

- RESULTADOS -
Resultados Objetivo 3

5.3.1. Análisis de la expresión del gen Timidilato Sintasa en la exposición a Oxaliplatino, 5-Fluorouracilo y la combinación Oxaliplatino/5-FU por Northern Blot

Tal y como hemos comentado anteriormente, diversos estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que los niveles de expresión (ARNm) del gen Timidilato Sintasa (TS) están directamente relacionados con la respuesta al tratamiento con 5-FU.

En este apartado se analiza la influencia del Oxaliplatino administrado como agente único y/o previamente a 5-FU (esquema de asociación OXA→5-FU) en la expresión de TS como un parámetro relacionado directamente con la sensibilidad a 5-FU, que nos permita clarificar las bases moleculares del efecto sinérgico observado en la asociación secuencial de OXA/5-FU tanto en líneas sensibles como en sus parejas resistentes a 5-FU.

La expresión de TS (ARNm) en la parejas HT29/HT29-5FUR y LoVo/LoVo-5FUR se analiza en los siguientes puntos (*figura 30*):

Esquema 1) Después de la exposición a Oxaliplatino: a las 0, 12 y 24h después del tratamiento

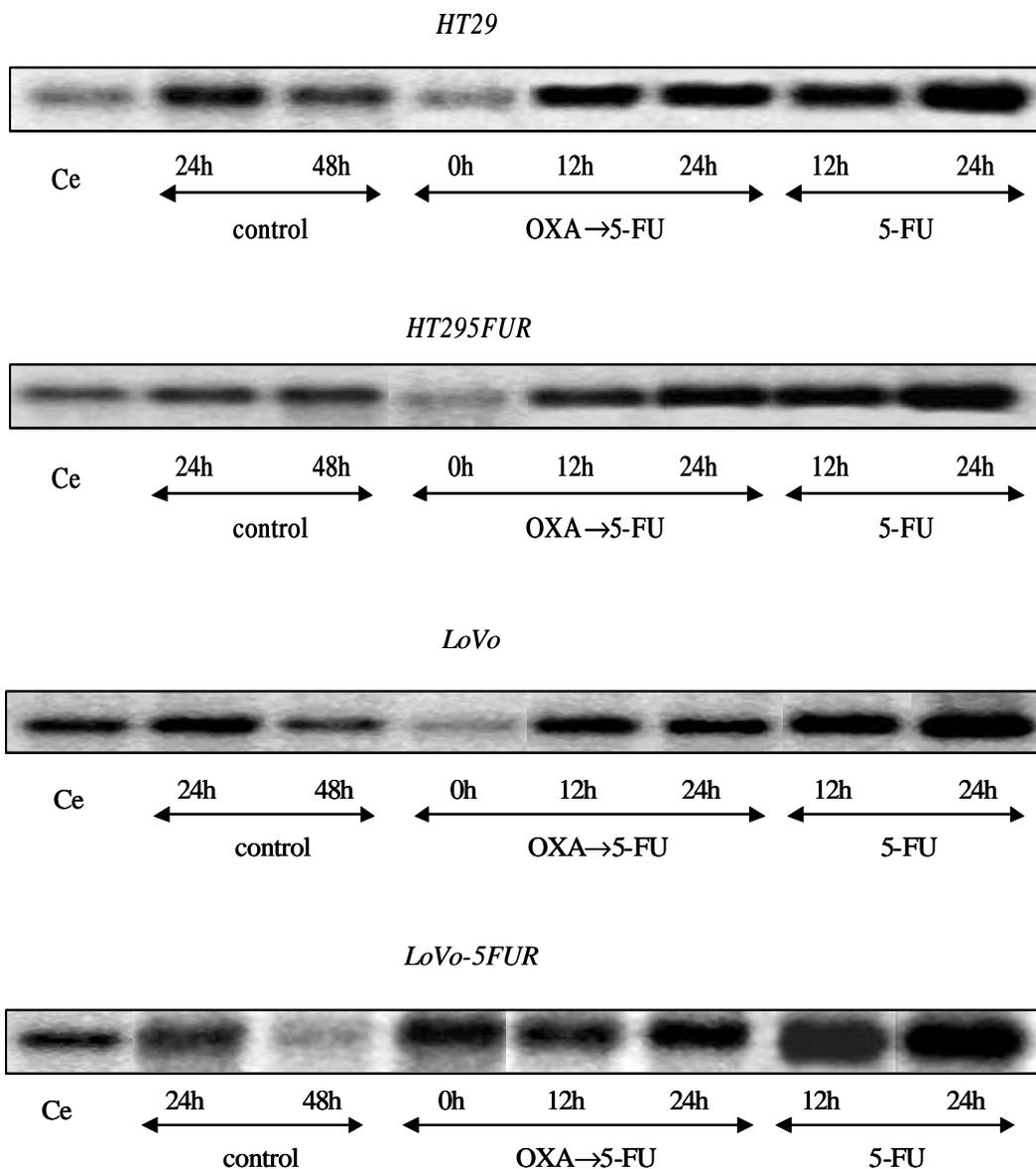
Esquema 2) Durante la exposición a 5-FU: a las 12h y 24h

Esquema 3) En el esquema secuencial OXA@5-FU después de la exposición previa a OXA y durante la exposición a 5-FU: a las 12h y 24h durante la exposición a 5-FU

En el **esquema n° 1**, se observó un marcado descenso de los niveles de TS en todas las líneas celulares analizadas después del tratamiento con Oxaliplatino a las 0h (justo en el momento de retirar el fármaco) cuando se compararon con sus respectivos controles, a excepción de la línea LoVo-5FUR en la que se observó una ligera disminución en la expresión cuando se comparó con su respectivo control sin tratar. Los niveles de TS incrementaron progresivamente a partir de las 12h y 24h después del

siempre fue menor que la sobreexpresión del ARNm provocada por la exposición a 5-FU como agente único (de 4 a 6 veces respecto a los controles sin tratar) (*figura 32*).

La disminución de los niveles de expresión de TS (ARNm) tras la exposición previa a Oxaliplatino en el esquema secuencial OXA→ 5-FU cuando se compara con los niveles de TS tras la administración de 5-FU como agente único en todas las líneas celulares analizadas, correlaciona con la sinergia observada *in vitro* en la combinación secuencial OXA→5-FU tanto en líneas sensibles como resistentes a 5-FU y justifica la sensibilización de estas líneas resistentes de nuevo al tratamiento con 5-FU (“reversión” del fenotipo de resistencia al fármaco).



Ejemplo del análisis por Northern Blot de la expresión de Timidilato Sintasa en las parejas sensibles/resistentes. Las bandas se normalizaron con la señal del ARN ribosómico 28S de cada una de las líneas y se estandarizaron respecto a los controles sin tratar (véase material y métodos). El control externo (Ce) es el mismo en todos los blots analizados.

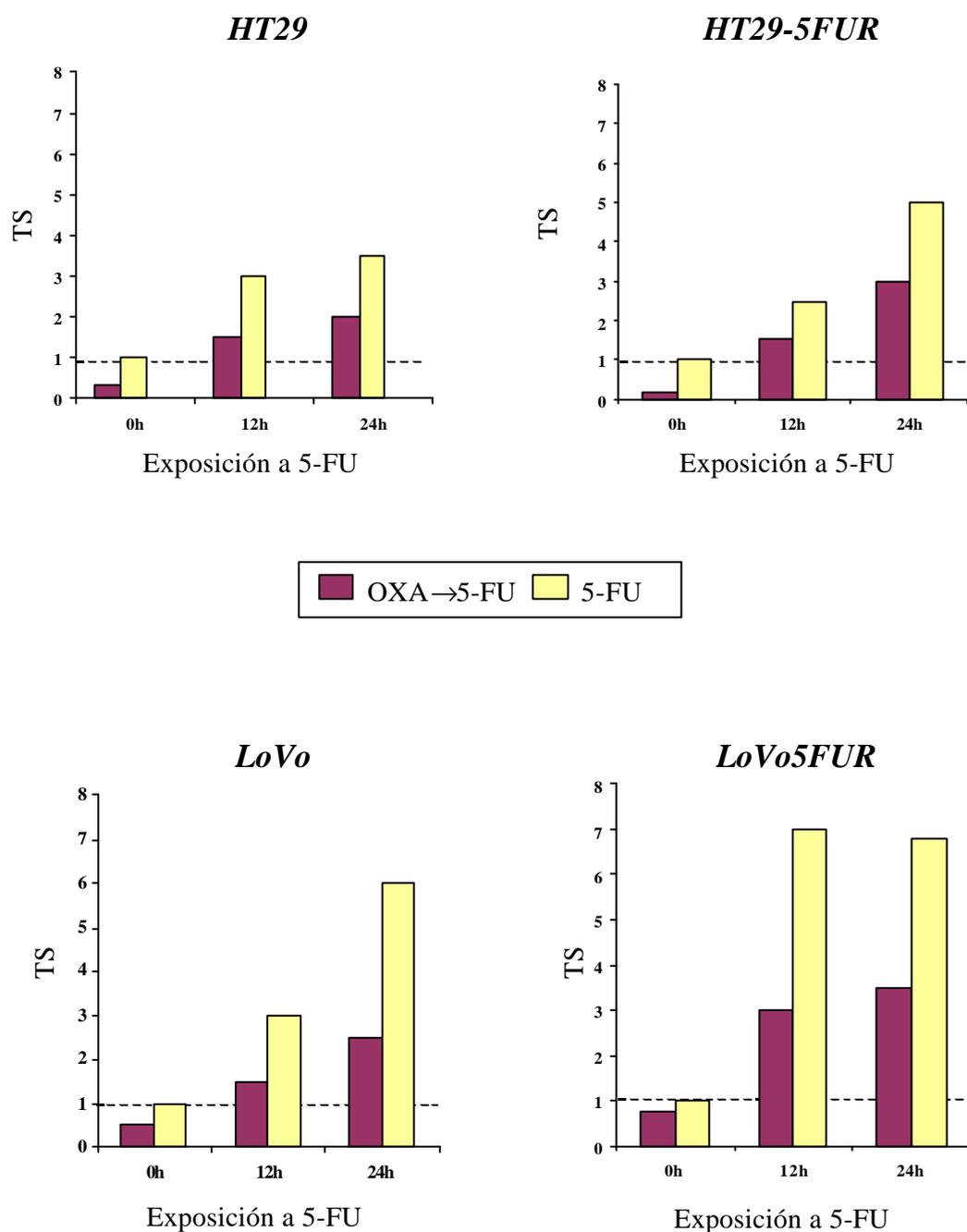


Figura 32. Expresión de TS ARNm en las células HT29/HT29-5FUR y LoVo/LoVo-5FUR durante la exposición a 5-FU en los esquemas 2 y 3. Los datos, una vez estandarizados respecto al ARN ribosómico (ARNr) 28S, representan la expresión ($\mu\pm SD$) respecto a las células control sin tratar (valor 1).

5.3.2. Análisis de la expresión de Timidilato Sintasa a nivel proteico en la exposición a Oxaliplatino, 5-Fluorouracilo y la combinación Oxaliplatino/5-FU por Western Blot

En este apartado se analiza si la desregulación de la expresión de ARNm de TS observada tras la administración de Oxaliplatino tanto en líneas sensibles como resistentes a 5-FU, se traduce en una alteración en los niveles proteicos de TS. Asimismo analizamos si la administración previa de Oxaliplatino en el esquema secuencial OXA→ 5-FU, permite disminuir los niveles de proteína TS cuando se compara con los niveles de TS obtenidos tras la administración de 5-FU como agente único, que nos permita explicar la sinergia de esta combinación observada *in vitro*.

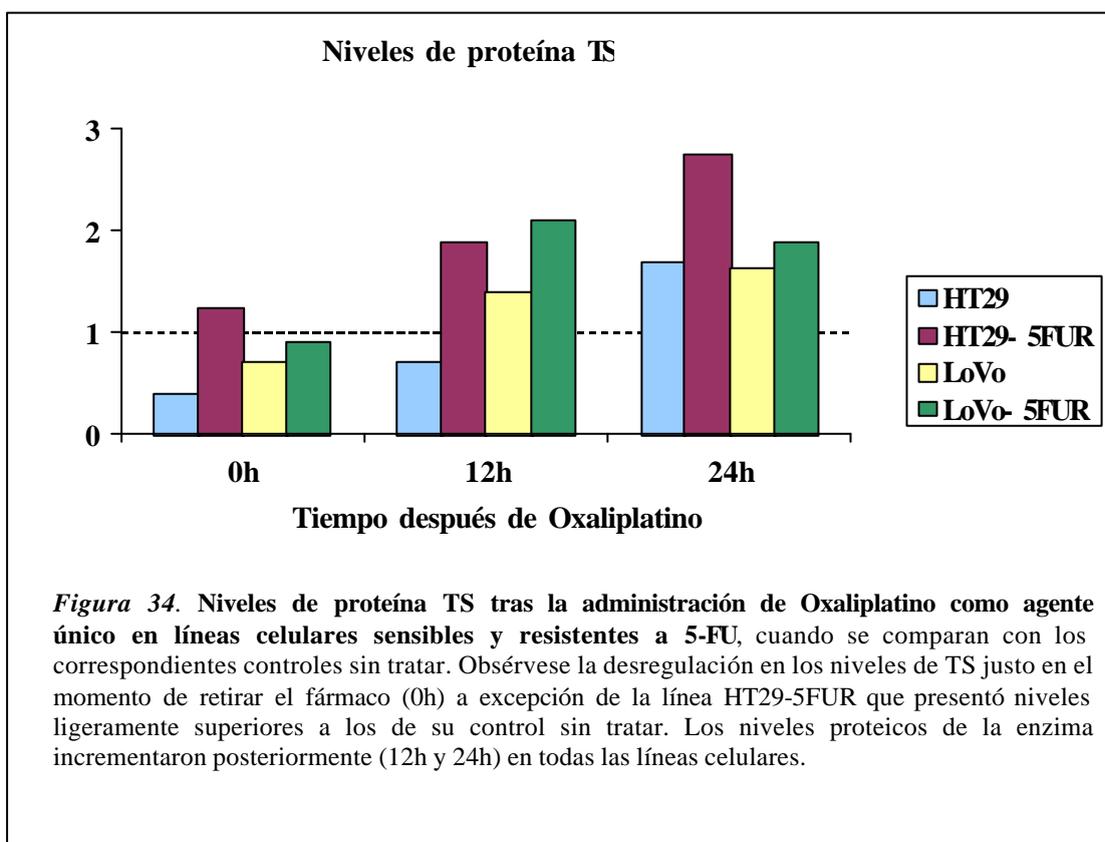
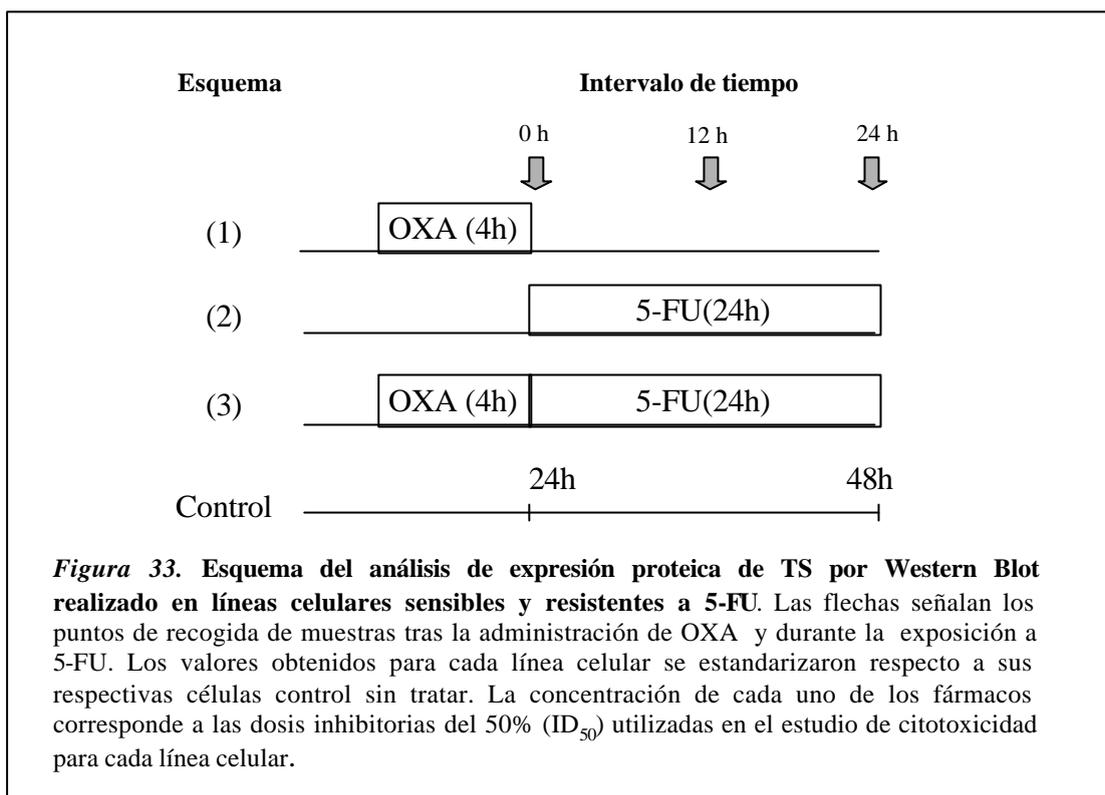
El análisis por Western Blot (*ver ejemplo*) se llevó a cabo en las líneas sensibles y resistentes a 5-FU (HT29/HT29-5FUR y LoVo/LoVo-5FUR) en los siguientes puntos (*figura 33*):

Esquema 1) Después de la exposición a Oxaliplatino: a las 0, 12 y 24h después del tratamiento.

Esquema 2) Durante la exposición a 5-FU: a las 12h y 24h.

Esquema 3) En el esquema secuencial OXA@5-FU después de la exposición previa a OXA y durante la exposición a 5-FU: a las 12h y 24h durante la exposición a 5-FU.

En el **esquema n°1** se observó tras la exposición a Oxaliplatino y justo en el momento de retirar el fármaco del medio de cultivo (0h), una disminución en los niveles de proteína TS en todas las líneas celulares cuando se comparara con los respectivos controles sin tratar, a excepción de la línea HT29-5FUR que muestra niveles ligeramente superiores (1,15 veces) a los de su control (*figura 34*). Los niveles enzimáticos de TS incrementaron posteriormente a partir de las 12h y 24h después del tratamiento con Oxaliplatino en todas las líneas celulares analizadas, hasta alcanzar niveles superiores a los de sus respectivas controles sin tratar (*figura 34*).



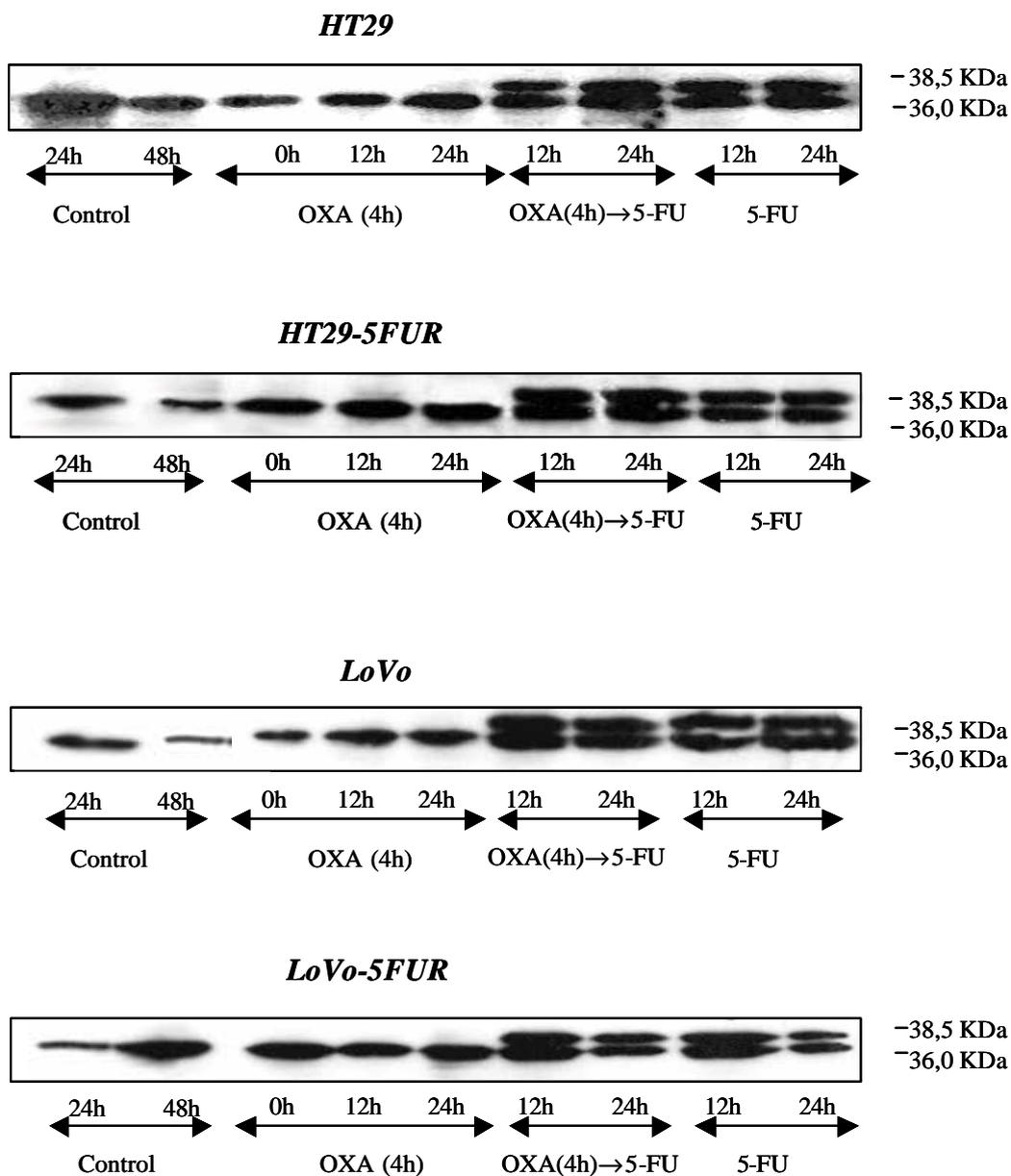
- En el caso de las líneas sensibles (HT29 y LoVo) el perfil de expresión proteica correlacionó con el observado para la expresión del gen (ARNm).
- En el caso de la línea LoVo-5FUR, los niveles de proteína a las 0h correlacionaron con la expresión del ARNm del gen (justo en el momento de retirar el Oxaliplatino del medio de cultivo) que también se mantenía ligeramente inferior a su control sin tratar.
- En cambio en la línea HT29-5FUR, se observó una clara discordancia entre los niveles del mensajero (claramente disminuidos a las 0h después de la exposición a Oxaliplatino) y la proteína. La disminución en los niveles de ARNm pero no de proteína, podría estar relacionada con una mayor eficiencia de la traducción de TS en esta línea celular tras la exposición a Oxaliplatino.

En el *esquema n°2* (durante la exposición a 5-FU) se observó que los niveles totales de TS (libre+ligada) aumentaron tanto a las 12h como a las 24h (*figura 35*). A las 24h, justo en el momento de retirar el 5-FU del medio de cultivo, se observó un incremento en todas las líneas celulares, de entre 2,5 y 4 veces comparado con sus respectivos controles sin tratar. Este incremento de los niveles enzimáticos es paralelo aunque algo inferior a la sobreexpresión observada a nivel de ARNm y se interpreta como la respuesta celular al 5-FU.

En el esquema de asociación OXA→5-FU (*esquema n° 3*) en las parejas sensibles/resistentes también se observó un incremento en los niveles totales de TS (libre+ligada) durante la exposición a 5-FU (a las 12h y 24h) (*figura 35*). Al analizar con más detalle, se observó que:

- a) A las 12h, los niveles proteicos se mantuvieron similares (LoVo y HT29) o incluso superiores (LoVo-5FUR y HT29-5FUR) para la asociación OXA→5-FU respecto al 5-FU como agente único, a diferencia de lo observado a nivel de ARNm.
- b) A las 24h, las células tratadas previamente con Oxaliplatino en el esquema OXA→5-FU presentaron niveles inferiores en comparación con las tratadas con 5-FU como agente único (*figura 35*). La disminución de TS correlacionó con la reducción de la dosis de 5-FU en la combinación OXA/5-FU y está en concordancia con el obtenido para el ARNm aunque cabe señalar que las diferencias en los niveles

proteicos fueron ligeras en comparación con los cambios observados a nivel de ARNm en estas líneas (aproximadamente el doble de expresión cuando 5-FU se administra como agente único comparado con la combinación OXA→5-FU).



Ejemplo del análisis por Western Blot de Timidilato Sintasa en líneas sensibles/resistentes a 5-FU. Obsérvese que tras la administración de Oxaliplatino no existen cambios apreciables en los niveles de TS, por tanto la administración de OXA no altera los niveles de la enzima. La banda de 36KDa corresponde a la TS libre mientras que la banda de 38,5 KDa corresponde a la TS ligada formando el complejo ternario de inhibición.

