

Universidad Aut3noma de Barcelona  
Facultad de Medicina  
Departamento de Medicina

**Actividad in vitro de Oxaliplatino asociado a otros  
f3rmacos y demostraci3n de la reversi3n de la  
resistencia a 5-Fluorouracilo**

Tesis presentada por **Carmen Plasencia Castillo**

**Director: Dr. Albert Abad Esteve**  
**Codirector: Dr. Miquel Taron i Roca**  
**Tutor: Dr. Rafael Rosell Costa**

**Albert Abad Esteve**, Jefe de Sección del Servicio de Oncología Médica del Hospital Germans Trias i Pujol, **Miquel Taron i Roca**, Jefe del Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Oncología del Hospital Germans Trias i Pujol, y **Rafael Rosell Costa**, profesor asociado al Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe del Servicio de Oncología Médica del Hospital Germans Trias i Pujol, certifican que la tesis titulada:

*ACTIVIDAD IN VITRO DE OXALIPLATINO ASOCIADO A  
OTROS FÁRMACOS Y DEMOSTRACIÓN DE LA REVERSIÓN  
DE LA RESISTENCIA A 5-FLUOROURACILO*

ha sido realizada por **Carmen Plasencia Castillo** bajo su dirección y es apta para ser defendida ante el Tribunal para optar al grado de Doctor.

Dr. Albert Abad Esteve  
Director

Dr. Rafael Rosell Costa  
Tutor

Dr. Miquel Taron i Roca  
Codirector

Badalona, Julio 2002

*A mi familia,*

*A David,*

## *A G R A D E C I M I E N T O S*

Al Dr. Albert Abad, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta tesis doctoral bajo su dirección y tutela, y por la amistad, confianza, comprensión y apoyo que ha mostrado en todo momento.

Al Dr. Miquel Taron, por su ayuda inestimable, su apoyo logístico, técnico y moral en la realización de esta tesis y por la confianza y amistad que ha mostrado en todo momento.

Al Dr. Rosell por su tutela en la elaboración de esta tesis, y por la amistad mostrada durante este tiempo.

A todos los miembros del Servicio de Oncología Médica y del Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer por su ayuda y apoyo.

A mis compañeras de laboratorio Sandra, Eva, Marian y Carme por los momentos inolvidables compartidos en el laboratorio y por su valía personal, su apoyo y su amistad en todo momento.

Al Dr. Howard L. McLeod y al Dr. PH Rooney por su colaboración y ayuda desinteresada en la realización de los análisis de CGH.

A mis padres, mis hermanos, mis cuñados, a mi tía y a mi sobrina Marina, que han vivido el día a día de la evolución de esta tesis.

A David, por su apoyo incondicional durante todo este tiempo.

Este trabajo ha sido posible gracias a la beca del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 98/1231)

## INDICE

<b>1. INTRODUCCION</b>	
1.1.Introducción a la biología molecular del cáncer	2
1.2.Biología molecular del cáncer colorrectal	6
1.3.Tratamiento quimioterápico del cáncer colorrectal	8
1.3.1. La resistencia a quimioterapia en el cáncer colorrectal	11
1.3.2. Parámetros biológicos implicados en la prognosis del cáncer Colorrectal	13
1.3.2.1. El oncogén k-ras	13
1.3.2.2. El gen supresor tumoral p53	14
1.3.2.3. Ganancias y/o pérdidas alélicas: <i>Allelic imbalance</i>	16
1.3.2.4. El sistema reparador de aparejamiento incorrectos	16
1.3.2.5. Las dianas terapéuticas	17
1.4. El 5-Fluorouracilo: Bases bioquímicas y moleculares	19
1.4.1. Mecanismo de acción	20
1.4.2. Mecanismos de resistencia a 5-Fluorouracilo	20
1.4.2.1. Niveles de expresión de Timidilato Sintasa	21
1.4.2.2. Regulación traduccional y post-traduccional de Timidilato Sintasa	23
1.4.2.3. Otros mecanismos de resistencia a 5-Fluorouracilo	24
1.5. Nuevos fármacos en el tratamiento del cáncer colorrectal	
1.5.1. Oxaliplatino: Bases bioquímicas	32
1.5.1.1. Mecanismo de acción	33
1.5.1.2. Mecanismos de resistencia a agentes platinados	34
1.5.1.3. Mecanismos de reparación de los agentes platinados	35
1.5.1.4. La derivación replicativa	39
1.5.2. Inhibidores de la Topoisomerasa I	42
1.5.2.1. Mecanismo de acción	43
1.5.2.2. Mecanismos de resistencia	45
<b>2. HIPOTESIS</b>	<b>50</b>

<b>3. OBJETIVOS</b>	54
<b>4. MATERIAL Y METODOS</b>	58
4.1. Líneas celulares utilizadas	59
4.2. Fármacos antineoplásicos	62
4.3. Análisis de la citotoxicidad	62
4.3.1. Grado de inducción de resistencia a 5-Fluorouracilo	64
4.3.2. Citotoxicidad de los agentes únicos. Análisis del patrón de resistencia cruzada	64
4.3.3. Análisis de la citotoxicidad de las combinaciones entre Oxaliplatino, Topotecán y 5-Fluorouracilo	65
4.4. Citometría de flujo	66
4.5. Tinción con May-Grünwald-Giemsa	67
4.6. Análisis mutacional del gen p53 por secuenciación automática	68
4.7. Análisis de la inestabilidad de microsatélites	69
4.8. Análisis de Hibridación Genómica Comparativa	71
4.9. Análisis de la amplificación génica por Southern Blot	73
4.10. Análisis de la expresión de ARNm por Northern Blot	76
4.11. Análisis de los niveles proteicos por Western Blot	79
4.12. Análisis de la muerte celular programada	81
<b>5. RESULTADOS</b>	
5.1. <i>RESULTADOS OBJETIVO 1</i>	84
5.1.1. Generación de líneas con resistencia a 5-Fluorouracilo	85
5.1.2. Análisis por citometría de flujo del patrón de ciclo celular en líneas sensibles y resistentes a 5-Fluorouracilo	87
5.1.3. Análisis del grado de resistencia inducida a 5-Fluorouracilo	88
5.1.4. Análisis de la citotoxicidad de Oxaliplatino, Topotecán y 5-Fluorouracilo administrados como agentes únicos. Estudio del patrón de resistencia cruzada a drogas	89
5.1.5. Análisis de la expresión de Timidilato Sintasa en las parejas sensible/resistente a 5-Fluorouracilo	95
5.1.5.1. Análisis de la amplificación génica de Timdilato Sintasa	





## ***ABREVIATURAS MÁS UTILIZADAS***

<b>ARNm:</b>	ARN mensajero
<b>CEA:</b>	Antígeno carcinoembrionario
<b>CCR:</b>	Cáncer Colorrectal
<b>CGH:</b>	Comparative Genomic Hybridization Analysis
<b>CI:</b>	Combination Index
<b>CPT-11:</b>	Irinotecán
<b>DI<sub>50</sub> :</b>	Dosis Inhibitoria del 50% del crecimiento celular
<b>5-FU:</b>	5-Fluorouracilo
<b>HNPCC:</b>	Hereditary Non-Polyposis Colorrectal Cancer
<b>LOH:</b>	Loss of heterozygosity
<b>MMR:</b>	Mismatch Repair Genes
<b>OXA:</b>	Oxaliplatino
<b>RER+:</b>	Fenotipo de errores de replicación
<b>Topo I:</b>	ADN Topoisomerasa I
<b>TPT:</b>	Topotecán
<b>TS:</b>	Timidilato Sintasa
<b>TSG:</b>	Gen supresor tumoral

# ***- INTRODUCCIÓN-***

## 1.1. INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

El cáncer es un grupo de enfermedades que se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células (por un aumento de su proliferación y/o por la inhibición de los procesos de muerte celular) y por la posterior adquisición por parte de estas células de la capacidad invasiva (proceso conocido como metástasis) que les permite colonizar y proliferar en otros tejidos, dañándolos y provocando finalmente la muerte del individuo (Muñoz A, 1997; NCBI, 2001).

La transformación de una célula normal en tumoral, conlleva una pérdida del denominado *control social de la proliferación*, es decir, las células tumorales proliferan a densidades elevadas (pérdida de la inhibición por contacto) e independientemente del anclaje a la matriz extracelular (MEC) y de factores de crecimiento, perdiendo además la capacidad de responder a factores inhibidores de crecimiento.

Además de todos estos factores reguladores, las células disponen de mecanismos de control o *checkpoints*, que actúan analizando la normalidad de la progresión del ciclo celular. Cuando estos sistemas de control detectan anomalías, actúan deteniendo el ciclo, activando mecanismos de reparación y finalmente en el caso de no poder resolver las anomalías, desencadenan la muerte celular programada o apoptosis. Las células tumorales se caracterizan por la pérdida de la funcionalidad de al menos alguno de estos *checkpoints*, lo que permite la acumulación de errores en el ADN que conducen a la inestabilidad genética característica de las células tumorales. Los sistemas de control deberían inducir la apoptosis de estas células que proliferan anormalmente, pero su alteración impide la muerte de las mismas. Por tanto, la combinación de la pérdida del control de la proliferación y de la funcionalidad de los *checkpoints* permite perpetuar células con capacidad de formar tumores.

La regulación anormal de la proliferación en las células cancerosas se origina por la acumulación de mutaciones en genes claves que inducen o inhiben la diferenciación, la senescencia o la muerte celular (Weinberg, 1997). Existen dos tipos de alteraciones: *cambios genéticos* en la secuencia del ADN celular (translocaciones cromosómicas,

deleciones, inserciones, amplificaciones o mutaciones puntuales) y *cambios epigenéticos*, que afectan al modo de expresión de los genes.

Las mutaciones que conducen al desarrollo neoplásico afectan a tres tipos de genes: a) los ***proto-oncogenes*** cuya función es regular positivamente la proliferación celular. La adquisición de mutaciones los convierte en oncogenes, y su activación constitutiva promueve la transformación tumoral; b) los ***genes supresores tumorales o TSG***, que regulan negativamente la proliferación y cuya pérdida de función también promueve la carcinogénesis.; y c) los ***genes reparadores del ADN***, responsables de corregir los errores producidos durante la replicación del ADN y reparar las alteraciones inducidas en esta molécula por agentes mutagénicos externos (radiación UV y agentes químicos). Las alteraciones en estos genes conducen a la aparición de múltiples mutaciones en el genoma (lo que se conoce como *fenotipo mutador*) que acaban afectando a oncogenes y TSG, contribuyendo a la carcinogénesis.

Los oncogenes fueron la primera clase de genes que se asociaron con el cáncer. Los genes normales, conocidos como proto-oncogenes, codifican para proteínas involucradas en el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis. Es su expresión excesiva o la expresión de formas mutadas lo que induce la transformación de las células normales en cancerosas. Las mutaciones que activan los oncogenes incluyen mutaciones puntuales (p.e. K-ras), amplificaciones génicas (p.e.c-myc) o traslocaciones cromosómicas (p.e. Bcr/Abl), las cuales desregulan la expresión o crean una proteína quimérica con una función anormal. La mutación en uno de los alelos es suficiente para alterar la funcionalidad de la proteína para la que codifican.

En cambio, para alterar la función de los TSGs es necesario en la mayoría de los casos (a excepción de p53) la inactivación de las dos copias (alelos) normales de dicho gen. Esto es lo que se conoce como la ***Hipótesis de los two hits o hipótesis de Knudson***. En la población humana existen individuos portadores de un alelo mutado (*mutaciones germinales*) en TSGs. Estos individuos manifiestan una mayor susceptibilidad a desarrollar tipos específicos de tumores porque sólo basta con un evento mutador adicional en el otro alelo para que se pierda totalmente la función del TSG.

Aproximadamente un 10% de los tumores humanos están ocasionados por la transmisión de alelos mutados en TSGs.

Generalmente, una de las copias del TSG se muta por un evento intragénico (una mutación puntual, una delección o inserción o bien, un cambio epigenético – hipermetilación-) y la segunda copia se suele inactivar por la delección de un segmento cromosómico grande o incluso de un brazo entero del cromosoma (*Hansen MF 1987*). En base a ello, se han desarrollado estrategias para la identificación de TSGs mediante el análisis de las regiones de pérdidas cromosómicas en tumores (estudios de pérdidas de heterozigosidad, LOH) o la delimitación de las regiones que cosegregan con la susceptibilidad hereditaria a un tipo específico de tumor (por análisis de segregación de marcadores polimórficos, *Hearne y col 1992*). De esta forma (del análisis en familias que desarrollan tumores con elevada frecuencia) se aisló el primer TSG, el gen de susceptibilidad a Retinoblastoma o Rb y otros como la los genes de susceptibilidad al cáncer de mama, BRCA1 y BRCA2. También se han aislado TSGs a través del estudio de las rutas que controlan la proliferación celular. Éste es el caso de p53 y p16, ambos implicados en la génesis de varios tumores. Se están empezando a entender las funciones bioquímicas de algunos TSGs. El control negativo del ciclo celular parece ser una de las principales funciones de estos genes en particular de Rb (*Weinberg RA y col 1995*) y p53 (*White E y col, 1996*) y p16 (*Sherr y Roberts, 1995*).

Los genes reparadores del ADN también desempeñan un papel en la tumorigénesis por una pérdida de la funcionalidad proteica para reparar el ADN que contribuye tal y como ya hemos comentado anteriormente, a la acumulación de mutaciones que acaban afectando a oncogenes y TSGs, que conducen finalmente al desarrollo del cáncer. Las mutaciones detectadas en los genes reparadores del DNA incluyen delecciones, inserciones, o mutaciones puntuales que conducen a una proteína truncada, y también hipermetilaciones (p.e. en el caso del hMLH1). En la mayoría de los casos se requiere la inactivación de los dos alelos del gen para que se origine el cáncer (*hipótesis de los two hits*). Sin embargo, diversos estudios muestran que un pequeño número de mutaciones germinales (p.e. hMLH1 o hPMS2) causan la deficiencia de la reparación en los tejidos normales sin necesidad de un segundo evento mutacional (*Parsons R y col, 1995*). Este hecho sugiere que el producto de este alelo mutado puede actuar de forma dominante

negativa posiblemente identificando y uniéndose al error de replicación en el ADN, previniendo posteriormente la unión de otras enzimas o impidiendo la corrección del ADN, o ambas cosas a la vez.

En definitiva, el cáncer es una enfermedad genética que se origina por la alteración de distintos genes en una célula inicial y que al ser heredadas por sus células hijas provoca que un grupo de células escape del control normal del crecimiento, adquiriendo posteriormente la capacidad de escapar e invadir otros tejidos, colonizarlos y creciendo en ellos. Estos fenómenos de invasividad y metástasis implican nuevas mutaciones, ya que en condiciones normales las células ocupan una localización definida en el organismo. Este grupo de células cancerosas ocasionan finalmente lesiones en tejidos y órganos y acaban por alterar el funcionamiento normal del organismo.

## 1.2. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer colorrectal es uno de los tumores sólidos más frecuentes con una incidencia de 150.000 casos nuevos al año en Estados Unidos y 170.000 en Europa. En Cataluña donde la incidencia es algo más elevada que en el resto de España, se cifra en 22,7 casos nuevos por cada 100.000 habitantes entre la población masculina y 18,4 casos entre la población femenina.

El 90% de los casos suele ser de tipo esporádico y sólo un 10% corresponde a síndromes familiares. Dentro de las neoplasias hereditarias destacan dos tipos de síndromes diferentes: el asociado a la poliposis múltiple familiar (*Familiar Adenomatous Polyposis, FAP*) y el no asociado a la poliposis familiar (*Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, HNPCC*).

El cáncer colorrectal es uno de los tumores sólidos mejor caracterizados gracias entre otras cosas a la ventaja de poder disponer de piezas correspondientes a todos los estadios de la enfermedad (secuencia desde la lesión pre-maligna al cáncer invasivo) lo que ha permitido el estudio de los eventos patológicos y moleculares involucrados en la iniciación y progresión tumoral (desde la lesión pre-maligna hasta la invasión metastásica) y establecer un modelo molecular de carcinogénesis (figura 1). Los avances de la biología molecular y en concreto, el estudio de las neoplasias hereditarias, establecen actualmente, dos vías moleculares por las que se produce la oncogénesis colorrectal (*R Grife y col, 1998*):

1. La *vía supresora* de tumores, caracterizada por las alteraciones en el balance cromosómico (inestabilidad cromosómica), que se manifiesta en el desarrollo de tumores con alto grado de aneuploidía. Estos tumores presentan pérdidas de heterozigosidad frecuentes (LOH) en múltiples *loci*, así como mutaciones que activan a oncogenes e inactivan o bloquean a genes supresores tumorales. En el caso del cáncer de colon, el oncogén K-Ras y los genes supresores tumorales APC y p53 aparecen mutados frecuentemente. Pertenecen a esta vía la mayor parte de los tumores esporádicos de colon (>80%) y los tumores asociados a la *Poliposis múltiple Familiar (FAP)*.

2. La *vía mutadora*, caracterizada por la presencia de mutaciones en los genes reparadores del ADN, que se manifiesta por la acumulación de errores de replicación (fenotipo RER+) en una serie de secuencias repetitivas no codificantes del genoma denominadas microsatélites. Estos tumores son en su mayoría diploides o pseudodiploides. Se observa en ellos, además, una ausencia de mutaciones en los genes tumorales habituales de la vía supresora. Pertenecen a esta vía una parte de los tumores esporádicos de colon (20%) y la mayor parte (90%) de los tumores hereditarios no polipoides (HNPCC).

Estas dos vías de carcinogénesis se diferencian porque los tumores correspondientes manifiestan divergencias claras en su fenotipo no sólo a nivel celular (como en el grado de diferenciación, pobremente diferenciado en el caso de la vía mutadora) sino también en sus manifestaciones clínicas (como en el grado de invasión, escasa capacidad invasiva en el caso de la vía mutadora). Las diferencias en el fenotipo son debidas en último término a diferencias en los genotipos correspondientes (en el espectro de los genes tumorales *-oncogenes y genes supresores-* implicados en el desarrollo del cáncer colorrectal).

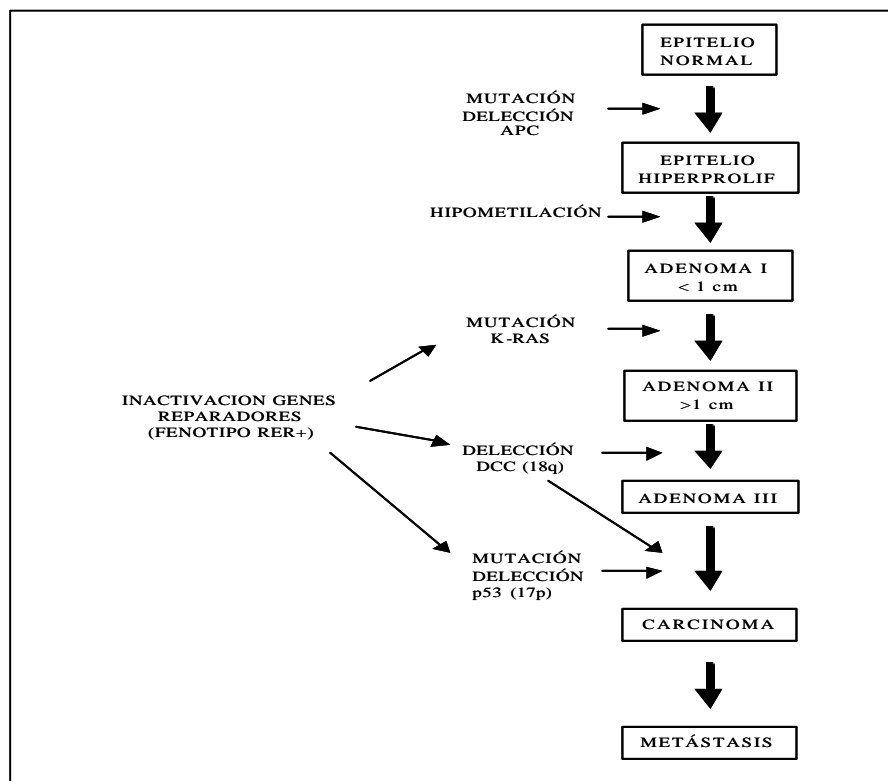


Figura 1. Modelo de la carcinogénesis colorrectal



### 1.3. TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO DEL CÁNCER COLORRECTAL

La quimioterapia sistémica en cáncer colorrectal (CCR) tiene como objetivos retrasar la aparición de síntomas en el paciente asintomático, aumentar el período de supervivencia libre de la enfermedad en los pacientes tratados y aumentar la supervivencia global frente a los pacientes no tratados con una toxicidad aceptable para el paciente y manejable para el oncólogo.

En el momento actual la estrategia del tratamiento del CCR la podemos situar en tres enfoques básicamente: 1) la modulación farmacológica del 5-Fluoruracilo (5-FU), 2) la utilización de dosis altas e hiper-altas de 5-FU mediante la infusión continua y 3) la asociación con nuevos fármacos.

El 5-FU continúa siendo la quimioterapia estándar en primera línea del CCR, aunque la respuesta como agente único no supera el 20%. El tratamiento con 5-FU es además una opción moderadamente efectiva, ya que muchos pacientes no responden o progresan tras una breve respuesta, requiriéndose por tanto, una opción de quimioterapia de segunda línea más efectiva. La modulación bioquímica con ácido folínico así como los regímenes de infusión permiten mejorar la respuesta al tratamiento, aunque no representan un beneficio claro en términos de supervivencia.

La introducción en los años noventa de nuevos agentes antineoplásicos activos en pacientes con cáncer colorrectal ha abierto nuevas posibilidades terapéuticas para el tratamiento de esta neoplasia. Algunos de ellos como Tomudex, Capecitabina, Tegafur, UFT (*Rustum YM y col, 1999*) y otros menos desarrollados como MTA y BOF-2, entre otros, son inhibidores de la Timidilato Sintasa (TS) como el 5-FU (*Papamichael D 2000*). Otros, como Oxaliplatino e Irinotecán (CPT-11), tienen un mecanismo de acción distinto y ofrecen, por tanto, la posibilidad de la combinación.

El *Raltitrexed (Tomudex)*, un agente antifolato que actúa como inhibidor de la TS. Se administra por vía intravenosa y presenta una actividad que es similar a la del esquema de 5FU/ácido folínico (19,3% respuestas, *Cunningham D y col, 1996*) con

buena tolerancia siendo las toxicidades más importantes la leucopenia y las diarreas, y en algún paciente produce un estado febril (*Carrato A, 1998*).

La *Capecitabina (Xeloda)* pertenece al grupo de las fluoropirimidinas, se administra por vía oral y se convierte en 5-FU de forma selectiva en las células tumorales por medio de una secuencia enzimática intracelular. Esta secuencia se desarrolla primeramente en el hígado con la conversión de capecitabina en un metabolito inactivo, el 5'-deoxi-5-fluorocitidina por acción de la carboxilesterasa. Después tanto en el hígado como en el tejido tumoral, se convierte en 5'-deoxi-fluorouridina (5'-DFUR). La conversión final se produce fundamentalmente en el tejido tumoral donde por acción de la timidina fosforilasa (TP) se convierte en 5-FU. La TP es un factor angiogénico con una elevada especificidad para el tejido tumoral. En este momento los estudios en fase II muestran un índice de respuestas globales entre 20-25%. Se está ensayando la asociación con otros citostáticos. Su mayor ventaja es la administración oral (*J Tabernero, 1998*).

El ftorafur, *UFT* se trata de la composición de tegafur (fluoropirimidina) con uracilo lo que le confiere una mayor capacidad de difusión en el tejido tumoral. Su mecanismo de acción es la inhibición de la TS. Su actividad es parecida a la del 5-FU (tasa de respuestas de un 20%) y también se utiliza con modulación bioquímica con ácido fólico, con lo que se han alcanzado índices de respuesta de hasta el 42% y supervivencia mediana de 15,8 meses en un estudio americano (*R Pazdur y 1999*) y de 39% con una mediana de supervivencia de 13,5 meses en un estudio nacional (*M Nogué 1998*). El UFT es muy bien tolerado y su administración oral lo hace un citostático adecuado para el tratamiento en los ancianos. En la experiencia del grupo TTD en pacientes mayores de 72 años, el índice de respuestas es de 13-18% pero la mayoría de los pacientes se estabiliza con lo que se alcanza una supervivencia media de 12-14 meses con muy baja toxicidad siendo la toxicidad principal las diarreas.

El *MTA* (MultiTarget-Antifolate, ALIMTA, Premetrexed) que actúa inhibiendo a diversos enzimas involucrados en el metabolismo de los folatos, siendo la TS, la dihidrofolato reductasa (DHFR), la glicinamida ribonucleótido formiltransferasa (GARFT) y la aminoimidazol carboxiamida ribonucleótido formiltransferasa (AICARFT) los más importantes. MTA necesita del transportador de los folatos para entrar en la célula y es sustrato de la enzima folilpoliglutamil sintasa (FPGS). Los

estudios recientes muestran la actividad en cáncer colorrectal con una tasa respuestas entre 15-17% (*MC Cripps 1997*)

El *Oxaliplatino* (1,2-diamino ciclohexano-oxalato-platino (II)) es un derivado platinado de tercera generación que ha mostrado actividad en cáncer colorrectal tanto en primera línea de terapia como en tumores refractarios a 5-FU (*E Ctvikovic y col, 1998*). Su actividad en monoterapia es limitada con 20% de respuestas en primera línea y sin alcanzar el 10% en segunda línea de tratamiento (*Abad A, 1998*). En clínica se han alcanzado hasta un 46% de respuestas con esta asociación al añadir Oxaliplatino a esquemas de 5-FU incluso en tumores refractarios a este último.

El Irinotecán (CPT-11) y el Topotecán (TPT) son derivados de la camptotecina y actúan inhibiendo a la enzima ADN-Topoisomerasa I. La actividad del CPT-11 en monoterapia es limitada con una tasa de respuestas objetivas entre un 15 y un 20% sin que existan diferencias apreciables en primera o segunda línea de tratamiento, con mediana de respuesta de 7 meses y una supervivencia de 10 meses. De hecho, esta actividad en segunda línea le ha convertido en el fármaco de referencia en enfermos que han progresado a 5-FU. Además los estudios en fase III de la combinación de CPT-11 con 5-FU/Leucovorín en pacientes con cáncer colorrectal metastático han demostrado un incremento en la supervivencia (17.4 meses versus 14.1 en la rama del 5-FU/Leucovorín) que ha llevado a la aceptación de este tratamiento como primera línea de terapia en pacientes con cáncer colorrectal metastático (*M.L Rothenberg, 2001*).

El *Topotecán* (TPT) ha mostrado actividad *in vitro* frente a una gran variedad de tumores (mama, pulmón, colon y ovario entre otros). Actualmente, se utiliza como segunda línea de terapia en el cáncer de ovario avanzado que ha progresado al tratamiento con Cisplatino (*WP McGuire, 2000*). La actividad del TPT en cáncer colorrectal es modesta tanto en el tratamiento en infusión de 5 días como en el de 21 días (*GJ Creemers y col, 1995; GJ Creemers y col 1996*). El TPT presenta la ventaja potencial respecto al CPT-11 de que no necesita ser metabolizado a su forma activa y la principal toxicidad es la neutropenia (siendo la diarrea mínima). Por su mecanismo de acción, se podría esperar que el TPT tuviera un comportamiento similar al del CPT-11 o incluso superior. Sin embargo, este último presenta mayor actividad en cáncer colorrectal aunque no existen estudios randomizados que los comparen. De hecho no

existen estudios reportados evaluando la combinación de TPT con 5-FU para cáncer colorrectal metastásico.

La actividad mostrada por Oxaliplatino y CPT-11 en segunda línea de tratamiento, ha potenciado su inclusión en regímenes de poliquimioterapia en primera línea. Dos estudios randomizados recientes muestran que la combinación entre Oxaliplatino o CPT-11 y 5-FU en infusión continua, incrementa la tasa de respuestas que se sitúa en un 50%, aumentando también el tiempo a la progresión y la supervivencia. Las estrategias actuales analizan la actividad de la combinación de CPT-11 y Oxaliplatino. La baja toxicidad hematológica y de diarreas del Oxaliplatino y la ausencia de toxicidad neurológica del CPT-11, favorecen su combinación. Previos estudios preclínicos (*Guichard S y col, 2001*) así como los resultados previos obtenidos en fase I y II en segunda línea demuestran la sinergia de esta asociación (*Waserman y col, 1999; Scheithauer W. y col, 1999*). En la actualidad existen además, un mínimo de 7 estudios abiertos en fase II de primera y segunda línea de terapia en CCR avanzado cuyos datos no se conocen todavía.

### **1.3.1. La resistencia a quimioterapia en el cáncer colorrectal**

Uno de los principales obstáculos en el tratamiento de esta neoplasia y en general del cáncer, es el fenotipo de resistencia a los diferentes fármacos antineoplásicos que conduce a una pérdida de eficacia de los mismos. La mayoría de los tumores de colon son *intrínsecamente resistentes* a la quimioterapia, lo cual limita susceptiblemente su tratamiento. La quimioterapia sistémica, utilizando los agentes estándares, presenta una tasa de respuestas objetivas (parciales o completas) inferior al 40%.

Esta resistencia intrínseca puede ser debida a factores farmacocinéticos (una rápida aclaración, mala absorción o la insuficiente distribución de la droga) o a propiedades de la propia célula tumoral (*Plasencia C y col, 2000*). Además, esta resistencia puede *adquirirse* durante el transcurso del tratamiento, en cuyo caso las células tumorales escapan de la terapia inicial mediante la adquisición de nuevas características que las hacen resistentes al tratamiento. Esta resistencia, *intrínseca o adquirida*, ocurre por una variedad de mecanismos citocinéticos que incluyen

alteraciones en los mecanismos de transporte de la droga (incorporación y/o expulsión), cambios en los procesos metabólicos intracelulares, alteraciones en las dianas terapéuticas (*targets*), alteraciones en los genes involucrados en la regulación del ciclo celular y en las vías de respuesta del daño inducido en el ADN (protección frente a procesos apoptóticos) (*Figura 2*).

Pero además hemos de tener en cuenta la heterogeneidad de las células tumorales tanto dentro del propio tumor como entre el tumor primario y las metástasis, que dificulta el tratamiento. Los tumores están compuestos por subpoblaciones celulares con diferentes características morfológicas y funcionales, observándose divergencias en el tamaño, el cariotipo, la capacidad de invasión y la proliferación de las subpoblaciones. Esta heterogeneidad tumoral presenta implicaciones a nivel morfológico y diagnóstico y permite explicar porqué tumores de la misma histología responden de manera diferente en distintos pacientes. Incluso dentro del mismo paciente unas células tumorales responden más que otras al tratamiento.

Otra de las consecuencias de esta heterogeneidad es la resistencia a fármacos. De acuerdo con la teoría de *Goldie y Coldman (1979)*, basada en resistencias bacterianas, la probabilidad de que un tumor albergue células resistentes en su interior depende del tamaño del tumor y de la frecuencia de la mutación. A pesar de una respuesta inicial a la quimioterapia, la expansión de las clonas resistentes origina la pérdida de sensibilidad al tratamiento. Por tanto, los fármacos estarían actuando como *agentes seleccionadores* destruyendo la población sensible y favoreciendo la población refractaria. Además estarían contribuyendo a incrementar el ratio de mutaciones al interferir en los procesos de síntesis del ADN.

En resumen, existe una variedad de mecanismos de resistencia y hemos de tener en cuenta además que: 1) para un mismo fármaco pueden existir múltiples mecanismos de resistencia; y 2) algunos procesos son muy específicos y sólo se producen con un fármaco determinado o con agentes quimioterápicos de la misma familia, en cuyo caso no tendremos resistencia cruzada a otras drogas.

### 1.3.2. Parámetros biológicos implicados en la prognosis del cáncer colorrectal

La prognosis del CCR está influenciada por una variedad de factores presentes ya en el momento del diagnóstico. Estos factores incluyen la edad, el sexo, la presencia de síntomas, la localización del tumor, la presencia de obstrucción, la necesidad de una transfusión y la calidad de la intervención quirúrgica (*Abad A, 2000; Mcleod HL y col, 1999*). Algunas características tumorales como la vascularización, la invasión linfática, la ploidia y los niveles en plasma del CEA, también se consideran factores pronóstico (*Wolmark N y col, 1983; Hermanek P, 1995*)

Por otro lado, los avances en la biología molecular así como en el conocimiento de los mecanismos de acción de los diferentes fármacos antineoplásicos, han puesto de manifiesto la relación de determinados factores moleculares y biológicos con la agresividad, la capacidad de proliferación y la diferenciación tumoral, la migración, la adhesión y la capacidad de invasión, la capacidad apoptótica, las funciones inmunes, y la respuesta al tratamiento en el cáncer colorrectal (CCR) avanzado (*Mcleod HL, 1999*) (*Tabla 1*).

**Tabla 1.** Factores implicados en la prognosis del cáncer colorrectal

- ✓ Factores clínicos: localización, edad, sexo, sintomatología, obstrucción
- ✓ Factores patológicos: estadio, nº ganglios, grado histológico
- ✓ Marcadores generales: CEA
- ✓ Factores moleculares:
  - Oncogenes (mutaciones K-ras, LOH 18q, TGFβ, c-erbB2, EGFR, c-myc)
  - TSGs (p53, APC, DCC, MCC, p27, Allelic Imbalance)
  - Genes reparadores del ADN (Mismatch repair genes, MMR)
  - Vías apoptosis (Bcl-2, Bax, p53)
  - Angiogénesis / metástasis /proliferación (TP, VEGF, MMPs, uPA, E-cadherina, CD44)
  - Dianas terapéuticas (TS, DPD, DHFR, GARFT, Topo I...)

#### 1.3.2.1. El oncogén K-rastt

La familia *ras* representa uno de los oncogenes más comúnmente detectados en tumores humanos (*Fearon ER y Vogelstein B, 1990*). Estos genes codifican para proteínas de peso molecular 21 KDa, localizadas en la cara interna de la membrana

citoplasmática, que actúan como moléculas transductoras de señales que afectan a la proliferación y diferenciación celular así como en el control del citoesqueleto y del tráfico de moléculas entre los distintos compartimentos intracelulares. Están involucradas en la señalización de otras vías tales como la apoptosis y la angiogénesis (Bogusky MS y col, 1993).

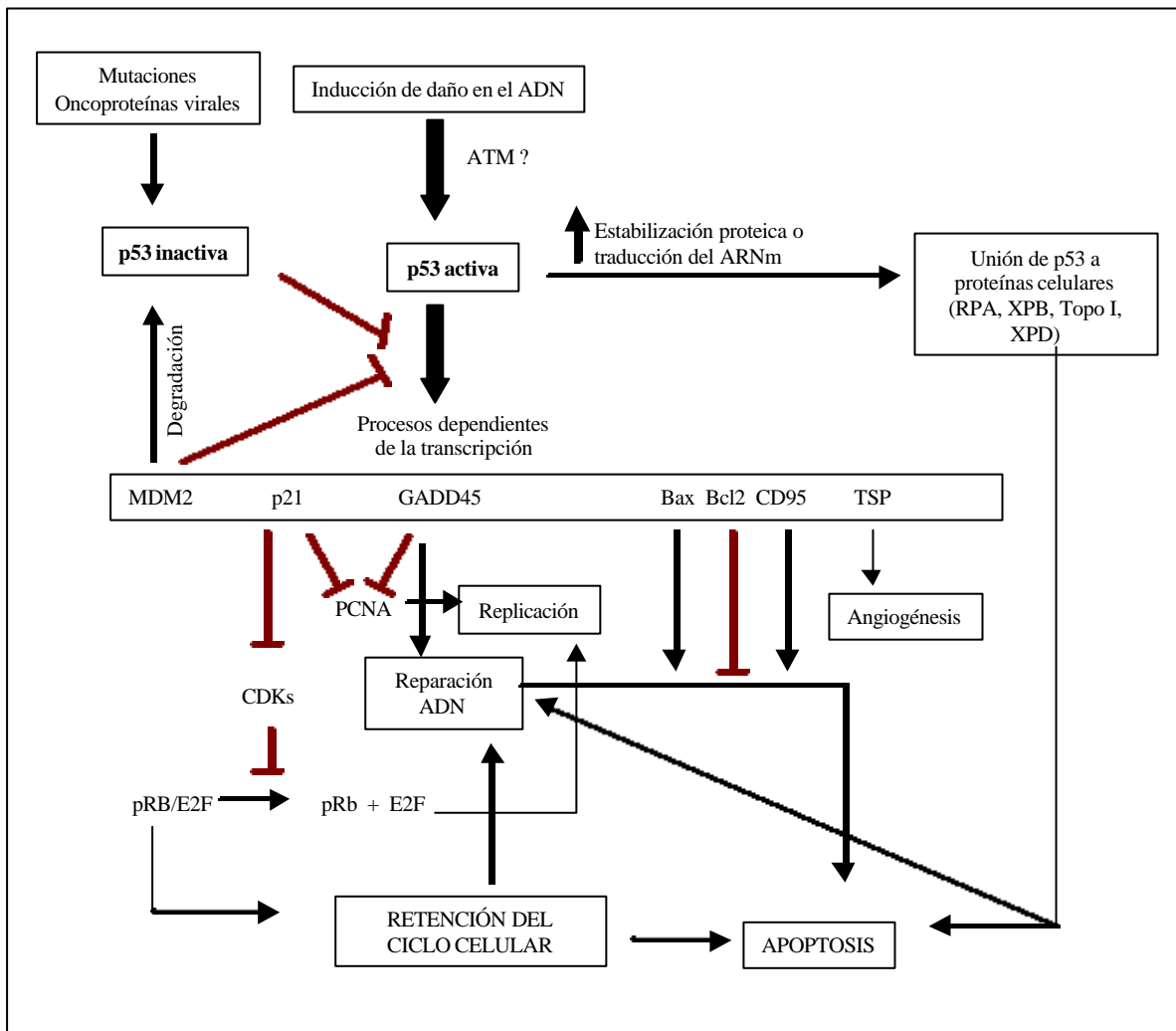
Las mutaciones en K-ras ocurren con frecuencia en CCR (50%) y es uno de los eventos previos en la tumorigénesis colorrectal (principalmente en el paso de adenoma I a II, *figura 1*). La mayoría de mutaciones ocurren en el codón 12 (la más agresiva) o 13 y con menor frecuencia en el codón 6. Estas mutaciones conducen a la activación constitutiva de la proteína, que estimula constantemente la división celular y otros procesos. En 1998, se publicó un meta-análisis denominado “RASCAL” que incluye 2721 pacientes. Los resultados muestran que las mutaciones en K-Ras se asocian significativamente con el grado de diferenciación histológica aunque no con el sexo, la edad, localización y estadio, e incrementan significativamente el riesgo de recaída y de muerte.

### **1.3.2.2. El gen supresor tumoral p53**

La expresión de p53 se induce por numerosos estímulos que incluyen la radiación ionizante, UV, fenómenos de hipoxia, privación de factores de crecimiento y el daño inducido en el ADN por determinados agentes antineoplásicos. Las principales funciones fisiológicas de la p53 son la regulación del ciclo celular en los puntos de transición de G1/S y de G2/M (a través de la inducción de la síntesis de proteínas inhibitoras de los complejos ciclina/quinasas dependientes de ciclinas), la activación de procesos de reparación del ADN (inducción de GADD45) y la señalización de procesos de apoptosis en los casos en que la reparación del daño genotóxico inducido no pueda ser reparado (activando Bax e IGFBP3 o inhibiendo Bcl-2 por unión a las zonas promotoras de estos genes).

Respecto al papel que desempeña la p53 en la respuesta a quimioterapia es aún hoy controvertido. En algunos casos, la inactivación de p53 resulta en un incremento en la resistencia mientras que en otros, se ha correlacionado con un incremento en la sensibilidad a las drogas. Los estudios preclínicos sugieren que esta respuesta a los citotóxicos depende tanto del contexto celular como del agente antineoplásico utilizado. Si la principal respuesta por parte de la célula a los efectos genotóxicos es el bloqueo de

la replicación y la activación de mecanismos de reparación, la p53 actuaría deteniendo el ciclo celular, favoreciendo la reparación del ADN en vez de los procesos de apoptosis y afectando potencialmente a la resistencia a los diferentes fármacos utilizados. En otros casos, sin embargo, el papel principal de esta proteína es la inducción de muerte por apoptosis por lo que las alteraciones de la p53 incrementan la sensibilidad a los fármacos.



**Figura 2. Esquema de las dos vías de actuación de la p53:** una, dependiente de su actividad transcripcional que es compleja e involucra la activación de diferentes genes (p21, bax, bcl2,...) en función del contexto celular. Y otra vía, independiente de la actividad transcripcional, que ocurre por la interacción directa de la p53 con proteínas involucradas en la síntesis del ADN, la reparación del ADN o la apoptosis.

Los resultados sobre el valor predictivo del estado de la p53 en la respuesta a quimioterapia en la clínica son contradictorios, debido entre otras cosas a una



discordancia en los métodos de determinación utilizado. Hemos de tener en cuenta además, que la respuesta a quimioterapia es un evento multifactorial que no puede explicarse basándose únicamente en el estado de una molécula aislada.

### ***1.3.2.3. Ganancias y/o pérdidas alélicas: Allelic imbalance***

Las deleciones (LOH) en el brazo largo del cromosoma 18 son un evento común en el CCR, se halla mutado en un 70% de los tumores, en el 50% de los adenomas avanzados y en el 100% de las metástasis hepáticas (*Vogelstein, 1988*). Su inactivación se asocia a tumores más agresivos y se han relacionado con una peor supervivencia en pacientes en estadio II y III, aunque existen discrepancias en éste último (*Martínez-López E, 1998*). Entre los genes localizados en este cromosoma 18q, encontramos el gen DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*), que codifica para una proteína que presenta similitudes con otras proteínas implicadas en la adhesión gen ocurren con elevada frecuencia y es uno de los eventos iniciales en la tumorigenesis colorrectal.

Recientemente, se ha identificado que las ganancias en la región del cromosoma 8p correlacionan con la supervivencia en CCR, aunque aún no se ha identificado el gen supresor tumoral responsable. Uno de los genes que se localizan en esta zona es el oncogén c-myc que se halla sobreexpresado en el 60% de los tumores de colon y que se ha correlacionado con un mejor pronóstico (*Mcleod HL, 1999*).

### ***1.3.2.4. El sistema reparador de aparejamiento incorrectos: Mismatch repair system***

Este sistema reparador (MMR) identifica y repara las lesiones inducidas en el ADN por el aparejamiento incorrecto entre bases nucleicas causadas por los fallos de las polimerasas del ADN durante la replicación celular. Además, el *MMR* participa también en la reparación del ADN durante la transcripción, la meiosis y los procesos de recombinación homóloga.

En humanos el sistema MMR comprende un complejo de proteínas codificadas por 6 genes: hMSH2 (localizado en el cromosoma 2p), hMLH1 (cromosoma 3p),

hPMS1 (cromosoma 2q), hPMS2 (cromosoma 7p), hMSH3 (cromosoma 5q), hMSH6 (también denominado GTBP, localizado en el cromosoma 2p).

El sistema MMR identifica el apareamiento incorrecto y elimina los nucleótidos desaparejados en la cadena del ADN recién sintetizada opuesta a la hebra molde (*template*). Para ello, la proteína hMSH2 forma un heterodímero con la hMSH6 (complejo *hMutS<sub>a</sub>*) o en su defecto con hMSH3 (*hMutS<sub>b</sub>*) que actúa uniéndose al ADN en el punto erróneo. Una vez se ha unido, recluta al heterodímero compuesto por hMLH1/hPMS2 (complejo *hMutL<sub>a</sub>*), formando de este modo el complejo funcional de reparación.

Si el sistema MMR es defectuoso, debido a mutaciones en alguno de estos genes reparadores, los errores de replicación (RER+) no pueden ser corregidos y resultan en la acumulación de mutaciones (inserciones y/o deleciones) en una serie de secuencias repetitivas no codificantes del genoma denominadas microsatélites (*Inestabilidad de microsatélites, MI*). La acumulación de errores acaba finalmente afectando a oncogenes y genes supresores tumorales que regulan el crecimiento y la proliferación celular. Esta *MI* es además, una característica de las células tumorales que no aparece en las células normales, por lo que puede considerarse como un marcador tumoral

Los defectos en este sistema reparador favorecen la oncogénesis y puede ocasionar resistencia a diferentes agentes antineoplásicos tanto directamente, porque la capacidad de la célula para detectar las lesiones en su ADN está deteriorada así como su capacidad para activar la apoptosis, como indirectamente, porque el mal funcionamiento del sistema MMR favorece la acumulación de mutaciones en todo el genoma que llegan a afectar a oncogenes y TSGs implicados también en la respuesta celular a la quimioterapia (*Fink D y col, 1996*).

Existen evidencias *in vitro* e *in vivo*, de que las células deficitarias en el sistema MMR presentan resistencia a agentes alquilantes (cisplatino, carboplatino) y a los inhibidores de la Topoisomerasa II (etopósido y antraciclinas) (*Fink D y col, 1998b*). Es más, el tratamiento continuado con estos agentes selecciona a la población celular deficitaria en el sistema MMR, puesto que estas células resistentes son capaces de tolerar el daño inducido en el ADN por la quimioterapia y continuar su replicación, evitando la parada del ciclo celular y la muerte por apoptosis (*Fink D y col, 1998b*).

### **1.3.2.5. Las dianas terapéuticas**

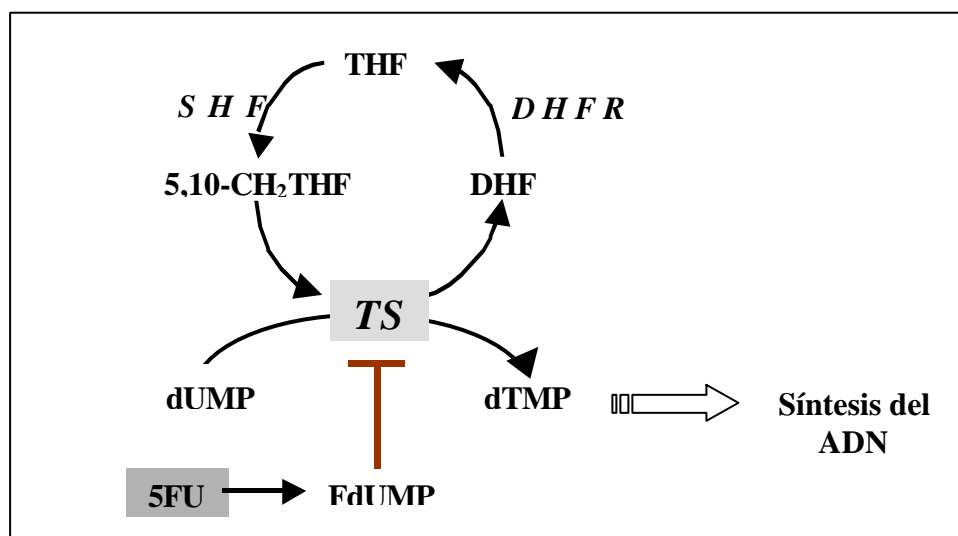
Se conoce que los niveles de expresión (tanto del gen como de la proteína) de determinados enzimas que son dianas terapéuticas para los diferentes agentes quimioterápicos utilizados en CCR, son capaces de predecir la respuesta de la quimioterapia en términos de supervivencia, tal y como detallaremos más adelante.

Citaremos aquí algunos de estos factores: a) en el caso de la terapia basada en fluoropirimidinas son considerados marcadores predictivos el nivel de la expresión de las enzimas TS (diana o *target* del 5-FU), la DPD (involucrada en el catabolismo del 5-FU y, por tanto, de la concentración intracelular de la droga) y la Timidina Fosforilasa o TP (involucrada en el anabolismo del 5-FU pero que también tiene un papel angiogénico); b) en el caso de los agentes platinados señalar el papel de los diferentes mecanismos de reparación del ADN así como de determinados sistemas de detoxificación de drogas (sistema de la glutatión y metalotioneínas); c) el papel de la expresión de la Topoisomerasa I o la glucuronidización como predictores de la actividad de los análogos de la camptotecina; y d) la implicación de otros procesos como la cinética del ciclo celular, la transducción de señales y los procesos de muerte celular programada.

## 1.4. EL 5-FLUOROURACILO: BASES BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES

El 5-Fluorouracilo (5-FU), es una fluoropirimidina que pertenece al grupo de los antimetabolitos. Las drogas de esta familia ejercen su citotoxicidad actuando como pseudosubstratos inhibidores de las enzimas de las rutas sintéticas de macromoléculas fundamentales para la integridad y la función celular. En concreto, el 5-FU actúa inhibiendo a la enzima Timidilato Sintasa (TS; 5,10-metilén-tetrahidrofolato:dUMP-C-metiltransferasa EC 2.2.2.45). La TS es también una diana importante para distintos agentes quimioterápicos actualmente en fase de estudio -las fluoropirimidinas (FdUrd, UFT, Capecitabina, S-1) y los antifolatos (Raltitrexed, Nolatrexed, MTA, GW1843U89)- para el tratamiento de distintos tumores (mama, colon, estómago, cabeza y cuello y pulmón).

La TS, codificada por un gen que mapa en el cromosoma 18p, es una enzima citosólica con una estructura dimérica compuesta por dos subunidades idénticas de aproximadamente 38,5 KDa. Esta enzima participa en la síntesis *de novo* de dTMP, precursor necesario para la biosíntesis del ADN, catalizando la metilación reductiva de desoxiuridina-5'-monofosfato (dUMP) a desoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP) mediada por la presencia del cofactor de folatos reducidos, N<sup>5</sup>N<sup>10</sup>-metiléntetrahidrofolato (CH<sub>2</sub>THF<sub>4</sub>) que actúa como grupo donador de metilos (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de la reacción catalizada por la enzima *Timidilato Sintasa*. Abreviaturas: TS: Timidilato Sintasa, DHFR: Dihidrofolato reductasa, SHF: Serín-hidroximetil transferasa

### 1.4.1. MECANISMO DE ACCIÓN

El 5-FU entra en la célula por mecanismos de transporte facilitado para el uracilo (Gorlick R, 1999) y se metaboliza mayoritariamente a su forma activa, 5-fluorodesoxiuridina monofosfato (FdUMP), utilizando para ello las enzimas de la ruta de síntesis de los precursores de ácidos nucleicos. El FdUMP compite con el substrato natural (dUMP) y forma un complejo ternario covalente estable que mantiene inhibida a la enzima. La inhibición de la TS conlleva una disminución en los niveles de dTMP y, por consiguiente, de desoxitimidina-5'-trifosfato (dTTP) y a la acumulación indirecta de dUMP. Esto resulta en la incorporación de desoxiuridina-5'-trifosfato (dUTP) en el ADN debido a la ausencia del substrato natural dTTP, conduciendo finalmente a una inhibición de la síntesis del ADN y la subsiguiente inducción de muerte celular (proceso conocido con el nombre de *thymineless death*).

Adicionalmente, el 5-FU se metaboliza hacia otras dos formas, la 5-fluorodesoxiuridina trifosfato (5-FdUTP) y la 5-fluorouridina trifosfato (5-FUTP), que actúan como falsas bases incorporándose en el ADN y ARN de la célula respectivamente, alterando su metabolismo y conduciéndola finalmente a la muerte.

El grado de importancia de cada uno de estos tres mecanismos de actuación varía entre los diferentes tumores colorrectales, dependiendo también del esquema de administración de la droga. Así, la administración prolongada ejerce su toxicidad principalmente a través de la inhibición de la TS mientras que en forma de *bolus* resultaría en una toxicidad mediada mayoritariamente por su incorporación en el ARN (Sobrero, 1997; Papamichael D, 2000).

### 1.4.2. Mecanismos de resistencia a 5-Fluorouracilo

Durante los últimos años se han desarrollado numerosas estrategias para identificar y conocer los factores moleculares involucrados en la resistencia al 5-FU en tumores sólidos. Como veremos esta resistencia es un evento multifactorial (tabla 2) y conduce a una falta de efectividad del fármaco.

Uno de los principales mecanismos descritos es el incremento en los niveles de TS. Existen numerosos trabajos *in vitro* e *in vivo* que demuestran que cuando las células neoplásicas se exponen a 5-FU sobreexpresan TS como un mecanismo de protección

frente al estrés citotóxico. De hecho, tal y como se ha comentado anteriormente, los niveles de TS se consideran actualmente, como un marcador predictivo de la respuesta a 5-FU.

Tabla 2. *Determinantes celulares de la sensibilidad al 5-FU*

- ✓ *Niveles de expresión/actividad de la Timidilato Sintasa*
- ✓ *Niveles intracelulares de dUMP y de folatos reducidos*
- ✓ *Grado de incorporación de FdUTP y de FUTP en el ADN y ARN, respectivamente*
- ✓ *Actividad de las enzimas involucradas en el catabolismo del 5-FU (DPD)*
- ✓ *Actividad de las enzimas involucrados en el anabolismo del 5-FU*
- ✓ *Estado de las vías de respuesta al daño inducido en el ADN (apoptosis/reparación)*
- ✓ *Alteraciones en la cinética del ciclo celular*
- ✓ *Disponibilidad de los cofactores necesarios para la activación del 5-FU*

#### **1.4.2.1. Niveles de expresión de la Timidilato Sintasa**

Los estudios en la clínica demuestran una correlación significativa entre los niveles de expresión intratumorales del gen en el tumor primario y la respuesta al tratamiento con 5-FU y la supervivencia. *Lenz HJ y col (1996)* analizaron 57 pacientes con cáncer gástrico sometidos a infusión continua de 5-FU combinado con Leucovorín y Cisplatino. De estos enfermos 20 respondieron al tratamiento, siendo la media de ARNm de TS en estos pacientes de  $2,3 \times 10^{-3}$  mientras que en los enfermos que no respondieron era de  $6,8 \times 10^{-3}$ . Además, el grupo con niveles bajos de TS presentaba una supervivencia de 43 meses que contrastaba significativamente con los 6 meses del grupo con niveles de TS elevados. Estos mismos investigadores (*Leichman LG, 1997; Lenz HJ, 1998*) analizan la expresión de TS en pacientes con cáncer colorrectal avanzado en tratamiento con infusión de 5-FU. El grado de respuesta en los pacientes que presentaban niveles elevados de ARNm por encima de la media global sólo fue de un 5%. Sin embargo, en estos estudios se observa que algunos pacientes con niveles bajos no responden al tratamiento. Esto indica que es necesario tener en cuenta la expresión de otros genes además de la TS para predecir la respuesta a la quimioterapia con 5-FU.

El aumento en los niveles de expresión de la TS puede provenir de varias vías moleculares:

- *Procesos de amplificación génica*: la exposición continua a 5-FU conduce a la selección dentro del tumor de un grupo de células que presentan mayor número de copias del gen que codifica para la TS. Este hecho se traduce en un incremento en la expresión y, por tanto, en un aumento en los niveles enzimáticos asociándose generalmente a un incremento en la proliferación celular (*Berger SH, 1985; Swain SM, 1989*).

- *Polimorfismo del promotor de la TS*. En la zona promotora del gen se ha identificado una región polimórfica en la zona 5'UTR (*Untranslated Region*) cercana al codón de inicio AUG, que contiene 2 o 3 secuencias de 28 pares de bases repetidas en tándem (*tandem repeats*). Esta región no contiene puntos de unión para factores de transcripción, pero actúa como un elemento amplificador o *enhancer* del gen (*TSER: Thymidylate Synthase Enhancer Region*). Los estudios *in vitro* demuestran que la presencia de la triple repetición en los dos alelos comporta niveles de expresión de hasta 2,6 veces superiores respecto a la doble repetición (*Horie y col, 1995*). Estudios posteriores en pacientes afectados de cáncer colorrectal demuestran que la presencia de triples repeticiones (genotipo 3/3) conduce a un incremento de hasta 3,5 veces de expresión respecto a la doble repetición (genotipo 2/2) existiendo además, una correlación entre el genotipo, la expresión proteica de la enzima y una menor respuesta a la quimioterapia basada en 5-FU (*KawaKami K, 1999; Pullarkat ST, 2000*). Recientemente, se ha identificado otro polimorfismo en la zona 3'UTR del gen TS que consiste en la delección de 6 pares de bases (*Lenz HJ y col, 2002*). Estos autores analizan la importancia del polimorfismo en pacientes afectados de cáncer colorrectal y muestran que los niveles intratumorales de TS (ARNm) correlacionan de forma inversa con el número de delecciones de 6 pares de bases. Los individuos homocigotos para el alelo *wild-type* (+6pb/+6pb) tienen una expresión de TS 4,2 veces superior a la de los individuos homocigotos para la delección (-6pb/-6pb). Por tanto, la delección de 6pb en la zona 3'UTR de la TS está asociada a una disminución en los niveles de expresión del gen TS en tumores colorrectales probablemente debida a un incremento en la

inestabilidad del ARNm. Estos resultados tienen una gran importancia en la clínica ya que los niveles disminuidos de TS correlacionan con una mejor respuesta al tratamiento con 5-FU. Por otro lado, la disminución en los niveles de expresión de TS conllevaría un desequilibrio en el balance de nucleótidos que puede resultar en un incremento en la mis-incorporación de Uracilo en el ADN de las células en replicación, incrementando la proliferación de células malignas y por tanto, aumentando el riesgo a padecer cáncer de colon (*Lenz HJ y col, 2002*)

- *Mutaciones en el gen de la TS*, que generan un péptido más inestable que la forma silvestre o *wild-type*, por lo que es rápidamente degradado, requiriéndose por tanto, una concentración de ARNm mayor para mantener los niveles adecuados de proteína TS. Se observa, por tanto, un incremento en la expresión del gen aunque no en los niveles enzimáticos (*Kitchens ME y col, 1999*). Estas mutaciones provocan además cambios conformacionales que alteran la estructura de la proteína, resultando en una enzima catalíticamente inactiva y afectando a su capacidad para formar el complejo ternario (catalítico con el dUMP o inhibitorio con el FdUMP). Las mutaciones que se conocen del gen se han descrito *in vitro*, y la contribución de las mismas en la sobreexpresión de TS *in vivo* no está bien establecido.

#### **1.4.2.2. Regulación traduccional y post-traduccional de la Timidilato Sintasa**

Se sabe que la respuesta a la quimioterapia con 5-FU depende de la concentración enzimática. Sin embargo, el aumento en los niveles proteicos no siempre obedece a un incremento en el nivel de expresión del ARNm, indicando la existencia de una regulación a nivel traduccional y/o post-traduccional de la enzima. *Chu E y col* postularon en 1991, el *Modelo de Autorregulación Traduccional de la Timidilato Sintasa*. Este modelo muestra que la proteína es capaz de unirse a su propio ARNm inhibiendo así su traducción. Los ligandos de la TS (dUMP y  $\text{CH}_2\text{THF}_4$ ) impiden esta unión y restablecen la traducción. El tratamiento prolongado con 5-FU comporta una acumulación de FdUMP y dUMP en el ámbito intracelular. Cada uno de estos substratos puede interactuar con TS, de forma que disminuye la concentración de la enzima libre. La TS ligada no puede inhibir su traducción (pérdida de la capacidad



autorreguladora) soportando una mayor traducción y permitiendo a la célula evadirse de la presión del 5-FU.

En un estudio más reciente, *Kitchens ME y col (1999)* proponen otro modelo para explicar el incremento de los niveles proteicos de la TS en las células tratadas con fluoropirimidinas. Estos autores no hallan evidencias de un control de la traducción mediado por la unión de TS a su ARNm (no se observa un aumento en el número de ribosoma unidos al ARNm –esta unión es uno de los pasos limitantes de la traducción en células eucariotas- ni una alteración en la expresión de TS en presencia de la droga aún cuando se provoca un cambio aminoacídico en la zona de unión de TS a su ARNm) Además, los análisis bioquímicos muestran la estabilización de la proteína en presencia de fluoropirimidina (tiempo de vida media de 25h en las células tratadas respecto a 7.3 h en el control sin tratar). Por otro lado, ya se había descrito que la unión de los ligandos estabiliza a la proteína. Se sabe que en la formación del complejo ternario (catalítico o de inhibición) la TS realiza un cambio conformacional, que consiste en un plegamiento de la zona carboxiterminal sobre el centro activo de la enzima. La unión del co-substrato folato estabiliza finalmente a la forma cerrada de la enzima. (*Kitchens ME, 1999b*). Estos estudios sugieren por tanto, que la inducción de TS en las líneas resistentes ocurre por una estabilización del polipéptido causada por uno o más factores que regulan la degradación de la enzima (eventos post-traduccionales) y no por la pérdida de la capacidad autorreguladora. La proteína es más estable presentando un tiempo de vida media superior por lo que el FdUMP se mantiene más tiempo ligado formando el complejo ternario de inhibición. Disminuye así la cantidad de nucleótido análogo disponible para inhibir a la enzima recién sintetizada (dado que la TS ligada no puede inhibir su traducción) y, por tanto, la célula puede escapar a la presión del 5-FU, contribuyendo a la resistencia a la droga.

#### **1.4.2.3. Otros mecanismos de resistencia a 5-Fluorouracilo**

✓ *Alteraciones en los transportadores de nucleótidos:* el 5-FU entra en la célula por el sistema de transporte de bases púricas (no dependiente de energía). La inhibición de TS por el 5-FU provoca una disminución en los niveles de timidina. Sin embargo, en la célula existen otras fuentes de timidina aparte de la síntesis *de novo*. En una masa tumoral, el aporte de este nucleótido puede provenir también del sistema vascular o de

la reutilización de la timidina liberada por las células muertas. De hecho, se observa un incremento en la actividad enzimática de la Timidina Quinasa (TK) en las células tumorales respecto al tejido normal, indicando la importancia en los tejidos tumorales de estas vías *de rescate* para la subsiguiente síntesis del ADN (Pettersen AV, 1998). El abastecimiento celular de timidina ocurre vía: a) transportadores de nucleósidos de la superficie celular sensibles o no a S-(p-nitrobencil)-6-tioinosina (Belt J, 1993) b) transporte asociado a canales de Na<sup>+</sup> y dependiente de energía que presenta gran afinidad por Timidina (Griffith DA, 1993); y c) a una difusión no facilitada.

Existen evidencias del incremento (entre un 22-39%) de la actividad del transporte de nucleósidos como consecuencia de la inhibición continuada de TS en una línea tumoral derivada de cáncer de vejiga (Pressaco J, 1995). Por tanto, el incremento en la actividad de los sistemas de transporte tanto facilitado como no facilitado provee de timidina a la célula, aumentando los niveles de dTMP necesario para la biosíntesis del ADN, y revierte el efecto citotóxico provocado por los inhibidores de TS.

#### ✓ *Alteraciones en las enzimas implicadas en el catabolismo y el anabolismo del 5-FU*

La enzima *Dihidropirimidín deshidrogenasa (DPD)* cataliza el primer paso en la vía de catabolismo de las pirimidinas y, por tanto, del 5-FU (Figura 3). La DPD reduce el doble enlace 5,6 del 5-FU (del uracilo en las células normales) a una forma inactiva, el 5-dihidrofluorouracilo (5-FUH<sub>2</sub>), mediante una reacción enzimática. Este es el paso limitante del catabolismo de este agente, influyendo por tanto, en la biodisponibilidad del 5-FU, pudiendo afectar a su farmacocinética, toxicidad y actividad antitumoral.

Los estudios en la clínica demuestran que el incremento de la actividad y la expresión de la DPD correlacionan inversamente con la respuesta a 5-FU: a menor actividad enzimática, mayor citotoxicidad. Así, los pacientes con niveles de DPD dentro del rango normal eliminan rápidamente el 80% del 5-FU administrado como 3-fluoro-β-alanina, mientras que los pacientes con deficiencias en niveles de la DPD retienen el 5-FU, alcanzando la droga un tiempo de vida mucho mayor, excretando 5-FU no modificado en orina y causándoles toxicidad severa (Stephan, 1995). Recientemente, Salonga D y col (2000) analizan los niveles de TS, DPD y Timidina fosforilasa (TP) en

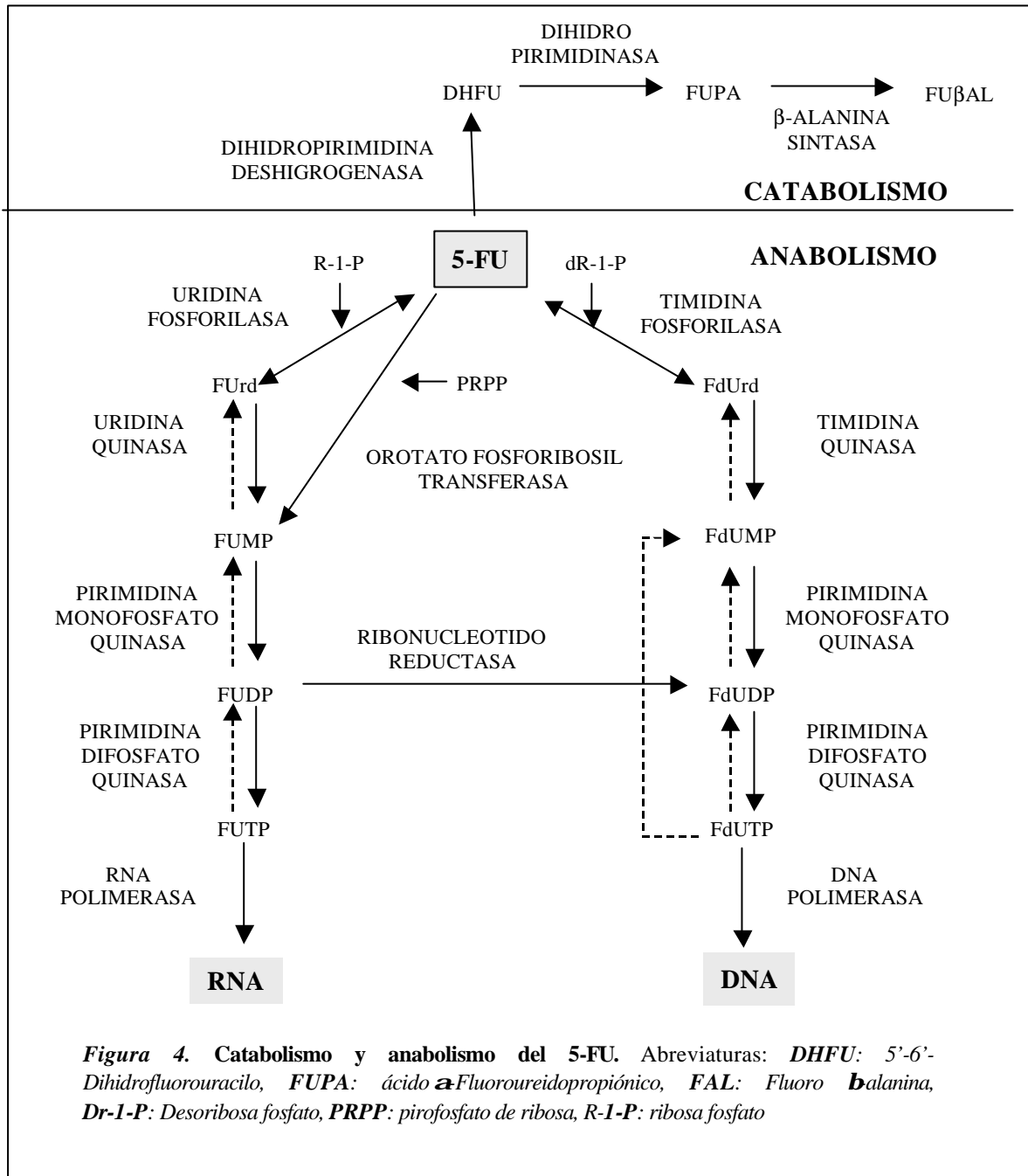
pacientes afectados de cáncer colorrectal. Este estudio muestra que los niveles bajos de la DPD son un factor pronóstico de mejor respuesta clínica y una mayor supervivencia. Además, señalan que los pacientes con mejor pronóstico (respuesta 92%) son aquellos que presentan niveles bajos de expresión de las tres enzimas, TS, TP y DPD.

La *Timidina fosforilasa (TP)* también denominada Platelet-derived endotelial cell growth factor, cataliza la interconversión de timina a timidina utilizando la deoxirribosa-1-fosfato (dR-1P) y un fosfato inorgánico ( $P_i$ ) como segundos sustratos. La TP también cataliza la reacción de transferencia de un grupo desoxirribosilo de un nucleótido a otro. El principal papel de la TP es el control de los niveles intracelulares de timidina, ya que concentraciones elevadas de este nucleótido son tóxicas para la célula y causan la acumulación de errores de replicación en el ADN. Además, se sabe que la TP es un factor angiogénico que promueve el crecimiento tumoral, la progresión metastásica y está relacionado con un fenotipo tumoral agresivo. Así, el incremento en los niveles de la TP es un factor de mal pronóstico en cáncer colorrectal (*Takebayashi, 1996*), cáncer gástrico (*Maeda K, 1996*) y cáncer de mama (*Toi M, 1995*).

La TP participa además, en el anabolismo del 5-FU, en la interconversión a 5-fluoro-2-desoxiuridina (FdUrd) utilizando la deoxirribosa-1-fosfato como sustrato (Figura 4). En un estudio reciente *Metzger y col (1998)* analizan el valor predictivo de los niveles de TS y TP en pacientes afectados de cáncer colorrectal no tratados previamente y sometidos a quimioterapia que contiene 5-FU, y hallan que el incremento en los niveles de TP está asociado a una peor respuesta al tratamiento. Esta relación inversa parece ser una consecuencia directa del papel angiogénico de la TP, sugiriendo que el aumento de la expresión de esta enzima es un marcador de otros cambios genéticos asociados al desarrollo de un fenotipo tumoral más agresivo y maligno que contribuye a la resistencia a agentes citotóxicos como el 5-FU a través de la pérdida del potencial apoptótico. Sin embargo, tal y como ocurre con la DPD, para poder predecir con una mayor precisión la sensibilidad de los tumores a la quimioterapia basada en 5U es necesario tener en cuenta la expresión de la TS y DPD (*Salonga, 2000*).

La *Timidina Quinasa (TK)* es la enzima implicada en la conversión de timidina a timidilato en la *vía salvaje (salvage pathway)*. En las células tumorales se observa una sobreexpresión de los niveles de esta enzima respecto al tejido normal, ya que como

hemos comentado anteriormente, la TK participa en las vías *de rescate* de timidina permitiendo restablecer los niveles de dTMP, reduciendo así, la actividad antitumoral del 5-FU (Pettersen A V, 1998).



**Figura 4. Catabolismo y anabolismo del 5-FU.** Abreviaturas: *DHFU*: 5'-6'-Dihidrofluorouracilo, *FUPA*: ácido  $\alpha$ -Fluoroureidopropiónico, *FAL*: Fluoro  $\beta$ alanina, *Dr-1-P*: Desoribosa fosfato, *PRPP*: pirofosfato de ribosa, *R-1-P*: ribosa fosfato

La Orotato fosforibosil transferasa (OPRT), la Uridina fosforilasa (UP), la Uridina quinasa (UK). Estas enzimas están involucradas en el anabolismo del 5-FU (Figura 3). Los niveles disminuidos o una menor actividad de las mismas junto con la

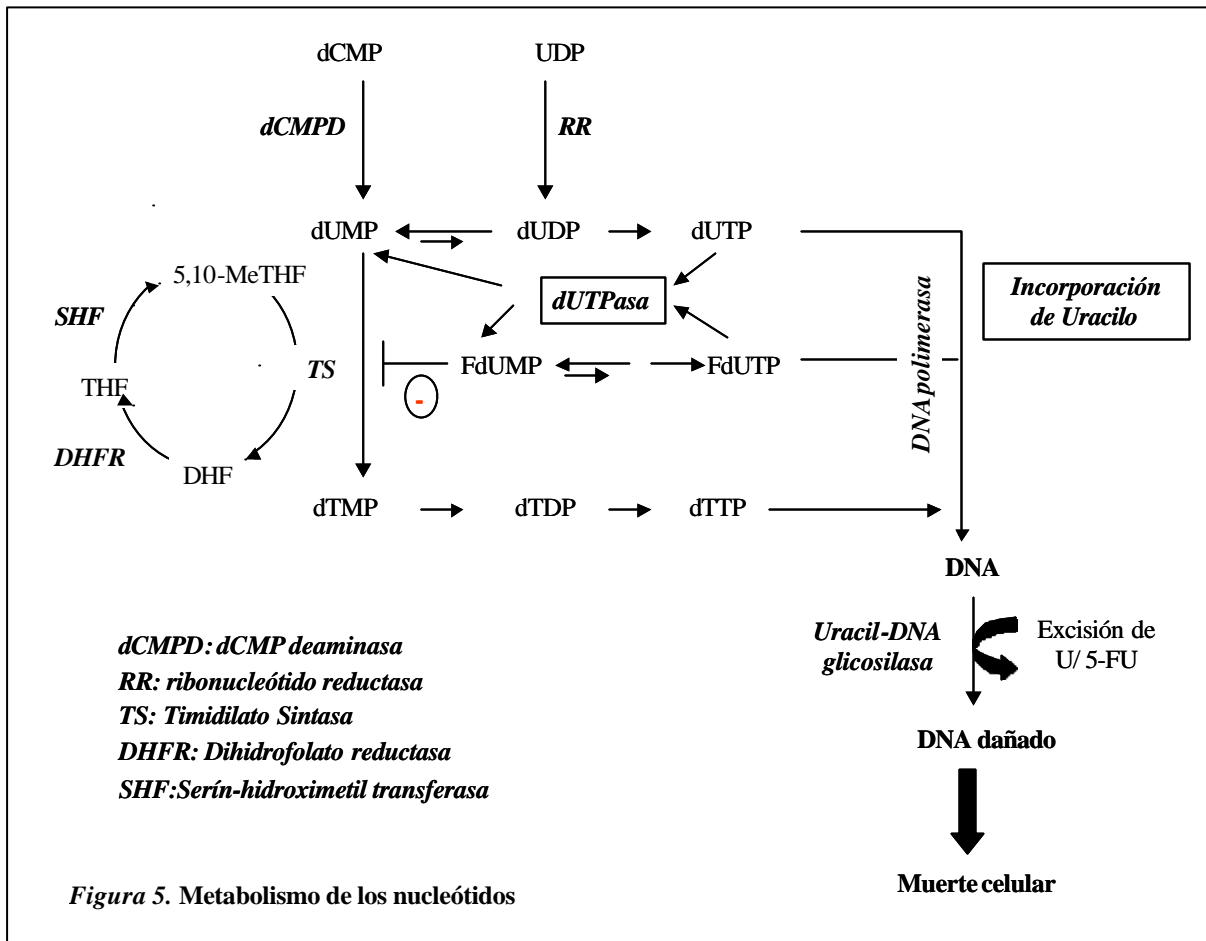
sobreexpresión de la TS contribuyen a una mayor resistencia al fármaco, puesto que implican menor anabolismo del 5-FU y por tanto, una menor incorporación del mismo en los ácidos nucleicos, ADN y ARN (Chung YM, 2000; Cao D, 2001; Gorlick R, 1999).

✓ *Grado de incorporación de dUTP y FdUTP en el ADN y ARN*

El uracilo no es un componente del ADN nativo, aunque puede hallarse en el mismo por un proceso espontáneo de deaminación de residuos de citosina (catalizado por la enzima dCMP deaminasa) o a través de la utilización del dUTP por las polimerasas del ADN durante la replicación (figura 5). En condiciones normales el mantenimiento del ADN libre de uracilo se debe a la acción combinada de dos enzimas: la deoxiuridina 5-trifosfato nucleótido hidrolasa (dUTPasa) que hidroliza el dUTP rindiendo dUMP y PPi, y la Uracil-ADN glicosilasa (UDG) que elimina los residuos de uracilo del ADN.

La acumulación de dUTP y FdUTP y el descenso de los niveles de dTTP, que regula de forma *feed-back* negativa a la enzima dCMP deaminasa, provocan el incremento del *pool* de dUMP durante la inhibición de la TS. Los niveles incrementados de estos nucleótido superan la capacidad de la enzima dUTPasa y son incorporados en el ADN durante la replicación. La célula entra entonces en ciclos repetidos de incorporación de uracilo y reparación mediada por la UDG, que provocan finalmente un incremento en los procesos de recombinación del ADN, roturas en las hebras (*DNA-strand breaks*) y conducen a la muerte celular.

Ladner RD y col (2000) analizan la expresión de la enzima dUTPasa y su relación con la respuesta quimioterapia y la supervivencia en 20 pacientes con cáncer de colon metastásico tratados con infusión de 5-FU/LV. El incremento en la expresión nuclear de la dUTPasa se asoció significativamente con la resistencia a 5-FU, un menor tiempo a la progresión y una menor supervivencia mediana. Estos datos sugieren que la variación en la expresión de la enzima dUTPasa puede ser un factor pronóstico de la eficacia de los inhibidores de la TS porque limita la acumulación de dUTP y previene la incorporación del Uracilo en el ADN, impidiendo por tanto, la inducción de daño celular (Mastran BA, 2001).



#### ✓ Vía de los folatos

El metilén tetrahydrofolato ( $\text{CH}_2\text{FH}_4$ ) es el cofactor necesario para la formación del complejo ternario de inhibición junto con el FdUMP y la enzima TS (Figura 1). En el medio intracelular, el  $\text{CH}_2\text{FH}_4$  es poliglutamado por la enzima *folilpoliglutamato sintetasa* (FPGS). La actividad disminuida de la FPGS y de otras enzimas de la vía de los folatos como la *Dihidrofolato Reductasa* (DHFR) y los *transportadores de folatos reducidos* (RFC), conllevan un descenso en la formación de poliglutamatos que afecta a la formación de complejo ternario inestable y se traduce en una inhibición menos prolongada de la TS por el 5-FU (Sobrero AF, 1997).

Chazal M y col (1997) analizan la actividad y los niveles proteicos de la FPGS y la TS y la relación con la respuesta a quimioterapia con 5-FU en metástasis hepáticas y tumores primarios de 44 pacientes con cáncer colorrectal avanzado antes del inicio del tratamiento. Este estudio muestra que niveles incrementados de TS junto con niveles disminuidos de FPGS contribuyen a la resistencia al tratamiento.

✓ *Cinética del ciclo celular: Papel de oncogenes y genes supresores tumorales*a) *El factor de transcripción E2F-1*

El E2F-1 libre es un factor de transcripción que en condiciones normales se halla ligado a la proteína Retinoblastoma (pRb) en estado hipofosforilado, impidiendo su acción. Durante la progresión del ciclo celular (fase G1 a S), los complejos ciclinas/quinasas dependientes de ciclinas (CDK) hiperfosforilan la pRb relajando la unión de esta proteína al factor E2F-1 que, una vez libre, activa la transcripción de genes que codifican para proteínas activas en las síntesis de DNA (TS, TK, DHFR, entre otras) (DeGregori J, 1995). Kasahara M y col (2000) analizan los niveles de expresión de ARNm de TS y E2F-1 en tumores de colon de pacientes no tratados anteriormente con quimioterapia, y demuestran que la sobreexpresión de los niveles de E2F-1 correlaciona con el incremento de los niveles de TS y una peor respuesta al tratamiento con 5-FU. Además un estudio reciente muestra que las metástasis pulmonares de CCR presentan una expresión de TS cuatro veces superior a las metástasis hepáticas, con una clara correlación con los niveles de E2F-1 (Benarjee D y col, 2000) y una peor respuesta al tratamiento.

b) *Ciclina D1*

La ciclina D1 participa en la regulación del ciclo celular en la transición de fase G1 a S (fosforila a la pRb). Estudios clínicos recientes sugieren que esta subunidad quinasa desempeña un papel en la transformación neoplásica y la progresión tumoral. Los estudios *in vitro* en un panel de líneas celulares muestran la correlación entre la sobreexpresión de ciclina D1 con la sobreexpresión de TS y la disminución de los niveles de TP (Kornman M, 1999). Este incremento en los niveles de TS se traduce en una menor efectividad del 5-FU.

c) *Gen supresor tumoral p53*

Además de los mecanismos bioquímicos descritos con anterioridad, el 5-FU ejerce su acción citotóxica en parte, a través de la inducción de apoptosis. La apoptosis debida a una deprivación de timidina o a la incorporación del FU en el ARN son procesos dependientes de la p53. En particular la apoptosis *in vitro* inducida por el 5-

FU, requiere de la expresión de p53 (Yang B, 1996). En cáncer colorrectal, un tipo de tumor que responde muy poco a la quimioterapia, las mutaciones de p53 son eventos bastante comunes y pueden determinar la respuesta clínica de los tumores (Bulleco C, 1996).

En un estudio publicado por Lee y col (1997) se sugiere que la p53 wild-type podría actuar modulando directamente la expresión de TS. Según estos autores la p53 “secuestraría” a algunos de los factores de transcripción que regulan positivamente la actividad del promotor del gen de TS. La pérdida de la funcionalidad de p53 provoca un incremento en los niveles de TS, contribuyendo así a la resistencia a 5-FU.

#### *d) Sistema reparador del ADN*

Los defectos del sistema reparador de apareamientos incorrectos se han descrito en el cáncer hereditario no polipoide de colon (HNPCC) y en un 15-20% de los esporádicos. Algunos estudios in vitro (Kitchens ME, 1999; Carethers JM, 1999) describen que las líneas deficientes en el sistema MMR (RER+) presentan menor sensibilidad a 5-FU. Además, existe una correlación entre el estado del sistema reparador y la expresión de TS: las líneas RER+ presentan un incremento en los niveles enzimáticos de TS respecto a las líneas RER-. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el que el 5-FU puede afectar al MMR, ya que la incorporación del fármaco no distorsiona físicamente la doble hélice de ADN, ni tampoco provoca un paro en el ciclo a nivel de G2/M. El reconocimiento por parte del sistema MMR del 5-FU podría explicarse por la naturaleza de la propia fluoropirimidina o la distorsión en la cadena que se genera cuando la UGD-glicosilasa elimina el FdUTP o el dUTP incorporados (Carethers, 1999). Además, el sistema MMR podría modular los niveles de TS de forma indirecta. La acumulación de mutaciones en las células RER+ podría estar afectando a elementos implicados en la regulación de la TS. Esto conllevaría un incremento en los niveles de la enzima y proporcionaría a estas células una ventaja selectiva en el crecimiento, permitiendo que estas células RER+ predominen dentro de la población tumoral, contribuyendo así a la resistencia a 5-FU. Así, el estado del sistema MMR en un tumor colorrectal podría ser un mecanismo de resistencia a 5-FU, aunque estos datos necesitan ser confirmados en posteriores estudios clínicos con pacientes.



## 1.5. NUEVOS FARMACOS EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER COLORRECTAL

### 1.5.1. OXALIPLATINO: BASES BIOQUÍMICAS

Desde la introducción del cisplatino (CDDP) en los regímenes de quimioterapia, se han realizado numerosas tentativas para sintetizar nuevos derivados platinados que incrementen el índice terapéutico de esta clase de agentes.

La sustitución de los radicales amino del CDDP por radicales 1,2-diaminociclohexanos (*DACH*) genera una nueva familia de compuestos que presenta un mecanismo de actividad diferente a otros agentes platinados, tal y como se demuestra en los estudios realizados en paneles de líneas celulares en el *National Cancer Institute*, *NCI* (*Rixe O y col, 1996*). De entre los compuestos con este grupo *DACH* destaca el Oxaliplatino ([*trans*[1*R*,2*R*]-1,2-ciclohexanodiamina-*N,N'*] oxalato-(2-)-*O,O'*-platino) (Figura 6). Este grupo 1,2-*DACH* restringe la movilidad del átomo de Platino y produce conjugados con el ADN más voluminosos que los que forma el grupo *cis*-diamino.

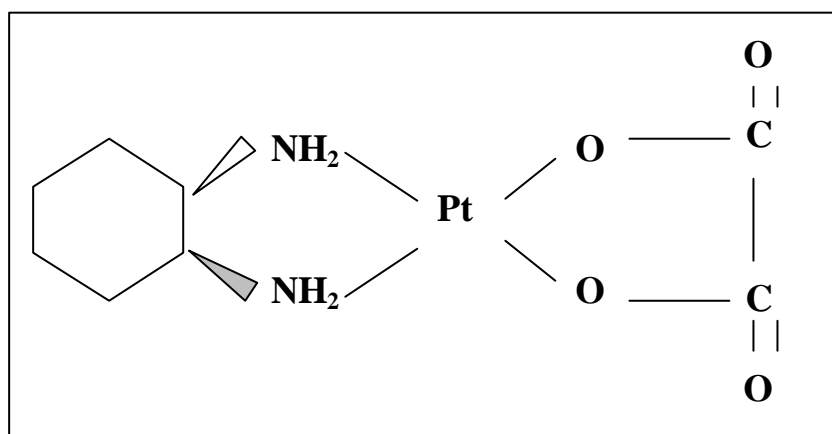


Figura 6. Estructura molecular del Oxaliplatino

El Oxaliplatino a pesar de compartir el mecanismo de acción con el cisplatino, posee un espectro de citotoxicidad *in vitro* y una actividad antitumoral *in vivo* que difiere del anterior. Además, el Oxaliplatino es el primer agente platinado con probada actividad en el tratamiento del cáncer colorrectal avanzado, demostrando eficacia en otros tumores sólidos como el cáncer de ovario avanzado. Así mismo, los resultados

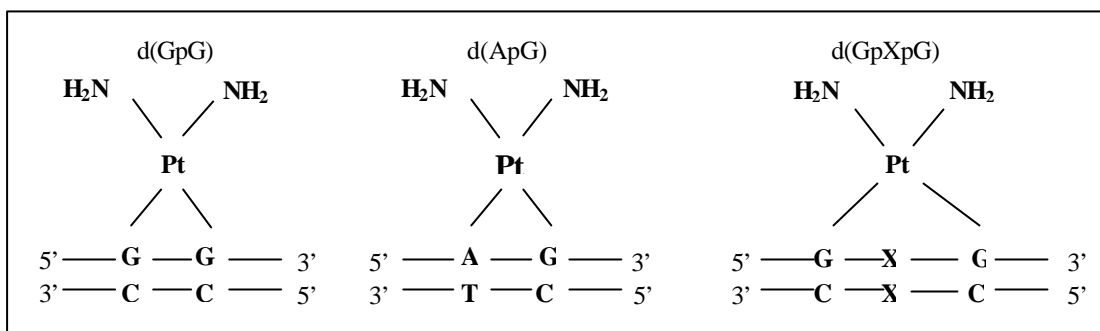
preliminares indican su actividad en el tratamiento de tumores de mama, pulmón de célula no pequeña (NSCLC) y linfomas no-Hodkings. Así pues, el Oxaliplatino muestra actividad en tumores con resistencia intrínseca o adquirida al CDDP. Este hecho está relacionado con la diferente estructura de los enlaces o “aductos” que forma el Oxaliplatino que le permite obviar ciertos mecanismos de resistencia a otros agentes platinados, especialmente el que resulta de la reparación de los defectos en la replicación del ADN. En estudios preclínicos se ha demostrado que el Oxaliplatino interactúa sinérgicamente con otros agentes anticancerígenos, incluyendo el 5-FU (Taron M y col, 1999; Plasencia C y col, 2000), y el SN-38 (Zeghari-Squalli N y col, 1999).

Por todas sus características y por el perfil favorable de toxicidad que ha mostrado durante los ensayos en fase I, el Oxaliplatino se ha desarrollado clínicamente para su uso en el tratamiento del cáncer colorrectal.

#### **1.5.1.1. Mecanismo de acción**

Aunque el mecanismo preciso no es del todo claro, los agentes platinados ejercen su citotoxicidad de forma similar a los agentes alquilantes causando enlaces dentro de la misma hebra (*intrastrand crosslinks*) o entre las dos hebras (*interstrand crosslinks*) del ADN, resultando en la formación de uniones covalentes entre el complejo activo platinado y determinadas bases de la secuencia del ADN. De hecho, el grado de citotoxicidad que ejercen este tipo de compuestos correlaciona con la unión al ADN. Concretamente, las lesiones citotóxicas provocadas por el Oxaliplatino ocurren mayoritariamente por las uniones intracatenarias con 2 guaninas adyacentes o próximas (d(GpG)) de forma similar a las que realiza el CDDP (Figura 7). Otros aductos incluyen enlaces intracatenarios entre 2 bases guanina-adenina adyacentes (d(ApG)) y enlaces entre guaninas de hebras opuestas del ADN ((dG)<sub>2</sub>), aunque estas uniones representan menos de un 5% del total de aductos generados.

Los enlaces que el platino forma con el ADN, causan la inhibición de la síntesis del mismo, interfieren en los procesos de transcripción, e inhiben la reparación, activando las vías de transducción de señales que desencadenan la apoptosis, y que provocan la muerte celular. Este hecho, además, parece ser independiente de la fase del ciclo celular.



**Figura 7. Enlaces intracatenarios más importantes del Oxaliplatino con el ADN.**

A pesar de las similitudes obvias en el tipo de lesiones que provocan, existen diferencias estructurales significativas (en el tipo y la frecuencia de lesiones que ocasionan) entre el Oxaliplatino y otros análogos platinados (CDDP, carboplatino) que pueden contribuir al perfil de actividad específico del fármaco. A concentraciones equimolares el Oxaliplatino genera un menor número de aductos ADN/platino pero presenta una toxicidad similar a los otros compuestos (Woynarowsky JM, 1998). Además, las uniones que se generan ocurren mucho más rápido (15 minutos en el caso del Oxaliplatino *versus* 12 horas para el CDDP). Es probable que el mayor volumen e hidrofobicidad de los enlaces DACH/Platino, el diferente ángulo de ligadura N-Pt-N formado cuando el ligando DACH se une al ADN y la mayor posibilidad de impedimento estérico y de distorsión del ADN, contribuyan a una inhibición más eficaz de la síntesis y la reparación del ADN y, en consecuencia, a un incremento en la citotoxicidad celular (Weinstein JN, 1997). Además, los estudios cristalográficos sugieren que el impedimento estérico provocado por el anillo del *carrier* DACH evita el reconocimiento y la unión de las proteínas que forman los complejos de reparación de apareamientos del ADN (sistema *Mismatch Repair*), iniciando, posiblemente, vías de tolerancia a la reparación (fenómeno conocido como *bypass replicativo o derivación replicativa*). Esta diferencia en la reparación de los aductos oxaliplatino/ADN marca una gran diferencia con el CDDP y explica la ausencia de resistencia cruzada con este agente.

### 1.5.1.2. Mecanismos de resistencia a agentes platinados

El amplio espectro de actividad del Oxaliplatino que incluye tumores con resistencia intrínseca o adquirida a los compuestos de platino convencionales (CDDP y carboplatino) puede atribuirse también a diferencias en los mecanismos de resistencia. Existen múltiples mecanismos de resistencia relacionados con estos agentes platinados, la mayoría de los cuales se han descrito para el CDDP (Tabla 3). Entre ellos destacamos los mecanismos que limitan la formación de menor número de aductos citotóxicos con el ADN (por alteración del transporte, y/o por un incremento en la inactivación del fármaco), el incremento en los mecanismos de reparación o la tolerancia al daño inducido en el ADN, así como defectos en los mecanismos de reparación del sistema MMR y un aumento en la derivación replicativa. Estos dos últimos parecen ser los únicos mecanismos que permiten discriminar entre el CDDP y el grupo de compuestos de la familia DACH como el Oxaliplatino, y en consecuencia, pueden explicar los diferentes patrones de sensibilidad a ambos fármacos.

**Tabla 3. Mecanismos de resistencia de las células cancerosas a agentes platinados.**

Diferencias entre Oxaliplatino y CDDP/carboplatino indicadas con asterisco(\*).

- ✓ Descenso en la acumulación de la droga (reducida la difusión pasiva y/o el transporte activo)
- ✓ Inactivación de la droga por niveles incrementados de metalotioneína (secuestro) o del glutatión (conjugación)
- ✓ Incremento en el sistema de reparación por excisión de nucleótidos (*Nucleotide Excision Repair*) de los aductos del ADN
- ✓ Defectos en el sistema de reparación por excisión de bases (*Base Excision Repair*)\*
- ✓ Defectos en el sistema reparador del ADN (*Mismatch Repair System*)\*
- ✓ Incremento en la tolerancia de los aductos con el ADN por alteración de los componentes de la vía apoptótica\*
- ✓ Incremento en el *bypass replicativo*

### 1.5.1.3. Mecanismos de reparación y resistencia a agentes platinados

Tal y como hemos comentado anteriormente el principal mecanismo de acción de los agentes platinados consiste en su unión al ADN, generando una serie de lesiones en el ADN que en el caso de no ser reparadas provocan la muerte celular. Las células eucariotas disponen de toda una serie de mecanismos de reparación que actúan antes, durante y después de la replicación. Estos sistemas de reparación están compuestos de complejos proteicos capaces de reconocer el daño, eliminarlo y reparar las hebras del

ADN permitiendo a la célula seguir su ciclo normal y/o en caso contrario estos mismos sistemas desencadenarán cascadas de señalización apoptótica. A continuación describiremos con más detalle algunos de estos sistemas de reparación y su implicación en la resistencia a agentes platinados.

✓ ***Sistema de reparación de apareamientos incorrectos de bases***

La identificación y la reparación de las lesiones inducidas en el ADN por el apareamiento incorrecto entre las bases que ocurre durante la replicación celular, desempeña un papel crucial para el mantenimiento de la estabilidad genómica. Se sabe que las alteraciones en la actividad de este sistema reparador del ADN, también conocido como Mismatch Repair System (MMR) confieren resistencia intrínseca a CDDP y carboplatino.

A diferencia de la reparación de las roturas del ADN, la reparación del sistema MMR no elimina el enlace ADN/platino (u otra lesión) identificado como apareamiento incorrecto, sino que elimina los nucleótidos desparejados en la cadena de ADN recién sintetizada opuesta al aducto del Platino, lo que resulta en un fallo en la replicación más allá de la lesión. La presencia continuada de la lesión en la cadena parental causa ciclos de escisión y resíntesis fútiles repetidos que conducen, por último, a la muerte celular por apoptosis (Figura 8).

Existen evidencias *in vitro* e *in vivo*, de que las células deficitarias en el sistema MMR presentan resistencia al CDDP o al carboplatino, así como a otros agentes como procarbazona, busulfán e inhibidores de la Topoisomerasa II (etopósido y antraciclinas) (Fink D y col, 1998). Es más, el tratamiento continuado con estos agentes selecciona a la población celular deficitaria en el sistema MMR, puesto que estas células resistentes son capaces de tolerar el daño inducido en el ADN por la quimioterapia y continuar su replicación, evitando la parada del ciclo celular y la muerte por apoptosis (Fink D, 1998). Si bien el nivel de resistencia al CDDP y al carboplatino, asociado a la incapacidad de reparación de los apareamientos incorrectos en el ADN, es relativamente exiguo (cambios en la sensibilidad menor a 2 veces) aunque parece suficiente para explicar el fracaso clínico del tratamiento.

En este punto, es importante señalar la eficacia que el Oxaliplatino ha demostrado en modelos deficientes en el sistema de reparación de apareamientos

incorrectos. Se plantea la hipótesis que el ligando voluminoso DACH del Oxaliplatino se coloca en el surco mayor de la doble hélice de ADN e impide estéricamente la unión de las proteínas del complejo reparador. En cambio, el *carrier* cis-diamino no parece alterar esta unión (Vaisman A, 1998). Esto sugiere el uso del Oxaliplatino en tumores con deficiencias en el sistema del MMR tales como los cánceres hereditarios de colon no ligados a la poliposis (HNPCC), intrínsecamente resistentes a las terapias convencionales con otros agentes platinados, y una variedad de tumores esporádicos (15-20%) que presentan el fenotipo RER+ incluyendo el cáncer colorrectal, el de ovario y el de mama entre otros. Además, el Oxaliplatino desempeña un papel en aquellos tumores con resistencia adquirida a CDDP y/o carboplatino. Por tanto, el Oxaliplatino puede ofrecer ventajas terapéuticas en tumores con resistencia intrínseca o adquirida al Cisplatino.

✓ ***Complejo reparador por escisión de nucleótidos (NER)***

Este sistema de reparación se encarga de reparar lesiones voluminosas en los genes transcritos. El proceso de reparación se lleva a cabo mediante la formación de complejos multiproteicos que reconocen, escinden y reparan la lesión. Entre las proteínas que forman parte de estos complejos reparadores encontramos las proteínas de la familia XP que deben su nombre al síndrome provocado por su déficit, el *Xeroderma Pigmentosum*. Igual que ocurre con el sistema MMR, la sobreexpresión de algunas proteínas de la vía correlaciona con la resistencia a cisplatino y oxaliplatino. Este es el caso del gen ERCC-1 (Escisión Repair Cross Complementing 1). La sobreexpresión del gen confiere a la célula tumoral una mayor capacidad reparadora frente a las lesiones generadas por el platino, impidiendo la acción citotóxica del fármaco. Los estudios realizados *in vivo* muestran la existencia de una correlación inversa entre la expresión de ERCC-1 y la supervivencia y la respuesta al cisplatino en tumores gástricos (Metzger y col, 1998) y en tumores de pulmón de célula no pequeña (Rosell R y col, 2001; Taron M y col, 2002). Las proteínas de la familia XP y más concretamente la proteína XPD también parecen estar involucradas en la respuesta a platinos (Taron M, 2002). Se han identificado tres polimorfismos en el gen que codifica para XPD, dos de los cuales (Asp312Asn y Lys751Gln) confieren a la célula una menor capacidad de reparación del sistema NER (Spitz y col, 2001). Un estudio reciente en pacientes con cáncer colorrectal avanzado tratados con oxaliplatino muestra que la presencia del

polimorfismo salvaje en uno de los alelos o en ambos (genotipo Lys/Lys o Lys/Gln) afecta a la respuesta al tratamiento basado en Oxaliplatino y a la supervivencia (Park y col, 2001).

#### ✓ **Complejo reparador por escisión de bases: XRCC-1**

Otro de las vías principales de reparación la constituyen los genes involucrados en la *excisión de bases* o *BER* (*Base Excision Repair*). Este sistema reconoce bases incorrectas en el ADN y las repara. Para ello se forma un complejo reparador multiproteico integrado por proteínas que reconocen los puntos de rotura (poli-ADP ribosa o PARP y la ADN ligasa III), la proteína XRCC-1 que actúa como molécula adaptadora, y las proteínas encargadas directamente de la reparación (la polimerasa  $\beta$  y la ADN ligasa III). En condiciones fisiológicas normales la PARP detecta la rotura en la hebra del ADN y activa las vías de reparación a través del reclutamiento del complejo BER (Masson, 1998).

Recientemente, se ha identificado la presencia de varios polimorfismos en la secuencia del gen que codifica para XRCC-1 (exón 6, 9 y 10). En concreto, el polimorfismo en el exón 10 provoca un cambio aminoacídico de Arg→Gln que confiere una menor actividad a la proteína, afectando a la capacidad del sistema BER para reparar las lesiones inducidas en el ADN por el Oxaliplatino, evitando la correcta señalización de muerte celular por apoptosis, que en última instancia constituye el mecanismo de citotoxicidad de estos agentes platinos.

La presencia del polimorfismo en el exón 10 se ha correlacionado clínicamente con la resistencia al tratamiento con Oxaliplatino (Lenz HJ 2001, Stoehlmacher J y col, 2001). En un estudio reciente en 45 pacientes afectados de cáncer colorrectal metastásico tratados con Oxaliplatino/5-FU en segunda línea de terapia (Stoehlmacher J y col, 2001), se muestra que la presencia del polimorfismo en uno de los alelos o en ambos (genotipo Gln/Arg o Gln/Gln) afecta a la respuesta al tratamiento basado en Oxaliplatino (67% de pacientes no respondieron) y a la supervivencia (8,5 meses respecto a los 11,2 meses de los pacientes con genotipo Arg/Arg).

#### ✓ **Recombinación homóloga**

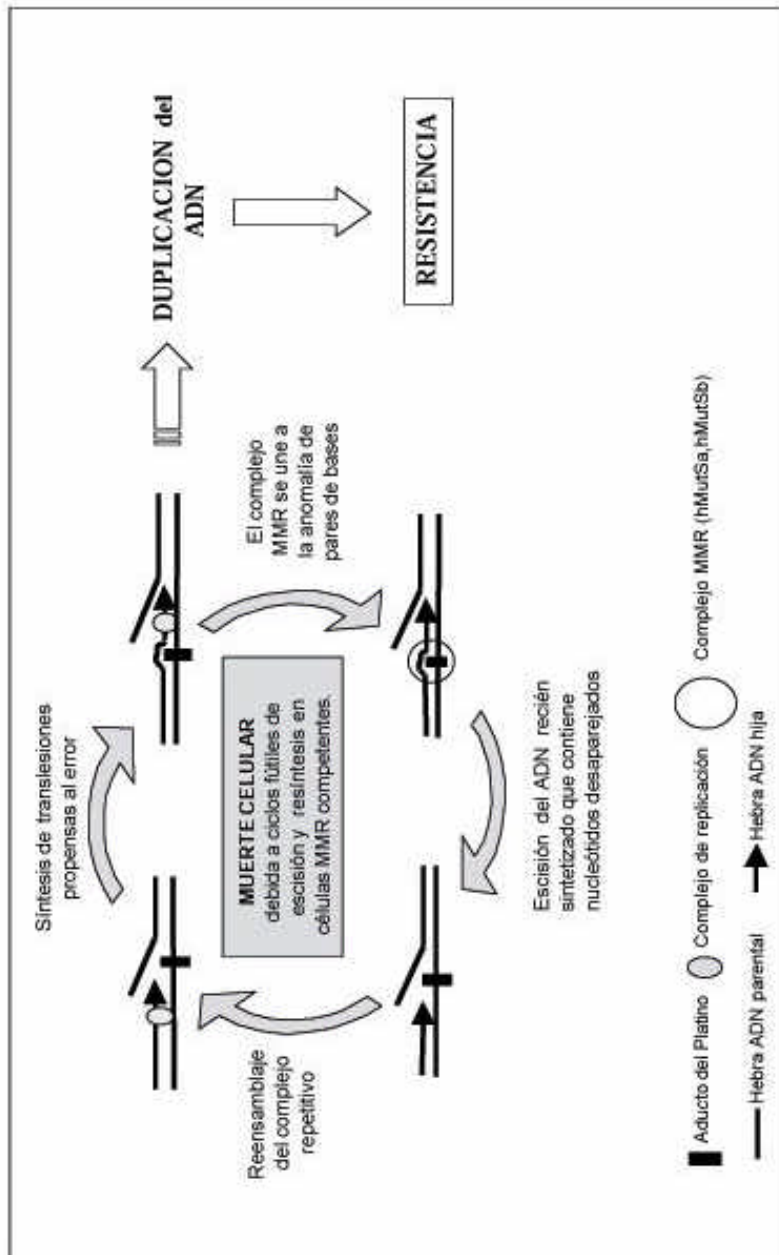
Algunos agentes citotóxicos como los inhibidores de la topoisomerasa I y los agentes platinados generan roturas dobles en el ADN (*double-strand breaks, DSB*). En las células eucariotas existen dos vías de reparación de estas dobles roturas (Lewin B): la *recombinación homóloga* (la célula repara la lesión a partir de una cadena homóloga del ADN de un heterodúplex no dañado –*single-strand exchange*– como el de la cromátida hermana) y la *religación directa de extremos no homólogos* (se repara a partir de una región que no es completamente homóloga, de forma que sólo son necesarias unos cuantos pares de bases complementarios para generar extremos cohesivos). Existen algunas evidencias de que la sobreexpresión de determinadas proteínas involucradas en el sistema de recombinación homóloga (RADD51, XRCC2) confieren resistencia a cisplatino y mitomicina (JBC, 2000). Esta resistencia se explica si tenemos en cuenta que los procesos de recombinación implican no sólo la reparación de las lesiones inducidas en el ADN por estos agentes citotóxicos sino que también protegen a la célula de los fenómenos de apoptosis (Radershall E y col, 2002).

#### **1.5.1.4. La derivación replicativa**

Existen evidencias in vitro de que algunas líneas celulares resistentes a cisplatino (Vaisman A, 1998), incrementan la derivación replicativa o *bypass replicativo* (habilidad del complejo de reparación del ADN para sobrepasar la lesión inducida en el ADN). Por ejemplo, se comprobó que la línea celular de ovario C13\* resistente al CDDP, que no presentan inestabilidad de microsatélites, tiene una capacidad 4,5 veces mayor que la línea parental sensible para evitar los aductos generados por el CDDP en el ADN. Sin embargo, cuando las líneas se exponían a un producto de la biotransformación del Oxaliplatino (el 1,2-DACH-dicloroplatino), la capacidad de derivación replicativa fue sólo 2,1 veces mayor en la línea resistente que la línea parental. Esta diferencia, parece correlacionar con la diferente sensibilidad que mostraba la línea resistente al CDDP o al Oxaliplatino. Este hallazgo junto con los de otros modelos, implican que los aductos que forman los DACH/platino no sólo son más eficaces en el bloqueo de la síntesis del ADN que los del CDDP, sino que además el ligando DACH podría desempeñar un papel impeliendo al complejo de reparación sobrepasar la lesión.



En resumen, las alteraciones del sistema reparador y el *bypass* replicativo de los aductos de Platino/ADN contribuyen a la resistencia al CDDP. Esta resistencia puede ser revertida con el uso de un agente platino con un ligando más voluminoso, DACH, que dificulta la derivación replicativa y previene la unión del complejo reparador MMR. Estos mecanismos justifican además la ausencia de resistencia cruzada entre Oxaliplatino y CDDP.



*Figura 8. Contribución del sistema reparador a la citotoxicidad de los agentes platinados. El complejo reparador MMR detecta e intenta reparar la anomalía en la hebra recién sintetizada. La presencia continuada de la lesión en la cadena parental causa ciclos de escisión y resíntesis fútiles repetidos que conducen, por último, a la muerte celular por apoptosis. En las células deficientes en el sistema MMR (RER+) no son capaces de detectar la anomalía y continúan la replicación celular.*

### 1.5.2. INHIBIDORES DE LA TOPOISOMERASA I

Topotecán (TPT) e Irinotecán son derivados solubles de la camptotecina, un alcaloide vegetal aislado por primera vez en 1965 a partir del tronco de un árbol nativo de la China, *Camptotheca acuminata*. A pesar de que ambas drogas han mostrado cierta actividad en el cáncer colorectal metastásico cuando son utilizados como agentes únicos, el CPT-11 parece ser más activo en este tipo de tumores.

Todas las camptotecinas consisten en una estructura básica de 5 anillos con un carbono quiral (C20) en el anillo lactona en posición terminal (Figura 9). La sustitución en los carbonos en posición 7, 9 y 10 incrementa la solubilidad de estos compuestos en agua así como su actividad como inhibidores de la Topo I, mientras que en posición 11 y 12 la neutralizan (Hertzberg RP, 1989).

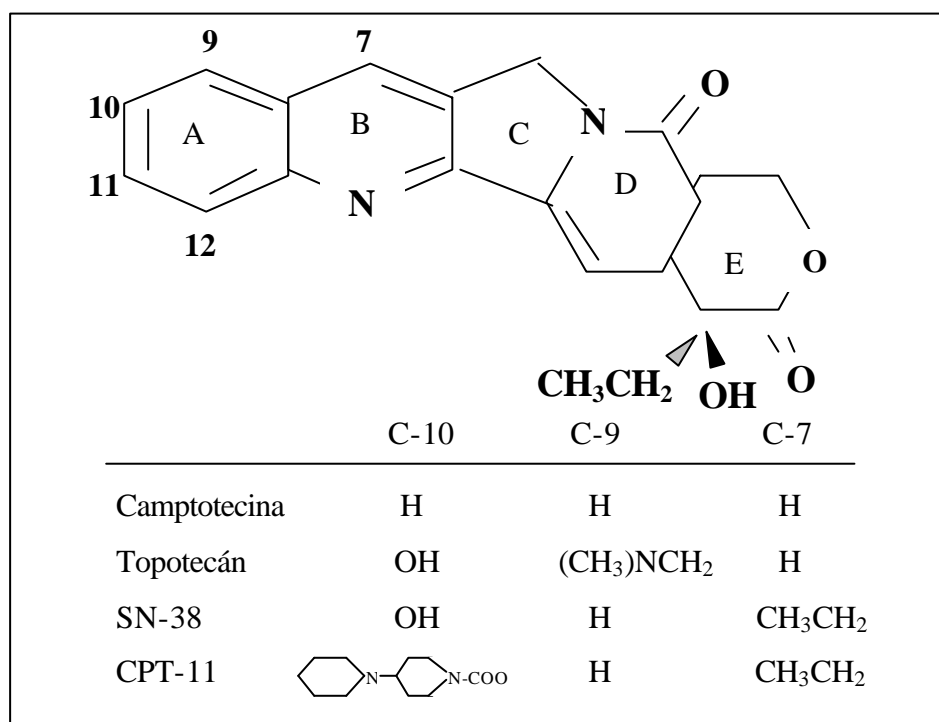


Figura 9. Estructura de los análogos de la camptotecina: Topotecán e Irinotecán

El anillo en forma lactona (anillo “E” cerrado) es esencial para la interacción de estos compuestos con la Topoisomerasa I cuando ésta se halla ligada al ADN. Esta forma lactona es inestable y se transforma mediante una hidrólisis reversible dependiente del pH, a una forma abierta carboxilada (anillo “E” abierto). La actividad de la forma lactona es 200 veces superior a la de la forma carboxilada (Mi Z, 1994). A

pH fisiológico ambas especies se hallan en equilibrio, aunque la forma carboxilada predomina en sangre porque presenta mayor afinidad de unión a la albúmina sérica.

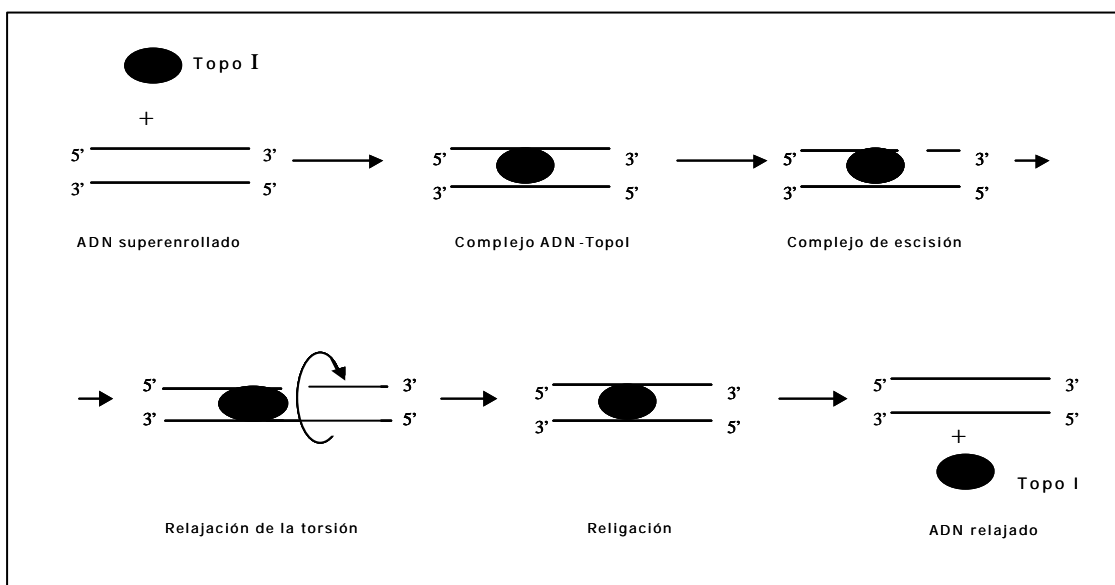
### 1.5.2.1. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de estos agentes consiste en la inhibición de la enzima Topoisomerasa I (Topo I). Esta enzima, de peso molecular 100 KDa, está codificada por un gen localizado en el cromosoma 20q. La TopoI se expresa constitutivamente durante todo el ciclo celular y su expresión está regulada a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional. Se sabe que la fosforilación por la proteína quinasa C (PKC) y la caseína quinasa II incrementa la actividad de la Topo I y que está regulada negativamente (*downregulated*) por la poli-ADP-ribosa, PARP (*Pommier P, 1996*).

La Topo I desempeña un papel clave en los procesos de replicación, transcripción y reparación del ADN (*Rottenberg ML, 1997*). Esta enzima actúa uniéndose al ADN y colaborando en la eliminación de los impedimentos estéricos derivados de la estructura helicoidal del ADN que restringe todos estos procesos. Para ello, la enzima introduce roturas controladas en una de las hebras del ADN que permiten el giro de la molécula y relajan su estructura. La Topo I realiza este proceso a través de una reacción de trans-esterificación que da lugar a un complejo intermedio reversible denominado complejo de escisión o *cleavable complex*, formado por la unión de la tirosina en posición 723 de la enzima al extremo 3'-P terminal de una de las cadenas del ADN. Una vez permite el paso de la otra hebra a través de la rotura, la propia Topo I se encarga de realizar el proceso de religación final (*Figura 10*).

Los inhibidores de Topo I se unen a la enzima cuando ésta se halla ligada al ADN, impidiendo el paso de religación final y causando la acumulación de roturas monocatenarias. Cuando la horquilla de replicación avanza encuentra estos puntos de escisión y causa roturas dobles irreversibles en las hebras del ADN (*Figura 11*). Estas lesiones provocan la retención de los procesos de división celular y se generan las señales de muerte por apoptosis. Estas lesiones son, por tanto, la causa de la citotoxicidad de estos fármacos (*Hsiang K, 1989; D'Arpa P, 1990*). Según el estudio de *Pomier Y y col*, estas dobles roturas se forman únicamente en la hebra *conductora* o

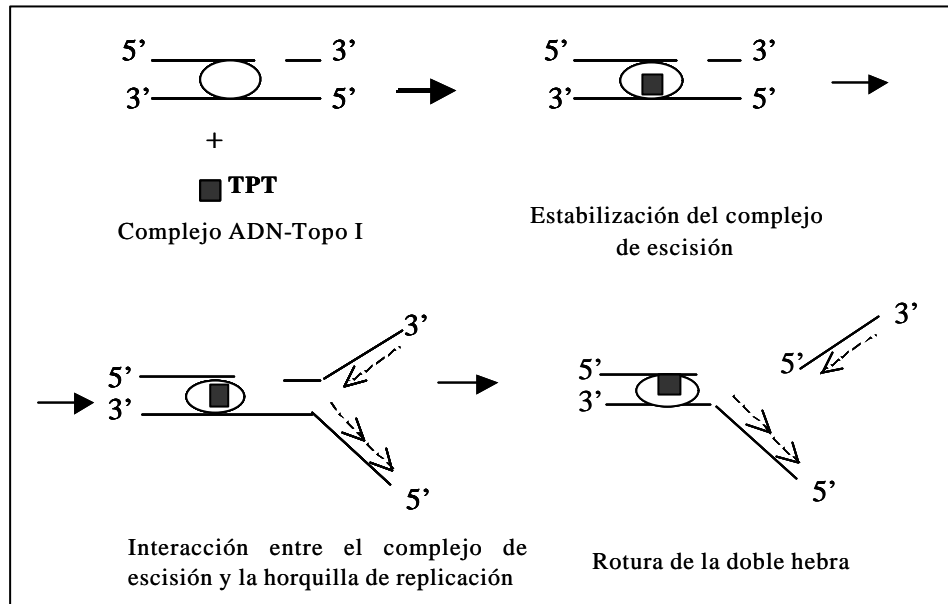
*leading* mientras que, en la cadena *retardada o lagging* se produce un bloqueo en la progresión de la horquilla de replicación (Giaccone G, 1999). Estos procesos ocurren durante la fase S o de síntesis del ciclo celular, por lo que los inhibidores de Topo I se consideran fármacos específicos de ciclo (Shinka BK, 1995). Sin embargo, la citotoxicidad inducida por estos agentes también se ha demostrado en células que no están sintetizando activamente ADN, demostrando que existen otros mecanismos de toxicidad independientes de la replicación que involucran a proteasas y endonucleasas (Shimizu T, 1996)



**Figura 10. Mecanismo de acción de la Topoisomerasa I**

Las camptotecinas, al igual que otros agentes que dañan el ADN, provoca una retención en la fase G2 del ciclo celular (Goldwasser F, 1996). Los inhibidores de la Topo I provocan una disminución en los niveles del complejo ciclina B1/cdc2 que regula la transición de la fase G2 a la fase de mitosis (Shao R y col, 1997). Esta retención es la respuesta celular frente a las lesiones producidas en el ADN por estos agentes y está relacionado con la capacidad de la célula para reparar el daño antes de su entrada en mitosis. El papel de la Topo I en los mecanismos de reparación sugiere que estos agentes podrían ser útiles en la clínica como radiosensibilizadores así como sugieren la actividad de las asociaciones de los inhibidores de Topo I con agentes que actúan dañando el ADN (agentes platinados, Zeghari-Squalli N y col, 1999), y agentes específicos de fase G2/M (Taron M, 2000). De hecho se conoce la sinergia de la

asociación de Oxaliplatino y CPT-11 que presenta actividad *in vitro* en líneas tumorales derivadas de tumores colorrectales.



**Figura 11. Mecanismo de acción de los inhibidores de Topoisomerasa I**

### 1.5.2.2. Mecanismos de resistencia

Se han identificado una variedad de mecanismos de resistencia a inhibidores de Topo I en modelos preclínicos. Sin embargo, se dispone de pocos estudios *in vivo* que evalúen la contribución relativa y la frecuencia de estos mecanismos en pacientes que progresan con el tratamiento con Inhibidores de Topoisomerasa I. Uno de los factores específicos que están siendo estudiados es la expresión del gen de la Topoisomerasa I. Parece que los tumores que sobreexpresan Topo I responden peor a la terapia con Irinotecan, aunque estos resultados necesitan ser ampliados incluyendo un mayor número de pacientes (*Paradiso AV y col, 2001*). Los principales mecanismos de resistencia descritos son:

Niveles reducidos de la enzima Topoisomerasa I: Se ha observado *in vitro* que determinadas líneas resistentes al tratamiento con camptotecinas, contienen niveles reducidos de la enzima Topo I, que es la enzima diana para el bloqueo de estos inhibidores, disminuyendo la sensibilidad de la célula a estos agentes (*Kanzama F,*

1990; Eng WK, 1990). Los niveles reducidos de la enzima se asocian a cambios post-transduccionales de la enzima. Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios en la clínica que correlacionen los niveles de Topoisomerasa I con la resistencia a estos agentes. Uno de las principales limitaciones es la redistribución subcelular de la Topo I. Esta enzima se sintetiza en el citoplasma y entra en el núcleo donde se une al ADN para que ocurra la replicación y la transcripción. Además, parte de a Topo I queda asociada al ADN sin que éste se transcriba o replique. Así que la cuantificación de los niveles totales de Topo I conduce a errores en la relevancia clínica de la expresión de esta enzima en la resistencia a los inhibidores de la Topo I.

✓ *Disminución en la actividad de la Topoisomerasa I:* También se han observado cambios en al actividad de la Topo I sin que existan alteraciones en el grado de expresión del gen. Esto sugiere la implicación de eventos post-transcripcionales, como la fosforilación por la PKC o la poli-ADP ribosilación, que tendrían un impacto significativo en la actividad de la Topo I y en la susceptibilidad a la inhibición (Ohira T,1996).

✓ *Mutaciones de la Topoisomerasa I:* Son diversas las mutaciones descritas en el gen que codifica para la Topo I. Estas alteraciones afectan a la actividad de la enzima, a la capacidad de unión de la Topo I con el ADN y/o alteran la formación del complejo de escisión o *cleavable complex* impidiendo la acción de los inhibidores de la enzima (Rothenberg ML, 1997).

✓ *Inactivación de la droga:* Algunos de estos inhibidores como el CPT-11, una vez dentro de la célula se metabolizan a un intermedio activo, que realiza la función. En el caso del CPT-11 esta función depende de una enzima la carboxilesterasa que convierte el CPT-11 a SN-38. La disminución en los niveles de esta enzima o una actividad disminuida provocan resistencia al fármaco.

✓ *Polimorfismo en el promotor del gen UGT1A1.* Este gen miembro de la familia de las UDP-glucuronosiltransferasas (UGTs) participa en la glucouronidación del estradiol y su déficit conlleva una disminución del 70% de la glucouronidación de esta hormona. Asimismo, una disminución en la expresión de UGT1A1 conduce a un elevado nivel de

bilirrubina no conjugada causado por la reducción de la transcripción de este gen (síndrome de Gilbert, Crigler-Najjar). La UGT1A1 es también responsable de la glucuronidación del SN38 (metabolito activo del CPT-11), existiendo una correlación entre el metabolismo de la bilirrubina y dicho metabolito. De hecho, las deficiencias de UGT1A1 se relacionan con un aumento de la toxicidad por CPT-11 y probablemente con la sensibilidad. Se han identificado polimorfismos en la zona promotora de este gen, específicamente en la caja TATA. La forma más común consiste en 6 repeticiones del dinucleótidos TA, si bien se han descrito variantes alélicas que contienen 5, 7 u 8 repeticiones (los alelos 6 y 7 se han descrito en poblaciones caucásicas). Se ha demostrado que la actividad del gen es inversamente proporcional al número de repeticiones: mayor número de repeticiones menor actividad y por tanto, disminución en la capacidad de glucuronidar el SN38 que correlaciona con el incremento de la toxicidad en los pacientes tratados con CPT-11.

✓ *Sobreexpresión del gen MDR-1*: un número de células resistentes a drogas sobreexpresan este gen y su producto proteico la glicoproteína P (PgP). Los niveles incrementados de PgP resultan en la expulsión de la droga del medio intracelular, provocando un descenso en la acumulación intracelular de la misma. El TPT al igual que otros inhibidores de Topo I son sustratos de esta PgP, aunque no es el mecanismo de resistencia principal para este tipo de fármacos.

✓ *Alteraciones en el ciclo celular*: Como hemos comentado anteriormente, los inhibidores de Topo I son drogas ciclo-específicas, su máxima acción ocurre durante la fase S del ciclo celular aunque también provocan la retención de células en fase G2 del ciclo. Las alteraciones en los puntos de control que regulan estas fases afectan también a la resistencia a estos agentes. Cabe señalar, que la Topo I interacciona con determinadas proteínas implicadas en el control de la replicación celular (Sml1, que inhibe la síntesis de dNTP por la unión directa con la subunidad mayor de la ribonucleótido reductasa) y proteínas implicadas en la retención del ciclo celular en la fase de síntesis tras la inducción del daño en el ADN (Mec1, Rad53). Las alteraciones en los mecanismos que ocurren tras la lesión provocada por los inhibidores de Topo I pueden afectar por tanto, a la actividad de estos agentes (*Reid RJ, 1999*)



✓ *Alteraciones en las proteínas relacionadas con las topoisomerasas*

Los factores relacionados con Topoisomerasas o Topoisomerase related factors (TRF4, TRF5) son proteínas que están implicadas en procesos de cohesión de cromátidas hermanas y de condensación de los cromosomas durante la mitosis (Hsiang YH, 1985). Estudios recientes muestran que la expresión de estas proteínas está relacionada con la sensibilidad a la camptotecina y sus análogos (Valowsky C, 1999). Estas proteínas están codificadas por una familia de genes que mapan en el cromosoma 5p15, una región cromosómica que se halla frecuentemente amplificada en una gran variedad de tumores. La expresión de estas proteínas nucleares está regulada durante el ciclo celular, presentando un pico máximo durante la fase de síntesis. La lesión más importante de los derivados de la camptotecina es la producción de dobles roturas del ADN. Existen dos vía moleculares importantes para la reparación de las roturas dobles en las hebras del ADN: la recombinación homóloga y la religación directa de extremos no homólogos. Concretamente, parece que la sobreexpresión de estas proteínas confiere resistencia a los inhibidores de la Topo I porque altera los procesos de recombinación homóloga, incrementando los mecanismos de reparación de las lesiones inducidas por estos citotóxicos.

La proteína *ADN-tirosina fosfodiesterasa I, DTPI*, es la enzima implicada en la rotura del enlace fosfodiéster entre el sitio activo de la tirosina de la Topo I y el ADN. Se sabe que los defectos en esta proteína están asociados a la hipersensibilidad a las camptotecinas.

Otro de los mecanismos que puede conferir resistencia a los inhibidores de Topo I es la degradación del complejo ADN-Topo I a través de la ubiquitinización o de proteínas que actúan como ubiquitinas denominadas *small ubiquitin-like modulator proteins, SUMOK* (Giaccone G, 1999).

✓ *Capacidad de reparación y alteración de las vías apoptóticas (eventos downstream)*

El efecto último de cualquier agente quimioterápico es la capacidad que tiene la célula para reconocer el daño inducido y activar los sistemas que conducen a la reparación. Este fenómeno involucran la activación de señales de transducción y

oncogenes y genes supresores tumorales que regulan los *checkpoints* del ciclo celular, entre otros p53, bcl-2, bax , p21, ciclina B1, cdc2.

Aunque el estado de p53 parece estar implicado en la apoptosis que ocurre tras la exposición de las células a determinados agentes quimioterápicos, parece que una p53 normal no es necesaria o suficiente para inducir apoptosis tras el tratamiento con camptotecinas. Los inhibidores de Topo I incrementan los niveles de p53 *wild-type* en las células dañadas, como respuesta a la lesión, hecho que permite la subsiguiente activación de los mecanismos de reparación y/o apoptosis. Por tanto, el estado de p53 podría influenciar a la respuesta a este tipo de agentes.

Por todo ello y a pesar de las diferencias existentes entre los modelos *in vivo* e *in vitro*, en nuestro estudio se ha intentado conservar al máximo la diversidad de esta neoplasia, utilizando como modelo en el laboratorio líneas celulares que presentaran diferentes alteraciones genéticas conocidas (estado de la p53, mutaciones oncogén Ras), diferente grado de inestabilidad genética (fenotipo RER+ / RER-), diferente procedencia (origen del tumor primario o de metástasis a distancia), diferente tasa de crecimiento, etc.

**- HIPÓTESIS-**

En el presente estudio experimental se ha seleccionado el modelo de neoplasia colorrectal para estudiar la citotoxicidad de las combinaciones entre Oxaliplatino, 5-Fluorouracilo y Topotecán. Este modelo ha sido escogido por diversas razones. Por un lado, la larga experiencia en el tratamiento del cáncer colorrectal que presenta el grupo de trabajo tanto en la clínica como en estudios preclínicos, enfocada a mejorar el conocimiento sobre el tratamiento actual de esta neoplasia. Por otro lado, a nivel más básico, se ha intentado evaluar los mecanismos moleculares involucrados en la actividad de estas asociaciones tanto en tumores sensibles como refractarios a 5-Fluorouracilo.

Nuestro trabajo se fundamenta en los siguientes puntos:

1. La práctica clínica así como numerosos estudios *in vitro*, demuestran que la administración continuada de 5-Fluorouracilo conduce a la aparición de una población refractaria al fármaco, lo que provoca la pérdida de eficacia del tratamiento.
2. Una de las principales razones bioquímicas de la resistencia a 5-Fluorouracilo es la sobreexpresión del gen *Timidilato Sintasa*.
3. La expresión de *Timidilato Sintasa* es marcador pronóstico de la respuesta a 5-Fluorouracilo
4. La introducción del Oxaliplatino en el tratamiento del cáncer colorrectal ha supuesto un gran avance. Este platino de tercera generación muestra una gran efectividad en este tipo de tumores, *intrínsecamente* resistentes a otros agentes platinados (CDDP y carboplatino).
5. El Oxaliplatino es eficaz *in vivo* en tumores sensibles y refractarios a 5-Fluorouracilo. Además, la asociación de Oxaliplatino con 5-Fluorouracilo es altamente sinérgica.
6. El Oxaliplatino actúa dañando al ADN, hecho que conduce a la inhibición de la replicación y la transcripción, generando señales que activan los procesos de apoptosis.
7. Los inhibidores de la enzima Topoisomerasa I (concretamente el Irinotecán, CPT-11) presentan actividad en cáncer colorrectal avanzado.

8. Estudios *in vitro* muestran la actividad sinérgica en la combinación de Oxaliplatino con CPT-11.
9. En el momento actual, el tratamiento del cáncer colorrectal es la poliquimioterapia combinando la infusión continua de 5-Fluorouracilo con Oxaliplatino o Irinotecán (CPT-11)
10. Las deficiencias genéticas en el sistema reparador de apareamientos incorrectos (*Mismatch Repair genes, MMR*), también conocido como fenotipo mutador o fenotipo de errores de replicación (RER+), son un factor de predisposición genética en los tumores hereditarios de colon no asociados a la poliposis múltiple (HNPCC) y ocurren en un 15-20% de los tumores colorrectales esporádicos.
11. Las mutaciones de p53 ocurren con elevada frecuencia (60%) en tumores colorrectales.
12. La respuesta a quimioterapia basada en 5-Fluorouracilo depende del estado de determinados parámetros biológicos como la p53 o el estado del sistema MMR. Ambos parámetros son factores pronóstico de la respuesta al tratamiento en cáncer colorrectal.
13. Los niveles de expresión de la *Timidilato Sintasa* están relacionados con el estado de p53 o el sistema MMR.
14. Las deficiencias en el sistema reparador MMR se relacionan con los fenómenos de resistencia a CDDP y carboplatino, aunque no afectan a la respuesta a Oxaliplatino.

Partiendo de estas premisas, diseñamos un estudio para analizar la citotoxicidad de la asociación de Oxaliplatino y 5-Fluorouracilo en líneas celulares derivadas de tumores colorrectales sensibles y refractarias a 5-Fluorouracilo con objeto de elucidar las bases moleculares de la actividad sinérgica observada en la clínica de dicha asociación, así como determinar el papel que desempeña el Oxaliplatino en la reversión del fenotipo de resistencia a 5-Fluorouracilo.

También se incluye el estudio de un nuevo esquema de asociación entre Oxaliplatino y el inhibidor de la Topoisomerasa I (Topotecán), analizando los mejores esquemas de asociación para la respuesta citotóxica así como el estudio de las causas de la sinergia de estas combinaciones.

Asimismo se evalúa si la respuesta a los diferentes tratamientos está relacionada con el valor genotípico del tumor (el estado de ciertos parámetros biológicos como la p53 o el sistema *MMR*), determinando su participación en el éxito o fracaso del tratamiento, hecho fundamental para diseñar correctamente nuevas estrategias de tratamiento en el cáncer colorrectal.

Partiendo de estas premisas se establecieron las siguientes **hipótesis de trabajo**:

1. La exposición continuada a 5-Fluorouracilo conduce a la selección de clones resistentes a este agente debido a cambios genotípicos y fenotípicos respecto al tumor sensible de origen.
2. Se puede diseñar un modelo *in vitro* para demostrar la sinergia de la asociación de Oxaliplatino y 5-Fluorouracilo en tumores sensibles y refractarios a 5-Fluorouracilo y la reversión de la resistencia por el Oxaliplatino
3. La expresión del gen *Timidilato Sintasa* tanto en tumores sensibles como refractarios a 5-Fluorouracilo debe correlacionar y explicar la actividad de la combinación Oxaliplatino/5-Fluorouracilo así como la reversión del fenotipo de resistencia a 5-Fluorouracilo.
4. Teniendo en cuenta sus mecanismos de acción, la combinación de Oxaliplatino y el inhibidor de Topoisomerasa I Topotecán, debe ser activa en tumores sensibles y refractarios a 5-Fluorouracilo.
5. Los niveles de expresión del gen Topoisomerasa I están relacionados con la actividad de la asociación Oxaliplatino/Topotecán tanto en tumores sensibles como refractarios a 5-Fluorouracilo.
6. El estado de p53 y/o del sistema reparador MMR puede influenciar la adquisición del fenotipo de resistencia a 5-Fluorouracilo y/o la actividad de estos fármacos (5-FU, Topotecán y Oxaliplatino) administrados como agentes únicos o en combinación.
7. La citotoxicidad observada en la asociación de Oxaliplatino/5-Fluorouracilo debe correlacionar con un incremento en los procesos de muerte celular programada en tumores sensibles y resistentes a 5-Fluorouracilo.

## **- OBJETIVOS-**

## **OBJETIVO 1**

### **Generación y tipificación de líneas celulares resistentes a 5-Fluorouracilo derivadas de tumores colorrectales.**

Este objetivo consta de los siguientes apartados:

1. Inducción de resistencia a 5-Fluorouracilo (5-FU) por exposición continuada a dosis crecientes del fármaco de líneas colorrectales inicialmente sensibles a la acción citotóxica del fármaco.
2. Analizar el grado de resistencia inducida al 5-FU por comparación con las correspondientes líneas parentales sensibles.
3. Evaluar la citotoxicidad provocada por la administración de Oxaliplatino, inhibidores de Topoisomerasa I (Topotecán, Irinotecán y SN-38) y 5-FU administrados como agentes únicos en líneas sensibles y resistentes al 5-FU. Estudio del patrón de resistencia cruzada a estas drogas.
4. Explicar y relacionar el fenotipo de resistencia inducida a 5-FU con la expresión de *Timidilato Sintasa* (ARN mensajero y proteína) y su correlación con la amplificación génica de TS.
5. Estudio de las alteraciones genómicas presentes en las líneas resistentes a 5-FU cuando se comparan con las correspondientes líneas parentales sensibles.
6. Análisis del estado de p53 y del fenotipo de errores de replicación (RER) en líneas sensibles y resistentes a 5-FU.



## **OBJETIVO 2**

**Estudiar la citotoxicidad celular in vitro en líneas derivadas de tumores colorrectales sensibles y resistentes a 5-Fluorouracilo por combinación de Oxaliplatino/5-Fluorouracilo y Oxaliplatino/Topotecán.**

Este objetivo consta de los siguientes apartados:

1. Estudiar la toxicidad de la combinación de OXA/5-FU y OXA/TPT, así como la determinación del esquema secuencial óptimo en líneas colorrectales sensibles a 5-FU (HT29, LoVo, DLD-1 y LS-513) y resistentes (HT29-5FUR y LoVo-5FUR).
2. Evaluar si la administración previa del Oxaliplatino se asocia a un incremento en la sensibilidad a 5-FU en las líneas refractarias a 5-FU (esquema OXA (4h) → 5-FU (infusión de 5 días)).
3. Evaluar la relación entre el estado de p53 y/o el estado del sistema reparador del ADN y la sensibilidad a Oxaliplatino, Topotecán y 5-FU administrados como agentes únicos y/o en combinación.

### **OBJETIVO 3**

**Análisis de la relación de la citotoxicidad de las asociaciones de Oxaliplatino/5-Fluorouracilo y Oxaliplatino/Topotecán con la expresión de *Timidilato Sintasa* y *Topoisomerasa I* respectivamente, así como los fenómenos de muerte celular por apoptosis.**

Este objetivo consta de los siguientes apartados:

1. Evaluar el valor predictivo de la expresión de *Timidilato Sintasa* (ARNm y proteína) y *Topoisomerasa I* (ARNm) tras la administración previa de Oxaliplatino como parámetro directamente relacionado con la sensibilidad a 5-FU y Topotecán respectivamente, en líneas colorrectales sensibles y resistentes a 5-FU.
2. Evaluar la relación de la expresión de *Timidilato Sintasa* con el estado de p53 y de los genes del sistema reparador (fenotipo RER).
3. Análisis del patrón de muerte celular por apoptosis en los esquemas secuenciales de combinación entre Oxaliplatino/5-FU así como la relación con el estado de p53, el estado del sistema reparador (fenotipo RER) y la resistencia al 5-FU.

***- MATERIAL Y MÉTODOS-***

#### 4.1. LÍNEAS CELULARES

Para evaluar el potencial citotóxico de estos agentes (TPT, 5-FU y OXA) y sus asociaciones, se utilizaron seis líneas celulares sensibles (HT29, LoVo, DLD-1 y LS-513) y resistentes a 5-FU (HT29-5FUR y LoVo-5FUR) derivadas de tumores humanos de colon que presentaban diferentes características.

La línea **HT29** aislada de un tumor primario de colon en el año 1964 por J. Fogh (*Human Tumor Cells in Vitro*, J. Fogh (ed), Plenum Press, New York, 1975). El tumor extirpado a una mujer de raza caucásica, era un adenocarcinoma de colon moderadamente diferenciado de grado II. Esta línea celular presenta las siguientes características: morfología epitelial, producen CEA en cultivo, tienen la p53 mutada (mutación en el exón 8), no expresan p21<sup>waf-1</sup> y no presentan inestabilidad de microsatélites (fenotipo RER negativo). Las células crecen en monocapa en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles medium*, BioWhittaker, Belgium) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS, inactivado a 56°C X 45 minutos), 400 U/ml de penicilina, 40 µg/ml de gentamicina y 2mM de L-Glutamina en atmósfera húmeda, a 37°C de temperatura y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se testan periódicamente por posibles contaminaciones de micoplasma mediante técnica de PCR (*Mycoplasma Plus™ PCR primer set*, Stratagene, USA). Esta línea celular fue cedida gentilmente por el Dr. Francisco Real, aunque también está comercializada por la *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, USA).

La línea celular **LoVo** aislada de un tumor metastásico de colon en el año 1971 (*Drewinko y col, Cancer Res 36: 467-475, 1976*). El cultivo se aisló de un nódulo metastásico en la región supraclavicular izquierda de un varón de raza caucásica con pruebas diagnósticas de adenocarcinoma de colon. Esta línea celular presenta morfología epitelial, tiene la p53 silvestre (*wild-type*), presenta inestabilidad de microsatélites (fenotipo RER positivo) ya que tiene deleccionados los exones 5 al 8 en los dos alelos del gen reparador hMSH2. Estas células crecen en monocapa en medio de cultivo HAM's F-12 (BioWhittaker, Belgium) suplementado con un 20 % de FBS (inactivado 56°Cx 45 minutos), 200 U/ml de penicilina, 20µg/ml de gentamicina en atmósfera húmeda, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se testaron periódicamente por posibles contaminaciones de micoplasma (mediante técnica de

PCR). La línea se compró directamente a la *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA).

La línea celular **DLD-1** aislada por el Dr. DL. Dexter, deriva de un adenocarcinoma primario de colon de estadio C. Estas células presentan morfología epitelial, producen CEA en cultivo, tienen la p53 mutada (mutación en la posición 241) y presentan inestabilidad de microsatélites (fenotipo RER positivo) por una delección en el gen reparador hMSH6. Las células crecen en medio RPMI 1640 (BioWhittaker, Belgium) suplementado con un 10% de FBS (inactivado a 56°C x 45 minutos), 400 U/ml de penicilina, 40 µg/ml de gentamicina y 2mM de L-Glutamina en atmósfera húmeda, a 37°C de temperatura y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se testan periódicamente por posibles contaminaciones de micoplasma mediante técnica de PCR (*Mycoplasma Plus*<sup>TM</sup> PCR primer set, Stratagene, USA). La línea celular se compró directamente a la *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA).

La línea celular **LS-513** aislada de un tumor primario de un varón caucásico de 63 años de edad diagnosticado como carcinoma de ciego de estadio C de Dukes (*Suardet L y col, Cancer Res 52:3705-3712, 1992*). Esta línea celular presenta morfología epitelial, tiene la p53 *wild-type*, producen CEA en cultivo y no presenta inestabilidad de microsatélites (fenotipo RER negativo). Esta línea celular crece en medio RPMI 1640 (BioWhittaker, Belgium) suplementado con un 10% de FBS (inactivado a 56°C x 45 minutos), 400 U/ml de penicilina, 40 µg/ml de gentamicina y 2mM de L-Glutamina, en atmósfera húmeda, a 37°C de temperatura y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se testan periódicamente por posibles contaminaciones de micoplasma mediante técnica de PCR (*Mycoplasma Plus*<sup>TM</sup> PCR primer set, Stratagene, USA). La línea celular se compró directamente a la *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA).

La línea celular resistente a 5-FU, **HT29-5FUR**, se generó en nuestro laboratorio a partir de la línea parental correspondiente sensible inicialmente a 5-FU (**HT29**) por exposición prolongada a concentraciones crecientes de la droga, hasta alcanzar una dosis 2µM. Iniciamos la adaptación de la línea HT29 a 5-FU cultivando 2x10<sup>5</sup> células en un frasco de 25 cm<sup>2</sup> en medio de cultivo que contiene una dosis 1µM de la droga, realizando cambios de medio cada 48 horas. Transcurridas 72 horas

calculamos la citotoxicidad celular por técnica de exclusión con *Trypan Blue* (contaje celular en cámara de Neubauer). Se compara el grado de citotoxicidad inducida por el 5-FU respecto a una población de células control cultivadas en paralelo en medio libre de fármaco. Se mantiene la dosis de 5-FU hasta comprobar que el porcentaje de viabilidad celular se mantiene estable cuando se cultiva las células en medio que contiene el fármaco. Se procede entonces a incrementar la dosis de 5-FU y se repite el proceso anterior. Las células **HT29-5FUR** establemente adaptadas a la dosis 2 $\mu$ M, presentan una morfología epitelial, crecen en monocapa en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's modified Eagles medium*, BioWhittaker, Belgium) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (FBS, inactivado 56°C X 45 minutos), 400 U/ml de penicilina, 40  $\mu$ g/ml de gentamicina y 2mM de L-Glutamina en atmósfera húmeda, a 37°C de temperatura y 5% de CO<sub>2</sub> y en presencia de la dosis correspondiente de 5-FU (preparada en medio de cultivo hasta alcanzar la dosis necesaria). Las células se testan periódicamente por posibles contaminaciones de micoplasma mediante técnica de PCR (*Mycoplasma Plus<sup>TM</sup> PCR primer set*, Stratagene, USA). Esta línea celular presenta una tasa de crecimiento estable comparable a su pareja sensible (**HT29**). Se calcula el tiempo de duplicación de esta línea tanto en presencia como en ausencia de 5-FU y se procede a su tipificación.

La línea celular resistente a 5-FU, **LoVo-5FUR**, se generó en nuestro laboratorio a partir de la línea parental correspondiente sensible a 5-FU (**LoVo**) por exposición prolongada a concentraciones crecientes de 5-FU hasta alcanzar una dosis de la droga de 7 $\mu$ M de igual forma a la detalla anteriormente para la línea HT29-5FUR. Cabe señalar que el proceso de inducción de resistencia de la línea LoVo se inicia a una dosis 5 $\mu$ M (dosis inferiores no mostraron toxicidad). La línea **LoVo-5FUR** establemente adaptada a dosis 7 $\mu$ M, presenta morfología epitelial, tiene la p53 silvestre (*wild-type*), presenta inestabilidad de microsatélites (fenotipo RER positivo) ya que tiene delecionados los exones 5 al 8 en los dos alelos del gen reparador hMSH2. Estas células crecen en monocapa en medio de cultivo HAM's F-12 (BioWhittaker, Belgium) suplementado con un 20 % de FBS (inactivado 56°Cx 45 minutos), 200 U/ml de penicilina, 20 $\mu$ g/ml de gentamicina en atmósfera húmeda, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se testaron periódicamente por posibles contaminaciones de micoplasma (mediante técnica de PCR). Se calculó también en

esta línea el tiempo de crecimiento tanto en presencia como en ausencia de 5-FU en el medio de cultivo y se procedió a su tipificación.

## 4.2. FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

**Topotecán** (también Hycamptin®; 9-[dimetilamino]metil-10-hidroxicamptotecina) cedido por los laboratorios farmacéuticos Smithkline Beecham (Madrid, España y King of Prusia, USA). Se prepara una solución madre de concentración 10 mM en dimetilsulfóxido (DMSO\*) y se guarda congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las diluciones posteriores se preparan en medio de cultivo hasta la concentración final.

**Oxaliplatino** (Eloxantine®) cedido por los laboratorios farmacéuticos Sanofi-Synthelabo (France) se prepara una solución madre en suero fisiológico a una concentración 25  $\mu\text{M}$  y se guarda congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las diluciones posteriores se preparan en medio de cultivo hasta la concentración final.

**5-Fluorouracilo** (5-FU). Se prepara en fresco la dilución inicial en suero fisiológico. Las diluciones posteriores se realizan en medio de cultivo hasta alcanzar la dosis correspondiente antes de su utilización.

**CPT-11** (también Campto®, Irinotecán; 7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carboniloxicamptotecina) obtenido de los laboratorios farmacéuticos Rhône-Poulenc Rorer (France). Las soluciones se preparan a una concentración de 20 mg/ml en suero fisiológico y se congelan a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las diluciones posteriores se realizan en medio de cultivo hasta la concentración final.

**SN-38** (7-etil-10-hidroxicamptotecina). Cedita por los laboratorios farmacéuticos Prasfarma (Madrid, España). La solución madre se preparó a una concentración 10mM en DMSO\* y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las diluciones posteriores se realizan en medio de cultivo hasta la concentración final.

*\*La concentración de DMSO en el medio de cultivo, inferior a 0,01% (v/v), demostró no ser tóxica.*

## 4.3. ANÁLISIS DE LA CITOTOXICIDAD

El análisis consta de los siguientes apartados:

- 1) Análisis de la citotoxicidad del 5-FU como agente único administrado durante 5-días, con el objeto de determinar el grado de resistencia de las líneas HT29-5FUR y LoVo-5FUR a 5-FU por comparación con sus homólogas sensibles.
- 2) Análisis de la citotoxicidad de los agentes únicos (OXA, 5-FU, TPT) en todas las líneas celulares estudiadas, con el objeto de determinar la dosis inhibitoria del 50% ( $DI_{50}$ ) que se utilizarán posteriormente en el análisis de la citotoxicidad de las combinaciones. Se incluye el análisis de la citotoxicidad de otros inhibidores de Topoisomerasa I (CPT-11 y SN38) en las parejas sensibles/resistentes para el análisis del patrón de resistencia cruzada a drogas.
- 3) Análisis de la citotoxicidad de las combinaciones secuenciales.

En todos los apartados, el análisis de la citotoxicidad se llevó a cabo por **ensayo colorimétrico** con el kit **MTT** (Rôche). Este ensayo se basa en la capacidad de las células viables para metabolizar la sal de tetrazolio (*3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolium bromide*) de color amarillo (MTT) dando lugar a la sal de formazán de color violeta. Esta sal se solubiliza con una solución que contiene 01% SDS en 0.01M HCl, resultando una solución de color violeta cuantificable mediante el uso de un lector ELISA convencional automatizado. El pico máximo de absorbancia de la sal de formazán corresponde a una longitud de onda entre 550 y 600 nm. Como lectura de referencia se utiliza una longitud de 695nm. La densidad óptica, DO, es proporcional al número de células viables.

En cada experimento, se calcula la **fracción de supervivencia  $f$**  como el cociente entre la DO de las células tratadas y la DO de las células control sin tratar tanto en el caso de la administración individual como en la combinación de fármacos.

Los datos obtenidos se analizan por el **método del efecto medio (*median-effect lines*)**. Este método consiste en representar el  $\log_{10} [(1/f)-1]$  frente al  $\log_{10}$  (**dosis droga**). Se calcula la recta de regresión por el método de los mínimos cuadrados (en todos los casos se aceptaron rectas que presentaban un coeficiente  $r^2$  superior a 0.95). A partir de las líneas resultantes denominadas *median effect lines*, se calcula la pendiente  **$m$**  y la dosis  **$DI_{50}$**  (dosis que inhibe el 50% del crecimiento celular). Con estos parámetros evaluamos las concentraciones individuales de las



drogas (utilizadas como agentes únicos) necesarias para inhibir una fracción celular determinada (en un rango del 10% al 90%), según la ecuación [1]:

$$\text{Dosis}_f = \text{Dosis}_{DI50} (1/f-1)^{1/m} \quad [1]$$

#### 4.3.1. Grado de inducción de resistencia a 5-Fluorouracilo

Se cultivaron células HT29/HT29-5FUR, LoVo/LoVo-5FUR en crecimiento exponencial en placas de 96 pozos a razón de 4000 células/pozo. Transcurridas 24h, las parejas sensible/resistente se tratan con diluciones seriadas de 5-FU durante 5 días. El análisis de citotoxicidad se realiza por ensayo colorimétrico con MTT y lectura automatizada por espectrofotometría. Cada experimento se repite un mínimo de tres veces de forma independiente. Los datos se analizan por el método del efecto medio y se calculan las dosis inhibitorias correspondientes a las diferentes fracciones de inhibición (ID10-ID90) para cada una de las líneas celulares. El grado de resistencia inducido se calcula como el cociente  $DI_f\text{-resistente}/DI_f\text{-sensible}$ , siendo  $f$  la fracción de inhibición correspondiente. Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el programa SigmaStat 2.0 (Jandel-Scientific) para el cálculo de la  $t$ -Student. Se consideró significativo a una  $p < 0.05$ .

#### 4.3.2. Citotoxicidad de los agentes únicos. Análisis del patrón de resistencia cruzada a fármacos

Las células en crecimiento exponencial se cultivaron en placas de 96 pozos a razón de 4000 células por pozo en el caso de las líneas HT29/HT29-5FUR, LoVo/LoVo-5FUR y LS513 y 2000 células por pozo en el caso de la línea celular DLD-1. Transcurridas 24 horas, las células se tratan con diluciones seriadas de cada fármaco individualmente. El tiempo de exposición para el Oxaliplatino fue de 4 horas mientras que la exposición a 5-FU y TPT fue de 24 horas. En las parejas sensibles/resistentes se analizó también la citotoxicidad a otros inhibidores de Topoisomerasa I (CPT-11 y SN38). El tiempo de exposición para estos fármacos fue de 24h. El análisis de citotoxicidad se llevó a cabo 72 horas después de la retirada del último tratamiento del medio de cultivo mediante el ensayo colorimétrico con MTT y las dosis inhibitorias correspondientes a cada fármaco ( $DI_{10}$ - $DI_{90}$ ) se calculan por el

método del efecto medio. Cada experimento se repite un mínimo de tres veces de forma independiente.

Una vez determinadas las DI correspondientes a cada fármaco, se analiza en las parejas sensibles/resistentes a 5-FU, el patrón de resistencia cruzada a fármacos calculado como el cociente entre la  $DI_f$  resistentes/  $DI_f$  sensibles para cada uno de los fármacos analizados. Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el programa SigmaStat 2.0 (Jandel-Scientific) para el cálculo de la t-Student. Se consideró significativo a una  $p < 0.05$ .

#### 4.3.3. Análisis de la citotoxicidad de las combinaciones entre Oxaliplatino, Topotecán y 5-Fluorouracilo

El análisis de la toxicidad de las combinaciones en todas las líneas celulares se realiza en cuatro esquemas propuestos:

**Esquema 1:** OXA(4h) → TPT(24h)

**Esquema 2:** TPT(24h) → OXA(4h)

**Esquema 3:** OXA(4h) → 5-FU(24h)

**Esquema 4:** 5-FU(24h) → OXA(4h)

En las parejas sensible/resistente, se analiza adicionalmente el siguiente esquema secuencial:

**Esquema 5:** OXA(4h) → 5-FU (infusión de 5 días)

Las células en crecimiento exponencial se cultivaron en placas de 96 pozos a razón de 4000 células por pozo en el caso de las líneas HT29/HT29-5FUR, LoVo/LoVo-5FUR y LS513 y 2000 células por pozo en el caso de la línea celular DLD-1. Transcurridas 24 horas, las células se tratan de forma secuencial en las diferentes combinaciones (esquemas 1-5).

Para la combinación de dos fármacos fijamos un *ratio* de concentraciones de ambos fármacos:  $(DI_{50})_1 : (DI_{50})_2$  que corresponden a las dosis inhibitorias del 50% de cada una de los agentes a combinar. Se tratan las células con proporciones de este ratio (3x, 1,5x, 1x,  $\frac{3}{4}x$ ,  $\frac{1}{2}x$ ,  $\frac{1}{4}x$ , ... veces las  $DI_{50}$  individuales) e igual que en el apartado anterior se calculan las dosis de cada fármaco individual en la combinación necesaria para producir una fracción *f* de supervivencia determinada. Las lecturas de

citotoxicidad se llevaron a cabo 72 horas después de la retirada de los diferentes agentes del medio de cultivo mediante reacción colorimétrica con MTT y lectura automática por espectrofotometría. Cada experimento se repitió por duplicado. Los datos se analizan por el método del efecto medio (*median-effect lines*). De esta manera se calculan las diferentes dosis de cada uno de los agentes utilizados en combinación necesarias para producir los diferentes niveles de toxicidad (10-90%).

Posteriormente, en cada esquema secuencial se calculan los índices de combinación (**CI; combination index**) para las distintas fracciones  $f$ , mediante el método de *Chou-Talalay*, según la ecuación [2]:

$$CI_f = D_1 / (D_f)_1 + D_2 / (D_f)_2 + \alpha D_1 D_2 / (D_f)_1 (D_f)_2 \quad [2]$$

donde:

- $D_1$  y  $D_2$  son las dosis de cada uno de los fármacos cuando están combinados que dan una supervivencia  $f$  determinada
- $(D_f)_1$  y  $(D_f)_2$  las dosis de los fármacos que resultan en la misma supervivencia  $f$  pero cuando los fármacos se administran como agentes únicos.
- El término  $\alpha$  adquiere el valor 1 ó 0, en función de si los fármacos combinados tienen mecanismos de acción mutuamente excluyentes o no excluyentes, respectivamente.

Cuando  $CI=1$  indica que la combinación es aditiva,  $CI>1$  indica antagonismo y  $CI<1$  indica que la combinación es sinérgica.

#### 4.4. CITOMETRÍA DE FLUJO

El patrón de ciclo celular en las parejas sensibles/resistente se analizó mediante técnica de citometría de flujo.

La técnica utilizada se basa en la tinción del ADN con Yoduro de Propidio (PI) descrita por Vindelov (*Vindelov LL, Flow Cytometric análisis of nuclear DNA in cells from solid tumours and cell suspensión; Virchows Arch B Cell Pathol 24: 227-242, 1977*) y posterior análisis por citometría de flujo.

Para ello sembramos  $5 \times 10^5$  células de cada una de las líneas celulares en frascos de cultivo de  $25 \text{ cm}^2$  (T-25, Nunc). Transcurridas 24 horas, se añade la dosis correspondiente de 5-FU al medio de cultivo de las líneas resistentes ( $2 \mu\text{M}$  y  $7 \mu\text{M}$  a

HT29-5FUR y LoVo-5FUR, respectivamente) y medio limpio a las líneas celulares sensibles. Transcurridas 72 horas se procede a realizar la tinción siguiendo el protocolo:

- Tripsinización de las células en monocapa y lavado en PBS-2%FCS
- Centrifugación a 1300 rpm durante 5 minutos y descartamos el sobrenadante
- Contaje celular. Se resuspenden  $5 \times 10^5$  células/ml en 0,5 ml de PBS-2% FBS o medio completo (Opcional: resuspensión en tampón citrato y congelación en vapores de  $N_2$  líquido). Una vez congeladas las muestras se guardan a  $-80^\circ C$ .
- Añadir 1,8 ml de solución A e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente
- Añadir 1,8 ml de solución B e incubar 10 minutos a temperatura ambiente
- Añadir 1,5 ml de solución C e incubar 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad
- Realizar un vorteadado suave y filtrar a través de una malla de  $100\mu$
- Análisis de las muestras

Realizamos la adquisición y el análisis de las muestras en un citómetro FacScan (Becton Dickinson, San José, CA, USA). La adquisición se realizó con el programa Cell Fit y el análisis en el programa S-Fit.

Centramos la población celular por FSC/SSC, y se adquieren por el canal de fluorescencia roja del Yoduro de Propidio, FL2-A, discriminando los dobletes con actividad DDM (FL2-A/FL2-W). Los picos de fluorescencia de la fase G1 se centran sobre las 200 unidades arbitrarias de fluorescencia. Para todas las muestras se analizan un mínimo de 10.000 células por muestra. Los experimentos se repitieron por duplicado.

#### **SOLUCIONES:**

**TAMPÓN CITRATO:** 350 mM sucrosa, 40 mM citrato trisódico dihidratado, 0,05% dimetilsulfóxido. Ajustar el pH a 7.8

#### **SOLUCIONES STOCK PARA SOLUCIONES A, B Y C:**

3,4 mM citrato trisódico dihidratado, 0,1% (v/v) Nonidet P-40, 1,5 mM Espermina tetrahidroclicorada, 0,5 mM tris-hidroxiaminometano. Ajustar el pH a 7.6

**SOLUCION A:** 0,03 mg de tripsina por ml de solución stock

**SOLUCIÓN B:** 0,5 mg de inhibidor de tripsina y 0.05 mg de Ribonucleasa A por ml de solución stock

**SOLUCIÓN C:** 0,41 mg de Yoduro de Propidio y 1,16 mg de espermina por ml de solución stock

#### **4.5. TINCIÓN CON MAY-GRÜN WALD-GIEMSA**

Mediante esta tinción se analizaron las características fenotípicas de las líneas resistentes por comparación con sus respectivas homólogas sensibles. Las estructuras básicas (como el núcleo) quedan teñidas de color violeta, mientras que las estructuras ácidas quedan de color azulado.

El procedimiento es el siguiente:

- Células en medio limpio o en PBS+FBS 50%. Preparar el citospin.
- Centrifugamos a 400g x 5 minutos.
- Dejamos secar las células al aire
- Fijamos con calor (pasamos rápidamente el portaobjetos sobre la llama)
- Teñir las células en colorante Grünwald durante 5 minutos
- Lavar el portaobjetos con agua abundante (2 o 3 minutos)
- Teñir en colorante Giemsa durante 15 minutos
- Lavar el portaobjetos son agua abundante
- Secar al aire
- Montar en líquido de montaje DPX
- Visualizar en microscopio óptico (objetivo 100x)

#### 4.6. ANÁLISIS MUTACIONAL DEL GEN p53 POR SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

Se amplifican mediante técnica de PCR los exones 5, 6, 7 y 8 (*zonas calientes* o *hotspots*) del gen utilizando los siguientes cebadores:

**Exón 5:** 5' TTC ACT TGT GCC CTG ACT T 3' longitud del amplímero = 298 pb  
3' GAG GAA TCA GAG GCC TGG G 5'

**Exón 6:** 5' GTC CCC AGG CCT CTG ATT C 3' longitud del amplímero = 205 pb  
3' CCA CTG ACA ACC ACC CTT AA 5'

**Exón 7:** 5' TGC TTG CCA CAG GTC TCC C 3' longitud del amplímero = 258 pb  
3' ATC GGT AAG AGG TGG GCC 5'

**Exón 8:** 5' ACA GGT AGG ACC TGA TTT CC 3' longitud del amplímero = 258 pb  
3' AAG TGA ATC TGA GGC ATA AC5'

Se amplifican por PCR, 200ng de ADN de cada una de las líneas celulares (HT29/HT29-5FUR y LoVo/LoVo-5FUR) en una mezcla que contiene: tampón 1x, MgCl<sub>2</sub> 1.0mM, dNTPs 0.2mM y 0.5µM de cada uno de los primers correspondientes a cada exón. La reacción de PCR consta de los siguientes pasos: desnaturalización

inicial (95 °C x 5 minutos), seguido de 32 ciclos de amplificación (95°C x 30 segundos; 60°C (temperatura de anillamiento) x 1 minuto y 72°C x 1 minuto; elongación final 72°C x 5 minutos.

Posteriormente, cada uno de los exones amplificados por PCR se secuencia en un secuenciador semiautomático ALF-Express (Pharmacia Biotech, UK) utilizando el *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycling sequencing Kit with 7-deaza-dGTP* (Amersham Pharmacia Biotech, UK) para la reacción de secuenciación. Se utiliza un cebador marcado con Cy5 específico para cada uno de los exones. Los cebadores utilizados son:

<b>Exón 5:</b> 5' AAC CAG CCC TGT CGT CTC 3'	longitud del amplímero = 269 pb
<b>Exón 6:</b> 5' GAG ACC CCA GTT GCA AAC CA 3'	longitud del amplímero = 173 pb
<b>Exón 7:</b> 5' GTC AGC GGC AAG CAG AGG CT 3'	longitud del amplímero = 230 pb
<b>Exón 8:</b> 5' CCT CCA CCG CCT CTT GTC 3'	longitud del amplímero = 224 pb

El protocolo de secuenciación fue el siguiente:

- 1.- Purificación del producto de PCR
- 2.- PCR de secuenciación
- 3.- Electroforesis en gel de acrilamida
- 4.- Detección de la fluorescencia

## PROTOCOLO

**1.- Purificación del producto:** Añadir 4µl de exonucleasa y 4µl de Fosfatasa Alcalina por cada 10µl de producto de PCR. Incubar 45 minutos a 37°C, seguido de 15 minutos a 80°C.

**2.- PCR de secuenciación:** Para cada una de las muestras preparamos 4 tubos: A, C, G, T. Cada uno de los reactivos contiene Tris· HCl (pH=9.5), MgCl<sub>2</sub>, Tween 20, Nonidet P-40, 2-Mercaptoetanol, Pirofosfatasa, Termo-Secuenasa ADN polimerasa, dATP, dCTP, dTTP y 7-deaza-dGTP. Además cada reactivo contiene su correspondiente ddNTP. La reacción de secuencia consta de los siguientes pasos: 1 ciclo a 96°C x 2 minutos; 25 ciclos de: 96°C x 30 segundos (desnaturalización), 58°C (temperatura anillamiento) x 30 segundos, 72°C x 30 segundos (elongación); 1 ciclo de 72°C x 2 minutos. Finalizada la PCR se añaden de 2-5 µl de formamida y tampón de carga a la muestra. Desnaturalizamos a 96°C x 2 minutos y cargamos el gel de secuenciación.

**3.- Secuenciación automática en gel de acrilamida** al 6% (Pharmacia Biotech, UK). El gel se deja polimerizar bajo luz UV. El tampón de electroforesis es TBE 6x.

**4.- La detección de la fluorescencia** se lleva a cabo mediante el Software ALF-Win Sequence Analyzer 2.0 (Pharmacia Biotech, UK).

## 4.7. ANÁLISIS DE LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES

El análisis automático de microsatélites se lleva a cabo en el secuenciador automático *ABI-Prism 310 Genetic Analyzer Perkin-Elmer con software GenScan Analysis*. Se amplifican mediante una PCR multiplex los marcadores **BAT-26** (2p16.13, para el gen hMSH2), **BAT-25** (4q12, para el gen c-Kit), **D5S346** (5q 21/22, para el gen APC), **D17S250** (17q11.2-q12, para el gen Mfd15CA-BRCA-1) y **D2S123** (2p16, para el gen hMSH2), con el kit *HNPCC-Microsatellite Instability Test* (Boehringer Mannheim). Estos cinco marcadores son los recomendados por la *American Join Comission on Cancer, The International Collaborative Group in HNPCC y el HNPCC Cancer Study Group in German*, para el análisis de la inestabilidad en cáncer colorrectal. Cada cebador está marcado con un fluorocromo distinto (TET, HEX, TAMRA), por lo que los fragmentos generados por PCR pueden ser analizados simultáneamente en un equipo automático.

El análisis consta de los siguientes pasos:

- 1.- Extracción de ADN
- 2.- PCR multiplex de cada una de las muestras
- 3.- Desnaturalización de la muestra
- 4.- Electroforesis capilar
- 5.- Análisis de los fragmentos con el *software 310 Genetic Analyzer*

## PROTOCOLO

**1.- Extracción del ADN** de cada una de las muestras a analizar por métodos clásicos (*Sambrook y col*).

**2.- Amplificación de las muestras por PCR:** 100 ng de ADN de cada una de las muestras (HT29, HT29-5FUR, LoVo, LoVo-5FUR y ADN extraído de linfocitos utilizado como control) se amplifica por PCR *multiplex* en una mezcla que contiene dNTPs, buffer, MgCl<sub>2</sub>, (*Enzyme Master Mix*) y 5µl de una mezcla que contiene los distintos cebadores marcados con diferentes fluorocromos (*Multi Primer Mix*). Añadimos agua hasta un volumen final de 25 µl. La PCR se realiza en un equipo termociclador Perkin-Elmer 9600. Las condiciones de PCR son las siguientes: desnaturalización inicial (96°C x 2 minutos); 30 ciclos de amplificación (94°C x 10 segundos; 55°C x 30 segundos; 72°C x 30 segundos); elongación final a 72°C x 7 minutos.

**3.- Desnaturalización de la muestra.** Finalizada la reacción de PCR, se mezclan en un tubo eppendorf de 0,5 ml, 12µl de formamida desionizada, 1-2µl de amplificado y 0.5µl de marcador de peso molecular GeneScan 350-[TAMRA] (PE Applied Biosystems). Se incluye un tubo control que contiene formamida y el marcador de peso molecular GeneScan 350-[TAMRA]. Se desnaturalizan las muestras a 95°C durante 7 minutos. Posteriormente, se dejan 5 minutos en hielo, y se centrifugan (spin) para recoger todo el contenido.

**4.-Electroforesis capilar en gel de poliacrilamida** en secuenciador automático ABI-Prism 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems)

5.- **Análisis de los fragmentos obtenidos** con la ayuda del software GeneScan Analysis.

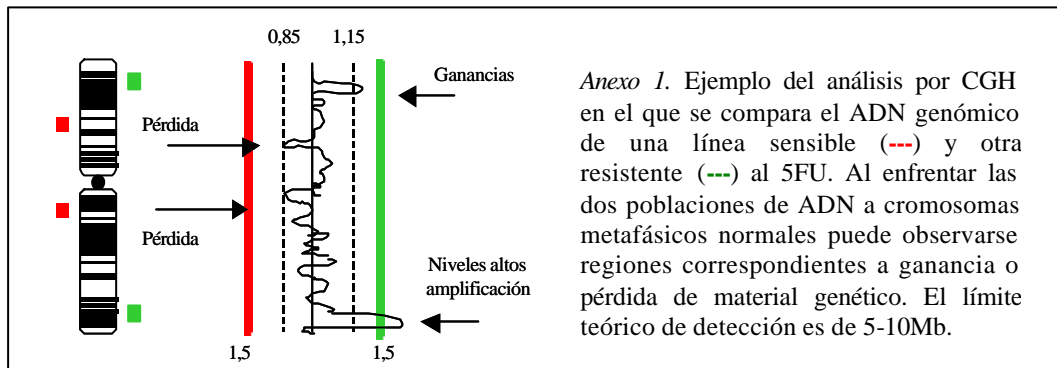
#### 4.8. ANÁLISIS DE HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA

Se determina mediante esta técnica las diferencias a nivel genético entre las parejas sensible/resistente. Este análisis permite detectar por comparación del ADN de la línea parental sensible (**HT29 y LoVo**) respecto al ADN de la línea resistente (**HT29-5FUR y LoVo-5FUR**) las regiones cromosómicas divergentes entre ambas, ya sea por ganancia o pérdida de material genético, y, por tanto, permite tipificar zonas potencialmente involucradas en la resistencia a 5-FU.

Esta técnica se basa en una hibridación *in situ* competitiva del ADN de las células sensibles y resistentes al 5-FU, cada uno marcado con un fluorocromo distinto y cromosomas en metafase procedentes de cualquier individuo sano o de fibroblastos en cultivo (*ver anexo 1*).

Mediante técnica de microscopía de fluorescencia asistida por ordenador, es posible analizar la intensidad de cada fluorocromo en los cromosomas metafásicos. Las diferencias de fluorescencia entre la línea sensible y la resistente a lo largo de un cromosoma normal control, refleja el cambio en el número de copias de las secuencias correspondientes. Si los cromosomas o las subregiones cromosómicas están presentes en número idéntico de copias tanto en la línea sensible como en la resistente se observa una contribución idéntica de cada fluorocromo. En cambio, se observa una variación en la fluorescencia si ciertas regiones muestran pérdidas o ganancias de material genético respecto a la línea parental. La intensidad de la señal es proporcional a la ganancia o pérdida observada en cada una de las regiones. El límite teórico de detección de ganancias/pérdidas es de 5-10 Mb. Este análisis se repite un mínimo de cinco veces sobre cada cromosoma metafásico, y se considera positivo únicamente cuando se superan los valores normales de fluorescencia en un rango previamente normalizado con el ADN control. En estos análisis sólo se contabilizan como positivas aquellas ganancias o pérdidas que coinciden después de enfrentar el ADN de cada una de las líneas (sensible y resistente) marcado con las dos fluorescencias, la roja y la verde.





## PROTOCOLO

**1.- Preparación de cromosomas metafásicos.** Linfocitos de sangre periférica de un voluntario sano se cultivaron durante 72h a 37°C en RPMI 1640 que contiene 10% FBS y pitoheflutina. La preparación de cromosomas metafásicos se prepara por métodos estándar (*Kallioniemi A y col, Science 258: 818-821, 1992*). Se seleccionan las preparaciones con una mayor intensidad de cromosomas no solapados mediante microscopía de contraste de fase.

**2.-Extracción del ADN** de las líneas celulares sensibles/resistentes a analizar y ADN de sangre total de un voluntario sano utilizando el kit *Nucleon-II DNA extraction*. (Amersham, UK). El ADN extraído se cuantifica por espectrofotometría y se diluye a una concentración de 0.1 µg/µl.

**3.-Incorporación del marcaje en el ADN.** Las líneas parentales sensibles se marcan con Spectrum Red dUTP (fluorescencia roja) y el ADN de las líneas parentales se marca con Spectrum Green dUTP (fluorescencia verde). Los fluorocromos se incorporan en el ADN (1µg) mediante técnica de *nick traslation* en un volumen final de 50 µl de una solución que contiene *translation buffer* (1x), CaCl<sub>2</sub> 0.1mM, dNTPs 0.1mM, fluorocromo marcado con dUTP 0.1mM, DNasa I (dilución 1/9500), 10 unidades de Polimerasa I, y agua. Esta solución se incubaba a 14-16°C durante 60 minutos. Transcurrido este tiempo, se incrementa la temperatura hasta 70°C x 10 minutos para finalizar la reacción. El producto de reacción se visualiza en un gel de agarosa a 1% para comprobar el tamaño del fragmento. La medida óptima para el análisis por CGH es de 500-2000 pares de bases.

**4.-Preparación de la sonda.** Se realiza una mezcla en un tubo de 1.5ml de: 200ng de ADN marcado con SpectrumGreen, 100 ng de ADN maracado con SpectrumRed y 10µg de Cot-1-ADN humano. Posteriormente, se precipita el ADN. Para ello se añaden 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto, se agita y se deja en hielo durante 20 minutos. Se centrifuga a 12000rpm x 30 minutos x 4°C. El precipitado se seca para eliminar las trazas de alcohol y se resuspende en 10ml de solución de hibridación que contiene 70% formamida, 10% sulfato de dextrano y SSC 2X . Esta solución se almacena a 4°C durante 12h. Justo antes de su utilización se desnaturaliza a 73°C x 5 minutos.

### 5.-Hibridación con cromosomas metafásicos.

- a) **Pre-hibridación.** Se sumergen las preparaciones de los cromosomas metafásicos en una solución de pre-hibridación (previamente calentada a 73°C x 5 minutos) que contiene 80% formamida y SSC 2X. Tras la pre-hibridación las preparaciones se deshidratan en diluciones a concentraciones crecientes de etanol (70% x 1 minuto, 85% x 1 minuto; 100% x 1 minuto) y se secan a 37°C para eliminar las trazas de Etanol.
- b) **Hibridación.** Se añaden 10µl de la sonda (previamente desnaturalizada) a cada una de las preparaciones. Se cubre rápidamente con un cubre-objetos y se sella. La hibridación se realiza durante 3-5 días a 37°C en un incubador.

**6.- Lavados.** Una vez realizada la hibridación, se retira el cubre-objetos de las preparaciones y se realiza:

- dos lavados con una solución que contiene 4X SSC – 0,3% Igepal CA-630 a 74°C durante 3 segundos y agitación

- un lavado con una solución 2X SSC – 0,1% Igepal CA-630 a temperatura ambiente durante 3 segundos y agitación
- Posteriormente, se dejan secar a temperatura ambiente y protegidas de la luz

**7.- Tinción con DAPI y cuantificación de la señal obtenida.** Se añaden 10µl de una solución de DAPI II. Se cubre con un cubre-objetos y se visualiza por microscopía de fluorescencia (objetivo 100X) capturando la imagen con filtros adecuados: rojo (SpectrumRed), verde (Spectrum-green) y azul (DAPI II).

#### **4.9. ANÁLISIS DE LA AMPLIFICACIÓN GÉNICA POR SOUTHERN BLOT**

Se analiza por esta técnica si existe amplificación génica (incremento en el número de copias) de *Timidilato Sintasa* en las líneas resistentes a 5-FU (HT29-5FUR y LoVo-5FUR) por comparación con sus homólogas sensibles.

Las líneas celulares se cultivan a razón de  $5 \times 10^5$  células en frascos de 25 cm<sup>2</sup>. Las líneas parentales HT29 y LoVo se cultivan en medio limpio, y las líneas HT29-5FUR y LoVo-5FUR se cultivan en medio que contiene 5-FU a dosis 2µM y 7µM respectivamente. Transcurridos 5 días, se lavan los frascos con PBS-2%FBS y se tripsinizan. Una vez centrifugados se recoge el precipitado (*pellet*) y se congela en seco en N<sub>2</sub> líquido y se almacena –20°C. El procesamiento de las muestras se realiza según el siguiente protocolo:

- 1- Obtención del ADN de las muestras
- 2- Digestión del ADN
- 3- Electroforesis en gel de agarosa
- 4- Transferencia en membrana de nylon N+
- 5- Hibridación con la sonda marcada con  $\alpha$ -<sup>32</sup>P
- 6- Lavados de la membrana de nylon
- 7- Exposición a película fotográfica y revelado
- 8- Cuantificación por densitometría de las señales correspondientes
- 9- Deshibridar y rehibridar de nuevo para sonda de p53 (repetir proceso de 5-7)

#### **PROTOCOLO**

##### **1.- Extracción del ADN de las células**

El protocolo se basa en el método descrito por Chomczynsky P y Sacchi N (*Analytical Biochemistry* 162: 152-159, 1987).

- Resuspender el pellet en 540 µl de una solución que contiene NaCl 370 mM, EDTA 2 mM, Tris· HCl 9 mM (pH=8.0), SDS 0,6% y Proteínasa K (0,25 µg/µl)
- Incubar 2 h a 50°C
- Añadir 200 µl de NaCl 5M y agitar por inversión
- Centrifugar 5 minutos x 8000rpm x 4 °C
- Recuperar la fase acuosa (parte superior) y añadir un volumen de fenol/cloroformo/isoamilalcohol (1:1)-(24:1) y mezclar por inversión
- Dejar reposar hasta formar dos fases
- Centrifugar 5 minutos x 12.000 rpm x 4 °C
- Recuperar la fase acuosa (parte superior) y añadir una solución que contiene 2 volúmenes de etanol absoluto frío (guardado a -20°C) y 0,1 volumen de Acetato sódico 3M a pH=5.2
- Precipitar un mínimo de 30 minutos a -80°C
- Centrifugar a 12.000 rpm x 30 minutos x 4 °C
- Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado (*pellet*) con 200 µl de Etanol al 70% a temperatura ambiente
- Centrifugar durante 3 minutos x 12.000 rpm x 4°C
- Eliminar bien los restos de alcohol
- Resuspender en TE
- Cuantificación en el espectrofotómetro
- Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% para visualizar la calidad del ADN extraído
- Guardar congelado a -20°C

## 2.- Digestión de ADN

- Calcular el volumen necesario de ADN para obtener 10-12 µg totales
  - Igualar los volúmenes de cada muestra con agua hasta 10 µl
  - Realizaremos dos digestiones dobles distintas:
    - a) digestión con los enzimas Hind III / BamH1
    - b) digestión con los enzimas Eco R1/ Bam H1
- \*En base al diseño de la sonda y a la zona del gen de la TS donde híbrida (exón 7), se realizó un mapa de restricción de la zona amplificada. Las enzimas utilizadas tienen dianas en esta zona generándose dos fragmentos distintos: uno de 9026 pb (digestión EcoRI/BamH1) y otro de 1883 pb (digestión Hind III/BamH1).
- En ambos casos se utilizan 2 unidades de cada enzima/µg de ADN, el volumen de tampón adecuado al 1% (multicore para el primer caso y buffer E para la segunda digestión) y el resto agua. Se calcula el porcentaje de glicerol (no puede exceder el 10%)
- La digestión se lleva a cabo durante 3 h a 37°C
  - Visualización en gel de agarosa al 0,7% de 1 µg de la digestión. Se considera que el ADN está bien digerido cuando no se observa ADN genómico en gel de agarosa. En caso contrario se realiza una segunda digestión añadiendo la correspondiente cantidad de cada enzima.
  - Se guarda la digestión a -20°C hasta su utilización

## 3.- Electroforesis en gel de agarosa

- Preparar un gel de agarosa al 0,8% y se añade Bromuro de Etidio
- Alicuotar la concentración necesaria de ADN de cada muestra (10-12µg) y se incubar durante 2-3 minutos a 56°C
- Añadir el tampón de carga y cargar el gel incluyendo un marcador de peso molecular (p.e. λ/Hind III). Correr el gel de electroforesis durante 6 -8 horas a 50 V.
- Tratamiento del gel previo a la transferencia, que consta de los siguientes pasos:
  - a) **Depurinización:** el gel de agarosa se sumerge en una solución que contiene HCl 0,25 M durante 10 minutos. De esta manera rompemos el ADN para facilitar su transferencia a la membrana
  - b) Lavado rápido con agua destilada
  - c) **Desnaturalización del ADN.** Se sumerge el gel de agarosa en una solución que contiene Tris 1M pH=7.4 y NaOH 0,5N durante 30 minutos y en agitación. Se realizan 2 cambios.
  - d) Tras el segundo cambio realizamos la lectura del pH del gel (tiras de pH). El gel debe estar a un pH entre 7-8 para asegurar la correcta transferencia
  - e) Cambiar la solución de neutralización y continuar durante 15 minutos más.

- f) Montar la transferencia

### 3.- Transferencia a membrana de Nylon (protocolo de Sambrook et al)

Se transfiere el ADN desde el gel a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond-N+, Amersham International, UK). Previamente, la membrana se sumerge en una solución de SSC 2X

El ADN se transfiere por capilaridad según el protocolo de Sambrook et al (*Sambrook J, Fritsch RF and Maniatis R; Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA*) durante un tiempo mínimo de 18 horas.

Una vez finalizada la transferencia, se lava la membrana en una solución que contiene SSC 6X durante 5 minutos. Posteriormente, se fija el ADN a la membrana (Stratalinker) y dejamos secar la membrana al aire. Se guarda a temperatura ambiente hasta su utilización.

### 4.- Obtención de la sonda

La sonda de TS se obtuvo en el laboratorio por técnica de PCR. Se diseñaron dos cebadores sobre zonas intrónicas específicas del exón 7 del gen TS. 300 ng de ADN de linfocitos se amplifican mediante PCR en una mezcla que contiene dNTPs 0.25 mM, buffer 1x, MgCl<sub>2</sub> 1.0 mM y 0.4μM de cada cebador. La amplificación por PCR consta de los siguientes pasos: desnaturalización inicial (95°C x 5 minutos), seguida de 32 ciclos de amplificación (95°C x 1 minuto; 58°C x 45 segundos y 72°C x 1 minuto y 15 segundos; elongación final 72°C x 7 minutos. El producto de PCR se purificó en un gel de agarosa con el kit Qiagen Gel Extraction (Qiagen) y se guardó a -20°C.

Se utilizaron los siguientes cebadores:

Cebador 3': CTG TCT TTA ATA AAT TTG CCA AGA G

Cebador 5': ATA ACT GAT AGG TCA CGG ACA GAT

### 5.- Hibridación con la sonda complementaria correspondiente marcada con α-<sup>32</sup>P

- Prehibridación de la membrana** durante 2 horas a 42 °C con 10 ml de una solución que contiene: Formamida al 50%, Denhardts 5X, SDS 5%, SSPE 6X y 100 μl de ADN de esperma de salmón (stock 10 mg/ml), desnaturalizada previamente a 95°C durante 5 minutos
- Hibridación de la membrana** durante 16 horas a 42°C en 10 ml de solución que contiene: Formamida al 50%, Sulfato de dextrano 10%, SDS 0,5%, SSPE 6x, 100 μl de ADN de esperma de salmón (stock 10 mg/ml), desnaturalizada previamente a 95°C durante 5 minutos y 30-40 ng de la sonda correspondiente marcada con [α-<sup>32</sup>P]-dCTP desnaturalizada (95°C x 5 minutos)
- Marcaje de la sonda** se lleva a cabo según técnica de *random priming extension* con [α-<sup>32</sup>P]-dCTP (actividad 3000 Ci/mmol, Amersham) utilizando el kit Prime It II (Stratagene, USA). Una vez marcada la sonda se eliminan los nucleótidos no incorporados con la columna de resina Microspin<sup>TM</sup> S-300HR (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden). Se recomienda que la sonda una vez marcada presente una actividad mínima de 10<sup>9</sup> cpm/μg.

**6.- Lavados de la membrana de Nylon.** Una vez acabada la hibridación con la sonda correspondiente se procede a lavar la membrana para eliminar las uniones inespecíficas de la sonda:

- 1 lavado rápido con SSC 2x a temperatura ambiente
- 2 lavados de 15 minutos con SSC 2x / 0,1% SDS a temperatura ambiente
- 1 lavado de 20 minutos con SSC 0,1x/0,1% SDS a 60°C

**7.- Exposición a película fotográfica y posterior revelado.** Después de lavar la membrana se expone a película fotográfica (X-Omat, Kodak) con doble pantalla amplificadora a -80°C. El revelado se realiza con un equipo Kodak automático.

### 8.- Cuantificación de las señales correspondientes a cada ADN

La cuantificación de las señales se realiza por densitometría de imagen en un equipo de BioRad. Para normalizar la señal los filtros se deshibridaron y rehibridaron con una sonda para p53 (exón 7). La señal de p53 se cuantifica también por densitometría con el equipo de BioRad. Para cada una de las parejas sensible/resistente (controles sin tratar y tratamientos) se calcula el cociente:

Señal de muestra x para TS / Señal de muestra x para p53 [1]

El grado de expresión se calcula según la ecuación: 
$$\frac{\text{Ratio línea resistente [1]}}{\text{Ratio línea sensible [1]}} \quad [2]$$

#### 4.10. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL ARNm POR NORTHERN BLOT

##### A) Timidilato Sintasa

Se analiza por esta técnica la variación en la expresión del ARNm del gen *Timidilato Sintasa* en las parejas sensible/resistente a 5-FU, en las siguientes condiciones experimentales:

1. Células HT29/HT29-5FUR y LoVo/LoVo-5FUR cultivadas en ausencia (medio libre de fármaco) y en presencia de 5-FU (5 días de exposición) a las dosis a las que se indujo la resistencia (2 $\mu$ M HT29/HT29-5FUR y 7 $\mu$ M LoVo/LoVo-5FUR)
2. Células HT29/HT29-5FUR y LoVo/LoVo-5FUR tratadas con Oxaliplatino (4h x DI<sub>50</sub>): análisis de TS a las 0, 12 y 24h después del tratamiento
3. Células HT29/HT29-5FUR y LoVo/LoVo-5FUR durante la exposición a 5-FU como agente único (24h x DI<sub>50</sub>): análisis de TS a las 0h, 12h y 24h
4. Células HT29/HT29-5FUR y LoVo/LoVo-5FUR tras la exposición previa a Oxaliplatino (4h x DI<sub>50</sub>) y durante la exposición a 5-FU (24h x DI<sub>50</sub>) en el esquema secuencial OXA→5-FU: análisis de TS a las 12h y 24h
5. Células control cultivadas en paralelo en medio libre de fármaco

##### B) Topoisomerasa I

Se analiza por esta técnica la variación en la expresión del ARNm del gen Topoisomerasa I en las parejas sensible/resistente a 5-FU, en las siguientes condiciones experimentales:

1. Células HT29/HT29-5FUR y LoVo/LoVo-5FUR tratadas con Oxaliplatino (4h x DI<sub>50</sub>): análisis de TS a las 0, 12 y 24h después del tratamiento
2. Células HT29/HT29-5FUR y LoVo/LoVo-5FUR durante la exposición a TPT como agente único (24h x DI<sub>50</sub>): análisis a las 0h, 12h y 24h
3. Células HT29/HT29-5FUR y LoVo/LoVo-5FUR tras la exposición previa a Oxaliplatino (4h x DI<sub>50</sub>) y durante la exposición a TPT (24h x DI<sub>50</sub>) en el esquema secuencial OXA→TPT: análisis a las 12h y 24h

#### 4. Células control cultivadas en paralelo en medio libre de fármaco

En ambos casos (**A** y **B**) cultivan las células sensibles/resistentes en frascos de 25 cm<sup>2</sup> a razón de 1 x 10<sup>6</sup> células/frasco. Después de 24 horas de crecimiento en medio libre de droga se administra los diferentes tratamientos. La concentración DI<sub>50</sub> corresponde a la dosis inhibitoria 50% de cada uno de los fármacos utilizada en el estudio de citotoxicidad para cada una de las líneas celulares (sensibles y resistentes). Posteriormente, se lavan los frascos con PBS-2% FBS y se congelan a -20°C hasta su procesamiento. El protocolo utilizado consta de los siguientes pasos:

- 1- Obtención del ARN total de las muestras
- 2- Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante
- 3- Transferencia en membrana de nylon N+
- 4- Hibridación con la sonda marcada con  $\alpha$ -<sup>32</sup>P
- 5- Lavados de la membrana de nylon
- 6- Exposición a película fotográfica y revelado
- 7- Cuantificación por densitometría de las señales correspondientes

### PROTOCOLO

#### 1.- Extracción del ARN de las células

- El protocolo se basa en el método descrito por *Chomczynsky P* y *Sacchi N* (*Analytical Biochemistry* 162: 152-159, 1987).
- Añadir directamente al frasco 1ml de solución de Ultraspec Reagent (Biotex Laboratories Inc, Huston, USA) que contiene fenol y sales de guanidina y se incuba 5 minutos en hielo
  - Centrifugar los frascos 2 minutos x 400 rpm y recoger la solución y homogeneizarla
  - Añadir 200 µl de cloroformo y mezclar por inversión. Dejar 5 minutos en hielo, permitiendo la formación de dos fases
  - Centrifugar 20 minutos x 14.000 rpm x 4 °C
  - Recuperar la fase acuosa (parte superior) y añadir un volumen de isopropanol a temperatura ambiente y mezclar por inversión
  - Precipitar durante 2 horas a -20°C
  - Centrifugar 30 minutos x 14.000 rpm x 4 °C
  - Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado (*pellet*) con 200 µl de Etanol al 70% a temperatura ambiente
  - Centrifugar durante 15 minutos x 14.000 rpm x 4°C
  - Eliminar bien los restos de alcohol
  - Resuspender en agua DEPC y dejar durante 3 minutos a 70°C
  - Cuantificación en el espectrofotómetro
  - Electroforesis en gel de agarosa al 1% para visualizar la calidad del ARN extraído
  - Guardar congelado a -20°C

#### 2.- Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante

- Preparar un gel de agarosa al 1%, formaldehído al 6% y MOPS 1x
- Alicuotar la concentración necesaria de ARN de cada muestra y añadir solución desnaturalizante (que contiene 50% Formamida, 6% Formaldehído y MOPS 1x a concentración final)
- Desnaturalizar durante 5 minutos a 65 °C
- Añadir el tampón de carga y correr el gel de electroforesis

### 3.- Transferencia a membrana de Nylon (protocolo de Sambrook y col)

Una vez finalizada la electroforesis se procede a transferir el ARN desde el gel a una membrana de nylon cargada positivamente (Hybond-N+, Amersham International, UK), previamente lavada con agua (3 cambios de 20 minutos) y equilibrada con SSC 2X (60 minutos, 3 cambios).

El ARN se transfiere por capilaridad según el protocolo de Sambrook et al (*Sambrook J, Fritsch RF and Maniatis R; Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA*) durante un tiempo mínimo de 18 horas.

### 4.- Hibridación con la sonda complementaria correspondiente marcada con $\alpha$ -<sup>32</sup>P

- a) **Prehibridación de la membrana** durante 2 horas a 42 °C con 10 ml de una solución que contiene: Formamida al 50%, Denhardtts 5X, SDS 5%, SSPE 6X y 100  $\mu$ l de ADN de esperma de salmón (stock 10 mg/ml), desnaturalizada previamente a 95°C durante 5 minutos
- b) **Hibridación de la membrana** durante 16 horas a 42°C en 10 ml de solución que contiene: Formamida al 50%, Sulfato de dextrano 10%, SDS 0,5%, SSPE 6x, 100  $\mu$ l de ADN de esperma de salmón (stock 10 mg/ml), desnaturalizada previamente a 95°C durante 5 minutos y 30-40 ng de la sonda correspondiente marcada con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP desnaturalizada (95°C x 5 minutos)
- c) **Marcaje de la sonda** se lleva a cabo según técnica de *random priming extension* con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (actividad 3000 Ci/mmol, Amersham) utilizando el kitt Prime It II (Stratagene, USA). Una vez marcada la sonda se eliminan los nucleótidos no incorporados con la columna de resina Microspin<sup>TM</sup> S-300HR (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden). Se recomienda que la sonda una vez marcada presente una actividad mínima de 300.000 cpm/ $\mu$ l.
- d) **Sonda para el análisis de ARNm de Timidilato Sintasa.** Esta sonda fue cedida por el *Dr. C. Allegra (National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA)*. Consiste en el cADN completo (1,2 Kb) correspondiente al gen de la Timidilato Sintasa clonado en un vector pGEM/4Z con las dianas de las enzimas de restricción XhoI/StuI. El vector tiene incorporado un gen de resistencia a la ampicilina para los posterior selección de las bacterias transformantes. Esta construcción (denominada PGEM/TS) se utiliza para transformar una "soca" bacteriana de *E. Coli*, JM109. La expansión del cultivo bacteriano se lleva cabo en medio LB + 5 $\mu$ l ampicilina (stock 50 mg/ml) a 37°C en agitación (250 rpm) durante toda la noche. Con tal de recuperar el pGEM-TS una vez expandido el cultivo, primero se hace una extracción del ADN del vector según la técnica descrita por *Sambrook J y col (Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA)*. El vector purificado se digiere con las enzimas de restricción Eco RI/ Hind III (Promega) y el fragmento de cADN de TS se separa por electroforesis en gel de agarosa al 0.7% en TBE 1x. La banda correspondiente se recorta del gel y se purifica con el Kit Ultraclean DNA Purification (Hispanlab) y se guarda congelada a -20°C. La cuantificación de la sonda se realiza por electroforesis en gel de agarosa al 0.7% en TBE1x respecto al marcador de peso molecular  $\lambda$ /Hind III.
- e) **La sonda de Topoisomerasa I** se obtuvo en nuestro laboratorio por técnica de RT-PCR. Se hizo una retrotranscripción (RT) a partir de 5 $\mu$ g de ARN total de células HT29 con el kit Ready-to-Go (Pharmacia Biotech) y un cebador 3'. A partir de 2 $\mu$ l del producto de RT se realiza una PCR con los cebadores 3' (exón 21) y 5' (solapado entre los exones 17 y 18) específicos del gen Topoisomerasa I y a una temperatura de anillamiento de 60°C. El producto de PCR se purifica en gel de agarosa con el kitt Quiagen Gel Extraction (Quiagen) y se guarda congelado (una vez cuantificado por comparación con el marcador de peso conocido  $\lambda$ /Hind III) a -20°C.  
 Cebador 3' (lectura 5' → 3'): CCT CTT CAC AGA ACT CTG CC  
 Cebador 5' (lectura 3' → 5'): TGA CAG CCC CGG ATG AGA A

**5.- Lavados de la membrana de nylon** Una vez acabada la hibridación con la sonda correspondiente se procede a lavar la membrana para eliminar las uniones inespecíficas de la sonda.

Para las membranas hibridadas con una sonda específica para TS se hacen los siguientes lavados:

- 1 lavado rápido con SSC 2x a temperatura ambiente
- 2 lavados de 10 minutos con SSC 2x / 0,5% SDS a temperatura ambiente
- 1 lavado de 20 minutos con SSC 0,5x/0,5% SDS a 60°C

**6.- Exposición a película fotográfica y posterior revelado.** Después de lavar la membrana se expone a película fotográfica (X-Omat, Kodak) con doble pantalla amplificadora a -80°C. El revelado se realiza con un equipo Kodak automático.

#### 7.- Cuantificación de las señales correspondientes a cada ARNm

La cuantificación de las señales se realiza por densitometría de imagen en un equipo de BioRad. La señal se normaliza respecto la señal de ARN ribosómico 28S visualizado en gel de agarosa para cada una de las muestras, cuantificado también por densitometría con el programa Quantity One (BioRad). Para cada una de las muestras (controles sin tratar y tratamientos) calculamos el ratio:

$$\frac{\text{Señal de ARNm muestra X / señal 28S muestra X}}{\text{Señal de ARNm control externo/señal 28S control externo}} \quad [1]$$

donde *muestra x* representa una condición experimental concreta de las células tratadas y el control externo representa una *muestra externa* idéntica en todas las membranas utilizadas que nos permite comparar los datos obtenidos.

El grado de expresión se calcula según la ecuación:

$$\frac{\text{Ratio muestra } x [1]}{\text{Ratio del control [1]}} \quad [2]$$

donde el *control* representa células cultivadas en paralelo en medio libre de droga y *ratio de la muestra x* representa una condición experimental concreta.

#### 4.11. ANÁLISIS DE LOS NIVELES PROTEICOS POR WESTERN BLOT

Se analiza mediante esta técnica la expresión a nivel enzimático de *Timidilato Sintasa* en las parejas sensible/resistentes a 5-FU, en las siguientes condiciones experimentales:

1. Células HT29/HT29-5FUR y LoVo/LoVo-5FUR cultivadas en ausencia (medio libre de fármaco) y en presencia de 5-FU (5 días de exposición) a las dosis a las que se indujo la resistencia (2µM HT29/HT29-5FUR y 7µM LoVo/LoVo-5FUR)
2. Células HT29/HT29-5FUR y LoVo/LoVo-5FUR tratadas con Oxaliplatino (4h x DI<sub>50</sub>): análisis de TS a las 0, 12 y 24h después del tratamiento
3. Células HT29/HT29-5FUR y LoVo/LoVo-5FUR durante la exposición a 5-FU como agente único (24h x DI<sub>50</sub>): análisis de TS a las 0h, 12h y 24h
4. Células HT29/HT29-5FUR y LoVo/LoVo-5FUR tras la exposición previa a Oxaliplatino (4h x DI<sub>50</sub>) y durante la exposición a 5-FU (24h x DI<sub>50</sub>) en el esquema secuencial OXA→ 5-FU: análisis de TS a las 12h y 24h
5. Células control cultivadas en paralelo en medio libre de fármaco



En ambos casos (A y B) cultivan las células sensibles/resistentes en frascos de 25 cm<sup>2</sup> a razón de 1 x 10<sup>6</sup> células/frasco. Después de 24 horas de crecimiento en medio libre de droga se administra los diferentes tratamientos. La concentración DI50 corresponde a la dosis inhibitoria 50% de cada uno de los fármacos utilizada en el estudio de citotoxicidad para cada una de las líneas celulares (sensibles y resistentes). Posteriormente, se lavan los frascos con PBS-2% FBS y se congelan a -20°C hasta su procesamiento. El procesamiento de las muestras se realiza según el siguiente protocolo:

- 1- Obtención del homogeneizado proteico
- 2- Electroforesis en gel de poliacrilamida
- 3- Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa
- 4- Inmunodetección con un anticuerpo específico anti-TS
- 5- Revelado con un anticuerpo secundario ligado a peroxidasa
- 6- Exposición a película fotográfica y revelado
- 7- Cuantificación por densitometría de las señales correspondientes de la proteína

## PROTOCOLO

### 1.- Obtención del homogeneizado proteico de las muestras

- Añadir directamente 1 ml de tampón de lisis que contiene: Tris-HCl a pH=8.0 a una concentración final 50 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, y un cóctel de inhibidores de proteasas Complete Mini (Boehringer Mannheim).
- Se recoge el homogeneizado en tubos de 1,5 ml y se congela en N2 líquido
- Incubar a 37°C durante 20 minutos
- Centrifugar a 14.000 rpm x 2 minutos x 4 °C
- Recuperar el sobrenadante
- Cuantificación de la proteína total según el método de Bradford (utilizamos Kitt Protein Assay DC-II de BioRad)

### 2.- Electroforesis vertical en gel PAGE según el método de Laemmli (*Sambrook J, Fritsch RF and Maniatis R; Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA*).

- Preparar el gel de poliacrilamida-bisacrilamida en dos partes:  
**Concentrador:** acrilamida-bisacrilamida (29:1) al 7,5%, SDS 0,1%, Tris· Cl 125 mM pH=6.8, Persulfato amónico 0,05% y Temed 6mM.  
**Separador:** acrilamida-bisacrilamida (29:1) al 15%, SDS 0,1%, Tris· Cl 375 mM pH=8.8, Persulfato amónico 0,05% y Temed 6 mM.
- Alicuotar la concentración necesaria de proteína y desnaturalizar añadiendo tampón reductor (β-Mercaptoetanol 5%, SDS 2%, Tris· Cl 63,5 mM (pH=6.8), Glicerol 10% y azul de bromofenol 0,5%). Desnaturalizar 5 minutos a 96°C y dejarlo durante 5 minutos en hielo.
- Realizar la electroforesis en tampón Tris 25mM, Glicina 192 mM y SDS 0,1%, durante 6-8 horas a 4°C

**3.- Electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa.** Una vez finalizada la electroforesis se procede a la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (BioRad). La transferencia se lleva a cabo en un equipo Transblot Cell (BioRad) en tampón que contiene Tris 50mM, Glicina 386 mM, SDS 0,1% y Metanol 20%, durante 18 horas a 4°C y 60 mA.

**4.- Inmunodetección con un anticuerpo primario específico anti-TS.** La detección se lleva a cabo en varios procesos:

- Bloqueo de la membrana se realiza durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación en 50 ml de una solución que contiene leche desnatada Sveltesse 5%, Tween-20 0,2 % y PBS.
- Incubación con el anticuerpo anti-TS que se realiza durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación en 10 ml de una solución que contiene leche desnatada Sveltesse 1%, Tween-20 0,5% y anticuerpo TS a una dilución 1:750 en PBS. El anticuerpo anti-TS es un monoclonal de ratón anti-TS humano cedido gentilmente por el *Dr. C. Allegra, del National Cancer Institute (Bethesda, MD, USA)*.
- Lavados de la membrana, una vez finalizada la incubación con el anticuerpo primario se lava la membrana con el objeto de eliminar las uniones inespecíficas. Se realizan 2 lavados de 15 minutos en agitación en 50ml de PBS y Tween-20 al 0,5%

**5.- Revelado con un anticuerpo secundario ligado a peroxidasa de rave.**

Se incuba la membrana con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón ligado a peroxidasa de Rave (Novex) en una dilución 1:7500 en 10 ml de una solución que contiene leche desnatada Sveltesse 0,5%, Tween-20 al 0,25% en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación.

Finalizada la incubación se lava la membrana para eliminar las uniones inespecíficas. Se realizan dos lavados de 15 minutos a temperatura ambiente en PBS al 0,5% de Tween-20.

Incubamos la membrana con 5 ml de solución reveladora quimioluminiscente (kitt *Supersignal*, Pierce, USA) durante 5 minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz.

**6.- Exposición a película fotográfica y revelado final.**

La membrana se expone a una película fotográfica (ECL film, Amersham) durante 5-30 segundos con una pantalla amplificadora. El revelado de la película se realiza con un equipo Kodak automático.

**7.- Cuantificación de la señal** por densitometría de imagen en un equipo de BioRad. En todos los casos los datos de expresión de proteína representan el ratio:

$$\frac{\text{señal de la muestra } x / \text{señal del control externo}}{\text{señal del control} / \text{señal del control externo}}$$

donde la señal de la *muestra x* representa una condición experimental y el *control* representa células cultivadas en paralelo en ausencia de tratamiento. En ambos casos, *muestra y control*, la señal se normaliza respecto a un *control externo* idéntico en todas las membranas, que nos permitirá comparar valores entre membranas distintas.

## 4.12. ANÁLISIS DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA

En este apartado analizamos la inducción de muerte celular programada bajo las siguientes condiciones experimentales:

- Células sensible/resistente control cultivada en medio libre de droga
- Células sensible/resistente tratadas con Oxaliplatino (4h)
- Células sensible/resistente tratadas con 5-FU (24h)
- Células sensible/resistente tratadas con el esquema OXA(4h)→5-FU(24h)

- Células sensible/resistente tratadas con el esquema 5-FU (24h)→OXA(4h)

Para este estudio se realizaron dos técnicas diferentes:

- 1.- Análisis de fragmentación del ADN en geles de agarosa
- 2.- Análisis por citometría de flujo con Anexina V / Yoduro de Propidio

Células sensibles/resistentes se cultivan en frascos de 25 cm<sup>2</sup> a razón de 1x10<sup>6</sup> células/frasco. Después de 24 horas de crecimiento en medio libre de droga se administra los diferentes tratamientos. La concentración de cada uno de los fármacos corresponde a la dosis inhibitoria 50% (DI<sub>50</sub>) utilizada en el estudio de citotoxicidad para cada una de las líneas celulares (HT29, HT29-5FUR, LoVo y LoVo-5FUR). Posteriormente, se lavan los tratamientos y se cultivan las células en medio libre de droga. Transcurridas 72 h, recogemos las células del sobrenadante y tripsinizamos las células de la monocapa. Se realiza un lavado de las células (sobrenadante y monocapa) con PBS-2% FBS. Una vez centrifugadas:

1. Se recoge el *pellet* y se congela en seco en N<sub>2</sub> líquido para el análisis de fragmentación en geles de agarosa.
2. Se recoge el *pellet* y se resuspende en PBS + 50% de FBS para el análisis por microscopía de fluorescencia

En ambos casos, las muestras se guardan congeladas a -80° C para su posterior procesamiento

### **Fragmentación del ADN en geles de agarosa**

Analizamos las muestras según el siguiente protocolo (*W. Nieves-Neira, National Cancer Institute, comunicación personal*):

- 1.- Resuspender las células en 50µl de un tampón de lisis que contiene NaCl 150mM, Tris· HCl 10 mM, EDTA 10mM a pH=8.0. Añadimos en fresco proteinasa K (a concentración final de 1.5 mg/ml) y SDS (a concentración final 0.5%.)
- 2.- Incubar las células un tiempo mínimo de 2h a 50°C
- 3.- Añadir ARNasa (0,1 mg/ml) y se incuba 30 minutos a 37°C

4.- Las muestras se cargan en gel de agarosa al 2% en seco (tras una incubación previa a 65°C x 2 minutos) y se sellan los pozos con agarosa de baja temperatura de fusión (*low melting*). La electroforesis se realiza en TBE 1X

5.- Teñir el gel con Bromuro de Etidio y fotografiar

### **Análisis por citometría de flujo con Anexina-V-fluos**

Este método permite detectar el proceso de translocación de la fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana celular que se produce durante los estadios preliminares de la apoptosis. Hemos utilizado para este trabajo el *kitt Anexina-V-Fluos Staining* (Roche) que consiste en una doble tinción Anexina V/Yoduro de Propidio. La Anexina V es un anticuerpo específico de la fosfatidilserina que lleva conjugada una molécula de fluoresceína que emite en la zona verde del espectro y que al unirse a la membrana celular permite cuantificar el porcentaje de células apoptóticas presentes en un cultivo. El Yoduro de Propidio (emisión en la zona roja del espectro) es un colorante vital que entra únicamente en células muertas y que nos permite calcular el porcentaje de células necróticas presentes en el cultivo. La cuantificación se llevó a cabo por citometría de flujo.

El procedimiento consta de los siguientes pasos:

- Lavar las células en PBS y centrifugar a 200g x 5 minutos. Recoger el precipitado
- Incubación de las células con 100µl de solución que contiene AnexinaV-fluoresceína/Yoduro de Propidio en tampón HEPES durante 10-15 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz
- Añadimos 0.4-0.8 ml de una solución *Binding buffer* y se analizan por citometría de flujo en un citómetro FacScan (Becton Dickinson, San José, CA, USA). La adquisición se realizó con el programa Lysis-II. Se utiliza una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 488nm para la excitación y una  $\lambda$  de emisión de 515nm para la fluoresceína y >600nm para el Yoduro de Propidio.