una davallada de l'expressió de gens implicats en els processos inflamatoris, com citoquines i quimiocines inflamatòries (p.ex. TNF $\alpha$ , IL-1, Interleuquina 12 (IL-12) i IL-8), MMP9, COX-2 i NOS (*Nitric oxide syntase*), entre d'altres (206-208). S'ha descrit que el tractament amb curcumina inhibeix l'activació i translocació nuclear de NF- $\kappa$ B en diverses línies cel·lulars de CCR (209). Concretament, l'enzim COX-2 es troba sobreexpressat en el 86% dels carcinomes i el 43% dels adenomes de colon i la seva inhibició *in vivo* s'ha correlacionat amb una reducció en l'aparició d'adenomes (210, 211). Aquest enzim es pot inhibir mitjançant l'ús d'AINEs com l'aspirina o el celecoxib però aquests alhora, presenten importants efectes adversos degut a la seva capacitat d'inhibir COX-1, una isoforma de COX expressada constitutivament en un gran nombre de teixits (159). Contràriament, la curcumina ha demostrat la capacitat d'inhibir específicament l'expressió de la isoforma COX-2 (i no la COX-1) en la línia cel·lular de CCR, HT29 (212). Altres mecanismes d'inhibició de la inflamació es basen en l'obstaculització de l'activació de la via de senyalització de les MAPKs [Revisat (180)] o en la supressió de l'enzim lipoxigenasa (LOX), enzim responsable de la producció de leucotriens (213).

### **1.5.3.3. Paper de la curcumina en l'apoptosi i la proliferació cel·lular**

La curcumina té la capacitat d'activar l'apoptosi a través tant de la via intrínseca com l'extrínseca. En quant a la via intrínseca, ho pot fer a través de la promoció del desequilibri en els nivells intracel·lulars de calci, de la inducció d'estrès en el reticle endoplasmàtic i de la generació de ROS, causant l'activació de la caspasa-3 i en conseqüència la mort cel·lular [Revisat a (214)]. En concordança, s'ha demostrat que la curcumina incrementa l'expressió de Bad, Bax i p53, disminueix l'expressió de proteïnes antiapoptòtiques com Bcl-2, Bcl-xl, XIAP i Survivina i promou l'alliberació del citocrom c en diferents models cel·lulars [Revisat a (215)]. És important remarcar que l'expressió de molts d'aquests gens antiapoptòtics es troba regulada pel factor de transcripció NF- $\kappa$ B. En relació a la via apoptòtica extrínseca, sembla ser que l'estimulació del receptor Fas i l'activació de la caspasa 8 per part de la curcumina constituïrien senyals d'activació (216). Per últim, la curcumina pot inhibir la fosforilació i activació d'EGFR i la seva senyalització a través d'Akt [Revisat a (214)]. Els principals mecanismes d'inducció de l'apoptosi per part de la curcumina es troben resumits a la Figura 21.

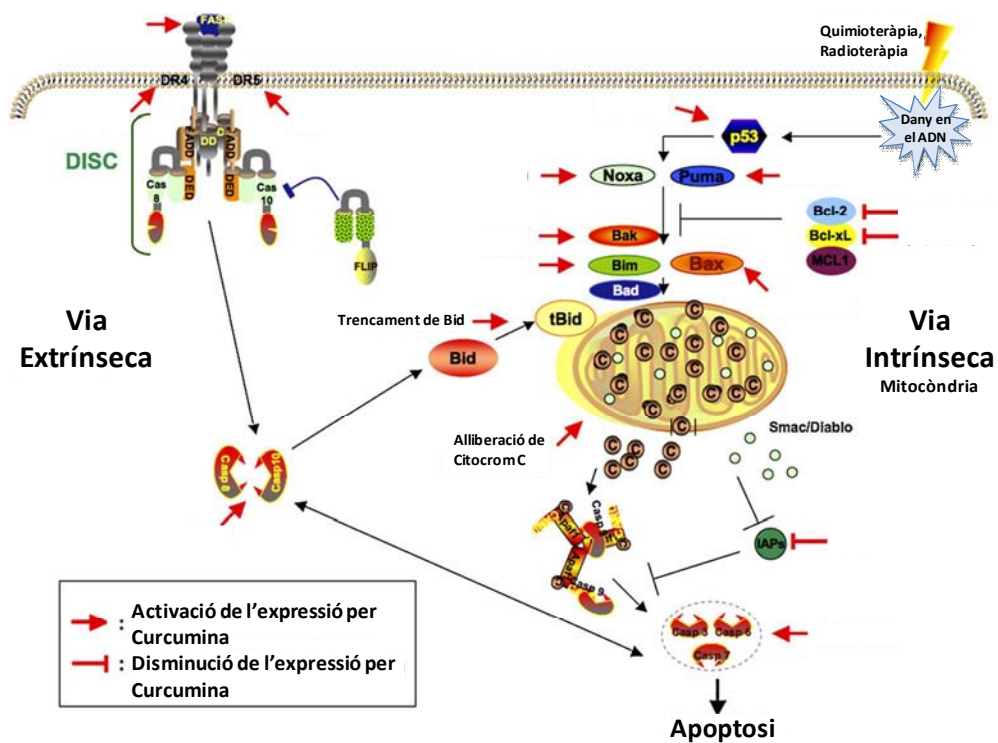


Figura 21. Representació de les principals proteïnes diana de la curcumina en la via intrínseca i extrínseca d'apoptosi. Adaptat de Reuter i col. *Biochem Pharmacol.* (2008) (214)

D'altra banda, la curcumina és capaç de promoure l'activació de l'autofàgia tant a nivell *in vitro* com *in vivo* (217). Mosieniak i col·laboradors van demostrar que el tractament amb curcumina en la línia cel·lular de CCR, HCT116, induïa la senescència i l'autofàgia mitjançant un increment en els nivells de LC3-II i en el nombre d'autofagosomes (218).

A banda del seu paper com a agent proapoptòtic, la curcumina té la capacitat d'inhibir la proliferació cel·lular en un gran nombre de línies cel·lulars tumorals mitjançant la modulació del cicle cel·lular. Així doncs, la curcumina induïa l'aturada del cicle cel·lular en la fase G0/G1 o G2/M mitjançant la sobreexpressió d'inhibidors de ciclins dependents de quinasa (CDKs) com p16, p21 i p27 i la inhibició de les Ciclines B, E i D1 [Revisat a (182)]. La inhibició de la Ciclina D1 es tradueix en la supressió de la hiperfosforilació i activació de la proteïna del Retinoblastoma i per tant en una aturada del cicle cel·lular [Revisat a (215)].

#### 1.5.3.4. Paper de la curcumina en l'angiogènesi

L'efecte antiangiogènic de la curcumina s'ha demostrat en models animals xenoinplantats amb glioblastoma, carcinoma hepatocel·lular, carcinoma de pròstata i carcinoma d'ovari i els mecanismes descrits es basen en la inhibició de diversos factors proangiogènics regulats pel factor de transcripció NF- $\kappa$ B, com ara VEGF, COX-2 i MMP-9 (219-222). Així, la curcumina

exerceix un efecte negatiu sobre el creixement, migració i capacitat de formació de túbuls de cèl·lules endotelials humanes dels microvasos intestinals mitjançant la supressió de la via de senyalització de les MAPKs i de l'expressió de COX-2 (223). D'altra banda, la curcumina també pot inhibir l'acció del factor de transcripció induïble per hipòxia 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ), un factor de transcripció induït per condicions hipòxiques i que regula l'expressió de VEGF (224). Estudis realitzats en CCR van en la mateixa direcció (225-228) i de manera interessant, recentment s'ha demostrat l'efecte beneficiós de la combinació de Bevacizumab i curcumina en la inhibició del creixement tumoral en models murins de CCR (229).

#### **1.5.3.5. Paper de la curcumina en invasió i metàstasi**

Estudis realitzats en diferents models tumorals han demostrat que la curcumina és capaç d'evitar la invasió cel·lular i la metàstasi mitjançant la inhibició de l'expressió de diferents MMPs, com MMP2 i MMP9 (230, 231) així com de les mol·lècules d'adhesió ICAM-1, VCAM-1 i ELAM-1 (232). Altres mecanismes es basen en la supressió de l'expressió a nivell d'ARN missatger (ARNm) de les quimiocines proinflamàtores CXCL1 i CXCL2, implicades en els processos d'invasió i metàstasi (233). Tenint en compte que l'expressió de molts d'aquests factors es troben regulats per NF- $\kappa$ B, de nou, l'efecte inhibitori de la curcumina sobre aquesta via seria clau en la supressió dels processos d'invasió i metàstasi dels tumors

#### **1.5.3.6. Curcumina i vies de senyalització de cèl·lules mare tumorals**

La curcumina pot modular les vies de senyalització implicades en la regulació de les cèl·lules mare tumorals, com la via de Notch, Wnt i Sonic hedgehog (SHH). Un estudi realitzat en la línia de CCR HCT116, va demostrar que la curcumina era capaç d'inhibir la via de Wnt/ $\beta$ -catenina donant com a resultat l'aturada del cicle cel·lular en la fase G2/M, l'activació de l'apoptosi i una pèrdua de l'adhesió cèl·lula-cèl·lula (234). L'efecte inhibitori de la curcumina sobre l'expressió de Notch-1 té com a conseqüència la supressió de l'activació de NF- $\kappa$ B i la consegüent inhibició del creixement cel·lular i inducció de l'apoptosi (235). Tanmateix, la curcumina redueix l'activació de la via de senyalització de SHH en models cel·lulars de glioma i càncer de pàncrees, tot i participant en la prevenció de la metàstasi mitjançant la reversió del procés EMT (236-238).

#### 1.5.4. Especificitat tumoral de la Curcumina

Ahora d'avaluar el potencial de la curcumina com a agent terapèutic, un aspecte important a tenir en compte és l'efecte diferencial que exerceix sobre les cèl·lules tumorals en comparació a les cèl·lules normals. Així per exemple, estudis *in vitro* han demostrat que la curcumina indueix l'aturada del cicle cel·lular i l'apoptosi en cèl·lules tumorals de càncer de mama i fetge sense exercir un efecte citotòxic en hepatòcits primaris de rata (239). Els fibroblasts humans i les cèl·lules epitelials normals del colon també han mostrat una menor sensibilitat a la curcumina en comparació a la línia tumoral HCT116 (240, 241). Resultats similars han estat descrits al comparar l'efecte de la curcumina en cèl·lules epitelials normals de la mucosa oral i cèl·lules de carcinoma escamós de cap i coll (242). Les raons d'aquests efectes diferencials no han estat ben establertes però s'han proposat diversos mecanismes. En primer lloc, mitjançant tècniques espectroscòpiques i d'absorció, s'ha observat una major captació de curcumina en cèl·lules tumorals que en cèl·lules normals, probablement com a resultat de les diferències estructurals entre les seves membranes cel·lulars (243). En segon lloc, els nivells de l'enzim glutatió són en general inferiors en les cèl·lules tumorals. Una disminució dels nivells de glutatió es tradueix en un augment de la generació de ROS per part de la curcumina, un augment de l'apoptosi i per tant, en una major sensibilitat a la curcumina de les cèl·lules tumorals en comparació a les cèl·lules normals (239). Finalment, l'activació en cèl·lules tumorals i no en cèl·lules normals de certes vies de senyalització protumorigèniques modulades pel tractament amb curcumina, com la via de NF- $\kappa$ B, també ha estat plantejada com una explicació plausible a aquest fet.

#### 1.5.5. Assajos clínics amb curcumina

L'ús de la curcumina com a agent terapèutic es troba sota investigació clínica en un gran nombre de patologies, entre les que destaquen el CCR, el càncer de pàncrees, el càncer de cap i coll, la leucèmia mieloide aguda, l'artritis, l'alzheimer i la depressió. Concretament, podem trobar 124 assajos clínics amb curcumina indexats en el portal web [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) dels quals, 17 avaluen l'efecte de la curcumina en la prevenció i tractament del CCR. De fet, a nivell clínic la gran majoria d'estudis realitzats fins al moment es basen en assajos clínics de fase I/II en els que s'avalua la farmacocinètica i toxicitat de la curcumina. Aquests estudis han demostrat la no-toxicitat de la curcumina oral a dosis de 3,6 g/dia durant 4 mesos (el període de tractament més llarg avaluat fins al moment) en pacients amb CCRa refractari al tractament (197-199, 244), la reducció del 40% en el nombre de focus de cripta aberrants del colon (FCA) després del tractament amb 4 g diaris de curcumina durant 1 mes en una cohort de pacients

fumadors que presentaven 8 o més FCA a l'inici de l'estudi (245) o la reducció significativa del nombre i la mida dels pòlips en pacients amb PAF (246). En càncer de pàncrees avançat, Aggarwal i col·laboradors van demostrar que el tractament amb 8 g/dia de curcumina durant 8 setmanes resultava segur i efectiu en 2 dels 25 pacients tractats, un dels quals va presentar una estabilització de la malaltia durant més de 18 mesos (247). Més recentment, també s'ha demostrat la seguretat del tractament combinat de curcumina i Gemcitabina en aquests malalts (248).

### 1.5.6. Curcumina i quimioteràpia

Mitjançant la combinació de fàrmacs antineoplàsics es pot aconseguir una reducció de la dosi i la toxicitat de les drogues utilitzades així com una disminució en l'aparició de quimioresistència en les cèl·lules tumorals. En la darrera dècada, un gran nombre d'estudis *in vitro* i *in vivo* han demostrat que la curcumina és capaç de potenciar l'efecte antiproliferatiu i/o proapoptòtic de certs fàrmacs antineoplàsics principalment degut al seu efecte en la inhibició de la via de senyalització de NF- $\kappa$ B activada per acció d'aquests agents [Revisat a (249)]. Per exemple, l'efecte de la combinació de curcumina amb taxol, gemcitabina o paclitaxel, és superior a l'efecte individual d'aquests fàrmacs degut a l'efecte inhibitori de la primera sobre l'activació de NF- $\kappa$ B i Akt per part dels altres (250, 251). La combinació de curcumina i FOLFOX es tradueix en una major inhibició de la proliferació cel·lular i en un augment de l'apoptosi en línies cel·lulars de CCR, juntament amb una reducció en l'expressió d'EGFR, Her-2, Akt i COX-2 (252). A més a més, el tractament amb curcumina sensibilitza les cèl·lules de CCR al tractament amb 5-FU per efecte de la inhibició de la via de senyalització NF- $\kappa$ B /PI3K/Src (253). En relació a l'oxaliplatí, Howells i col·laboradors van demostrar que el tractament amb curcumina revertia la resistència a oxaliplatí (209) i en la mateixa línia, estudis *in vivo* han reportat els efectes terapèutics de la combinació d'oxaliplatí i curcumina en comparació als seus efectes en monoteràpia (226, 254). Per últim, un estudi de James i col·laboradors va constatar que l'addició de curcumina al tractament amb oxaliplatí i 5-FU potenciava els seus efectes antiproliferatius i proapoptòtics en cultius *ex vivo* d'explants derivats de metàstasis hepàtiques (200). En relació a la toxicitat causada per la quimioteràpia, el pretractament amb curcumina seguit del tractament concomitant d'oxaliplatí i curcumina es tradueix en una disminució de la toxicitat neuropàtica produïda per l'agent platinat (255). En definitiva, la combinació de curcumina amb oxaliplatí no només augmenta l'eficàcia d'aquest últim sinó que també en redueix els seus efectes adversos. De fet, actualment s'està realitzant un assaig clínic de Fase II

en el que s'estudia l'efecte de la combinació de curcumina oral i FOLFOX en pacients amb CCRa i metàstasis inoperables (256).



## **2. HIPÒTESI I OBJECTIUS**

---

La resistència adquirida als tractaments basats en l'oxaliplatí representa un dels principals obstacles en l'èxit del tractament dels pacients amb CCRa. Aquest és un procés complex i multifactorial en el que la via de senyalització de NF- $\kappa$ B, a través de la qual s'activa la transcripció de gens involucrats en supervivència, resistència a la mort cel·lular, invasió i metàstasi entre altres, hi juga un paper rellevant. En un treball previ del nostre grup on s'analitzaren les diferències a nivell d'expressió gènica entre quatre línies de CCR sensibles a oxaliplatí i les seves derivades resistents, es van identificar uns pocs gens les alteracions en l'expressió dels quals es traduirien en un increment en la senyalització de la via de NF- $\kappa$ B.

En base a aquestes premises, la hipòtesi en la que es fonamenta aquest treball és que l'activació de la via de senyalització de NF- $\kappa$ B estaria implicada en la sensibilitat i el procés d'adquisició de resistència a l'oxaliplatí en els nostres models *in vitro* de resistència adquirida i per tant, que la inhibició farmacològica mitjançant el polifenol curcumina d'aquest factor de transcripció comportaria la reversió de la resistència a aquest agent platinat.

Per tal de demostrar aquestes hipòtesis es van establir els següents objectius:

- 1.** Estudiar la implicació de la via de senyalització de NF- $\kappa$ B en la resistència i la resposta a l'oxaliplatí en models cel·lulars de CCR sensibles i amb resistència adquirida a aquest fàrmac.
- 2.** Estudiar l'efecte de la curcumina, com a potent inhibidor de NF- $\kappa$ B, en la reversió de la resistència adquirida i en la resposta a l'oxaliplatí, individualment i en combinació amb aquest.
- 3.** Analitzar l'efecte diferencial del tractament combinat de curcumina i oxaliplatí sobre els perfils transcriptòmics de línies sensibles i resistents a oxaliplatí mitjançant un estudi de *microarrays* i identificar possibles marcadors predictius d'eficàcia del tractament.
- 4.** Validar tots o part dels resultats obtinguts, en mostres de teixit de pacients amb CCR metastàtic.

### **3. MATERIAL I MÈTODES**

---

### 3.1. Línies cel·lulars

---

En la present tesi doctoral es van utilitzar les línies cel·lulars humanes de CCR HT29, LoVo i DLD1 (*American Type Culture Collection*, ATCC, Manassas, VA, USA) (Figura 22) així com les seves línies derivades amb resistència adquirida a oxaliplatí: HTOXAR3, LoVOXAR3 i DLDOXAR3, respectivament. Les línies resistents es van desenvolupar al nostre laboratori a través d'un procés d'exposició contínua a dosis creixents d'oxaliplatí setmanalment durant 10 mesos tal i com s'ha descrit anteriorment no mostrant resistència creuada a altres fàrmacs com el 5-FU, el cisplatí o el CPT-11 (102). Totes elles són línies epitelials adherents que creixen en monocapa a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub> en atmosfera humida. Les línies cel·lulars parentals HT29, Lovo i DLD1 han estat caracteritzades segons el fenotip de les proteïnes p53, KRAS i BRAF, així com pel fenotip RER (inestabilitat de microsatèl·lits). Les línies resistents, en canvi, no han estat caracteritzades:

**HT29:** línia cel·lular aïllada d'un tumor primari humà de còlon (adenocarcinoma de grau II). Les cèl·lules HT29 creixen en medi DMEM (*Dulbeccos's Modified Eagle Medium*, Gibco® Life technologies), suplementat amb 2 mM de L-glutamina (Applichem, Panreac), 10 mM d'Hepes (Applichem, Panreac), 10% de sèrum boví fetal (FBS; *foetal bovine serum*) (Reactiva) inactivat a 56°C durant 45 minuts, 400 u/mL de penicil·lina (ERN) i 40 µg/mL de gentamicina (Gibco®, Life technologies). El seu temps de doblatge en aquestes condicions de creixement és de 24 hores; el mateix que el de la seva sublínia resistent a oxaliplatí HTOXAR3. Presenta un fenotip RER negatiu i una mutació en la proteïna p53 per canvi d'aminoàcid Arg → His en el codó 273. La proteïna 21 no és funcional en aquesta línia. A més a més, presenta mutació (V600E) en l'oncogen BRAF però no en la proteïna KRAS.

**LoVo:** línia cel·lular procedent d'un adenocarcinoma avançat de colon. Les cèl·lules van ser aïllades d'un nòdul metastàtic localitzat a la regió subclavicular esquerra. Creixen en medi de cultiu HAM's F12 (Gibco®, Life technologies) suplementat amb un 20% de FBS (Reactiva) inactivat a 56°C durant 45 minuts, 200 u/mL de penicil·lina (ERN) i 20 µg/mL de gentaminacina (Gibco®, Life technologies). El seu temps de doblatge en aquestes condicions de creixement és de 26 hores; el mateix que el de la seva sublínia resistent a oxaliplatí LoVOXAR3. Aquesta línia mostra un fenotip RER positiu (deleció de l'exó 5 al 8 en els dos al·lels del gen hMSH2) i presenta la proteïna p53 WT. En relació a KRAS i BRAF, presenta les mutacions G13D i A14V de la proteïna KRAS però en canvi manté la forma WT de BRAF.

**DLD1:** línia cel·lular aïllada d'un adenocarcinoma primari humà de colon d'estadi C de Dukes. Es cultiva en medi de cultiu RPMI 1640 (Gibco® Life technologies), suplementat amb 2 mM de L-glutamina (Applichem, Panreac), 10 mM d'Hepes (Applichem, Panreac), 10% FBS (Reactiva) inactivat a 56°C durant 45 minuts, 400 u/mL de penicil·lina (ERN) i 40 µg/mL de gentamicina (Gibco®, Life technologies). El seu temps de doblatge en aquestes condicions de creixement és de 21 hores i el de la seva sublínia resistent DLDOXAR3 és de 23 hores. DLD1 presenta una mutació en la posició 241 de la proteïna p53 (canvi de base C→T que provoca el canvi d'aminoàcid Ser→Phe) i el fenotip RER positiu (deleció en el gen *hMSH6*). Pel que fa als oncogens *BRAF* i *KRAS*, presenta les mutació G13D de la proteïna KRAS però en canvi manté la forma WT de BRAF.

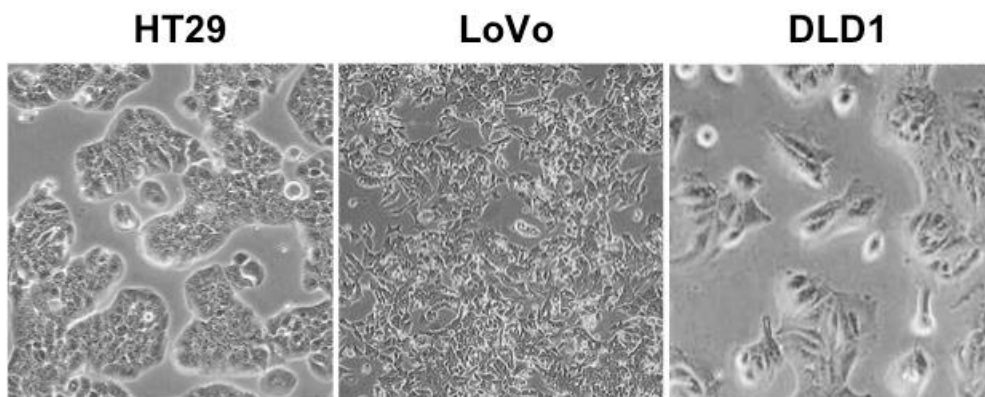


Figura 22. Cèl·lules HT29, LoVo i DLD1 en cultiu. Font: ATCC

Totes les línies van ser testades regularment per a la presència de contaminació per *Mycoplasma*, mitjançant la tècnica de PCR (Mycoplams Plus™ PCR primer set, Stratagene, USA) usant els primers MICO 1 : 5'-GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG-3' i MICO 2 : 5'- CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G -3' a una concentració final de 10X a més del tampó de reacció (1X), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM) i 0,5 unitats de Taq polimerasa (Ecotaq, Ecogen) en les següents condicions de PCR (Figura 23):

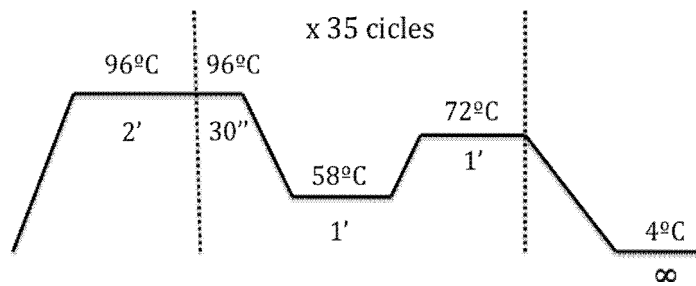


Figura 23. Condicions de PCR utilitzades en l'assaig de detecció de contaminació per *Mycoplasma*.

La mostra de partida consistia en 1 mL de medi de cultiu de cada una de línies a valorar tenint en compte que el flascó de cultiu havia d'estar força confluent i el medi de cultiu no havia d'haver estat canviat com a mínim en 72 hores. Els productes de PCR es van visualitzar en un gel d'agarosa estàndard (Ecogen) al 1% en tampó TBE (Tris-Borat-EDTA) 1X tenyit amb Realsafe (20.000X) (Real Life Science Solutions). L'amplificació d'una banda de 464 parells de bases (pb) indica la infecció de *Mycoplasma* a la mostra testada. En cada experiment es va incorporar un control positiu de contaminació.

Per tal de mantenir viables les línies cel·lulars anteriorment descrites, les cèl·lules van ser cultivades en flascons de cultiu cel·lular T-25 cm<sup>2</sup> (Nunc, Thermo Scientific) canviant el medi de cultiu per medi fresc cada 2-3 dies, valorant el ritme de creixement i tornant a sembrar en flascons nous cada 7 dies. Així doncs, tan bon punt les cèl·lules assolien aproximadament un 70% de confluència en els flascons, es procedia a la seva desadhesió de la superfície mitjançant l'ús de Tripsina-EDTA 3X (Labclinics). Un cop desadherides, es va procedir al comptatge cel·lular mitjançant tinció amb blau tripà (Gibco, Invitrogen) i recompte amb cambra de Neubauer (hemocitòmetre). El nombre de cèl·lules a sembrar per tal de no assolir el 100% de confluència es va determinar en funció del temps de doblatge de cada línia, la mida cel·lular i el nombre de cèl·lules requerides per a la realització dels subsegüents experiments. Periòdicament es va testar el temps de doblatge de cada línia cel·lular mitjançant la fórmula:

$$C_f = C_o \cdot e^{-\lambda t}$$

On:

C<sub>f</sub> : concentració final de cèl·lules al flascó

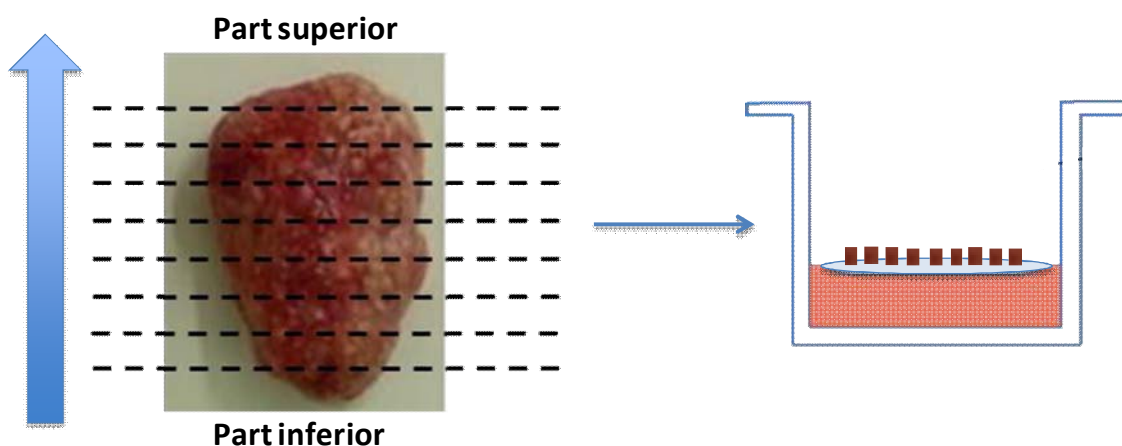
C<sub>o</sub>: concentració inicial de cèl·lules sembrades

Lambda = ln(2)/(temps de doblatge de la línia (h) / 24 h) (dies)

t: temps transcorregut entre les sembres (dies)

### 3.2. Mostres d'explants de metàstasis hepàtiques derivades de pacients amb CCRa

Les mostres fixades amb formol i incloses en parafina d'explants de metàstasis hepàtiques derivades de pacients amb CCRa van ser cedides per la Dra. Lynne Howells de la Universitat de Leicester. Es van tallar els teixits tumorals en 9 segments d'1 mm<sup>3</sup> aproximadament i es van col·locar de manera aleatòria en inserts organotípics (Millipore) que es trobaven flotant a l'interior de pous coberts amb 1,5 mL de medi DMEM suplementat amb 1% de FBS i 2% d'antibiòtics i antimicòtics (Figura 24). Els teixits es van deixar incubar durant 15 hores i tot seguit es va retirar la meitat del medi i es va reemplaçar amb els medis que contenien els tractaments d'estudi. Es van deixar incubar durant 24 hores i es van recollir els segments de teixit. A continuació els teixits es van col·locar entre esponges mullades amb etanol al 70% en un cassette d'immunohistoquímica, es van fixar amb formol durant 24 hores, es van incloure en parafina i es van realitzar els talls. Durant tot el procés, va resultar essencial que la orientació dels teixits fos identificable per tal de que les superfícies dels explants fossin comparables alhora d'analitzar l'efecte dels tractaments. La immunohistoquímica va ser realitzada mitjançant el kit *Novolink Polymer Detection* (Novocastra Laboratories) seguint les instruccions del fabricant. Per tal d'analitzar l'efecte del tractament amb oxaliplatí o la combinació d'oxaliplatí i curcumina en la proliferació cel·lular i l'apoptosi cada explant va ser avaluat amb els marcadors ki67 (Dako), com a indicador de la proliferació, i caspasa 3 truncada (New England Biolabs) com a marcador d'apoptosi. La puntuació de la tinció es va fer de forma cega (200).



**Figura 24. Cultiu d'explants.** Representació de l'orientació del tumor en els inserts organotípics. Només una de les superfícies dels explants es troba en contacte amb el medi que conté els tractaments.

Les mostres van ser obtingudes de tumors de pacients operats de les metàstasis hepàtiques a l'hospital Universitari de Leicester NHS trust. L'aprovació ètica per l'ús d'aquestes mostres va ser concedida pel *Leicestershire, Northamptonshire and Rutland Ethics Committee* (referència REC 09/H0402/45). A més a més, l'ús d'aquestes mostres també va ser aprovat pel Comitè ètic de l'Hospital Germans Trias i Pujol (Badalona, Barcelona).

### 3.3. Fàrmacs

---

**Oxaliplatí:** L'oxaliplatí (Sanofi-Aventis) es va obtenir de la farmàcia de l'Institut Català d'Oncologia (Badalona, Barcelona) a partir dels romanents de vials de pacients. Es van preparar solucions *stock* de 12,6 mM en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> i es van conservar congelades a -20°C fins a la seva utilització.

**Curcumina:** La Curcumina (Sigma-Aldrich) va ser adquirida en pols i fou reconstituïda amb etanol absolut (Appllichem, Panreac) a una concentració de 10 mM. Les alíquotes van ser conservades a -20°C fins al moment de la seva utilització. La concentració més alta d'etanol absolut utilitzada en cultiu va ser de 0,3%, dosi que va ser valorada mitjançant l'assaig de viabilitat cel·lular MTT i va demostrar no ser tòxica per als nostres models cel·lulars.

**SB265610:** L'antagonista del receptor CXCR2 SB265610 (Sigma-Aldrich) va ser adquirit en pols i reconstituït amb *dimethyl sulfoxide* (DMSO) (Cryoserv, Bioniche Pharma) a una concentració de 14 mM. Les alíquotes van ser conservades a 4°C fins al moment de la seva utilització.

Tant l'oxaliplatí, la curcumina i l'antagonista de l'inhibidor de CXCR2 SB265610 van ser diluïts posteriorment en medi de cultiu (específic per a cada línia cel·lular) per tal d'assolir les concentracions finals de treball.

### 3.4. Assaig de viabilitat cel·lular MTT

---

Per tal de determinar la citotoxicitat produïda per l'oxaliplatí, la curcumina, la combinació de tots dos i el compost SB265610 es va utilitzar el mètode de detecció de viabilitat cel·lular MTT (Roche) (Figura 25). Aquest assaig es basa en la capacitat de les cèl·lules viables, metabòlicament actives, de metabolitzar la sal de tretazoli (*3-[4,5-dimetiltiazol-2-]-2,5-difenil tetrazolium bromide*) de color groc, donant lloc a la sal de formazan de color violeta. Aquesta sal es solubilitza amb una solució que conté 0,1% SDS en HCL 0,01 M, resultant en una solució



de color violeta quantificable mitjançant l'ús d'un lector ELISA convencional automatitzat, com és el cas de l'equip *Varioskan Flash* (Thermo®). El pic màxim d'absorbància de la sal de formazan correspon a una longitud d'ona entre 500 i 600 nm i per aquest motiu, la lectura va ser realitzada a 570 nm. La densitat òptica (OD) obtinguda, és proporcional al nombre de cèl·lules viables.

En primer lloc, les cèl·lules tumorals van ser sembrades en plaques de 96 pous (Nunc, Labclinics) a una densitat òptima per tal d'evitar la saturació de la OD en els pous control ( $1,5 \geq OD \leq 1,8$ ). Així doncs, tenint en compte el temps de doblatge de cada línia cel·lular i la durada dels experiments, les cèl·lules HT29 i HTOXAR3 van ser sembrades a una densitat de 1.500 cèl·lules/pou, les línies LoVo i LoVOXAR3 a una densitat de 3.000 cèl·lules/pou i les línies DLD1 i DLDOXAR3 a una densitat de 4.000 cèl·lules/pou en un volum final de 100  $\mu$ l per pou. Passades 24 hores (temps necessari per a l'adherència de les cèl·lules al fons dels pous) es va retirar el medi i es van tractar les cèl·lules amb diferents concentracions del fàrmac en estudi. Els tractaments es van realitzar durant el temps d'estudi determinat, passat el qual, es va retirar el medi amb la droga i es va afegir medi fresc de cultiu. A les 72 hores (temps de recuperació), es va retirar el medi de cultiu i es va afegir la solució de MTT seguint les instruccions del fabricant (a cada pou: MTT 10%, FBS 10% i RPMI no suplementat 80%, en un volum final de 100  $\mu$ l). La solució de MTT es va deixar incubant 4 hores a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub> i posteriorment les sals de formazan formades al fons dels pous van ser resuspeses amb 100  $\mu$ l/pou de solució solubilitzadora (0,1% SDS en HCL 0,01 M). Un cop solubilitzades, les plaques es van incubar tota la nit (O.N., *overnight*) a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub> en atmosfera humida fins a la seva lectura a 570 nm el dia següent.

En cada experiment de MTT, es va calcular la fracció de supervivència (*f*) com el quocient entre la OD de les cèl·lules tractades a les diferents dosis de fàrmac i la OD de les cèl·lules control sense tractar. Les dades obtingudes s'analitzaren mitjançant el mètode de l'efecte mig (*median-effect lines*). Aquest mètode consisteix en la representació gràfica de  $\log_{10}((1/fn)-1)$  (on *fn* representa les diferents fraccions de viabilitat obtingudes) enfront del  $\log_{10}$  (dosi del fàrmac). A partir d'aquest punt, es va calcular la recta de regressió pel mètode dels mínims quadrats; acceptant rectes que presentaven un coeficient de regressió  $r^2$  superior a 0,95.

Mitjançant aquestes rectes denominades *median effect lines*, es va poder calcular el pendent (*m*) i la dosi IC50 (dosi que inhibeix el 50% del creixement cel·lular). Amb aquests paràmetres,

es van poder avaluar les concentracions de fàrmac necessàries per a inhibir una fracció cel·lular determinada, entre el 10 i el 90%, segons l'equació:

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

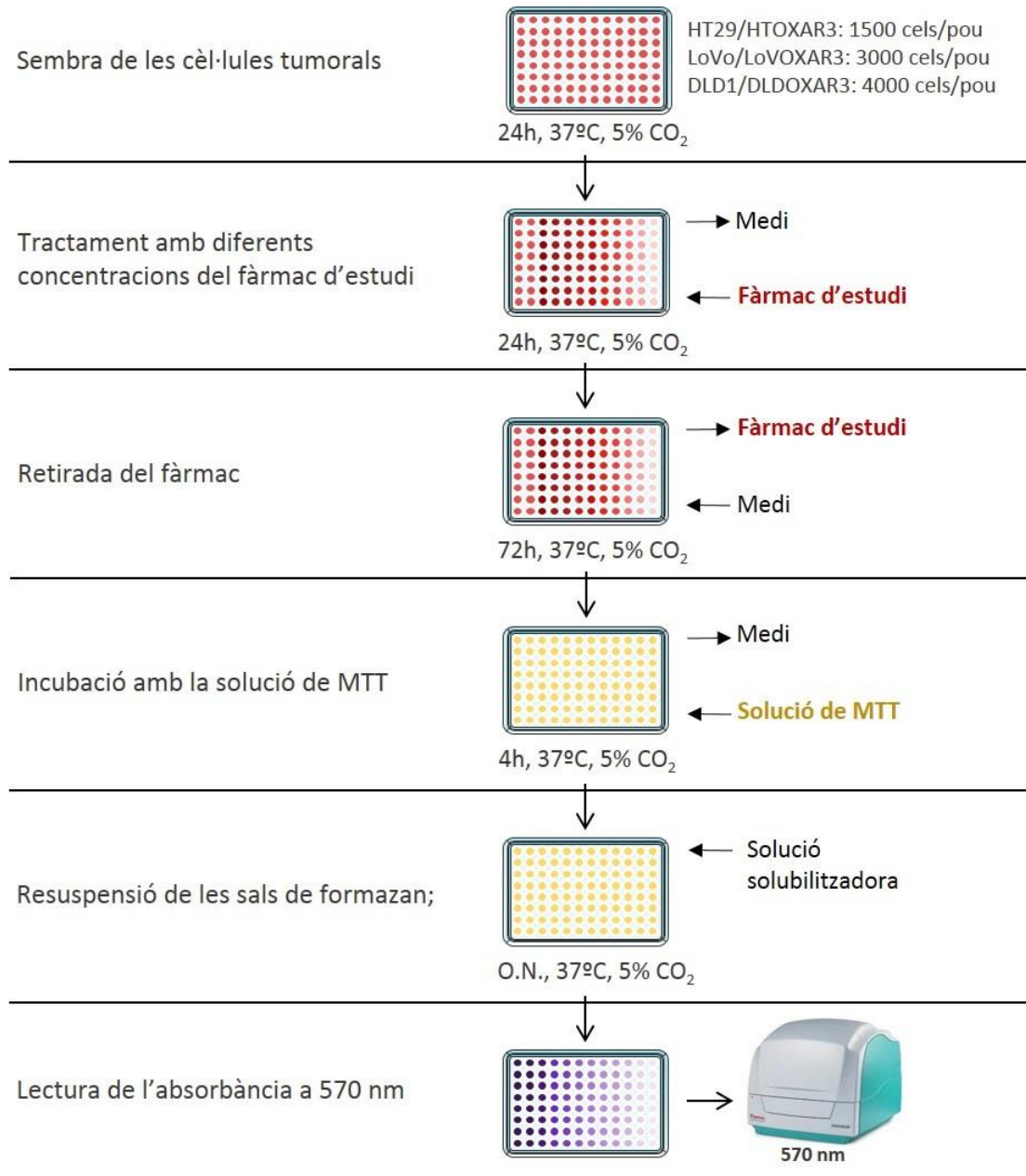


Figura 25. Esquema explicatiu del procediment de MTT.

### 3.4.1. Anàlisi de combinació de fàrmacs

Per tal de conèixer el sinergisme, antagonisme o additivitat de la combinació d'oxaliplatí i curcumina en els nostres models cel·lulars, vam seguir el mètode descrit per Chow i Talalay

(257), que consisteix en tractar les cèl·lules amb dilucions seriadades de cada fàrmac utilitzat en la combinació amb ràtios fixes de dosis que corresponen a diferents proporcions de les IC50 individuals (en aquest cas, 3; 1,5; 1; 7/8; ¾; 5/8; ½; ¼ i 1/8 vegades les IC50 individuals) i avaluar la viabilitat en cadascun dels punts mitjançant l'assaig de MTT. En cada experiment, tant pels tractaments individuals com pels combinats, s'obté el log IC50 i el pendent  $m$  tal i com s'explica en l'apartat anterior. Ambdós paràmetres van ser utilitzats per calcular les diferents dosis dels fàrmacs administrats individualment i en les combinacions, necessaris per a produir els diferents nivells de toxicitat ( $f=0,95, 0,90, \dots, 0,05$ ) a partir de l'equació:

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

Quan els fàrmacs s'administren a ràtios fixes, la dosi en la combinació necessària per a produir una fracció de supervivència pot ser separada en els dos components de dosi D1 i D2 corresponents als fàrmacs 1 i 2 respectivament. Per a cada nivell de citotoxicitat ( $f=0,95, 0,90, \dots, 0,05$ ) el paràmetre anomenat índex de combinació (CI, *combination index*) pot ser calculat atenent a l'equació:

$$\text{CI} = (\text{D1}/\text{Df1}) + (\text{D2}/\text{Df2}) + \alpha[(\text{D1} \cdot \text{D2})/(\text{Df1} \cdot \text{Df2})]$$

on:

- D1 i D2 són les concentracions dels fàrmacs 1 i 2 en la combinació per a produir una fracció  $f$  de supervivència.
- Df1 i Df2 són les concentracions individuals d'1 i 2 per a produir la mateixa fracció  $f$  de supervivència.
- $\alpha = 1$  o  $\alpha = 0$  depenent de si els dos fàrmacs es consideren mútuament no excloents o excloents. En el nostre cas, l'oxaliplatí i la curcumina van ser considerats mútuament no excloents degut a que presenten mecanismes d'acció diferents.

En base a aquest mètode,  $\text{CI} < 1$  indica que la combinació de fàrmacs és sinèrgica,  $\text{CI} > 1$  indica que és antagonista i  $\text{CI} = 1$  indica que es tracta d'una combinació additiva.

### 3.5. Assaig de formació de colònies

---

Per tal de determinar l'efecte de l'oxaliplatí, la curcumina o la combinació de tots dos en la capacitat de les cèl·lules per sobreviure i mantenir la seva capacitat intrínseca de formar colònies després dels diferents tractaments, es van realitzar assajos de formació de colònies.

Les cèl·lules van ser sembrades en plaques de 6 pous (Nunc, Thermo Scientific) a una densitat de 300 cèl·lules per pou en el cas de HT29 i HTOXAR3 i de 500 cèl·lules per pou en el cas de les línies LoVo i LoVOXAR3. Passades 24 hores (temps necessari per a l'adhèrença de les cèl·lules al fons dels pous) es va retirar el medi i es van tractar les cèl·lules durant 24 hores amb diferents concentracions del/s fàrmac/s d'estudi. Passat aquest temps, es va retirar el medi amb la droga i es va afegir medi de cultiu fresc. A partir d'aquest punt, el medi es va canviar per medi fresc cada 2 o 3 dies fins al desè dia, moment en que es va retirar i es van rentar les colònies amb solució salina tamponada amb fosfat (PBS ; NaCl 137 mM, KCl 2,6 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM). Seguidament es va procedir a la seva fixació durant 10 minuts a temperatura ambient (TA) amb metanol absolut i àcid acètic en una proporció 3:1. Després d'un últim rentat amb PBS, les colònies es van tenyir durant 10 minuts a TA amb cristall violeta 0,5% (Merck) (diluït en aigua), es van rentar amb PBS i es van contar de manera manual.

### **3.6. Extracció i determinació de la concentració de proteïnes**

---

#### **3.6.1. Extracció de proteïna total**

Tot el procés d'extracció de proteïnes es va realitzar en suport fred. Un cop retirat el medi de cultiu de les plaques on estaven sembrades les cèl·lules es va realitzar el rentat dels pouets amb tampó PBS o solució salina tamponada amb tris (TBS, Tris-Cl 20 mM, 137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, a pH 7,6) si es volien obtenir proteïnes fosforilades. Tot seguit es va afegir el tampó d'extracció de proteïnes RIPA (+) [PBS, NP40 1%, Na Deoxycholate 0,5%, SDS 0,1%, EDTA 1 mM, NaF 50 mM, NaVO<sub>3</sub> 5 mM, inhibidors de proteases (complete, EDTA-free, Roche Diagnostics)]. Amb un raspador o *scraper* es va raspar mecànicament el fons de la placa per tal d'obtenir la màxima quantitat de proteïnes. Els homogenats obtinguts es van passar a tubs eppendorf i es van deixar en gel durant 30 minuts en agitació constant. Passat aquest temps, els tubs es van centrifugar 15 minuts a 13.000 rpm i a 4°C per després recollir el sobrenedant (on es trobaven les proteïnes) del que es va separar una alíquota de 20 µl per a la posterior quantificació proteica. Les mostres es van congelar a -80°C fins al moment de la seva utilització.

#### **3.6.2. Extracció de proteïnes nuclears**

L'obtenció dels extractes proteics nuclears es va realitzar mitjançant el mètode de Schreiber i col·laboradors (258). Les cèl·lules en cultiu es van tripsinitzar i centrifugar durant 5 minuts a 1.200 rpm a TA i es van resuspendre en 400 µl de tampó de lisi cel·lular hipotònic [10 mM

HEPES pH 7,5, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM EDTA, 1mM DTT, 5 mM PMSF, 0,5% NP-40 i inhibidors de proteases (Roche Diagnostics)]. Després de deixar les mostres en agitació constant durant 20 minuts i en fred, es van centrifugar a 11.400 rpm durant 10 minuts a 4°C i els sobrenedants (proteïnes citoplasmàtiques) es van recollir i conservar a -80°C fins al moment de la seva quantificació i utilització. A continuació, el *pellets* nuclears van ser rentats tres vegades amb tampó de lisi i es van resuspendre en 50 µl de tampó fred d'extracció nuclear [20 mM HEPES pH 7,5, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF i inhibidors de proteases (Roche Diagnostics)]. Les mostres es van deixar en gel durant 30 minuts en agitació constant i posteriorment van ser centrifugades a 12.000 rpm durant 15 minuts a 4°C. Els sobrenedants (proteïnes nuclears) es van recollir i van ser conservats a -80°C fins al moment de la seva quantificació i utilització.

### 3.6.3. Determinació de la concentració de proteïnes

La quantificació de proteïnes es va realitzar en plaques de 96 pous (Nunc, Thermo Scientific) amb el kit de quantificació DC protein assay (Bio Rad) basat en el mètode colorimètric de Lowry. Per a la quantificació de proteïnes, 5 µl de mostra es van barrejar amb 25 µl de reactiu A' (compost per 20 µl de reactiu S per cada 1 ml de reactiu A) i amb 200 µl de reactiu B. La barreja es va mantenir durant 15 minuts a TA i tapada de la llum. Passat aquest temps, es va realitzar la quantificació mitjançant el lector de colorimetria *Varioskan Flash* (Thermo®) a una longitud d'ona de 750 nm. La proteïna BSA va ser utilitzada com a proteïna estàndard i la recta patró utilitzada per a la determinació de la concentració proteica es va considerar vàlida si pel mètode dels mínims quadrats el valor  $R^2$  era superior a 0,95.

### 3.7. Western Blot (WB)

---

Per tal de detectar canvis en els nivells de proteïnes específiques presents en les mostres es va utilitzar la tècnica de Western Blot (WB). Aquesta tècnica es basa en la separació mitjançant electroforesi en condicions desnaturalitzants de les proteïnes presents en una mostra segons el seu pes molecular, la posterior transferència d'aquestes proteïnes a una membrana de PVDF (blot) i finalment la detecció de la/les proteïna/es d'interès mitjançant anticossos específics.

Els homogenats de proteïnes en van descongelar en gel i en funció de la concentració de proteïna, es va utilitzar el volum necessari per a carregar la mateixa quantitat de proteïna en cada carril del gel, en el nostre cas 50 µg. A continuació, es van barrejar els homogenats amb

tampó de mostra 4x NuPAGE LDS (Novex, Life technologies), es va afegir agent reductor (Novex, Life technologies) i es van incubar les mostres a 70°C durant 10 minuts al termoblock per tal de desnaturalitzar les proteïnes.

L'electroforesi i electrotransferència es van dur a terme en un sistema Xcell4 *SureLock Midi-Cell* (Life Technologies) utilitzant les següents solucions preparades en fresc a partir de solucions més concentrades que es mantenien a 4°C:

- Tampó d'electroforesi MOPS/SDS : 50 mM MOPS, 50 mM Tris, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, ph=7,7.
- Tampó de transferència : 27 mM Tris, 197 mM Glicina i 20% metanol.

L'electroforesi de les mostres es va fer en gels de poliacrilamida pre-cast NUPAGE Novex Bis-Tris Gel 10% (Novex, Life technologies). Els gels es van retirar del seu envàs, es van rentar amb aigua destil·lada i es van muntar en el suport de la cubeta d'electroforesi. Seguidament, es va omplir la cubeta amb tampó d'electroforesi, es van carregar les mostres i el marcador de pes molecular (Novex (R) Sharp Pre-Stained protein Standard, Life technologies) i es van fer migrar a 200 V durant 1 hora.

Un cop finalitzada l'electroforesi, es va procedir a la transferència humida de les proteïnes del gel a una membrana de PVDF de 0,45 µm de porus (polyvinylidene fluoride, Immobilon-FL, Millipore) prèviament activada amb metanol. Es va realitzar el muntatge tipus *sandwich* en un *cassette* amb unes reixetes específiques submergit en una cubeta amb tampó de transferència (Figura 26). La transferència es va realitzar durant 1 hora a 100V i 4°C.

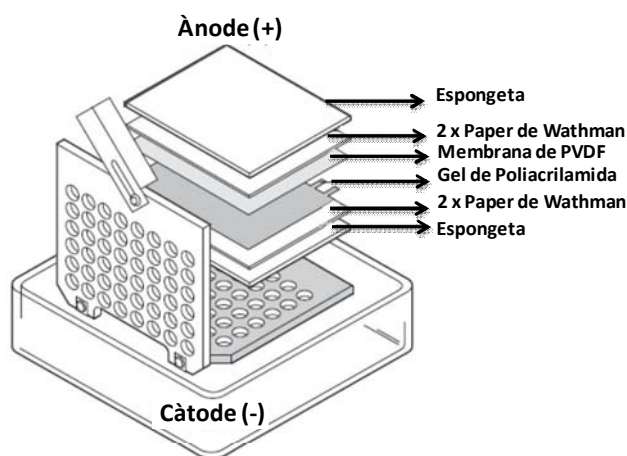


Figura 26. Representació del muntatge tipus *sandwich* utilitzat en la transferència humida durant el protocol de *Western blot*.

El següent pas va consistir en la immunodetecció de les proteïnes d'interès mitjançant l'ús d'anticossos específics. Per aquest propòsit es van utilitzar les següents solucions preparades en fresc:

- Tampó de bloqueig per a WB: 50% PBS i 50% Blocking Buffer de Odyssey (LI-COR)
- Tampó d'incubació per a WB : 50% PBS, 50% Blocking Buffer de Odyssey i 0,1% Tween-20 (Sigma-Aldrich)
- Tampó de rentat per a WB : PBS + 0,1% Tween-20

Per a l'estudi de proteïnes fosforilades, en tots els passos es va substituir el PBS per tampó TBS.

En primer lloc es van activar les membranes amb metanol absolut i es van rentar amb PBS o TBS 1x. Posteriorment es van bloquejar durant 1 hora a TA amb tampó de bloqueig i seguidament es van incubar O.N. a 4°C en agitació contínua amb un anticòs primari específic per a les proteïnes d'interès (Taula 3). Després de la incubació, es van realitzar tres rentats de 5 minuts amb tampó de rentat i les membranes es van incubar 50 minuts resguardades de la llum amb un anticòs secundari (que detecta l'anticòs primari) conjugat amb fluoròfors que emeten senyal en l'infraroig proper (680 nm i/o 800 nm, LI-COR). Finalment es van realitzar tres rentats de 5 minuts amb tampó de rentat i un últim rentat de 10 minuts amb PBS o TBS.

Per últim, la presència de les proteïnes d'interès en les membranes es va detectar i analitzar utilitzant un sistema de generació i anàlisi d'imatges mitjançant l'aparell Odyssey (LI-COR) basat en la detecció de fluorescència de l'infraroig proper. La intensitat de les bandes en les membranes es va quantificar amb el programa específic del mateix sistema (software odyssey V3.0) i així es van poder comparar les variacions en els nivells proteics entre diferents condicions experimentals. Els valors densitomètrics de les bandes que corresponien a les proteïnes d'estudi es van normalitzar amb els valors de les bandes d' $\alpha$ -tubulina (control intern) corresponents. Els resultats es van mostrar com la mitjana  $\pm$  error estàndard de la mitjana (SEM), calculats a partir d'un mínim de tres experiments independents.

<b>Anticossos primaris</b>	<b>Dilució</b>	<b>Casa comercial</b>
<i>Rabbit anti-phospho-NF-<math>\kappa</math>B p65 (Ser 536) clone EP2294Y</i>	1:2000	Merck -Millipore
<i>Rabbit anti-NF-<math>\kappa</math>B p65 (D14E12) XP®</i>	1:1000	Cell Signaling
<i>Mouse anti-Phospho-I<math>\kappa</math>B-<math>\alpha</math> (Ser32/36) (5A5)</i>	1:1000	Cell Signaling
<i>Rabbit anti-I<math>\kappa</math>B alpha antibody [E130]</i>	1:1000	Abcam
<i>Rabbit anti-Survivin antibody [EP2880Y]</i>	1:1000	Abcam
<i>Rabbit anti-Cyclin D1 antibody [EPR2241]</i>	1:1000	Abcam
<i>Rabbit anti-Bcl-2 antibody [E17]</i>	1:1000	Abcam
<i>Rabbit anti-phospho-Akt (S473) (D9E) XP®</i>	1:1000	Cell Signaling
<i>Rabbit anti-Akt (pan) (C67E7)</i>	1:1000	Cell Signaling
<i>Rabbit anti-CXCR2 antibody</i>	1:1000	Abcam
<i>Mouse anti-Msh2 (Ab-2) (FE11)</i>	1:500	Merck Millipore
<i>Mouse anti-<math>\alpha</math>-tubulin, clone B-5-1-2</i>	1:20000	Sigma-Aldrich
<b>Anticossos secundaris</b>	<b>Dilució</b>	<b>Casa comercial</b>
IRDye 680 Donkey Anti-rabbit	1:10000	LI-COR
IRDye 800 Donkey Anti-rabbit	1:10000	LI-COR
IRDye 800 Donkey Anti-mouse	1:10000	LI-COR

Taula 3. Anticossos primaris i secundaris utilitzats en la tècnica de Western blot.

### 3.8. Immunocitofluorescència (ICF)

Per tal d'estudiar la localització subcel·lular de la subunitat p65 de NF- $\kappa$ B en les línies HT29 i HTOXAR3 es va utilitzar la tècnica de ICF. Per a l'assaig de ICF es van utilitzar les següents solucions preparades en fresc:

- Solució 4% paraformaldehid (PFA) (Panreac): Es va dissoldre 1 gram de paraformaldehid en 20 mL d'aigua miliQ en agitació i a una temperatura de 65°C. Es varen afegir 20  $\mu$ L de NaOH 10 M per tal d'ajudar en el procés de dissolució. Un cop dissolt es va ajustar el pH a 7,2 mitjançant HCl al 25%. Es va filtrar i es va guardar la solució protegida de la llum a 4°C fins al moment de la seva utilització.
- Tampó de bloqueig i permeabilització : PBS, TritóX-100 0,3%, FBS 5%, sèrum AB humà 5%

Les cèl·lules HT29 i HTOXAR3 van ser sembrades en un sistema de petites cambres de cultiu sobre portaobjectes (Millicell EZ slide, Millipore) a una densitat de 50.000 cèl·lules per cambra



i es van deixar créixer durant 48 hores. Passat aquest temps, es va retirar el medi de les cambres i es va realitzar un rentat de 5 minuts amb PBS 1X estèril. Posteriorment es van fixar les cèl·lules amb PFA 4% durant 20 minuts a TA i tot seguit, es van realitzar 3 rentats de 5 minuts amb PBS 1X estèril i es va procedir al bloqueig i permeabilització amb tampó de bloqueig durant 30 minuts a TA. A continuació es va dur a terme la incubació de l'anticòs primari anti-p65 (dilució 1:400 en tampó de bloqueig) O.N. i a 4°C. Transcorregut aquest temps, es van fer 3 rentats de 5 minuts amb PBS 1X estèril i es va afegir l'anticòs secundari anti-*rabbit* Alexa-555 (dilució 1:500 en tampó de bloqueig) durant 40 minuts a TA i protegit de la llum. Es van realitzar 3 nous rentats de 5 minuts amb PBS 1X i es va dur a terme la tinció dels nuclis amb *DAPI gold-antifade* (Invitrogen, Life Technologies), medi de muntatge fluorescent que conté el tint nuclear i que evita que es cremi la mostra per sobreexposició a la llum. Es va col·locar un cubreobjectes i es va segellar mitjançant l'ús d'esmalt d'ungles transparent. Els portaobjectes es van mantenir a 4°C resguardats de la llum fins al moment de la seva observació amb el microscopi de fluorescència *Axio Observer Z1* (Carl Zeiss).

### 3.8.1. Adquisició de les imatges

Per a l'obtenció de les imatges es va utilitzar el mòdul *ApoTome* acoplat al microscopi *Axio Observer Z1*. Es tracta d'un sistema òptic basat en tres graelles de diferents freqüències que es modifiquen segons el gruix de la mostra i el fluoròfor utilitzat. El sistema *ApoTome* s'utilitza per a prevenir punts desenfocats i possible soroll de fons de la mostra i per tant, ens permet obtenir imatges d'elevat contrast i amb una major resolució en la direcció Z respecte de les imatges realitzades amb microscopia de fluorescència convencional.

Per determinar amb exactitud la localització subcel·lular de p65 es va realitzar un anàlisi per z-stack, mòdul que permet obtenir una sèrie d'imatges transversals a diferents nivells de la cèl·lula. En el present estudi es van obtenir seccions de 0,750 µm.

Per a comprovar que la senyal fluorescent era deguda exclusivament a la detecció específica de l'anticòs primari, es van realitzar controls negatius en els que es va ometre la presència d'anticòs primari en la incubació. Aquests controls negatius van permetre determinar el nivell d'exposició màxim de cada fluoròfor per a que la senyal obtinguda fos deguda únicament a la proteïna d'estudi.

### 3.9. Determinació de la mort cel·lular per iodur de propidi

Per a determinar la mort cel·lular després del tractament amb oxaliplatí, curcumina o la combinació d'ambdós es va fer una tinció amb iodur de propidi (PI, *propidium iodide*, Sigma-Aldrich) el qual és un compost fluorescent intercalant de l'ADN que només penetra en les cèl·lules que tenen la membrana danyada degut als processos de mort. La fluorescència emesa per les cèl·lules no viables es pot detectar mitjançant citometria de fluxe.

Les cèl·lules HT29 i HTOXAR3 es van sembrar en plaques de cultiu de 6 pous (Nunclon, Nunc) a una concentració de 300.000 cèl·lules/pou durant 24 hores moment en que es va retirar el medi i es va procedir al tractament durant 24, 48 i 72 hores amb oxaliplatí, curcumina i la combinació de tots dos a dosis equivalents a la IC50 de cada fàrmac. Passat aquest temps, es va recollir el sobrenedant i es va desar en un tub falcon. A continuació es van netejar els pous amb PBS, es va afegir 1 mL d'acutasa (StemPro® Accutase®; Gibco, LifeTechnologies) per tal de desadherir les cèl·lules i es va deixar actuar durant aproximadament 5-10 minuts a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub>. Una vegada desadherides, les cèl·lules es van afegir al tub Falcon on anteriorment havíem recollit el sobrenedant i es van centrifugar durant 5 minuts a 1.200 rpm i a TA. El *pellet* obtingut va ser ressuspès en 1 mL PBS i es van afegir 20 µl de PI a cada tub obtenint una concentració final de 3 µM. El *pellet* cel·lular es va ressuspèndre i la solució es va transferir a tubs específics per a citometria de flux que es van mantenir en gel i protegits de la llum fins al moment de l'anàlisi en un equip *FACS Canto II* (Beckton Dickinson) (Figura 27).

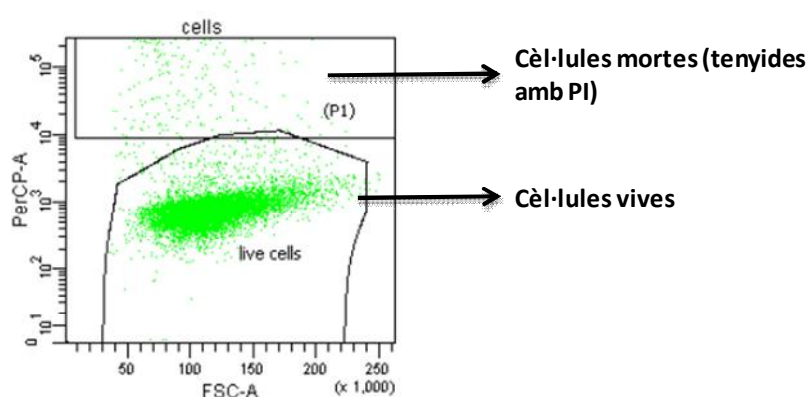


Figura 27. Imatge de la distribució de la població de cèl·lules vives i mortes després de la tinció amb PI i l'anàlisi mitjançant citometria de flux.

### 3.10. Anàlisi de l'expressió gènica

---

Per als estudis d'expressió gènica es va partir d'ARN obtingut de dues fonts diferents. D'una banda, es va utilitzar ARN total de línies cel·lulars i d'altra banda, ARN total de mostres d'explants de metàstasis hepàtiques derivades de pacients amb CCRa fixades amb formol i incloses en parafina. Segons la naturalesa de la mostra, el mètode d'extracció d'ARN emprat va ser diferent.

#### 3.10.1. Extracció d'ARN de línies cel·lulars

L'obtenció d'ARN a partir de línies cel·lulars es va realitzar utilitzant un kit comercial (E.Z.N.A.<sup>®</sup> Total RNA Kit, OMEGA) basat en la retenció d'àcids nucleics en membranes de sílice. L'extracció es va realitzar seguint el protocol descrit pel fabricant:

Es va afegir un volum de 350 µL de tampó de lisi (tampó TRK + 7 µL de β-mercaptoetanol/mostra) en *pellets* de menys de  $5 \times 10^6$  cèl·lules i de 700 µL per a *pellets* de fins a  $10^7$  cèl·lules. Seguidament, es va afegir a cada mostra 350 µL d'etanol al 70 % (preparat amb H<sub>2</sub>O lliure d'ARNases o aigua DEPC) i es va vortejar 5 segons, 2 vegades. El lisat resultant (700 µL màxim) es va passar a una columna d'extracció + tub col·lector i es va centrifugar 1 minut a 11.000 rpm i TA. A continuació, es van fer rentats de la columna amb 500 µL de *Wash buffer I* primer i després amb 500 µL *Wash Buffer II* (2 vegades) centrifugant cada vegada 1 minut a 11.000 rpm i TA. A continuació, es va centrifugar 2 minuts a 11.000 rpm i TA per tal d'assecar completament la columna, i seguidament aquesta es va introduir en un tub eppendorf de 1,5 mL i es va eluir l'ARN amb 40 µL de H<sub>2</sub>O lliure d'ARNases o aigua DEPC centrifugant 1 minut a 11.000 rpm i 4°C.

L'ARN obtingut es va tractar amb DNAasa (*DNA-free kit Dnase treatment*; AMBION, Life technologies) (4 µL de *10X Dnase I Buffer* i 1,5 µL de *rDNase I*) a 37°C durant 3 minuts. Passat aquest temps, es va inactivar la reacció amb 4 µL de *Dnase Inactivation Reagent* durant 2 minuts a TA. Finalment, es van centrifugar les mostres a 14.000 rpm durant 1 minut a 4°C i es va recollir el sobrenedant (ARN purificat) en un tub eppendorf nou. Les mostres d'ARN es van mantenir a -80°C fins a la seva quantificació i utilització.

### 3.10.2. Extracció d'ARN parafinat

#### 3.10.2.1. Desparafinització i digestió

Es va partir de portaobjectes de vidre on s'havien dipositat talls d'uns 10 µm de gruix provinents de mostres de tumors incloses en parafina. Aquests portaobjectes es van introduir en xilol (QCA) durant 10 minuts i després de deixar-los assecar durant 20 minuts a TA es va rascar la mostra romanent amb un bisturí i es va dipositar en un tub eppendorf amb 200 µL de solució de digestió (10 mM Tris-HCL pH=8, 0,1 mM EDTA pH=8, 2% SDS i H<sub>2</sub>O de ARNases) i 10 µL de proteinasa k (20 mg/ml; Qiagen), es van agitar lleugerament i es van deixar incubant O.N. a 65°C i en agitació constant.

#### 3.10.2.2. Extracció de l'ARN

En aquest cas, degut a la poca quantitat de teixit parafinat de partida, l'ARN es va obtenir mitjançant el mètode del Trizol. Tot el procés es va realitzar en gel.

A les mostres digerides la nit anterior es van afegir 800 µL de Trizol (Invitrogen, Life Technologies), es va barrejar la mostra, es van afegir 160 µL de cloroform (Appllichem, Panreac) i es van deixar incubant 2-3 minuts a TA. Passat aquest temps, els tubs es van centrifugar a 13.400 rpm durant 15 minuts a 4°C, moment en que es van obtenir tres fases clarament diferenciables, una fase inferior de color vermell formada per fenol-cloroform, una interfase, i una fase aquosa superior on es trobava l'ARN. Aquesta última es va recollir en un nou tub eppendorf, es van afegir 2,5 µL de glicogen (Roche Diagnostics) i 400 µL d'isopropanol (Sigma-Aldrich) i la barreja es va deixar incubant durant 10 minuts a 4°C per posteriorment centrifugar-la a 13.400 rpm durant 10 minuts a 4°C. El pellets resultants es van ressuspendre en 800 µL d'etanol al 75% (rentat) i es van centrifugar a 2.900 rpm durant 5 minuts a 4°C. Es va descartar el sobrenedant (etanol) i els pellets es van deixar assecar a TA durant 5-10 minuts per posteriorment ressuspendre'ls en uns 40 µL de H<sub>2</sub>O lliure d'ARNases. Tot seguit, les mostres es van incubar a 60°C durant 10 minuts i es va procedir al tractament amb DNAasa tal i com ha estat detallat en el punt anterior. Finalment, les mostres van ser congelades a -80°C fins al moment de la seva quantificació i utilització.

A la figura 28, es troben esquematitzats els processos d'extracció d'ARN a partir de cèl·lules i teixit parafinat.

### 3.10.3. Quantificació de les mostres d'ARN

La quantificació (ng/ $\mu$ L) i mesura de la qualitat de l'ARN obtingut es va realitzar mitjançant l'equip NanoDrop TM ND-1000 (Thermo Scientific), a partir de la mesura de les absorbàncies de la mostra a 260 i 280 nm. Per a treballar amb *microarrays* d'expressió és important obtenir mostres d'alta qualitat ( $1,7 < \text{Rati}_{A260/A280} < 2,1$ ) i ben purificades (no presència d'ADN). Es va analitzar la presència d'ADN contaminant a les mostres mitjançant un gel d'agarosa a l'1%.

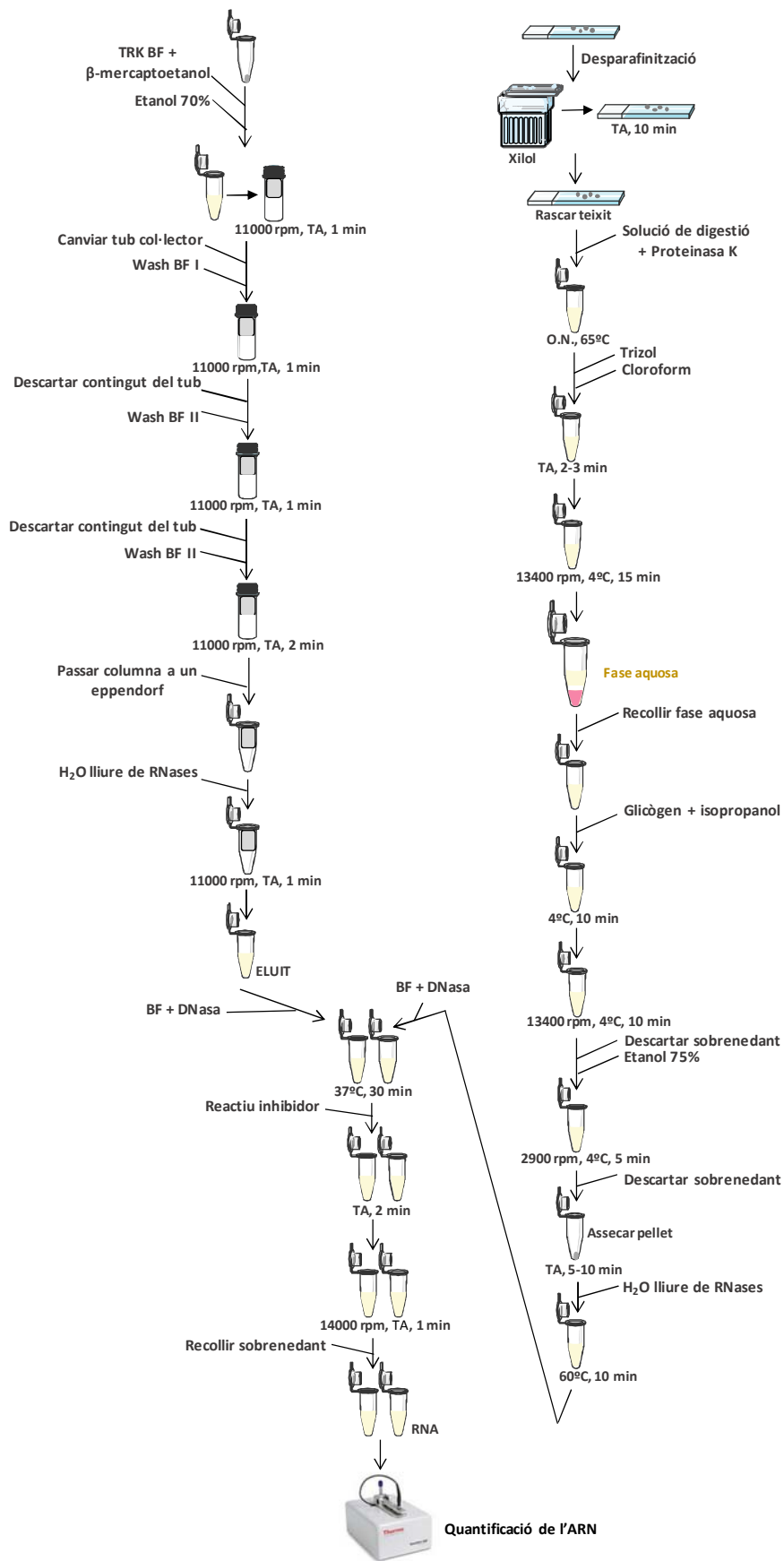


Figura 28. Esquema explicatiu del procediment d'extracció d'ARN a partir de *pellets* cel·lulars o teixit parafinat.

### 3.10.4. Retrotranscripció

La retrotranscripció (RT) és un procés basat en la síntesi d'ADN complementari (ADNc) utilitzant com a motlle ARN monocatenari mitjançant l'enzim transcriptasa inversa (retrotranscriptasa). Per a l'obtenció de l'ADNc es va partir d'uns 3 µg d'ARN en un volum final de 10 µL que es van incubar amb 2 µL de MIX 1 [1 µL de 10 mM dNTPs (Ecogen) i 1 µL de 250 ng/mL *Random Hexamer Primer* (Thermo Fisher Scientific)] durant 5 minuts a 65°C. A continuació, es van afegir 8 µL de MIX 2 [2 µL de 0,1 M ditioneitol (DTT) (Thermo Fisher Scientific), 4 µL de Buffer de reacció 5X (Thermo Fisher Scientific), 1 µL de *RNAasa OUT* (Thermo Fisher Scientific) i 1 µL d'enzim *MMLV reverse transcriptase 200u* (Thermo Fisher Scientific)]. Les condicions de PCR utilitzades per a l'amplificació de l'ADNc van ser les següents (Figura 29):

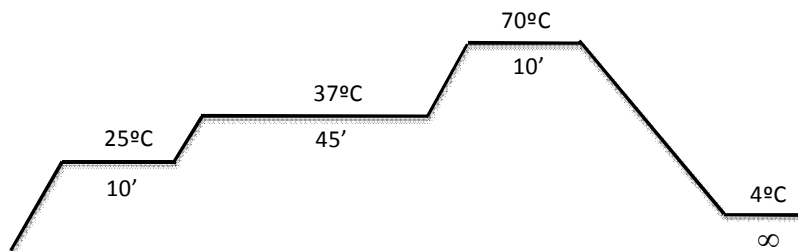


Figura 29. Condicions de PCR utilitzades en el procés de retrotranscripció.

El producte obtingut es va diluir en H<sub>2</sub>O lliure de nucleases fins una concentració d'ADNc final de 20 ng/µL i es va congelar a -20°C fins al moment de la seva utilització.

### 3.10.5. Expressió d'ARNm a temps real (qPCR)

La qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*) és una tècnica que permet detectar i quantificar simultàneament l'amplificació de l'ADN en temps real mitjançant la detecció del senyal fluorescent que emet durant la seva síntesi per acció d'un fluoròfor. Aquest senyal fluorescent és directament proporcional a la quantitat de producte generat.

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

- 3 rèpliques per mostra d'estudi.
- 3 rèpliques de calibrador o ARN de referència.
- 2 rèpliques de control negatiu per a cada mix.
- 2 rèpliques de control negatiu de RT.

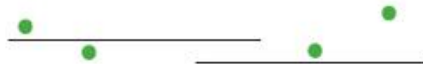
- 3 rèpliques per a cada mostra de *RTMINUS*, que consisteix en introduir ARN no retrotranscrit per a comprovar l'absència d'ADN a la mostra de partida.

L'equip utilitzat va ser el *LightCycler® 480 PCR system* (Roche). L'ADNc es va amplificar mitjançant el kit *KAPA SYBR® Fast qPCR kit Master Mix (2X)* (KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA), consistent en la polimerasa *KAPA SYBR®DNA polymerase*, colorant fluorescent *SYBR® Green I*,  $MgCl_2$ , dNTPs i estabilitzadors. La polimerasa *KAPA SYBR®DNA polymerase* està especialment dissenyada per a realitzar qPCR utilitzant el colorant fluorescent SYBR Green I, el qual, detecta els productes de PCR mitjançant la seva unió a les cadenes d'ADN formades en aquesta reacció. A la Figura 30, es detalla el procés de qPCR mitjançant SYBR green:

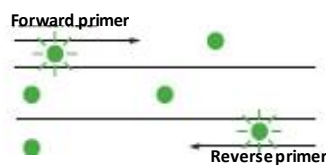
**1. Inici de la reacció:** El SYBR\*Green I emet fluorescència quan s'uneix a la doble cadena d'ADN.



**2. Desnaturalització:** Quan l'ADN es desnaturalitza, el SYBR\*Green I s'allibera i la fluorescència es redueix dràsticament.



**3. Polimerització:** Durant l'extensió, s'uneixen els *primers* i es genera el producte de PCR.



**4. Polimerització completa:** Quan s'ha completat la polimerització, el SYBR\*Green I s'uneix al producte de doble cadena, resultant en un increment net de la fluorescència detectada pel sistema *LightCycler® 480 PCR system*.

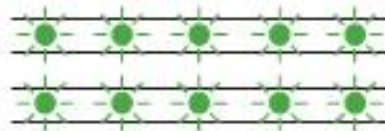


Figura 30. Esquema del procés de qPCR mitjançant SYBR green.

Es va utilitzar la mesura de l'expressió del gen de la  $\beta$ -actina com a control endògen (veure més endavant). Les parelles de *primers* (Sigma-Aldrich) utilitzats en aquest estudi estan detallats a la Taula 4:



	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (3'-5')
CXCL8	TCTTGGCAGCCTTCCTGATTTTC	GTGTGGTCCACTCTCAATCACTCT
CXCL1	AACCCCAAGTTAGTTCAATCTGGA	CATGTTGCAGGCTCCTCAGAA
CXCL2	TCAAACCCAAGTTAGTTCAATCCTGA	GCTGACATGTGATATGTCATCACGAA
β-actina	TGAGCGCGGCTACGCTT	TCCTTAATGTCACGCACGATTT

Taula 4. Parelles de primers utilitzats en els assajos de qPCR

La mida dels productes de PCR generats amb aquests primers van ser de 155 parells de bases (pb) per a CXCL8, 104 pb per a CXCL1 i 113pb per a CXCL2.

Els reactius necessaris per dur a terme la reacció de PCR es troben detallats a continuació (Taula 5):

	Ci	Cf	Volum (µL)
Mostra ADNc			2 µL
KAPA SYBR Fast Master Mix 2X	2X	1X	5 µL
Primers	20 µM	0,2 µM	0,1 µL
H <sub>2</sub> O lliure d'ARNases	Fins a 10 µL		2,9 µL

Taula 5. Volums necessaris de mostra d'ADNc, KAPA SYBR Fast Master Mix, primers i H<sub>2</sub>O lliure d'ARNases per a dur a terme la reacció d'amplificació de l'ADNc. Ci: concentració inicial Cf: concentració final.

Les condicions de PCR utilitzades van ser les següents (Figura 31):

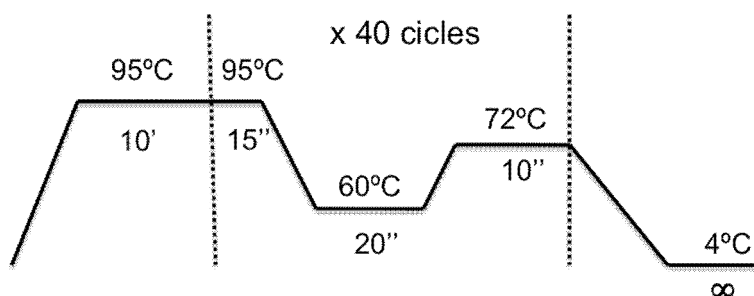
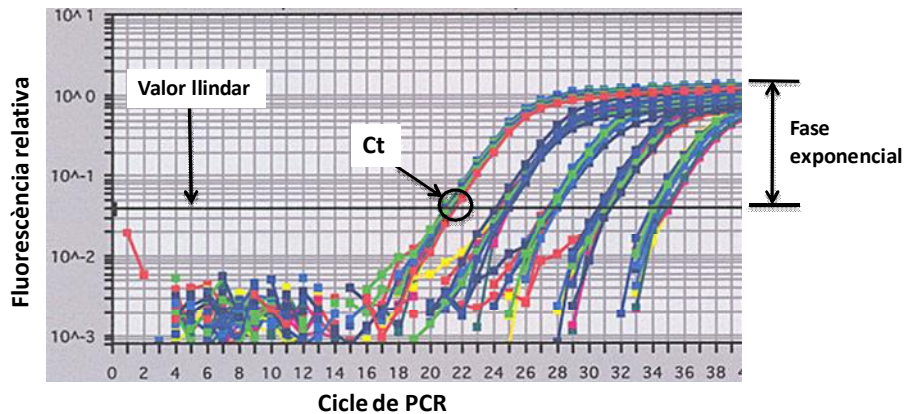


Figura 31. Condicions de PCR emprades per a l'amplificació de l'ADNc

La quantificació relativa de l'expressió gènica es va calcular d'acord amb el mètode comparatiu del cicle llindar o  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (259). Es defineix com a cicle llindar, el cicle de PCR en que la fluorescència supera la fluorescència basal. Aquest valor es troba a la zona d'amplificació exponencial. Per tant, per a cada una de les mostres es va establir el valor d'expressió de cada gen com el cicle de PCR que talla amb aquest llindar (Ct). (Figura 32):



**Figura 32. Gràfic d'amplificació gènica analitzada una vegada ha finalitzat el procés.** Les corbes representen l'amplificació del gen per a cada mostra. El valor llindar, dependent de cada gent, talla per la part inferior de la zona d'amplificació exponencial.

A continuació es va calcular la diferència de Ct, o  $\Delta Ct$ , com la diferència de cicles entre el gen experimental i el del control endògen mitjançant la fórmula:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gen problema}} - Ct_{\text{gen endògen}}$$

Per a que totes les mostres fossin comparables entre elles, els valors d'expressió van ser normalitzats amb una mateixa mostra de referència o calibrador (*Human Reference RNA*, Stratagene), mitjançant la fórmula:

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

Finalment, el valor d'expressió, calculat com  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , es va referenciar al calibrador ( $\Delta\Delta Ct = 0$ ), mostrant quantes vegades per sobre o per sota del calibrador ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$ ) s'expressa el gen problema en cada mostra.

Per a cada mostra es van realitzar 3 experiments independents (procedents de 3 RT independents) per a cada gen. En cada experiment, la desviació estàndard entre les 3 rèpliques per mostra de cada gen havia de ser inferior a 0,25.

D'altra banda, per a considerar que una mostra no estava contaminada per ADN genòmic, el valor de RT MINUS havia de ser inferior a 5, segons la fórmula:

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

i finalment :  $100 / 2^{\Delta\Delta Ct_{RTMINUS}} < 5$

### 3.11. Anàlisi de l'expressió per tecnologia Microarray

Aquesta tècnica es va utilitzar per a identificar els efectes sobre l'expressió gènica dels tractaments amb oxaliplatí i oxaliplatí més curcumina comparant la línia HT29 amb la seva derivada resistent a oxaliplatí, HTOXAR3. L'estudi es va realitzar mitjançant la plataforma *Agilent Human V2 Microarrays* (Agilent) al servei de genòmica i bioinformàtica del nostre Institut de recerca. 100 ng d'ARN total es van retrotranscriure a cRNA i van ser marcats amb el nucleòtid fluorescent Cy3-CTP mitjançant el kit *Quick Amp Labeling kit* (Agilent). Posteriorment es va procedir a la hibridació i rentat dels *arrays* i tot seguit, a l'escaneig i extracció d'imatges utilitzant un programa informàtic comercial seguint les instruccions del fabricant (Agilent). En el pre-processament i anàlisi de les dades es va corregir el soroll de fons (*background*) mitjançant el mètode *normexp*, i es va aplicar una normalització de quantils per tal que les distribucions del log<sub>2</sub> de les intensitats fossin comparables entre mostres. L'expressió diferencial de gens va ser analitzada mitjançant el model lineal empíric Bayesià. La significació estadística en l'expressió gènica diferencial va ser determinada establint un valor de *false discovery rate* (FDR, calibra la proporció de falsos positius) aplicant el mètode de Benjamini and Yekutiely de correcció per l'ajustament de comparacions múltiples amb el paquet estadístic Limma en entorn R (260).

Per a determinar els gens diferencialment expressats entre les diferents condicions experimentals, es va aplicar un filtre dual que consistia en el punt de tall o *cut-off* i el valor absolut de *fold change* ( $|FC| > 1,2$  i q-valor  $< 0,05$ ) en cada comparació específica. Les interseccions entre les llistes de gens es van representar mitjançant diagrames de Venn amb l'aplicació Venny 2.02 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>).

### 3.11.1. Anàlisi d'enriquiment funcional

A partir dels gens diferencialment expressats de forma significativa es van estudiar possibles enriquiments rellevants de gens en les categories de *gene ontology* (GO) mitjançant el web GOrilla (261, 262). Per a la confirmació independent d'aquestes dades es va utilitzar l'eina GSEA (*gene set enrichment analysis*) (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/annotate.jsp>)

### 3.12. Silenciament gènic amb siRNAs

La interferència per ARN (ARNi) descoberta per Craig Mello i Andrew Fire l'any 1998 (263) és un procés de silenciament gènic post-transcripcional de gens específics pel qual ARNs de 21 a 23 nucleòtids de doble cadena (*siRNA*, *small interfering RNAs*) s'uneixen a seqüències d'ARNm complementàries causant la seva degradació i el consegüent silenciament gènic i proteic. En la present tesi doctoral, aquesta tècnica es va utilitzar per al silenciament gènic transitori de les quimiocines *CXCL1* (siCXCL1) i *CXCL8* (siCXCL8). Per fer-ho es van utilitzar pools de 4 *siRNAs* diferents i específics per a cadascun dels gens així com un control negatiu (siCNT), tots de la casa comercial Dharmacon (*On-TARGET plus SMART pool Human #L-003898-00*, *#L-004756-00* i *D-001810-10-05*, respectivament). El control negatiu consisteix en un oligonucleòtid de seqüència no homòloga a cap ARN humà. A més a més, es va incloure un control de toxicitat de la transfecció o *Mock* consistent en cèl·lules no transfectades amb *siRNA*. La concentració d'oligonucleòtids per aconseguir al menys un 70% de silenciament a nivell gènic es va establir per a cadascun dels gens en estudi: 25 nM per a siCXCL1 i siCXCL8 i 3 nM per a siCNT.

Les cèl·lules HTOXAR3 van ser tripsinitzades, comptades amb la cambra de Neubauer i concentrades a  $2,5 \times 10^5$  cèl·lules/mL en medi de cultiu DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific) lliure d'antibiòtics (medi de transfecció). Les cèl·lules es van mantenir a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> fins al moment de la transfecció. Els *siRNA* es van afegir a plaques de 6 pous (Nunc, Labclinics) i es van deixar 5 minuts a TA en medi OptiMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific) sense FBS a un volum final de 500 µL. A continuació es van incorporar 5 µL de l'agent de transfecció Lipofectamina<sup>®</sup> RNAiMAX (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) barrejant suaument el contingut del pou i deixant 20 minuts a TA i protegint de la llum per a la formació dels complexos de transfecció. A continuació, es va afegir 1 mL de suspensió cel·lular ( $2,5 \times 10^5$  cèl·lules/mL) a cada un dels pous i medi DMEM (Gibco, Life technologies) de transfecció fins a un volum final de 2,5 mL/pou i es van incubar les plaques a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub> durant 24 hores. Passat aquest temps, es va substituir el medi de transfecció per medi fresc suplementat amb

antibiòtics i es van tornar a deixar les plaques durant 24 hores a 37°C i 5% de CO<sub>2</sub> fins al moment de la valoració del silenciament i/o el seu ús per a posteriors experiments (Figura 33).

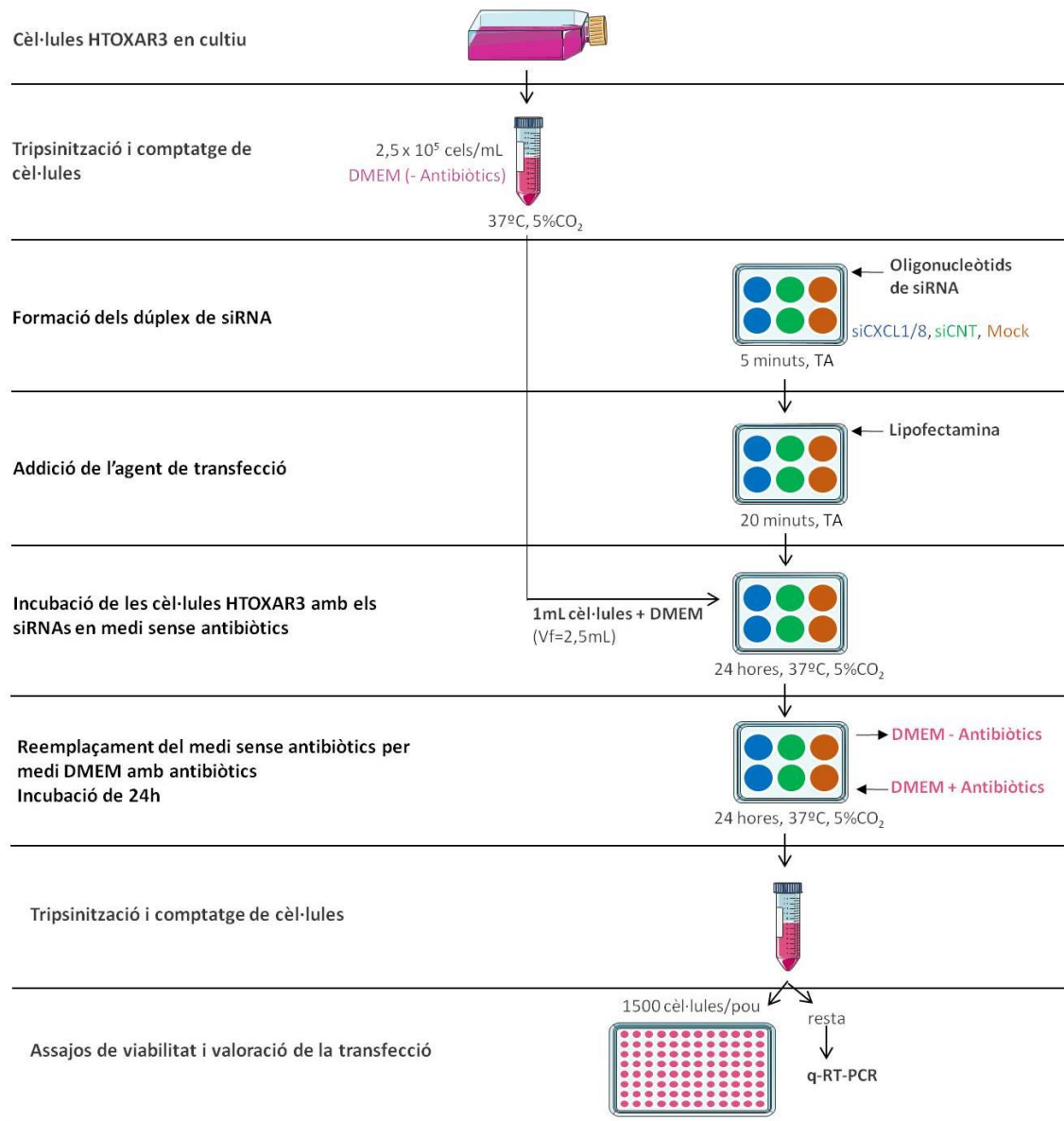


Figura 33. Esquema explicatiu del procediment de silenciament gènic mitjançant siRNA.

### 3.13. Assaig ELISA

Per tal de determinar la concentració proteica de CXCL8 i CXCL1 present en el sobrenedant (medi de cultiu) de les cèl·lules HT29 i HTOXAR3 es va utilitzar l'assaig d'ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). L'assaig ELISA és una tècnica d'immunoassaig en la qual un anticòs immobilitzat en una placa pot detectar un antígen (proteïna) que a la vegada és reconegut per un anticòs secundari conjugat amb un enzim que en contacte amb els seu substrat genera un

producte detectable, com per exemple un canvi de color del medi que pot ser detectat i quantificat per un espectrofotòmetre (Figura 34).

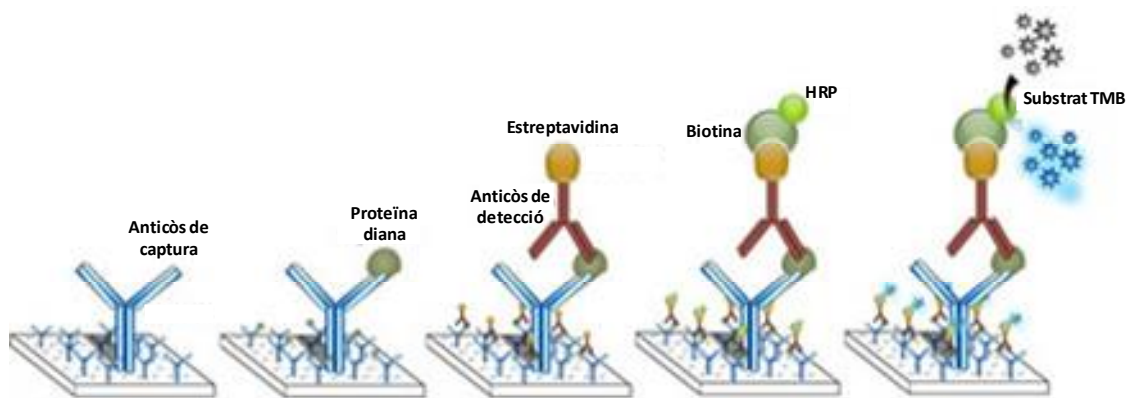


Figura 34. Esquema explicatiu del procediment d'ELISA.

Es van sembrar 300.000 cèl·lules per pou en plaques de 6 pous (Nunc, Labclinics) i passades 24 hores es va procedir al tractament amb diferents concentracions d'oxaliplatí, curcumina i la combinació de tots dos durant 24 hores. Transcorregut aquest temps, es va recollir el medi sobrenedant de cada pou (1 mL) amb el que es va procedir a realitzar l'assaig ELISA:

### 3.13.1. Detecció de CXCL8

Per mesurar els nivells proteics de CXCL8 es va fer servir el kit *IL-8 OptEIA ELISA Set* (Becton Dickinson). En primer lloc, es van cobrir els pous de la placa de 96 amb 100 µL de l'anticòs anti-CXCL8 (*Capture antibody*) diluït 1:250 en *Coating Buffer* (0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9,5, 10N NaOH) i es va deixar incubant O.N. a 4°C. Al dia següent, es van realitzar 3 rentats amb *Wash Buffer* (PBS + 0,05% Tween-20), es van afegir 200 µl d'*Assay diluent* (tampó de bloqueig. PBS + 10% FBS) i es va incubar la placa a TA durant 1 hora. Tot seguit, es va aspirar l'*Assay diluent* dels pous i es van realitzar 3 rentats amb *Wash Buffer* de la mateixa manera que en el pas anterior. A continuació, es van preparar les dilucions per a la recta patró mitjançant l'estandard proveït pel kit i les dilucions ½ de les mostres d'estudi amb l'*Assay diluent*. Un volum de 100 µl de cada mostra es va afegir en els pous corresponents i es va deixar incubar durant 2 hores a TA. Passat aquest temps, es van aspirar les mostres i es van realitzar 5 nous rentats amb *Wash Buffer*. A continuació es van afegir 100 µl de *Working Detector* [*Assay Diluent* + *Detection Antibody* (dilució 1:250) + *Sav-HRP reagent* (dilució 1:250)] a cada un dels pous i es va deixar incubar la placa durant 1 hora a TA. Posteriorment, es va extreure el *Working Detector* i es van realitzar 7 rentats amb *Wash Buffer*. Tot seguit, es van afegir 100 µl de *Substrate Solution* a cada pou i es va incubar la placa durant 30 minuts a TA protegida de la llum. Finalment es van

afegir 50 µl de *Stop Solution* (2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i immediatament es va llegir l'absorbància a 450 nm mitjançant l'espectrofotòmetre *Varioskan* (Thermo®).

### 3.13.2. Detecció de CXCL1

En aquest cas es va utilitzar el kit *RayBio Human GRO-alpha ELISA kit* (RayBiotech) que a diferència de l'anterior, ja portava immobilitzat l'anticòs primari anti-CXCL1 al fons dels pous de la placa de 96 i per tant, el primer pas va ser diluir les mostres 1/2 i preparar les dilucions per a la recta patró utilitzant *1X Assay diluent*. A continuació, es van afegir 100 µL de cada mostra en els pous corresponents i es va deixar incubar O.N. a 4°C. L'endemà es va retirar la mostra, es van realitzar 4 rentats amb 300 µL de *1x Wash Buffer* i es van afegir 100 µL de *1X biotinylated antibody* a cada pou deixant 1 hora a TA en agitació constant. Passat aquest temps, es van realitzar 4 rentats amb 300 µL de *1X Wash Buffer*, es van afegir 100 µL de *Streptavidin solution* i es va deixar incubant durant 45 minuts a TA i en agitació constant. Després de 3 rentats més amb 300 µL de *1X Wash Buffer* es van afegir 100 µL de *TMB (3,3', 5,5' – tetramethylbenzidine) One-Step Substrate Reagent* deixant la placa 30 minuts a TA protegida de la llum. Finalment es van afegir 50 µl de *Stop Solution* (0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i immediatament es va llegir l'absorbància a 450 nm mitjançant l'espectrofotòmetre *Varioskan* (Thermo®).

### 3.14. Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic i la representació gràfica de les dades es va dur a terme amb el programa Graphpad Prism v4 per a Mac OS. En tots els casos es van realitzar un mínim de 3 experiments independents. Els resultats es mostren com el mitjana ± SEM i per fer la comparació entre dues condicions experimentals (per exemple: No tractament i tractament amb oxaliplatí) es va utilitzar el test paramètric de *t de Student* per a dades aparellades, després de comprovar que les dades s'ajustaven a una distribució normal. En el cas de comparacions múltiples es va fer servir el test ANOVA de dos factors seguit del test de Bonferroni per a valorar les comparacions entre mitjanes individuals. En tots els casos es va estudiar en primer lloc la homogeneïtat de la variància. En aquells casos en els que es van obtenir diferències significatives en la homogeneïtat de la variància, les dades es van transformar al seu logaritme en base 10 i es van tornar a analitzar estadísticament. Es va considerar que les dades eren significativament diferents quan el valor de *p* va ser inferior a 0,05.

En el cas de dues mostres aparellades en què els valors de la variable en estudi no seguien una distribució normal es va fer servir la prova no paramètrica dels rangs amb signe de Wilcoxon. Es va considerar que les dades eren significativament diferents quan el valor de  $p$  va ser inferior a 0,05.

Les diferències entre tractaments individuals es van calcular a partir de la representació gràfica de les corresponents corbes dosi-resposta i el subseqüent anàlisi per regressió no lineal i test F. Per a la construcció de les corbes, es van transformar les dades de dosi calculant el corresponent  $\text{Log}[\text{dosi}]$  i representant-les a l'eix de les abscisses. Els valors de viabilitat cel·lular corresponents a cada una de les dosis es van normalitzar i es van representar a l'eix d'ordenades. Es va considerar que les dades eren significativament diferents quan el valor de  $p$  va ser inferior a 0,05.

L'anàlisi estadístic corresponent a l'estudi de *microarrays* es troba explicat en l'apartat 3.11.



---

## 4. RESULTATS

Gran part dels resultats corresponents al treball realitzat en el transcurs de la present tesi doctoral han estat publicats en la revista científica *Scientific Reports* (2016) sota el títol: *Curcumin mediates oxaliplatin-acquired resistance reversion in colorectal cancer cell lines through modulation of CXCL-chemokine/NF- $\kappa$ B signaling pathway*. **Vicenç Ruiz de Porras**, Sara Bystrup, Anna Martínez-Cardús, Raquel Pluvinet, Lauro Sumoy, Lynne Howells, Mark I. James, Chinenye Iwuji, José Luis Manzano, Laura Layos, Cristina Bugés, Albert Abad & Eva Martínez-Balibrea (veure Annex 1).

## **4.1. Resultats de l'objectiu 1**

---

### **4.1.1. Estudi de l'activació de NF- $\kappa$ B en línies cel·lulars de CCR sensibles i amb resistència adquirida a oxaliplatí**

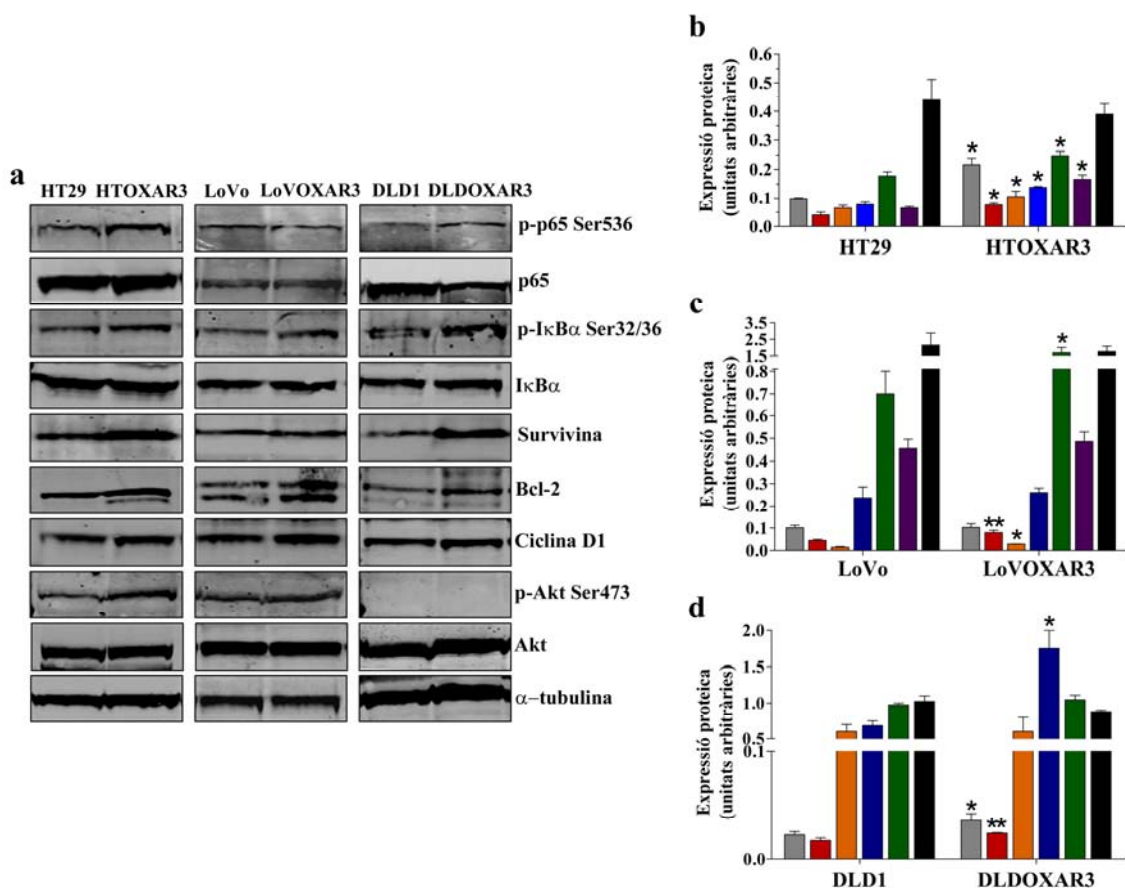
Resultats previs del nostre grup suggerien la implicació del factor de transcripció NF- $\kappa$ B en l'adquisició de resistència a oxaliplatí en els nostres models cel·lulars amb resistència adquirida a aquest fàrmac (102). Per tal de validar aquesta hipòtesi es va analitzar l'activació basal de NF- $\kappa$ B en tres línies cel·lulars de CCR (HT29, LoVo i DLD1) i en les seves línies derivades amb resistència adquirida a oxaliplatí (HTOXAR3, LoVOXAR3 i DLDOXAR3, respectivament). Per fer-ho, mitjançant western blot es va estudiar l'estat de fosforilació de les proteïnes p65 en el residu Ser536 (p-p65 Ser536) i d'I $\kappa$ B $\alpha$  en els residus Ser32 i Ser36 (p-I $\kappa$ B $\alpha$  Ser32/36) en extractes de proteïnes obtingudes de les diferents línies cel·lulars recollides després de 48 hores en cultiu. A més a més, es van analitzar els nivells de Bcl-2, Survivina (proteïnes antiapoptòtiques) i Ciclina D1 (proteïna proproliferativa) que són tres proteïnes l'expressió gènica de les quals està regulada per NF- $\kappa$ B i que estan estretament relacionades amb els processos de quimioresistència (168). Tal i com es pot observar a la Figura 35, es va detectar una banda intensa corresponent a la proteïna p65 fosforilada en el residu Ser536 en totes les línies cel·lulars estudiades el que indica una activació constitutiva de la via de NF- $\kappa$ B. A més a més, es va poder observar un augment significatiu en les bandes corresponents a aquesta proteïna en les línies resistents HTOXAR3 (Figura 35a,b) i DLDOXAR3 (Figura 35a,c) en comparació a les seves línies cel·lulars parentals sensibles a oxaliplatí, suggerint que, almenys en aquestes dues línies, la pressió selectiva del fàrmac ha provocat un enriquiment de cèl·lules amb una major activació de la via.

La fosforilació de I $\kappa$ B $\alpha$  és un pas essencial en l'activació de la via de NF- $\kappa$ B i es tradueix en la seva degradació pel proteasoma 26S i la consegüent translocació nuclear de l'heterodímer p65/p50. En consonància amb l'hiperfosforilació de p65 en HTOXAR3 i DLDOXAR3, també es va

observar un increment significatiu en les bandes corresponents a  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  fosforilada en els residus Ser32 i Ser36 en aquestes línies i també en LoVOXAR3 en comparació amb LoVo. Malgrat això, no vam observar diferències significatives en els nivells basals de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  total entre les línies cel·lulars sensibles i les resistents.

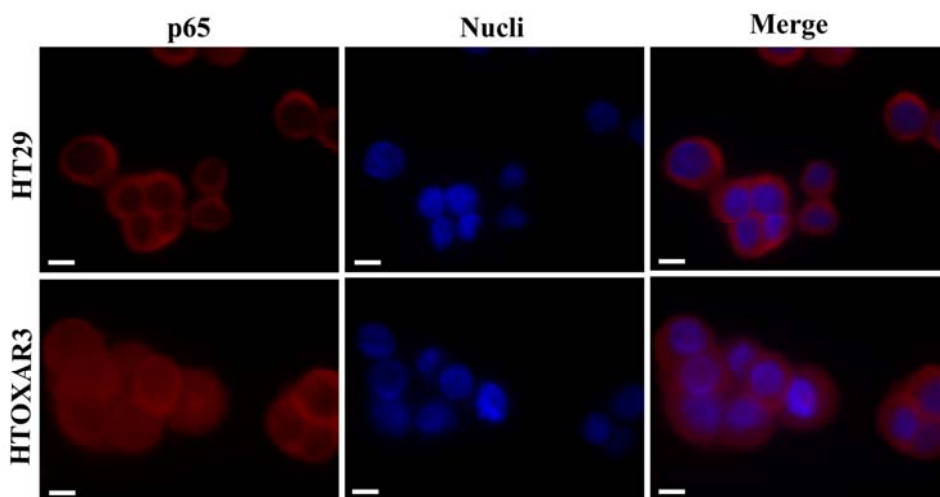
En relació a Bcl-2, Survivina i Ciclina D1 es va observar un increment significatiu de les bandes corresponents en el model resistent HTOXAR3 en comparació a la línia HT29 (Figura 35a,b) mentre que en els altres models aquest increment només es va observar en Bcl-2 i Ciclina D1 en la línia LOVOXAR3 (Figura 35a,c) i en Survivina en el cas de DLDOXAR3 (Figura 35a,d). A la Figura 35a, a l'alçada corresponent al pes molecular de Bcl-2 s'hi poden observar dues bandes clarament diferenciades. Aquest fet és degut a que aquesta proteïna s'expressa en dues isoformes diferents: Bcl-2 $\alpha$  (26 kDa) que representa la isoforma majoritària i Bcl-2 $\beta$  (22 kDa). Resulta interessant destacar la sobreexpressió de la isoforma  $\beta$  en les línies resistents a oxaliplatí i de manera significativa en el model HTOXAR3. Malgrat que ambdues isoformes presenten una estructura gairebé idèntica, Petros i col·laboradors van demostrar que Bcl-2 $\beta$  s'unia de manera més eficient a les proteïnes Bad i Bak fet que li confereix unes majors propietats antiapoptòtiques a les de la isoforma Bcl-2 $\alpha$  (264).

La serina/treonina quinasa Akt participa activament en els processos de supervivència i proliferació cel·lular i és capaç d'activar NF- $\kappa$ B per fosforilació directa de la quinasa IKK $\beta$  i de p65 o de manera indirecta estimulant l'activació del complex IKK a través de mTOR o MAP3K (265-267). Donat que els nostres resultats previs van demostrar un increment d'AKT1 a nivell transcriptòmic en les línies resistents a oxaliplatí vam voler comprovar si aquesta proteïna també estava hiperfosforilada i per tant hiperactivada en aquestes línies. Els nostres resultats van mostrar un increment significatiu de la banda corresponent a Akt fosforilada en el residu Ser473 (p-Akt Ser473) només en el model HTOXAR3 en comparació a la línia parental sensible HT29 (Figura 35a,b). És interessant destacar que a diferència del que han reportat altres estudis (268) no vam poder observar cap banda corresponent a p-Akt Se473 en les línies cel·lulars DLD1 i DLDOXAR3.



**Figura 35. Activació de la via NF-κB en línies cel·lulars de càncer colorectal amb resistència adquirida a oxaliplatí.** Imatges representatives de western blot (a) i representació gràfica corresponents a l'anàlisi basal de les proteïnes p65 fosforilada (p-p65 Ser536, barres grises), IκBα fosforilada (p-IκBα Ser32/36, barres vermelles), Survivina (barres taronges), Bcl-2 (barres blaves), Ciclina D1 (barres verdes), Akt fosforilada (p-Akt Ser473, barres liles) i IκBα (barres negres) a les línies cel·lulars HT29/HTOXAR3 (b), LoVo/LoVOXAR3 (c) i DLD1/DLDOXAR3 (d). L'α-tubulina es va utilitzar com a control intern. Els resultats es mostren com la mitjana ± SEM, calculats a partir d'un mínim de tres experiments independents. \*p<0,05 i \*\*p<0,01 respecte a l'expressió de proteïna en la línia parental sensible corresponent.

En conjunt, aquests resultats indiquen que la via de NF-κB està hiperactivada especialment en el model HTOXAR3 com a resultat del procés d'adquisició de resistència a oxaliplatí i que l'activació d'Akt pot representar una possible causa d'aquesta activació. Per tal de comprovar que la hiperactivació de la via i l'augment en l'expressió de les dianes de NF-κB estudiades es corresponien amb un increment en la translocació nuclear de p65, es van analitzar els nivells basals de p65 en aquest compartiment cel·lular en les línies HT29 i HTOXAR3 mitjançant immunocitofluorescència. Els resultats obtinguts van constatar un increment de la tinció nuclear de p65 en el model resistent HTOXAR3 en comparació a la línia HT29 (Figura 36).



**Figura 36. Localització subcel·lular basal de p65 en les línies cel·lulars HT29 i HTOXAR3.** Imatges representatives de l'anàlisi per immunocitofluorescència de la proteïna p65 (vermell) en cèl·lules HT29 i HTOXAR3. *Merge*: superposició de la senyal detectada per p65 i nucli cel·lular (en blau). Les imatges s'han obtingut amb un objectiu d'immersió en oli 40x. Barra de mida: 10  $\mu$ m

Així doncs, en vista d'aquests resultats, en el subsegüents experiments vam considerar la utilització del model de resistència HT29/HTOXAR3 com a paradigma d'activació de la via de NF- $\kappa$ B com a conseqüència de l'adquisició de resistència a oxaliplatí.

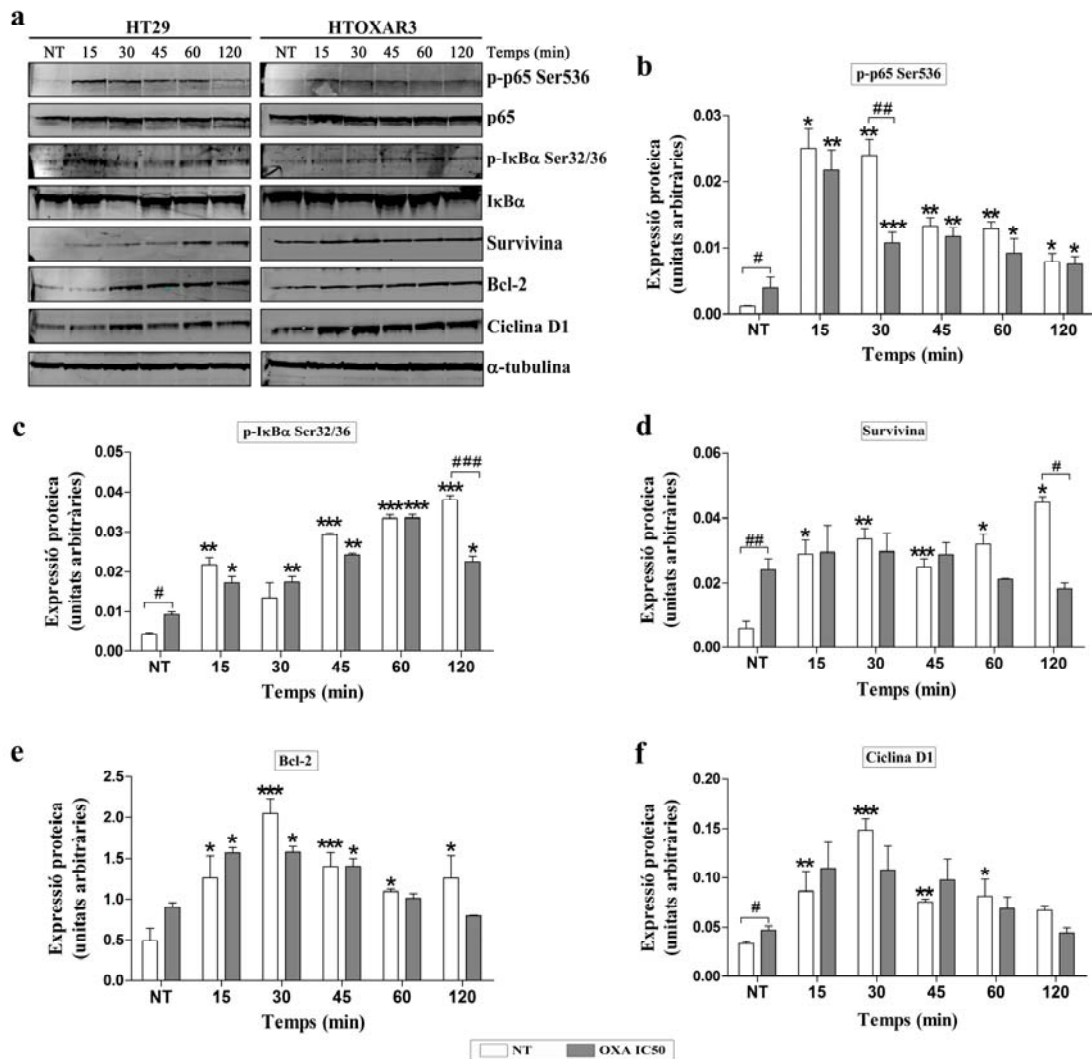
#### 4.1.2. Estudi de l'activació de la via de senyalització de NF- $\kappa$ B en resposta al tractament amb oxaliplatí

Un gran nombre de fàrmacs antineoplàsics poden activar la via de NF- $\kappa$ B a través tant de l'activació de receptors de mort cel·lular situats a la membrana citoplasmàtica (com TNFRs), la inducció d'estrès oxidatiu (ROS) o per efecte de senyals originats al nucli cel·lular en resposta al dany a l'ADN (119, 123, 269). S'ha descrit que l'activació de la via de NF- $\kappa$ B es produeix després dels primers 10 minuts d'exposició a TNF $\alpha$  mantenint-se activada durant un temps superior a les 48 hores en cèl·lules HT29 (270).

Tenint en compte aquest fet, vam estudiar l'estat de fosforilació de p65 i I $\kappa$ B $\alpha$  així com els nivells proteics de Bcl-2, Survivina i Ciclina D1 en les línies cel·lulars HT29 i HTOXAR3 després del tractament amb oxaliplatí a temps curts (fins a 120 minuts) i a les 24 hores post-tractament. Les dosis d'oxaliplatí emprades en tots els experiments corresponen a dosis equivalents a la IC50 per a cada línia cel·lular (10 i 30  $\mu$ M per a HT29 i HTOXAR3, respectivament). Els resultats van mostrar que el tractament amb oxaliplatí induïa una ràpida fosforilació de p65 i I $\kappa$ B $\alpha$  (Figura 37a, b, c) així com un augment en els nivells de Survivina, Bcl-2 i Ciclina D1 (Figures 37a, d, e, f) en els primers 15 minuts d'exposició al fàrmac en ambdues

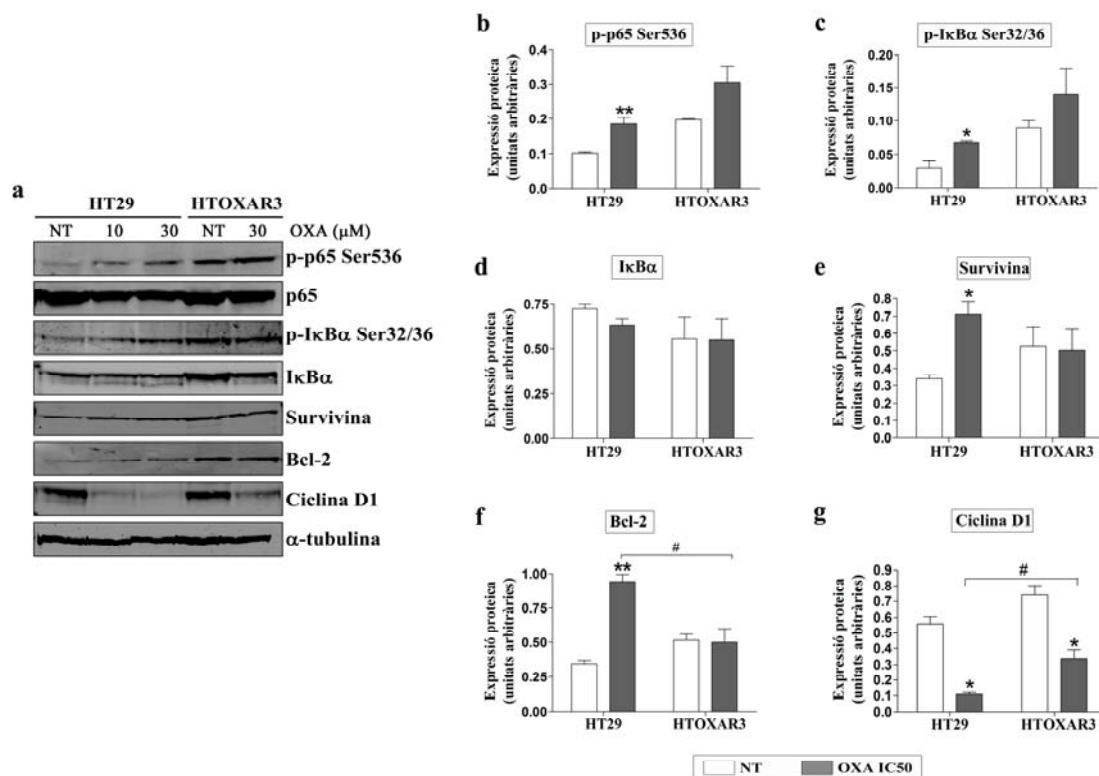
línies cel·lulars. D'altra banda, contràriament al que es podria esperar, no es van observar diferències significatives en quant als nivells de  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  total després del tractament amb oxaliplatí (Figura 37a).

Malgrat que a partir dels 30 minuts d'exposició a oxaliplatí observem una davallada en els nivells de Bcl-2 i Ciclina D1 i de la fosforilació de p65, els valors obtinguts continuen essent superiors als de la condició de no tractament (NT; d'aquí en endavant la condició NT representa el tractament amb el vehicle adequat, en aquest cas  $\text{H}_2\text{O}_a$ ) després de 120 minuts d'exposició amb l'agent platinat. És interessant destacar que aquest pic d'activació als 30 minuts de tractament amb oxaliplatí també ha estat reportat per altres autors en resposta a l'exposició amb  $\text{TNF}\alpha$  en cèl·lules HT29 (114). Convé subratllar també que malgrat que les diferències no són estadísticament significatives, a nivell global podem observar una major activació de la via de NF- $\kappa$ B en la línia HT29 respecte HTOXAR3 després del tractament amb oxaliplatí a temps curts.



**Figura 37. Efecte del tractament amb oxaliplatí administrat a temps curts sobre l'activació de NF-κB en les línies HT29 i HTOXAR3.** Imatges de western blot (a) i representació gràfica dels canvis en els nivells de les proteïnes p-p65 Ser536 (b), p-IκBα Ser32/36 (c), Survivina (d), Bcl-2 (e) i Ciclina D1 (d) en cèl·lules HT29 i HTOXAR3 després del tractament amb 10 μM o 30 μM d'oxaliplatí (OXA), respectivament, entre 0 i 120 minuts. L'α-tubulina es va utilitzar com a control intern. Els resultats es mostren com la mitjana ± SEM, calculats a partir d'un mínim de tres experiments independents. \* $p < 0,05$  i \*\* $p < 0,01$  respecte als resultats en cèl·lules tractades amb vehicle (NT). # $p < 0,05$  respecte els nivells de proteïna en la línia HT29.

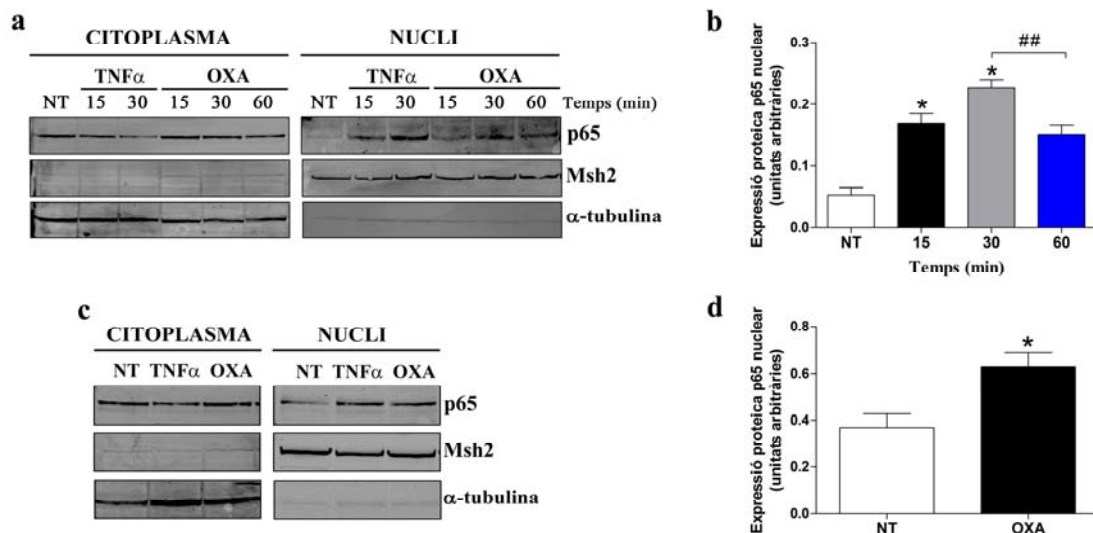
En quant al tractament de 24 hores, sí vàrem poder observar diferències significatives entre la línia sensible i la resistent ja que el tractament amb oxaliplatí resultava en un increment dels nivells de p-p65 Ser536, p-IκBα Ser32/36, Survivina i Bcl-2 (Figura 38a-f) només en les cèl·lules sensibles. En contraposició, vam constatar que els nivells de la proteïna Ciclina D1 (Figura 38a, g) disminuïen de manera estadísticament significativa en ambdues línies essent aquesta davallada més evident en la línia parental sensible HT29. En aquest cas, tampoc es van observar diferències significatives en quant als nivells de IκBα total (Figura 38a,d) després del tractament amb oxaliplatí.



**Figura 38.** Efecte del tractament amb oxaliplatí durant 24 hores sobre l'activació de NF-κB en les línies cel·lulars HT29 i HTOXAR3. Imatges de western blot (a) i representació gràfica dels canvis en l'expressió proteica de p-p65 Ser536 (b), p-IκBα Ser32/36 (c), IκBα total (d), Survivina (e), Bcl-2 (f) i Cyclina D1 (g) en cèl·lules HT29 i HTOXAR3 després del tractament amb 10 μM o 30 μM d'oxaliplatí (OXA), respectivament. L'α-tubulina es va utilitzar com a control intern. Els resultats es mostren com la mitjana ± SEM, calculats a partir d'un mínim de tres experiments independents. \*p<0,05 i \*\*p<0,01 respecte als resultats en cèl·lules tractades amb vehicle (NT). #p<0,05 respecte els nivells de proteïna en la línia HT29.

A continuació, es va analitzar la translocació nuclear de la subunitat p65 en resposta a diferents temps de tractament amb oxaliplatí (10 μM) en la línia HT29. Els resultats van mostrar un increment de p65 en els extractes proteics nuclears en els primers 15 minuts de tractament (Figura 39a,b) que es mantenia durant almenys les primeres 24 hores d'exposició al fàrmac (Figura 39c,d). De la mateixa manera que amb la fosforilació de p65 també vam observar un pic en la presència de p65 al nucli després de 30 minuts de tractament (Figura 39a,b).





**Figura 39. Estudi de la translocació nuclear de p65 en resposta al tractament amb oxaliplatí.** Western Blot representatiu **(a)** i representació gràfica **(b)** dels nivells de p65 en extractes citoplasmàtics o nuclears de cèl·lules HT29 després d'una exposició d'entre 0 i 60 minuts a oxaliplatí (OXA). Western Blot representatiu **(c)** i representació gràfica **(d)** dels nivells de p65 en extractes citoplasmàtics o nuclears de cèl·lules HT29 després de 24 hores de tractament amb OXA. El TNF $\alpha$  s'ha emprat com a control positiu a 50 ng/mL. Msh2 i  $\alpha$ -tubulina es van utilitzar com a controls interns de nucli i citoplasma, respectivament. NT: cèl·lules tractades amb vehicle. Els resultats es mostren com la mitjana  $\pm$  SEM, calculats a partir d'un mínim de tres experiments independents. \* $p < 0,05$  respecte a NT. ## $p < 0,01$  respecte a p65 nuclear als 30 minuts d'exposició a OXA.

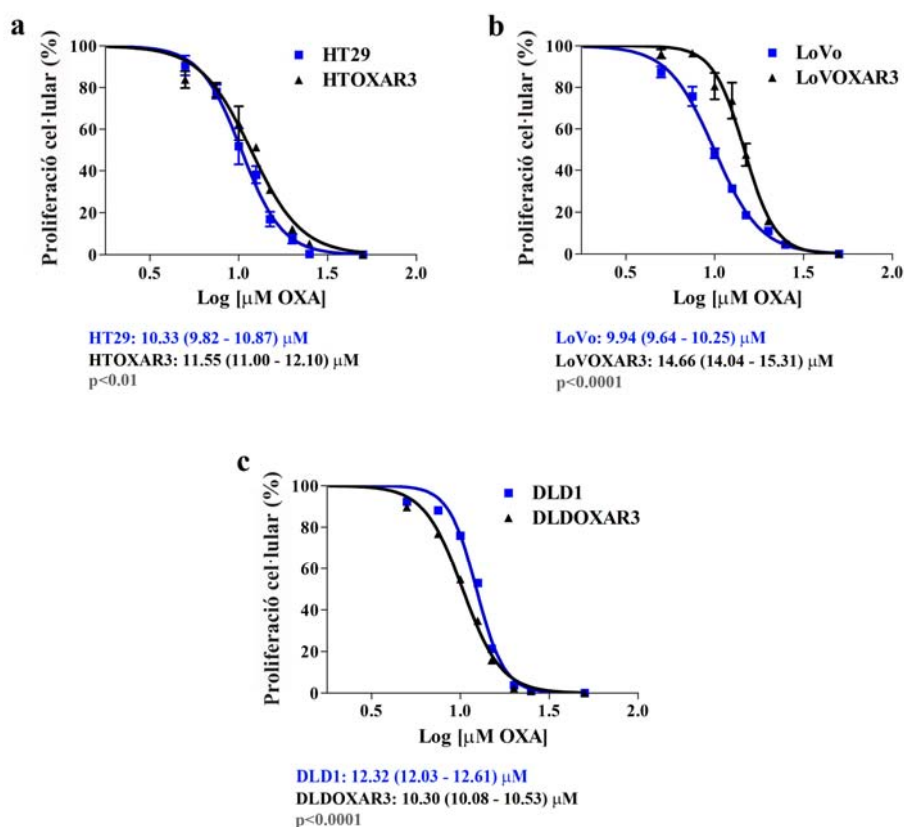
En conjunt, aquests resultats demostren que l'activació de la via de NF- $\kappa$ B es produeix molt ràpidament en els primers 15 minuts d'exposició a oxaliplatí tant en la línia HT29 com en HTOXAR3 i que aquesta activació es manté després de 24 hores de tractament en la línia HT29 però no en el model resistent HTOXAR3.

Així doncs, aquests resultats suggerien que almenys en els nostres models cel·lulars l'ús d'un inhibidor de NF- $\kappa$ B de forma individual i/o la seva combinació amb oxaliplatí podria ser una bona estratègia per tal de revertir la resistència a aquest fàrmac. A aquest efecte vam escollir la curcumina, basant-nos en la seva ben documentada capacitat d'inhibir de manera eficient l'activitat de NF- $\kappa$ B [Revisat a (271)], la seva capacitat d'incrementar l'efecte citotòxic de l'oxaliplatí en models *in vitro* i *in vivo* (209, 254) i el baix perfil de toxicitat en humans reportat en diversos estudis clínics de fase I i II (197, 199, 200).

## 4.2. Resultats de l'objectiu 2

### 4.2.1 Estudi de l'efecte de la curcumina en la proliferació de línies de CRC sensibles i amb resistència adquirida a oxaliplatí

Per tal de conèixer l'efecte del tractament durant 24 hores amb curcumina sobre la proliferació dels nostres models cel·lulars, es va realitzar l'assaig MTT utilitzant un rang de dosis de 0 a 50  $\mu\text{M}$  en les parelles HT29/ HTOXAR3, LoVo/ LoVOXAR3 i DLD1/ DLDOXAR3. Tal i com es pot observar a la Figura 40, la curcumina va produir una disminució significativa de la proliferació cel·lular de manera dosi-dependent en totes les línies cel·lulars estudiades. És important destacar que els models resistents HTOXAR3 i LoVOXAR3 van resultar ser lleugera però significativament més resistents a la curcumina en comparació a les seves línies parentals HT29 i LoVo, respectivament. Contràriament, la línia DLDOXAR3, va presentar una major sensibilitat a oxaliplatí en relació a la línia DLD1.



**Figura 40.** Efecte del tractament amb curcumina en la proliferació de cèl·lules de CRC sensibles i amb resistència adquirida a oxaliplatí. (a) Corbes dosi resposta corresponents a les línies HT29/HTOXAR3, (b) LoVo/LoVOXAR3 i (c) DLD1/DLDOXAR3 després del tractament amb 0-50  $\mu\text{M}$  de curcumina durant 24 hores (mitjana  $\pm$  SD) i anàlisi de MTT. Els valors d'IC50 s'indiquen com la mitjana (95% CI) obtinguts a partir d'un mínim de tres experiments independents.

#### 4.2.2. Avaluació del sinergisme del tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina

Amb el propòsit de conèixer si la combinació de curcumina i oxaliplatí podia resultar sinèrgica, la línia resistent HTOXAR3 es va tractar amb diferents esquemes de combinació tal i com es mostra a la figura 40. A aquest efecte es va seguir la metodologia descrita per Chou i Talalay i es va partir de les IC50 d'ambdues drogues (30 µM per l'oxaliplatí i 10 µM per la curcumina). A partir de les viabilitats obtingudes mitjançant el test MTT per a cadascuna de les combinacions es va calcular l'índex de combinació (CI; *combination index*). Tal i com s'observa a la Figura 41, l'esquema més sinèrgic va ser el tractament concomitant durant 24 hores. El valor de CI per aquesta combinació va ser inferior a 1 (sinergisme) a partir del valor de IC40 en amunt, igual a 1 (additivitat) a la IC30 i lleugerament superior a 1 (antagonisme) a dosis molt baixes d'ambdós fàrmacs. La resta d'esquemes de tractament analitzats no van resultar sinèrgics en cap cas.

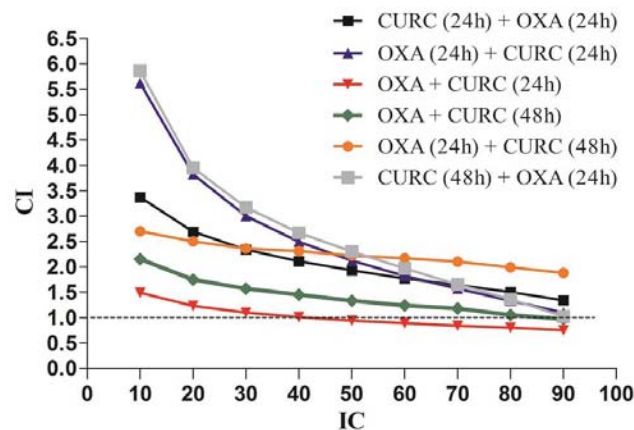


Figura 41. Índex de combinació (CI) entre l'oxaliplatí (OXA) i la curcumina (CURC) segons diferents esquemes d'administració en HTOXAR3. Representació gràfica dels valors de CI per a cadascuna de les fraccions inhibidòries de creixement cel·lular (IC %) obtingudes després dels tractaments indicats.

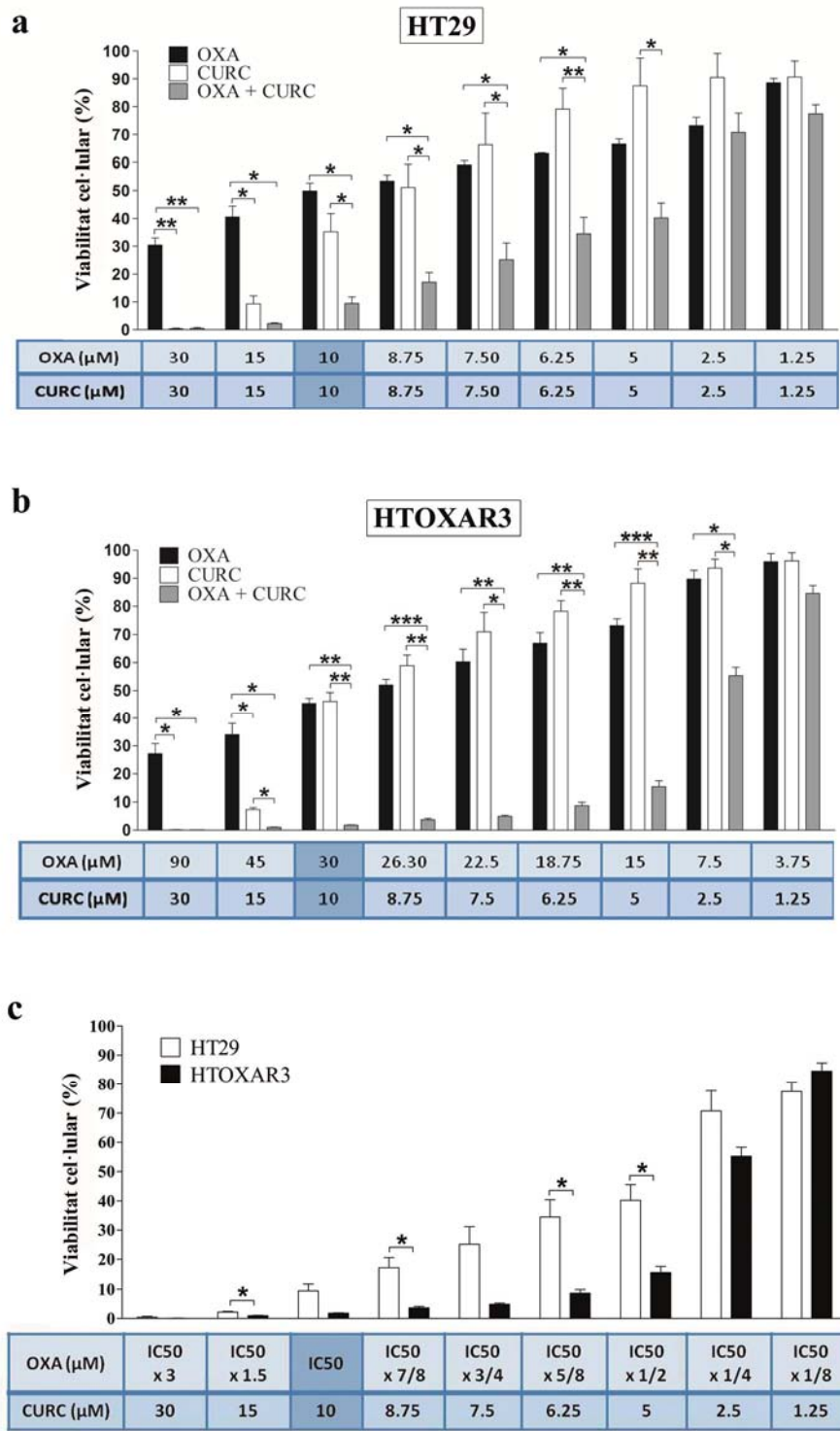
Així doncs, en base a aquests resultats es va decidir utilitzar l'esquema de tractament concomitant durant 24 hores per tal d'avaluar l'efecte de la curcumina en la reversió de resistència a oxaliplatí en els models de resistència *in vitro* HT29/HTOXAR3 i LoVo/LoVOXAR3.

#### 4.2.3. Estudi de l'efecte del tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina en la proliferació de línies de CCR sensibles i amb resistència adquirida a oxaliplatí

Per tal d'analitzar l'efecte del tractament combinat sobre la proliferació de les línies cel·lulars HT29/HTOXAR3 i LoVo/LoVOXAR3, aquestes es van tractar a dosis corresponents al valor de les dilucions seriades (3x; 1,5x; 1x; 7/8x; 3/4x; 5/8x; 1/2x; 1/4x i 1/8x) a partir de la IC50 d'oxaliplatí (10 i 30 µM, per a HT29/HTOXAR3 i 0,9 i 2,5 µM per a LoVo/LoVOXAR3,

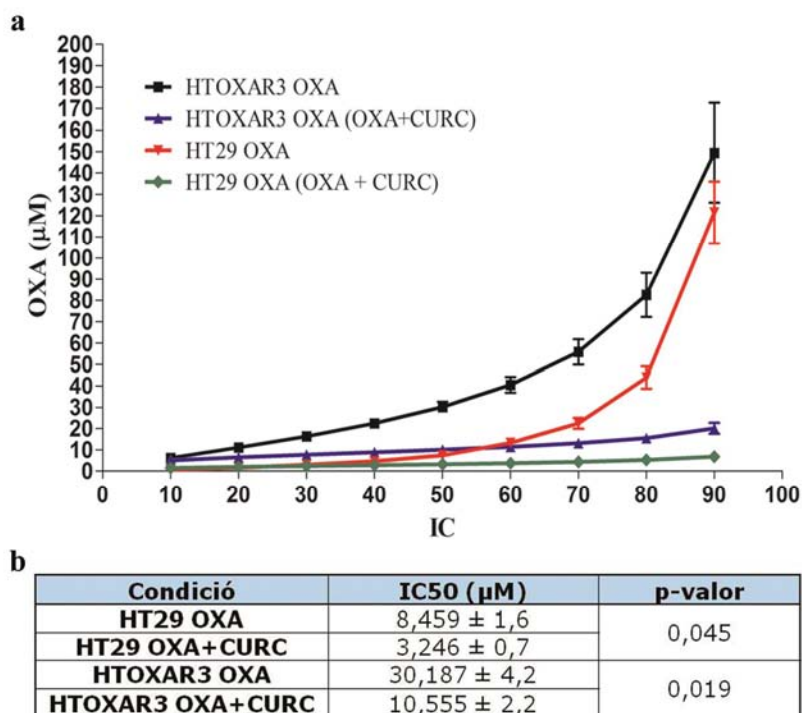
respectivament) i de curcumina, en aquest cas 10  $\mu\text{M}$  per a HT29, HTOXAR3 i LoVO i 15  $\mu\text{M}$  per a LoVOXAR3.

En el cas de HT29 i HTOXAR3, vam observar que el tractament combinat produïa una disminució significativa de la proliferació cel·lular, excepte a dosis molt baixes d'ambdós fàrmacs, tant en la línia HT29 (Figura 42a) com en la línia HTOXAR3 (Figura 42b) en comparació als tractaments individuals amb cada droga. Cal destacar que aquest efecte va resultar ser significativament més evident en la línia resistent HTOXAR3 en comparació al model HT29 (Figura 42c).



**Figura 42. Efecte del tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina en la proliferació de les línies cel·lulars HT29 i HTOXAR3.** Els gràfics de barres representen la mitjana ± SEM del percentatge de cèl·lules viables després de 24 hores de tractament amb oxaliplatí (OXA), curcumina (CURC) o la combinació de tots dos de forma concomitant a les dosis indicades, en les cèl·lules HT29 (a) i HTOXAR3 (b). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecte la condició de tractament indicada. (c) Comparació del percentatge de cèl·lules viables entre la línia HT29 i HTOXAR3. \*p<0,05 respecte la viabilitat en la línia HT29.

En efecte, el tractament combinat en la línia HTOXAR3 va permetre una reducció significativa del 65% en el valor d'IC50 per a l'oxaliplatí, passant de  $30,2 \pm 4,2 \mu\text{M}$  en el tractament individual a  $10,6 \pm 2,2 \mu\text{M}$  en el tractament combinat amb curcumina. Convé subratllar que la dosis d'IC50 per a l'oxaliplatí obtinguda en la combinació amb curcumina en la línia HTOXAR3 va resultar ser equiparable a la IC50 de l'oxaliplatí en el model sensible HT29 ( $8,45 \pm 1,6 \mu\text{M}$ ) (Figura 43).



**Figura 43.** Efecte del tractament combinat d'oxaliplatí (OXA) i curcumina (CURC) en la reversió de resistència a oxaliplatí en el model cel·lular HTOXAR3. **(a)** Gràfic on es mostren les dosis individuals d'oxaliplatí (mitjana  $\pm$  SD) corresponents a cadascuna de les fraccions d'inhibició del creixement obtingudes en els tractaments indicats a la llegenda. **(b)** Taula on s'indiquen les IC50 d'oxaliplatí (mitjana  $\pm$  SD) segons els tractaments i les línies cel·lulars indicades. p-valor respecte el tractament concomitant en cada línia.

En termes de sinergisme, mentre que en la línia HT29 la combinació d'oxaliplatí i curcumina va ser additiva a la IC50 i sinèrgica a dosis superiors d'ambdós fàrmacs, en el model resistent HTOXAR3 el tractament va resultar ser sinèrgic tant a la IC50 com a dosis superiors (Figura 44).

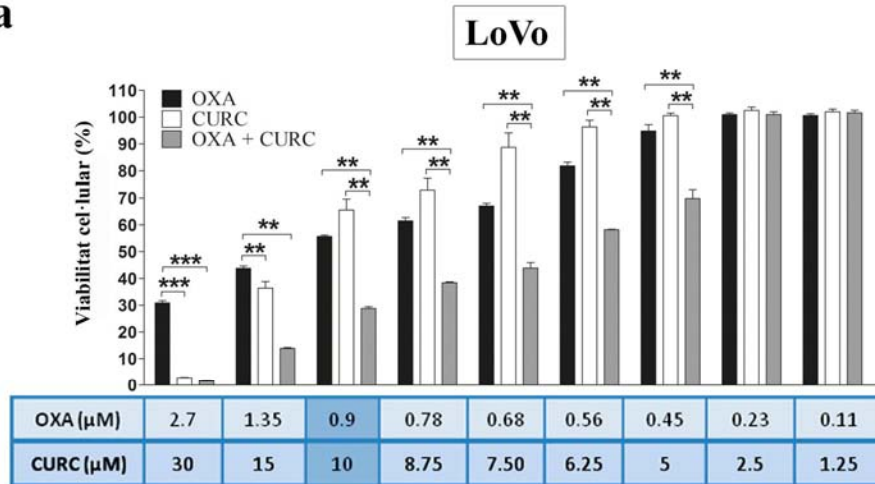
HT29					
IC	OXA en combinació	CURC en combinació	OXA individual	CURC individual	CI
<b>10</b>	1,514 ± 0,6	2,165 ± 0,8	0,671 ± 0,3	5,410 ± 1,5	3,56
<b>20</b>	2,001 ± 0,6	2,853 ± 0,9	1,583 ± 0,4	6,349 ± 1,5	2,28
<b>30</b>	2,410 ± 0,7	3,433 ± 1,0	3,070 ± 0,1	7,070 ± 1,5	1,65
<b>40</b>	2,814 ± 0,7	4,000 ± 1,0	4,642 ± 0,8	7,727 ± 1,5	1,44
<b>50</b>	3,246 ± 0,7	4,605 ± 1,1	8,459 ± 1,6	8,988 ± 1,4	1,09
<b>60</b>	3,746 ± 0,7	4,973 ± 0,8	13,219 ± 3,1	9,128 ± 1,4	0,98
<b>70</b>	4,384 ± 0,7	6,197 ± 1,1	22,481 ± 6,2	9,976 ± 1,4	0,94
<b>80</b>	5,318 ± 0,7	7,497 ± 1,2	43,850 ± 12,8	11,139 ± 1,4	0,88
<b>90</b>	6,801 ± 1,3	10,004 ± 1,4	121,500 ± 35,5	13,217 ± 1,7	0,86

HTOXAR3					
IC	OXA en combinació	CURC en combinació	OXA individual	CURC individual	CI
<b>10</b>	5,075 ± 1,1	1,759 ± 0,4	6,191 ± 0,6	4,765 ± 0,5	1,49
<b>20</b>	6,645 ± 1,4	2,300 ± 0,5	11,090 ± 1,1	5,842 ± 0,6	1,23
<b>30</b>	7,952 ± 1,6	2,750 ± 0,6	16,361 ± 1,7	6,690 ± 0,7	1,10
<b>40</b>	9,216 ± 1,9	3,185 ± 0,7	22,511 ± 2,7	7,477 ± 0,8	1,01
<b>50</b>	10,555 ± 2,2	3,645 ± 0,8	30,187 ± 4,2	8,280 ± 0,8	0,94
<b>60</b>	12,092 ± 2,6	4,173 ± 0,9	40,501 ± 6,4	9,170 ± 0,9	0,89
<b>70</b>	14,026 ± 3,0	4,838 ± 1,0	55,824 ± 10,3	10,250 ± 1,1	0,84
<b>80</b>	16,818 ± 3,8	5,795 ± 1,3	82,639 ± 18,0	11,741 ± 1,2	0,80
<b>90</b>	22,116 ± 5,4	7,613 ± 1,8	149,374 ± 40,3	14,406 ± 1,6	0,75

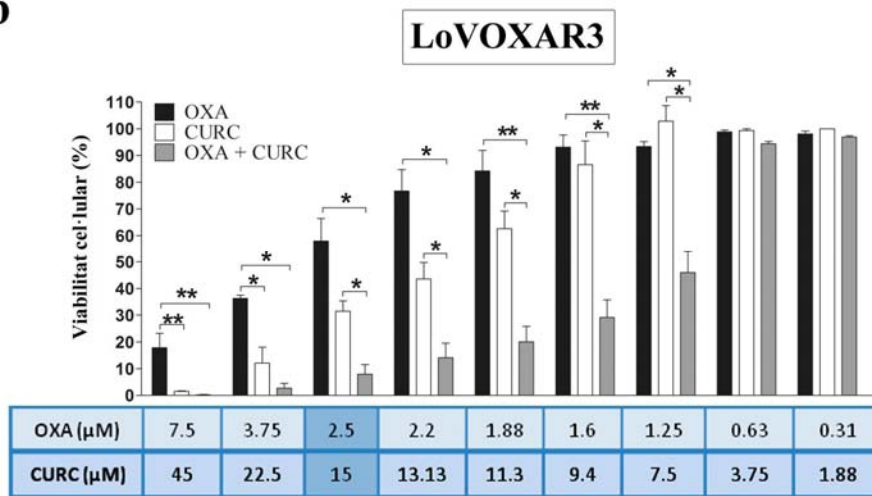
Figura 44. Avaluació del sinergisme, antagonisme o additivitat valorat a partir de l'índex de combinació (CI) del tractament concomitant d'oxaliplatí (OXA) i curcumina (CURC) durant 24 hores en cèl·lules HT29 i HTOXAR3. IC: percentatge d'inhibició del creixement. Les dosis (mitjana ± SD) són micromolars. S'han ressaltat en verd els valors de CI sinèrgics (<1).

En el model LoVo/LoVOXAR3, els resultats van mostrar que de la mateixa manera que en el model HT29/HTOXAR3, el tractament combinat va produir una davallada significativa de la proliferació cel·lular, excepte a dosis molt baixes d'ambdós fàrmacs, tant en la línia cel·lular LoVo (Figura 45a) com en LoVOXAR3 (Figura 45b) en comparació amb els tractaments individuals amb cada fàrmac. De nou, el tractament combinat va ser significativament més efectiu en el model resistent a oxaliplatí LoVOXAR3 en comparació a la línia sensible LoVo (Figura 44c).

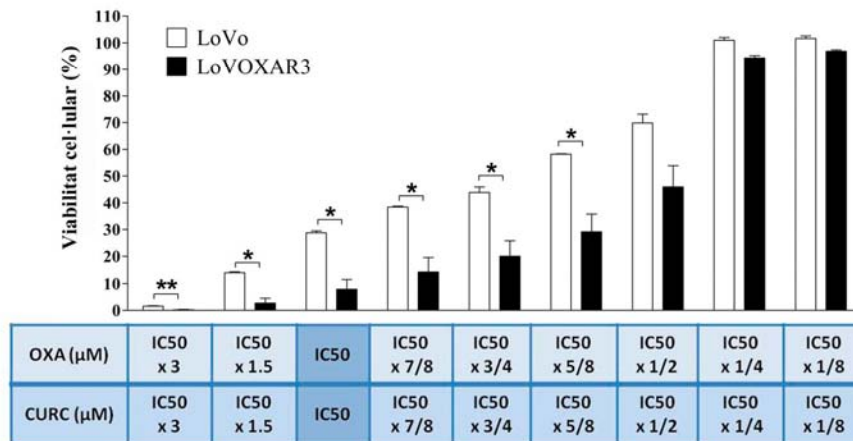
**a**



**b**



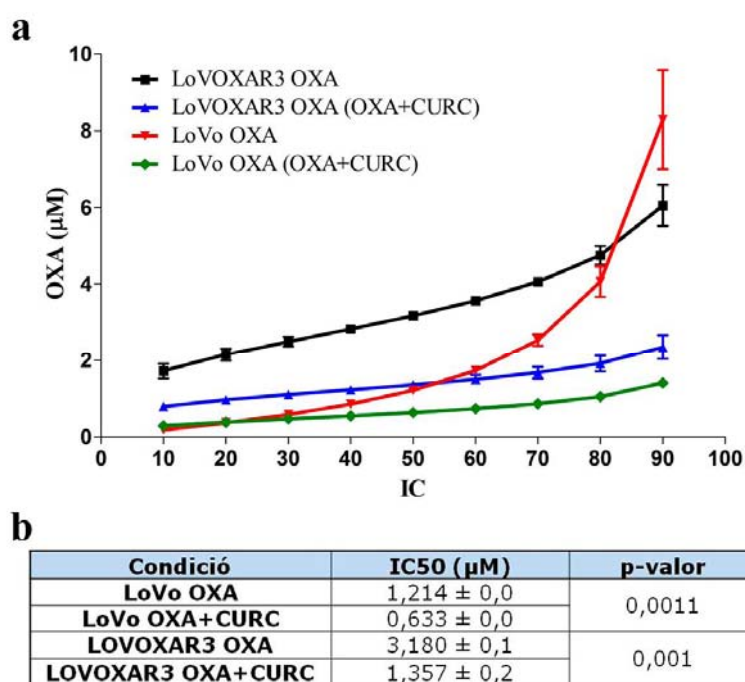
**c**



**Figura 45.** Efecte del tractament combinat d'oxaliplatí i Curcumina sobre la proliferació de les línies cel·lulars LoVo i LoVOXAR3. Els gràfics de barres representen la mitjana ± SEM del percentatge de cèl·lules viables després de 24 hores de tractament amb oxaliplatí (OXA), curcumina (CURC) o la combinació de tots dos de forma concomitant a les dosis indicades, en les cèl·lules Lovo (a) i LoVOXAR3 (b). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 respecte la condició de tractament indicada. (c) Comparació del percentatge de cèl·lules viables entre la línia lovo i LoVOXAR3. \*p<0,05 respecte la viabilitat en la línia LoVo.



Els resultats presentats a la Figura 46 mostren com el tractament combinat es va traduir en una davallada significativa del 40% en el valor d'IC50 de l'oxaliplatí en la línia resistent LoVOXAR3 respecte al valor d'IC50 obtingut en el tractament individual. Novament, cal destacar que la dosis d'IC50 per a l'oxaliplatí obtinguda en la combinació amb curcumina en la línia LoVOXAR3 va resultar ser equiparable a la IC50 de l'oxaliplatí en el model sensible LoVo.



**Figura 46. Efecte del tractament concomitant d'oxaliplatí (OXA) i curcumina (CURC) en la reversió de resistència a oxaliplatí en el model cel·lular LoVOXAR3. (a)** Gràfic on es mostren les dosis individuals d'oxaliplatí (mitjana ± SD) corresponents a cadascuna de les fraccions d'inhibició del creixement obtingudes en els tractaments indicats a la llegenda. **(b)** Taula on s'indiquen les IC50 d'oxaliplatí (mitjana ± SD) segons els tractaments i les línies cel·lulars indicades. IC: percentatge d'inhibició del creixement. p-valor respecte el tractament concomitant en cada línia.

D'altra banda, a diferència del model HT29/HTOXA, la combinació d'oxaliplatí i curcumina no va resultar ser sinèrgica en cap fracció d'inhibició, observant-se només un lleuger efecte additiu a altes dosis (IC90) d'ambdós fàrmacs en els dos models cel·lulars (Figura 47).

LoVo					
IC	OXA en combinació	CURC en combinació	OXA individual	CURC individual	CI
<b>10</b>	0,285 ± 0,0	3,178 ± 0,1	0,182 ± 0,0	7,912 ± 1,5	2,34
<b>20</b>	0,383 ± 0,0	4,275 ± 0,2	0,365 ± 0,1	9,478 ± 1,6	1,86
<b>30</b>	0,466 ± 0,0	5,196 ± 0,3	0,582 ± 0,1	10,688 ± 1,6	1,63
<b>40</b>	0,546 ± 0,0	6,098 ± 0,3	0,853 ± 0,0	11,794 ± 1,7	1,49
<b>50</b>	0,633 ± 0,0	7,062 ± 0,4	1,214 ± 0,0	12,911 ± 1,7	1,38
<b>60</b>	0,733 ± 0,0	8,178 ± 0,4	1,727 ± 0,1	14,134 ± 1,7	1,29
<b>70</b>	0,860 ± 0,0	9,599 ± 0,5	2,539 ± 0,2	15,600 ± 1,7	1,21
<b>80</b>	1,046 ± 0,1	11,669 ± 0,6	4,069 ± 0,6	17,597 ± 1,7	1,15
<b>90</b>	1,403 ± 0,1	15,653 ± 0,8	8,294 ± 1,8	21,098 ± 1,7	1,09

LoVOXAR3					
IC	OXA en combinació	CURC en combinació	OXA individual	CURC individual	CI
<b>10</b>	0,793 ± 0,1	4,722 ± 0,4	1,721 ± 0,5	6,375 ± 1,6	1,88
<b>20</b>	0,965 ± 0,1	5,753 ± 0,5	2,151 ± 0,4	7,841 ± 2,1	1,79
<b>30</b>	1,101 ± 0,1	6,566 ± 0,6	2,501 ± 0,3	9,001 ± 2,6	2,06
<b>40</b>	1,227 ± 0,1	7,322 ± 0,8	2,833 ± 0,2	10,082 ± 3,0	1,80
<b>50</b>	1,356 ± 0,2	8,096 ± 1,0	3,180 ± 0,1	11,191 ± 3,5	1,63
<b>60</b>	1,500 ± 0,2	8,955 ± 1,3	3,573 ± 0,1	12,423 ± 4,0	1,51
<b>70</b>	1,675 ± 0,3	10,000 ± 1,6	4,062 ± 0,3	13,925 ± 4,6	1,42
<b>80</b>	1,917 ± 0,4	11,450 ± 2,2	4,758 ± 0,6	16,009 ± 5,6	1,34
<b>90</b>	2,352 ± 0,5	14,054 ± 3,3	6,056 ± 1,3	19,760 ± 7,3	1,04

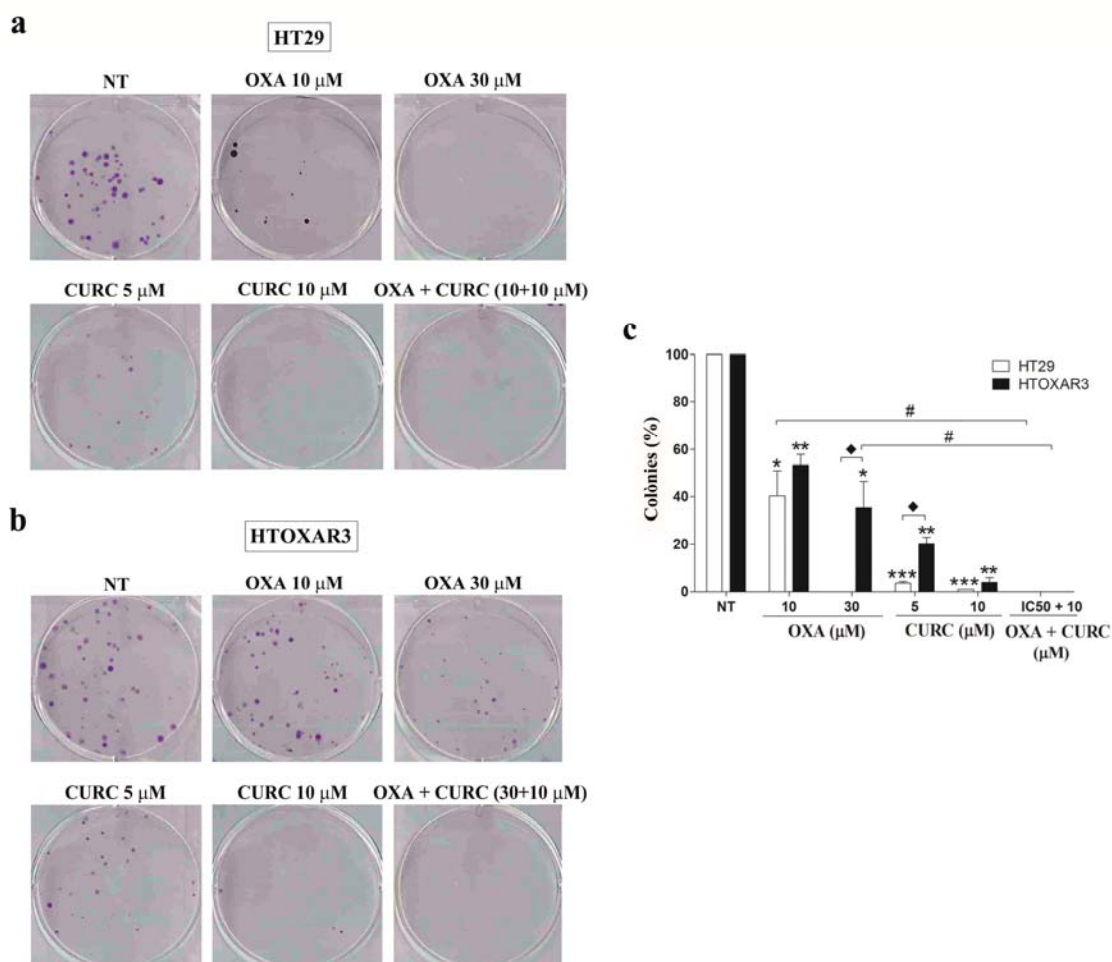
Figura 47. Avaluació del sinergisme, antagonisme o additivitat valorat a partir de l'índex de combinació (CI) del tractament concomitant d'oxaliplatí (OXA) i curcumina (CURC) durant 24 hores en cèl·lules LoVo i LoVOXAR3. IC: percentatge d'inhibició del creixement. Les dosis (mitjana ± SD) són micromolars.

#### 4.2.4. Estudi de l'efecte del tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina en la capacitat clonogènica de línies de CCR sensibles i amb resistència adquirida a oxaliplatí

Per tal de determinar si les alteracions observades en la proliferació cel·lular per efecte del tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina es traduïa també en una menor capacitat de les cèl·lules per formar colònies, es van dur a terme assajos clonogènics en les parelles HT29/HTOXAR3 i LoVo/LoVOXAR3. Es van sembrar 300 cèl·lules/pou en el cas d'HT29/HTOXAR3 i 500 cèl·lules/pou en el cas de LoVo/LoVOXAR3 i es van tractar durant 24 hores amb oxaliplatí, curcumina o la combinació d'ambdós de forma concomitant a les dosis indicades a les Figures 48 i 49, deixant-les en cultiu durant un període de 10 dies.

En el cas d'HT29/HTOXAR3 (Figura 48), el tractament amb 30 µM d'oxaliplatí es va traduir en una reducció dràstica del nombre de colònies formades per la línia HT29 en comparació a les formades per HTOXAR3. Tot i que a 10 µM també es va observar una disminució de colònies en HT29, les diferències amb HTOXAR3 no van arribar a ser significatives. En relació a la curcumina, la línia resistent va formar un major nombre de colònies en comparació amb la línia sensible especialment després del tractament a dosis baixes (5 µM). Finalment, el tractament combinat es va traduir en una absència completa de colònies en els dos models

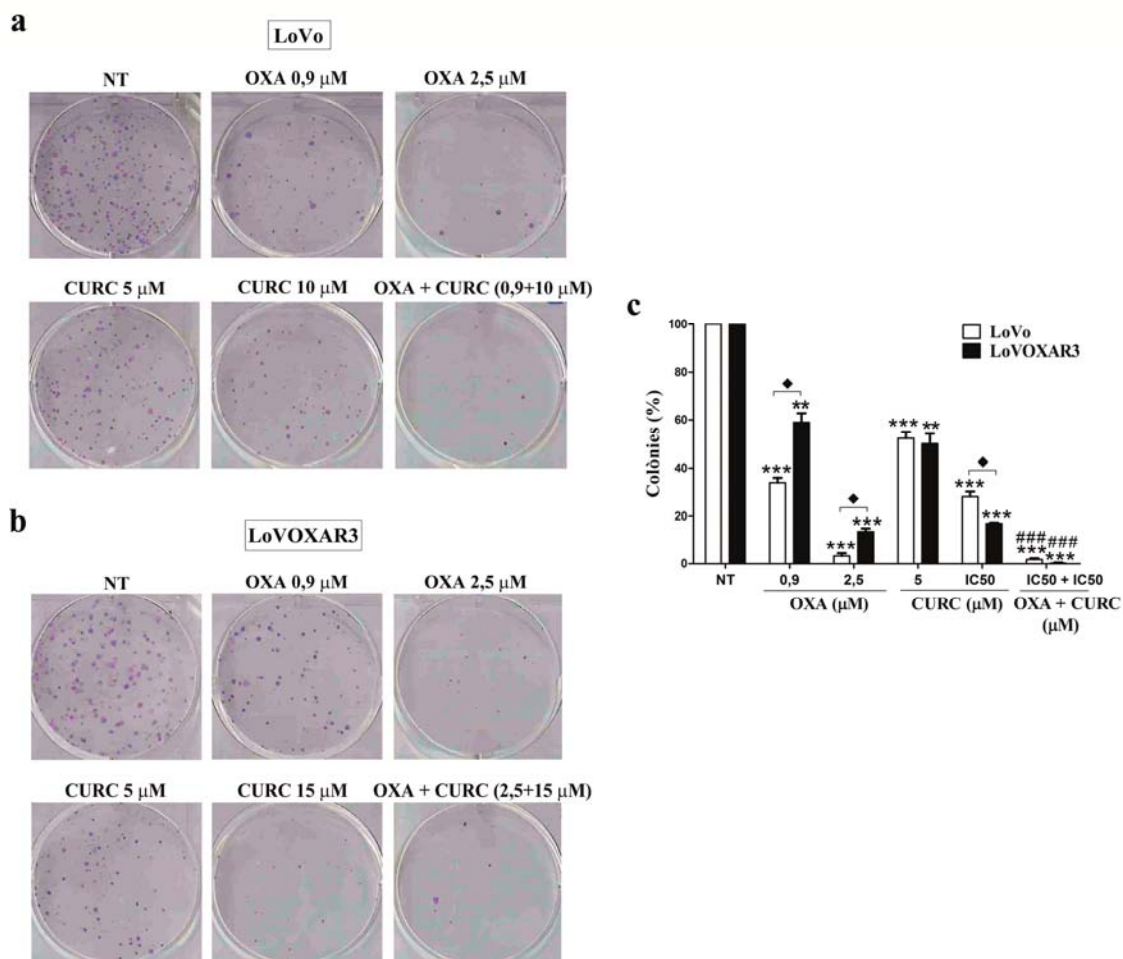
cel·lulars, mostrant diferències significatives amb els tractaments individuals d'oxaliplatí però en canvi, no amb els de curcumina. Val la pena esmentar que a banda de la reducció en el nombre de colònies, els tractaments amb oxaliplatí i curcumina també van comportar una disminució en la mida de les colònies formades tant per la línia HT29 com per HTOXAR3.



**Figura 48. Assaigs clonogènics en HT29 i HTOXAR3.** Imatges representatives de les colònies formades per les cèl·lules HT29 **(a)** i HTOXAR3 **(b)** després del tractament amb oxaliplatí (OXA), curcumina (CURC) o la seva combinació concomitant durant 24 hores a les dosis indicades. **(c)** Representació gràfica del percentatge (mitjana  $\pm$  SD) de colònies en HT29 i HTOXAR3 després dels tractaments indicats. Els resultats s'han obtingut a partir d'un mínim de tres experiments independents. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecte les cèl·lules tractades amb vehicle (NT). # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  respecte el tractament individual amb OXA.  $\blacklozenge p < 0,05$  en comparació amb el nombre de colònies en HT29.

Pel que fa a la parella LoVo/LoVOXAR3 (Figura 49) el tractament amb oxaliplatí a 0,9 i 2,5  $\mu$ M va resultar en una davallada significativa del nombre de colònies en el model LoVo en comparació a LoVOXAR3 i contràriament a HT29/HTOXAR3, el tractament en aquest cas a la IC50 de curcumina va resultar en una reducció de les colònies formades pel model resistent en comparació a la línia sensible. Finalment, el tractament concomitant d'ambdós fàrmacs es va

traduir en una reducció significativa del nombre de colònies en ambdues línies en comparació als tractaments individuals amb oxaliplatí però no amb els de curcumina, corroborant així el que ja havíem observat anteriorment en el model HT29/HTOXAR3.



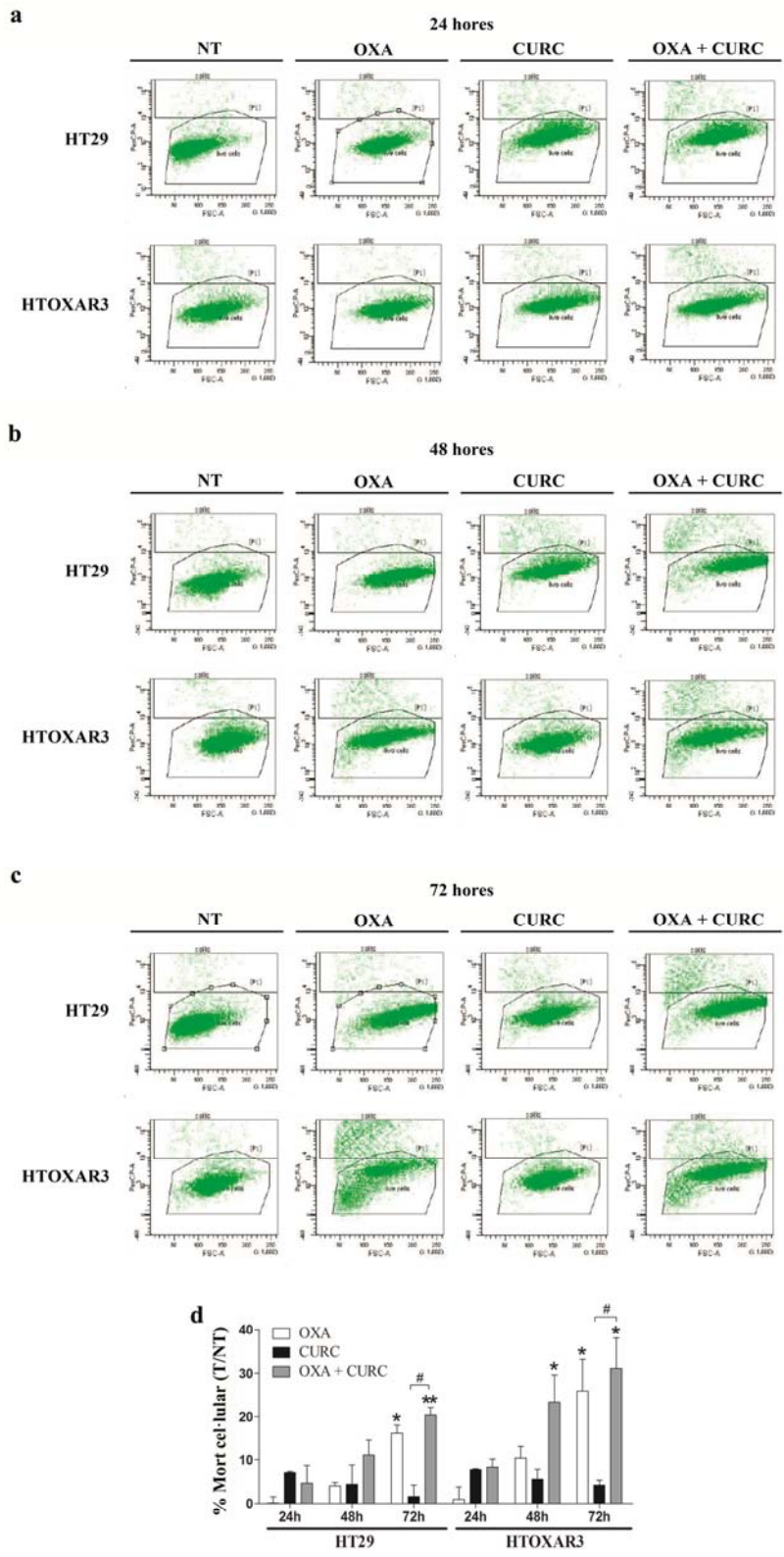
**Figura 49. Assajos clonogènics en LoVo i LoVOXAR3.** Imatges representatives de les colònies formades per les cèl·lules LoVo **(a)** i LoVOXAR3 **(b)** després del tractament amb oxaliplatí (OXA), Curcumina (CURC) o la seva combinació concomitant durant 24 hores a les dosis indicades. (c) Representació gràfica del percentatge (mitjana  $\pm$  SD) de colònies en LoVo i LoVOXAR3 després dels tractaments indicats. Els resultats s'han obtingut a partir d'un mínim de tres experiments independents. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecte les cèl·lules tractades amb vehicle. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecte la condició de no tractament (NT). # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  respecte el tractament individual amb OXA.  $\blacklozenge p < 0,05$  en comparació amb el nombre de colònies en LoVo.

#### 4.2.5. Estudi de l'efecte del tractament concomitant d'oxaliplatí i curcumina en la mort de cèl·lules sensibles i resistents a oxaliplatí

Una disminució en la proliferació cel·lular no sempre va acompanyada d'un increment en la mort cel·lular induïda pel fàrmac. Per tal de determinar si l'addició de curcumina incrementava la mort cel·lular provocada per l'oxaliplatí, les línies HT29 i HTOXAR3 van ser tractades amb

oxaliplatí, curcumina o la combinació de tots dos de forma concomitant a les respectives IC50 per a cada fàrmac durant 24, 48 i 72 hores. Degut a que l'oxaliplatí pot activar diferents tipus mort cel·lular, com l'apoptosi i la necrosi entre d'altres la quantificació de la mort cel·lular es va dur a terme amb iodur de propidi i citometria de fluxe degut a que és un tipus de tinció no específica que reconeix totes les cèl·lules mortes independentment del tipus de via de mort implicada.

Tal i com es desprèn de la Figura 50, la mort cel·lular només va assolir nivells significatius després de 72 hores de tractament amb oxaliplatí en comparació amb les cèl·lules no tractades, amb una taxa de mort per sota del 25%. Sorprenentment, el tractament amb curcumina només va produir nivells de mort cel·lular inferiors al 10% en tots els temps estudiats, observant-se una lleugera disminució de la taxa de mortalitat a mesura que augmentava el temps d'exposició. El tractament combinat, en canvi, es va associar a un increment significatiu de la mort cel·lular a les 72 hores per a HT29 i a les 48 i 72 hores per a HTOXAR3 en comparació a les cèl·lules no tractades. En la comparació entre tractaments, només es van observar diferències significatives entre la combinació i el tractament individual amb curcumina després de 72 hores en ambdues línies cel·lulars.

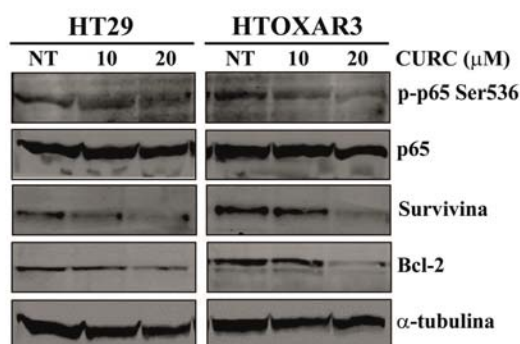


**Figura 50. Efecte de l'oxaliplatí, la curcumina o la combinació d'ambdós en la mort cel·lular de les línies HT29 i HTOXAR3.** Imatges obtingudes a partir de l'anàlisi per citometria de flux que representen la mort cel·lular després del tractament amb oxaliplatí (OXA), curcumina (CURC) o la seva combinació concomitant durant 24 (a), 48 (b) o 72 hores (c) en les línies cel·lulars HT29 i HTOXAR3 a les seves corresponents dosis IC50 per a cada fàrmac (d) Percentatge (mitjana ± SD) de cèl·lules HT29 i HTOXAR3 mortes després de 24, 48 o 72 hores de tractament amb OXA, curcumina o la combinació d'ambdós de forma concomitant, en comparació amb els controls no tractats. Els resultats s'han obtingut a partir d'un mínim de tres experiments independents \*p<0,05; \*\*p<0,01 respecte a cèl·lules tractades amb vehicle (NT). #p<0,05 respecte al tractament individual amb curcumina.

En conjunt, els resultats d'aquest apartat suggereixen que l'addició de curcumina al tractament amb oxaliplatí seguint un esquema adequat, es tradueix en una sensibilització de les cèl·lules de CCR al tractament amb aquest platí mitjançant la disminució de la proliferació cel·lular essent aquest efecte més evident en les cèl·lules amb resistència adquirida a aquest fàrmac.

#### 4.2.6. Efecte de la curcumina sobre l'activació de la via de NF-κB induïda per oxaliplatí

En vista dels resultats dels apartats anteriors, ens vàrem preguntar si l'efecte sinèrgic de la combinació de curcumina i oxaliplatí era conseqüència de la inhibició per part de la primera de l'activació de la via de NF-κB per part de l'agent platinat. En primer lloc, es va analitzar l'efecte inhibitori de la curcumina individualment a dosis de 10 i 20 μM durant 24 hores sobre l'activació de NF-κB en les línies HT29 i HTOXAR3. En aquest cas, tal i com s'esperava, es va observar una disminució dosi-dependent en els nivells de p-p65 Ser536 i també de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Survivina en totes dues línies cel·lulars (Figura 51).

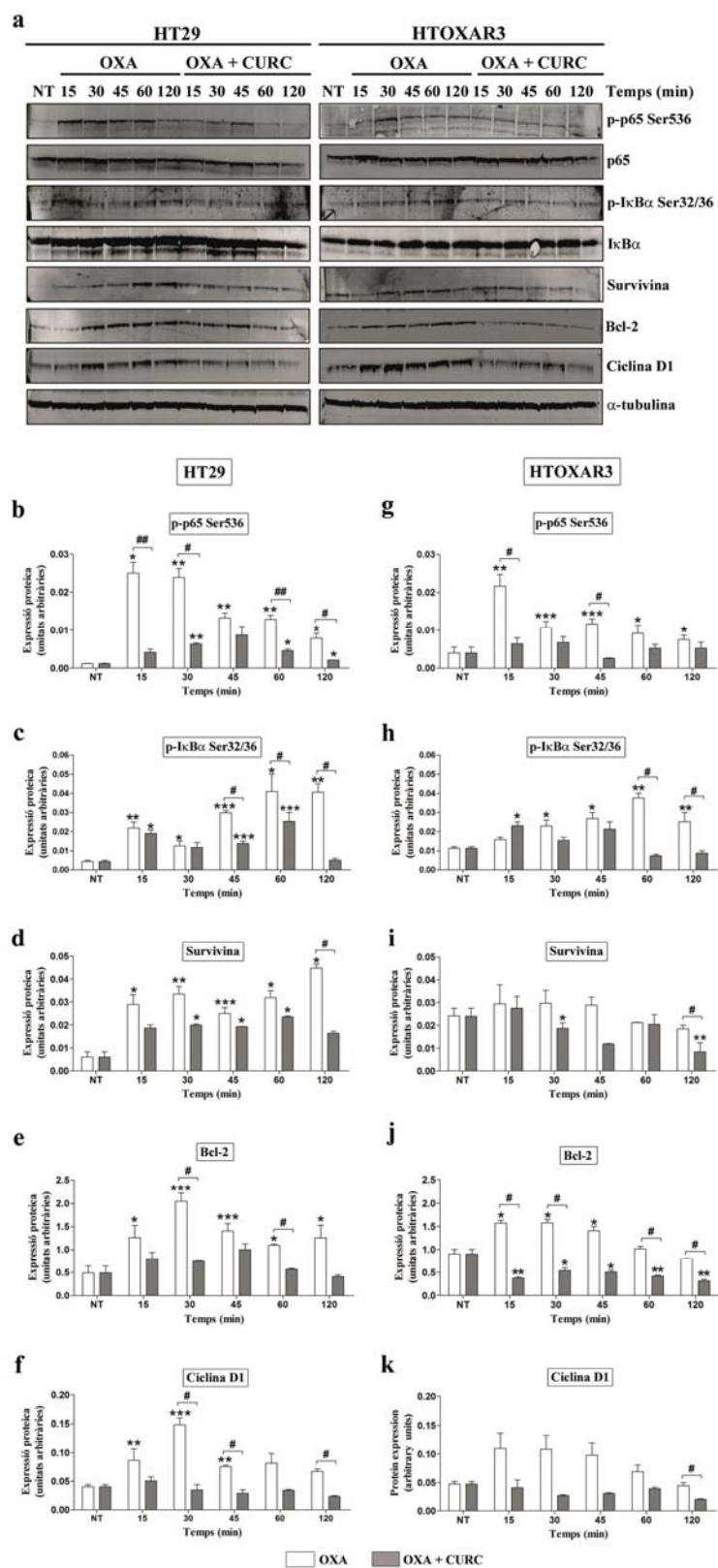


**Figura 51. Efecte de la curcumina sobre la activació constitutiva de NF-κB en HT29 i HTOXAR3.** Imatges representatives de Western blot mostrant bandes corresponents a les proteïnes p-p65 Ser536, p65 total, Survivina i Bcl-2 després del tractament durant 24 hores amb 10 o 20 μM de curcumina (CURC). NT: cèl·lules tractades amb vehicle.

A continuació, es van estudiar els nivells de p-p65 Ser536, p-IκBα Ser32/36, Bcl-2, Survivina i Ciclina D1 en les línies cel·lulars HT29 i HTOXAR3 després del tractament amb oxaliplatí o oxaliplatí i curcumina de forma concomitant a les corresponents dosis IC50, a temps curts (fins a 120 min) i a les 24 hores post-tractament. Els resultats presentats a la Figura 52 mostren com en HT29 i HTOXAR3 l'addició de curcumina es va associar amb una davallada significativa de la fosforilació de p65 ( $p < 0,001$  en HT29 /  $p = 0,04$  en HTOXAR3) i IκBα ( $p < 0,05$  en HT29 /  $p = 0,02$

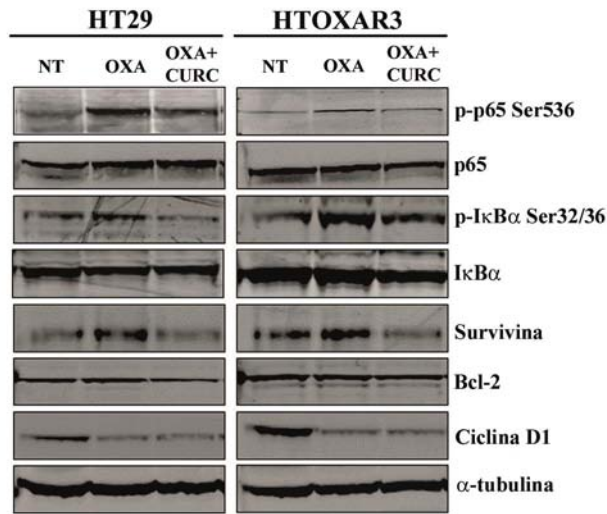
en HTOXAR3) i dels nivells de Survivina ( $p < 0,001$  en HT29 /  $p = 0,02$  en HTOXAR3), Bcl-2 ( $p < 0,03$  en HT29 /  $p < 0,01$  en HTOXAR3) i Ciclina D1 ( $p < 0,001$  en HT29 /  $p = 0,04$  en HTOXAR3) en comparació amb el tractament amb oxaliplatí únicament.





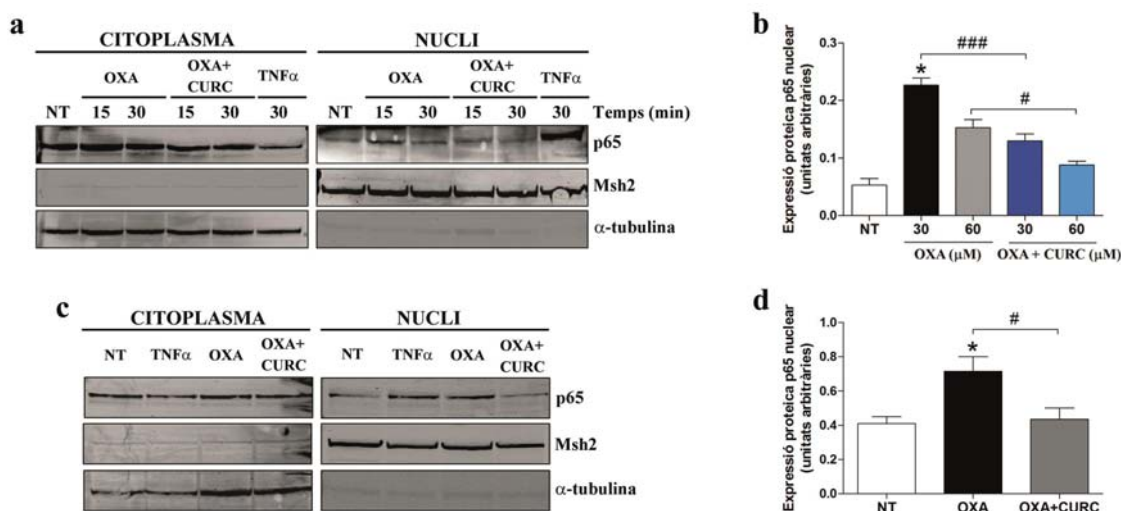
**Figura 52. Efecte de la curcumina sobre l'activació de NF-κB induïda per oxaliplatí en HT29 i HTOXAR3.** Imatges de western blot (**a**) i representació gràfica dels canvis en els nivells de les proteïnes p-p65 Ser536, p-IκBα Ser32/36, Survivina, Bcl-2 i Ciclina D1 en cèl·lules HT29 (**c,d,e,f**) i HTOXAR3 (**h,i,j,k**) després del tractament durant els temps indicats amb les corresponents dosis IC50 d'oxaliplatí (OXA) o oxaliplatí i curcumina (CURC) de manera concomitant. L'α-tubulina es va utilitzar com a control intern. Els resultats es mostren com la mitjana ± SEM, calculats a partir d'un mínim de tres experiments independents. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\* p<0,0001 respecte als resultats en cèl·lules tractades amb vehicle (NT). #p<0,05 respecte els nivells de proteïna en la línia HT29.

En els tractaments durant 24 hores, els resultats van ser similars tot i que en aquest cas no es van assolir diferències significatives (Figura 53).



**Figura 53. Efecte de la curcumina sobre la activació de NF-κB induïda per oxaliplatí en HT29 i HTOXAR3.** Imatges representatives de Western blot mostrant les bandes corresponents a les proteïnes p-p65 Ser536, p65 total, p- IκBα Ser32/26, Survivina, Bcl-2 i Ciclina D1 després del tractament durant 24 hores amb les corresponents dosis IC50 d'oxaliplatí (OXA) o oxaliplatí i curcumina (CURC). **NT:** cèl·lules tractades amb vehicle.

Finalment, vam voler comprovar que la disminució en l'activació de la via de NF-κB es corresponia amb un decrement de la translocació nuclear de p65. Tal i com es mostra a la figura 54, l'addició de curcumina al tractament amb oxaliplatí va produir una disminució dels nivells de p65 nuclear tant a temps curts d'exposició (fins a 30 minuts) com després de 24 hores de tractament concomitant amb ambdós fàrmacs en la línia cel·lular HT29.



**Figura 54. Efecte del tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina en la translocació nuclear de p65 induïda per oxaliplatí.** Imatges de Western blot i representació gràfica mostrant la proteïna p65 en extractes citoplasmàtics i extractes nuclears de cèl·lules HT29 després del tractament amb oxaliplatí (OXA, 10 $\mu$ M) o oxaliplatí i curcumina (CURC) (10 $\mu$ M de cada droga) a temps curts d'exposició (**a,b**) o a les 24 hores de tractament (**c,d**). Les cèl·lules tractades amb TNF $\alpha$  (50 ng/mL) han estat utilitzades com a control positiu de translocació. Les bandes corresponents a les proteïnes Msh2 i  $\alpha$ -tubulina indiquen la puresa dels extractes de nucli i citoplasma, respectivament. NT: cèl·lules tractades amb vehicle.

En conjunt aquests resultats suggereixen que, almenys en part, els efectes de la curcumina sobre cèl·lules de CCR sensibles i resistents a oxaliplatí, individualment o en combinació amb oxaliplatí, estan produïts per la inhibició de la cascada de senyalització de NF- $\kappa$ B.

### 4.3. Resultats objectiu 3

#### 4.3.1. Efecte diferencial del tractament concomitant d'oxaliplatí i curcumina en el patró d'expressió gènica dels models cel·lulars HT29 i HTOXAR3

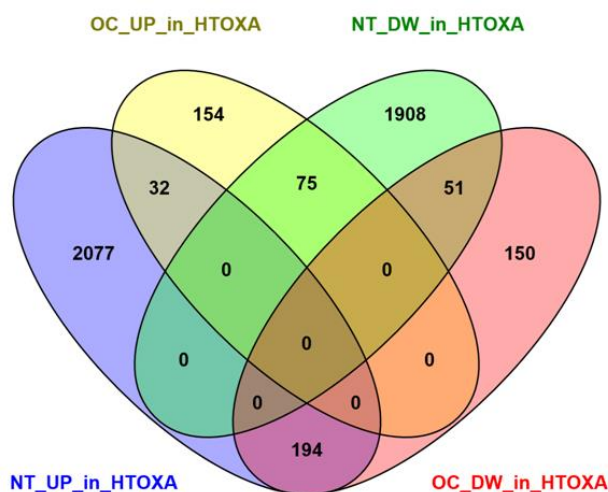
Fins aquest moment, els nostres resultats demostraven que la combinació d'oxaliplatí i curcumina era més efectiva i sinèrgica en la línia HTOXAR3 la qual, presentava una sobreactivació de la via de NF- $\kappa$ B en comparació a la seva línia parental sensible, HT29. Tenint en compte que NF- $\kappa$ B és un factor de transcripció, la nostra hipòtesi era que aquesta efectivitat venia determinada per l'expressió gènica diferencial entre la línia HT29 i HTOXAR3 com a conseqüència del procés d'adquisició de resistència. Per demostrar aquesta hipòtesi, les cèl·lules HT29 i HTOXAR3 es van tractar durant 24 hores amb oxaliplatí o oxaliplatí i curcumina a les respectives dosis IC50, se'n va obtenir l'ARN total i es va analitzar el patró transcripcional global d'ambdues línies mitjançant un estudi de *microarrays*. En aquest cas, ens interessaven aquells gens l'expressió dels quals es trobava alterada a nivell basal com a conseqüència del

procés d'adquisició de resistència a oxaliplatí i que alhora, es trobaven diferencialment expressats després del tractament concomitant. D'un total de 36.204 gens analitzats, 4.237 gens presentaven nivells d'expressió significativament diferents entre les dues línies cel·lulars a nivell basal dels quals, 2.303 es trobaven incrementats i 2.034 decrementats en HTOXAR3. Aquest elevat nombre de gens diferencialment expressats en el model resistent confirma la complexitat i multifactorialitat del procés de resistència a oxaliplatí. En quant a la combinació, es van identificar 656 gens diferencialment expressats en resposta a aquesta combinació 261 dels quals presentaven una expressió augmentada i 395 disminuïda en HTOXAR3 (Taula 6).

	Comparacions	Gens regulats	Incrementen	Disminueixen
A la línia HT29	Oxaliplatí vs no tractat	5726	2980	2746
	Oxaliplatí + curcumina vs no tractat	6622	3420	3202
	Oxaliplatí + curcumina vs oxaliplatí	2447	1330	1117
A la línia HTOXAR3	Oxaliplatí vs no tractat	4022	2095	1927
	Oxaliplatí + curcumina vs no tractat	6295	3194	3101
	Oxaliplatí + curcumina vs oxaliplatí	5513	2766	2747
Entre les línies HT29 i HTOXAR3	No tractat HTOXAR3 vs HT29	4337	2303	2034
	Oxaliplatí HTOXAR3 vs HT29	645	349	296
	Oxaliplatí + curcumina vs basal HTOXAR3 vs HT29	656	261	395
	Oxaliplatí + curcumina vs oxaliplatí HTOXAR3 vs HT29	165	48	117

**Taula 6. Resum de tots els gens diferencialment expressats (incloent gens de símbol únic i altres trànscrips) en les comparacions indicades.**

La intersecció d'ambdues llistes ens va permetre identificar 75 gens decrementats a nivell basal en HTOXAR3 que alhora s'incrementaven després del tractament amb oxaliplatí i curcumina i 194 gens que mostraven el sentit oposat ja que es trobaven incrementats a nivell basal però decrementats després del tractament combinat (Figura 55).



**Figura 55. Diagrama de Venn** que representa el nombre de gens presents en la intersecció entre les següents condicions: OC\_UP\_in\_HTOXA (gens amb expressió diferencial incrementada després del tractament amb oxaliplatí i curcumina (OC) respecte a HTOXAR3 a nivell basal (NT) comparat amb HT29). OC\_DW\_in\_HTOXA (gens amb expressió diferencial reduïda després del tractament amb oxaliplatí i curcumina respecte a HTOXAR3 a nivell basal comparat amb HT29). NT\_UP\_in\_HTOXA HTOXA (gens sobreexpressats en HTOXAR3 en comparació amb HT29 en condicions basals (no tractament)), i NT\_DW\_in\_HTOXA (gens infraexpressats en HTOXAR3 en comparació amb HT29 en condicions basals (no tractament)).

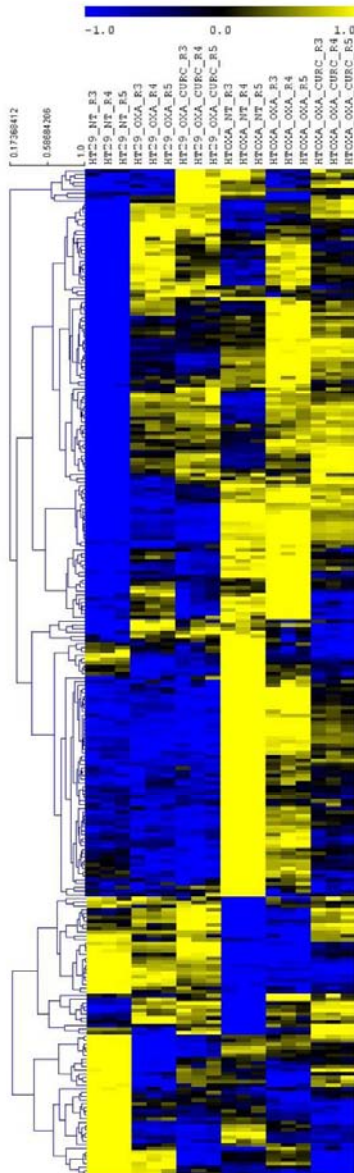
L'anàlisi exploratori d'enriquiment funcional amb l'eina GSEA va revelar que els processos biològics principalment sobrerrepresentats ( $q$ -valor < 0,00001) eren la resposta a l'interferó gamma, el sistema del complement, la transició epitelial mesènquima (EMT) i la via de senyalització  $TNF\alpha/NF-\kappa B$  en la llista de 194 gens i únicament la via de senyalització de  $TNF\alpha/NF-\kappa B$  en la llista de 75 gens (Taula 7).

LLISTA DE 194 GENS					
Funció molecular / <i>Hallmark</i>	Genes in Gene Set (K)	Genes in Overlap (k)	k/K	p-valor	FDR q-valor
Resposta a interferó gamma	200	11	0,055	1,52E-10	7,58E-09
Complement	200	8	0,04	5,94E-07	7,43E-06
Transició epitelí mesènquima	200	8	0,04	5,94E-07	7,43E-06
Via de senyalització TNF $\alpha$ /NF- $\kappa$ B	200	8	0,04	5,94E-07	7,43E-06
Resposta a interferó alfa	97	6	0,0619	1,28E-06	1,28E-05
Apoptosi	161	6	0,0373	2,37E-05	1,97E-04
Hipòxia	200	6	0,03	7,93E-05	4,95E-04
Via de senyalització de K-Ras $\uparrow$	200	6	0,03	1,32E-04	4,95E-04
Coagulació	138	5	0,0362	7,26E-04	7,34E-04
Adipogènesi	200	5	0,025	7,26E-04	2,59E-03
Resposta tardana a estrògens	200	5	0,025	7,26E-04	2,59E-03
Miogènesi	200	5	0,025	7,26E-04	2,59E-03
Via de senyalització de p53	200	5	0,025	7,26E-04	2,59E-03
Metabolisme xenobiòtic	200	5	0,025	5,52E-03	2,59E-03
Unió apical	200	4	0,02	5,52E-03	1,53E-02
Resposta temprana a estrògens	200	4	0,02	5,52E-03	1,53E-02
Glicòlisi	200	4	0,02	5,52E-03	1,53E-02
Via de senyalització de K-Ras $\downarrow$	200	4	0,02	5,52E-03	1,53E-02
Peroxisoma	104	3	0,0288	5,93E-03	1,56E-02
Metabolisme dels àcids grassos	158	3	0,019	1,83E-02	4,36E-02
Resposta a llum UV $\uparrow$	158	3	0,019	1,83E-02	4,36E-02
LLISTA DE 75 GENS					
Funció molecular / <i>Hallmark</i>	Genes in Gene Set (K)	Genes in Overlap (k)	k/K	p-valor	FDR q-valor
Via de senyalització NF- $\kappa$ B	200	8	0,04	7,45E-10	3,72E-08
Via de senyalització de p53	200	5	0,025	1,33E-05	3,33E-04
Resposta inflamatòria	200	4	0,02	2,41E-04	4,02E-03
Resposta a llum UV $\uparrow$	158	3	0,019	1,77E-03	2,21E-02
Transició epitelí mesènquima	200	3	0,015	3,44E-03	2,87E-02
Via de senyalització de K-Ras $\uparrow$	200	3	0,015	3,44E-03	2,87E-02
Homeòstasi del colesterol	74	2	0,027	5,60E-03	4,00E-02

**Taula 7. Llistat de les funcions moleculars o *Hallmark terms* enriquides segons l'anàlisi per *GSEA overlap*.** El panell superior mostra l'anàlisi obtingut a partir de la llista de 194 gens l'expressió dels quals es troba incrementada significativament en HTOXAR3 a nivell basal i disminuïda pel tractament concomitant. El panell inferior mostra el mateix per la llista de 75 gens l'expressió dels quals es troba disminuïda en HTOXAR3 en condicions basals i augmentada pel tractament combinat.

Per tant, aquests resultats corroboren per una banda el paper central de la via de NF- $\kappa$ B en el procés d'adquisició de resistència a oxaliplatí en el nostre model HT29/HTOXAR3 i d'altra banda confirmen el paper de la curcumina en la modulació de la via de senyalització d'aquest factor de transcripció.

És important destacar que entre els 10 primers gens que complien els criteris de la llista de 194 gens, es van identificar tres que codifiquen per tres CXC-quimiocines proinflamatòries regulades a nivell transcripcional per NF- $\kappa$ B: *CXCL8* (Interleuquina-8), *CXCL1* (Gro- $\alpha$ ) i *CXCL2* (Gro- $\beta$ ). Els ARN missatgers d'aquestes quimiocines es van trobar significativament incrementats en HTOXAR3 i decrementats després del tractament amb oxaliplatí i curcumina en aquesta línia respecte HT29 (Figura 56)

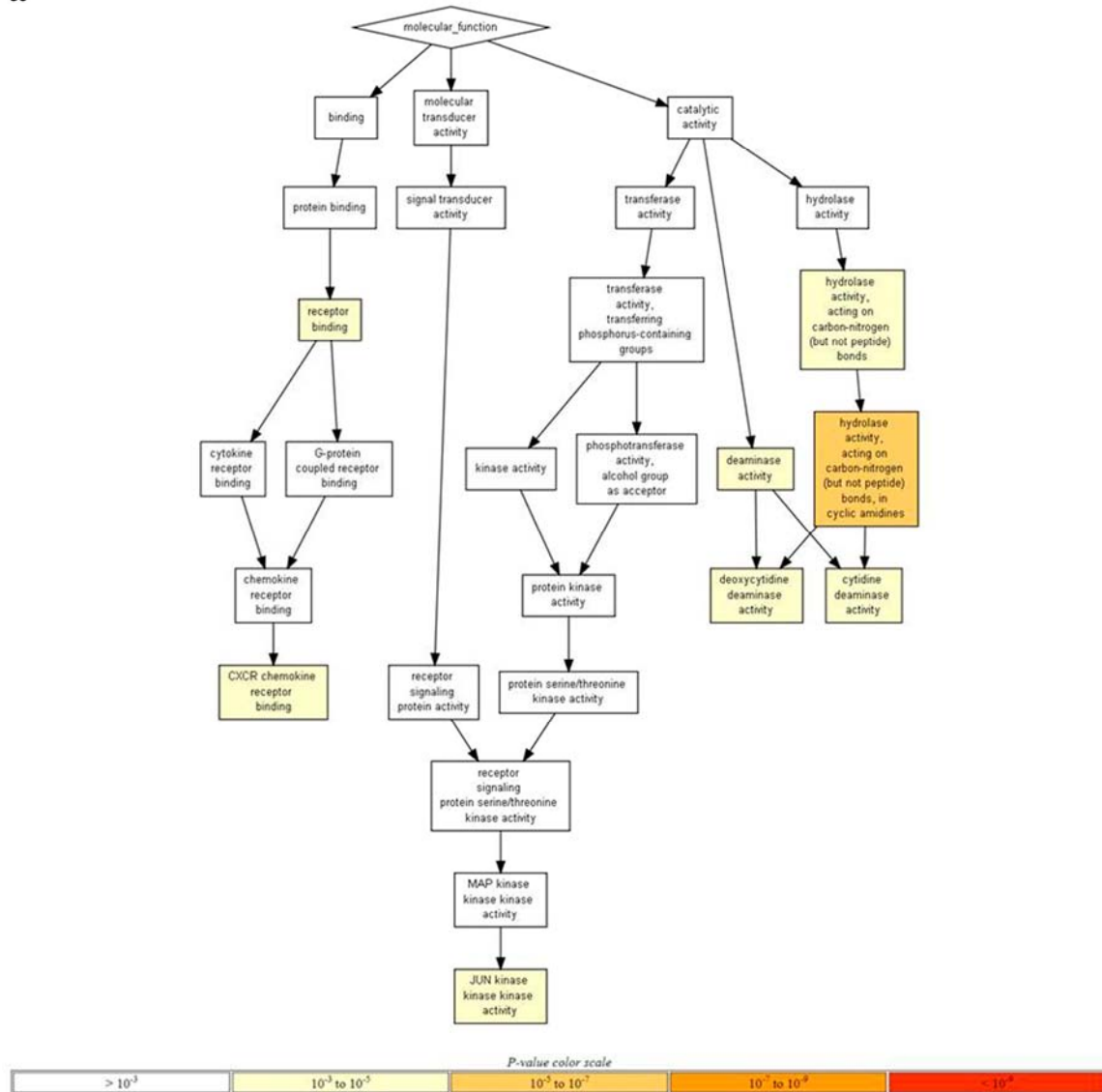


GeneBank Accession n°	Nom del gen	Descripció	Fold Change OXA+CURC / Basal
<b>10 primers gens sobreexpressats a nivell basal en HTOXAR3 vs. HT29 i infraexpressats després del tractament concomitant OXA+CURC en HTOXAR3 vs. HT29</b>			
NM_198196	CD96	CD96 molecule	-7.61 / 9.81
NM_00110454	MIR205HG	MIR205 host gene	-4.53 / 9.65
NM_005752	CLEC3A	C-type lectin domain family 3, memberA	-3.88 / 137.46
NM_001511	CXCL1	Chemokine (CXC-motif) ligand 1	-3.46 / 2.42
NM_002089	CXCL2	Chemokine (CXC-motif) ligand 2	-3.25 / 1.90
NM_000584	CXCL8	Chemokine (CXC-motif) ligand 8	-3.11 / 5.10
NR_002918	SNORA48	Small Nuclear RNA, H/ACA box 48	-3.08 / 2.29
THC_2544321	THC_2544321	HSINTLK8M Interleukin	-3.00 / 3.33
ENST00000457321	ENST00000457321	Unknown	-2.59 / 3.06
XR_242411	LOC_101927172	Uncharacterized LOC101927172	-2.55 / 2.68
<b>10 primers gens infraexpressats a nivell basal en HTOXAR3 vs. HT29 i sobreexpressats després del tractament concomitant OXA+CURC en HTOXAR3 vs. HT29</b>			
NM_032546	TRIM54	Tripartite motif containing 54	7.34 / -7.65
NM_001080395	AATK	Apoptosis-associate tyrosine kinase	3.76 / -4.49
NR_024089	LINC00162	Long intergenic non protein coding RNA 162	2.75 / 1.81
NM_145894	KLK12	Kallikrein-related peptidase 12	2.26 / -2.91
NM_001200	BMP2	Bone morphogenetic protein 2	2.22 / -2.62
NM_014344	FJX1	Four jointed box 1	2.07 / -1.93
NM_152597	FSIP1	Fibrous sheath interacting protein 1	2.01 / -2.03
NM_005309	GPT	Glutamic-pyruvate transaminase	1.91 / -4.77
NM_001242890	DDC	Dopa decarboxylase	1.87 / -5.86
NM_001242890	PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor	1.81 / -2.73

**Figura 56. Patrons d'expressió gènica associats a la resistència a oxaliplatí i al sinergisme del tractament d'oxaliplatí i curcumina.** Mapes de calor o *heatmaps* mostrant l'agrupació dels gens diferencialment expressats en les categories indicades. El color blau indica disminució de l'expressió, el groc augment de l'expressió i les zones fosques indiquen que no hi ha canvis en l'expressió. A la taula es mostren els 10 gens millor classificats segons el *fold change* entre HTOXAR3 i HT29 a nivell basal i després del tractament combinat.

D'acord amb això, la via de senyalització del receptor de quimiocines CXCR va ser una de les funcions moleculars destacades en l'anàlisi d'enriquiment funcional de la llista de 194 gens. Altres funcions destacades van ser la via de senyalització de la proteïna quinasa JNK així com l'activitat deaminasa dels enzims citidina i deoxicitidina deaminasa (Figura 57).

**a**





**b**

Gene Set Name	Genes in Gene Set (K)	Genes in Overlap (k)	k/K	p-valor	FDR q-valor
Activitat deaminasa	14	3	0,2143	1,49E-05	4,53E-03
Activitat hidrolasa	16	3	0,1875	2,29E-05	4,53E-03
Activitat isomerasa	35	3	0,0857	2,54E-04	2,52E-03
Unió a receptor	377	7	0,0186	3,91E-04	2,52E-02
Activitat quimiocina	42	3	0,0714	4,38E-04	2,52E-02
Unió a receptor de quimiocina	43	3	0,0698	4,70E-04	2,52E-02
Activitat receptor transmembrana proteïna tirosina quinasa	43	3	0,0698	4,70E-04	2,52E-02
Activitat sialiltransferasa	10	2	0,2	5,39E-04	2,52E-02
Activitat hidrolasa	46	3	0,0652	5,74E-04	2,52E-02
Activitat citoquina	113	4	0,0354	6,94E-04	2,75E-02
Activitat receptor transmembrana proteïna quinasa	51	3	0,0588	7,77E-04	2,80E-02
Unió a receptor acoblat a proteïna G	54	3	0,0556	9,18E-04	3,03E-02
Activitat proteïna tirosina quinasa	53	3	0,0476	1,44E-03	4,38E-02
Activitat molècula estructural	244	5	0,0205	1,75E-03	4,95E-02

**Figura 57. Anàlisi d'enriquiment funcional. (a)** Diagrama de les funcions moleculars enriquides segons l'anàlisi a partir de la llista de 194 gens augmentats en HTOXAR3 en condicions basals i disminuïts després del tractament amb oxaliplatí i curcumina **(b)** Funcions moleculars més significativament enriquides segons l'anàlisi GO a la llista de 194 gens.

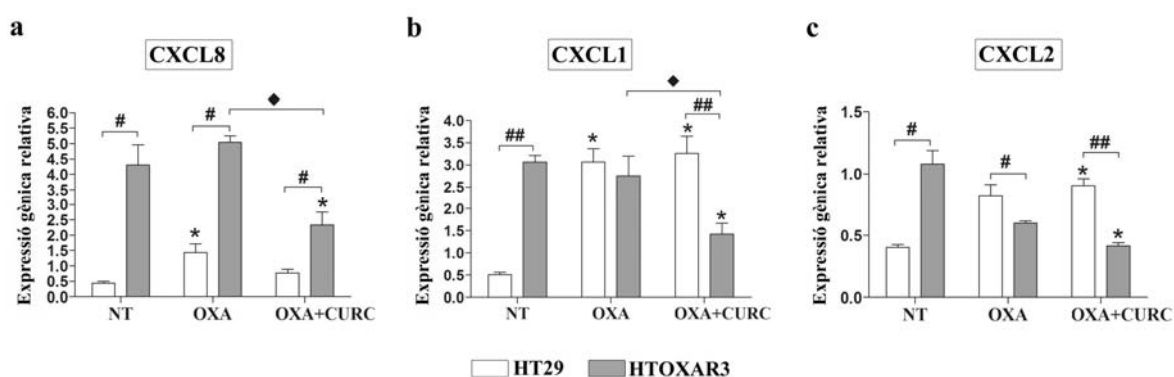
D'altra banda, l'anàlisi d'enriquiment funcional a partir de la llista de 75 gens no va mostrar cap funció molecular significativament associada probablement degut a que el nombre de gens en aquest cas era menor.

Aquests resultats ens van conduir a estudiar les quimiocines CXCL1, CXCL2 i CXCL8 per tres raons principalment. En primer lloc, perquè la seva via de senyalització a través del receptor CXCR va ser una de les funcions moleculars destacades en l'anàlisi d'enriquiment funcional de la llista de gens sobreexpressats a nivell basal i decrementats després del tractament amb oxaliplatí i curcumina en HTOXAR3 respecte HT29; en segon lloc, perquè van aparèixer entre els 10 primers gens que complien aquesta condició i finalment, perquè són dianes transcripcionals de NF- $\kappa$ B.

#### 4.3.2. Validació dels resultats obtinguts en l'anàlisi de *microarrays* per a CXCL1, CXCL2 i CXCL8

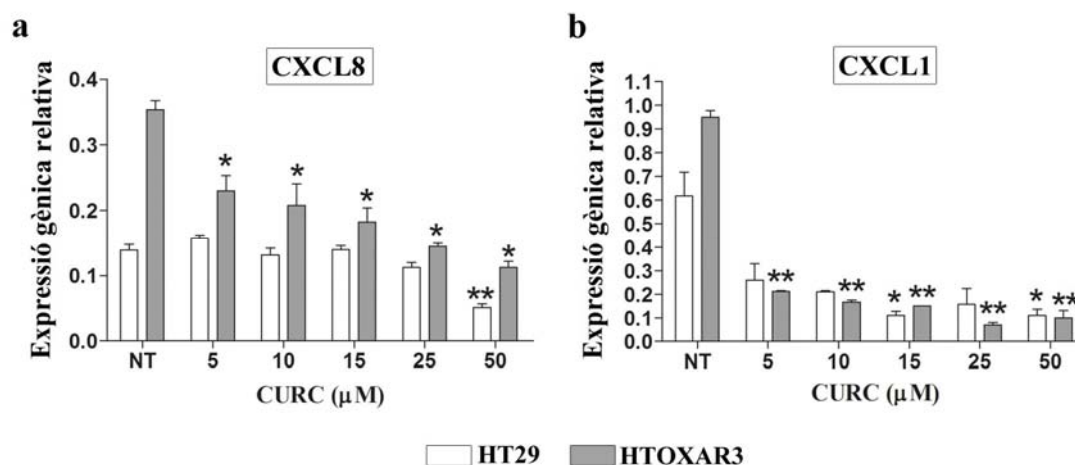
Per l'estudi específic dels nivells d'expressió de CXCL8, CXCL1, CXCL2 vam utilitzar la tècnica de RT-qPCR. Tal i com s'observa a la Figura 58, es va validar l'increment de CXCL8 (10 vegades sobreexpressat), CXCL1 (6 vegades sobreexpressat) i CXCL2 (2,5 vegades sobreexpressat) en la línia HTOXAR3 en relació a HT29. A més a més, vam observar un increment de l'expressió de les tres quimiocines després del tractament durant 24 hores amb oxaliplatí només en la línia sensible HT29. Així, CXCL8 va incrementar 3 vegades la seva expressió, CXCL1 6 vegades i

*CXCL2* 2 vegades. En el cas concret de *CXCL2*, el tractament amb oxaliplatí es va associar amb una disminució de la seva expressió en la línia HTOXAR3. Quan vam combinar l'oxaliplatí i la curcumina concomitantment, l'ARNm de *CXCL8* i *CXCL1* va disminuir significativament en la línia HTOXAR3 però no en HT29 mentre que en les mateixes condicions, l'expressió de *CXCL2* va disminuir significativament en comparació a les cèl·lules no tractades però no a les tractades amb oxaliplatí. Així doncs, la validació per qPCR va corroborar els resultats dels arrays per *CXCL8* i *CXCL1* i per tant, vam descartar continuar amb l'estudi de *CXCL2*.



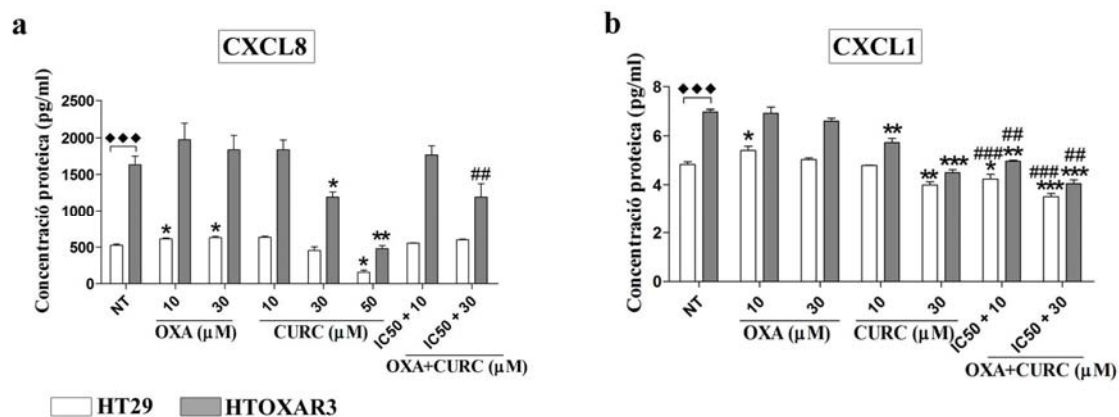
**Figura 58.** Canvis en els nivells d'expressió gènica de *CXCL8*, *CXCL1* i *CXCL2* en HT29 i HTOXAR3 després del tractament amb oxaliplatí o oxaliplatí i curcumina mesurats per RT-qPCR. Els gràfics de barres mostren els nivells de cadascun dels gens indicats relatius als de la  $\beta$ -actina (mitjana  $\pm$  SEM) en cèl·lules HT29 i HTOXAR3 tractades amb vehicle (NT) i tractades amb oxaliplatí (OXA) o oxaliplatí i curcumina (CURC) a les respectives dosis IC50 per a cada fàrmac. Els resultats es van obtenir a partir d'un mínim de tres experiments independents. \* $p < 0,05$  respecte NT, # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  respecte HT29, ♦ $p < 0,05$  respecte tractament amb oxaliplatí.

A continuació, es va estudiar l'efecte del tractament amb dosis creixents de curcumina (de 0 a 50  $\mu$ M) durant 24 hores en l'expressió de *CXCL8* i *CXCL1* en les línies HT29 i HTOXAR3. Com s'observa a la Figura 59, el tractament amb curcumina es va associar amb una reducció de l'expressió gènica d'ambdues quimiocines en les dues línies cel·lulars, essent aquesta disminució estadísticament significativa en totes les dosis únicament en la línia resistent i a dosis altes en la línia sensible HT29.



**Figura 59.** Canvis en els nivells d'expressió gènica de CXCL8 i CXCL1 en cèl·lules HT29 i HTOXAR3 després del tractament amb curcumina. Els gràfics de barres mostren la mitjana  $\pm$  SEM dels nivells d'expressió dels gens indicats després del tractament amb curcumina durant 24 h a les dosis indicades. Els resultats es van obtenir a partir d'un mínim de tres experiments independents. NT: tractades amb vehicle. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecte NT.

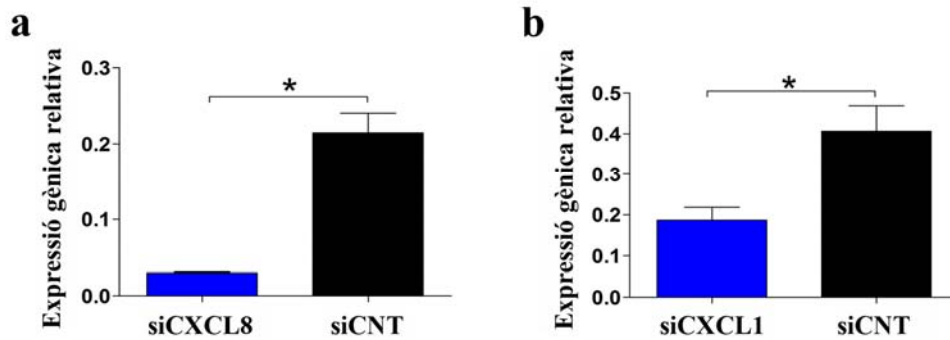
Degut a que les quimiocines són proteïnes secretades per les cèl·lules, vam voler estudiar la seva presència en els sobredants de les línies HT29 i HTOXAR3 mitjançant la tècnica d'ELISA. De la mateixa manera que a nivell d'expressió gènica, també vam trobar una major quantitat d'aquestes quimiocines, ara en forma de proteïna en els sobredants de HTOXAR3 respecte a HT29 i només en aquestes, el tractament amb oxaliplatí durant 24 hores n'incrementava els nivells. En canvi, el tractament amb curcumina individualment es va associar amb una davallada dosi-depenent en els nivells de CXCL1 i CXCL8 en els sobredants de les dues línies, essent aquesta disminució més significativa en la línia resistent. Finalment, els nivells de CXCL1 i CXCL8 van resultar menors en els sobredants de cèl·lules HT29 i HTOXAR3 tractades amb la combinació de curcumina i oxaliplatí que en els de les tractades únicament amb l'agent platinat. En el cas de CXCL8, aquesta disminució va ser més marcada en la línia resistent (Figura 60).



**Figura 60. Valoració dels nivells de CXCL8 i CXCL1 en sobredants de cèl·lules HT29 i HTOXAR3.** Els gràfics de barres mostren la mitjana  $\pm$  SEM dels nivells de les quimiocines CXCL8 (a) i CXCL1 (b) mesurats mitjançant la tècnica d' ELISA en els sobredants de cèl·lules HT29 i HTOXAR3 tractades segons s'indica. NT: cèl·lules tractades amb vehicle . Els resultats es van obtenir a partir d'un mínim de tres experiments independents \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  respecte NT. ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  respecte al tractament amb oxaliplatí.

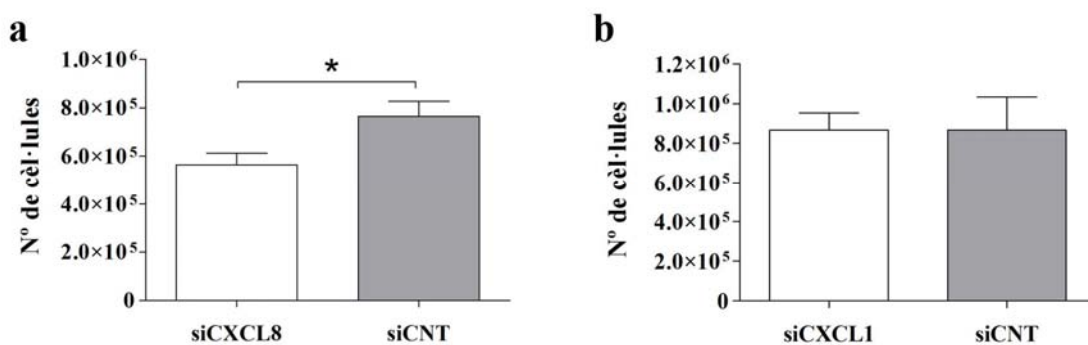
#### 4.3.3. Estudi del paper de CXCL8 i CXCL1 en la reversió de resistència a oxaliplatí

El fet que els nivells de ARNm i proteïna de CXCL1 i CXCL8 estiguessin augmentats en la línia resistent no implica *per se* que aquesta sigui una causa de l'adquisició de resistència a oxaliplatí sinó que també podria ser una conseqüència. Per tant, per tal de confirmar el paper específic d'aquestes quimiocines en la resistència i la sensibilitat a oxaliplatí en la línia HTOXAR3, es va silenciar la seva expressió gènica de manera transitòria mitjançant la tècnica de *siRNA*. L'eficiència de la inhibició després de 48 hores de silenciament va ser avaluada mitjançant qPCR i va resultar ser d'aproximadament el 90% per a CXCL8 i del 60% per a CXCL1 en comparació amb la condició control (siCNT) (Figura 61).



**Figura 61. Eficiència del silenciament de *CXCL8* i *CXCL1* amb *siRNAs*.** Els gràfics mostren la mitjana  $\pm$  SEM dels nivells d'expressió relatius als de  $\beta$ -actina de les quimiocines *CXCL8* (a) i *CXCL1* (b) mesurats per qPCR després del tractament de cèl·lules HTOXAR3 amb *siRNAs* contra cadascun dels gens (siCXCL8 i siCXCL1) i amb un control negatiu (siCNT) durant 48 h. Els resultats es van calcular a partir d'un mínim de tres experiments independents \* $p < 0,05$  respecte a siCNT.

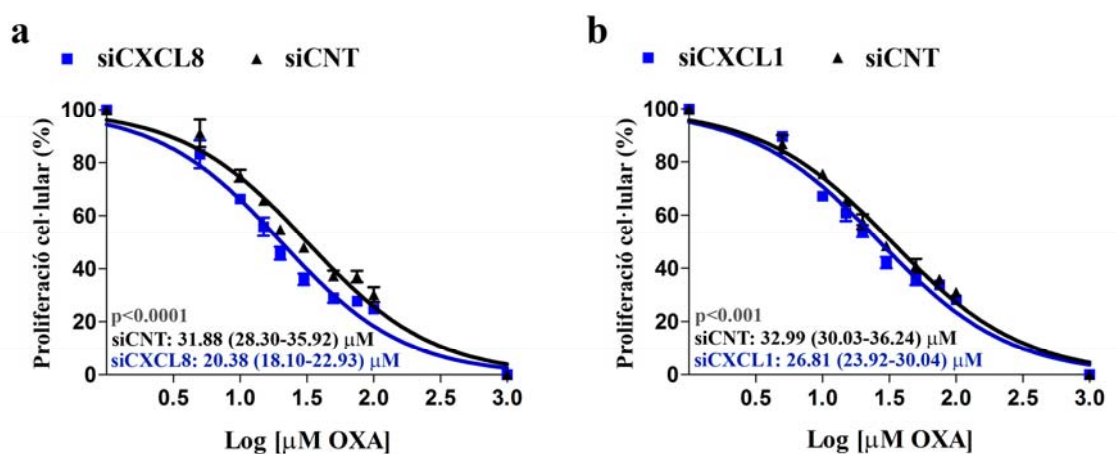
En concordança amb altres estudis (272), el silenciament de *CXCL8* es va traduir en una disminució significativa del nombre de cèl·lules viables a les 48 hores post-inhibició en comparació a la condició siCNT (Figura 62a). La inhibició específica de *CXCL1*, en canvi, no va produir cap canvi en el nombre de cèl·lules HTOXAR3 viables. (Figura 62b)



**Figura 62. Efecte del silenciament de *CXCL8* i *CXCL1* sobre la viabilitat cel·lular de HTOXAR3.** Els gràfics mostren la mitjana  $\pm$  SEM del nombre de cèl·lules viables contades amb l'hemocitòmetre després de 48 hores de transfecció amb *siRNAs* contra *CXCL8* (siCXCL8, a) i *CXCL1* (siCXCL1, b) i amb un control negatiu (siCNT) i tinció amb blau de tripà. El nombre inicial de cèl·lules va ser de 250.000 cèl·lules per condició. Els resultats es van calcular a partir d'un mínim de tres experiments independents. \* $p < 0,05$  respecte a siCNT.

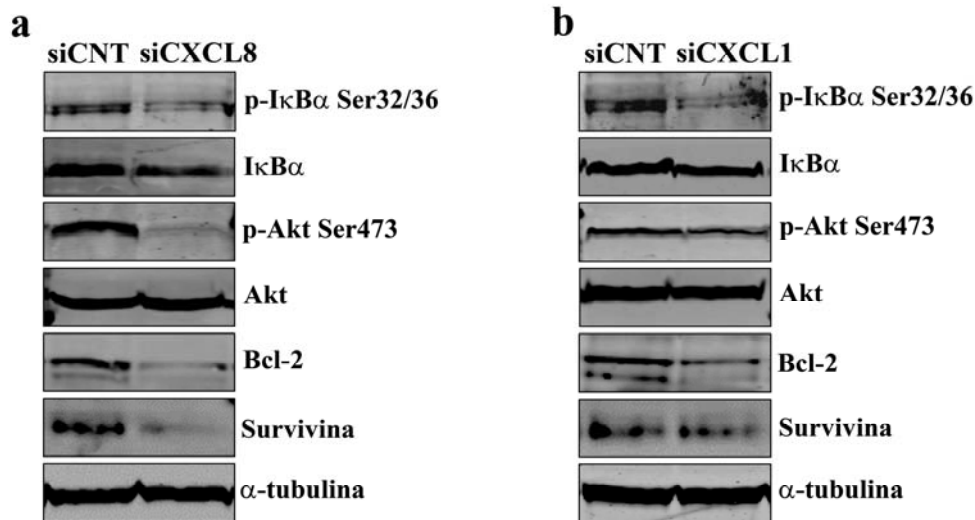
Tot seguit, es va avaluar l'efecte del silenciament gènec específic de *CXCL8* i *CXCL1* en la resposta a oxaliplatí en la línia HTOXAR3. Les cèl·lules a les que se'ls havia silenciats *CXCL1* o *CXCL8* es van tractar durant 24 hores a dosis creixents d'oxaliplatí, de 0 a 100  $\mu$ M. Tal i com es mostra en la Figura 63, el silenciament gènec de *CXCL8* i *CXCL1* es va associar amb una

disminució significativa del 35 i el 20%, respectivament, del valor d'IC50 en comparació amb la línia transfectada amb el control negatiu.



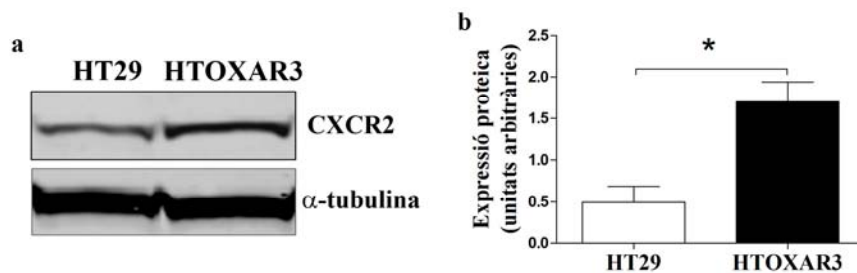
**Figura 63. Efecte del silenciament gènic de *CXCL8* i *CXCL1* en la sensibilitat a oxaliplatí de les cèl·lules HTOXAR3.** Corbes dosi-resposta després del silenciament gènic de *CXCL8* (siCXCL8, a) i *CXCL1* (siCXCL1, b) i tractament amb dosis d'entre 0 i 100  $\mu$ M d'oxaliplatí (OXA) durant 24 hores (els valors representen la mitjana  $\pm$  SD). Els valors d'IC50 per a cadascuna de les condicions indicades corresponen a la mitjana i als intervals de confiança al 95%. Els p valor s'han obtingut després de calcular les diferències entre les dues corbes mitjançant el test F.

Tant CXCL1 com CXCL8 poden actuar de forma autocrina sobre els receptors específics de membrana CXCR1 i CXCR2 i promoure una cascada de senyalització intracel·lular que finalitzarà en l'activació de NF- $\kappa$ B (99, 233, 273). En aquest sentit, els nostres resultats van mostrar que el silenciament gènic de *CXCL8* i *CXCL1* s'associava amb una reducció de la fosforil·lació de I $\kappa$ B $\alpha$  així com dels nivells de Bcl-2 i Survivina en la línia HTOXAR3. A més a més, la inhibició d'aquestes dues quimiocines es va traduir també en una disminució dels nivells de la forma fosforilada de la quinasa Akt (Figura 64).



**Figura 64. Efecte del silenciament gènic de CXCL8 i CXCL1 en l'activació de la via de senyalització de NF-κB en cèl·lules HTOXAR3.** Imatges representatives de western blots que mostren els canvis en els nivells de les proteïnes p-IκBα Ser32/36, p-Akt Ser473, Bcl-2 i Survivina en cèl·lules transfectades amb un *siRNA* control negatiu (siNTC) o contra *CXCL8* (siCXCL8, a) o *CXCL1* (siCXCL1, b).

Tant CXCL1 com CXCL8 duen a terme la seva acció biològica mitjançant la seva unió específica al receptor de membrana CXCR2 [Revisat a (274)]. Els nostres resultats van mostrar que els nivells de CXCR2 eren clarament superiors a la línia HTOXAR3 en comparació a a línia HT29 (Figura 65).



**Figura 65. Expressió proteica de CXCR2 en línies HT29 i HTOXAR3.** a) Imatge representativa de l'anàlisi per western blot i b) representació gràfica de la mitjana  $\pm$  SEM dels nivells basals de CXCR2 en línies HT29 i HTOXAR3 mesurats per western blot i calculats a partir d'un mínim de tres experiments independents. \* $p < 0,05$  respecte HT29.

A continuació, per tal de conèixer l'efecte del tractament durant 72 hores amb l'antagonista específic de CXCR2 SB265610 sobre la proliferació dels nostres models cel·lulars, vam realitzar l'assaig MTT utilitzant un rang de dosis de 0 a 100  $\mu$ M en HT29 i HTOXAR3. Tal i com es pot observar a la Figura 66, el compost SB265610 va produir una disminució significativa de la proliferació cel·lular de manera dosi-dependent en ambdues línies cel·lulars. És important

destacar que el model resistent HTOXAR3 va resultar ser significativament més sensible a aquest inhibidor en comparació a la línia parental HT29.

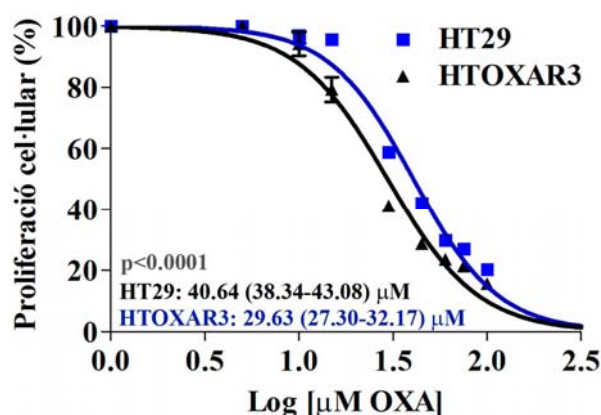


Figura 66. Efecte del tractament amb l'antagonista del receptor CXCR2 SB265610 en la proliferació de les línies HT29 i HTOXAR3. Corbes dosi resposta corresponents a les línies HT29 i HTOXAR3 després del tractament amb 0-100 µM de SB265610 durant 72 hores (mitjana  $\pm$  SEM) i anàlisi de MTT. Els valors d'IC50 per a cadascuna de les condicions indicades corresponen a la mitjana i als intervals de confiança al 95%. Els p valor s'han obtingut després de calcular les diferències entre les dues corbes mitjançant el test F.

En global, aquests resultats suggereixen per una banda el possible paper de les quimiocines *CXCL8* i *CXCL1* i el seu receptor CXCR2 en el procés d'adquisició de resistència a oxaliplatí mitjançant l'activació de la via de senyalització Akt/NF- $\kappa$ B i per altra, la seva implicació en el sinergisme i major eficàcia del tractament concomitant d'oxaliplatí i curcumina en el model resistent HTOXAR3. Així doncs, en base a aquests resultats, ens vàrem plantejar la possible utilitat de les quimiocines *CXCL8* i *CXCL1* com a marcadors predictius de l'eficàcia del tractament concomitant d'ambdues drogues.

#### 4.4. Resultats de l'objectiu 4

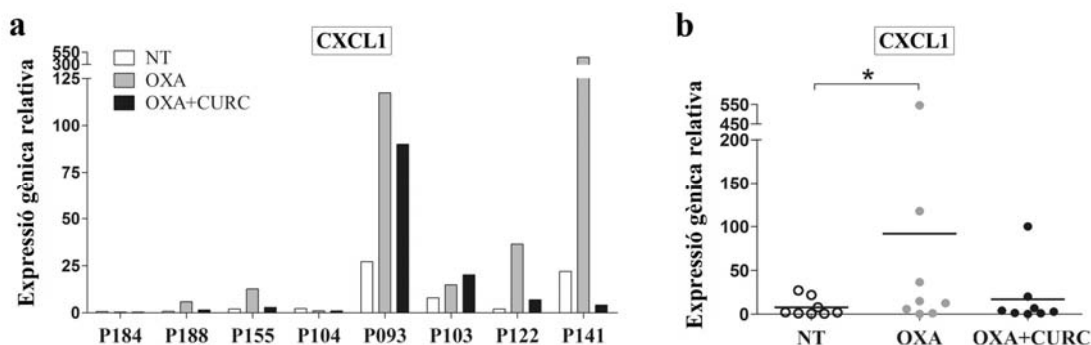
##### 4.4.1. Estudi dels nivells d'expressió de *CXCL8* i *CXCL1* en explants de metàstasi de pacients de CCR i associació amb l'eficàcia del tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina

Davant de la impossibilitat d'obtenir mostres tumorals de pacients tractats amb curcumina i per tal d'avaluar el potencial de *CXCL8* i *CXCL1* com a biomarcadors predictius de la resposta al tractament concomitant d'oxaliplatí i curcumina, es va analitzar l'expressió gènica d'ambdues quimiocines en un panell de 8 mostres fixades amb formol i incloses en parafina d'explants de



metàstasis hepàtiques derivades de pacients amb CCR. Els explants, havien estat tractats prèviament pels nostres col·laboradors de Leicester amb oxaliplatí, oxaliplatí i curcumina o vehicle (DMSO) durant 24 hores. Per tal d'avaluar l'efecte dels diferents tractaments sobre la disminució de la proliferació cel·lular i l'increment de l'apoptosi en aquests explants, es va analitzar mitjançant immuohistoquímica la presència del marcador ki67, com a indicador de la proliferació, i de la caspasa 3 truncada com a marcador de l'apoptosi (200).

A partir d'aquests explants vam extreure ARN i es va analitzar l'expressió de les quimiocines *CXCL1* i *CXCL8* mitjançant RT-qPCR. Malauradament sota les nostres condicions de qPCR només vam poder detectar l'expressió de *CXCL1* però no de *CXCL8*, probablement degut a la baixa concentració d'ARN (de 20 a 75 ng/ $\mu$ l) que vam poder obtenir a partir de les mostres d'explants. Malgrat això, l'anàlisi de *CXCL1* va mostrar una sobreexpressió d'aquesta quimiocina en 6 dels 8 explants que havien estat tractats amb oxaliplatí. A més, aquest augment d'expressió es veia atenuat pel tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina en 5 dels anteriors 6 explants. Aquests resultats corroboraven les dades obtingudes en el nostre estudi *in vitro* (Figura 67).



**Figura 67.** Nivells d'expressió gènica de *CXCL1* en cultius d'explants de metàstasis hepàtiques derivades de pacients amb CCR. (a) El gràfic mostra els nivells de *CXCL1* relatius als de  $\beta$ -actina mesurats per RT-qPCR en 8 explants i segons si havien estat tractats *ex-vivo* amb oxaliplatí (OXA) o oxaliplatí més curcumina (CURC) o pel contrari no havien rebut tractament (vehicle) (NT) durant 24 hores. (b) Representació dels nivells de *CXCL1* per grups de tractament. Les línies horitzontals representen els valors promig.

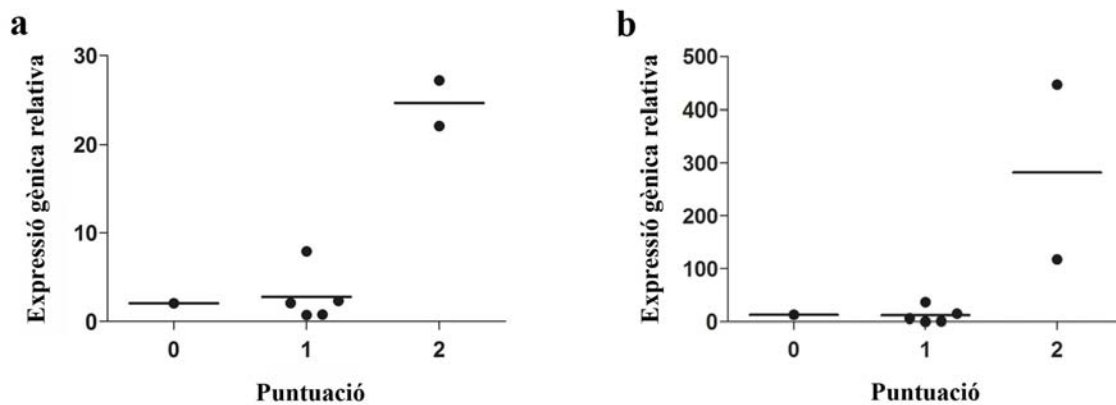
A continuació, es va analitzar el patró d'expressió de *CXCL1* en relació a la resposta al tractament. Per dur a terme aquest objectiu, vam recollir les dades obtingudes pels nostres col·laboradors de Leicester en relació a la tinció dels marcadors ki67 i caspasa 3 truncada en els explants. A partir d'aquestes dades vam assignar un valor numèric, de 0 a 2, en relació als canvis en la tinció de ki67 i caspasa 3 truncada després de l'exposició dels explants a oxaliplatí

o oxaliplatí i curcumina en comparació al tractament amb vehicle. Així, una puntuació de 2 ( 2 marcadors de “bon pronòstic”) representava una disminució i un augment significatiu de ki67 i de caspasa 3 truncada, respectivament; una puntuació de 1 (1 marcador de “bon pronòstic”) representava una disminució de ki67 o un augment de caspasa 3 truncada en resposta al tractament; i finalment, un valor de 0 (0 marcadors de “bon pronòstic”) significava que cap dels dos marcadors varia en relació als criteris de bon pronòstic. Cal remarcar que l’ús combinat d’aquests dos paràmetres com a marcadors pronòstic de l’eficàcia d’un determinat tractament han estat utilitzats també per altres autors (275). Tal i com es pot observar a la Taula 8, els explants p93 i p141 van ser els únics que van presentar una puntuació igual a 2 després del tractament combinat amb oxaliplatí i curcumina.

	Resposta al tractament				Expressió gènica relativa de CXCL1		
	NT vs. OXA	Puntuació	NT vs. OXA+CURC	Puntuació	NT	OXA	OXA+CURC
Ki67	S (0.001)		S (0.003)				
P093		1		2	27.19	117.38	100.08
C3	NS		S (0.02)				
Ki67	NS		NS				
P103		1		1	7.92	14.88	20.18
C3	S (0.021)		S (<0.0001)				
Ki67	NS		S (<0.0001)				
P104		0		1	2.31	1.03	1.01
C3	NS		NS				
Ki67	NS		S (0.002)				
P122		0		1	2.06	36.5	6.94
C3	NS		NS				
Ki67	S (0.001)		S (0.014)				
P141		2		2	22.1	446.85	4.13
C3	S (<0.0001)		S (<0.0001)				
Ki67	NS		NS				
P155		0		0	2.03	12.68	2.85
C3	NS		NS				
Ki67	NS		NS				
P184		1		1	0.72	0.37	0.39
C3	S (<0.0001)		S (<0.0001)				
Ki67	NS		NS				
P188		0		1	0.76	5.9	1.5
C3	NS		NS				

**Taula 8. Resposta al tractament i nivells de CXCL1 en els 8 explants de metàstasis hepàtiques.** En verd s’indiquen els canvis relatius a la tinció de Ki67 i en blau als de la caspasa 3 truncada. **NS** = no significatiu; **NT** = no tractat; **OXA** = oxaliplatí; **CURC** = curcumina. Els valors d’expressió gènica s’han obtingut a partir de la tècnica de RT-qPCR. El terme “**puntuació**” representa una mesura arbitrària de la resposta al tractament tal i com s’ha explicat en l’apartat 4.4.1, essent 0 equivalent a una no resposta, 1 a una resposta intermitja i 2 a una resposta completa.

De forma interessant, aquests dos explants van ser els que presentaven una major expressió de la quimiocina CXCL1 a nivell basal i després del tractament amb oxaliplatí, en relació als explants que presentaven puntuacions de 1 o 0 (Figura 68).



**Figura 68. Expressió basal (a) i post-tractament amb oxaliplatí (b) de *CXCL1* segons la resposta al tractament amb oxaliplatí i curcumina.** L'eix Y mostra els valors relatius d'expressió de *CXCL1* en els 8 explants de metàstasis hepàtiques valorats per RT-qPCR. L'eix X mostra la resposta al tractament segons la puntuació obtinguda tal i com s'explica a l'apartat 4.4.1. Les línies horitzontals representen els valors promig.

En conclusió, malgrat que aquests resultats han estat obtinguts a partir de molt pocs casos, corroboren els nostres resultats *in vitro* i suggereixen que aquells pacients amb elevats nivells de *CXCL1* (a nivell basal o després del tractament amb esquemes basats en l'oxaliplatí) serien bons candidats per a ser tractats de manera efectiva amb la combinació d'oxaliplatí i curcumina.

---

## 5. DISCUSSIÓ

Malgrat la recent aparició de noves teràpies antitumorals consistents en la utilització d'anticossos monoclonals dirigits contra dianes moleculars específiques, els esquemes de quimioteràpia basats en l'ús de l'oxaliplatí continuen essent essencials en el tractament dels pacients amb CCR metastàtic. Tot i això, l'aparició de resistències representa la principal causa de fracàs dels mateixos. La resistència a oxaliplatí és un procés complex i multifactorial, basat principalment en l'alteració de gens que participen en el seu transport, metabolisme i mecanisme d'acció. En un treball previ del nostre grup es va proposar la desregulació de la via de NF- $\kappa$ B com un important mecanisme d'adquisició de resistència a oxaliplatí comú en almenys 4 models *in vitro* (102). En base a aquests resultats, la present tesi doctoral s'ha focalitzat en l'estudi del paper de NF- $\kappa$ B en la sensibilitat i resistència a oxaliplatí així com en la seva inhibició mitjançant curcumina com a mecanisme de reversió de resistència a aquest fàrmac.

#### **Paper de NF- $\kappa$ B en la sensibilitat i resistència adquirida a oxaliplatí**

El paper de la via de NF- $\kappa$ B i els seus gens diana en els processos de quimioresistència ha estat ben establert [Revisat a (168)] i pel que fa a l'oxaliplatí, s'ha demostrat que la sensibilitat de les cèl·lules de CCR a la mort induïda per aquest fàrmac es veu negativament afectada per una elevada activitat d'aquest factor de transcripció (65). En concordança amb altres estudis (156, 276), els nostres resultats indiquen una activació constitutiva de NF- $\kappa$ B en totes les línies cel·lulars de CCR analitzades donat que en totes elles hem pogut detectar la proteïna p65 fosforilada en el residu Ser536. En tots els casos, les línies amb resistència adquirida van mostrar una hiperactivació de la via respecte les línies sensibles i d'entre elles, la línia HTOXAR3 es va escollir com a paradigma d'aquesta hiperactivació donat que va mostrar un augment significatiu de la fosforilació de p65, I $\kappa$ B $\alpha$  i Akt així com uns majors nivells de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Survivina, i la proteïna proproliferativa Ciclina D1 respecte la seva línia parental sensible HT29. La sobreexpressió d'aquestes proteïnes s'ha relacionat amb un augment de la quimioresistència en un gran nombre de cèl·lules tumorals [Revisat a (168)]. Bcl-2 antagonitza les proteïnes proapoptòtiques Bax i Bak i inhibeix la permeabilització de la membrana mitocondrial en la via intrínseca d'apoptosi; la Survivina, en canvi, inhibeix directament l'activació de diverses caspases, com la caspasa 9, impeding l'activació de l'apoptosi per acció dels fàrmacs quimioterapèutics i per tant disminuint-ne la sensibilitat. En concordança amb els nostres resultats, Wen i col·laboradors han reportat la sobreexpressió de Survivina en línies de CCR resistents a oxaliplatí (277) i a més a més s'ha demostrat que la inhibició específica d'aquesta proteïna i de Bcl-2 incrementa la sensibilitat a aquest fàrmac en

línies cel·lulars de càncer de pròstata metastàtic (99). D'altra banda, l'augment en la fosforilació i per tant en l'activació d'Akt, correlaciona amb una sobreexpressió de p65 i IκBα fosforilades ja que aquesta quinasa és capaç d'activar NF-κB per fosforilació directa de IKKβ, quinasa responsable de la fosforilació de IκBα, i de p65 (265-267). S'ha demostrat que l'activació de la via PI3K/Akt promou la resistència a l'oxaliplatí en la línia cel·lular HT29 (278) i que la inhibició farmacològica d'Akt es tradueix en un augment de la citotoxicitat d'aquest fàrmac en línies cel·lulars de colangiocarcinoma (279).

El factor de transcripció NF-κB participa en els processos de progressió tumoral, metàstasi i quimioresistència mitjançant la regulació del procés EMT. Concretament, s'ha demostrat que el tractament crònic amb TNFα en cèl·lules de càncer de mama indueix el procés d'EMT mitjançant la sobreexpressió d'un gen diana de NF-κB, el repressor transcripcional Twist-1 (165) i que la inhibició de la via canònica de NF-κB promou la reversió del EMT, corroborant el paper central de NF-κB en la iniciació i manteniment d'aquest procés (166). En relació a la quimioresistència, l'increment en l'expressió de marcadors mesenquimals, com N-caderina o Vimentina, ha estat relacionat amb un augment de la resistència a diversos fàrmacs quimioterapèutics. Un estudi realitzat en metàstasis pulmonars va demostrar la implicació del procés EMT en la formació de metàstasis pulmonars recurrents després del tractament amb cyclofosfamida (280), suggerint la contribució del tractament crònic amb quimioteràpia en l'aparició del procés EMT i la quimioresistència. Tanmateix, el nostre anàlisi exploratori d'enriquiment funcional amb GSEA va revelar que els processos biològics (*hallmarks*) principalment sobrerrepresentats en la llista de gens que estaven sobreexpressats a nivell basal en la línia HTOXAR3 en comparació a la línia sensible HT29 eren ( $q$ -valor < 0,00001) la via de senyalització de TNFα/NF-κB i el procés EMT (Taula 9).

Funció molecular / <i>Hallmark</i>	Genes in Gene Set (K)	Genes in Overlap (k)	k/K	p-valor	FDR q-valor
Via de senyalització TNF $\alpha$ /NF- $\kappa$ B	200	41	0,205	6,79E-18	3,40E-16
Resposta a l'interferó gamma	200	39	0,195	2,57E-16	6,43E-15
Transició epitel·li-mesènquima	200	38	0,19	1,51E-13	2,51E-14
Resposta tardana a estrògens	200	35	0,175	2,50E-13	3,12E-12
Resposta primerenca a estrògens	200	34	0,17	1,28E-12	1,28E-11
Resposta a interferó alfa	97	23	0,2371	4,71E-12	3,92E-11
Resposta a llum UV ↓	144	27	0,1875	2,49E-11	1,69E-10
Hipoxia	200	32	0,16	3,04E-11	1,69E-10
Senyalització STAT5/IL-2	200	32	0,16	3,04E-11	1,69E-10
Via de senyalització de K-Ras ↑	200	31	0,155	1,40E-10	6,38E-10
Miogènesi	200	31	0,155	1,40E-10	6,38E-10
Unió apical	200	30	0,15	6,23E-10	2,23E-09
Metabolisme Heme	200	30	0,15	6,23E-10	2,23E-09
Via de senyalització de p53	200	30	0,15	6,23E-10	2,23E-09
Complement	200	29	0,145	2,66E-09	8,88E-09
Resposta a llum UV ↑	158	24	0,1519	2,43E-08	7,60E-08
Metabolisme xenobiòtic	200	27	0,135	4,32E-08	1,27E-07
Metabolisme dels àcids grassos	158	22	0,1392	4,34E-07	1,21E-06
Peroxisoma	104	17	0,1635	9,01E-07	2,37E-06
<i>Allograft rejection</i>	200	24	0,12	2,06E-06	5,15E-06
Resposta a andrògens	101	16	0,1584	2,87E-06	6,82E-06
Glicòlisi	200	23	0,115	6,83E-06	1,55E-05
Homeostasi del colesterol	74	13	0,1757	7,52E-06	1,63E-05
Coagulació	138	18	0,1304	1,19E-05	2,48E-05
Via de senyalització de MTORC1	200	22	0,11	2,16E-05	4,33E-05
G2M <i>checkpoint</i>	200	21	0,105	6,52E-05	1,21E-04
Eix mitòtic	200	21	0,105	6,52E-05	1,21E-04
Apoptosi	161	18	0,1118	9,47E-05	1,69E-04
Resposta inflamatòria	200	20	0,1	1,87E-04	3,12E-04
Via de senyalització de K-Ras ↓	200	20	0,1	1,87E-04	3,12E-04
Adipogènesi	200	19	0,095	5,10E-04	7,75E-04
Gens diana de E2F	200	19	0,095	5,10E-04	7,75E-04
Angiogènesi	36	7	0,1944	5,11E-04	7,75E-04
Metabolisme dels àcids biliars	112	13	0,1161	5,93E-04	8,73E-04
<i>Unfolded protein response</i>	113	13	0,115	6,46E-04	9,23E-04
Senyalització IL6/JAK/STAT3	87	11	0,1264	7,47E-04	1,04E-03
Senyalització PI3K/AKT/MTOR	105	11	0,1048	3,45E-03	4,66E-03
Senyalització Wnt/beta-catenina	42	6	0,1429	6,44E-03	8,48E-03
Gens diana de MYC	200	16	0,08	7,40E-03	9,25E-03
Fosforil·lació oxidativa	200	16	0,08	7,40E-03	9,25E-03
Reparació de l'ADN	150	13	0,0867	7,90E-03	9,63E-03
Gens diana de MYC_2	58	7	0,1207	8,55E-03	1,00E-02
Via de senyalització de NOTCH	32	5	0,1562	8,61E-03	1,00E-02
Via de senyalització de TGF-beta	54	6	0,1111	2,11E-02	2,40E-02

Taula 9. Llistat de les funcions moleculars o *Hallmark terms* enriquides segons l'anàlisi per *GSEA overlap*. Anàlisi obtingut a partir de la llista de 2303 gens l'expressió dels quals es troba incrementada significativament en HTOXR3 a nivell basal respecte HT29

En la mateixa línia, altres estudis han reportat la sobreexpressió de tota una sèrie de gens implicats en el procés EMT en la línia HT29 resistent a oxaliplatí; com per exemple la citoquina TGF- $\beta$ 1 (*Transforming growth factor beta 1*) (281). El paper de TGF- $\beta$ 1 com a inductor del procés EMT en diversos models tumorals està àmpliament descrit (282, 283). En aquest sentit, el nostre estudi transcriptòmic va mostrar una sobreexpressió significativa de TGF- $\beta$ 1 (FC= 4,91 ;  $p < 0,0001$ ) en la línia HTOXAR3 en comparació al model HT29.

En conjunt, els resultats obtinguts en el present estudi suggereixen que l'exposició continuada a oxaliplatí ha contribuït a la selecció d'aquelles cèl·lules que presentaven una sobreactivació de NF- $\kappa$ B. Tanmateix, la sobreactivació d'aquest factor de transcripció ha contribuït a la transició epiteli-mesènquima en el model HTOXAR3 que alhora ha afavorit l'aparició del seu fenotip resistent a oxaliplatí. Aquesta hipòtesi es veu recolzada per l'estudi de Yang i col·laboradors en el que observaren que l'exposició continua d'oxaliplatí en la línia HT29 produïa canvis morfològics que confluien en l'aparició d'un fenotip mesenquimal que es correlacionava amb una disminució dels marcadors epitelials E-caderina i Pakoglobina així com en una marcada sobreexpressió nuclear de NF- $\kappa$ B. En una segona línia de CCR resistent a oxaliplatí, en canvi, van observar que l'exposició a oxaliplatí va produir una sobreexpressió de Vimentina i del factor de transcripció Snail però no de NF- $\kappa$ B nuclear (284) corroborant el paper cabdal de la via de NF- $\kappa$ B en l'adquisició del fenotip mesenquimal i l'aparició de resistència a oxaliplatí en el model cel·lular HTOXAR3. En línia amb aquest treball, Jiao i col·laboradors van reportar que el tractament amb l'oxaliplatí s'associava a l'aparició dels processos d'EMT i metàstasi mitjançant la producció de ROS i la consegüent activació de la cascada de senyalització de PI3k/Akt/Snail (285).

Els nostres resultats indiquen que l'oxaliplatí és capaç d'activar la via de senyalització de NF- $\kappa$ B en les línies HT29 i HTOXAR3, mitjançant la fosforilació de I $\kappa$ B $\alpha$  i p65, la translocació nuclear de p65 i l'expressió de gens diana específics, com Bcl-2 i Survivina. En concordança, altres estudis han demostrat que l'administració d'oxaliplatí en models cel·lulars de càncer de pròstata es correlaciona l'activació de NF- $\kappa$ B així com amb un increment en la transcripció i expressió de Bcl-2, Survivina i diverses quimiocines, com CXCL8 i CXCL1 (99). També, Liu i col·laboradors van observar que el tractament amb oxaliplatí promovia l'activació i translocació nuclear de p65 en la línia HT29 (173). Cal apuntar que una de les possibles limitacions d'aquest treball és que no hem utilitzat tècniques de valoració directa de l'increment de l'activitat transcripcional de NF- $\kappa$ B mesurant per exemple, la seva unió directa a l'ADN o l'activitat de transcripció del gen



luciferasa sota un promotor gènic amb seqüència d'unió a aquest factor de transcripció, sinó que dita activació s'ha avaluat de manera indirecta a través de la valoració de l'expressió o la fosforilació de certes proteïnes mitjançant la tècnica de western blot o la translocació nuclear de p65.

D'altra banda, cal destacar que malgrat que hem demostrat que l'oxaliplatí és capaç de fosforilar I $\kappa$ B $\alpha$  en els residus Ser32/36, no hem pogut observar una degradació significativa d'aquesta proteïna després de l'exposició a aquest agent platinat. Aquesta observació es troba en concordança amb altres estudis que han demostrat que malgrat que les cèl·lules HT29 poden activar una resposta inflamatòria depenent de NF- $\kappa$ B, no poden degradar la proteïna I $\kappa$ B $\alpha$  en resposta a estímuls activadors com TNF $\alpha$ , LPS o IL-1 $\beta$  però sí son capaces de translocar NF- $\kappa$ B al nucli i expressar gens diana específics d'aquest factor de transcripció com IL-8 (270). Jobin i Sartor plantejaren que aquesta incapacitat de les cèl·lules HT29 per degradar I $\kappa$ B $\alpha$  estaria relacionada amb una funció defectuosa de la via del proteasoma (286). Altres estudis, en canvi, relacionen aquest fenomen amb una baixa activació del complex de quinases IKK, responsable de la fosforilació de I $\kappa$ B $\alpha$  (287). D'altra banda, cal destacar també que diverses publicacions han demostrat que l'estrès oxidatiu produït pel tractament amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promou la translocació nuclear de p65 sense provocar la degradació d'I $\kappa$ B $\alpha$  per acció del proteasoma [Revisat a (288)].

Pel que fa a la Survivina, els nostres resultats demostren una sobreexpressió significativa d'aquesta proteïna després de l'exposició a oxaliplatí, especialment en el model sensible HT29. Contràriament, altres estudis han reportat una disminució dràstica dels nivells proteics de Survivina (però no dels nivells d'ARNm) en la línia de CCR RKO mitjançant la seva degradació via proteasoma després del tractament durant 24 hores amb oxaliplatí (289). Tenint en compte els resultats presentats en diversos treballs del grup de Jobin i Sartor (286, 290), l'increment de l'expressió de Survivina després de l'exposició a oxaliplatí reportada pels nostres resultats podria explicar-se d'una banda, per un augment en l'activació de NF- $\kappa$ B i d'altra banda per una funció defectuosa del proteasoma en la línia HT29 que no permetria la degradació d'aquesta proteïna. En aquest mateix context, Howells i col·laboradors van observar una davallada dels nivells de Survivina després del tractament amb oxaliplatí en la línia de CCR HCT116 que presenta p53 WT però no en canvi en la línia que no expressava p53. De fet, s'ha demostrat que la forma WT de p53 pot reprimir l'expressió de Survivina. Concretament, Mirza i col·laboradors van observar que l'expressió de la forma WT de p53,

però no la forma mutada, estava associada amb una forta repressió del promotor de la Survivina en diverses línies cel·lulars (291). La manca d'aquesta repressió en el promotor de la Survivina en la línia HT29 (p53 mutat) podria representar també una explicació plausible a l'augment d'aquesta proteïna després de l'exposició a oxaliplatí.

Els nostres resultats mostren que l'activació de la via de NF- $\kappa$ B és produïda molt ràpidament en els primers 15 minuts d'exposició a l'oxaliplatí tant en HT29 com en HTOXAR3 però aquesta activació es manté després de 24 hores de tractament només en la línia sensible HT29. L'activació de la via de NF- $\kappa$ B per efecte de l'exposició a oxaliplatí pot produir-se per la inducció d'estrès oxidatiu mitjançant la producció de ROS (269, 285) o bé per la inducció de dany genotòxic. El dany a l'ADN produït per l'oxaliplatí pot provocar la fosforilació i activació de la quinasa ATM, responsable del reconeixement dels trencaments de cadena dobles. ATM fosforila llavors la subunitat reguladora NEMO del complex de quinases IKK i i l'heterodímer p65/p50 pot translocar-se al nucli cel·lular (122, 123). En quant a les diferències observades entre la línia sensible HT29 i HTOXAR3 en relació a l'activació de NF- $\kappa$ B després de 24 hores d'exposició a oxaliplatí, podrien explicar-se degut a una major tolerància de les cèl·lules HTOXAR3 al dany a l'ADN ja que de l'estudi transcriptòmic hem pogut aïllar 29 gens relacionats amb la reparació de l'ADN i que estaven diferencialment expressats entre HT29 i HTOXAR3 dels quals, 17 es trobaven sobreexpressats en la línia resistent HTOXAR3. Quatre d'aquests gens estan relacionats amb la resposta al dany (i no directament amb la reparació d'aquest) i entre ells, *ATR*, *RAC1* i *CHK2* van mostrar una expressió decrementada en la línia resistent (Figura 63). Altres autors han observat que a igual concentració d'oxaliplatí es produeixen un major nombre de d'adductes intracatenaris en la línia sensible HT29 en comparació a la derivada resistent a oxaliplatí desenvolupada per aquests autors fet que de donar-se també en el nostre cas, podria explicar els resultats esmentats (281).

GeneBank Accesion nº	Nom del gen	Fold Change HTOXAR3 vs. HT29
<b>GENS DE REPARACIÓ DE L'ADN</b>		
<i>Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) enzymes</i>		
NM_001618	PARP1	1.28
NM_001003931	PARP3	1.25
<i>Repair of DNA-topoisomerase crosslinks</i>		
NM_018319	TDP1	1.79
<i>Mismatch excision repair (MMR)</i>		
NM_002439	MSH3	1.27
NM_014381	MLH3	1.41
NM_000534	PMS1	-1.78
<i>Nucleotide excision repair (NER)</i>		
NM_004344	CETN2	1.22
NM_005316	GTF2H1	-1.25
NM_001517	GTF2H4	1.61
NM_001799	CDK7	1.30
NM_002431	MNAT1	1.55
NM_005236	ERCC4	1.27
<i>Homologous Recombination</i>		
NM_003579	RAD54L	1.34
NM_012415	RAD54B	-1.21
NM_182625	GEN1	-1.23
<i>Fanconi Anemia</i>		
NM_022725	FANCF	-1.48
NM_004629	FANCG	1.24
<i>Non-homologous end-joining</i>		
NM_021141	XRCC5	-1.23
<i>Modulation of Nucleotide pools</i>		
NM_015713	RRMB2	-1.24
<i>DNA polymerases (catalytic subunits)</i>		
NM_002912	REV3L	-1.27
NM_006502	POLH	1.23
<i>Editing and procesing nucleases</i>		
NM_033629	TREX1	1.22
NM_003686	EXO1	1.27
<i>Ubiquitination and modification</i>		
NM_152617	RNF8	1.22
<i>Chromatin structure and modification</i>		
NM_002105	H2AFX	-1.22
<b>GENS DE RESPOSTA AL DANY A L'ADN</b>		
NM_001184	ATR	-1.20
NM_130384	ATRIP	1.26
NM_002853	RAD1	-1.26
NM_007194	CHEK2	-1.33

**Taula 10.** Llista de gens de reparació de l'ADN i de resposta al dany a l'ADN que es troben expressats de manera diferencial entre les cèl·lules HT29 i les cèl·lules HTOXAR3 ( $|FC| > 1.2$  i  $q\text{-value} < 0.05$ ). Es marquen en verd els gens de reparació de l'ADN sobreexpressats i els gens de resposta al dany a l'ADN infraexpressats en HTOXAR3 respecte HT29.

En conjunt, aquests resultats suggereixen que la línia HTOXAR3 s'ha adaptat a l'oxaliplatí disminuint la resposta i augmentant la reparació del dany a l'ADN causat pel mateix i com a conseqüència, produint una atenuació de l'activació de NF- $\kappa$ B.

En el present treball hem observat una disminució dràstica dels nivells proteics de Ciclina D1 després del tractament amb oxaliplatí durant 24 hores. La Ciclina D1 és un important regulador de la transició de la fase G1 a la fase S del cicle cel·lular (292). Durant la fase G1 del cicle cel·lular, la Ciclina D1 es sintetitza i s'acumula en el nucli cel·lular. Per contra, quan la cèl·lula entra en fase S aquesta proteïna és ràpidament degradada (293). Resultats previs del nostre i d'altres grups han demostrat que el tractament amb oxaliplatí durant 24 hores en les cèl·lules HT29 produeix una acumulació de cèl·lules en fase S (69, 240, 294) i d'altra banda, s'ha reportat que l'activació de la via de NF- $\kappa$ B per acció de la camptotecina (fàrmac que també provoca dany a l'ADN) es produeix predominantment durant la fase S del cicle cel·lular (295, 296). Per tant, l'efecte de l'oxaliplatí en la retenció de les cèl·lules HT29 en la fase S del cicle cel·lular, podria explicar la davallada en l'expressió proteica de Ciclina D1 observada després dels tractaments durant 24 hores.

Per últim, la ràpida activació de la via de NF- $\kappa$ B després de 15 minuts d'exposició a oxaliplatí probablement deguda a una resposta de supervivència per part de les cèl·lules, suggereix la possible implicació de determinats receptors de membrana cel·lular, com podria ser el receptor LT $\beta$ R de la família TNFR. Aquest receptor és capaç d'unir-se als factors TRAF (*TNF-receptor-associated factor*) 2, 3 i 5 i activar NF- $\kappa$ B principalment a través de la via no canònica però també de la canònica (297). Harradine i col·laboradors van demostrar que el silenciament gènic del receptor LT $\beta$ R es traduïa en un increment de la sensibilitat a oxaliplatí en un model cel·lular de CCR resistent a oxaliplatí (298). Resultats previs del nostre grup van reportar nivells transcripcionals baixos de *TRIP* (*TRAF interacting protein*), implicat en la inhibició de l'activació de NF- $\kappa$ B induïda per TRAF2 (299), en les línies resistents a oxaliplatí utilitzades en aquest treball en comparació a les seves respectives línies parentals sensibles (102). Una altra possibilitat són els TLRs (108) degut a que s'ha reportat la implicació d'algun d'ells, com el TLR5 (*Toll like receptor 5*), en la resposta al tractament amb oxaliplatí (300).

### **Reversió de la resistència adquirida a oxaliplatí mitjançant curcumina**

La implicació de NF- $\kappa$ B en el desenvolupament, progressió i resistència als tractaments dels tumors ha conduït a que en les darreres dècades s'hagin explorat noves estratègies terapèutiques consistents en la supressió de l'activitat d'aquest factor de transcripció. Malgrat que molts dels compostos estudiats han demostrat la seva eficàcia en models preclínic, la seva aplicabilitat clínica no ha estat ben establerta. De fet, actualment l'únic inhibidor farmacològic indirecte de NF- $\kappa$ B aprovat per a ús clínic és el Bortezomib, un inhibidor del

proteasoma. En relació als inhibidors del proteasoma, Németh i col·laboradors van demostrar que degut a la característica activació de la via de NF- $\kappa$ B en el model cel·lular HT29 (no degradació de I $\kappa$ B), l'ús d'aquests inhibidors en aquesta línia cel·lular no suposava una bona estratègia terapèutica, ja que no només no la inhibien sinó estimulaven l'activació de la via de NF- $\kappa$ B contrapasant-se així als resultats obtinguts en altres línies cel·lulars (301).

S'ha demostrat que l'ús d'inhibidors de NF- $\kappa$ B en combinació amb oxaliplatí potencia l'eficàcia d'aquest fàrmac a través de la inhibició de la proliferació cel·lular i l'activació de l'apoptosi en línies tumorals de diferent origen, entre elles HT29 (99, 173). Concretament, el silenciament gènic específic de la subunitat p65 mitjançant *siRNA* s'ha associat amb un augment de la sensibilitat a oxaliplatí en diferents línies de CCR (176, 177).

En el present treball es va escollir la curcumina donada l'evidència que demostra que pot inhibir de forma efectiva la via de senyalització de NF- $\kappa$ B (205, 302, 303). Els resultats presentats, corroboren que la curcumina suprimeix l'activació de NF- $\kappa$ B induïda per l'oxaliplatí a través de la supressió parcial de la fosforilació de p65 i I $\kappa$ B $\alpha$  i de l'expressió de les proteïnes Bcl-2, Survivina i Ciclina D1. Tal i com han reportat altres treballs (304), hem demostrat que el tractament amb curcumina inhibeix la proliferació cel·lular en totes les línies de CCR analitzades. També en línia amb altres estudis (209, 305-307), els nostres resultats han determinat que el tractament concomitant de curcumina i oxaliplatí durant 24 hores es tradueix en una supressió significativa de la proliferació cel·lular i de la capacitat de formació de colònies de totes les línies estudiades en comparació amb els tractaments individuals amb cada fàrmac. A més a més, hem observat com l'efecte de la combinació sobre la proliferació cel·lular ha resultat ser més evident en els models resistents HTOXAR3 i LoVOXAR3 en comparació a les línies HT29 i LoVo. Aquesta observació es troba en consonància amb els resultats d'altres autors que reportaren un major efecte de la combinació d'oxaliplatí i curcumina en cèl·lules HCT116 resistents a oxaliplatí en comparació a cèl·lules sensibles a aquest fàrmac (209). Els nostres resultats també indiquen que el tractament combinat és més sinèrgic en la línia HTOXAR3 en comparació a HT29 i de fet, aquesta combinació ha permès una reversió del 65% en la resistència a l'oxaliplatí en la línia HTOXAR3. En el cas de la parella LoVo/LoVOXAR3, malgrat obtenir una reversió de la resistència a oxaliplatí del 40% amb l'esquema de tractament utilitzat no hem pogut observar sinèrgisme entre els dos fàrmacs. Aquestes diferències entre ambdós models podrien explicar-se per diferents motius; per una banda, cal tenir en compte que les diferències genotípiques entre les línies cel·lulars HT29 i

LoVo (308) podrien influir en la sensibilitat al tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina. A més a més, és important tenir present que la sobreactivació de la via de NF- $\kappa$ B va resultar ser més evident en el model HTOXAR3 que en la línia LoVOXAR3 fet que podria explicar que les cèl·lules HTOXAR3 fossin més dependents de l'estimulació d'aquesta via de senyalització i per tant més sensibles a la seva inhibició. En qualsevol cas, queda palès que el tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina utilitzant un esquema concomitant durant 24 hores no seria adequat en termes de sinergisme en el model resistent LoVOXAR3 i que per tant, seria necessari identificar quin és l'esquema de tractament més sinèrgic en aquesta línia cel·lular.

Els nostres resultats mostren que el tractament amb oxaliplatí com a agent únic durant 24 hores no s'associa amb un increment en la mort cel·lular en les línies HT29 i HTOXAR3. Aquest fet ha estat descrit prèviament per altres autors i per nosaltres mateixos (69, 93, 240) i suggereix que després de 24 hores de tractament, l'oxaliplatí inhibeix la proliferació cel·lular sense provocar mort cel·lular i que no és fins a les 72 hores post-tractament quan s'observen taxes de mort significatives almenys en els models estudiats. S'ha suggerit que aquesta baixa activació de la mort cel·lular en resposta a oxaliplatí podria explicar-se per la presència d'una mutació en el gen supressor tumoral *TP53* en la línia HT29 (96, 98). Pel que fa al tractament amb curcumina, malgrat la ben establerta capacitat d'aquest compost d'induir la mort cel·lular per apoptosi (214), tampoc hem pogut observar taxes de mort significatives en cap dels temps d'exposició estudiats. Malgrat que alguns autors han reportat que l'activació de la mort cel·lular per part de la curcumina és un procés independent de l'estat mutacional de p53 (309), els nostres resultats suggereixen que la presència de la forma mutada de p53 en el model HT29 estaria influïnt negativament en l'activació de la mort cel·lular per part de la curcumina. A més a més, aquests resultats corroboren els de l'estudi de Hanif i col·laboradors en el que van observar que la curcumina no induïa l'apoptosi en cèl·lules HT29 (304). Finalment, el tractament concomitant durant 24 hores tampoc ha mostrat taxes de mort cel·lular significatives en comparació amb els tractaments individuals, suggerint que la curcumina contribueix a l'acció antiproliferativa de l'oxaliplatí en les condicions i les línies cel·lulars estudiades en aquest treball.

**Paper de les quimiocines CXCL1 i CXCL8 en la resistència a oxaliplatí i en la sensibilitat i sinergisme del tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina**

Tenint en compte que NF- $\kappa$ B és un factor de transcripció, vam hipotetitzar que les línies resistents presentarien patrons d'expressió diferents com a conseqüència del guany en l'activitat del mateix i que en aquesta expressió diferencial podríem trobar gens responsables del major efecte de la combinació d'oxaliplatí i curcumina observat en la línia resistent. Així, entre tots els gens aïllats a partir d'un estudi de *microarrays* d'expressió hem demostrat la sobreexpressió de tres quimiocines de la família CXC, *CXCL8* (IL-8), *CXCL1* (Gro- $\alpha$ ) i *CXCL2* (Gro- $\beta$ ) en el model HTOXAR3, l'expressió de les quals disminueix després del tractament amb oxaliplatí i curcumina de manera significativa en la línia HTOXAR3 però no en HT29. També hem observat la sobreexpressió del seu receptor CXCR2 a nivell de proteïna en la línia HTOXAR3. En sintonia amb aquestes dades, l'anàlisi d'enriquiment funcional de la llista de gens l'expressió dels quals es troba incrementada a nivell basal però disminuïda pel tractament combinat en la línia resistent HTOXAR3 posa de manifest que la via de senyalització dels receptors de quimiocines CXCR és una de les funcions moleculars significativament sobrerepresentades en aquesta condició, el que suggereix que les 3 quimiocines podrien tenir un paper important tant en l'adquisició de resistència com en el sinergisme entre l'oxaliplatí i la curcumina en les cèl·lules HTOXAR3. Malauradament, al no poder validar-se per qPCR els resultats obtinguts per CXCL2, es va descartar el seu estudi i es va continuar amb l'anàlisi de CXCL1 i CXCL8. El fet que el silenciament gènic d'ambdues quimiocines es tradueixi en un augment en la sensibilitat a oxaliplatí en HTOXAR3, demostra que la seva funció és important en la resposta a aquest fàrmac.

La transcripció gènica d'aquestes tres quimiocines es troba principalment regulada per NF- $\kappa$ B i intervenen no només en la quimiotaxi dels neutròfils (acció protumoral) i en la resposta inflammatòria sinó també en la regulació de la progressió, angiogènesi, migració, invasió, metàstasi i quimioresistència del CCR. Aquestes quimiocines poden ser secretades pels propis leucòcits i també per cèl·lules epitelials, endotelials, fibroblasts i cèl·lules tumorals ja sigui en resposta a un estímul inflamatori o de forma constitutiva [Revisat a (274)]. La CXCL8, és una de les quimiocines més estudiades en CCR i la seva sobreexpressió s'ha associat amb un increment en la resistència a oxaliplatí i 5-FU i també a una major capacitat en la proliferació cel·lular, l'angiogènesi, la migració i la metàstasi de cèl·lules de CCR resistents a oxaliplatí (272, 310). En un treball del grup del Dr. Joan Massagué es va demostrar que la sobreexpressió de *CXCL1* i *CXCL2* en tumors de mama s'associava no només a un augment en la resistència al tractament sinó també a un cert avantatge de les cèl·lules tumorals per a sobreviure en llocs metastàtics (311). Per tant, els nostres resultats suggereixen, com altres ja ho han fet prèviament (312), que existeix un nexa d'unió entre dos dels principals obstacles en el

tractament del CCR: la quimioresistència i el desenvolupament o promoció de la metastasi. Tot i que els nostres experiments han estat realitzats *in vitro*, els resultats indiquen que el tractament continuat amb oxaliplatí ha contribuït a l'aparició de canvis a nivell molecular que a més d'afavorir la quimioresistència, també estarien associats a un fenotip més metastàtic mitjançant la selecció d'aquelles clones cel·lulars que sobreexpressen aquestes quimiocines. Aquesta hipòtesi però, s'hauria de validar en un model *in vivo*.

L'efecte de la quimioteràpia en l'augment de l'expressió de *CXCL8*, *CXCL1* i *CXCL2* ha estat descrit prèviament (99, 311, 313, 314). En aquest treball, també hem demostrat que l'oxaliplatí indueix una forta sobreexpressió de *CXCL1* i *CXCL8* a nivell gènic i proteic únicament en la línia HT29 i no en HTOXAR3 el que s'explicaria pel fet que NF- $\kappa$ B és capaç d'activar-se després de 24 hores de tractament només en la línia sensible. D'altra banda, la curcumina presenta l'efecte contrari i tot i que també és capaç de disminuir els nivells d'aquestes quimiocines en HT29, l'efecte va ser significativament més evident en el model resistent a oxaliplatí. Els nostres resultats estan d'acord amb els d'altres investigadors que han demostrat la capacitat de la curcumina d'inhibir l'expressió d'aquestes quimiocines en diferents models cel·lulars (207, 208, 233). Pel que fa al tractament combinat, és interessant destacar que l'expressió de *CXCL8* i *CXCL1* és atenuada pel tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina únicament en el model resistent HTOXAR3 probablement degut al fet que en aquesta línia l'oxaliplatí no exerceix un efecte estimulador de l'expressió d'aquestes quimiocines i per tant la curcumina pot disminuir-ne la seva expressió de manera més efectiva que en la línia HT29 en la que es produiria un efecte compensatori. En resum, aquests resultats suggereixen la implicació d'aquestes dues quimiocines no només en l'adquisició de resistència a oxaliplatí sinó també en el sinergisme entre aquest i la curcumina observat en la línia HTOXAR3.

Un cop sintetitzades, les quimiocines *CXCL1* i *CXCL8* són secretades per les cèl·lules tumorals promovent un cercle de retroalimentació positiva i també actuant paracrinament sobre altres cèl·lules del microambient tumoral, com els fibroblasts, a través de la unió als receptors de membrana CXCR1 en el cas de *CXCL8* i CXCR2 en el cas de *CXCL8* i *CXCL1*. La senyalització a través d'aquests receptors culminarà en l'activació de la via de senyalització de NF- $\kappa$ B i en més expressió de *CXCL1*, *CXCL8* i dels seus receptors (99). Els nostres resultats mostren que la silenciament gènica de *CXCL1* o *CXCL8* es tradueix en una disminució de la fosforilació de I $\kappa$ B $\alpha$  així com un decrement dels nivells proteics de Bcl-2 i Survivina fet que indica que efectivament, existeix un efecte autocrí en aquestes cèl·lules. A més, en aquestes condicions també hem observat una disminució dels nivells de fosforilació de la quinasa Akt el que



suggereix que almenys en part, la sobreactivació de la via de NF- $\kappa$ B observada en la línia resistent a oxaliplatí HTOXAR3 podria explicar-se per un augment de l'activació de la quinasa Akt per acció de les quimiocines CXCL1 i CXCL8 (Figura 69). Aquesta hipòtesi es veu recolçada pel fet que la sobreexpressió de CXCL8 promou la fosforilació d'Akt així com la consegüent activació de NF- $\kappa$ B en una altra línia de CCR (272) i per resultats similars en línies de càncer d'ovari estimulades amb TNF $\alpha$  (315). Finalment, la inhibició del receptor CXCR2 resulta en una major disminució de la proliferació cel·lular en el model resistent HTOXAR3 en comparació a HT29, suggerint de nou la importància de la via de senyalització CXCR2/NF- $\kappa$ B en el manteniment de la proliferació d'aquesta línia cel·lular.

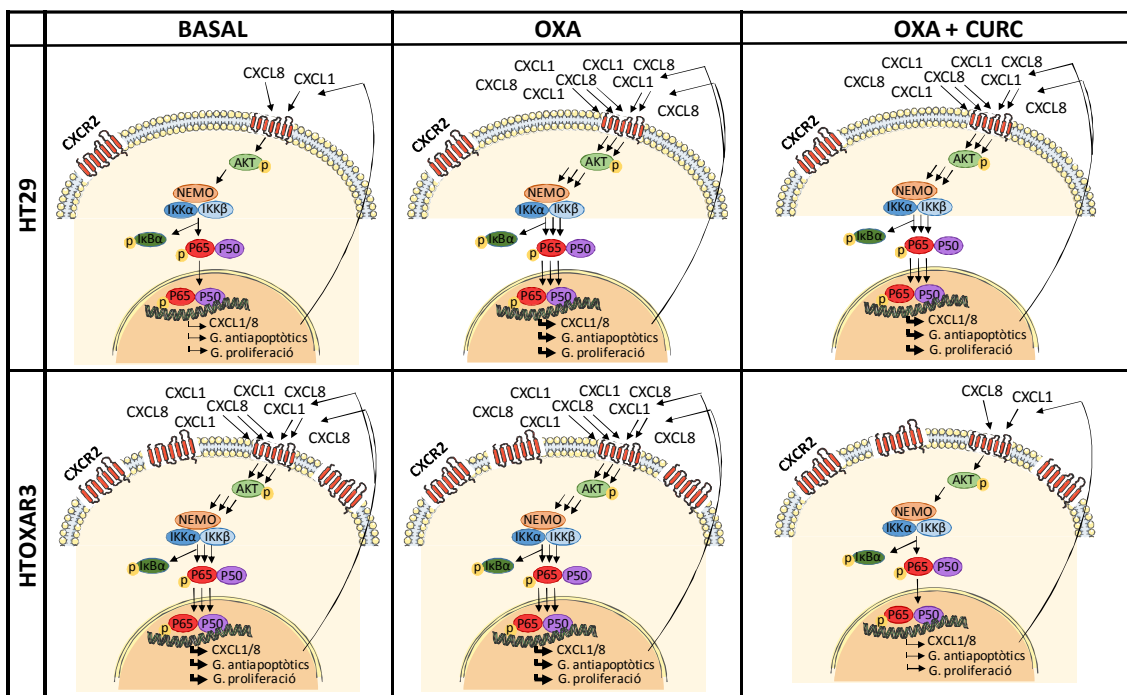


Figura 69. Esquema representatiu de la possible acció del tractament amb oxaliplatí o oxaliplatí més curcumina sobre l'expressió de les quimiocines CXCL1, CXCL2 i CXCL8 i l'activació de la via de senyalització de NF- $\kappa$ B a través del receptor CXCR2 en les línies HT29 i HTOXAR3.

Davant la impossibilitat de trobar mostres de pacients tractats amb curcumina, la validació dels resultats obtinguts *in vitro* es va realitzar en 8 explants de metàstasis hepàtiques de pacients de CCR que es van tractar *ex vivo* amb diferents esquemes de tractament basats en l'oxaliplatí i la curcumina. Així, hem pogut constatar que, igual que succeïa *in vitro*, l'exposició a oxaliplatí incrementa l'expressió de CXCL1 en 6 dels 8 explants analitzats i l'addició de curcumina reprimeix aquesta sobreexpressió en 5 d'aquests 6 explants. A més, és interessant destacar que els explants amb una millor "resposta" al tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina mostren una major expressió de CXCL1 tant a nivell basal com després del

tractament amb oxaliplatí. Aquests resultats suggereixen la possibilitat d'utilitzar la mesura dels nivells de *CXCL1* com a marcador predictiu de resposta al tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina, fet que ja s'ha demostrat efectiu en termes de pronòstic (316).

En conjunt, els nostres resultats indiquen que en el procés d'adquisició de resistència a oxaliplatí, la pressió selectiva del fàrmac fa que aquelles cèl·lules amb una major activitat de NF- $\kappa$ B sobrevisquin davant la resta, augmentant aquesta població i per tant, la secreció de CXCL1 i 8 que alhora estimularan altres cèl·lules, fet que comporta més activació de la via i més quimioresistència, probablement a través de l'activació d'Akt. A més, el cultiu passa a ser més dependent de l'estimulació d'aquesta senyalització i per tant, més vulnerable a la seva inhibició, el que es demostra pel fet que la curcumina, com a inhibidor de NF- $\kappa$ B, restableix la sensibilitat a oxaliplatí i quan es combina amb aquest, el tractament és més efectiu en les cèl·lules resistents.

#### **Altres vies moleculars associades a la major sensibilitat i sinergisme del tractament concomitant d'oxaliplatí i curcumina en HTOXAR3:**

A banda de la via de quimiocines, l'estudi de *microarrays* va identificar dues funcions moleculars addicionals que es trobaven enriquides en quant a nombre de gens amb expressió alterada en la llista de 194 gens sobreexpressats a nivell basal en la línia HTOXAR3 i l'expressió dels quals disminuïa pel tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina de manera significativa en aquesta línia respecte a HT29. Aquestes funcions són: l'activitat dels enzims citidina i deoxicitidina deaminasa i la via d'activació de la quinasa JUN (JNK) (Figura 51) el possible paper de les quals es discuteix a continuació.

##### **a) Activitat citidina i deoxicitidina deaminasa**

Entre els gens amb funció citidina deaminasa augmentats a nivell basal i decrementats pel tractament amb oxaliplatí i curcumina significativament en HTOXAR3 respecte a HT29, destaquen: la citidina deaminasa (*CDA*), *APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *APOBEC3F* i *APOBEC3G* (Taula 11):

GeneBank Accesion nº	Nom del gen	Descripció	Fold Change OXA+CURC / Basal
NM_001785	CDA	Cytidine deaminase	-1,70 / 1,71
NM_004900	APOBEC3B	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B	-1,73 / 2,05
NM_014508	APOBEC3C	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3C	-2,37 / 16,97
NM_001006666	APOBEC3F	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F	-1,74 / 4,83
NM_021822	APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G	-2,07 / 3,97

**Taula 11.** Gens amb funció citidina deaminasa augmentats a nivell basal i disminuïts pel tractament amb oxaliplatí i curcumina significativament en HTOXAR3 respecte a HT29

La CDA és un enzim que catalitza la deaminació hidrolítica irreversible d'una citidina o desoxicitidina a una uridina o desoxiuridina, respectivament. Malgrat que no existeixen evidències prèvies sobre el paper de la CDA en la resistència a oxaliplatí alguns estudis han demostrat que la sobreexpressió de CDA contribueix a la resistència a la gemcitabina en diferents tumors (317, 318). La gemcitabina és un fàrmac que pertany al grup dels anàlegs de nucleòsids i que s'utilitza com agent quimioterapèutic en el tractament dels tumors de pulmó de cèl·lula no petita, pàncrees, ovari i mama metastàtic. Més del 90% de la gemcitabina és metabolitzada i inactivada per la CDA fet que evita l'acumulació intracel·lular del seu principi actiu. A banda de la gemcitabina, una expressió elevada de CDA també s'ha relacionat amb una disminució de la sensibilitat a l'arabinosid citosina (Ara-c), fàrmac utilitzat en el tractament de leucèmies i limfomes (318, 319).

La família d'enzims APOBEC3 (*AID/apolipoprotein B mRNA editing complex catalytic polypeptide 3*) consta de set proteïnes que han demostrat la capacitat de provocar el canvi d'una base de citosina per una d'uracil en les mol·lecules d'ADN de cadena simple, considerant-se APOBEC3B com un dels majors inductors de mutacions en tumors [Revisat a (320)]. S'ha reportat la implicació de la via canònica i no canònica de NF-κB en la regulació de l'expressió d'aquest gen (321, 322) i també que els membres de la família APOBEC3 juguen un paper dual en la promoció de la supervivència de les cèl·lules *in vivo* ja que per una banda incrementen la taxa de reparació dels trencaments dobles de la cadena de l'ADN després del tractament amb agents genotòxics i d'altra banda, promouen un fenotip mutador que condueix a la progressió tumoral (323). Com a hipòtesi, la sobreexpressió d'aquestes proteïnes en la línia HTOXAR3 promouria un augment de la reparació del dany a l'ADN, una menor inducció de la mort cel·lular i per tant un augment de la resistència a l'oxaliplatí. El fet que el

tractament amb curcumina sigui més efectiu quan aquests enzims estan elevats i el perquè queda per demostrar.

La proteïna AID (*Activation-induced cytidine deaminase*) pertany a la família de desaminases APOBEC, es troba sobreexpressada en limfòcits B (324) i participa en els processos EMT. Diversos estímuls inflamatoris com la interleuquina 4 (IL-4), TNF $\alpha$  i TGF- $\beta$  (325) promouen la seva expressió, la qual s'ha descrit en diferents teixits epitelials sotmesos a ambients d'inflamació crònica com és el cas de la colitis ulcerosa. De fet, l'AID participa en el desenvolupament del càncer colorectal associat a colitis (326) i en càncer de mama, també s'ha observat l'activació d'EMT per part de la proteïna AID (327). Aquestes evidències, podrien suggerir que un augment de l'activació de l'enzim AID per acció de citoquines proinflamatòries es tradueix en la promoció d'EMT i com a conseqüència en un increment de la resistència a oxaliplatí en la línia HTOXAR3.

En conjunt, els nostres resultats obren la porta a futurs estudis per tal d'analitzar la relació entre la sobreexpressió d'aquests enzims amb activitat deaminasa i el procés d'adquisició de resistència a oxaliplatí. A més a més, suggereixen la possibilitat d'inhibir aquests enzims com a mecanisme de reversió de la resistència a oxaliplatí.

### b) Via d'activació de la quinasa JNK

En relació a la via d'activació de la quinasa JNK destaca l'augment en l'expressió dels gens MAP3K1 (MEKK1) i MAP3K10 (MLK2) a nivell basal i el seu decrement després del tractament combinat en la línia HTOXAR3 (Taula 12).

GeneBank Accesion nº	Nom del gen	Descripció	Fold Change OXA+CURC / Basal
NM_002446	MAP3K10	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 10	-1,35/ 1,34
NM_005921	MAP3K1	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 1	-1,28/1,98

**Taula 12.** Gens activadors de la quinasa JNK augmentats a nivell basal i disminuïts pel tractament amb oxaliplatí i curcumina significativament en HTOXAR3 respecte a HT29

La família de quinases JNK, està formada per tres membres, JNK1, 2 i 3 (codificades pels gens MAPK8, 9 i 10, respectivament). Aquestes quinases, són les responsables de la fosforilació de la proteïna c-Jun, un dels components principals del factor de transcripció AP-1 (*Activator protein-1*) que és responsable de la transcripció de gens implicats en proliferació cel·lular,

diferenciació i apoptosi [Revisat a (328)]. La via de JNK s'activa en resposta a estímuls, com factors de creixement, citoquines proinflamàtòries (com  $TNF\alpha$ ), xoc osmòtic o tèrmic, radiació UV i lesions isquèmiques, anòxia o hipòxia. Les quinases MKK4 i MKK7 són les encarregades d'activar JNK mitjançant la seva fosforilació en els residus de Thr183 y Tyr185 [Revisat a (329)]. Per la seva banda, MKK4 i MKK7 són activades per quinases activadores denominades MEKKs o MAP3Ks (MAP quinasa quinasa quinasa). Així, mentre que MKK7 s'activa per estímuls com  $TNF\alpha$  o IL-1, MKK4 s'activa preferentment per estrès genotòxic [Revisat a (329)]. Una de les principals MAP3K responsable de l'activació de MKK4 i MKK7 en resposta a estímuls inflamatoris o estrès oxidatiu és MEKK1 (330-333). És interessant destacar que MEKK1 també fosforila el complex de quinases IKK activant la via de senyalització de NF- $\kappa$ B (334, 335). Dins de la família MAP3Ks també trobem les quinases MLKs. Concretament, MLK2 fosforila i activa tant MKK4 com MKK7 (330).

Depenent del model cel·lular així com de l'estímul i de la seva intensitat i durada, l'activació de la quinasa JNK pot donar lloc a diferents respostes cel·lulars, des de la inducció de l'apoptosi fins a un augment de la supervivència i l'alteració de la proliferació cel·lular [Revisat a (336)].

D'altra banda, el factor de transcripció NF- $\kappa$ B pot unir-se a les subunitats c-Fos i c-Jun d'AP-1 i actuar de manera sinèrgica en la transcripció de gens proinflamatoris, pro- i antiapoptòtics, reguladors del cicle cel·lular i diversos enzims [Revisat a (103)]. Alhora, NF- $\kappa$ B també regula l'activació d'AP-1 mitjançant la transcripció de membres de la família AP-1 (337) i l'activació de la quinasa JNK mitjançant l'estímul amb citoquines inflamàtòries indueix la translocació nuclear de NF- $\kappa$ B (338).

Una possibilitat és que degut a l'acció autocrina de diverses citoquines inflamàtòries com  $TNF\alpha$ , NF- $\kappa$ B i AP-1 estarien hiperactivats, almenys en part per la sobreexpressió de la quinasa MEKK1, en la línia resistent HTOXAR3 i actuarien de manera conjunta en la transcripció de gens proliferatius i antiapoptòtics que estimularien la resistència a l'oxaliplatí (Figura 70).

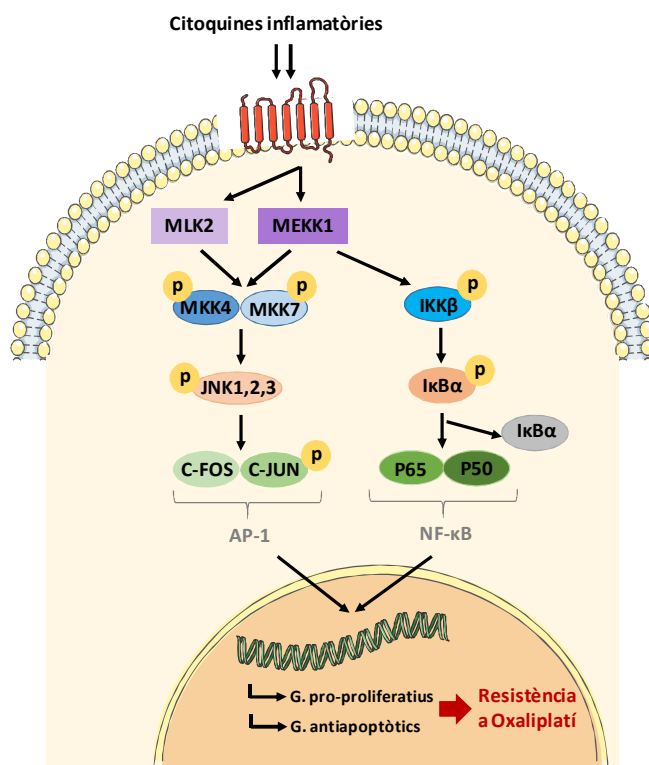


Figura 70. Esquema representatiu de la possible activació de NF-κB i AP-1 a través de l'estimulació autocrina amb citoquines inflammatòries i que desemboca en l'acció conjunta d'ambdós factors de transcripció en l'expressió de gens antiapoptòtics i proliferatius que contribuiran a la resistència a l'oxaliplatí.

L'activació constitutiva de JNK s'ha descrit en línies de CCR, entre elles HT29 (339), suggerint el paper clau d'aquesta quinasa en la supervivència d'aquestes cèl·lules. Cal destacar que els efectes terapèutics d'inhibir JNK són oposats depenent del tipus de tumor. Així, la inhibició d'aquesta quinasa en models de càncer de colon es tradueix en una reducció de la mida tumoral (340) i en canvi, en tumors de mama o fetge la deficiència de JNK es correlaciona amb un increment de la formació tumoral (341, 342). Alguns estímuls inductors de la fosforilació de JNK i c-Jun en CCR son l'oxaliplatí i també la hipòxia (65, 343).

La inhibició de l'activitat quinasa de MKK4 i MKK7, produeix efectes diferents en la sensibilitat a oxaliplatí: en el cas de MKK4 resulta en un augment de la sensibilitat a oxaliplatí mentre que en el cas de MKK7 el resultat és un augment de la resistència a oxaliplatí en la línia HT29 tant a nivell *in vivo* com *in vitro* (344). A més a més, la inhibició farmacològica de JNK1, sensibilitza les cèl·lules de CCR al tractament amb oxaliplatí tant a nivell *in vitro* com *in vivo* (339) fet que estaria relacionat amb una disminució de l'autofàgia (345). Paral·lelament, sembla que la curcumina és capaç d'inhibir l'activació de JNK (346) i AP-1 [Revisat a (182)].

D'aquesta manera, el procés d'adquisició de resistència a oxaliplatí estaria associat a una senyalització augmentada a través de JNK que es veuria atenuada pel tractament amb oxaliplatí i curcumina produint una reducció en els nivells d'expressió de MEKK1 i MLK2 que alhora es traduiria en una supressió de l'activació de NF- $\kappa$ B i AP-1 i finalment en un major efecte i sinergisme d'aquest tractament en la línia resistent HTOXAR3 i per tant, la combinació d'inhibidors de la via MEKK1-JNK amb oxaliplatí podria resultar beneficiosa en el tractament de determinats casos de CCR.

### **Aplicabilitat clínica dels resultats obtinguts**

El conjunt dels resultats presentats en aquest treball de tesi suggereixen que l'addició de curcumina al tractament amb oxaliplatí es tradueix en una sensibilització de les cèl·lules de CCR al tractament amb aquest platí essent aquest efecte més sinèrgic en cèl·lules resistents a aquest fàrmac. A més a més, aquests resultats ens permeten suggerir que l'ús de concentracions subòptimes d'oxaliplatí en combinació amb curcumina ens permetria obtenir una eficàcia similar al tractament individual amb dosis elevades d'oxaliplatí però amb una considerable reducció de la toxicitat induïda per aquest. En referència a la toxicitat del tractament amb oxaliplatí cal destacar també que s'ha demostrat que la curcumina és capaç de reduir els efectes neurotòxics produïts pel tractament amb aquest agent platinat (255).

Tal i com s'ha explicat a la introducció, l'oxaliplatí s'administra en la pràctica clínica en combinació amb 5-FU (FOLFOX) tant en el tractament de la malaltia avançada com en adjuvència. Els nostres resultats preliminars no mostrats en aquest treball indiquen que la combinació de curcumina amb FOLFOX presenta un major efecte sobre la inhibició de la proliferació cel·lular que el tractament individual amb aquest doblet de quimioteràpia, observació que es troba en concordança amb altres treballs (200) i que suggereix la possibilitat d'introduir la curcumina en aquest esquema de tractament.

En vista dels nostres resultats podem suggerir també, que la combinació d'inhibidors del receptor de quimiocines CXCR2 amb oxaliplatí podria ser sinèrgica i resultar en una reversió de la resistència a aquest agent platinat. De fet, s'ha demostrat que l'ús de l'antagonista de CXCR2 SCH-527123, es tradueix en un augment de la sensibilitat a oxaliplatí en models preclínic de CCR (347).

Aquests resultats representen un bon punt de partida per a la realització d'estudis *in vivo* per tal de validar els nostres resultats i suposen una base sòlida per al plantejament de diversos assajos clínics on es valori l'eficàcia del tractament combinat tant en pacients amb CCRa que han progressat a una primera línia de tractament amb oxaliplatí com en adjuvència en aquells pacients que han estat operats del tumor primari. Cal tenir en compte, però, que aquells pacients que han experimentat toxicitat a l'oxaliplatí en primera línia, no serien bons candidats per a rebre la combinació d'oxaliplatí i curcumina en segona línia de tractament ja que s'incrementaria la toxicitat produïda per l'oxaliplatí comprometent la supervivència dels pacients. Val a dir que actualment, els nostres col·laboradors de Leicester estan realitzant un estudi clínic de fase II en el que es compara l'eficàcia del tractament combinat FOLFOX + Curcumina C3 oral respecte al tractament amb FOLFOX en pacients amb CCRa que no poden ser operats de les metàstasis (256)(NCT01490996; [www.ClinicalTrials.gov](http://www.ClinicalTrials.gov)).



---

## 6. CONCLUSIONS

1. L'adquisició de resistència a oxaliplatí en els nostres models cel·lulars s'associa a un increment en la senyalització a través del factor de transcripció NF- $\kappa$ B, de manera especialment destacable en el model HTOXAR3.
2. Mentre que l'oxaliplatí exerceix una resposta de supervivència a través de NF- $\kappa$ B després d'un tractament curt tant en HT29 com en HTOXAR3, la línia resistent sembla haver superat el llindar d'activació a temps perllongats d'exposició.
3. La curcumina inhibeix la proliferació cel·lular de manera dosi-dependent en totes les línies cel·lulars de CCR estudiades.
4. La combinació de curcumina i oxaliplatí resulta sinèrgica en funció de l'esquema de tractament i la línia cel·lular emprada. El tractament concomitant d'oxaliplatí i curcumina durant 24 hores és sinèrgic en la línia HT29 però no en la línia LoVo. D'altra banda, la sinèrgia d'ambdós compostos és major en les línies resistents HTOXAR3 i LoVOXAR3 respecte les seves línies parentals sensibles, arribant a revertir la resistència a oxaliplatí.
5. L'addició de curcumina al tractament amb oxaliplatí durant 24 hores potencia l'acció antiproliferativa de l'oxaliplatí però no contribueix a un augment de la mort cel·lular.
6. Els efectes terapèutics de la curcumina com a agent únic o en combinació amb oxaliplatí en les línies HT29 i HTOXAR3 estan produïts, almenys en part, per la inhibició de la via de senyalització de NF- $\kappa$ B.
7. L'adquisició de resistència a oxaliplatí en HTOXAR3 promou canvis profunds en l'expressió gènica. Alhora, l'expressió d'alguns d'aquests gens es veu afectada de forma diferent entre la línia sensible i la resistent després del tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina. Aquest conjunt de gens estaria associat al fet que el tractament combinat sigui més efectiu en la línia cel·lular resistent.
8. La modulació de l'expressió de les quimiocines CXCL1 i CXCL8 a través del factor de transcripció NF- $\kappa$ B i probablement d'Akt, estaria implicada en la resposta a oxaliplatí i a curcumina, en l'adquisició de resistència a oxaliplatí i en l'efecte sinèrgic d'ambdós compostos, especialment en la línia HTOXAR3.

**9.** La línia HTOXAR3 resulta més sensible al bloqueig de la senyalització de CXCL1 i CXCL8 a través del receptor CXCR2 mitjançant inhibidors específics del mateix, el que suggereix que de la mateixa manera que amb la curcumina, la combinació d'aquests inhibidors amb oxaliplatí podria ser sinèrgica i resultar en una reversió de la resistència a aquest fàrmac.

**10.** Els resultats *in vitro*, juntament amb els obtinguts a partir dels explants de metàstasis hepàtiques de pacients de càncer colorectal avançat suggereixen que, els tumors colorectals que presenten una elevada activitat de NF- $\kappa$ B juntament amb nivells alts de CXCL1 (i probablement de CXCL8), serien susceptibles de rebre tractament combinat d'oxaliplatí i curcumina. A més a més, la valoració de CXCL1 en sèrum de pacients podria servir com a marcador predictiu de bona resposta al tractament combinat.

## **7. BIBLIOGRAFIA**

---

1. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet* 2014 Apr 26;383(9927):1490-502.
2. Power DG, Glogowski E, Lipkin SM. Clinical genetics of hereditary colorectal cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2010 Oct;24(5):837-59.
3. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003 Mar 6;348(10):919-32.
4. Terzic J, Grivnickov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 2010 Jun;138(6):2101-14 e5.
5. Perea J, Lomas M, Hidalgo M. Molecular basis of colorectal cancer: towards an individualized management? *Rev Esp Enferm Dig* Jan;103(1):29-35.
6. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990 Jun 1;61(5):759-67.
7. Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997 Apr 24;386(6627):761, 3.
8. Michor F, Iwasa Y, Rajagopalan H, Lengauer C, Nowak MA. Linear model of colon cancer initiation. *Cell Cycle* 2004 Mar;3(3):358-62.
9. Henderson BR. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol* 2000 Sep;2(9):653-60.
10. He TC, Sparks AB, Rago C, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998 Sep 4;281(5382):1509-12.
11. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999 Apr 1;398(6726):422-6.
12. Horst D, Chen J, Morikawa T, Ogino S, Kirchner T, Shivdasani RA. Differential WNT activity in colorectal cancer confers limited tumorigenic potential and is regulated by MAPK signaling. *Cancer Res* 2012 Mar 15;72(6):1547-56.
13. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 2010 Jun;138(6):2059-72.
14. Mohammed AA, El-Tanni H, El-Khatib HM, Mirza AA, El-Kashif AT. Molecular classification of colorectal cancer: Current perspectives and controversies. *J Egypt Natl Canc Inst* 2016 Jan 2.
15. Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2012 Mar 15;18(6):1506-12.
16. Wu C, Bekaii-Saab T. CpG Island Methylation, Microsatellite Instability, and BRAF Mutations and Their Clinical Application in the Treatment of Colon Cancer. *Chemother Res Pract* 2012;2012:359041.
17. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* 2015 Nov;21(11):1350-6.

18. Astler VB, Collier FA. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954 Jun;139(6):846-52.
19. Obrocea FL, Sajin M, Marinescu EC, Stoica D. Colorectal cancer and the 7th revision of the TNM staging system: review of changes and suggestions for uniform pathologic reporting. *Rom J Morphol Embryol* 2010;52(2):537-44.
20. Adam R. Chemotherapy and surgery: new perspectives on the treatment of unresectable liver metastases. *Ann Oncol* 2003;14 Suppl 2:ii13-6.
21. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, et al. Colorectal cancer. *Lancet* 2010 Mar 20;375(9719):1030-47.
22. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003 May;3(5):330-8.
23. Kawato Y, Aonuma M, Hirota Y, Kuga H, Sato K. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res* 1991 Aug 15;51(16):4187-91.
24. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007 Aug;7(8):573-84.
25. Saltz LB, Cox JV, Blanke C, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 2000 Sep 28;343(13):905-14.
26. de Gramont A, Figer A, Seymour M, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000 Aug;18(16):2938-47.
27. Tournigand C, Andre T, Achille E, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004 Jan 15;22(2):229-37.
28. Colucci G, Gebbia V, Paoletti G, et al. Phase III randomized trial of FOLFIRI versus FOLFOX4 in the treatment of advanced colorectal cancer: a multicenter study of the Gruppo Oncologico Dell'Italia Meridionale. *J Clin Oncol* 2005 Aug 1;23(22):4866-75.
29. Grothey A, Sargent D, Goldberg RM, Schmoll HJ. Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *J Clin Oncol* 2004 Apr 1;22(7):1209-14.
30. Diaz-Rubio E, Tabernero J, Gomez-Espana A, et al. Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with continuous-infusion fluorouracil plus oxaliplatin as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: final report of the Spanish Cooperative Group for the Treatment of Digestive Tumors Trial. *J Clin Oncol* 2007 Sep 20;25(27):4224-30.
31. Porschen R, Arkenau HT, Kubicka S, et al. Phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and leucovorin plus oxaliplatin in metastatic colorectal cancer: a final report of the AIO Colorectal Study Group. *J Clin Oncol* 2007 Sep 20;25(27):4217-23.

32. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol* 2007 May 1;25(13):1670-6.
33. Abad A, Massuti B, Anton A, et al. Colorectal cancer metastasis resectability after treatment with the combination of oxaliplatin, irinotecan and 5-fluorouracil. Final results of a phase II study. *Acta Oncol* 2008;47(2):286-92.
34. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004 Jun 3;350(23):2335-42.
35. Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M, et al. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 2005 Jun 1;23(16):3697-705.
36. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 2007 Apr 20;25(12):1539-44.
37. Fakih MG. Metastatic colorectal cancer: current state and future directions. *J Clin Oncol* 2015 Jun 1;33(16):1809-24.
38. Taberero J, Yoshino T, Cohn AL, et al. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2015 May;16(5):499-508.
39. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004 Jul 22;351(4):337-45.
40. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009 Apr 2;360(14):1408-17.
41. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009 Feb 10;27(5):663-71.
42. Maughan TS, Adams RA, Smith CG, et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet* 2011 Jun 18;377(9783):2103-14.
43. Tveit KM, Guren T, Glimelius B, et al. Phase III trial of cetuximab with continuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX) versus FLOX alone in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: the NORDIC-VII study. *J Clin Oncol* 2012 May 20;30(15):1755-62.
44. Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008 Apr 1;26(10):1626-34.

45. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol* 2010 Nov 1;28(31):4697-705.
46. Peeters M, Price TJ, Cervantes A, et al. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010 Nov 1;28(31):4706-13.
47. Tol J, Koopman M, Cats A, et al. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009 Feb 5;360(6):563-72.
48. Saltz LB, Lenz HJ, Kindler HL, et al. Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: the BOND-2 study. *J Clin Oncol* 2007 Oct 10;25(29):4557-61.
49. Mayer RJ, Van Cutsem E, Falcone A, et al. Randomized trial of TAS-102 for refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2015 May 14;372(20):1909-19.
50. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, et al. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol* 2012 Oct;23(10):2479-516.
51. Andre T, Boni C, Navarro M, et al. Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* 2009 Jul 1;27(19):3109-16.
52. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol* 2011 Apr 10;29(11):1465-71.
53. Yothers G, O'Connell MJ, Allegra CJ, et al. Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. *J Clin Oncol* 2011 Oct 1;29(28):3768-74.
54. Ahmad S. Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. *Chem Biodivers* 2010 Mar;7(3):543-66.
55. Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther* 2002 Jan;1(3):227-35.
56. Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res* 2000 Apr;6(4):1205-18.
57. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev* 2007 Feb;33(1):9-23.
58. Todd RC, Lippard SJ. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics* 2009;1(4):280-91.
59. Longley DB, Allen WL, Johnston PG. Drug resistance, predictive markers and pharmacogenomics in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2006 Dec;1766(2):184-96.



60. Chaney SG, Campbell SL, Bassett E, Wu Y. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005 Jan;53(1):3-11.
61. Tao Z, Goodisman J, Penefsky HS, Souid AK. Caspase activation by anticancer drugs: the caspase storm. *Mol Pharm* 2007 Jul-Aug;4(4):583-95.
62. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007 Jun;35(4):495-516.
63. Bunz F, Hwang PM, Torrance C, et al. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest* 1999 Aug;104(3):263-9.
64. Arango D, Wilson AJ, Shi Q, et al. Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 2004 Nov 29;91(11):1931-46.
65. Rakitina TV, Vasilevskaya IA, O'Dwyer PJ. Additive interaction of oxaliplatin and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in colon cancer cell lines results from inhibition of nuclear factor kappaB signaling. *Cancer Res* 2003 Dec 15;63(24):8600-5.
66. Marchetti P, Galla DA, Russo FP, et al. Apoptosis induced by oxaliplatin in human colon cancer HCT15 cell line. *Anticancer Res* 2004 Jan-Feb;24(1):219-26.
67. Preston TJ, Henderson JT, McCallum GP, Wells PG. Base excision repair of reactive oxygen species-initiated 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine inhibits the cytotoxicity of platinum anticancer drugs. *Mol Cancer Ther* 2009 Jul;8(7):2015-26.
68. Lim SC, Choi JE, Kang HS, Han SI. Ursodeoxycholic acid switches oxaliplatin-induced necrosis to apoptosis by inhibiting reactive oxygen species production and activating p53-caspase 8 pathway in HepG2 hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2010 Apr 1;126(7):1582-95.
69. Gines A, Bystrup S, Ruiz de Porras V, et al. PKM2 Subcellular Localization Is Involved in Oxaliplatin Resistance Acquisition in HT29 Human Colorectal Cancer Cell Lines. *PLoS One* 2015;10(5):e0123830.
70. Qu K, Xu X, Liu C, et al. Negative regulation of transcription factor FoxM1 by p53 enhances oxaliplatin-induced senescence in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* Apr 30;331(1):105-14.
71. Ngan CY, Yamamoto H, Takagi A, et al. Oxaliplatin induces mitotic catastrophe and apoptosis in esophageal cancer cells. *Cancer Sci* 2008 Jan;99(1):129-39.
72. Stein A, Arnold D. Oxaliplatin: a review of approved uses. *Expert Opin Pharmacother* 2012 Jan;13(1):125-37.
73. Cersosimo RJ. Oxaliplatin-associated neuropathy: a review. *Ann Pharmacother* 2005 Jan;39(1):128-35.
74. Chay WY, Tan SH, Lo YL, et al. Use of calcium and magnesium infusions in prevention of oxaliplatin induced sensory neuropathy. *Asia Pac J Clin Oncol* 2010 Dec;6(4):270-7.
75. Holohan C, Van Schaeybroeck S, Longley DB, Johnston PG. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* 2013 Oct;13(10):714-26.

76. Swanton C. Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer Res* 2012 Oct 1;72(19):4875-82.
77. Martinez-Balibrea E, Abad A, Aranda E, et al. Pharmacogenetic approach for capecitabine or 5-fluorouracil selection to be combined with oxaliplatin as first-line chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2008 Jun;44(9):1229-37.
78. Martinez-Balibrea E, Manzano JL, Martinez-Cardus A, et al. Combined analysis of genetic polymorphisms in thymidylate synthase, uridine diphosphate glucuronosyltransferase and X-ray cross complementing factor 1 genes as a prognostic factor in advanced colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil plus oxaliplatin or irinotecan. *Oncol Rep* 2007 Mar;17(3):637-45.
79. Maier S, Dahlstroem C, Haefliger C, Plum A, Piepenbrock C. Identifying DNA methylation biomarkers of cancer drug response. *Am J Pharmacogenomics* 2005;5(4):223-32.
80. Taylor ST, Hickman JA, Dive C. Epigenetic determinants of resistance to etoposide regulation of Bcl-X(L) and Bax by tumor microenvironmental factors. *J Natl Cancer Inst* 2000 Jan 5;92(1):18-23.
81. Debatin KM, Krammer PH. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 2004 Apr 12;23(16):2950-66.
82. Chuthapisith S, Eremin J, El-Sheemey M, Eremin O. Breast cancer chemoresistance: emerging importance of cancer stem cells. *Surg Oncol* 2010 Mar;19(1):27-32.
83. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005 May 1;204(3):216-37.
84. Martinez-Balibrea E, Martinez-Cardus A, Gines A, et al. Tumor-Related Molecular Mechanisms of Oxaliplatin Resistance. *Mol Cancer Ther* 2015 Aug;14(8):1767-76.
85. Plasencia C, Martinez-Balibrea E, Martinez-Cardus A, Quinn DI, Abad A, Neamati N. Expression analysis of genes involved in oxaliplatin response and development of oxaliplatin-resistant HT29 colon cancer cells. *Int J Oncol* 2006 Jul;29(1):225-35.
86. Martinez-Balibrea E, Martinez-Cardus A, Musulen E, et al. Increased levels of copper efflux transporter ATP7B are associated with poor outcome in colorectal cancer patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Int J Cancer* 2009 Jun 15;124(12):2905-10.
87. Seo YR, Chen EI, Smith ML. Sensitivity of p53-deficient cells to oxaliplatin and thio-TEPA (N, N', N'' triethylenethiophosphoramidate). *Breast Cancer Res Treat* 2002 Apr;72(3):255-63.
88. Beretta GL, Benedetti V, Cossa G, et al. Increased levels and defective glycosylation of MRPs in ovarian carcinoma cells resistant to oxaliplatin. *Biochem Pharmacol* 2010 Apr 15;79(8):1108-17.
89. Goto S, Iida T, Cho S, Oka M, Kohno S, Kondo T. Overexpression of glutathione S-transferase pi enhances the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cells. *Free Radic Res* 1999 Dec;31(6):549-58.

90. Ban N, Takahashi Y, Takayama T, et al. Transfection of glutathione S-transferase (GST)-pi antisense complementary DNA increases the sensitivity of a colon cancer cell line to adriamycin, cisplatin, melphalan, and etoposide. *Cancer Res* 1996 Aug 1;56(15):3577-82.
91. Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, et al. Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002 Jun 19;94(12):936-42.
92. Bohanes P, Labonte MJ, Lenz HJ. A review of excision repair cross-complementation group 1 in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2011 Sep;10(3):157-64.
93. Arnould S, Hennebelle I, Canal P, Bugat R, Guichard S. Cellular determinants of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cell lines. *Eur J Cancer* 2003 Jan;39(1):112-9.
94. Graf N, Ang WH, Zhu G, Myint M, Lippard SJ. Role of endonucleases XPF and XPG in nucleotide excision repair of platinated DNA and cisplatin/oxaliplatin cytotoxicity. *Chembiochem* 2011 May 2;12(7):1115-23.
95. Li P, Fang YJ, Li F, Ou QJ, Chen G, Ma G. ERCC1, defective mismatch repair status as predictive biomarkers of survival for stage III colon cancer patients receiving oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy. *Br J Cancer* 2013 Apr 2;108(6):1238-44.
96. Toscano F, Parmentier B, Fajoui ZE, et al. p53 dependent and independent sensitivity to oxaliplatin of colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2007 Aug 1;74(3):392-406.
97. Gourdier I, Del Rio M, Crabbe L, et al. Drug specific resistance to oxaliplatin is associated with apoptosis defect in a cellular model of colon carcinoma. *FEBS Lett* 2002 Oct 9;529(2-3):232-6.
98. Hayward RL, Macpherson JS, Cummings J, Monia BP, Smyth JF, Jodrell DI. Enhanced oxaliplatin-induced apoptosis following antisense Bcl-xl down-regulation is p53 and Bax dependent: Genetic evidence for specificity of the antisense effect. *Mol Cancer Ther* 2004 Feb;3(2):169-78.
99. Wilson C, Purcell C, Seaton A, et al. Chemotherapy-induced CXC-chemokine/CXC-chemokine receptor signaling in metastatic prostate cancer cells confers resistance to oxaliplatin through potentiation of nuclear factor-kappaB transcription and evasion of apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2008 Dec;327(3):746-59.
100. Almendro V, Ametller E, Garcia-Recio S, et al. The role of MMP7 and its cross-talk with the FAS/FASL system during the acquisition of chemoresistance to oxaliplatin. *PLoS One* 2009;4(3):e4728.
101. Moutinho C, Martinez-Cardus A, Santos C, et al. Epigenetic inactivation of the BRCA1 interactor SRBC and resistance to oxaliplatin in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014 Jan;106(1):djt322.
102. Martinez-Cardus A, Martinez-Balibrea E, Bandres E, et al. Pharmacogenomic approach for the identification of novel determinants of acquired resistance to oxaliplatin in colorectal cancer. *Mol Cancer Ther* 2009 Jan;8(1):194-202.

103. Li F, Zhang J, Arfuso F, et al. NF-kappaB in cancer therapy. *Arch Toxicol* 2015 May;89(5):711-31.
104. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 1986 Dec 26;47(6):921-8.
105. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002 Mar;3(3):221-7.
106. May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today* 1998 Feb;19(2):80-8.
107. Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF-kappaB by TNF family cytokines. *Semin Immunol* 2014 Jun;26(3):253-66.
108. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008 Feb 8;132(3):344-62.
109. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 2002 Apr;109 Suppl:S81-96.
110. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225-60.
111. Luque I, Gelinas C. Distinct domains of IkappaBalpha regulate c-Rel in the cytoplasm and in the nucleus. *Mol Cell Biol* 1998 Mar;18(3):1213-24.
112. Xia Y, Shen S, Verma IM. NF-kappaB, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res* 2014 Sep;2(9):823-30.
113. DiDonato J, Mercurio F, Rosette C, et al. Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* 1996 Apr;16(4):1295-304.
114. Amy Collieran AR, Angela O'Gorman, Coralie Mureau, Catherine Liptrot, Peter Dockery, Howard Fearnhead and Laurence J. Egan. Autophagosomal IkBa Degradation Plays aRole in the Long Term Control of Tumor Necrosis Factor-alpha induced Nuclear Factor-kB (NF-kB) Activity. *The Journal of Biological Chemistry* 2011;286(26):17.
115. Tam WF, Lee LH, Davis L, Sen R. Cytoplasmic sequestration of rel proteins by IkappaBalpha requires CRM1-dependent nuclear export. *Mol Cell Biol* 2000 Mar;20(6):2269-84.
116. Ghosh S, Hayden MS. Celebrating 25 years of NF-kappaB research. *Immunol Rev* 2012 Mar;246(1):5-13.
117. Hacker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* 2006 Oct 17;2006(357):re13.
118. Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, Karin M. Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* 1999 Apr 9;284(5412):309-13.

119. Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* 2013;12:86.
120. Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol* 2011 Aug;12(8):695-708.
121. Sun SC. Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res* 2011 Jan;21(1):71-85.
122. Habraken Y, Piette J. NF-kappaB activation by double-strand breaks. *Biochem Pharmacol* 2006 Oct 30;72(9):1132-41.
123. Wu ZH, Shi Y, Tibbetts RS, Miyamoto S. Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science* 2006 Feb 24;311(5764):1141-6.
124. Gallagher D, Gutierrez H, Gavalda N, O'Keeffe G, Hay R, Davies AM. Nuclear factor-kappaB activation via tyrosine phosphorylation of inhibitor kappaB-alpha is crucial for ciliary neurotrophic factor-promoted neurite growth from developing neurons. *J Neurosci* 2007 Sep 5;27(36):9664-9.
125. Imbert V, Rupec RA, Livolsi A, et al. Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha activates NF-kappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha. *Cell* 1996 Sep 6;86(5):787-98.
126. Takada Y, Mukhopadhyay A, Kundu GC, Mahabeleshwar GH, Singh S, Aggarwal BB. Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 2003 Jun 27;278(26):24233-41.
127. Sakurai H, Suzuki S, Kawasaki N, et al. Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway. *J Biol Chem* 2003 Sep 19;278(38):36916-23.
128. Mattioli I, Geng H, Sebald A, et al. Inducible phosphorylation of NF-kappa B p65 at serine 468 by T cell costimulation is mediated by IKK epsilon. *J Biol Chem* 2006 Mar 10;281(10):6175-83.
129. Buss H, Dorrie A, Schmitz ML, Hoffmann E, Resch K, Kracht M. Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF-{kappa}B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I{kappa}B kinase (IKK)-{alpha}, IKK{beta}, IKK{epsilon}, TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription. *J Biol Chem* 2004 Dec 31;279(53):55633-43.
130. Haller D, Russo MP, Sartor RB, Jobin C. IKK beta and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt participate in non-pathogenic Gram-negative enteric bacteria-induced RelA phosphorylation and NF-kappa B activation in both primary and intestinal epithelial cell lines. *J Biol Chem* 2002 Oct 11;277(41):38168-78.
131. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 Mar 4;144(5):646-74.

132. Gambhir S, Vyas D, Hollis M, Aekka A, Vyas A. Nuclear factor kappa B role in inflammation associated gastrointestinal malignancies. *World J Gastroenterol* Mar 21;21(11):3174-83.
133. Sovak MA, Bellas RE, Kim DW, et al. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. *J Clin Invest* 1997 Dec 15;100(12):2952-60.
134. Sweeney C, Li L, Shanmugam R, et al. Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in prostate cancer in vitro and is overexpressed in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma of the prostate. *Clin Cancer Res* 2004 Aug 15;10(16):5501-7.
135. Huang S, Robinson JB, Deguzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of nuclear factor-kappaB signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. *Cancer Res* 2000 Oct 1;60(19):5334-9.
136. Wang W, Abbruzzese JL, Evans DB, Larry L, Cleary KR, Chiao PJ. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clin Cancer Res* 1999 Jan;5(1):119-27.
137. Visconti R, Cerutti J, Battista S, et al. Expression of the neoplastic phenotype by human thyroid carcinoma cell lines requires NFkappaB p65 protein expression. *Oncogene* 1997 Oct 16;15(16):1987-94.
138. Yu LL, Yu HG, Yu JP, Luo HS, Xu XM, Li JH. Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human colorectal carcinoma tissue. *World J Gastroenterol* 2004 Nov 15;10(22):3255-60.
139. Sasaki N, Morisaki T, Hashizume K, et al. Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue. *Clin Cancer Res* 2001 Dec;7(12):4136-42.
140. Tai DI, Tsai SL, Chang YH, et al. Constitutive activation of nuclear factor kappaB in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000 Dec 1;89(11):2274-81.
141. Amiri KI, Richmond A. Role of nuclear factor-kappa B in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005 Jun;24(2):301-13.
142. Sakamoto K, Maeda S. Targeting NF-kappaB for colorectal cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2016 Jun;14(6):593-601.
143. Rayet B, Gelinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 1999 Nov 22;18(49):6938-47.
144. Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, et al. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 1997 Dec 15;100(12):2961-9.
145. Jiao X, Wood LD, Lindman M, et al. Somatic mutations in the Notch, NF-KB, PIK3CA, and Hedgehog pathways in human breast cancers. *Genes Chromosomes Cancer* May;51(5):480-9.

146. Pacifico F, Leonardi A. NF-kappaB in solid tumors. *Biochem Pharmacol* 2006 Oct 30;72(9):1142-52.
147. Dhawan P, Singh AB, Ellis DL, Richmond A. Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor-kappaB and tumor progression. *Cancer Res* 2002 Dec 15;62(24):7335-42.
148. Grandage VL, Gale RE, Linch DC, Khwaja A. PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappaB, Mapkinase and p53 pathways. *Leukemia* 2005 Apr;19(4):586-94.
149. Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. *Cancer Cell* 2004 Sep;6(3):203-8.
150. Li F, Zhang J, Arfuso F, et al. NF-kappaB in cancer therapy. *Arch Toxicol* May;89(5):711-31.
151. Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* 2008 Aug 15;14(16):5000-5.
152. Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000 May;46(5):645-50.
153. Garg A, Aggarwal BB. Nuclear transcription factor-kappaB as a target for cancer drug development. *Leukemia* 2002 Jun;16(6):1053-68.
154. Kornmann M, Danenberg KD, Arber N, Beger HG, Danenberg PV, Korc M. Inhibition of cyclin D1 expression in human pancreatic cancer cells is associated with increased chemosensitivity and decreased expression of multiple chemoresistance genes. *Cancer Res* 1999 Jul 15;59(14):3505-11.
155. Biliran H, Jr., Wang Y, Banerjee S, et al. Overexpression of cyclin D1 promotes tumor cell growth and confers resistance to cisplatin-mediated apoptosis in an elastase-myc transgene-expressing pancreatic tumor cell line. *Clin Cancer Res* 2005 Aug 15;11(16):6075-86.
156. Sakamoto K, Maeda S, Hikiba Y, et al. Constitutive NF-kappaB activation in colorectal carcinoma plays a key role in angiogenesis, promoting tumor growth. *Clin Cancer Res* 2009 Apr 1;15(7):2248-58.
157. Huang S, DeGuzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice. *Clin Cancer Res* 2000 Jun;6(6):2573-81.
158. Huang S, Pettaway CA, Uehara H, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of NF-kappaB activity in human prostate cancer cells is associated with suppression of angiogenesis, invasion, and metastasis. *Oncogene* 2001 Jul 12;20(31):4188-97.
159. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998 May 29;93(5):705-16.

160. Lin J, Hsiao PW, Chiu TH, Chao JI. Combination of cyclooxygenase-2 inhibitors and oxaliplatin increases the growth inhibition and death in human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2005 Sep 1;70(5):658-67.
161. Trifan OC, Durham WF, Salazar VS, et al. Cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib enhances antitumor efficacy and reduces diarrhea side effect of CPT-11. *Cancer Res* 2002 Oct 15;62(20):5778-84.
162. John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res* 2001;7(1):14-23.
163. Astarci E, Sade A, Cimen I, Savas B, Banerjee S. The NF-kappaB target genes ICAM-1 and VCAM-1 are differentially regulated during spontaneous differentiation of Caco-2 cells. *FEBS J* Aug;279(16):2966-86.
164. Kang Y, Massague J. Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 2004 Aug 6;118(3):277-9.
165. Li CW, Xia W, Huo L, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF-alpha requires NF-kappaB-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer Res* 2012 Mar 1;72(5):1290-300.
166. Huber MA, Azoitei N, Baumann B, et al. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 2004 Aug;114(4):569-81.
167. Helbig G, Christopherson KW, 2nd, Bhat-Nakshatri P, et al. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem* 2003 Jun 13;278(24):21631-8.
168. Li F, Sethi G. Targeting transcription factor NF-kappaB to overcome chemoresistance and radioresistance in cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2010 Apr;1805(2):167-80.
169. Bottero V, Busuttill V, Loubat A, et al. Activation of nuclear factor kappaB through the IKK complex by the topoisomerase poisons SN38 and doxorubicin: a brake to apoptosis in HeLa human carcinoma cells. *Cancer Res* 2001 Nov 1;61(21):7785-91.
170. Wang CY, Cusack JC, Jr., Liu R, Baldwin AS, Jr. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med* 1999 Apr;5(4):412-7.
171. Fukuyama R, Ng KP, Cicek M, et al. Role of IKK and oscillatory NFkappaB kinetics in MMP-9 gene expression and chemoresistance to 5-fluorouracil in RKO colorectal cancer cells. *Mol Carcinog* 2007 May;46(5):402-13.
172. Uetsuka H, Haisa M, Kimura M, et al. Inhibition of inducible NF-kappaB activity reduces chemoresistance to 5-fluorouracil in human stomach cancer cell line. *Exp Cell Res* 2003 Sep 10;289(1):27-35.
173. Liu T, Liu D, Liu J, et al. Effect of NF-kappaB inhibitors on the chemotherapy-induced apoptosis of the colon cancer cell line HT-29. *Exp Ther Med* 2012 Oct;4(4):716-22.



174. Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, Aggarwal BB. Inhibiting NF-kappaB activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta* 2010 Oct-Dec;1799(10-12):775-87.
175. Caponigro F, Lacombe D, Twelves C, et al. An EORTC phase I study of Bortezomib in combination with oxaliplatin, leucovorin and 5-fluorouracil in patients with advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2009 Jan;45(1):48-55.
176. Arriaga JM, Greco A, Mordoh J, Bianchini M. Metallothionein 1G and zinc sensitize human colorectal cancer cells to chemotherapy. *Mol Cancer Ther* 2014 May;13(5):1369-81.
177. He JM, Wang FC, Qi HB, Li Y, Liang HJ. Down-regulation of alphav integrin by retroviral delivery of small interfering RNA reduces multicellular resistance of HT29. *Cancer Lett* 2009 Nov 1;284(2):182-8.
178. Kurita T, Makino Y. Novel curcumin oral delivery systems. *Anticancer Res* 2013 Jul;33(7):2807-21.
179. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 2009 Jan;41(1):40-59.
180. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* 2003 Jan-Feb;23(1A):363-98.
181. Zhou H, Beevers CS, Huang S. The targets of curcumin. *Curr Drug Targets* 2011 Mar 1;12(3):332-47.
182. Shanmugam MK, Rane G, Kanchi MM, et al. The multifaceted role of curcumin in cancer prevention and treatment. *Molecules* 2015;20(2):2728-69.
183. Rastogi T, Devesa S, Mangtani P, et al. Cancer incidence rates among South Asians in four geographic regions: India, Singapore, UK and US. *Int J Epidemiol* 2008 Feb;37(1):147-60.
184. Smith LK, Botha JL, Benghiat A, Steward WP. Latest trends in cancer incidence among UK South Asians in Leicester. *Br J Cancer* 2003 Jul 7;89(1):70-3.
185. Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, et al. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res* 2001 Jul-Aug;21(4B):2895-900.
186. Sharma RA, McLelland HR, Hill KA, et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2001 Jul;7(7):1894-900.
187. Asai A, Miyazawa T. Occurrence of orally administered curcuminoid as glucuronide and glucuronide/sulfate conjugates in rat plasma. *Life Sci* 2000 Oct 27;67(23):2785-93.
188. Ravindranath V, Chandrasekhara N. Metabolism of curcumin--studies with [3H]curcumin. *Toxicology* 1981;22(4):337-44.

189. Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. *Cancer Res Treat* 2014 Jan;46(1):2-18.
190. Jordan BC, Mock CD, Thilagavathi R, Selvam C. Molecular mechanisms of curcumin and its semisynthetic analogues in prostate cancer prevention and treatment. *Life Sci* 2016 May 1;152:135-44.
191. Carroll RE, Benya RV, Turgeon DK, et al. Phase IIa clinical trial of curcumin for the prevention of colorectal neoplasia. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011 Mar;4(3):354-64.
192. Perkins S, Verschoyle RD, Hill K, et al. Chemopreventive efficacy and pharmacokinetics of curcumin in the min/+ mouse, a model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002 Jun;11(6):535-40.
193. Huang AC, Lin SY, Su CC, et al. Effects of curcumin on N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN)-induced lung and liver tumorigenesis in BALB/c mice in vivo. *In Vivo* 2008 Nov-Dec;22(6):781-5.
194. Aзуine MA, Bhide SV. Chemopreventive effect of turmeric against stomach and skin tumors induced by chemical carcinogens in Swiss mice. *Nutr Cancer* 1992;17(1):77-83.
195. Shoba G, Joy D, Joseph T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med* 1998 May;64(4):353-6.
196. Lao CD, Ruffin MT, Normolle D, et al. Dose escalation of a curcuminoid formulation. *BMC Complement Altern Med* 2006;6:10.
197. Garcea G, Berry DP, Jones DJ, et al. Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005 Jan;14(1):120-5.
198. Garcea G, Jones DJ, Singh R, et al. Detection of curcumin and its metabolites in hepatic tissue and portal blood of patients following oral administration. *Br J Cancer* 2004 Mar 8;90(5):1011-5.
199. Irving GR, Howells LM, Sale S, et al. Prolonged biologically active colonic tissue levels of curcumin achieved after oral administration--a clinical pilot study including assessment of patient acceptability. *Cancer Prev Res (Phila)* 2013 Feb;6(2):119-28.
200. James MI, Iwuji C, Irving G, et al. Curcumin inhibits cancer stem cell phenotypes in ex vivo models of colorectal liver metastases, and is clinically safe and tolerable in combination with FOLFOX chemotherapy. *Cancer Lett* 2015 Aug 10;364(2):135-41.
201. Sreejayan, Rao MN. Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J Pharm Pharmacol* 1994 Dec;46(12):1013-6.
202. Sandur SK, Ichikawa H, Pandey MK, et al. Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). *Free Radic Biol Med* 2007 Aug 15;43(4):568-80.

203. Banerjee A, Kunwar A, Mishra B, Priyadarsini KI. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. *Chem Biol Interact* 2008 Jul 30;174(2):134-9.
204. Bharti AC, Donato N, Singh S, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and IkappaBalpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood* 2003 Feb 1;101(3):1053-62.
205. Aggarwal S, Ichikawa H, Takada Y, Sandur SK, Shishodia S, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of IkappaBalpha kinase and Akt activation. *Mol Pharmacol* 2006 Jan;69(1):195-206.
206. Camacho-Barquero L, Villegas I, Sanchez-Calvo JM, et al. Curcumin, a *Curcuma longa* constituent, acts on MAPK p38 pathway modulating COX-2 and iNOS expression in chronic experimental colitis. *Int Immunopharmacol* 2007 Mar;7(3):333-42.
207. Bachmeier BE, Mohrenz IV, Mirisola V, et al. Curcumin downregulates the inflammatory cytokines CXCL1 and -2 in breast cancer cells via NFkappaB. *Carcinogenesis* 2008 Apr;29(4):779-89.
208. Jobin C, Bradham CA, Russo MP, et al. Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J Immunol* 1999 Sep 15;163(6):3474-83.
209. Howells LM, Sale S, Sriramareddy SN, et al. Curcumin ameliorates oxaliplatin-induced chemoresistance in HCT116 colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2011 Jul 15;129(2):476-86.
210. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994 Oct;107(4):1183-8.
211. Lal G, Ash C, Hay K, et al. Suppression of intestinal polyps in Msh2-deficient and non-Msh2-deficient multiple intestinal neoplasia mice by a specific cyclooxygenase-2 inhibitor and by a dual cyclooxygenase-1/2 inhibitor. *Cancer Res* 2001 Aug 15;61(16):6131-6.
212. Goel A, Boland CR, Chauhan DP. Specific inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by dietary curcumin in HT-29 human colon cancer cells. *Cancer Lett* 2001 Oct 30;172(2):111-8.
213. Ammon HP, Safayhi H, Mack T, Sabieraj J. Mechanism of antiinflammatory actions of curcumin and boswellic acids. *J Ethnopharmacol* 1993 Mar;38(2-3):113-9.
214. Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB, Diederich M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2008 Dec 1;76(11):1340-51.
215. Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. Curcumin and cancer cells: how many ways can curcumin kill tumor cells selectively? *AAPS J* 2009 Sep;11(3):495-510.

216. Bush JA, Cheung KJ, Jr., Li G. Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. *Exp Cell Res* 2001 Dec 10;271(2):305-14.
217. Aoki H, Takada Y, Kondo S, Sawaya R, Aggarwal BB, Kondo Y. Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol Pharmacol* 2007 Jul;72(1):29-39.
218. Mosieniak G, Adamowicz M, Alster O, et al. Curcumin induces permanent growth arrest of human colon cancer cells: link between senescence and autophagy. *Mech Ageing Dev* 2012 Jun;133(6):444-55.
219. Lin YG, Kunnumakkara AB, Nair A, et al. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in ovarian carcinoma by targeting the nuclear factor-kappaB pathway. *Clin Cancer Res* 2007 Jun 1;13(11):3423-30.
220. Perry MC, Demeule M, Regina A, Moumdjian R, Beliveau R. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in glioblastoma xenografts. *Mol Nutr Food Res* 2010 Aug;54(8):1192-201.
221. Shankar S, Ganapathy S, Chen Q, Srivastava RK. Curcumin sensitizes TRAIL-resistant xenografts: molecular mechanisms of apoptosis, metastasis and angiogenesis. *Mol Cancer* 2008;7:16.
222. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Bhattarakosol P, Niimi H, Patumraj S. Effects of curcumin on tumor angiogenesis and biomarkers, COX-2 and VEGF, in hepatocellular carcinoma cell-implanted nude mice. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006;34(1-2):109-15.
223. Binion DG, Otterson MF, Rafiee P. Curcumin inhibits VEGF-mediated angiogenesis in human intestinal microvascular endothelial cells through COX-2 and MAPK inhibition. *Gut* 2008 Nov;57(11):1509-17.
224. Bae MK, Kim SH, Jeong JW, et al. Curcumin inhibits hypoxia-induced angiogenesis via down-regulation of HIF-1. *Oncol Rep* 2006 Jun;15(6):1557-62.
225. Kunnumakkara AB, Diagaradjane P, Guha S, et al. Curcumin sensitizes human colorectal cancer xenografts in nude mice to gamma-radiation by targeting nuclear factor-kappaB-regulated gene products. *Clin Cancer Res* 2008 Apr 1;14(7):2128-36.
226. Li L, Ahmed B, Mehta K, Kurzrock R. Liposomal curcumin with and without oxaliplatin: effects on cell growth, apoptosis, and angiogenesis in colorectal cancer. *Mol Cancer Ther* 2007 Apr;6(4):1276-82.
227. Tu SP, Jin H, Shi JD, et al. Curcumin induces the differentiation of myeloid-derived suppressor cells and inhibits their interaction with cancer cells and related tumor growth. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012 Feb;5(2):205-15.
228. Rajitha B, Nagaraju GP, Shaib WL, et al. Novel synthetic curcumin analogs as potent antiangiogenic agents in colorectal cancer. *Mol Carcinog* 2016 Apr 29.

229. Yue GG, Kwok HF, Lee JK, et al. Combined therapy using bevacizumab and turmeric ethanolic extract (with absorbable curcumin) exhibited beneficial efficacy in colon cancer mice. *Pharmacol Res* 2016 May 27;111:43-57.
230. Liao H, Wang Z, Deng Z, Ren H, Li X. Curcumin inhibits lung cancer invasion and metastasis by attenuating GLUT1/MT1-MMP/MMP2 pathway. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(6):8948-57.
231. Zhu GH, Dai HP, Shen Q, Ji O, Zhang Q, Zhai YL. Curcumin induces apoptosis and suppresses invasion through MAPK and MMP signaling in human monocytic leukemia SHI-1 cells. *Pharm Biol* 2015 Jul 1:1-9.
232. Thaloor D, Singh AK, Sidhu GS, Prasad PV, Kleinman HK, Maheshwari RK. Inhibition of angiogenic differentiation of human umbilical vein endothelial cells by curcumin. *Cell Growth Differ* 1998 Apr;9(4):305-12.
233. Killian PH, Kronski E, Michalik KM, et al. Curcumin inhibits prostate cancer metastasis in vivo by targeting the inflammatory cytokines CXCL1 and -2. *Carcinogenesis* 2012 Dec;33(12):2507-19.
234. Jaiswal AS, Marlow BP, Gupta N, Narayan S. Beta-catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene* 2002 Dec 5;21(55):8414-27.
235. Wang Z, Zhang Y, Banerjee S, Li Y, Sarkar FH. Notch-1 down-regulation by curcumin is associated with the inhibition of cell growth and the induction of apoptosis in pancreatic cancer cells. *Cancer* 2006 Jun 1;106(11):2503-13.
236. Du WZ, Feng Y, Wang XF, et al. Curcumin suppresses malignant glioma cells growth and induces apoptosis by inhibition of SHH/GLI1 signaling pathway in vitro and vivo. *CNS Neurosci Ther* 2013 Dec;19(12):926-36.
237. Sun XD, Liu XE, Huang DS. Curcumin reverses the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells by inhibiting the Hedgehog signaling pathway. *Oncol Rep* 2013 Jun;29(6):2401-7.
238. Cao L, Xiao X, Lei J, Duan W, Ma Q, Li W. Curcumin inhibits hypoxia-induced epithelialmesenchymal transition in pancreatic cancer cells via suppression of the hedgehog signaling pathway. *Oncol Rep* 2016 Mar 28.
239. Syng-Ai C, Kumari AL, Khar A. Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. *Mol Cancer Ther* 2004 Sep;3(9):1101-8.
240. Howells LM, Mitra A, Manson MM. Comparison of oxaliplatin- and curcumin-mediated antiproliferative effects in colorectal cell lines. *Int J Cancer* 2007 Jul 1;121(1):175-83.
241. Watson JL, Hill R, Lee PW, Giacomantonio CA, Hoskin DW. Curcumin induces apoptosis in HCT-116 human colon cancer cells in a p21-independent manner. *Exp Mol Pathol* 2008 Jun;84(3):230-3.

242. Chakravarti N, Kadara H, Yoon DJ, et al. Differential inhibition of protein translation machinery by curcumin in normal, immortalized, and malignant oral epithelial cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 2010 Mar;3(3):331-8.
243. Kunwar A, Barik A, Mishra B, Rathinasamy K, Pandey R, Priyadarsini KI. Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 2008 Apr;1780(4):673-9.
244. Sharma RA, Euden SA, Platton SL, et al. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res* 2004 Oct 15;10(20):6847-54.
245. Carroll RE, Benya RV, Turgeon DK, et al. Phase IIa clinical trial of curcumin for the prevention of colorectal neoplasia. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012 Mar;4(3):354-64.
246. Cruz-Correa M, Shoskes DA, Sanchez P, et al. Combination treatment with curcumin and quercetin of adenomas in familial adenomatous polyposis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006 Aug;4(8):1035-8.
247. Dhillon N, Aggarwal BB, Newman RA, et al. Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2008 Jul 15;14(14):4491-9.
248. Epelbaum R, Schaffer M, Vigel B, Badmaev V, Bar-Sela G. Curcumin and gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Nutr Cancer* 2010;62(8):1137-41.
249. Troselj KG, Kujundzic RN. Curcumin in combined cancer therapy. *Curr Pharm Des* 2014;20(42):6682-96.
250. Bava SV, Puliappadamba VT, Deepti A, Nair A, Karunakaran D, Anto RJ. Sensitization of taxol-induced apoptosis by curcumin involves down-regulation of nuclear factor-kappaB and the serine/threonine kinase Akt and is independent of tubulin polymerization. *J Biol Chem* 2005 Feb 25;280(8):6301-8.
251. Kamat AM, Sethi G, Aggarwal BB. Curcumin potentiates the apoptotic effects of chemotherapeutic agents and cytokines through down-regulation of nuclear factor-kappaB and nuclear factor-kappaB-regulated gene products in IFN-alpha-sensitive and IFN-alpha-resistant human bladder cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007 Mar;6(3):1022-30.
252. Patel BB, Gupta D, Elliott AA, Sengupta V, Yu Y, Majumdar AP. Curcumin targets FOLFOX-surviving colon cancer cells via inhibition of EGFRs and IGF-1R. *Anticancer Res* 2010 Feb;30(2):319-25.
253. Shakibaei M, Mobasheri A, Lueders C, Busch F, Shayan P, Goel A. Curcumin enhances the effect of chemotherapy against colorectal cancer cells by inhibition of NF-kappaB and Src protein kinase signaling pathways. *PLoS One* 2013;8(2):e57218.
254. Guo LD, Shen YQ, Zhao XH, et al. Curcumin combined with oxaliplatin effectively suppress colorectal carcinoma in vivo through inducing apoptosis. *Phytother Res* 2015 Mar;29(3):357-65.
255. Al Moundhri MS, Al-Salam S, Al Mahrouqee A, Beegam S, Ali BH. The effect of curcumin on oxaliplatin and cisplatin neurotoxicity in rats: some behavioral, biochemical, and histopathological studies. *J Med Toxicol* 2013 Mar;9(1):25-33.

256. Irving GR, Iwuji CO, Morgan B, et al. Combining curcumin (C3-complex, Sabinsa) with standard care FOLFOX chemotherapy in patients with inoperable colorectal cancer (CUFOX): study protocol for a randomised control trial. *Trials* 2015;16:110.
257. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 2006 Sep;58(3):621-81.
258. Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1989 Aug 11;17(15):6419.
259. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 2001 Dec;25(4):386-401.
260. Smyth GK, Michaud J, Scott HS. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 2005 May 1;21(9):2067-75.
261. Eden E, Lipson D, Yogev S, Yakhini Z. Discovering motifs in ranked lists of DNA sequences. *PLoS Comput Biol* 2007 Mar 23;3(3):e39.
262. Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 2009;10:48.
263. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998 Feb 19;391(6669):806-11.
264. Petros AM, Medek A, Nettesheim DG, et al. Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Mar 13;98(6):3012-7.
265. Bava SV, Sreekanth CN, Thulasidasan AK, et al. Akt is upstream and MAPKs are downstream of NF-kappaB in paclitaxel-induced survival signaling events, which are down-regulated by curcumin contributing to their synergism. *Int J Biochem Cell Biol* 2010 Mar;43(3):331-41.
266. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999 Sep 2;401(6748):82-5.
267. Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 1999 Jun 3;9(11):601-4.
268. Itoh N, Semba S, Ito M, Takeda H, Kawata S, Yamakawa M. Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma. *Cancer* 2002 Jun 15;94(12):3127-34.
269. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling. *Cell Res* 2011 Jan;21(1):103-15.

270. Jobin C, Haskill S, Mayer L, Panja A, Sartor RB. Evidence for altered regulation of I kappa B alpha degradation in human colonic epithelial cells. *J Immunol* 1997 Jan 1;158(1):226-34.
271. Panahi Y, Darvishi B, Ghanei M, Jowzi N, Beiraghdar F, Varnamkhasti BS. Molecular mechanisms of curcumins suppressing effects on tumorigenesis, angiogenesis and metastasis, focusing on NF-kappaB pathway. *Cytokine Growth Factor Rev* 2016 Jan 2.
272. Ning Y, Manegold PC, Hong YK, et al. Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. *Int J Cancer* 2011 May 1;128(9):2038-49.
273. Manna SK, Ramesh GT. Interleukin-8 induces nuclear transcription factor-kappaB through a TRAF6-dependent pathway. *J Biol Chem* 2005 Feb 25;280(8):7010-21.
274. Verbeke H, Struyf S, Laureys G, Van Damme J. The expression and role of CXC chemokines in colorectal cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011 Oct-Dec;22(5-6):345-58.
275. Reimers MS, Zeestraten EC, van Alphen TC, et al. Combined analysis of biomarkers of proliferation and apoptosis in colon cancer: an immunohistochemistry-based study using tissue microarray. *Int J Colorectal Dis* 2014 Sep;29(9):1043-52.
276. Kojima M, Morisaki T, Sasaki N, et al. Increased nuclear factor-kB activation in human colorectal carcinoma and its correlation with tumor progression. *Anticancer Res* 2004 Mar-Apr;24(2B):675-81.
277. Wen K, Fu Z, Wu X, Feng J, Chen W, Qian J. Oct-4 is required for an antiapoptotic behavior of chemoresistant colorectal cancer cells enriched for cancer stem cells: effects associated with STAT3/Survivin. *Cancer Lett* 2013 Jun 1;333(1):56-65.
278. Chen J, Huang XF, Qiao L, Katsifis A. Insulin caused drug resistance to oxaliplatin in colon cancer cell line HT29. *J Gastrointest Oncol* 2011 Mar;2(1):27-33.
279. Leelawat K, Narong S, Udomchaiprasertkul W, Leelawat S, Tungpradubkul S. Inhibition of PI3K increases oxaliplatin sensitivity in cholangiocarcinoma cells. *Cancer Cell Int* 2009;9:3.
280. Fischer KR, Durrans A, Lee S, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 2015 Nov 26;527(7579):472-6.
281. Virag P, Fischer-Fodor E, Perde-Schrepler M, et al. Oxaliplatin induces different cellular and molecular chemoresistance patterns in colorectal cancer cell lines of identical origins. *BMC Genomics* 2013;14:480.
282. Saito D, Kyakumoto S, Chosa N, et al. Transforming growth factor-beta1 induces epithelial-mesenchymal transition and integrin alpha3beta1-mediated cell migration of HSC-4 human squamous cell carcinoma cells through Slug. *J Biochem* 2013 Mar;153(3):303-15.
283. Cao L, Shao M, Schilder J, Guise T, Mohammad KS, Matei D. Tissue transglutaminase links TGF-beta, epithelial to mesenchymal transition and a stem cell phenotype in ovarian cancer. *Oncogene* 2012 May 17;31(20):2521-34.



284. Yang AD, Fan F, Camp ER, et al. Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4147-53.
285. Jiao L, Li DD, Yang CL, et al. Reactive oxygen species mediate oxaliplatin-induced epithelial-mesenchymal transition and invasive potential in colon cancer. *Tumour Biol* 2015 Jan 5.
286. Jobin C, Sartor RB. The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000 Mar;278(3):C451-62.
287. Russo MP, Schwabe RF, Sartor RB, Jobin C. NF-kappaB-inducing kinase restores defective IkappaB kinase activity and NF-kappaB signaling in intestinal epithelial cells. *Cell Signal* 2004 Jun;16(6):741-50.
288. Oliveira-Marques V, Marinho HS, Cyrne L, Antunes F. Role of hydrogen peroxide in NF-kappaB activation: from inducer to modulator. *Antioxid Redox Signal* 2009 Sep;11(9):2223-43.
289. Liu HF, Hu HC, Chao JI. Oxaliplatin down-regulates survivin by p38 MAP kinase and proteasome in human colon cancer cells. *Chem Biol Interact* 2010 Dec 5;188(3):535-45.
290. Bocker U, Schottelius A, Watson JM, et al. Cellular differentiation causes a selective down-regulation of interleukin (IL)-1beta-mediated NF-kappaB activation and IL-8 gene expression in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2000 Apr 21;275(16):12207-13.
291. Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 2002 Apr 18;21(17):2613-22.
292. Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer* 2007;6:24.
293. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* 1993 May;7(5):812-21.
294. Rakitina TV, Vasilevskaya IA, O'Dwyer PJ. Inhibition of G1/S transition potentiates oxaliplatin-induced cell death in colon cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 2007 Jun 1;73(11):1715-26.
295. Habraken Y, Piret B, Piette J. S phase dependence and involvement of NF-kappaB activating kinase to NF-kappaB activation by camptothecin. *Biochem Pharmacol* 2001 Sep 1;62(5):603-16.
296. Huang TT, Wuerzberger-Davis SM, Seufzer BJ, et al. NF-kappaB activation by camptothecin. A linkage between nuclear DNA damage and cytoplasmic signaling events. *J Biol Chem* 2000 Mar 31;275(13):9501-9.
297. Muller JR, Siebenlist U. Lymphotoxin beta receptor induces sequential activation of distinct NF-kappa B factors via separate signaling pathways. *J Biol Chem* 2003 Apr 4;278(14):12006-12.

298. Harradine KA, Kassner M, Chow D, et al. Functional genomics reveals diverse cellular processes that modulate tumor cell response to oxaliplatin. *Mol Cancer Res* 2011 Feb;9(2):173-82.
299. Park ES, Choi S, Kim JM, et al. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the TRAF-interacting protein (TRIP) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2007 Nov 30;363(4):971-7.
300. Klahan S, Huang CC, Chien SC, et al. Bioinformatic analyses revealed underlying biological functions correlated with oxaliplatin responsiveness. *Tumour Biol* 2015 Aug 2.
301. Nemeth ZH, Wong HR, Odoms K, et al. Proteasome inhibitors induce inhibitory kappa B (I kappa B) kinase activation, I kappa B alpha degradation, and nuclear factor kappa B activation in HT-29 cells. *Mol Pharmacol* 2004 Feb;65(2):342-9.
302. Shishodia S, Amin HM, Lai R, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF-kappaB activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochem Pharmacol* 2005 Sep 1;70(5):700-13.
303. Tomita M, Kawakami H, Uchihara JN, et al. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive active NF-kappaB, leading to suppression of cell growth of human T-cell leukemia virus type I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer* 2006 Feb 1;118(3):765-72.
304. Hanif R, Qiao L, Shiff SJ, Rigas B. Curcumin, a natural plant phenolic food additive, inhibits cell proliferation and induces cell cycle changes in colon adenocarcinoma cell lines by a prostaglandin-independent pathway. *J Lab Clin Med* 1997 Dec;130(6):576-84.
305. Patel BB, Sengupta R, Qazi S, et al. Curcumin enhances the effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in mediating growth inhibition of colon cancer cells by modulating EGFR and IGF-1R. *Int J Cancer* 2008 Jan 15;122(2):267-73.
306. Yu Y, Kanwar SS, Patel BB, Nautiyal J, Sarkar FH, Majumdar AP. Elimination of Colon Cancer Stem-Like Cells by the Combination of Curcumin and FOLFOX. *Transl Oncol* 2009 Dec;2(4):321-8.
307. Wang YT, Liu HS, Su CL. Curcumin-enhanced chemosensitivity of FDA-approved platinum (II)-based anti-cancer drugs involves downregulation of nuclear endonuclease G and NF-kappaB as well as induction of apoptosis and G2/M arrest. *Int J Food Sci Nutr* 2014 May;65(3):368-74.
308. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* 2013;2:e71.
309. Mullally JE, Fitzpatrick FA. Pharmacophore model for novel inhibitors of ubiquitin isopeptidases that induce p53-independent cell death. *Mol Pharmacol* 2002 Aug;62(2):351-8.
310. Dabkeviciene D, Jonusiene V, Zitkute V, et al. The role of interleukin-8 (CXCL8) and CXCR2 in acquired chemoresistance of human colorectal carcinoma cells HCT116. *Med Oncol* 2015 Dec;32(12):258.

311. Acharyya S, Oskarsson T, Vanharanta S, et al. A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell* 2012 Jul 6;150(1):165-78.
312. Hu G, Chong RA, Yang Q, et al. MTDH activation by 8q22 genomic gain promotes chemoresistance and metastasis of poor-prognosis breast cancer. *Cancer Cell* 2009 Jan 6;15(1):9-20.
313. Collins TS, Lee LF, Ting JP. Paclitaxel up-regulates interleukin-8 synthesis in human lung carcinoma through an NF-kappaB- and AP-1-dependent mechanism. *Cancer Immunol Immunother* 2000 May;49(2):78-84.
314. Tamatani T, Azuma M, Ashida Y, et al. Enhanced radiosensitization and chemosensitization in NF-kappaB-suppressed human oral cancer cells via the inhibition of gamma-irradiation- and 5-FU-induced production of IL-6 and IL-8. *Int J Cancer* 2004 Mar 1;108(6):912-21.
315. Dong YL, Kabir SM, Lee ES, Son DS. CXCR2-driven ovarian cancer progression involves upregulation of proinflammatory chemokines by potentiating NF-kappaB activation via EGFR-transactivated Akt signaling. *PLoS One* 2013;8(12):e83789.
316. le Rolle AF, Chiu TK, Fara M, et al. The prognostic significance of CXCL1 hypersecretion by human colorectal cancer epithelia and myofibroblasts. *J Transl Med* 2015;13:199.
317. Ye FG, Song CG, Cao ZG, et al. Cytidine Deaminase Axis Modulated by miR-484 Differentially Regulates Cell Proliferation and Chemoresistance in Breast Cancer. *Cancer Res* 2015 Apr 1;75(7):1504-15.
318. Neff T, Blau CA. Forced expression of cytidine deaminase confers resistance to cytosine arabinoside and gemcitabine. *Exp Hematol* 1996 Sep;24(11):1340-6.
319. Momparler RL, Laliberte J, Eliopoulos N, Beausejour C, Cournoyer D. Transfection of murine fibroblast cells with human cytidine deaminase cDNA confers resistance to cytosine arabinoside. *Anticancer Drugs* 1996 May;7(3):266-74.
320. Swanton C, McGranahan N, Starrett GJ, Harris RS. APOBEC Enzymes: Mutagenic Fuel for Cancer Evolution and Heterogeneity. *Cancer Discov* 2015 Jul;5(7):704-12.
321. Leonard B, McCann JL, Starrett GJ, et al. The PKC/NF-kappaB signaling pathway induces APOBEC3B expression in multiple human cancers. *Cancer Res* 2015 Nov 1;75(21):4538-47.
322. Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, et al. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science* 2014 Mar 14;343(6176):1221-8.
323. Nowarski R, Kotler M. APOBEC3 cytidine deaminases in double-strand DNA break repair and cancer promotion. *Cancer Res* 2013 Jun 15;73(12):3494-8.
324. Conticello SG. The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. *Genome Biol* 2008;9(6):229.
325. Dedeoglu F, Horwitz B, Chaudhuri J, Alt FW, Geha RS. Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB. *Int Immunol* 2004 Mar;16(3):395-404.

326. Endo Y, Marusawa H, Chiba T. Involvement of activation-induced cytidine deaminase in the development of colitis-associated colorectal cancers. *J Gastroenterol* 2011 Jan;46 Suppl 1:6-10.
327. Munoz DP, Lee EL, Takayama S, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) is necessary for the epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 Aug 6;110(32):E2977-86.
328. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2003 Nov;3(11):859-68.
329. Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol* 2007 Apr;19(2):142-9.
330. Tournier C, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Barrett T, Davis RJ. The MKK7 gene encodes a group of c-Jun NH2-terminal kinase kinases. *Mol Cell Biol* 1999 Feb;19(2):1569-81.
331. Yan M, Dai T, Deak JC, et al. Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature* 1994 Dec 22-29;372(6508):798-800.
332. Baud V, Liu ZG, Bennett B, Suzuki N, Xia Y, Karin M. Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev* 1999 May 15;13(10):1297-308.
333. Minamino T, Yujiri T, Papst PJ, Chan ED, Johnson GL, Terada N. MEKK1 suppresses oxidative stress-induced apoptosis of embryonic stem cell-derived cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Dec 21;96(26):15127-32.
334. Lee FS, Hagler J, Chen ZJ, Maniatis T. Activation of the I $\kappa$ B $\alpha$  kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell* 1997 Jan 24;88(2):213-22.
335. Lee M, Koh WS. Raf-independent and MEKK1-dependent activation of NF- $\kappa$ B by hydrogen peroxide in 70Z/3 pre-B lymphocyte tumor cells. *J Cell Biochem* 2003 Feb 15;88(3):545-56.
336. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 2009 Aug;9(8):537-49.
337. Fujioka S, Niu J, Schmidt C, et al. NF- $\kappa$ B and AP-1 connection: mechanism of NF- $\kappa$ B-dependent regulation of AP-1 activity. *Mol Cell Biol* 2004 Sep;24(17):7806-19.
338. Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 1995 Nov 15;9(22):2723-35.
339. Vasilevskaya IA, Selvakumaran M, Hierro LC, Goldstein SR, Winkler JD, O'Dwyer PJ. Inhibition of JNK Sensitizes Hypoxic Colon Cancer Cells to DNA-Damaging Agents. *Clin Cancer Res* 2015 Sep 15;21(18):4143-52.

340. Fujishita T, Aoki M, Taketo MM. JNK signaling promotes intestinal tumorigenesis through activation of mTOR complex 1 in Apc(Delta716) mice. *Gastroenterology* 2011 May;140(5):1556-63 e6.
341. Cellurale C, Girnius N, Jiang F, et al. Role of JNK in mammary gland development and breast cancer. *Cancer Res* 2012 Jan 15;72(2):472-81.
342. Das M, Garlick DS, Greiner DL, Davis RJ. The role of JNK in the development of hepatocellular carcinoma. *Genes Dev* 2011 Mar 15;25(6):634-45.
343. Vasilevskaya IA, O'Dwyer PJ. Effects of geldanamycin on signaling through activator-protein 1 in hypoxic HT29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 1999 Aug 15;59(16):3935-40.
344. Vasilevskaya IA, Selvakumaran M, O'Dwyer PJ. Disruption of signaling through SEK1 and MKK7 yields differential responses in hypoxic colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Mol Pharmacol* 2008 Jul;74(1):246-54.
345. Vasilevskaya IA, Selvakumaran M, Roberts D, O'Dwyer PJ. Jnk1 Inhibition Attenuates Hypoxia-Induced Autophagy and Sensitizes to Chemotherapy. *Mol Cancer Res* 2016 May 23.
346. Chen YR, Zhou G, Tan TH. c-Jun N-terminal kinase mediates apoptotic signaling induced by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide. *Mol Pharmacol* 1999 Dec;56(6):1271-9.
347. Ning Y, Labonte MJ, Zhang W, et al. The CXCR2 antagonist, SCH-527123, shows antitumor activity and sensitizes cells to oxaliplatin in preclinical colon cancer models. *Mol Cancer Ther* 2012 Jun;11(6):1353-64.

**8. ANNEX**

---

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Curcumin mediates oxaliplatin-acquired resistance reversion in colorectal cancer cell lines through modulation of CXC-Chemokine/NF- $\kappa$ B signalling pathway

Received: 23 December 2015

Accepted: 04 April 2016

Published: 19 April 2016

Vicenç Ruiz de Porras<sup>1,7</sup>, Sara Bystrup<sup>1,7</sup>, Anna Martínez-Cardús<sup>2</sup>, Raquel Pluvinet<sup>3</sup>, Lauro Sumoy<sup>3</sup>, Lynne Howells<sup>4</sup>, Mark I. James<sup>4</sup>, Chinenye Iwuji<sup>4</sup>, José Luis Manzano<sup>1,5,7</sup>, Laura Layos<sup>1,5,7</sup>, Cristina Bugés<sup>1,5,7</sup>, Albert Abad<sup>6</sup> & Eva Martínez-Balibrea<sup>1,7</sup>

Resistance to oxaliplatin (OXA) is a complex process affecting the outcomes of metastatic colorectal cancer (CRC) patients treated with this drug. De-regulation of the NF- $\kappa$ B signalling pathway has been proposed as an important mechanism involved in this phenomenon. Here, we show that NF- $\kappa$ B was hyperactivated in *in vitro* models of OXA-acquired resistance but was attenuated by the addition of Curcumin, a non-toxic NF- $\kappa$ B inhibitor. The concomitant combination of Curcumin + OXA was more effective and synergistic in cell lines with acquired resistance to OXA, leading to the reversion of their resistant phenotype, through the inhibition of the NF- $\kappa$ B signalling cascade. Transcriptomic profiling revealed the up-regulation of three NF- $\kappa$ B-regulated CXC-chemokines, CXCL8, CXCL1 and CXCL2, in the resistant cells that were more efficiently down-regulated after OXA + Curcumin treatment as compared to the sensitive cells. Moreover, CXCL8 and CXCL1 gene silencing made resistant cells more sensitive to OXA through the inhibition of the Akt/NF- $\kappa$ B pathway. High expression of CXCL1 in FFPE samples from explant cultures of CRC patients-derived liver metastases was associated with response to OXA + Curcumin. In conclusion, we suggest that combination of OXA + Curcumin could be an effective treatment, for which CXCL1 could be used as a predictive marker, in CRC patients.

Colorectal Cancer (CRC) is still one of the most frequent causes of cancer-related death worldwide. The 5-year overall survival rate is less than 10% in advanced disease and chemotherapy treatment remains essential for these patients. Thus, despite the availability of targeted therapies against the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) or the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), combinations of oxaliplatin (OXA) with fluoropyrimidines (5-fluorouracil or capecitabine) are the most commonly used frontline regimens in the metastatic disease<sup>1</sup>. OXA is a third-generation platinum drug and it is the only platinum analogue that has activity in CRC, in both adjuvant and first-line treatment<sup>2</sup>. OXA cytotoxicity is mainly generated through the formation of platinum-DNA adducts resulting in DNA transcription and replication blockade. As a consequence, several signalling pathways

<sup>1</sup>Health Sciences Research Institute of the Germans Trias i Pujol Foundation (IGTP), Can Ruti Campus, Ctra. Can Ruti- Camí de les escoles s/n, 08916, Badalona, Spain. <sup>2</sup>Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Gran Via de l'Hospitalet, 199. 08908 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Genomics and Bioinformatics Unit, Institute for Predictive and Personalized Medicine of Cancer (IMPPC), Can Ruti Campus, Ctra. Can Ruti- Camí de les escoles s/n, 08916, Badalona, Spain. <sup>4</sup>Dept Cancer Studies, University of Leicester, Robert Kilpatrick Clinical Sciences Building, Leicester Royal Infirmary, Leicester, LE2 7LX, UK. <sup>5</sup>Medical Oncology Service, Catalan Institute of Oncology (ICO) University Hospital Germans Trias i Pujol, Ctra. Can Ruti- Camí de les escoles s/n, 08916, Badalona, Spain. <sup>6</sup>Oncology Unit, Hospital CIMA Sanitas, Barcelona, Catalonia, Spain. <sup>7</sup>Resistance, chemotherapy and predictive biomarkers group. ProCURE (Program against cancer resistance). Catalan Institute of Oncology. Edifici IGTP, Carretera de Can Ruti, Camí de les escoles, s/n, Campus Can Ruti, 08916 Badalona, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to E.M.-B. (email: embalibrea@iconcologia.net)

are activated leading to DNA damage repair and/or the activation of cell death programs<sup>3</sup>. However, as with other chemotherapies, its effectiveness is limited by the appearance of drug resistance<sup>4</sup>. Chemoresistance associated with OXA is a complex and multifactorial process in which several mechanisms such as drug influx/efflux modifications, alterations in DNA damage repair, decrease of cell death activation, autocrine survival signalling or high detoxification activity could play a part<sup>5</sup>. Amongst these processes, the Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) has been implicated in the activation of survival pathways following OXA treatment, and may be an important factor in mediating acquired resistance to OXA. NF- $\kappa$ B is a transcription factor that contributes to the progression of CRC by regulating the expression of diverse target genes that are involved in inflammation (e.g. TNF $\alpha$ , IL-1, CXC-chemokines), cell proliferation (e.g. Cyclin D1, COX2, c-myc, IL-6), apoptosis (e.g. XIAP, IAP-1, IAP-2, Survivin, Bcl-2 and Bcl-xl), angiogenesis (e.g. VEGF, IL-8), invasion (e.g. ICAM-1, VCAM-1) and metastasis (e.g. MMP-9)<sup>6</sup>. Constitutive activation of NF- $\kappa$ B has been observed in many solid tumours, including CRC<sup>7,8</sup>, and provides a survival mechanism by up-regulating anti-apoptotic genes and thereby representing a major causative factor for drug resistance<sup>9</sup>. Of note, it has been shown that administration of OXA can potentiate NF- $\kappa$ B activity, increasing transcriptional regulation and expression of anti-apoptotic genes<sup>10</sup>. Thus, the inhibition or modulation of NF- $\kappa$ B and its downstream targets has been proposed as an important target for the development of therapeutic approaches against this disease and the resistance to platinum agents<sup>11</sup>. In previous work, we investigated the alteration in gene transcription patterns between sensitive and OXA-acquired resistant human CRC cell lines. Our results led us to hypothesize that the NF- $\kappa$ B signalling pathway was an important contributor in the development of OXA resistance in this model<sup>12</sup> and that a reasonable strategy for CRC cancer treatment may be the combination of OXA-based chemotherapy with compounds active against NF- $\kappa$ B. One such compound is Curcumin (diferuloylmethane), the major active ingredient of turmeric (*Curcuma longa*). Curcumin, with no discernable toxicity, inhibits the growth of transformed cells<sup>13,14</sup> and also has been shown to suppress initiation, promotion, and progression of colon carcinogenesis in induced rodent models<sup>15</sup>. In the past few years, several studies have demonstrated that Curcumin inhibits NF- $\kappa$ B activity and down-regulates the expression of NF- $\kappa$ B regulated gene products in different cell types at nontoxic concentrations in humans, leading to the suppression of proliferation, cell cycle arrest and induction of apoptosis<sup>16,17</sup>. It has also been reported that Curcumin enhances the effect of diverse anti-cancer drugs against CRC, including OXA and 5-fluorouracil, both in *in vitro* and *in vivo* models<sup>18–23</sup>. The anti-tumour activity and safety of Curcumin has been extensively studied in humans, and several clinical trials are on-going in order to evaluate new formulations with greater bioavailability and combinations with conventional chemotherapy<sup>24–26</sup>. Despite its poor systemic bioavailability, Curcumin has been reported to distribute in gastrointestinal tract to a great extent and is independent of systemic availability, demonstrating the potential to prevent and reduce CRC<sup>27</sup>.

The aims of this work were firstly, to demonstrate that the NF- $\kappa$ B pathway was hyper-activated in CRC cells with acquired resistance to OXA and to evaluate whether the combined treatment of Curcumin and OXA could revert this phenotype and secondly, to find one or more predictive markers for the effectiveness of this combination that could be used in the selection of patients with high probability to respond to this treatment.

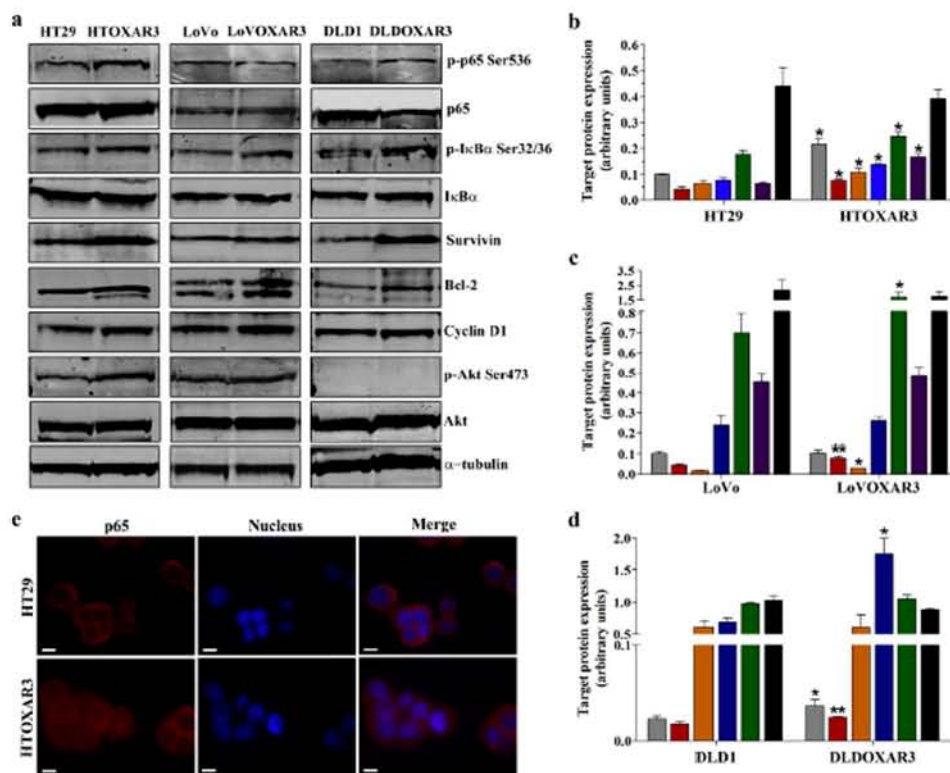
## Results

**The NF- $\kappa$ B pathway is hyperactivated in CRC cell lines with acquired resistance to OXA.** Previous results from our group suggested an important role for the NF- $\kappa$ B pathway in OXA resistance acquisition in *in vitro* models<sup>12</sup>. In the present work, we tried to demonstrate this hypothesis by first investigating the NF- $\kappa$ B basal status in 3 CRC Cell lines (HT29, LoVo and DLD1) and their corresponding OXA-resistant derived sub-lines (HTOXAR3, LoVOXAR3 and DLDOXAR3, respectively). As shown in Fig. 1 all the cell lines had constitutively phosphorylated p65 subunit at Ser536 which is considered an indicator of this pathway's activity<sup>9</sup>. However, we observed an increase in this phosphorylation in HTOXAR3 (Fig. 1a,b) and DLDOXAR3 (Fig. 1a,d) as compared with their parental cell lines. Besides this, increased levels of phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$  at Ser32/36 residues, indicating degradation of this NF- $\kappa$ B inhibitor by the proteasome and p65 nuclear translocation, were also found in all three resistant cell lines in comparison with their respective parental ones. Taking into account that Survivin, Bcl-2 and Cyclin D1 have all been shown to be transcriptionally regulated by NF- $\kappa$ B<sup>6</sup>, we examined the basal expression levels of these proteins by western blot. We observed that all of them were significantly overexpressed in HTOXAR3 as compared to HT29 cells (Fig. 1a,b). In the case of the LoVo/LoVOXAR3 pair we observed a significant increase in Bcl-2 and Cyclin D1 protein expression in the resistant cell line (Fig. 1a,c) while only Survivin protein expression showed statistically significant differences between DLDOXAR3 and DLD1 (Fig. 1a,d). The Serine/threonine kinase Akt plays a critical role in proliferation and cell survival and its implication in the activation of anti-apoptotic mechanisms such as those driven by NF- $\kappa$ B is well documented<sup>28,29</sup>. In agreement with this, in our previous study we reported increased levels of *AKT1* mRNA in OXA-resistant cell lines<sup>12</sup>. Here we also demonstrate a significantly increased phosphorylation of Akt at Ser473 in HTOXAR3 as compared to HT29 cells (Fig. 1a,b) suggesting a possible role for Akt in the NF- $\kappa$ B pathway activation in the HTOXAR3 cell line.

Taken together, our results indicate that the NF- $\kappa$ B pathway is hyper-activated as a result of OXA resistance acquisition, especially in the HTOXAR3 resistant cell line. In addition, through immunocytochemistry experiments, we corroborated this finding since the HTOXAR3 cell line showed increased p65 nuclear staining compared to HT29 (Fig. 1e). Therefore, we used the HT29/HTOXAR3 pair as a model to perform most of the subsequent analysis.

**OXA induces NF- $\kappa$ B activation in CRC cells.** NF- $\kappa$ B pathway could be activated through two mechanisms: signals that originate at cell receptors and signals that originate in the nucleus in response to DNA damage. Treatment with OXA potentiated NF- $\kappa$ B activation in different cell types, including CRC cell lines<sup>10,30</sup>. Accordingly, we assessed the phosphorylation status of p65 and I $\kappa$ B $\alpha$ , and the expression of three NF- $\kappa$ B target



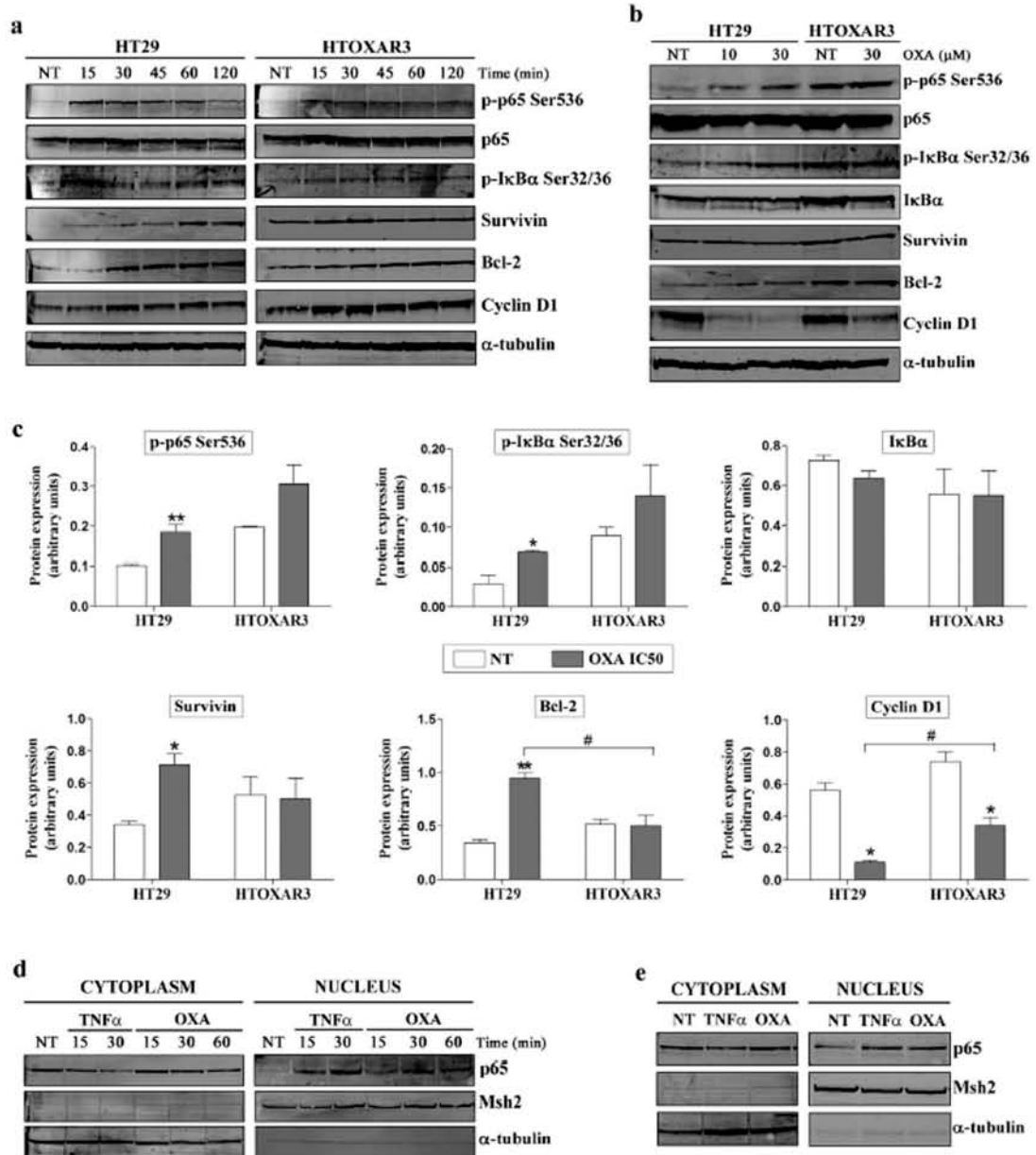


**Figure 1.** NF- $\kappa$ B pathway activation in CRC cell lines with acquired resistance to OXA. Western blot analysis (a) and graphic representation of phosphorylated p65 (p-p65 Ser536, grey bars), phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$  (p-I $\kappa$ B $\alpha$  Ser32/36, red bars), Survivin (orange bars), Bcl-2 (blue bars), Cyclin D1 (green bars), phosphorylated Akt (p-Akt Ser473, purple bars) and I $\kappa$ B $\alpha$  (black bars) basal expression in HT29/HTOXAR3 (b), LoVo/LoVOXAR3 (c) and DLD1/DLDOXAR3 (d) cell lines. Alpha-tubulin was used as endogenous control. (e) Representative immunocytochemistry images of the subcellular localization of p65 (red) in HT29 and HTOXAR3 cells. Nuclei were stained in blue. Objective lens: 40x immersion oil. Scale bar: 10  $\mu$ m. Bar graphs represent mean  $\pm$  SEM values, calculated from at least three independent experiments. \*p-value < 0.05 and \*\*p-value < 0.01; relative to protein expression in the corresponding sensitive cell line.

genes in HT29 and HTOXAR3 cell lines after short OXA-exposure times (0 to 120 min) and after 24 h of OXA treatment at 10 and 30  $\mu$ M (IC<sub>50</sub> values), respectively. We observed that OXA induced a fast phosphorylation of p65 and I $\kappa$ B $\alpha$  after the first 15 min of treatment and potentiated the expression of Bcl-2, Survivin and Cyclin D1 in both cell lines. Despite a slightly decrease in the expression of these proteins was observed after 30' post-treatment, higher levels as compared to non-treated cells were maintained until at least 120' after OXA treatment. Interestingly, we observed a trend to a more evident activation in HT29 as compared with HTOXAR3 cell line (Fig. 2a and Supplementary Fig. S1). In fact, these differences were more evident after a 24 h exposure since p65 and I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation and Bcl-2 and Survivin expression increased in HT29 but not in HTOXAR3 cell line in a statistically significant way. In contrast, Cyclin D1 protein levels decreased significantly in both cell lines, this effect being more evident in the parental cell line. As previously described in HT29 cells<sup>31</sup> we did not observe a significant I $\kappa$ B $\alpha$  protein degradation (Fig. 2b,c). When NF- $\kappa$ B is activated, the p65 subunit translocates to the cell nucleus. To confirm that OXA treatment promotes p65 nuclear translocation, HT29 cells were treated with OXA (10  $\mu$ M) for varying lengths of times, and p65 expression in nuclear and cytoplasmic extracts was analysed by western blot. Nuclear p65 increased as early as 15 min after OXA exposure (Fig. 2d) and was sustained at least after 24 h of OXA treatment (Fig. 2e). TNF $\alpha$  was used as a positive control due to its ability to activate the NF- $\kappa$ B pathway.

Collectively, these results suggest that the combination of OXA with an NF- $\kappa$ B inhibitor could be an appropriate strategy to revert OXA resistance in our *in vitro* model. We tried that our work was the most closed to the clinics as possible. More than 700 different inhibitors of NF- $\kappa$ B have been reported, yet no blocker of this transcription factor has been approved for human use. We therefore selected the natural compound Curcumin (*diferuloylmethane*) in order to block NF- $\kappa$ B activation in our cells due to its strong ability to inhibit this pathway and its low toxicity profile in humans as reported in several phase I and II clinical trials<sup>32–34</sup>.

**Concomitant treatment OXA plus Curcumin for 24 hours reverts OXA resistance in CRC cells.** A panel of 3 CRC cell lines and their respective OXA-resistant cells were treated with increasing concentrations of



**Figure 2.** Effect of OXA treatment on NF- $\kappa$ B activation in HT29 and HTOXAR3 cells. Representative western blot images showing protein expression changes of phosphorylated p65 (p-p65 Ser536), phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$  (p-I $\kappa$ B $\alpha$  Ser32/36), Survivin, Bcl-2 and Cyclin D1 in HT29 and HTOXAR3 cells after treatment with 10  $\mu$ M or 30  $\mu$ M of OXA respectively, for 0 to 120 minutes (a) and for 24 hours (b,c) Bar graphs representing mean  $\pm$  SEM expression changes of the indicated proteins after a 24-hour OXA treatment with the corresponding IC50 dose for HT29 (10  $\mu$ M) and HTOXAR3 (30  $\mu$ M). Alpha-tubulin was used as endogenous control. (d) Western blots showing p65 protein expression in cytoplasmic and nuclear extracts of HT29 cells after OXA treatment at short exposure times (0 to 60 min) and at 24 hours (e). TNF $\alpha$  was used as positive control at 50 ng/mL. Msh2 and  $\alpha$ -tubulin were used as nuclear- and cytoplasmic-specific protein controls, respectively. NT: Non-treated cells. Results shown were obtained from at least 3 independent experiments. \*p-value < 0.05 and \*\*p-value < 0.01; as compared to NT. #p-value < 0.05 relative to protein expression in the HT29 cell line.

Curcumin for 24 h. Curcumin decreased cell proliferation of all cell lines in a dose-dependent manner (IC<sub>50</sub> range 9.5–14.6  $\mu$ M). Importantly, HTOXAR3 and LoVOXAR3 (Supplementary Fig. S2a,b) cells were more resistant to Curcumin treatment as compared with HT29 and LoVo cell lines whereas DLDOXAR3 cells were more sensitive than their parental sensitive cell line, DLD1 (Supplementary Fig. S2c). Next we wanted to determine the most synergistic combination between OXA and Curcumin. To do that, HTOXAR3 resistant cells were treated with different combination schedules, with the most synergistic being the concomitant treatment of both drugs for 24 h, where the CI was < 1 from IC<sub>40</sub> onwards, CI = 1 at IC<sub>30</sub> and was slightly higher than 1 at very low doses (IC<sub>10</sub> and 20) (Fig. 3a). Therefore, we decided to use this combination in order to evaluate the effect of Curcumin on the reversion of OXA-acquired resistance in our models. We observed that this schedule significantly decreased cell proliferation of both HT29 and HTOXAR3 cell lines (Fig. 3b,c) as compared with individual treatments. Remarkably, this reduction of cell viability was more evident in the HTOXAR3 cell line where in fact the combined treatment was able to revert the OXA-acquired resistance phenotype leading to a 65% reduction in the OXA IC<sub>50</sub> (10.6  $\pm$  2.2  $\mu$ M with the combination vs. 30.2  $\pm$  4.2  $\mu$ M in individual treatment) and brought it closer to that of the HT29 sensitive cell line (8.45  $\pm$  1.6  $\mu$ M) (Fig. 3d). While in the HT29 cell line, the combination of Curcumin plus OXA was additive at the IC<sub>50</sub> of these drugs and synergistic at doses higher than the IC<sub>50</sub>, in the resistant HTOXAR3 cells, the treatment started to be synergistic at the IC<sub>50</sub> (Fig. 3e). Clonogenic assays revealed that while both drugs reduced the number of colonies as compared with untreated cells, their combination led to a complete absence of colonies in both HT29 and HTOXAR3 cells (Fig. 3f). In order to determine if these results could be explained by an increased cell death after the combined treatment, HT29 and HTOXAR3 cells were treated with OXA, Curcumin or their combination at their respective IC<sub>50</sub> doses for 24, 48 and 72 h. As can be seen in Fig. 3g, OXA induced cell death rates below 25% after 72 h of treatment in both cell lines while in the case of Curcumin alone these rates were less than 10% in all cases. However the percentage of dead cells was increased after treatment with OXA plus Curcumin for 72 h in HT29 cells and for 48 and 72 h in HTOXAR3 only as compared with Curcumin alone. Similar results were obtained in the LoVo/LoVOXAR3 pair although an additive effect was observed only at high doses (IC<sub>90</sub>) of the two drugs in both cell lines (Supplementary Fig. S3).

In summary, these results suggest that the addition of Curcumin to OXA treatment sensitizes CRC cells to the latter, with this effect more evident in the OXA-resistant cell lines.

#### Curcumin inhibits the OXA-induced activation of NF- $\kappa$ B and decreases the expression of NF- $\kappa$ B anti-apoptotic and pro-proliferative gene products.

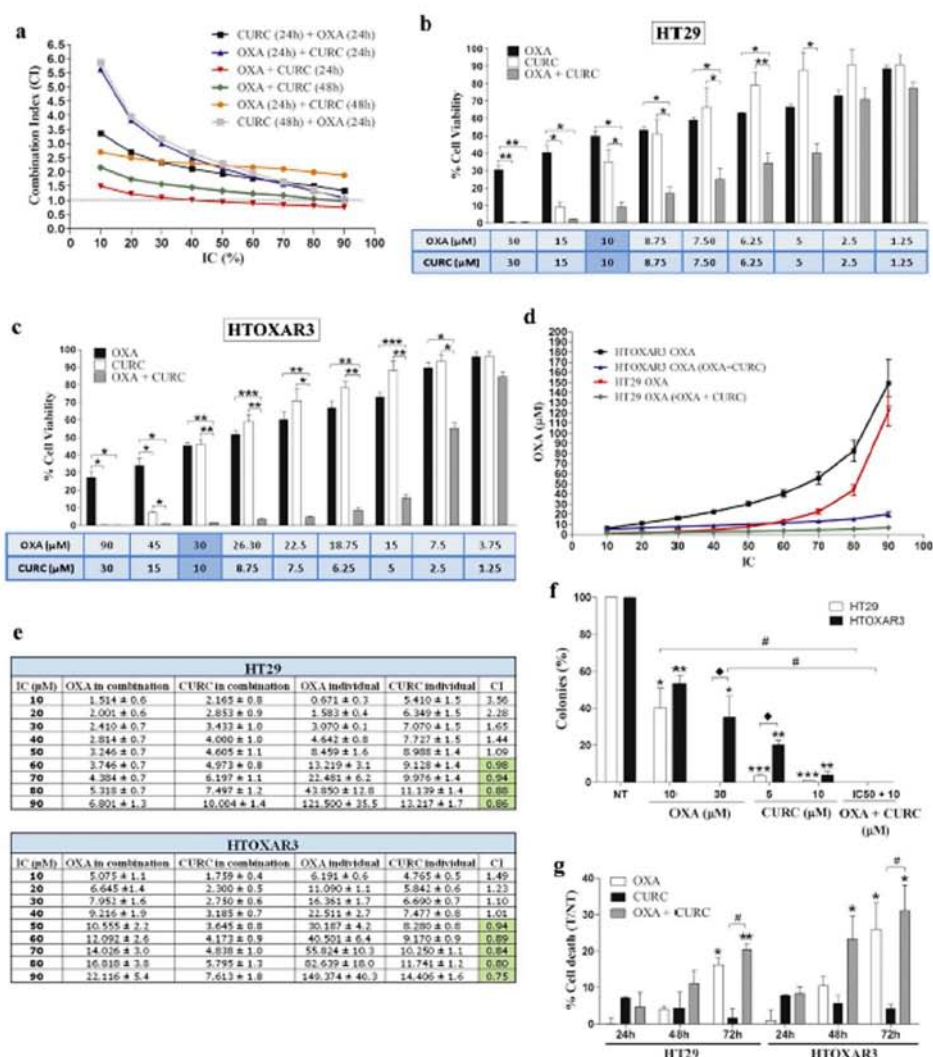
In view of our results, we wanted to study the effect of the addition of Curcumin on OXA treatment at the molecular level. We first investigated the effect of Curcumin as a single agent on NF- $\kappa$ B inhibition. HT29 and HTOXAR3 cells were treated with Curcumin at 10 and 20  $\mu$ M for 24 h. As expected, Curcumin decreased p65 phosphorylation and Survivin expression in a dose-dependent manner in both cell lines (Fig. 4a). Next, both cell lines were treated with OXA and OXA plus Curcumin at IC<sub>50</sub> doses for short exposure times (0 to 120 min) and for 24 h. Results in Fig. 4b show that, in HT29/HTOXAR3 cells, the addition of Curcumin significantly decreased the OXA-induced phosphorylation of p65 ( $p < 0.001/p = 0.04$ ) and  $\kappa$ B $\alpha$  ( $p < 0.05/p = 0.02$ ) as well as the expression of Bcl-2 ( $p < 0.03/p < 0.01$ ), Survivin ( $p < 0.001/p = 0.02$ ) and Cyclin D1 ( $p < 0.001/p = 0.04$ ) after short treatment times. Similar results were observed after a 24 h-treatment, although they did not reach statistical significance (Fig. 4c). We also studied how the addition of Curcumin affected the OXA-induced p65 nuclear translocation. As shown in Fig. 4d,e, levels of nuclear p65 were decreased in all cases when HT29 cells were treated with OXA plus Curcumin as compared with OXA alone.

These results suggest that at least in part, the effects of Curcumin alone and in combination with OXA may be mediated by the inhibition of the NF- $\kappa$ B signalling cascade.

#### Treatment with Curcumin and OXA induces different gene expression patterns between OXA-sensitive and -resistant cell lines.

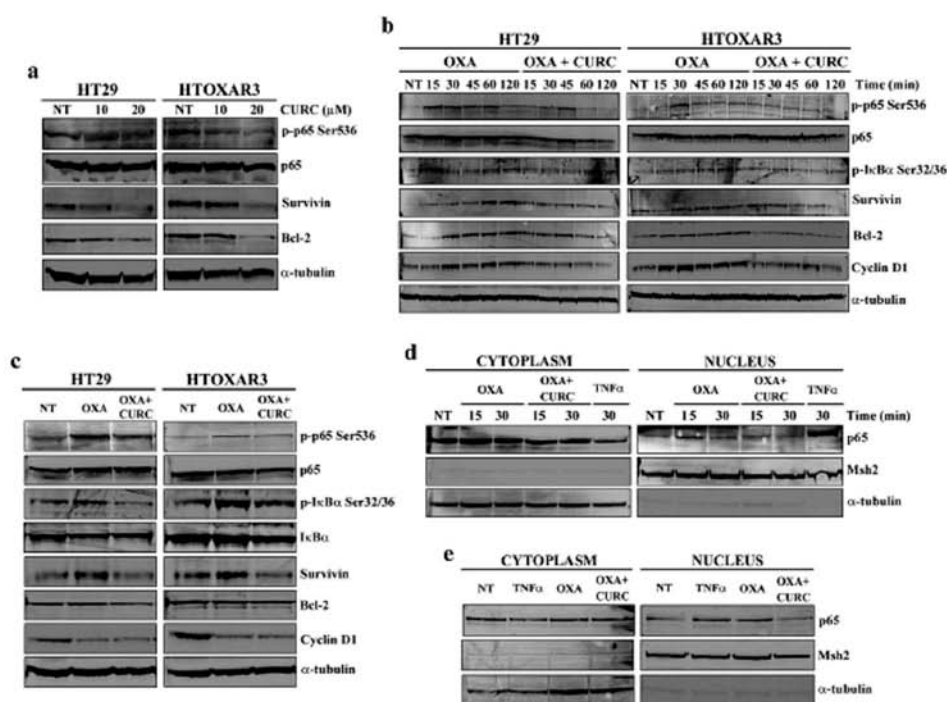
Our results indicate that the combination of Curcumin and OXA is more effective and synergistic in HTOXAR3 cell line, in which the NF- $\kappa$ B pathway is hyper-activated, as compared with its sensitive-parental cell line, HT29. Given that NF- $\kappa$ B is a transcription factor, we wanted to investigate whether a specific transcriptomic pattern was associated with this differential effect. Total RNA from HT29 and HTOXAR3 cells was obtained after vehicle treatment and after a 24 h-treatment with OXA or OXA plus Curcumin at IC<sub>50</sub> doses and global transcriptional profiling was assessed using microarrays. We were interested in genes that were altered as a consequence of the resistance acquisition process and at the same time, were differentially expressed after treatment with the combined treatment. At the significance cut-off thresholds ( $|FC| > 1.2$  and  $q\text{-value} < 0.05$ ) the results showed 4,237 regulated transcripts when comparing the two cell lines under basal conditions (among 36,204 genes including unique gene symbols and other transcripts). A total of 2,303 transcripts were up-regulated and 2,034 down-regulated in HTOXAR3 relative to HT29, confirming the involvement of multiple genes and pathways in OXA acquired resistance. There were 656 differentially regulated transcripts in the differential response analysis to combination treatment, 261 'up' and 395 'down' in HTOXAR3 relative to HT29 (Supplementary Table S2).

The intersection between both lists allowed us to identify 75 genes up-regulated by the combination treatment in HTOXAR3 relative to HT29 which were repressed under basal conditions, and 194 genes showing the opposite relationship (activated under basal conditions in HTOXAR3 cells and down-regulated by combination treatment in these cells than in the sensitive parental cell line, HT29) (Supplementary Figure S4). Exploratory functional enrichment analysis revealed the biological processes induced by the combination treatment (with GSEA overlap  $q\text{-values} < 0.00001$ ): interferon gamma response, complement, epithelial to mesenchymal transition (EMT) and TNF $\alpha$  signalling via NF- $\kappa$ B in the 194 gene list and the TNF $\alpha$  signalling via NF- $\kappa$ B in the 75 gene list (Supplementary Table S3). This is in agreement with the central role of the NF- $\kappa$ B pathway in our OXA resistance



**Figure 3.** Combination of OXA and Curcumin in OXA-sensitive and -resistant CRC cell lines. (a) Graphic representation of the Combination Index (CI) values corresponding to different OXA plus Curcumin (CURC) treatment schedules in the HTOXAR3 cell line. (b) Bar graphs representing mean ± SEM percentage of cell viability after a 24-hour treatment with OXA, Curcumin or their concomitant combination at the indicated doses in HT29 and HTOXAR3 cells (c). \*p-value < 0.05; \*\*p-value < 0.01; \*\*\*p-value < 0.001 relative to the indicated treatment condition. (d) OXA doses (mean ± SEM) corresponding to indicated inhibitory concentrations (IC) in HT29 and HTOXAR3 cells as a single agent or when combined with Curcumin concomitantly for 24 h. (e) OXA and Curcumin doses (mean ± SD) corresponding to the indicated inhibitory concentrations (IC) when given as single agents or in a 24-h-concomitant schedule in HT29 and HTOXAR3. CI represents the combination index values in each case. Synergistic values (CI < 1) are highlighted in green. (f) Bar graph representing the percentage (mean ± SEM) of colonies in HT29 and HTOXAR3 cells after 24 h of the indicated treatments. \*p-value < 0.05; \*\*p-value < 0.01; \*\*\*p-value < 0.001 relative to NT (Non-treated cells). †p-value < 0.05 relative to OXA individual treatment. ‡p-value < 0.05 as compared to HT29. (g) Bar graph representing the percentage (mean ± SEM) of dead cells after 24, 48 and 72 h of treatment with OXA, Curcumin or their combination (as compared to non-treated controls) at their corresponding IC50 doses in HT29 and HTOXAR3 cell lines. \*p-value < 0.05; \*\*p-value < 0.01, relative to NT. †p-value < 0.05, relative to Curcumin individual treatment.

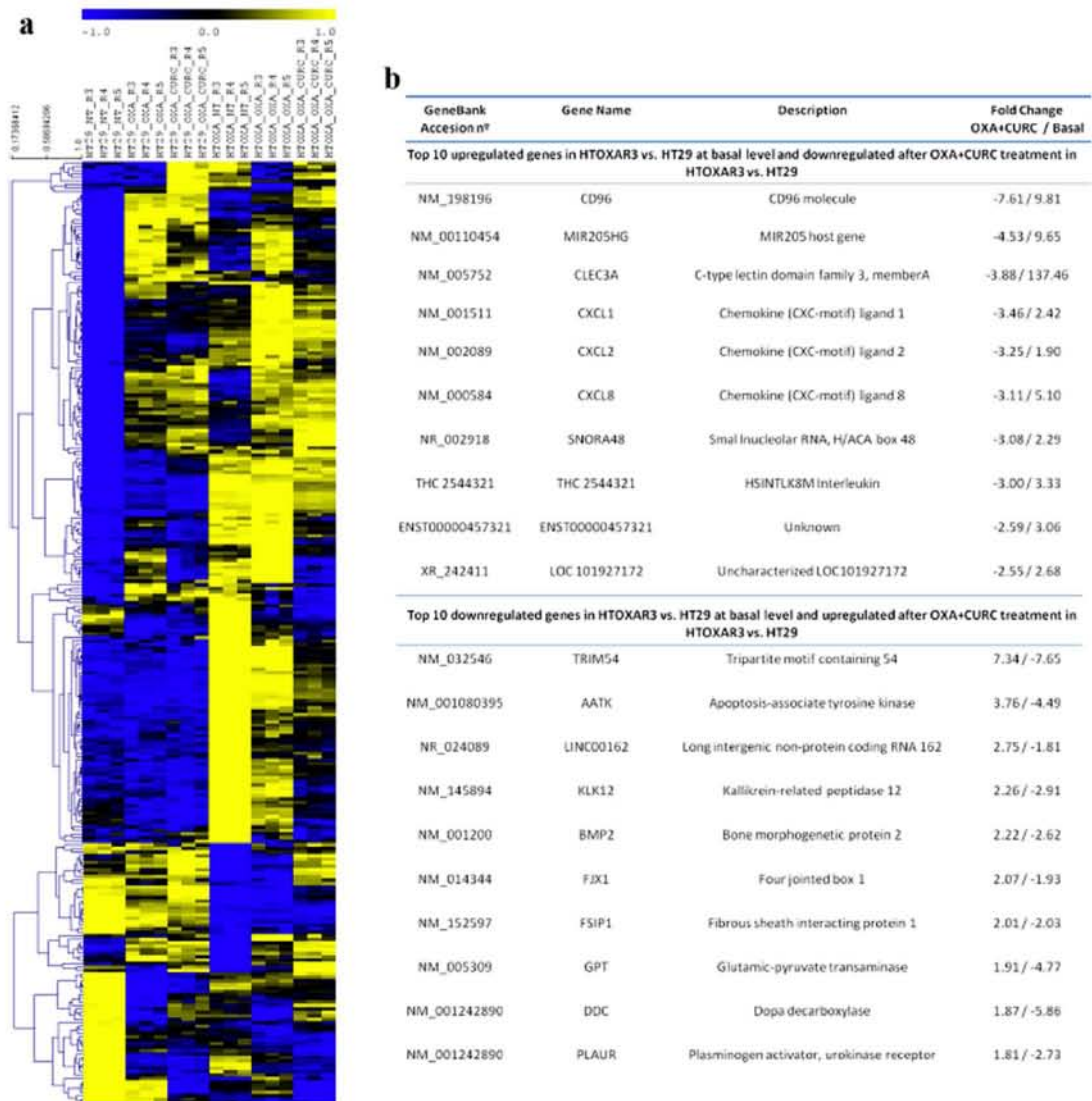
acquisition model and supports the coherence of our dataset with prior evidence. In addition it would support the proposed mechanism of action by Curcumin acting through the same pathway.



**Figure 4.** Effect of Curcumin on constitutive and OXA-induced NF- $\kappa$ B activation. (a) Western blot images of phosphorylated p65 (p-p65 Ser536), total p65, Survivin and Bcl-2 in HT29 and HTOXAR3 cells after a 24-hour treatment with 10 and 20  $\mu$ M Curcumin (CURC). (b) Representative western blot images showing protein expression changes as indicated, in HT29 and HTOXAR3 cells after 24 h treatment with OXA or concomitant OXA plus Curcumin, for 0 to 120 minutes or 24 hours (c,d) Western blots showing p65 protein expression in cytoplasmic and nuclear extracts of HT29 cells after treatment with OXA (10  $\mu$ M) or OXA + Curcumin (10  $\mu$ M each) for short-time exposure (0 to 30 min) or 24 h (e). TNF $\alpha$  was used as positive control at 50 ng/ml. Msh2 and  $\alpha$ -tubulin were used as nuclear- and cytoplasmic-specific protein controls, respectively. Images are representative of at least 3 independent experiments. NT: Non-treated cells.

Among the top 10 genes fitting these criteria (Fig. 5) we observed that three pro-inflammatory CXC-chemokines, *CXCL8* (Interleukin-8), *CXCL1* (Gro- $\alpha$ ) and *CXCL2* (Gro- $\beta$ ) that are primarily regulated by NF- $\kappa$ B<sup>35</sup> were significantly up-regulated at basal level, and were more efficiently down-regulated after treatment with OXA plus Curcumin in the resistant cell line. Accordingly, functional enrichment analysis revealed cytokine signalling as one of the two molecular functions significantly overrepresented in this condition (Supplementary Figure S5). These results were validated through qRT-PCR experiments, confirming a basal overexpression of *CXCL8* (~10-fold), *CXCL1* (~6-fold) and *CXCL2* (~2.5-fold) in HTOXAR3 cell line as compared with HT29 (Fig. 6a). The three chemokines were up-regulated after OXA treatment only in HT29 cells (*CXCL8* 3-fold, *CXCL1* 6-fold and *CXCL2* 2-fold; Fig. 6a). In the case of *CXCL2*, we observed a down-regulation in expression after OXA treatment in HTOXAR3 cells. Interestingly, the OXA-induced expression of *CXCL8* and *CXCL1* was significantly attenuated by the addition of Curcumin in the resistant cell line but not in the sensitive one (Fig. 6a). Down-regulation of *CXCL2* with regards to basal conditions was also observed in the HTOXAR3 cell line after concomitant treatment (Fig. 6a). In view of these results, we investigated the effect of a 24 h-treatment with Curcumin as a single agent at different doses, on the expression of *CXCL8* and *CXCL1* observing a significant reduction in a dose-dependent manner only in the resistant cell line while in HT29 cells, this reduction was only observed at very high doses (Fig. 6b). ELISA-based analysis of HT29 and HTOXAR3 conditioned media revealed similar results at protein-secreted levels (Fig. 6c).

***CXCL8* and *CXCL1* siRNA-mediated gene silencing sensitizes HTOXAR3 resistant cells through the inhibition of the NF- $\kappa$ B signalling pathway.** To confirm the specific role of *CXCL8* and *CXCL1* on OXA resistance acquisition in HTOXAR3 cells, we transiently silenced their gene expression by using siRNA oligonucleotides. We assessed the cytotoxicity of OXA by MTT assay in control cells (siNTC) and *CXCL8* or *CXCL1* knockdown cells (si*CXCL8* or si*CXCL1*, respectively). Forty-eight hours after gene silencing, cells were seeded in 96-well plates and treated for 24 h with doses of OXA ranging 0–100  $\mu$ M. *CXCL8* and *CXCL1* knockdown efficiency was ~90% and ~60% at mRNA level, respectively (insets on Fig. 7a,b). Under these conditions, we found that *CXCL8* and *CXCL1* gene silencing in HTOXAR3 led to a 35% and a 20% decrease in OXA IC50 value as compared to siNTC cells, respectively (Fig. 7a,b).

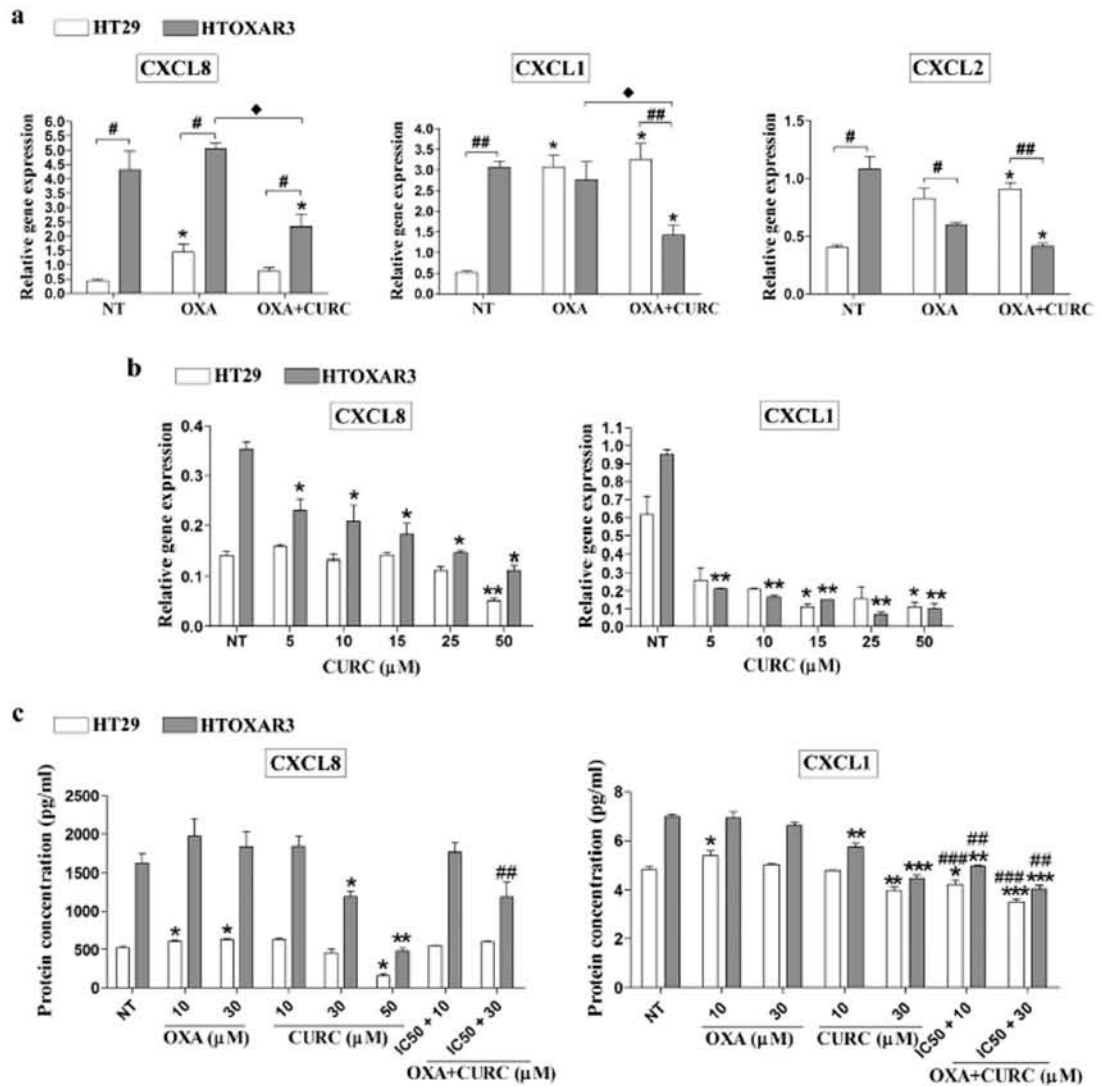


**Figure 5.** Gene expression patterns associated with OXA resistance and Curcumin + OXA synergism. (a) Hierarchical clustering of genes using Pearson correlation as distance and average linkage with leaf order optimization. Cluster analysis was performed with TMEV version 4.8.1 using normalized expression values (mean subtracted log<sub>2</sub> intensities divided by the standard deviation of the log<sub>2</sub> intensities for each gene) (b) Table showing the top 10 up and down-regulated genes ranked by basal fold change between basal levels between HTOXAR3 and HT29 with regulation reversed by concomitant treatment.

CXCL8 and CXCL1 have been reported to act as autocrine growth factors through the induction of NF-κB transcriptional activity<sup>10,36–38</sup>. Thus, we investigated NF-κB activation by western blot under CXCL8 and CXCL1 gene silencing conditions. As expected, phosphorylated IκBα and Bcl-2 and Survivin protein expression levels were decreased in siCXCL8 and siCXCL1 cells as compared with siNTC cells. We also observed a decrease in Akt phosphorylation after silencing of both genes (Fig. 7c,d).

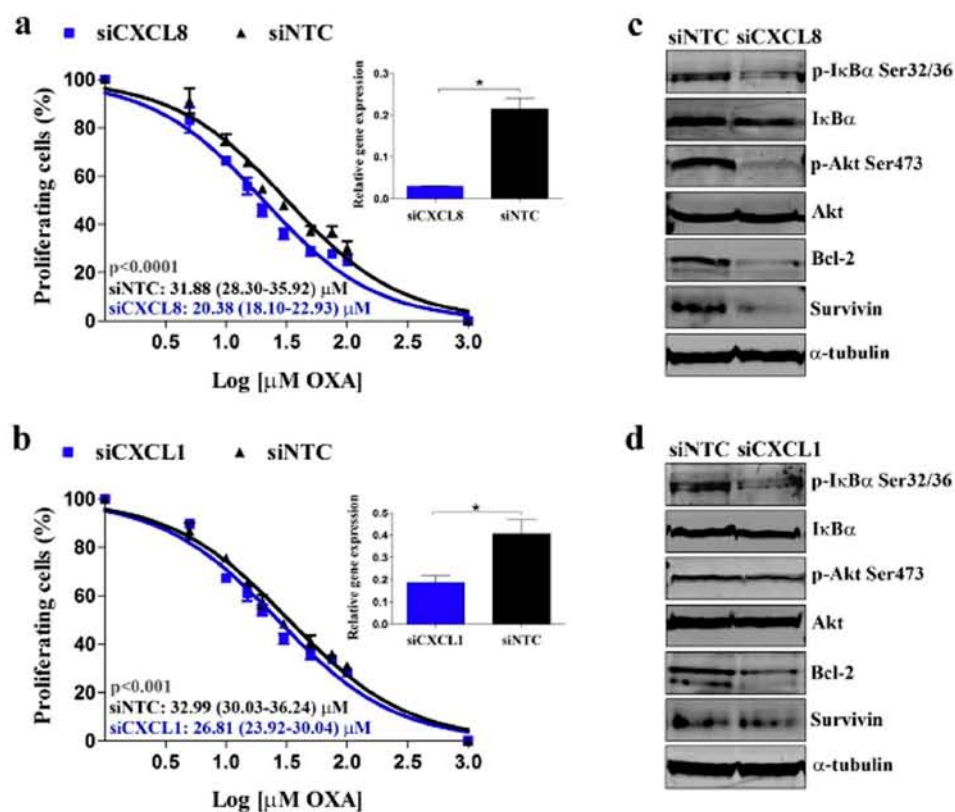
Globally, our results support first, the probable role of CXCL8 and CXCL1 chemokines in the OXA resistance acquisition process through the activation of the Akt/NF-κB pathway and second, their implication in the synergism and greater efficacy of OXA plus Curcumin treatment in OXA-resistant cells. Accordingly, the expression levels of CXCL8 and CXCL1 could be used as predictive markers of this combination's effectiveness.

**Evaluation of CXCL8 and CXCL1 as predictive markers of OXA plus Curcumin treatment effectiveness.** In order to evaluate the potential of CXCL8 and CXCL1 as predictive biomarkers of OXA plus



**Figure 6.** *CXCL1*, *CXCL8* and *CXCL2* gene expression and *CXCL1* and *CXCL8* secreted protein levels after treatment with OXA, Curcumin or both. (a) Bar graphs illustrating relative gene expression levels (mean ± SEM) of the indicated chemokines in non-treated (NT) and after OXA or OXA plus Curcumin (CURC) treatment at IC50 doses in HT29 and HTOXAR3 cells. Gene expression levels of β-actin were used as endogenous control. \*p-value < 0.05 relative to NT, #p-value < 0.05; ##p-value < 0.01, relative to HT29. \*p-value < 0.05 relative to OXA. (b) Changes in chemokines' gene expression after treatment with Curcumin at indicated doses. (c) Graph bars showing levels of secreted chemokines (mean ± SEM) measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the supernatants of treated cells as indicated. \*p-value < 0.05; \*\*p-value < 0.01; \*\*\*p-value < 0.001 relative to NT. #p-value < 0.01, ###p-value < 0.001 relative to OXA. Results were obtained from at least 3 independent experiments.

Curcumin treatment response, we analysed gene expression of both chemokines in a panel of 8 FFPE samples from explant cultures of CRC patients-derived liver metastases, that were treated with OXA or OXA plus Curcumin or vehicle (DMSO) for 24h. Response to each treatment was assessed by means of decreasing proliferation and/or apoptosis activation as indicated by ki-67 and cleaved caspase-3 immunohistochemistry staining, respectively<sup>34</sup>. The RNA concentrations obtained from these samples ranged (20–75 ng/μL) and under our qRT-PCR conditions we were unable to detect *CXCL8* expression. According to our *in vitro* results, we observed an increase of *CXCL1* expression in 6/8 explants treated with OXA that was attenuated by the addition of Curcumin in 5/6 explants (Fig. 8a,b). We then studied the expression patterns of *CXCL1* according to "response" to treatment. To do this, we assigned each case a score according to changes in ki-67 and cleaved caspase 3 staining after treatments (compared to vehicle). Thus, a score of 2 meant that ki-67 decreased and cleaved caspase 3



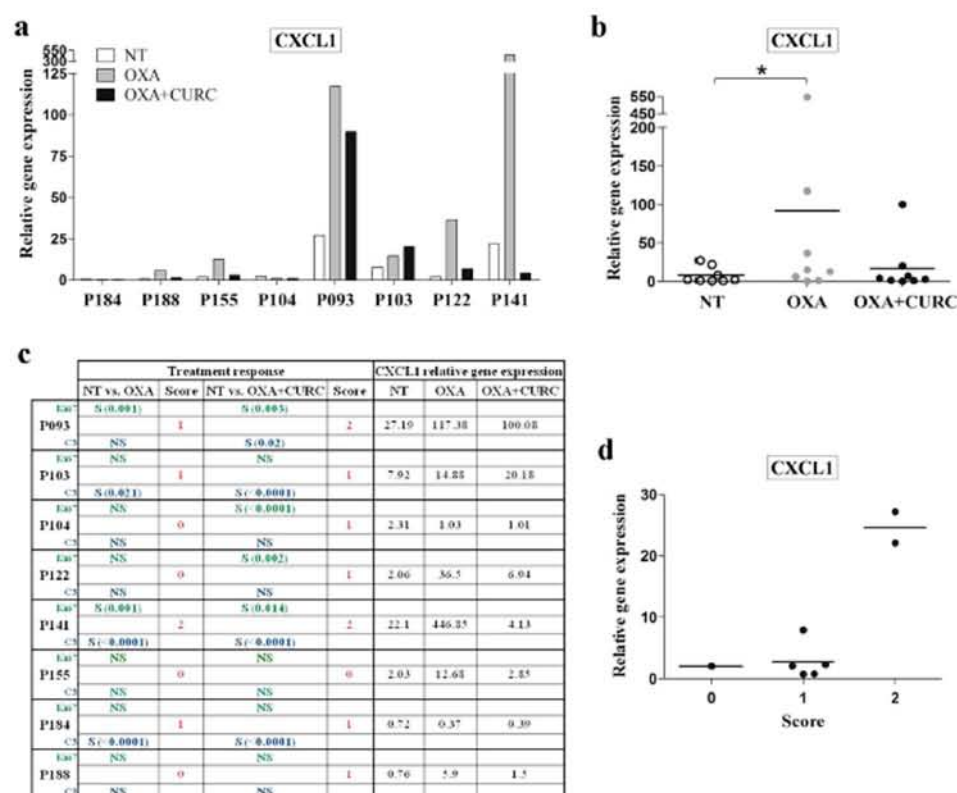
**Figure 7.** Effect of *CXCL8* and *CXCL1* siRNA-mediated gene silencing on OXA cytotoxicity and NF- $\kappa$ B signalling pathway activation in HTOXR3 cells. (a) Dose-response curves for HTOXR3 cell line, after *CXCL8* and (b) *CXCL1* gene silencing, treated with 0–100  $\mu\text{M}$  OXA for 24 hours (mean  $\pm$  SEM). Insets show siRNA-mediated gene silencing efficiency at 48 h post-transfection. IC50 values are indicated as mean (95% CI). (c) Representative western blot images showing changes in phosphorylated I $\kappa$ B $\alpha$  (p-I $\kappa$ B $\alpha$  Ser32/36), phosphorylated Akt (p-Akt Ser473), Survivin, Bcl-2 and Cyclin D1 protein expression in HTOXR3 cells under control (siNTC) and *CXCL8* (siCXCL8) or (d) *CXCL1* (siCXCL1) gene silencing. All results were obtained from at least 3 independent experiments.

increased significantly after treatment; score 1 meant that ki-67 decreased or cleaved caspase 3 increased and score 0 meant that neither of them was changed according to this criteria. Interestingly, other authors have used a similar approach before<sup>39</sup>. As shown in Fig. 8c, explants p93 and p141 were the only ones with a score = 2 when treated with Curcumin + OXA and interestingly, they had the highest *CXCL1* basal levels as compared to explants with score 1 or 0. Although these results were obtained in a very few cases, they are in agreement with those obtained *in vitro* supporting the idea that those patients whose tumours present high *CXCL1* levels (basally or after treatment with OXA-based chemotherapy) would be suitable candidates to be treated with a combination of Curcumin plus OXA (Fig. 8d). Whether this also applies to *CXCL8*, remains to be elucidated. Further clinical studies are on going in order to investigate these hypotheses.

## Discussion

Chemotherapy schedules based on OXA combinations are essential in the clinical management of metastatic CRC patients. However, resistance phenomena remain one of the principal problems hindering treatment success. In previous work we found that the deregulation of the NF- $\kappa$ B signalling pathway could be an important mechanism of OXA-resistance acquisition in our *in vitro* models<sup>12</sup>. The role of elevated NF- $\kappa$ B activity in the resistance of CRC cells to OXA-induced cell death was previously demonstrated<sup>30</sup> and in agreement with other studies<sup>40</sup>, results presented here indicate that NF- $\kappa$ B is constitutively active in all the CRC cell lines examined; however, we found that those cell lines with acquired resistance to OXA exhibited an increased activation of this pathway as compared to their matched sensitive parental cells, especially the HTOXR3 resistant model, suggesting a role for NF- $\kappa$ B and its downstream targets in the development of the drug-resistant phenotype. This fact was reported to be associated with the acquisition of a mesenchymal phenotype along the OXA-resistance acquisition process<sup>41,42</sup> and according to this, our exploratory functional enrichment analysis revealed EMT as one of the top hallmarks in the list of genes that were up-regulated in HTOXR3 cell line in comparison with





**Figure 8.** CXCL1 gene expression in explant cultures of patient-derived tissues after treatment with OXA or OXA + Curcumin. (a) Bar graph illustrating CXCL1 expression levels in 8 FFPE samples from explant cultures of CRC patients-derived liver metastases, that were treated with DMSO (NT), OXA or OXA plus Curcumin (CURC) for 24 h. (b) Scattergram reporting the expression levels of CXCL1 in NT, OXA or OXA plus Curcumin treated tissue explants. Horizontal lines represent mean values. (c) Table showing significant (S) or not significant (NS) changes in ki-67 (green) and cleaved caspase 3 (C3, blue) staining. Score 2 meant that ki-67 decreased and cleaved caspase increased significantly after the indicated treatment; score 1 meant that ki-67 decreased or cleaved caspase increased and score 0 meant that neither of them was changed. CXCL1 gene expression changes after NT, OXA or OXA + Curcumin treatment are also shown. (d) Scatter plot showing CXCL1 expression according to score values. Horizontal lines represent mean values. \*p-value < 0.05 relative to NT (Wilcoxon test).

HT29 cells (Supplementary Table S3). Therefore our results could be explained in part by an EMT process in OXA resistant cells.

Similarly to other conventional anticancer drugs<sup>43,44</sup>, administration of OXA further potentiates NF-κB activity, increasing transcriptional regulation and expression of anti-apoptotic genes<sup>10</sup>. Consistent with this, our results indicate that OXA activates NF-κB in HT29 and HTOXR3 cell lines through the classical pathway: IκBα and p65 phosphorylation, p65 nuclear translocation and expression of NF-κB-regulated genes, including Bcl-2 and Survivin. However, in agreement with other authors, we did not observe IκBα degradation after OXA exposure. It seems that HT29 cells display a NF-κB-dependent inflammatory response with final induction of target genes expression but at the same time, they are unable to degrade IκBα, probably because of a defective proteasome system or by low levels of IKK activation<sup>31,45,46</sup>. Importantly, we observed that NF-κB activation occurred very rapidly after OXA treatment, probably through the activation of death receptors, such as TNFR family<sup>47</sup>, but it was significantly sustained after treatment for 24 h only in the parental-sensitive HT29 cell line. This activation after OXA treatment could be due to the well-known capacity of OXA to induce both oxidative cellular stress and DNA damage. Differences observed between both cell lines could be explained by the tolerability of HTOXR3 to this damage; this would be reinforced by the fact that most of the DNA repair genes found to be differentially expressed in our microarray experiments between sensitive and resistant cells, were overexpressed in the latter (17/25) while expression of genes encoding for DNA damage response proteins, were down-regulated in this cell line indicating an adaptation to DNA damage and in consequence contributing to an attenuated NF-κB activation after OXA treatment (Supplementary Table S4). We also observed a drastic reduction in Cyclin D1 protein levels after OXA treatment. Cyclin D1 regulates the G1 to S phase transition, being synthesized during

the G1 phase and degraded as the cell enters the S phase<sup>48</sup>. As other authors and we have reported, a 24-h OXA treatment causes S-phase accumulation in HT29 cells<sup>49,50</sup>; this effect could explain the Cyclin D1 protein decrease after this time of OXA treatment. Targeting of NF- $\kappa$ B has been explored extensively as a therapeutic strategy against cancer and Curcumin has been demonstrated to suppress NF- $\kappa$ B activation and NF- $\kappa$ B-dependent gene expression<sup>6</sup>. As expected, we found that Curcumin suppressed constitutive and OXA-induced NF- $\kappa$ B activation as well as proliferation<sup>13,21</sup> and it was able to sensitize CRC cells to OXA treatment. Indeed, the concomitant treatment of Curcumin and OXA led to a significant suppression of cell proliferation and colony formation as compared to either treatment alone in LoVo and HT29 cells. The combination was especially efficacious in their corresponding OXA-resistant derived LoVOXAR3 and HTOXAR3 cells. This observation was also reported by Howells *et al.*<sup>19</sup>. Drug combination experiments revealed that the concomitant treatment was more synergistic in the HTOXAR3 cell line than in the HT29 cell line and in fact, this treatment reverted the resistance to OXA in the former. However, under the same conditions, no synergism was found between the two drugs in the LoVo/LoVOXAR3 pair. These differences could be partly explained by differences of genetic features between the two *in vitro* models, by the fact that the NF- $\kappa$ B pathway was not so evidently hyperactivated in LoVOXAR3 cells or by the necessity to test specific combination schedules in these cell lines in order to find the most synergistic one in this model. We found this effect was not associated with an increase in cell death after 24 h treatment which was in line with other studies<sup>50</sup>. Taken together, these results are of paramount interest because they suggest that a suboptimal concentration of OXA could be used in combination with Curcumin leading to similar efficacy but minimizing toxicity.

We then wanted to know whether a specific gene expression pattern in the HTOXAR3 cell line was associated with the greater efficacy of OXA plus Curcumin. Three NF- $\kappa$ B-transcriptionally regulated CXC-chemokines, CXCL8, CXCL1 and CXCL2, were highly overexpressed as a result of OXA-resistance acquisition in the HTOXAR3 cell line and at the same time were specifically down-regulated after treatment with OXA plus Curcumin in these cells. These pro-inflammatory chemokines play an important role in regulating CRC progression, angiogenesis and metastasis<sup>51</sup>, processes that have been associated with OXA resistance<sup>42</sup>. The effect of chemotherapy on CXCL8<sup>52,53</sup>, CXCL1 and CXCL2<sup>54</sup> gene transcription has been described elsewhere. For example, Wilson *et al.* showed that OXA treatment induced CXCL8 and CXCL1 gene expression and potentiated NF- $\kappa$ B activation<sup>10</sup>. Similarly, we show that OXA treatment strongly induced CXCL8 and CXCL1 gene and protein expression only in the HT29 OXA-sensitive cells, which was in agreement with results of NF- $\kappa$ B activation after 24 h of treatment with OXA only in this cell line. Curcumin has been demonstrated to down-regulate the expression of CXCL1 and CXCL8<sup>55,56</sup>, interestingly the addition of Curcumin to OXA treatment suppressed these chemokines' expression only in the OXA-resistant HTOXAR3 cell line. In summary, this finding suggests the implication of these two chemokines in the observed greater efficacy and synergism of OXA and Curcumin in the OXA-resistant cells. We further demonstrated that overexpression of CXCL8 and CXCL1 is indeed affecting OXA-resistance acquisition since their gene silencing led to a significant although slight sensitization of HTOXAR3 cells.

CXCL8 and CXCL1 can be secreted and promote positive autocrine and/or paracrine feedback loops through their binding to the CXC receptors CXCR1 and CXCR2 which in turn activates the NF- $\kappa$ B signalling pathway<sup>10</sup>. We show that this also happened in our model as CXCL8 and CXCL1 gene silencing was associated with decreased phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  and reduced protein levels of Bcl-2 and Survivin in HTOXAR3 cells. Under these conditions we also observed a decrease in Akt phosphorylation, which suggests that at least in part, the observed NF- $\kappa$ B hyperactivation in the resistant cell line could be a result of an acquired increased activation of Akt. These results are supported by prior studies indicating that overexpression of CXCL8 causes phosphorylation of Akt and NF- $\kappa$ B activation in the HCT116 CRC cell line<sup>57</sup>. This signalling pathway has been associated with resistance to OXA in prostate cancer cells<sup>10</sup> and treatment with a CXCR2 antagonist such as SCH-527123, sensitizes cells to OXA in preclinical colon cancer models<sup>58</sup>. We propose that not only the inhibition of NF- $\kappa$ B *per se*, but also the binding of chemokines to receptors that activate this pathway could be useful strategies in increasing the efficacy of OXA in CRC. Finally, we tried to translate our results to the clinical setting. Facing the impossibility of finding samples from patients treated with Curcumin, we took advantage of previous work from our collaborators in which they utilised patient-derived colorectal liver metastases explant cultures treated with different schedules containing Curcumin<sup>34</sup>. In order to mimic our *in vitro* experiments, we chose those explants that were treated with OXA or OXA + Curcumin. We found that, treatment with OXA also induced the expression of CXCL1 that was repressed by the addition of Curcumin. Interestingly, the explants with best "response" to OXA + Curcumin, were those with the highest basal levels of CXCL1, suggesting that this chemokine could be a good predictive marker for this treatment. These results are not definitive yet they lead us to hypothesize that i) in some cases, the addition of Curcumin to OXA could lead to a more efficacious treatment, permitting dose reduction of the latter and avoiding toxicity; ii) combinations of Curcumin + OXA could be an effective treatment in metastatic CRC patients, including those that had progressed to an OXA-based first line. In this case, we have to be careful and take into account that those patients developing toxicity to the first-line treatment would not be candidates to a second-line with OXA and iii) the measurement of CXCL1 (and probably CXCL8) in tumours (but also in serum) could serve to identify those patients that are more likely to respond to OXA + Curcumin. Clinical trials such as the one that is being coordinated by the Howells' group in Leicester (NCT01490996; www.ClinicalTrials.gov) are warranted in order to validate these results and to establish the best conditions to include this compound in the clinical management of CRC patients.

## Materials and Methods

**Cell lines.** Human tumor-derived colorectal adenocarcinoma HT29, LoVo, and DLD1 cell lines (American Type Culture Collection) were used as the parental cells to obtain the oxaliplatin-resistant sublines HTOXAR3, LoVOXAR3 and DLDOXAR3, respectively as a result of continuous exposure to increasing doses of OXA as described previously<sup>12</sup>. Cell lines were grown as monolayer in RPMI 1640 (Invitrogen, Life Technologies) medium

(DLD1 and DLDOXAR3) and DMEM (Invitrogen, Life Technologies) medium (HT29 and HTOXAR3) supplemented with 10% of heat-inactivated FCS (Reactiva), 400 units/mL penicillin, 40 µg/mL gentamicin, 2 mmol/L L-glutamine (Sigma), and 10 mmol/L HEPES (Sigma). LoVo and LoVOXAR3 cells were grown in Ham's F-12 (Invitrogen, Life Technologies) with 20% FCS (Reactiva), 200 units/mL penicillin, and 20 µg/mL gentamicin. All cell lines were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. Cells were periodically tested for Mycoplasma contamination and were authenticated by short tandem repeat profiling.

**Samples from explant cultures of patient-derived tissues.** FFPE explant cultures were a gift of Dr. Lynne Howells (University of Leicester). Procedures for their obtaining, culture, treatment and response evaluation are described in<sup>34</sup>. These samples were obtained from tumours from patients undergoing surgical resection for colorectal liver metastases at University Hospitals of Leicester NHS Trust. Ethical approval for this fully anonymised, excess tissue study was granted by Leicestershire, Northamptonshire and Rutland Ethics Committee (REC reference 09/H0402/45). Additionally, the Clinical Research Ethical Committee from Hospital Germans Trias i Pujol provided approval for the study.

**Drugs.** OXA and Curcumin (Sigma) were prepared in water and in absolute ethanol respectively at a concentration of 10 mM and stored at –20 °C. Further dilutions of each drug were made in culture medium to final concentrations before use.

**Western blot analysis.** Cells were homogenized in RIPA plus buffer [Phosphate Buffered Saline (PBS); NP-40 1%; Na deoxycholate 0.5%; SDS 0.1%; EDTA 1 mM; NaF 50 mM; NaVO<sub>3</sub> 5 mM] containing a cocktail of EDTA-free protease inhibitors (Roche). Protein concentration was determined by the Bradford method by using the DC™ Protein Assay (Bio-Rad) and bovine serum albumin as a standard. Fifty micrograms of protein were loaded and subjected to electrophoresis in 10% SDS-PAGE gels (Invitrogen, Life Technologies) and transferred onto PVDF membranes (Bio-Rad). After 1 h of blocking (LICOR Biosciences) membranes were incubated overnight at 4 °C using specific primary antibodies against phospho-p65 Ser536 (Merck-Millipore, 1:2000), p65 (Cell Signaling, 1:1000), phospho-IκBα Ser32/36 (Cell Signaling 1:1000), IκBα (Abcam, 1:1000) Bcl-2 (Abcam, 1:1000), Cyclin D1 (Abcam, 1:1000), Survivin (Abcam, 1:1000), phospho-Akt (Cell Signaling, 1:1000) and Akt (Cell Signaling, 1:1000). Mouse monoclonal anti-α-tubulin antibody (Sigma Aldrich, 1:20000) was used as internal and cytoplasmic control. Anti-Msh2 antibody (Calbiochem, 1:500) was used as nuclear protein control. Membranes were incubated with IRDye rabbit and mouse secondary antibodies (1:10000) (LICOR Biosciences) for 50 minutes protected from the light. Membranes were scanned by using an Odyssey Imaging System and analyzed with Odyssey v2.0 software (LICOR Biosciences).

**Preparation of nuclear extracts.** The nuclear extracts were prepared according to Schreiber *et al.*<sup>59</sup>. Briefly, cells were washed with cold PBS and suspended in 0.4 ml hypotonic lysis buffer containing protease inhibitors and 0.5% Nonidet P-40 for 30 minutes. The homogenate was centrifuged, and supernatant containing the cytoplasmic extracts was stored frozen at –80 °C. The nuclear pellet was washed twice with lysis buffer and then resuspended in 50 µl ice-cold nuclear extraction buffer. After 30 minutes of intermittent mixing, the extract was centrifuged, and supernatants containing nuclear extracts were secured. The protein content was measured by the Bradford method by using the DC™ Protein Assay (Bio-Rad).

**Cell viability Assay.** The cytotoxicity of OXA, Curcumin and combination of both was assessed by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test (Roche Diagnostics). Cells were seeded in 96-well microtiter plates (Nunc) at a density of 1,500 (HT29 and HTOXAR3), 3,000 cells/well (LoVo and LoVOXAR3) and 4,000 cells/well (DLD1 and DLDOXAR3). Cells were treated with different drug concentrations for 24 h. Subsequently, the drug was removed and fresh media was added to each well. Cells were allowed to grow for 72 h. MTT was then added and doses for each fraction of survival (ranging from 10% to 90% of cell viability) were determined in each cell line by the median-effect line method. The maximum concentration of absolute ethanol (Curcumin vehicle) used was 0.3% which did not affect cell proliferation in our experiments.

**Analysis of combined drug effects.** Cell viability was assessed by MTT assay, as described above, and data were analyzed by Chou and Talalay method<sup>60</sup>. The analysis of combined drug effects was performed in each experiment with serial dilution of both drugs administered at doses that typically correspond to 1/8, 1/4, 1/2, 5/8, 3/4, 7/8, 1, 1.5 and 3 of the individual IC50 values. Fractional survival was then calculated by dividing the number of cells in drug-treated plates by the number of cells in control plates. Data was subsequently analyzed by the method of Chou and Talalay. For each level of cytotoxicity, a parameter called combination index (CI) was then calculated according to the following equation:  $CI = D1/(Df)1 + D2/(Df)2 + \alpha \cdot D1 \cdot D2 / (Df)1 \cdot (Df)2$ ; where (D1) and (D2) are the concentrations of the combination required to produce survival *f*; (Df)1 and (Df)2 are the concentrations of the individual drugs required to produce *f*, and  $\alpha = 1$  or 0 depending on whether the drugs are assumed to be mutually nonexclusive or mutually exclusive, respectively, in their action. For Curcumin and OXA combination we considered an  $\alpha = 1$  since they have a mutually exclusive mechanism of action. According to this method, synergism is indicated by  $CI < 1$ , antagonism by a  $CI > 1$ , and additivity by  $CI = 1$ .

**Colony-formation assay.** Colony-formation assays were also performed to evaluate the cytotoxicity of OXA, Curcumin and their combination. Briefly, cells were plated in 6-well plates at a density of 300 cells/well (HT29 and HTOXAR3) or 500 cells/well (LoVo and LoVOXAR3) and allowed to attach. The next day, different dilutions of the corresponding drugs were added for 24 h. After exposure, cells were washed in PBS and cultured in free media until colonies were formed (10 days). Cells were subsequently washed, fixed with a Methanol/acetic

acid (3:1) solution for 10 min and stained with a solution of crystal violet (0,5%) for 10 min. After staining, cells were thoroughly washed with PBS. Colonies were counted manually.

**Gene silencing.** Interfering RNA (siRNA) was used to generate specific knockdowns of *CXCL8* and *CXCL1* in the HTOXAR3 cell line. Cells were seeded at 60% confluence in serum and antibiotic-free OptiMem medium (Invitrogen, Life Technologies) in 6-well plates. *CXCL8* and *CXCL1* were transiently silenced by using a pool of 4 different siRNAs (Smartpool On-target plus: *CXCL8* siRNA, #L-004756; *CXCL1* siRNA, #L-003898; Dharmacon, GE, respectively). As a transfection agent we used Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. A silencer negative transcription control (Cat No. AM4611; Ambion) was introduced in each experiment. Following 24 h of transfection, medium was replaced with full DMEM medium supplemented with serum and antibiotic. Validation of *CXCL8* and *CXCL1* knockdown was assessed by qRT-PCR. In fine-tuning experiments, non-transfected cells (Mock) were introduced to ensure that transfection had minimal effects on gene expression, proliferation and cell viability.

**Quantitative RT-PCR.** Gene expression experiments were performed as described in previous work<sup>12</sup>. Retrotranscription was performed with MMLV reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies) in accordance to the manufacturer's instructions. Then, 2  $\mu$ L of each RT reaction was amplified in a LightCycler<sup>®</sup> 480 PCR system (Roche), using the KAPA SYBR Fast Master Mix (KAPA Biosystems, Woburn, MA, USA). Primer pairs used are listed in Supplementary Table S1. The PCR product size generated with these primers was 155 bp for *CXCL8*, 104 bp for *CXCL1* and 113 bp for *CXCL2*. Relative gene expression quantification was calculated according to the comparative Ct method as described elsewhere using  $\beta$ -Actin (Applied Biosystems) as endogenous control. In all experiments, only triplicates with a Ct value lower than 0.20 SD were accepted. In addition, for each sample analyzed, a retrotranscriptase minus control was run in the same plate to ensure absence of genomic DNA contamination.

**ELISA assay.** Culture supernatants were collected 24 h post-treatment with OXA, Curcumin or their combination. *CXCL8* and *CXCL1* secretion was measured with the IL-8 OptEIA ELISA Set (Becton Dickinson) and the RayBio Human GRO-alpha ELISA kit (RayBiotech), respectively; following the manufacturer's instructions.

**Propidium iodide test.** OXA and Curcumin-induced cell death was measured by using Propidium Iodide (PI). After 24, 48 and 72 h of treatment with OXA, Curcumin or the combination of both, cells were harvested with Accutase (ref. A11105-01, Invitrogen) and resuspended in cold PBS with a PI concentration of 3  $\mu$ M. The PI fluorescence was determined on a FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry System).

**Immunofluorescence analysis.** Subcellular localization of p65 (NF- $\kappa$ B) was detected by immunofluorescence, as described in previous work<sup>49</sup>.

**Microarray gene expression profiling.** We used Agilent HumanV2 Microarrays for global gene expression profiling. 100 ng of total RNA was used as input for reverse transcription. cRNA was then fluorescently tagged with Cy3-CTP nucleotide by *in vitro* transcription using the low input quick Amp Labeling kit followed by hybridization, washing, scanning and image extraction using commercial software; all steps were performed strictly following the manufacturer's instructions (Agilent, Palo Alto, CA). Subsequent data pre-processing and analysis was as follows: raw data intensities were background corrected using normexp, and log<sub>2</sub>intensity distributions were made comparable between samples using quantile normalization. Differential gene expression was assessed by fitting to an empirical Bayesian linear model. Statistical significance in differential gene expression was determined by setting a false discovery rate applying the Benjamini and Yekutieli method for multiple testing adjustment correction. For analysis we used the Limma package and the R statistical programming environment<sup>61</sup>.

We analyzed total RNA obtained from 3 biological replicates of 3 conditions: basal without treatment, OXA individual treatment and OXA plus Curcumin in 2 cell lines (HT29 and HTOXAR3). Data are publicly available and can be accessed with the GSE76092 identifier in the GEO database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

To look for differentially expressed genes following desired patterns of gene expression we first applied a dual filter applying as cut-off an absolute fold change |FC| > 1.2 and a q-value < 0.05 on each specific comparison. Then the intersection between lists was computed and Venn diagrams were plotted using Venny 2.02 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)

**Functional enrichment analysis.** To explore relevant enrichment in gene ontology categories within the genes found in the intersection between significantly regulated gene list, we used GOrilla web server tool<sup>62,63</sup>. For independent confirmation we also used the GSEA<sup>64</sup> gene set investigation tool (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/annotate.jsp>) and computed significant overlaps with GO 'C5' molecular function 'MF' gene sets as well as the 'H' gene set collection (hallmarks, a collection of 50 sets representing specific well defined biological states or processes identified by extracting coherent representatives from gene set overlaps in the version available November 20 2015 [http://www.broadinstitute.org/cancer/software/gsea/wiki/index.php/MSigDB\\_v5.0\\_Release\\_Notes](http://www.broadinstitute.org/cancer/software/gsea/wiki/index.php/MSigDB_v5.0_Release_Notes))

**Statistical analysis.** Data are presented as mean  $\pm$  SEM of at least 3 independent experiments and the statistical analysis was performed with Graphpad Prism V.4 software. Statistical differences between IC50 were determined by graphic representation of dose-response curves and subsequent non-linear regression analysis and F-test. Comparisons among different experimental conditions were carried out through the T-student or two-way ANOVA test followed by Bonferroni post-test. Values of  $p \leq 0.05$  were considered significant.

## References

- Fakih, M. G. Metastatic colorectal cancer: current state and future directions. *J Clin Oncol* **33**, 1809–1824, doi: JCO.2014.59.7633 (2015).
- Grothey, A. & Goetz, M. P. Oxaliplatin plus oral fluoropyrimidines in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* **4** Suppl 1, S37–42 (2004).
- Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **7**, 573–584, doi: 10.1038/nrc2167 (2007).
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B. & Johnston, P. G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* **13**, 714–726, doi: 10.1038/nrc3599 (2013).
- Martinez-Balibrea, E. *et al.* Tumor-Related Molecular Mechanisms of Oxaliplatin Resistance. *Mol Cancer Ther* **14**, 1767–1776, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0636 (2015).
- Kim, H. J., Hawke, N. & Baldwin, A. S. NF- $\kappa$ B and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death Differ* **13**, 738–747, doi: 10.1038/sj.cdd.4401877 (2006).
- Wang, S., Liu, Z., Wang, L. & Zhang, X. NF- $\kappa$ B signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. *Cell Mol Immunol* **6**, 327–334, doi: 10.1038/cmi.2009.43 (2009).
- Xia, Y., Shen, S. & Verma, I. M. NF- $\kappa$ B, an active player in human cancers. *Cancer Immunol Res* **2**, 823–830, doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0112 (2014).
- Hoese, B. & Schmid, J. A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* **12**, 86, doi: 10.1186/1476-4598-12-86 (2013).
- Wilson, C. *et al.* Chemotherapy-induced CXC-chemokine/CXC-chemokine receptor signaling in metastatic prostate cancer cells confers resistance to oxaliplatin through potentiation of nuclear factor- $\kappa$ B transcription and evasion of apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther* **327**, 746–759, doi: 10.1124/jpet.108.143826 (2008).
- Jani, T. S., DeVecchio, J., Mazumdar, T., Agyeman, A. & Houghton, J. A. Inhibition of NF- $\kappa$ B signaling by quinacrine is cytotoxic to human colon carcinoma cell lines and is synergistic in combination with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) or oxaliplatin. *J Biol Chem* **285**, 19162–19172, doi: 10.1074/jbc.M109.091645 (2010).
- Martinez-Cardus, A. *et al.* Pharmacogenomic approach for the identification of novel determinants of acquired resistance to oxaliplatin in colorectal cancer. *Mol Cancer Ther* **8**, 194–202, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0659 (2009).
- Hanif, R., Qiao, L., Shiff, S. J. & Rigas, B. Curcumin, a natural plant phenolic food additive, inhibits cell proliferation and induces cell cycle changes in colon adenocarcinoma cell lines by a prostaglandin-independent pathway. *J Lab Clin Med* **130**, 576–584, doi: S0022-2143(97)90107-4 (1997).
- Aggarwal, B. B., Kumar, A. & Bharti, A. C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* **23**, 363–398 (2003).
- Shishodia, S., Chaturvedi, M. M. & Aggarwal, B. B. Role of curcumin in cancer therapy. *Curr Probl Cancer* **31**, 243–305, doi: 10.1016/j.cupr.2007.04.001 (2007).
- Shishodia, S., Amin, H. M., Lai, R. & Aggarwal, B. B. Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive NF- $\kappa$ B activation, induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochem Pharmacol* **70**, 700–713, doi: 10.1016/j.bcp.2005.04.043 (2005).
- Tomita, M. *et al.* Curcumin (diferuloylmethane) inhibits constitutive active NF- $\kappa$ B, leading to suppression of cell growth of human T-cell leukemia virus type I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer* **118**, 765–772, doi: 10.1002/ijc.21389 (2006).
- Guo, L. D. *et al.* Curcumin combined with oxaliplatin effectively suppress colorectal carcinoma *in vivo* through inducing apoptosis. *Phytother Res* **29**, 357–365, doi: 10.1002/ptr.5257 (2015).
- Howells, L. M. *et al.* Curcumin ameliorates oxaliplatin-induced chemoresistance in HCT116 colorectal cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer* **129**, 476–486, doi: 10.1002/ijc.25670 (2011).
- Patel, B. B. *et al.* Curcumin enhances the effects of 5-fluorouracil and oxaliplatin in mediating growth inhibition of colon cancer cells by modulating EGFR and IGF-1R. *Int J Cancer* **122**, 267–273, doi: 10.1002/ijc.23097 (2008).
- Shakibaei, M. *et al.* Curcumin enhances the effect of chemotherapy against colorectal cancer cells by inhibition of NF- $\kappa$ B and Src protein kinase signaling pathways. *PLoS One* **8**, e57218, doi: 10.1371/journal.pone.0057218 (2013).
- Wang, Y. T., Liu, H. S. & Su, C. L. Curcumin-enhanced chemosensitivity of FDA-approved platinum (II)-based anti-cancer drugs involves downregulation of nuclear endonuclease G and NF- $\kappa$ B as well as induction of apoptosis and G2/M arrest. *Int J Food Sci Nutr* **65**, 368–374, doi: 10.3109/09637486.2013.871694 (2014).
- Yu, Y. *et al.* Elimination of Colon Cancer Stem-Like Cells by the Combination of Curcumin and FOLFOX. *Transl Oncol* **2**, 321–328 (2009).
- Dhillon, N. *et al.* Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **14**, 4491–4499, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0024 (2008).
- Cheng, A. L. *et al.* Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res* **21**, 2895–2900 (2001).
- Sharma, R. A. *et al.* Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res* **10**, 6847–6854, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0744 (2004).
- Prasad, S., Tyagi, A. K. & Aggarwal, B. B. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: the golden pigment from golden spice. *Cancer Res Treat* **46**, 2–18, doi: 10.4143/crt.2014.46.1.2 (2014).
- Bava, S. V. *et al.* Akt is upstream and MAPKs are downstream of NF- $\kappa$ B in paclitaxel-induced survival signaling events, which are down-regulated by curcumin contributing to their synergism. *Int J Biochem Cell Biol* **43**, 331–341, doi: 10.1016/j.biocel.2010.09.011 (2010).
- Ozes, O. N. *et al.* NF- $\kappa$ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401**, 82–85, doi: 10.1038/43466 (1999).
- Rakitina, T. V., Vasilevskaya, I. A. & O'Dwyer, P. J. Additive interaction of oxaliplatin and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in colon cancer cell lines results from inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B signaling. *Cancer Res* **63**, 8600–8605 (2003).
- Jobin, C., Haskill, S., Mayer, L., Panja, A. & Sartor, R. B. Evidence for altered regulation of I  $\kappa$ B alpha degradation in human colonic epithelial cells. *J Immunol* **158**, 226–234 (1997).
- Garcea, G. *et al.* Consumption of the putative chemopreventive agent curcumin by cancer patients: assessment of curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 120–125 (2005).
- Irving, G. R. *et al.* Prolonged biologically active colonic tissue levels of curcumin achieved after oral administration—a clinical pilot study including assessment of patient acceptability. *Cancer Prev Res (Phila)* **6**, 119–128, doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0281 (2013).
- James, M. I. *et al.* Curcumin inhibits cancer stem cell phenotypes in *ex vivo* models of colorectal liver metastases, and is clinically safe and tolerable in combination with FOLFOX chemotherapy. *Cancer Lett* **364**, 135–141, doi: 10.1016/j.canlet.2015.05.005 (2015).
- Brat, D. J., Bellail, A. C. & Van Meir, E. G. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol* **7**, 122–133, doi: 10.1215/S1152851704001061 (2005).
- Manna, S. K. & Ramesh, G. T. Interleukin-8 induces nuclear transcription factor- $\kappa$ B through a TRAF6-dependent pathway. *J Biol Chem* **280**, 7010–7021, doi: 10.1074/jbc.M410994200 (2005).

37. Killian, P. H. *et al.* Curcumin inhibits prostate cancer metastasis *in vivo* by targeting the inflammatory cytokines CXCL1 and -2. *Carcinogenesis* **33**, 2507–2519, doi: 10.1093/carcin/bgs312 (2012).
38. Cao, Z. *et al.* Overexpression of Chemokine (C-X-C) ligand 1 (CXCL1) associated with tumor progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell Int* **14**, 86, doi: 10.1186/s12935-014-0086-8 (2014).
39. Reimers, M. S. *et al.* Combined analysis of biomarkers of proliferation and apoptosis in colon cancer: an immunohistochemistry-based study using tissue microarray. *Int J Colorectal Dis* **29**, 1043–1052, doi: 10.1007/s00384-014-1930-y (2014).
40. Kojima, M. *et al.* Increased nuclear factor- $\kappa$ B activation in human colorectal carcinoma and its correlation with tumor progression. *Anticancer Res* **24**, 675–681 (2004).
41. Yang, A. D. *et al.* Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin Cancer Res* **12**, 4147–4153, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0038 (2006).
42. Virag, P. *et al.* Oxaliplatin induces different cellular and molecular chemoresistance patterns in colorectal cancer cell lines of identical origins. *BMC Genomics* **14**, 480, doi: 10.1186/1471-2164-14-480 (2013).
43. Huang, T. T. *et al.* NF- $\kappa$ B activation by camptothecin. A linkage between nuclear DNA damage and cytoplasmic signaling events. *J Biol Chem* **275**, 9501–9509 (2000).
44. Samuel, T., Fadlalla, K., Gales, D. N., Putcha, B. D. & Manne, U. Variable NF- $\kappa$ B pathway responses in colon cancer cells treated with chemotherapeutic drugs. *BMC Cancer* **14**, 599, doi: 10.1186/1471-2407-14-599 (2014).
45. Jobin, C. & Sartor, R. B. The I  $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**, C451–462 (2000).
46. Russo, M. P., Schwabe, R. F., Sartor, R. B. & Jobin, C. NF- $\kappa$ B-inducing kinase restores defective I $\kappa$ B kinase activity and NF- $\kappa$ B signaling in intestinal epithelial cells. *Cell Signal* **16**, 741–750, doi: 10.1016/j.cellsig.2003.11.007 (2004).
47. Harradine, K. A. *et al.* Functional genomics reveals diverse cellular processes that modulate tumor cell response to oxaliplatin. *Mol Cancer Res* **9**, 173–182, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0412 (2011).
48. Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M. J., Pagano, M. & Draetta, G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* **7**, 812–821 (1993).
49. Gines, A. *et al.* PKM2 Subcellular Localization Is Involved in Oxaliplatin Resistance Acquisition in HT29 Human Colorectal Cancer Cell Lines. *PLoS One* **10**, e0123830, doi: 10.1371/journal.pone.0123830 (2015).
50. Howells, L. M., Mitra, A. & Manson, M. M. Comparison of oxaliplatin- and curcumin-mediated antiproliferative effects in colorectal cell lines. *Int J Cancer* **121**, 175–183, doi: 10.1002/ijc.22645 (2007).
51. Wang, D., Dubois, R. N. & Richmond, A. The role of chemokines in intestinal inflammation and cancer. *Curr Opin Pharmacol* **9**, 688–696, doi: 10.1016/j.coph.2009.08.003 (2009).
52. Collins, T. S., Lee, L. F. & Ting, J. P. Paclitaxel up-regulates interleukin-8 synthesis in human lung carcinoma through an NF- $\kappa$ B- and AP-1-dependent mechanism. *Cancer Immunol Immunother* **49**, 78–84 (2000).
53. Tamatani, T. *et al.* Enhanced radiosensitization and chemosensitization in NF- $\kappa$ B-suppressed human oral cancer cells via the inhibition of gamma-irradiation- and 5-FU-induced production of IL-6 and IL-8. *Int J Cancer* **108**, 912–921, doi: 10.1002/ijc.11640 (2004).
54. Acharyya, S. *et al.* A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell* **150**, 165–178, doi: 10.1016/j.cell.2012.04.042 (2012).
55. Jobin, C. *et al.* Curcumin blocks cytokine-mediated NF- $\kappa$ B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I- $\kappa$ B kinase activity. *J Immunol* **163**, 3474–3483 (1999).
56. Bachmeier, B. E. *et al.* Curcumin downregulates the inflammatory cytokines CXCL1 and -2 in breast cancer cells via NF $\kappa$ B. *Carcinogenesis* **29**, 779–789, doi: 10.1093/carcin/bgm248 (2008).
57. Ning, Y. *et al.* Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity *in vitro* and *in vivo* in colon cancer cell line models. *Int J Cancer* **128**, 2038–2049, doi: 10.1002/ijc.25562 (2011).
58. Ning, Y. *et al.* The CXCR2 antagonist, SCH-527123, shows antitumor activity and sensitizes cells to oxaliplatin in preclinical colon cancer models. *Mol Cancer Ther* **11**, 1353–1364, doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0915 (2012).
59. Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M. & Schaffner, W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* **17**, 6419 (1989).
60. Chou, T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* **58**, 621–681, doi: 10.1124/pr.58.3.10 (2006).
61. Smyth, G. K., Michaud, J. & Scott, H. S. Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* **21**, 2067–2075, doi: 10.1093/bioinformatics/bti270 (2005).
62. Eden, E., Lipson, D., Yogeve, S. & Yakhini, Z. Discovering motifs in ranked lists of DNA sequences. *PLoS Comput Biol* **3**, e39, doi: 10.1371/journal.pcbi.0030039 (2007).
63. Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D. & Yakhini, Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* **10**, 48, doi: 10.1186/1471-2105-10-48 (2009).
64. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 15545–15550, doi: 10.1073/pnas.0506580102 (2005).

## Acknowledgements

This study was funded by the ISCIII grant, project n° PI1202228 and Departament d'Innovació, Universitat i Empresa, Generalitat de Catalunya. SGR-PREDIVHICO. This work was done under the framework of the doctorate in Medicine from the Universitat Autònoma de Barcelona. We thank Dr. Lucía Sanjurjo (Innate Immunity Group, IGTP, Badalona, Spain) for her technical assistance and support and Dr. Verónica Guirao (Biobank research support unit, IGTP, Badalona, Spain) for her comments and editorial assistance.

## Author Contributions

V.R.d.P. performed all experiments. L.S. and R.P. performed the microarray work and analyses. L.H., M.J. and C.I. provided patients samples and information. A.M.-C. and S.B. assisted in the cell and molecular studies. J.L.M., L.L., C.B. and A.A. performed the clinical data analysis. E.M.-B. designed the study. E.M.-B. and V.R.d.P. wrote the paper. All authors reviewed the manuscript.

## Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

**How to cite this article:** Ruiz de Porras, V. *et al.* Curcumin mediates oxaliplatin-acquired resistance reversion in colorectal cancer cell lines through modulation of CXC-Chemokine/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Sci. Rep.* **6**, 24675; doi: 10.1038/srep24675 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

