

- RESULTADOS-
Resultados Objetivo 1

5.1.1. Generación de líneas con resistencia a 5-Fluorouracilo

Las líneas celulares con resistencia a 5-FU, HT29-5FUR y LoVo-5FUR, se generaron en nuestro laboratorio a partir de las correspondientes líneas parentales inicialmente sensibles a 5-FU (HT29 y LoVo) por exposición continuada a dosis crecientes del fármaco hasta alcanzar una dosis de 2 μ M y 7 μ M, respectivamente.

La adaptación de la línea celular HT29-5FUR se inicia a una dosis de 1 μ M de 5-FU. Tras un período de elevada toxicidad (figura 12) aparece una población estable con una viabilidad cercana al 80% en presencia del fármaco. Se procede entonces a incrementar la dosis de 5-FU hasta 2 μ M. Al igual que en el caso anterior, tras un período de toxicidad elevada, se obtuvo la línea celular HT29-5FUR (utilizada en nuestro procedimiento experimental) que presenta una viabilidad cercana al 80% tanto en presencia como en ausencia de 5-FU 2 μ M en el medio de cultivo con respecto a la línea sensible (siendo la viabilidad celular para la línea HT29 a esta dosis de 5-FU del 56%). La diferencia en la viabilidad celular respecto a la línea sensible está en relación con el tiempo de duplicación que fue de 30h (comparado con 26 horas para HT29). La línea HT29-5FUR presenta una morfología epitelial, apreciándose cambios morfológicos (observables al microscopio óptico) respecto a la línea parental HT29 con un incremento de células de gran tamaño con nucleolos grandes y prominentes, con el citoplasma vacuolizado, y alteraciones de la membrana citoplasmática (figura 13).

La adaptación de la línea LoVo-5FUR se inicia a una dosis de 5-FU 5 μ M (dosis inferiores no mostraron citotoxicidad). Tras un período de citotoxicidad elevado (figura 12) aparece una población estable con una viabilidad cercana al 70% en presencia de 5-FU. Se procede a incrementar la dosis del fármaco hasta concentración 7 μ M. Al igual que en el caso anterior, tras un período de elevada citotoxicidad celular, se obtuvo la línea LoVo-5FUR que presenta una viabilidad celular próxima al 100% con respecto a la línea parental sensible LoVo (que presentó una supervivencia del 68% en presencia de la misma dosis de 5-FU). La línea resistente tiene un tiempo de duplicación de 34 horas (comparado con 28h para la línea celular LoVo) y presenta morfología epitelial, apreciándose cambios morfológicos al microscopio óptico (selección de una población con mayor tamaño celular) (figura 13).

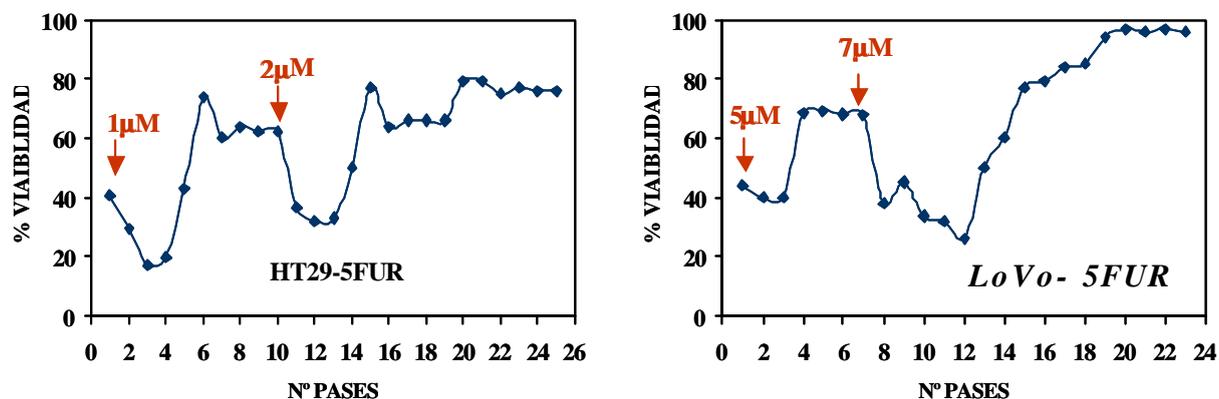


Figura 12. Generación de las líneas HT29-5FUR y LoVo-5FUR por adaptación de las correspondientes parejas sensibles (HT29 y LoVo) a dosis crecientes de 5-FU hasta alcanzar la dosis 2 μM y 7 μM, respectivamente. Puede observarse que tras un período inicial de elevada citotoxicidad, emerge una población adaptada al fármaco, que presenta una viabilidad cercana a la de las líneas parentales.

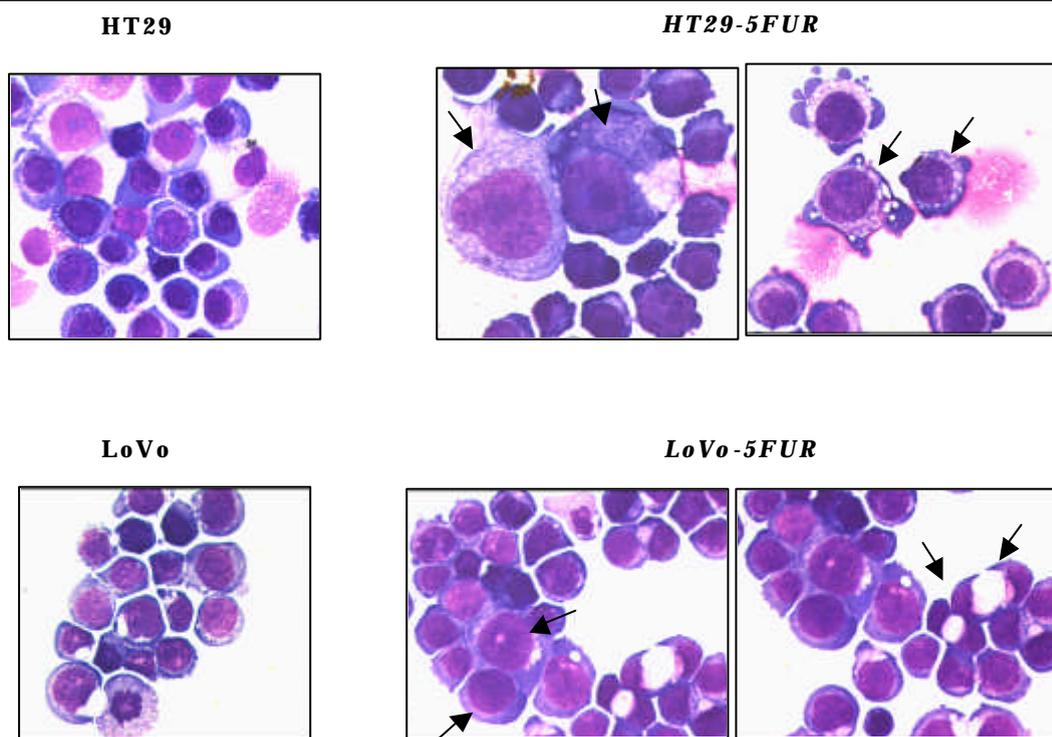


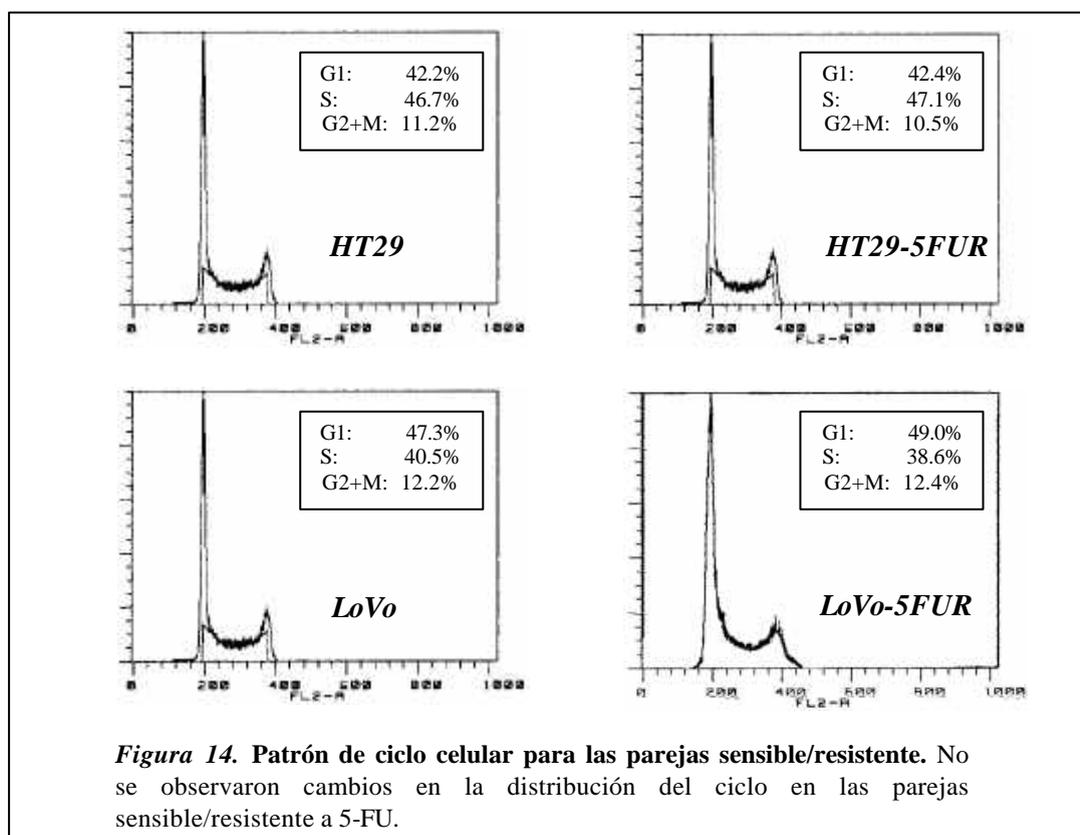
Figura 13. Tinción con May-Grünwald-Giemsa y captación en microscopio (objetivo 100x) de las parejas sensibles/resistentes. Obsérvese la presencia de células de gran tamaño y vacuolizadas en la línea HT29-5FUR (flecha) y el incremento en el tamaño celular así como el aumento de la proporción de células vacuolizadas (indentaciones) en la línea celular LoVo-5FUR (flecha).

5.1.2. Análisis por citometría de flujo del patrón de ciclo celular en líneas sensibles y resistentes a 5-FU.

Una vez inducida la resistencia a 5-FU, se analizó el patrón de ciclo celular de las líneas HT29-5FUR y LoVo-5FUR y se comparó con el de sus correspondientes parejas sensibles. Tal y como muestra la *figura 14*, el porcentaje de población celular para la línea HT29 en fase G1, S y G2/M del ciclo fue de 42.2 %, 46.7% y 11.2% respectivamente, y de 42.4%, 47.1% y 10.5% para la línea HT29-5FUR.

La línea LoVo-5FUR presentó una distribución de ciclo celular similar a la de la línea parental sensible. El análisis del porcentaje de población para la línea LoVo en las distintas fases (G1, S y G2/M) fue de 47.3%, 40.5% y 12.2%, respectivamente y de 49.0%, 38.6% y 12.4% para la línea LoVo-5FUR.

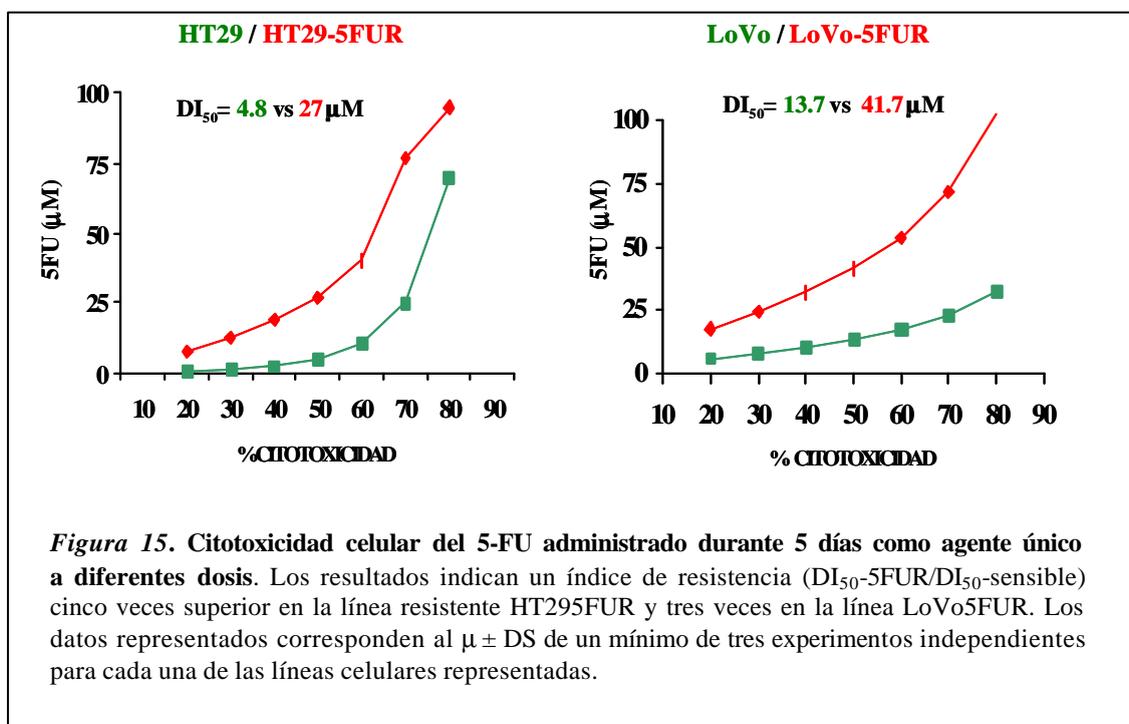
Estos datos muestran que no existen diferencias significativas entre la población sensible y la resistente a 5-FU con respecto al patrón de ciclo celular. No se observó una retención en la fase S del ciclo en las líneas resistentes pese a que las líneas celulares resistentes se cultivaron en presencia de la correspondiente dosis de 5-FU (2 μ M y 7 μ M, respectivamente).



5.1.3. Análisis del grado de resistencia inducida a 5-FU

Para determinar el grado de resistencia inducida a 5-FU en las líneas resistentes, se analizó la citotoxicidad celular tras la exposición durante 5 días a diferentes dosis de 5-FU y se calcularon las fracciones de supervivencia para las parejas sensible/resistente. Una vez calculadas las dosis inhibitorias (DI10%-DI90%) se comparan los valores de la línea resistente respecto a la sensible. El grado de resistencia inducido a 5-FU en las líneas HT29-5FUR y LoVo-5FUR se muestra en la *tabla 4*.

La línea HT29-5FUR mostró una resistencia a 5-FU casi 6 veces superior a la línea sensible HT29 ($DI_{50}=27.2\mu\text{M}$ versus $4.8\mu\text{M}$). Asimismo, la línea LoVo5FUR mostró un grado de resistencia 3 veces superior al de la línea LoVo ($DI_{50} = 41.7\mu\text{M}$ versus $13.6\mu\text{M}$ para la línea LoVo). Por tanto, estos resultados indican que las dosis de 5-FU requeridas para conseguir el mismo efecto citotóxico en las líneas resistentes fueron superiores a las requeridas por sus homólogas sensibles para todas las fracciones de inhibición (*figura 15*). Señalar además que la dosis $2\mu\text{M}$ en la línea HT29-5FUR y $7\mu\text{M}$ en la línea LoVo-5FUR no resultaron tóxicas.



<i>Dosis inhibitoria</i>	HT29	HT29-5FUR	GR^a	LoVo	LoVo-5FUR	GR^a
DI90	339.4 ± 87.7	198.0 ± 81.8	0.6	55.18 ± 2.0	175.0 ± 53.0	3.2
DI80	70.7 ± 15.4	98.2 ± 35.9	1.3	32.6 ± 9.3	102.15 ± 18.1	3.1
DI70	24.9 ± 4.8	76.8 ± 33.0	3.1	23.2 ± 5.05	71.8 ± 6.9	3.1
DI60	10.6 ± 1.8	39.3 ± 13.1	3.7	17.55 ± 2.9	54.01 ± 2.2	3.1
DI50	4.8 ± 0.7	27.2 ± 8.6	5.6	13.65 ± 1.7	41.71 ± 2.2	3.1
DI40	2.2 ± 0.3	18.9 ± 5.7	8.5	10.5 ± 0.8	32.27 ± 3.3	3.1
DI30	0.9 ± 0.04	12.7 ± 3.6	13.4	8.12 ± 0.7	24.48 ± 4.06	3.0
DI20	0.33 ± 0.04	7.8 ± 2.0	23.3	6.03 ± 0.7	17.55 ± 4.2	2.9
DI10	0.07 ± 0.006	3.8 ± 0.8	53.9	3.2 ± 0.8	10.7 ± 3.7	3.0

^aGR: muestra el grado de resistencia para cada una de las dosis inhibitorias (DI) calculadas como el ratio entre la DI línea resistente / DI línea sensible

Tabla 4. Cálculo del grado de resistencia inducido a 5-FU en las líneas HT29-5FUR y LoVo-5FUR. Cada una de las dosis inhibitorias se calcula a partir de la DI₅₀ y la pendiente m según la fórmula $DI_f = DI_{50} \cdot [(1-f)/f]^{1/m}$. Los datos representan la $\mu \pm SD$ de tres experimentos independientes.

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.

En este apartado se calcularon las dosis individuales de cada fármaco (Oxaliplatino, los inhibidores de Topoisomerasa I (TPT, CPT-11 y SN38) y 5-FU en todas las líneas celulares, sensibles (HT29, LoVo, DLD-1 y LS-513) y resistentes a 5-FU (HT29-5FUR y LoVo-5FUR). Se analiza también si la inducción de resistencia a 5-FU en las líneas HT29-5FUR y LoVo-5FUR ha provocado un cambio en la sensibilidad de estas líneas a otros fármacos con mecanismos de acción diferentes al 5-FU (Oxaliplatino e inhibidores de Topoisomerasa I). Los resultados obtenidos en el análisis de la citotoxicidad se muestran en la *tabla 5*.

Cuando se analiza la citotoxicidad inducida por el 5-FU administrado de forma individual durante 24 horas en las parejas sensible/resistente, se observa que la dosis de 5-FU necesaria para conseguir la misma fracción de inhibición es superior en las líneas resistentes cuando se comparan con sus correspondientes parejas sensibles (*figura 16*). Así por ejemplo, se observa un índice de resistencia de dos veces en la línea HT29-5FUR y tres veces en la línea LoVo-5FUR para la DI_{50} . Los resultados obtenidos están en concordancia con los obtenidos para la infusión de 5 días de 5-FU.

La línea HT29-5FUR no muestra un patrón de resistencia cruzada a Oxaliplatino para ninguna de las fracciones de inhibición ($p=0.25$; test t-Student) cuando se compara con la respectiva línea sensible HT29 (*figura 17*). Las diferencias de toxicidad para Topotecán entre HT29 y HT29-5FUR tampoco son estadísticamente significativas ($p=0.33$; test t-Student) (*figura 17*).

La línea LoVo-5FUR tampoco presenta resistencia cruzada al Oxaliplatino ($p>0.05$) cuando se compara con su homóloga sensible (*figura 18*). Se observa además que las líneas LoVo/LoVo-5FUR mostraron una mayor sensibilidad a Oxaliplatino (DI_{50} 7.38 y 8.37 μ M, respectivamente) que las líneas HT29/HT29-5FUR (DI_{50} 40 y 52 μ M, respectivamente). Sin embargo, la línea LoVo-5FUR muestra una menor sensibilidad al Topotecán que su correspondiente pareja sensible, requiriendo aproximadamente el doble de la dosis de este fármaco para conseguir las mismas fracciones de inhibición del crecimiento por exposición a 24 horas (300nM en la línea LoVo frente a 621.14nM en la línea LoVo-5FUR para la DI_{50}) (*figura 18*). Esta ligera resistencia cruzada a Topotecán muestra significación estadística ($p=<0.0001$; test t-Student) y se repite para otros inhibidores de la Topoisomerasa I como CPT-11 ($p=0.009$; test t-Student) y su metabolito activo SN38 ($p<0.001$, test t-Student) (*tabla 6*).

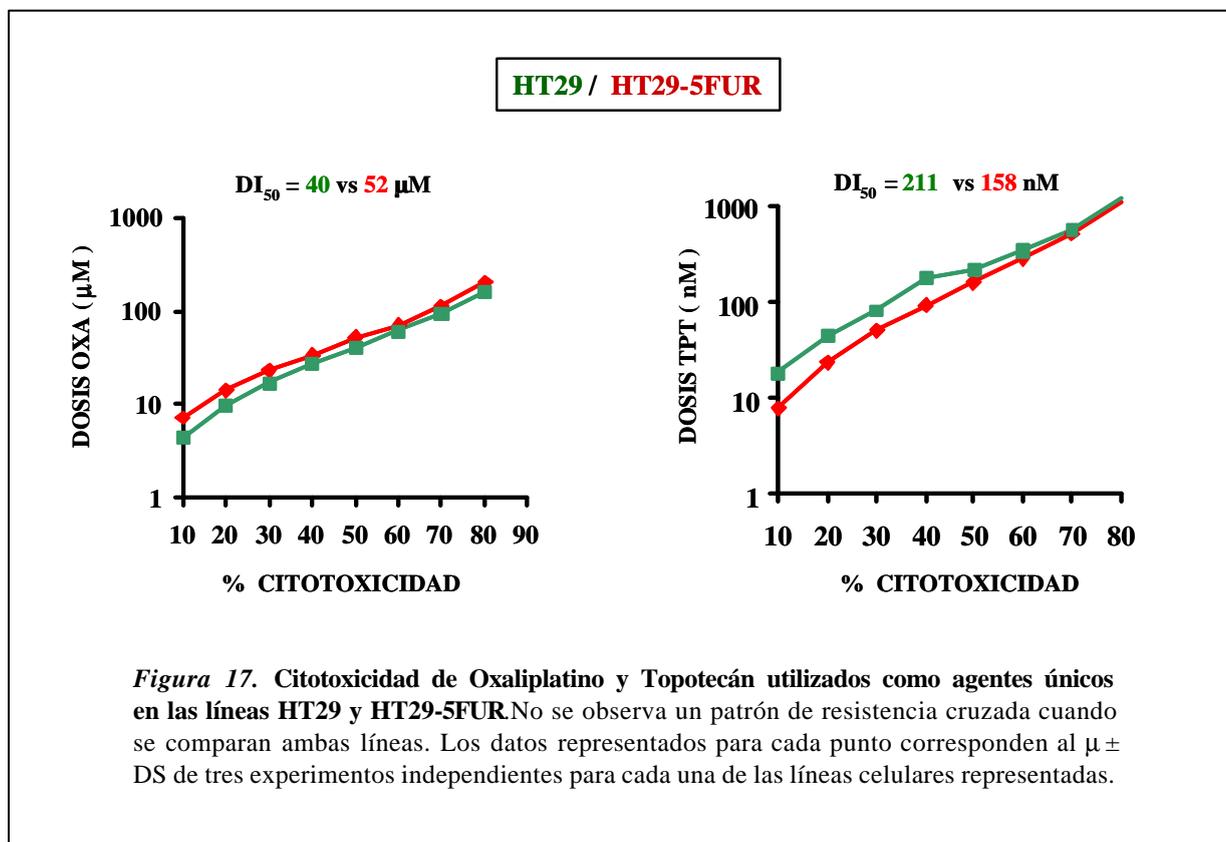
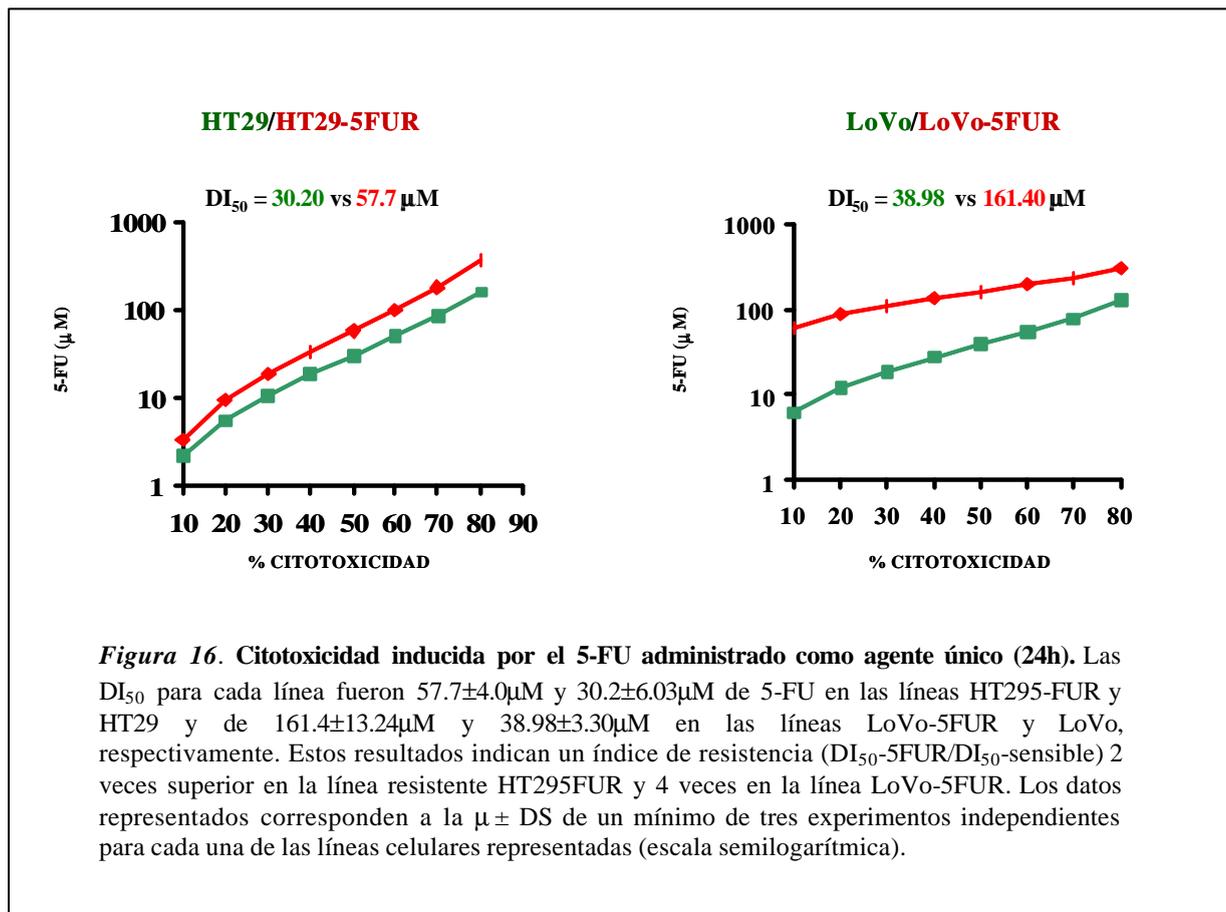
Atendiendo al objetivo de analizar si el estado de p53 o del fenotipo RER influyen en la sensibilidad de las líneas colorrectales a TPT, OXA y 5-FU, se incluyeron en este análisis las líneas DLD-1 y LS-513, que completan el fenotipo/genotipo RER/p53. En la *tabla 2*, se muestran los resultados de citotoxicidad obtenidos por estas líneas. Se

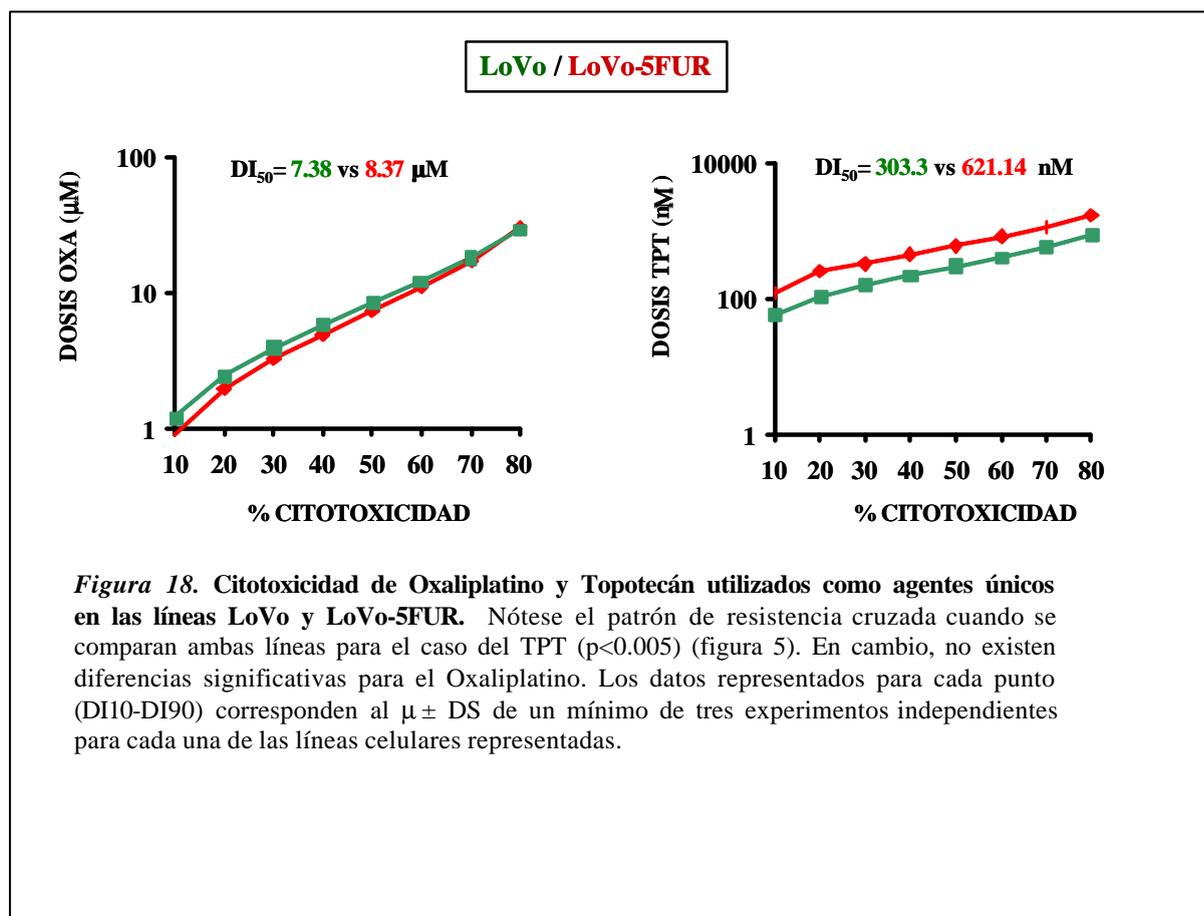
observa una diferencia marcada en la sensibilidad de estas dos líneas a los distintos fármacos. Así por ejemplo, la línea LS-513 es hasta 50 veces más sensible a Oxaliplatino que las líneas HT29 y HT29-5FUR ($DI_{50} = 0.94\mu\text{M}$ versus $39.67\mu\text{M}$ y $52.28\mu\text{M}$ para las líneas HT29 y HT29-5FUR, respectivamente) y entre 10 y 20 veces más sensibles a 5-FU y TPT que las líneas HT29 y LoVo. Sin embargo, observando la totalidad de los datos no podemos atribuir las diferencias existentes al estado de p53 (mutado en el caso de las líneas HT29, HT29-5FUR y DLD-1 y *wild-type* para LoVo, LoVo-5FUR y LS-513) o a deficiencias en el sistema reparador de apareamientos incorrectos (las líneas LoVo, LoVo-5FUR y DLD-1 son fenotipo RER+), puesto que no existe una tendencia clara que asocie una mayor o menor sensibilidad a estos fármacos con alguna de estas características.

Globalmente, se observa que tanto TPT como Oxaliplatino administrados individualmente mostraron actividad tanto en líneas sensibles como en líneas resistentes a 5-FU. Además esta actividad es independiente del estado de p53 o de las deficiencias en el sistema MMR (fenotipo RER+).

5-FU	HT29	HT29-5FUR	LoVo	LoVo-5FUR	DLD-1	LS513
DI90	498.92 ± 235.3	3687.0 ± 738.8	254.16 ± 38.70	441.50 ± 67.60	51.55 ± 6.85	194.12 ± 48.57
DI80	162.07 ± 63.10	791.40 ± 89.10	126.85 ± 12.97	304.40 ± 38.50	20.00 ± 0.56	42.48 ± 7.44
DI70	87.20 ± 24.90	285.40 ± 18.80	78.40 ± 7.55	237.80 ± 25.90	10.77 ± 0.95	15.52 ± 1.99
DI60	50.04 ± 11.50	123.90 ± 6.80	53.87 ± 5.60	194.26 ± 18.40	6.43 ± 0.91	6.83 ± 0.67
DI50	30.20 ± 6.03	57.70 ± 4.40	38.98 ± 3.30	161.40 ± 13.24	4.12 ± 0.89	3.22 ± 0.25
DI40	18.30 ± 3.80	26.90 ± 2.98	27.60 ± 2.80	134.07 ± 9.31	2.62 ± 0.73	1.52 ± 0.15
DI30	10.70 ± 2.80	11.70 ± 1.80	19.04 ± 2.40	109.56 ± 6.18	1.60 ± 0.55	0.67 ± 0.08
DI20	5.60 ± 2.00	4.30 ± 0.87	12.08 ± 1.90	85.68 ± 3.58	0.89 ± 0.37	0.25 ± 0.04
DI10	2.20 ± 1.20	0.94 ± 0.25	6.11 ± 1.30	59.20 ± 1.57	0.37 ± 0.19	0.06 ± 0.01
TPT	HT29	HT29-5FUR	LoVo	LoVo-5FUR	DLD-1	LS513
DI90	2538.5 ± 920.0	2755.4 ± 920.0	1682.1 ± 325.7	3321.1 ± 1069.8	89.10 ± 14.64	139.93 ± 22.20
DI80	1011.40 ± 340.0	967.80 ± 132.00	888.26 ± 122.60	1776.8 ± 374.0	44.93 ± 7.91	65.49 ± 7.13
DI70	550.00 ± 183.00	483.40 ± 59.20	583.34 ± 72.20	1192.6 ± 186.2	28.51 ± 5.31	39.58 ± 2.95
DI60	334.10 ± 112.90	273.84 ± 32.75	414.36 ± 55.00	842.70 ± 67.15	19.65 ± 3.86	26.19 ± 1.27
DI50	211.90 ± 73.90	162.65 ± 20.14	303.30 ± 47.20	621.14 ± 19.70	13.97 ± 2.89	17.95 ± .48
DI40	173.20 ± 70.30	96.65 ± 12.90	222.47 ± 41.80	458.68 ± 16.60	9.92 ± 2.22	12.32 ± 0.31
DI30	82.09 ± 32.00	54.84 ± 8.20	159.03 ± 36.40	330.30 ± 28.90	6.85 ± 1.58	8.16 ± 0.38
DI20	45.09 ± 19.20	27.50 ± 4.80	105.90 ± 30.20	259.80 ± 32.70	4.35 ± 1.07	4.93 ± 0.42
DI10	18.30 ± 8.90	9.75 ± 2.08	57.80 ± 21.60	122.74 ± 30.25	2.20 ± 0.60	2.33 ± 0.32
OXA	HT29	HT29-5FUR	LoVo	LoVo-5FUR	DLD-1	LS513
DI90	365.60 ± 76.99	598.40 ± 188.20	68.44 ± 22.2	60.16 ± 9.70	121.66 ± 13.55	26.98 ± 5.36
DI80	160.70 ± 41.50	241.88 ± 54.10	29.50 ± 5.07	28.97 ± 5.09	51.24 ± 4.89	7.80 ± 1.15
DI70	93.20 ± 27.10	133.00 ± 21.05	17.10 ± 2.11	17.86 ± 3.44	28.93 ± 3.46	3.42 ± 0.40
DI60	59.70 ± 19.00	81.63 ± 8.33	11.01 ± 1.58	12.03 ± 2.50	18.16 ± 2.81	1.75 ± 0.16
DI50	39.67 ± 13.70	52.28 ± 2.55	7.38 ± 1.40	8.37 ± 1.90	11.86 ± 2.29	0.94 ± 0.08
DI40	26.35 ± 9.85	33.55 ± 0.33	4.96 ± 1.20	5.80 ± 1.40	7.76 ± 1.83	0.51 ± 0.04
DI30	16.90 ± 6.80	20.70 ± 1.44	3.25 ± 0.97	3.93 ± 1.04	4.9 ± 1.40	0.26 ± 0.02
DI20	9.87 ± 4.30	11.57 ± 1.70	1.94 ± 0.72	2.42 ± 0.70	2.81 ± 0.98	0.12 ± 0.01
DI10	4.30 ± 2.16	4.85 ± 1.30	0.90 ± 0.42	1.19 ± 0.40	1.34 ± 0.55	0.03 ± 0.01

Tabla 5. Dosis individuales de cada uno de los fármacos para las distintas fracciones de Inhibición (10%-90%): 5-FU (μM); Topotecán, TPT (nM); Oxaliplatino, OXA (μM).





Drogas	DI_{50} ($\mu \pm SD$)		
	LoVo	LoVo-5FUR	GR ^c
TPT	303.3 ± 47.2	621.14 ± 19.7	2.05 ^a
CPT-11	34.52 ± 1.4	89.3 ± 15.6	2.58 ^b
SN38	104.07 ± 32.2	399.3 ± 54.9	3.84 ^b

^a $p < 0.005$ y ^b $p < 0.001$ (test t-Student); TPT: Topotecán; CPT-11: Irinotecán.; ^cGrado de resistencia calculado como DI_{50} -resistente/ DI_{50} -sensible

Tabla 6. Sensibilidad de las líneas celulares LoVo y LoVo-5FUR a diferentes inhibidores de Topoisomerasa I. El tiempo de exposición a estos agentes fue de 24h. La viabilidad celular se determinó por ensayo colorimétrico con MTT. La línea celular LoVo-5FUR muestra un patrón de resistencia cruzada a los diferentes inhibidores de la Topoisomerasa I ($p < 0.005$ para TPT y $p < 0.001$ para CPT-11 y SN38) cuando se compara con la correspondiente línea parental.

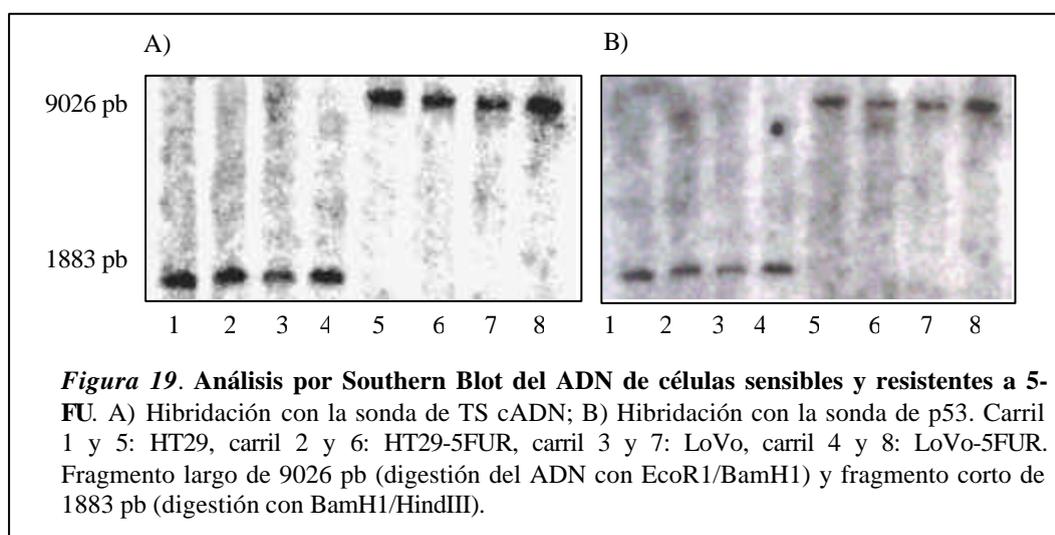
5.1.5. Análisis de la expresión de Timidilato Sintasa en las parejas sensible/resistente a 5-Fluorouracilo

Con objeto de explicar el fenotipo de resistencia a 5-FU observado en las líneas celulares HT29-5FUR y LoVo-5FUR cuando se comparan con sus homólogas sensibles (HT29 y LoVo), nos propusimos analizar los cambios en la diana terapéutica del 5-FU, la *Timidilato Sintasa*, ya que estudios previos *in vitro* e *in vivo* demuestran que los niveles de TS están directamente relacionados con la respuesta a 5-FU.

5.1.5.1. Análisis de la amplificación génica de Timidilato Sintasa mediante técnica de Southern Blot

En primer lugar se analizó si el fenotipo de resistencia observada se asociaba a un proceso de amplificación génica en estas líneas resistentes, ya que el incremento en el número de copias del gen se ha asociado *in vitro* con una mayor expresión del gen y un aumento de los niveles de la enzima.

Tal y como se muestra en la *figura 19*, después del análisis densitométrico y una vez normalizadas las bandas, no se observó amplificación génica de TS cuando se compararon las líneas resistentes con las correspondientes líneas sensibles. Estos datos correlacionan con los observados por técnica de CGH, que tampoco identificó ganancias en la zona del cromosoma 18p (donde se localiza la TS) tal y como veremos más adelante.



5.1.5.2. Análisis de la expresión de Timidilato Sintasa a nivel de ARNm mediante técnica de Northern Blot.

En este apartado se analizó si el fenotipo de resistencia a 5-FU observado en las líneas HT29-5FUR y LoVo-5FUR, se explica por una sobreexpresión de TS (ARNm).

El análisis por Northern Blot se llevó a cabo en las parejas sensible/resistente en presencia o ausencia de 5-FU administrado durante 5 días a las dosis inhibitorias a las que se indujo la resistencia al fármaco (2 μ M y 7 μ M para HT29-5FUR y LoVo-5FUR, respectivamente).

En **ausencia de 5-FU**, se observó que la línea HT29-5FUR expresaba aproximadamente el doble de cantidad de TS que la línea parental HT29 (*figura 21*). Esta sobreexpresión correlaciona con los datos de citotoxicidad a 5-FU obtenidos para la exposición de 5 días y explica la diferente sensibilidad que presenta esta línea al 5-FU (las dosis inhibitorias para cualquier fracción de inhibición - DI_f - siempre fueron superiores en la línea HT29-5FUR en relación a la línea HT29).

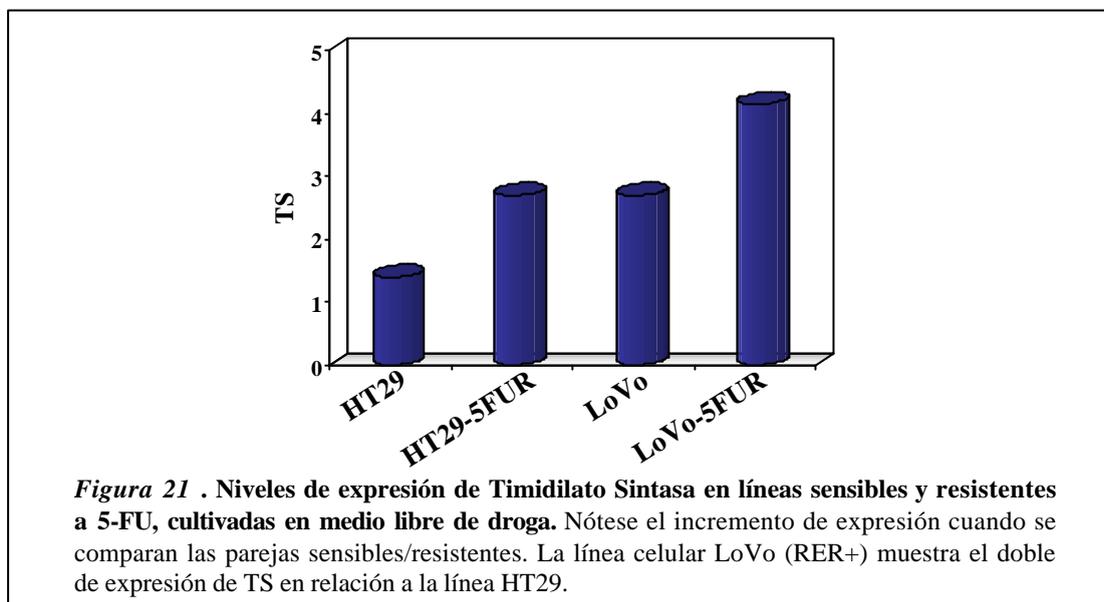
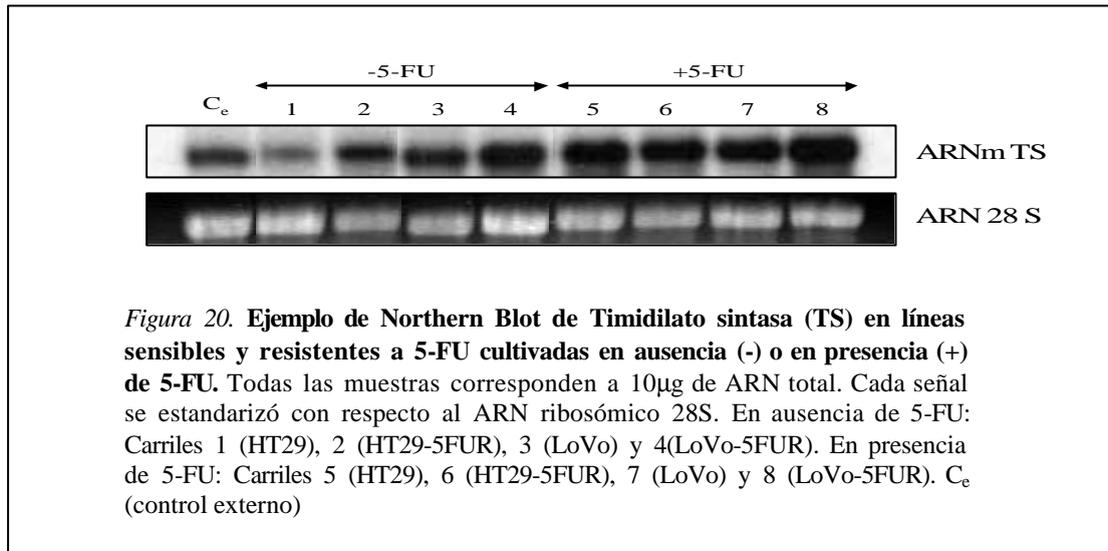
La línea celular LoVo-5FUR también expresó una mayor cantidad de TS (aproximadamente 1,5 veces) que su homóloga sensible LoVo en ausencia de 5-FU (*figura 21*). Esta sobreexpresión correlaciona con la citotoxicidad del fármaco administrado como agente único (las dosis inhibitorias para cualquier fracción de inhibición - DI_f - siempre fueron superiores en la línea LoVo-5FUR en relación a la línea LoVo) y explica el fenotipo de resistencia a 5-FU observado en esta línea cuando se compara con su homóloga sensible LoVo.

Por otro lado, tal y como muestra la *figura 21*, se observó que a nivel basal (en ausencia de 5-FU) la línea LoVo expresaba aproximadamente el doble de TS que la línea HT29. Este dato correlaciona con: a) la diferencia de dosis requerida para inducir la resistencia a 5-FU (recordar que dosis inferiores a 5 μ M no inducían citotoxicidad celular en la línea LoVo, *apartado 5.11*); y b) con la diferencia en la dosis de 5-FU requerida como agente único (5-días de exposición) en estas líneas (superior para cualquier fracción de inhibición en la línea LoVo respecto a la línea HT29). Por otro

lado, la mayor expresión de TS en la línea LoVo podría estar relacionada con los defectos de esta línea en el sistema reparador del ADN (fenotipo RER+), ya que estudios previos en la literatura sugieren que las líneas con fenotipo RER+ expresan mayor cantidad de TS. Tal y como se observa en el *figura 21*, los niveles de expresión de TS en ausencia de 5-FU en las líneas LoVo/LoVo-5FUR (RER+) fueron superiores a los niveles de expresión de las líneas HT29/HT29-5FUR (RER-). Este incremento en los niveles de TS correlaciona con una menor sensibilidad de las líneas RER+ al 5-FU (DI_{50} 13.65 y 41.71 μ M para LoVo y LoVo-5FUR respectivamente, *versus* 4.8 y 27.2 μ M para HT29 y HT29-5FUR para la exposición a 5 días de 5-FU).

En **presencia de 5-FU** también se observó un incremento en los niveles de expresión de TS en todas las líneas celulares utilizadas (sensibles y resistentes). Esta sobreexpresión se explica como la respuesta celular para evadir la presión ejercida por el 5-FU.

Globalmente, se observa un incremento en los niveles de expresión de ARNm de TS en las líneas celulares resistentes (HT29-5FUR y LoVo-5FUR) cuando se comparan con las correspondientes líneas sensibles (HT29 y LoVo). Esta sobreexpresión es por tanto, una característica estable de estas líneas celulares HT29-5FUR y LoVo-5FUR producto de la selección de clones resistentes tras la exposición continuada a 5-FU. El incremento en los niveles de expresión correlaciona con las diferencias en la sensibilidad de ambas líneas (HT29-5FUR y LoVo-5FUR) al fármaco. La sobreexpresión de TS no puede atribuirse a una amplificación génica tal y como se deduce de los resultados obtenidos por Southern Blot.



5.1.5.3. Análisis de los niveles de la proteína Timidilato Sintasa mediante técnica de Western Blot

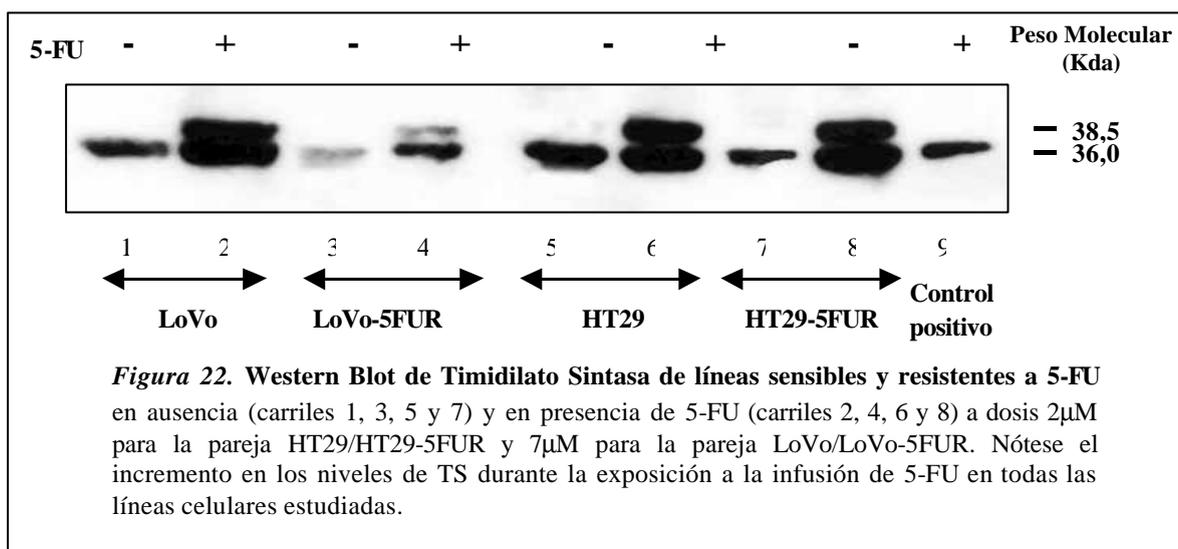
Después de analizar la expresión del ARNm, se analizaron los niveles de TS (proteína) con objeto de determinar: a) si existía una correlación entre los niveles proteicos y el fenotipo de resistencia a 5-FU observado en las líneas HT29-5FUR y LoVo-5FUR y, b) si el incremento observado a nivel de ARNm se traducía en un incremento en los niveles enzimáticos.

En **ausencia de 5-FU**, (*figura 22: carriles -*) las líneas resistentes (HT29-5FUR y LoVo-5FUR) presentaban niveles proteicos inferiores (*carriles 3 y 7*) a sus homólogas sensibles (*carriles 1 y 5*). Este patrón de expresión proteica no correlacionó con la sobreexpresión observada a nivel de ARNm en estas líneas en ausencia de 5-FU (apartado anterior). Esta discordancia entre los niveles proteicos y de expresión podría estar relacionada con características propias de las líneas resistentes como: a) una menor tasa de crecimiento en comparación a la de sus homólogas sensibles (tiempos de duplicación de 22-24h en HT29 frente a 30-32h para HT29-5FUR y 26-28h en la línea LoVo *versus* 32-34h en la línea LoVo-5FUR); o bien, b) una mayor capacidad de TS en estas líneas para regular su traducción. Estas discordancias sugieren además, la existencia de otros mecanismos de resistencia a 5-FU en las líneas resistentes, tal y como veremos posteriormente en el análisis por CGH.

La línea LoVo presentó a nivel basal (en ausencia de 5-FU) mayor cantidad de proteína TS que la línea HT29 (si tenemos en cuenta que la cantidad total de proteína cargada en los carriles es de 30 μg en LoVo/LoVo-5FUR y de 40 μg en HT29/HT29-5FUR), dato que está en concordancia con los niveles de expresión del ARNm que observábamos en el apartado anterior y con la diferencia en la sensibilidad de estas líneas celulares a 5-FU (la dosis requerida del fármaco administrado como agente único -5 días de exposición- siempre fue superior para cualquier fracción de inhibición en la línea LoVo respecto a la línea HT29).

En **presencia de 5-FU** (*figura 22, carriles +*) se observó tanto en las líneas sensibles como en las resistentes, la aparición de una segunda banda de peso molecular 38,5 KDa que corresponde a la enzima TS ligada formando el complejo ternario de inhibición (ligada a FdUMP y el donador de grupos metilo).

La línea HT29-5FUR presentó niveles superiores a los de su homóloga sensible HT29, mientras que los niveles enzimáticos en la línea LoVo-5FUR siempre se mantuvieron inferiores a los de la línea LoVo, tanto en presencia como en ausencia de 5-FU. La cantidad de TS en esta línea celular no correlacionó con la sobreexpresión de ARNm observada (mayor expresión en LoVo-5FUR en relación a LoVo) ni con la sensibilidad de la línea al 5-FU (las dosis inhibitorias en la línea LoVo-5FUR siempre fueron superiores a las de la línea LoVo).



Si analizamos el **incremento de TS** expresado como el cociente entre los niveles de TS en presencia de 5-FU (+) respecto a los niveles de TS en ausencia de 5-FU (-) para cada una de las líneas celulares estudiadas (*Tabla 7*) se observa:

1. Un incremento en los niveles proteicos totales de TS en presencia de 5-FU en todas las líneas celulares, sensibles y resistentes que correlaciona con la sobreexpresión del ARNm y que se explica como la respuesta celular al 5-FU.
2. El incremento de TS (*ver tabla 7*) en las líneas resistentes es mayor (aproximadamente 1,7 veces) que el observado en sus homólogas sensibles y correlaciona con un aumento en la cantidad de TS libre en las líneas resistentes (efecto muy notorio para el caso de la línea LoVo-5FUR).
3. Estos resultados indican que cuando en el medio se halla presente el 5-FU, estas líneas celulares resistentes (HT29-5FUR y LoVo-5FUR) soportan una mayor traducción, contrarrestando así el efecto del fármaco.

	$\frac{HT29+5-FU}{HT29}$	$\frac{HT29-5FUR+5-FU}{HT29-5FUR}$	$\frac{LoVo+5-FU}{LoVo}$	$\frac{LoVo-5FUR+5-FU}{LoVo-5FUR}$
Incremento TS total	2.56±0.7	4.50±1.5	4.27±1.6	6.90±2.0

Tabla 7. Valores del incremento de proteína total TS (libre y ligada formando el complejo ternario de inhibición) calculado como el ratio de la cantidad total de proteína TS en presencia de 5-FU (a la dosis correspondiente 2µM en HT29/HT29-5FUR y 7µM en LoVo/LoVo-5FUR) respecto a la cantidad total de proteína TS en ausencia de este agente. Los datos corresponden a la $\mu\pm DS$ de dos experimentos independientes. Nótese que el incremento de TS en las líneas resistentes es superior al observado en sus homólogos sensibles.

5.1.6. Análisis de Hibridación Genómica Comparativo (CGH)*

En el presente estudio experimental, también hemos intentado caracterizar los cambios inducidos en el genotipo de las líneas resistentes que pueden estar contribuyendo al fenotipo de resistencia observado en las mismas

Para ello analizamos mediante técnica de **Hibridación, Genómica Comparativa* (CGH; ver Material y métodos)** las variaciones por ganancias/pérdidas de material genético entre las líneas sensibles y resistentes a 5-FU, que detallamos a continuación (en las *figuras anexas 23 y 24*, se muestra un ejemplo de cada análisis para las parejas sensible/resistente).

En estos análisis, si bien se han detectado algunas otras pérdidas/ganancias de regiones cromosómicas concretas a parte de las que aparecen en la *tabla 8*, sólo se han contabilizado como pérdidas o ganancias, aquellas 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. Así por ejemplo, se enfrentan primero el ADN-HT29 marcado con fluorescencia roja *versus* ADN-HT29-5FUR marcado con fluorescencia verde, y se repite el análisis enfrentando ahora el ADN-HT29 marcado con fluorescencia verde *versus* ADN-HT29-5FUR marcado con fluorescencia roja,

*Este análisis se llevó a cabo en colaboración con el laboratorio del Dr. HL. McLeod (*Department of Medicine, Division of Oncology of Washington University School of Medicine, St. Louis, USA*) y el Dr. PH Rooney (*Department of Medicine and Therapeutics of Institute of Medical Sciences University of Aberdeen, UK*).

contabilizándose como positivas las ganancias/pérdidas coincidentes en ambos análisis.

El análisis por CGH (tal y como muestra la *tabla 8*) identificó nuevas regiones de ganancias (5p, 6, 7p, 7q, 8q Y 12q) y pérdidas (3q) cromosómicas en las líneas resistentes, que podrían estar potencialmente implicadas en la resistencia a 5-FU de estas líneas. Se observa que la línea deficiente en el sistema reparador (LoVo-5FUR) acumuló un mayor número de ganancias que podría indicar un incremento en el *ratio* de alteraciones (debido precisamente a un defecto en la reparación) que podrían estar confiriendo a estas células resistentes a 5-FU una ventaja selectiva en el crecimiento permitiendo su predominio dentro de la población tumoral refractaria.

En la *tabla 9* se muestran algunos de los genes que mapan sobre las regiones de ganancias/pérdidas detectadas en estas líneas resistentes (tras realizar una búsqueda en las bases de datos del genoma humano) y que podrían estar directamente relacionadas con la resistencia a 5-FU.

Entre las regiones de ganancia cabe señalar la alteración que presentan ambas líneas resistentes, HT29-5FUR y LoVo-5FUR, en el cromosoma 5p, lo que sugiere la existencia de uno o varios genes directamente implicados en la adaptación de estas líneas a 5-FU. Entre los diferentes *loci* que mapan en este cromosoma se hallan entre otros el gen NHE3 (Sodium/H⁺ Exchanger 3) localizado en el cromosoma 5p15.3 que está implicado en el mantenimiento de la homeostasis celular, los factores TRF4 y TRF5 (*Topoisomerase related factors*) involucrados en la reparación de los errores de las Topoisomerasas y cuya sobreexpresión parece estar relacionada con la resistencia a inhibidores de la Topoisomerasa I como la camptotecina y el CPT-11, la Uracil-DNA-Glicosilasa 4 (UDGasa 4) encargada de eliminar el Uracilo del ADN y cuya sobreexpresión igual que otros miembros de la familia UDG, podría estar relacionada directamente con la resistencia a 5-FU.

	GANANCIAS	PÉRDIDAS
HT29-5FUR	5p15.3 6 (brazo entero) 13q14.1-centrómero	3q12-qter
LoVo-5FUR	5p 7p15.2 7q31.3-35 8q22-24.2 12q14-24.1	-----

Tabla 8. Análisis por hibridación genómica comparativa (CGH). Se muestra un resumen de las ganancias y/o pérdidas de material cromosómico observadas después de enfrentar el ADN de las líneas resistentes con el ADN de las correspondientes líneas sensibles. No se observó ninguna pérdida en la línea LoVo-5FUR.

Referente a las pérdidas de material genético sólo se observó una pérdida en la línea HT29-5FUR en la zona q3q12-qter. Entre los diferentes *loci* que mapan en esta zona cromosómica se halla el gen MRP2 (también denominado c-MOAT) que pertenece a la familia de transportadores de membrana dependientes de ATP (*ABC-transporters*) y cuya sobreexpresión se ha relacionado con fenómenos de resistencia a inhibidores de Topoisomerasa I. *A priori* se desconoce la relevancia de la pérdida de este transportador de membrana.

En el análisis por CGH también se observó que las líneas resistentes a 5-FU (HT29-5FUR y LoVo-5FUR) no presentaron una ganancia en la zona del cromosoma 18p11.32, donde se localiza el gen de la TS, cuando se compararon con sus correspondientes líneas parentales HT29 y LoVo, resultado que coincide con el observado ya por Southern Blot. Tampoco se observaron ganancias en otras zonas como, por ejemplo, el cromosoma 18 donde se localiza el gen de la Topoisomerasa I (enzima diana de los inhibidores de Topoisomerasa I, utilizados también en nuestro diseño experimental) o el cromosoma 17q donde se localiza el gen p53. Sin embargo, el estudio de los genes implicados en estas zonas de ganancias pueden dar una idea de los mecanismos involucrados en la resistencia a 5-FU en nuestras líneas celulares.

Cromosoma	
5p	NHE3, TRF4 y TRF5, UDG4
6	MRP7
7p15.2	Sp4, AHR, GPNMB
7q31.3-35	IRF5, GCS1L
8q22-24.2	c-Myc, ENPP2, TRC8
12q14-24.1	NUP10, MDM1, GPR49
13q14.1-centrómero	Rb, DNAJ protein
3q12-qter	c-MOAT, MRC-OX2

Tabla 9. Algunos de los genes que mapan en las distintas zonas de ganancias o pérdidas detectadas en las líneas resistentes HT29-5FUR y LoVo-5FUR.

NHE3: sodium/H⁺ exchanger 3; TRF: Topoisomerase-related factors, UDG: uracil-DNA-glicosylase; MRP7: multidrug-resistance protein 7; AHR: aryl-hidrocarbon receptor; Rb: retinoblastoma; Sp4: SP-family transcription factor 4; IRF5: interferon receptor 5; ENPP2: Endonucleotide phosphodiesterase 2; NUP-10: nucleo-citoplasmic protein 10; GPR49: Gprotein-coupled receptor; Rb: Retinoblastoma; c-Moat: Organic Anionic Transporter.

Globalmente, se observa que la adaptación de las líneas resistentes al 5-FU utilizadas en este estudio está mediada por la acumulación de aberraciones cromosómicas (mayoritariamente ganancias, ya que sólo se detectó una pérdida) que pueden estar contribuyendo a la aparición de la resistencia a 5-FU.

5.1.7. Estado del fenotipo de errores de replicación (RER+)

Atendiendo al objetivo de analizar si la actividad del Oxaliplatino, Topotecán y 5-FU administrados como agentes únicos o en combinación es independiente del estado de los genes reparadores o *DNA-mismatch repair genes* responsables del fenotipo de errores de replicación, RER+, hemos corroborado experimentalmente que tras la inducción de resistencia a 5-FU no se había seleccionado ninguna población RER+ en el caso de las células HT29 (inicialmente RER-), y que no habían variado los patrones de inestabilidad para la línea LoVo (RER+).

Para ello, se analizó el patrón de inestabilidad de microsatélites, ya que la variación en la longitud de estas secuencias no codificantes del genoma (microsatélites) es un indicador del fenotipo RER+.

En este análisis se observó que la línea HT29-5FUR, al igual que la correspondiente línea parental, no presentaba inestabilidad en ninguno de los marcadores analizados, y que la línea LoVo-5FUR presentaba el mismo patrón que la línea parental LoVo (RER+) en los distintos marcadores. Tal y como puede observarse en la *figura 25 adjunta*, en las líneas LoVo/LoVo-5FUR no se obtuvo la señal del marcador BAT-26 que mapa sobre la zona intrónica del exón 5 del gen hMSH2, ya que la línea celular LoVo presenta una delección del exón 5 al 8 de este gen (*Liu B y col, 1995*).

5.1.8. Análisis mutacional del gen p53 por secuenciación automática

Con el mismo objetivo que en el apartado anterior, se secuenció el gen p53 para comprobar que no se seleccionaban variantes celulares LoVo p53 mutadas en la inducción de la resistencia, y en segundo término, demostrar si HT29 mantenía el mismo genotipo (ya que esta línea celular presenta una mutación descrita en el codón 273 del exón 8, un cambio de una G→ A (cambio de Arginina → Histidina), tal y como puede observarse en la *figura 26*) y no acumulaba otras mutaciones.

Se analizaron las secuencias de los exones 5, 6, 7 y 8 del gen p53 en las parejas sensible/resistente ya que en estas zonas se localizan más del 80% de las mutaciones descritas para este gen. Las secuencias obtenidas por este método confirmaron que no existen cambios entre las líneas sensibles y resistentes a 5-FU. Las líneas resistentes tal y como se muestra en la *figura 26*, mantuvieron el mismo genotipo que las correspondientes líneas parentales (HT29 y LoVo), salvaje para el caso de LoVo-5FUR y mutado en el exón 8 para el caso de HT29-5FUR.

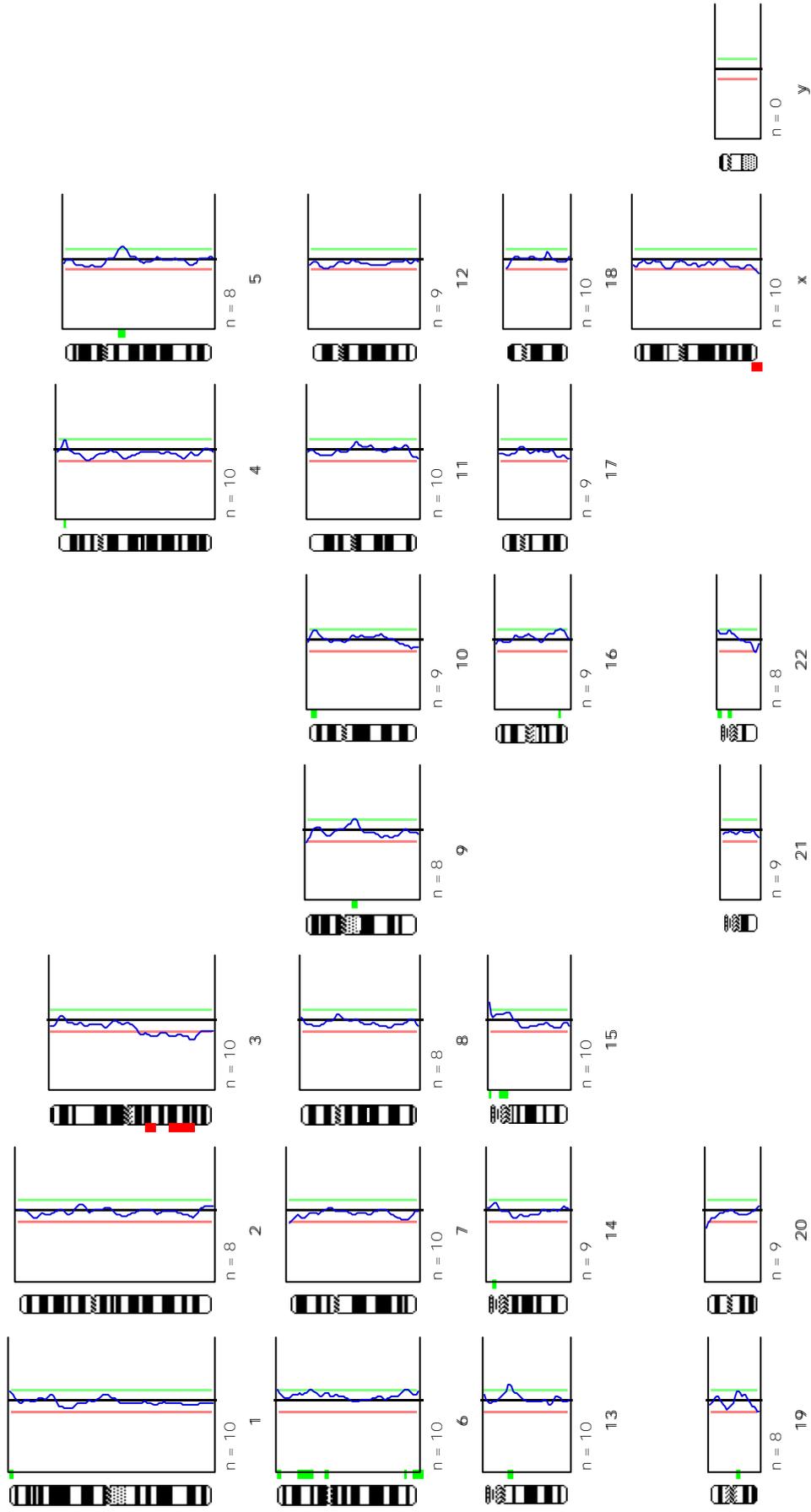


Figura 23. Análisis por CGH de las células HT29 vs HT29-5FUR. Las regiones de ganancia de material genético se muestran a la derecha de las figuras en verde y las regiones de pérdidas de material en rojo a la izquierda (n= número de cromosomas metafásicos analizados)

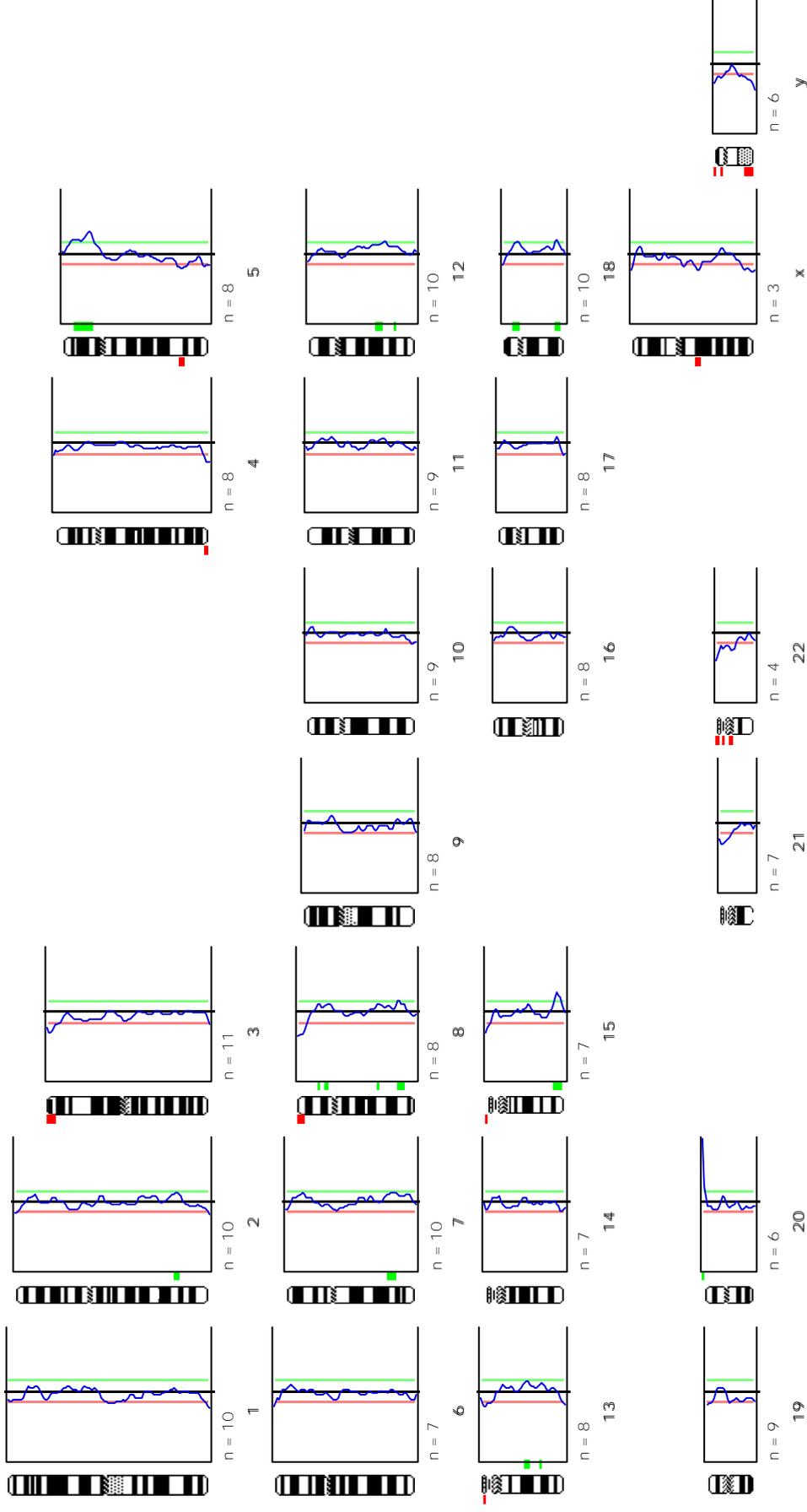


Figura 24 Análisis por CGH de las células LoVo vs LoVo-5FUR. Las regiones de ganancia de material genético se muestran a la derecha de las figuras en verde y las regiones de pérdidas de material en rojo a la izquierda (n= número de cromosomas metafásicos analizados)

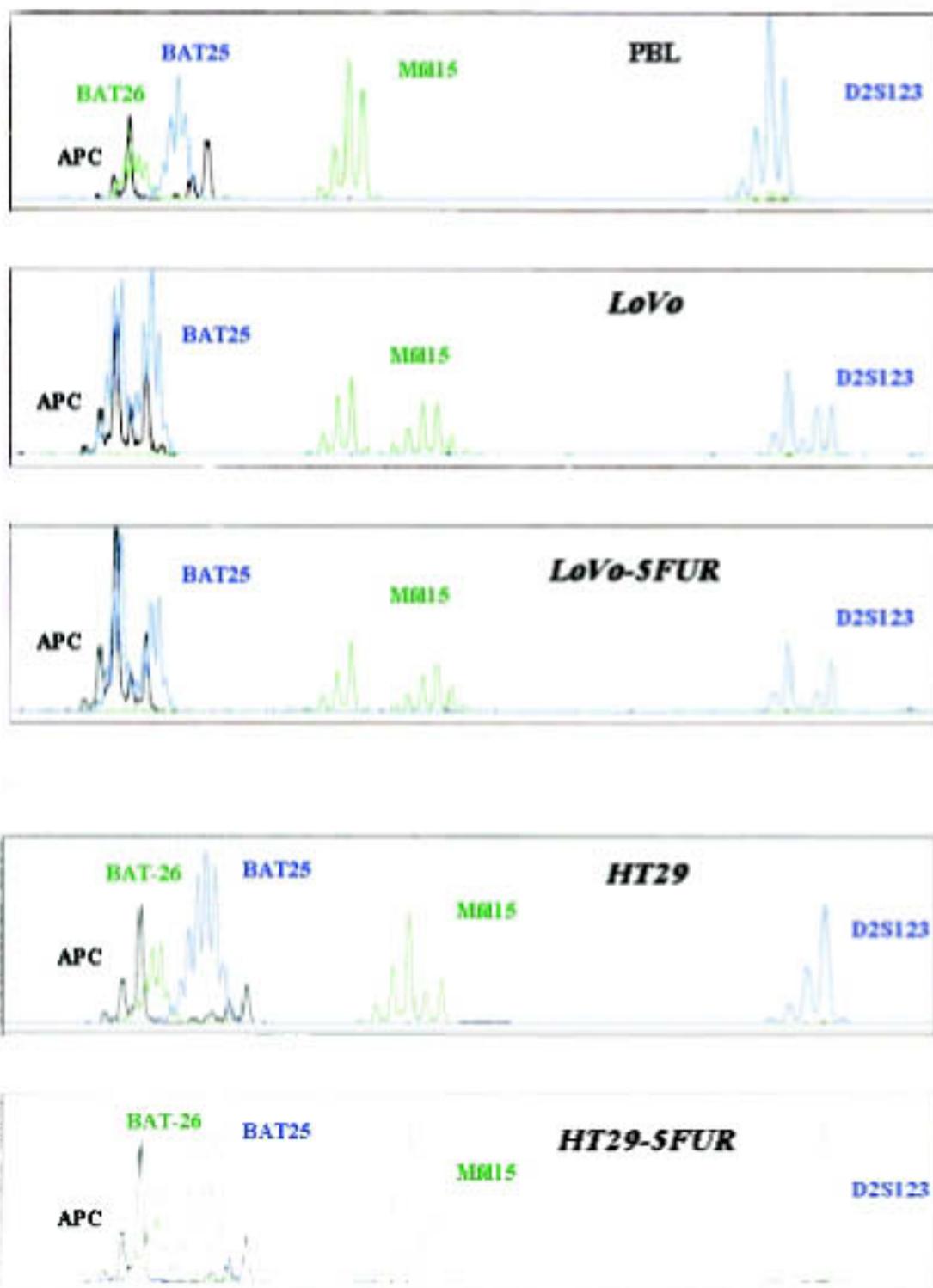
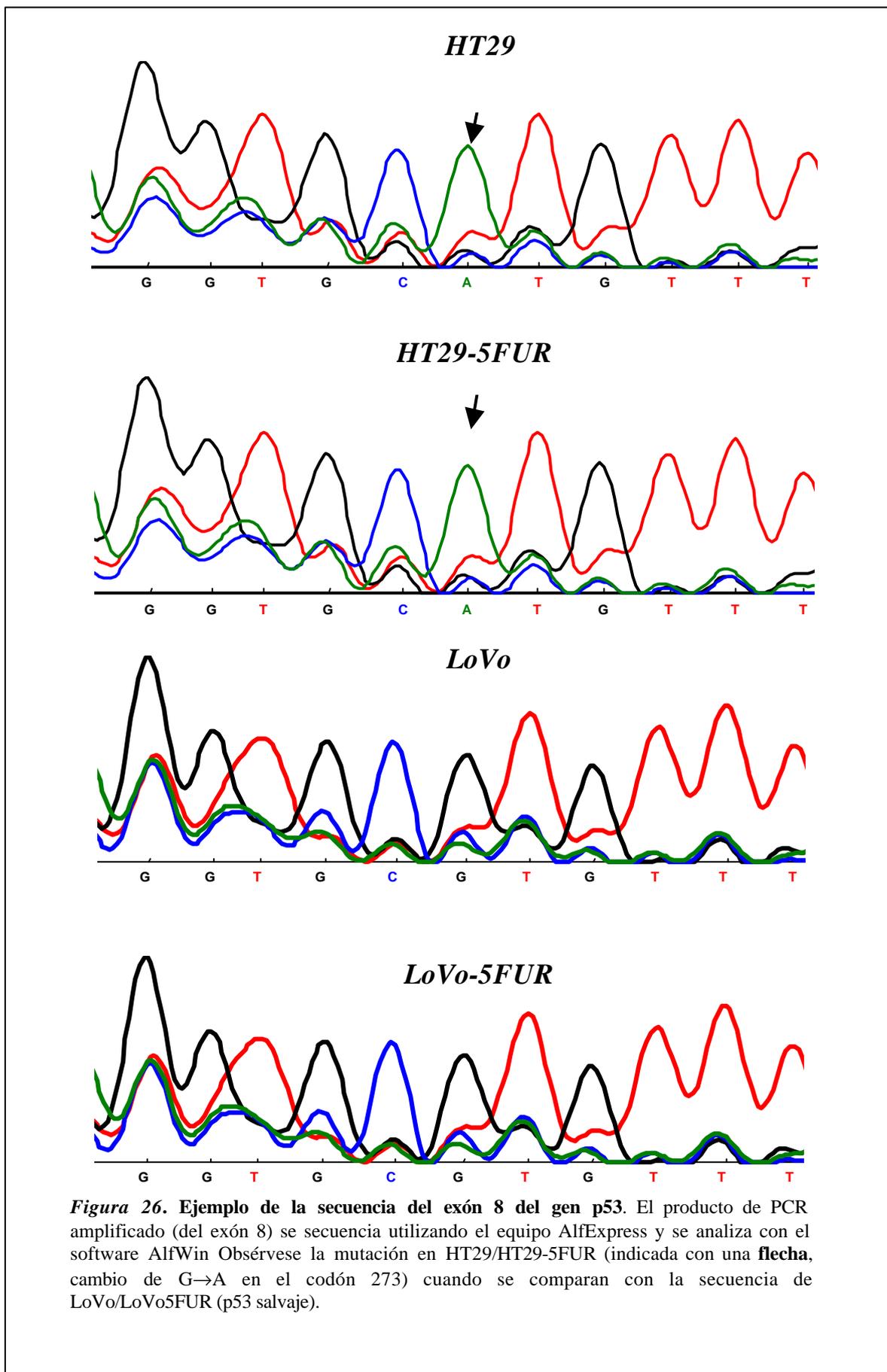


Figura 25. Análisis comparativo de microsatélites en las líneas celulares HT29/HT29-SFUR y LoVo/LoVo-SFUR utilizando el equipo *AbiPrism 310-Perkin Elmer* y el programa de análisis *GenScan Genetic Analyzer*. El ADN de cada línea celular se amplifica en una PCR-multiplex con los cinco juegos de cebadores simultáneamente que corresponden a cada marcador, cada uno con una fluorescencia distinta. Puede observarse como en ningún caso se observa discordancia entre las parejas sensible / resistente.



- *R E S U L T A D O S* -
Resultados Objetivo 2

5.2.1. Asociaciones secuenciales por combinación de Oxaliplatino, 5-Fluorouracilo y Topotecán

En este apartado se analiza el efecto citotóxico *in vitro* de las combinaciones secuenciales de Oxaliplatino, Topotecán (TPT) y 5-FU en líneas de colon sensibles (HT29, LoVo, DLD-1 y LS-513) y resistentes a 5-FU (HT29-5FUR y LoVo-5FUR).

Las combinaciones secuenciales analizadas fueron las siguientes:

- OXA (4h) → 5FU (24h)
- 5FU (24h) → OXA (4h)
- OXA (4h) → TPT (24h)
- TPT (24h) → OXA (4h)

Para ello, se combinaron diferentes proporciones del ratio fijado de las DI_{50} individuales de cada fármaco (ver *tabla 10*) y el análisis de sinergismo/antagonismo se realizó según el método descrito por *Chou y Talalay* (ver *Material y Métodos*).

DI_{50}	HT29	HT29-5FUR	LoVo	LoVo-5FUR	DLD-1	LS-513
5-FU	30.2±6.03	57.7±4.40	38.98±3.30	161.40±13.24	4.12±0.89	3.22±0.25
OXA	39.67±13.70	52.28±2.55	7.38±1.40	8.37±1.90	11.86±2.29	0.94±0.08
TPT	211.90±73.90	162.65±20.14	303.30±47.20	621.14±19.70	13.97±2.89	17.95±0.48

Tabla 10. Dosis inhibitorias del 50% (DI_{50}) para cada uno de los fármacos en todas las líneas celulares utilizadas en el estudio de la citotoxicidad de las combinaciones entre OXA, 5-FU y TPT. Los datos representan la $\mu \pm DS$ de un mínimo de tres experimentos independientes.

Globalmente, tal y como puede observarse en las *figuras 26 y 27* que se adjuntan, se obtuvieron combinaciones sinérgicas (valores del índice de combinación, $CI < 1$) para todos los esquemas de combinación en todas las líneas celulares. Únicamente se observó aditividad y no sinergia en la línea celular LoVo-5FUR en el esquema secuencial 5-FU → OXA para cualquier fracción de inhibición, la línea LS-513 donde se observó antagonismo en la misma asociación cuando se combinaban dosis

medias/bajas de ambos fármacos (OXA y 5-FU), aunque a la dosis inhibitoria del 50% (tal y como puede observarse en la *tabla 10*) el esquema resultó sinérgico (CI = 0.75 ± 0.08) y la línea DLD-1 que mostró aditividad y no sinergia en el esquema secuencial TPT→OXA a dosis medias/altas de ambos fármacos.

Estos resultados confirman por tanto nuestra hipótesis de trabajo inicial, es decir que se pueden obtener esquemas sinérgicos por combinación de estos fármacos, incluso en las líneas resistentes a 5-FU y pese a las diferencias existentes entre las distintas líneas celulares de dosis y toxicidad de los tres fármacos cuando son administrados como agentes únicos, indicando la potencialidad de las secuencias analizadas. Este fenómeno es además independiente del esquema secuencial utilizado.

En el caso de la pareja HT29/HT29-5FUR (*figura 28*) se observó que la adición de Oxaliplatino en el esquema de asociación OXA→5-FU, permitía disminuir la dosis de 5-FU en la línea resistente hasta niveles idénticos a los requeridos por la línea sensible HT29 (p.e., DI_{50} 's 5-FU en la combinación de $7,7 \mu\text{M}$ y $7,1 \mu\text{M}$ para HT29-5FUR y HT29, respectivamente) revirtiendo por tanto, el fenotipo de resistencia a 5-FU observado en la línea HT29-5FUR.

El presente estudio *in vitro* también propone el análisis de la efectividad de la asociación de Oxaliplatino y Topotecán en líneas celulares con resistencia a 5-FU comparándola con la combinación Oxaliplatino/5-FU. Si bien, el Topotecán ha mostrado baja efectividad en el tratamiento del cáncer de colon *in vivo*, por sus características (no necesita metabolización y tampoco muestra toxicidad clínica cruzada con 5-FU ni Oxaliplatino) pensamos que puede convertirse en una nueva alternativa si se utiliza en el esquema adecuado y en combinación. Los datos obtenidos (*tabla 11*) muestran la sinergia de las asociaciones de Oxaliplatino y Topotecán con independencia del fenotipo de resistencia a 5-FU, puesto que la sinergia se observó tanto en líneas sensibles como resistentes a 5-FU. Cabe señalar además la efectividad de estas combinaciones en la línea LoVo-5FUR (un índice de combinación para la fracción de

inhibición del 50% de 0.66 para la combinación TPT→OXA y 0.56 para la combinación OXA→TPT) (figura 26) a pesar de que esta línea mostraba resistencia cruzada a Topotecán cuando se administraba como agente único. La adición de Oxaliplatino en el esquema OXA→TPT en esta línea LoVo-5FUR, permitió disminuir las dosis de Topotecán en la combinación hasta niveles similares a los requeridos por la línea parental sensible (DI_{50} 's TPT = 174.5nM y 102.4nM para LoVo-5FUR y LoVo respectivamente, en la combinación).

Por tanto, la asociación *in vitro* de Topotecán/Oxaliplatino resulta al menos tan efectiva como la combinación Oxaliplatino/5-FU (tabla 11) tanto en líneas sensibles como resistentes a 5-FU.

Otro de los objetivos del presente estudio experimental es demostrar si la actividad de las combinaciones entre Oxaliplatino y 5-FU o TPT es independiente del estado de p53 (mutada o *wild-type*) o de los estados de los genes reparadores de apareamientos erróneos (sistema *MMR*). En general, se observa que todas las combinaciones resultaron efectivas con independencia del fenotipo RER (recordemos que las líneas LoVo, LoVo-5FUR y DLD-1 presentaban deficiencias en los genes del sistema reparador del ADN, fenotipo RER+) y/o del estado de p53 (mutada en las líneas HT29, HT29-5FUR y DLD-1 y *wild-type* en las líneas LoVo, LoVo-5FUR y LS-513). Estos resultados son relevantes en la clínica si tenemos en cuenta que existe un elevado porcentaje de tumores colorrectales con inestabilidad de microsatélites y/o mutaciones en el gen supresor tumoral p53.

5.2.2. Análisis del papel del Oxaliplatino en la reversión de la resistencia a 5-FU

En este apartado se determinó si la exposición previa a Oxaliplatino (administrado a diferentes dosis) se asocia a un incremento en la sensibilidad a 5-FU de las líneas resistentes. Para ello, analizamos la citotoxicidad de:

OXA (0-200 μ M; 4 h) → 5-FU (2 μ M* x 5 días) en HT29/HT29-5FUR

OXA (0-50 μ M; 4h) → 5-FU (7 μ M* x 5 días) en LoVo/LoVo-5FUR

(*2 μ M y 7 μ M representan las dosis de 5-FU a las que se indujo la resistencia en HT29/HT29-5FUR y LoVo/LoVo-5FUR)

En la *figura 29* se observó como las curvas de citotoxicidad de las líneas HT29 y HT29-5FUR se solaparon para dosis de Oxaliplatino iguales o superiores a 25 μ M. En cambio, las curvas de toxicidad para la pareja LoVo/LoVo-5FUR no llegaron a solaparse, aunque el esquema resultó ser citotóxico (la viabilidad celular de la asociación OXA \rightarrow 5-FU en ambas líneas LoVo y LoVo-5FUR siempre fue muy inferior a de sus respectivos controles tratados únicamente con 5-FU).

Por tanto, la exposición previa a Oxaliplatino en estos esquemas secuenciales se asocia a un incremento en la sensibilidad a 5-FU de las líneas resistentes, llegando incluso a revertir el fenotipo de resistencia a 5-FU en la línea HT29-5FUR. Este hecho coincide con el resultado observado en el apartado anterior para la asociación de OXA(4h) \rightarrow 5-FU(24h).

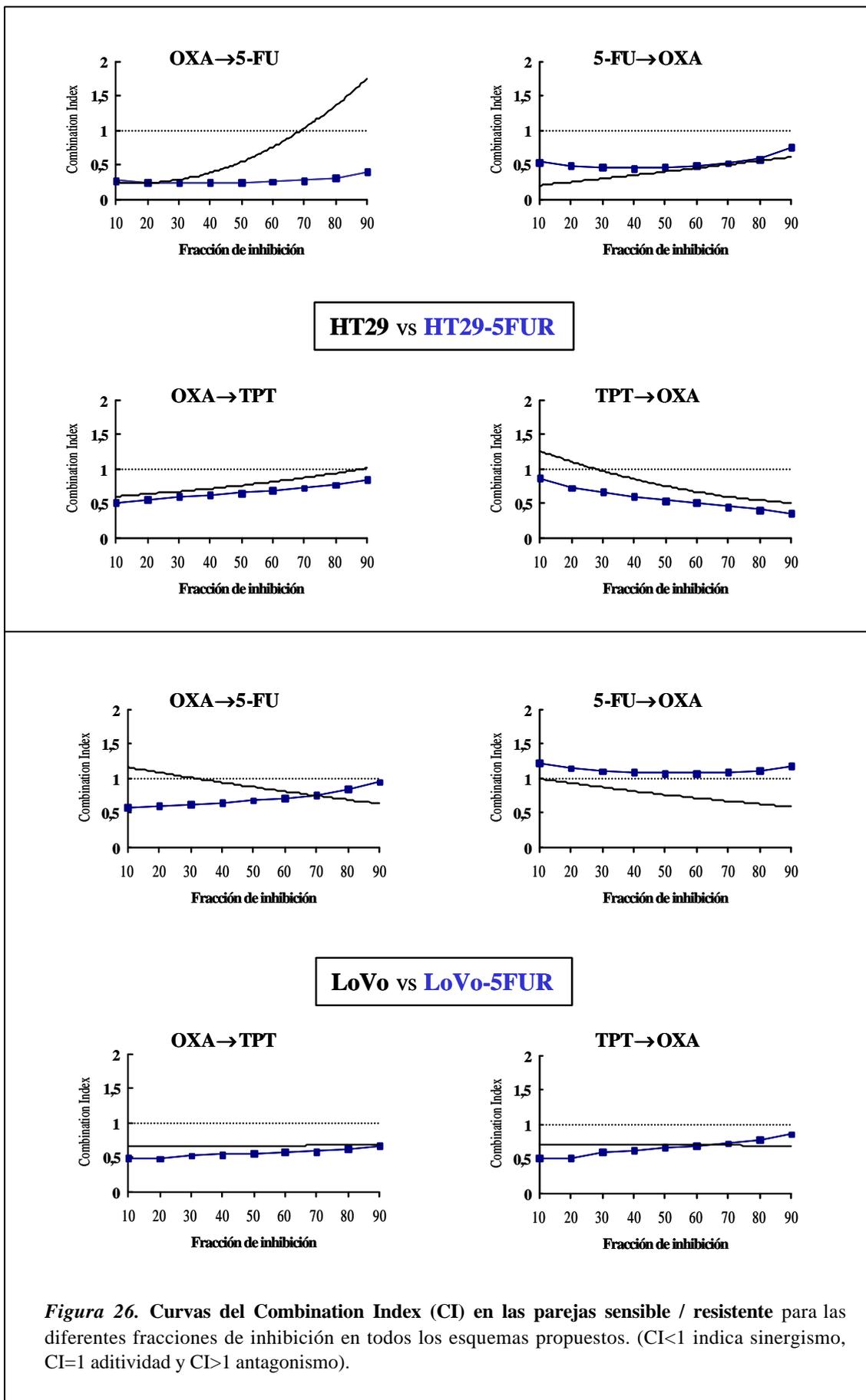
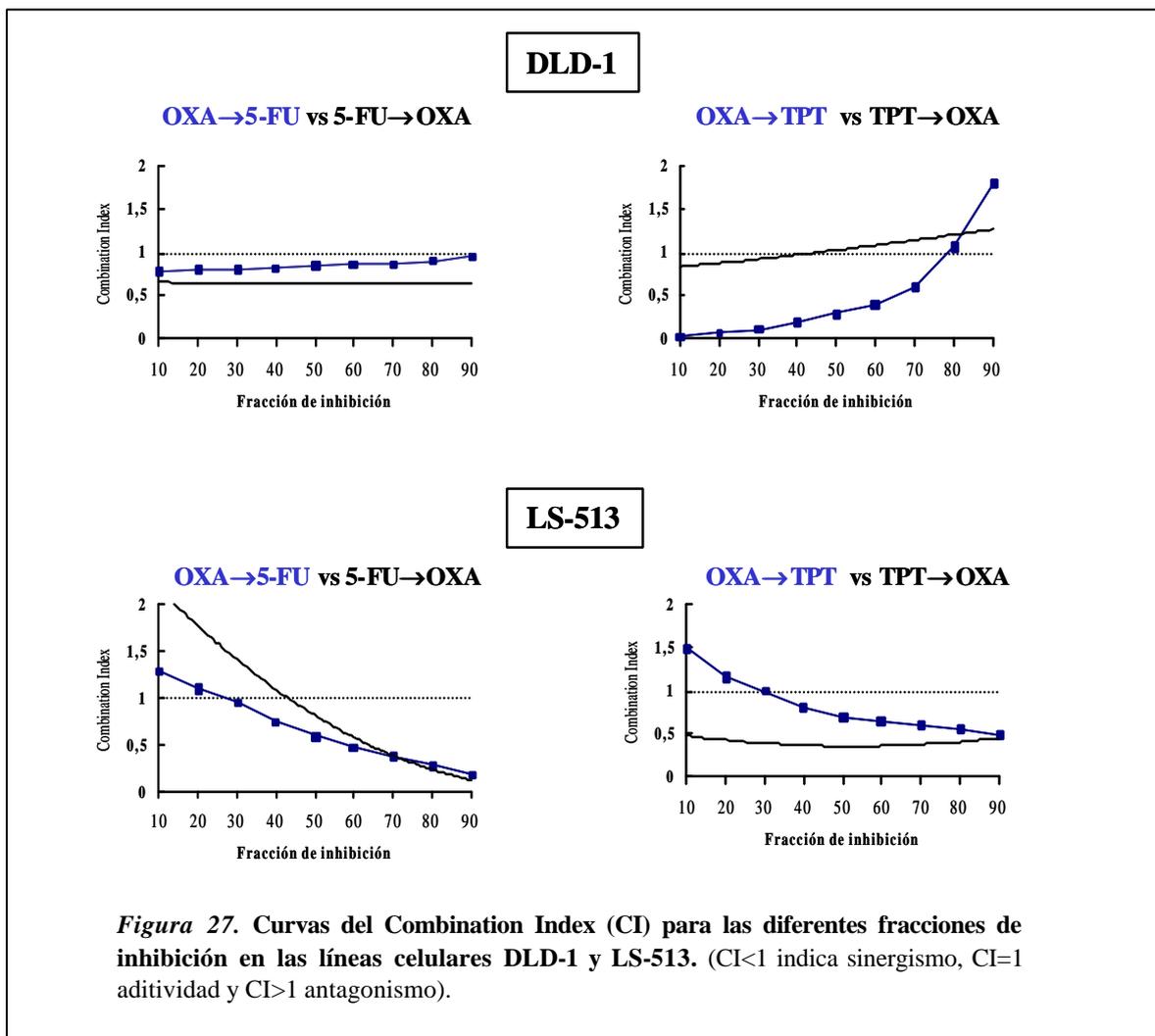


Figura 26. Curvas del Combination Index (CI) en las parejas sensible / resistente para las diferentes fracciones de inhibición en todos los esquemas propuestos. (CI<1 indica sinergismo, CI=1 aditividad y CI>1 antagonismo).



	OXA→5-FU	5-FU→OXA	OXA→TPT	TPT→OXA
HT29	0.58 ± 0.07	0.40 ± 0.04	0.77 ± 0.03	0.78 ± 0.07
HT29-5FUR	0.24 ± 0.005	0.47 ± 0.02	0.65 ± 0.02	0.55 ± 0.01
LoVo	0.88 ± 0.05	0.79 ± 0.12	0.68 ± 0.16	0.70 ± 0.10
LoVo-5FUR	0.68 ± 0.004	1.08 ± 0.06	0.56 ± 0.14	0.66 ± 0.03
DLD-1	0.65 ± 0.02	0.85 ± 0.13	0.25 ± 0.05	1.07 ± 0.17
LS-513	0.60 ± 0.08	0.75 ± 0.08	0.77 ± 0.15	0.37 ± 0.04

Tabla 11. Valores del Índice de Combinación (CI) para una fracción de supervivencia del 50% para todas las combinaciones y líneas celulares. (CI<1 indica sinergismo, CI=1 aditividad y CI>1 antagonismo).

