

5.3.3. Análisis de la expresión del gen Topoisomerasa I en la exposición a Oxaliplatino, Topotecán y la combinación Oxaliplatino/TPT por Northern Blot

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

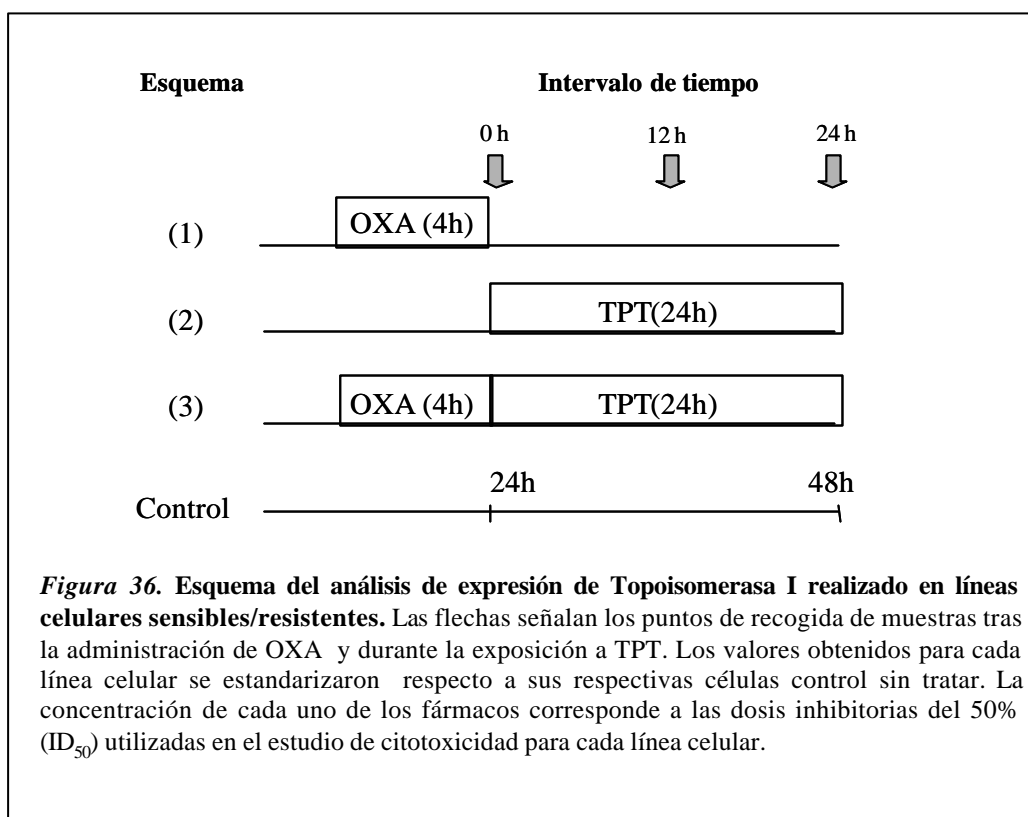
Para ello, analizamos la expresión de Topoisomerasa I en las parejas HT29/HT29-5FUR y LoVo/LoVo-5FUR mediante técnica de Northern Blot (*ver ejemplo*) en los siguientes puntos (*figura 36*):

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

Esquema 2) Durante la exposición a TPT: a las 12h y 24h

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

En el *esquema n°1*, se observó una disminución importante en los niveles de expresión de Topo I después de la exposición a Oxaliplatino a las 0h (justo en el momento de retirar el fármaco del medio de cultivo) en todas las líneas celulares cuando se comparaban con las células control sin tratar, a excepción de la línea HT29 que presentó niveles idénticos a su respectivo control sin tratar (*figura 37*). Los niveles de Topo I incrementaron posteriormente hacia las 12 y 24h después del tratamiento con Oxaliplatino en todas las líneas celulares analizadas, hasta alcanzar niveles superiores a los de sus respectivos controles sin tratar (*figura 37*).



En el *esquema n°2* (durante la exposición a TPT) se observó un incremento en los niveles de Topo I en todas las líneas celulares cuando se comparaban con las células sin tratar (*figura 37*) que se interpreta como la respuesta celular al daño inducido, incrementando los niveles de la enzima que forma parte de la maquinaria reparación celular. Cabe señalar que el incremento en la línea HT29-5FUR fue muy ligero (aproximadamente 1,5 veces respecto a su control sin tratar) si se compara con la sobreexpresión observada en su homóloga sensible HT29 (que se caracteriza porque presenta amplificación génica de Topo I, *Mcleod HL y col, 1996*, y que presentó una expresión 3 veces superior a la de su respectivo control sin tratar) (*figura 37*). Estas diferencias en la expresión de Topo I en la pareja HT29/HT29-5FUR podría estar relacionada con el hecho que la dosis de TPT requerida por la línea HT29 en el estudio de citotoxicidad fuera ligeramente superior a la requerida por la línea HT29-5FUR (DI₅₀'s de 211,90 y 162,65 nM para HT29 y HT29-5FUR, respectivamente).

En el esquema secuencial OXA→TPT (*esquema n°3*) se observó un aumento en los niveles de expresión de Topo I a las 12h y 24h en todas las líneas celulares analizadas.

Sin embargo los resultados obtenidos fueron algo distintos para cada una de las parejas sensible/resistente:

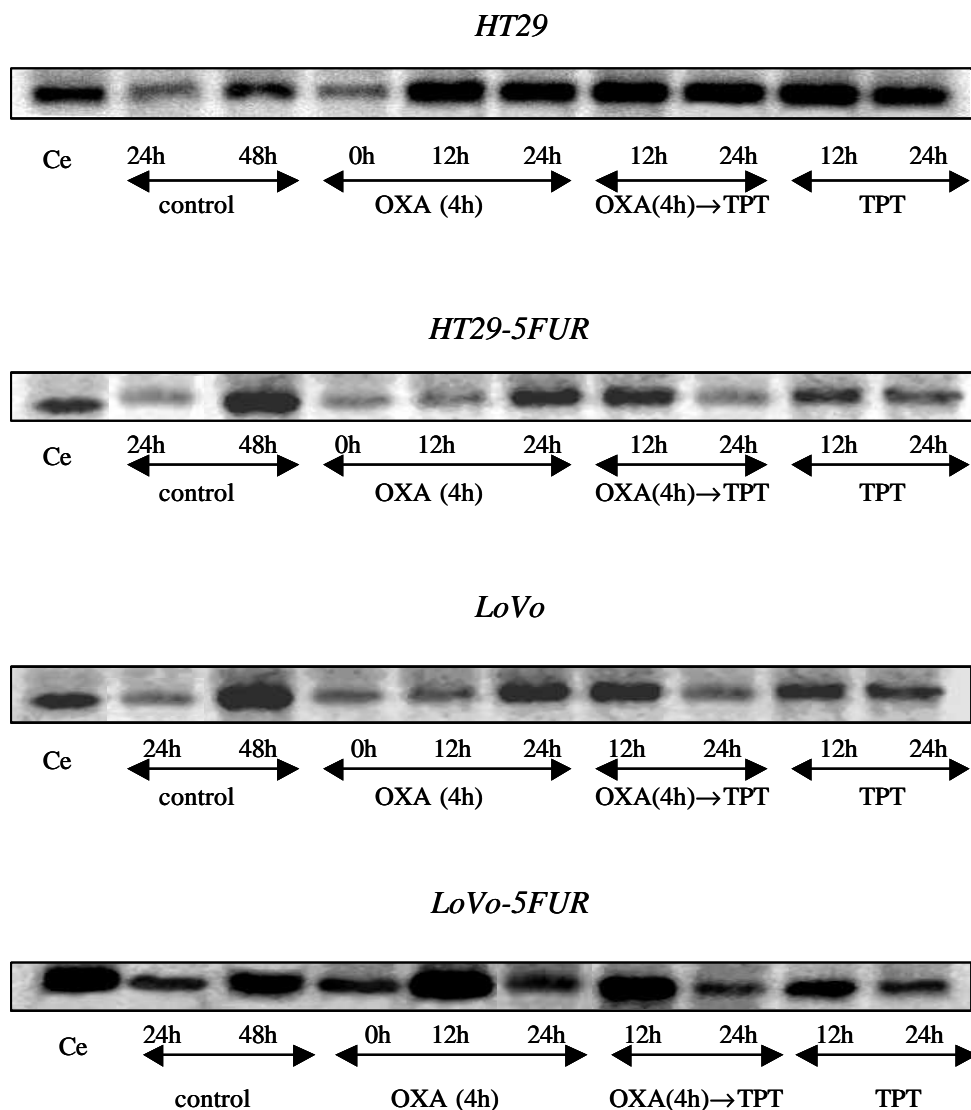
- En el caso de la pareja HT29/HT29-5FUR los niveles de Topo I a las 24h en este *esquema n° 3 (figura 37)* llegan incluso a superar ligeramente (aproximadamente 1,2 veces) los niveles de expresión obtenidos para la administración de TPT como agente único (*esquema n° 2*). Estos resultados no correlacionaron con la citotoxicidad observada para la combinación secuencial OXA→TPT en estas líneas celulares (para una fracción de inhibición del 50% los valores de CI fueron 0.77 y 0.65 para HT29 y HT29-5FUR, respectivamente).

- En el caso de la pareja LoVo/LoVo-5FUR, el incremento en los niveles de Topo I durante la exposición a TPT en el esquema secuencial OXA→TPT (*esquema n° 3*) siempre fue inferior al observado durante la exposición a TPT como agente único (*esquema n°2*) (*figura 37*). Quisiera en este punto, hacer mención a los resultados del objetivo 1 (*apartado 5.1.4.*), donde se observaba que la inducción de resistencia a 5-FU en la línea LoVo-5FUR generaba un patrón de resistencia cruzada (una menor sensibilidad) a los inhibidores de Topo I (TPT, CPT-11 y SN38). La desregulación de los niveles de Topo I tras la exposición previa a Oxaliplatino en el esquema OXA→TPT correlacionó con la disminución de la dosis de TPT en la combinación en ambas líneas, y señalar además que en el caso de la línea LoVo5FUR esta dosis de TPT en la combinación se acercaba a la requerida por la línea parental LoVo (tal y como se ha explicado anteriormente en los resultados del *objetivo 2, apartado 5.2.1.*). Por tanto, la desregulación en los niveles de Topo I correlaciona con la sinergia observada para la combinación OXA→TPT en estas líneas celulares.

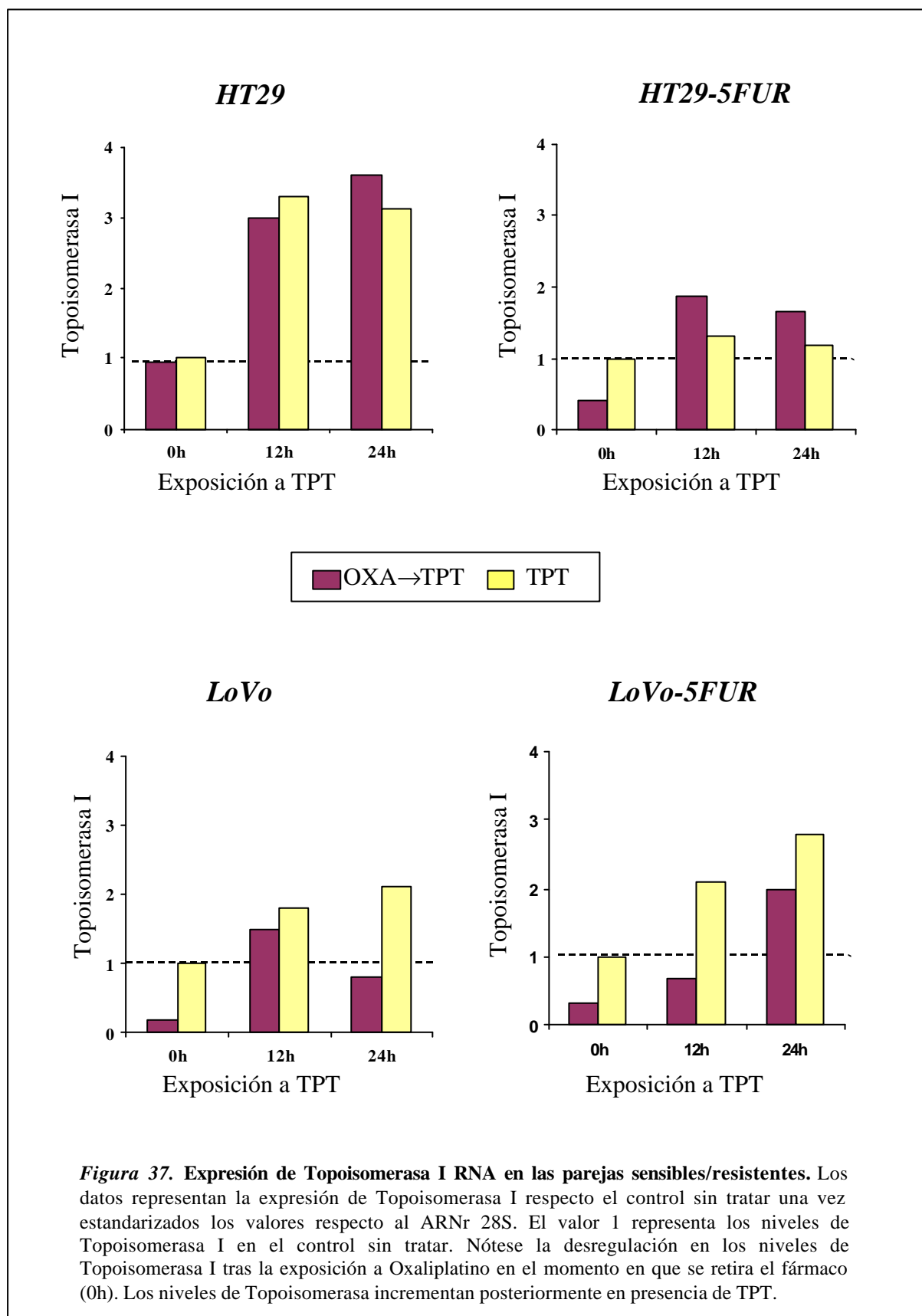
En resumen, la administración de Oxaliplatino como agente único o en la combinación OXA→TPT provoca una desregulación de la expresión de Topoisomerasa I, que es lógica si tenemos en cuenta que el Oxaliplatino por su mecanismo de acción, provoca un bloqueo en la síntesis de ADN y por tanto, una disminución en los niveles de los enzimas implicados en este proceso (tanto TS como Topoisomerasa I). Así, la sinergia observada en la asociación OXA→TPT parece estar asociada al daño inducido

en el DNA tras la exposición a OXA, de forma que la subsiguiente administración de otra droga como el 5-FU o los inhibidores de Topoisomerasa I, que actúan también en procesos de la síntesis y/o reparación del ADN, provoca un efecto citotóxico mayor, letal para la célula tumoral.

Además cabe destacar que el descenso marcado de los niveles de Topoisomerasa I justo a las 0h después de retirar el OXA del medio de cultivo, señala la necesidad de administrar el inhibidor de Topoisomerasa I previo a Oxlaiplatino, ya que niveles bajos de expresión de esta enzima comportan resistencia a este tipo de drogas (TPT, CPT-11).



Ejemplo del análisis por Northern Blot de la expresión de Topoisomerasa I 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).



5.3.4. Análisis de la muerte celular programada (apoptosis) después de la exposición a Oxaliplatino, 5-Fluorouracilo y la combinación Oxaliplatino/5-FU

En este último apartado tratamos de analizar si la citotoxicidad observada en las asociaciones secuenciales de OXA/5-FU tanto en líneas sensibles como resistentes a 5-FU, se explica por un incremento en la inducción de muerte celular programada o apoptosis.

Para ello, se analizó la existencia o no de apoptosis mediante dos técnicas complementarias:

- Análisis de la fragmentación del ADN en geles de agarosa (*DNA laddering*)
- Análisis de Anexina V por citometría de flujo

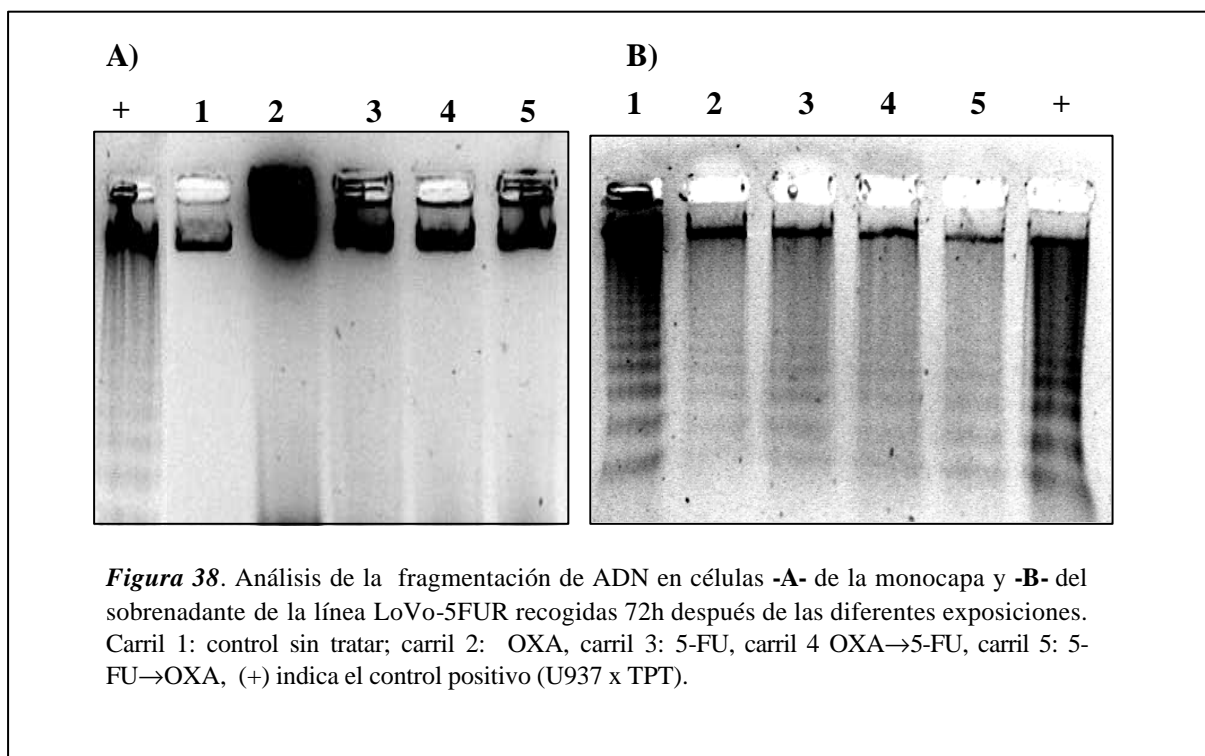
Con la inclusión de estas técnicas aseguramos el estudio de los diferentes estadios de apoptosis: temprana (anexina V) y/o tardía (*DNA laddering*). En todos los casos se utiliza la línea celular U937 como control positivo, ya que durante el tratamiento de 4h con TPT a dosis 300 nM se induce apoptosis muy prominente tal y como se observa por el patrón de fragmentación del DNA (*figura 38*).

Los análisis se realizaron en muestras procedentes de las parejas sensibles/resistentes tras la exposición a Oxaliplatino y 5-FU como agentes únicos o en las dos combinaciones secuenciales OXA→5FU y 5FU→OXA, a las correspondientes dosis DI_{50} de cada fármaco en cada una de las líneas celulares analizadas.

Tras el análisis de *DNA laddering*, sólo observamos apoptosis (tal y como muestra la *tabla 12*) en el caso de las células recogidas del sobrenadante de todas las líneas celulares si bien esta apoptosis se trata de un proceso espontáneo ya que los controles sin tratar también presentaron el mismo patrón y responde a procesos de inhibición por contacto del crecimiento en los cultivos en monocapa.

	Control	OXA	5-FU	OXA-5FU	5FU-OXA
HT29 monocapa	-	-	-	-	-
HT29 sobrenadante	+	+	+	+	+
HT29-5FUR monocapa	-	-	-	-	-
HT29-5FUR sobrenadante	+	+	+	+	+
LoVo monocapa	-	-	-	-	-
LoVo sobrenadante	+	+	+	+	+
LoVo-5FUR monocapa	-	-	-	-	-
LoVo-5FUR sobrenadante	+	+	+	+	+

Tabla 12. Resultado del análisis de muerte celular programada por DNA laddering en líneas sensibles y resistentes a 5-FU a las 72h después de la administración de Oxaliplatino, 5FU y OXA/5FU. (+) apoptosis, (-) no apoptosis.



En el análisis por citometría de flujo realizado con annexina V, se observó un ligero incremento de muerte celular por apoptosis -3,2% de la población de células tratadas *versus* 1,7% de sus correspondientes controles sin tratar- que correlaciona con la citotoxicidad observada tras el tratamiento con los diferentes agentes, aunque globalmente, no se aprecia un patrón claro de muerte por apoptosis.

Los resultados obtenidos por uno u otro método son coincidentes y muestran la ausencia de un patrón de muerte por apoptosis en las muestras analizadas tras la exposición a Oxaliplatino, 5-FU como agentes únicos y en combinación (OXA→5-FU y 5-FU→OXA) y sugieren que la apoptosis no es el mecanismo principal de la muerte celular que se produce *in vitro* en estas asociaciones como mínimo a las dosis utilizadas. Los resultados obtenidos están en concordancia con datos publicados en la literatura que señalan que a diferencia de lo que ocurre en células de la línea hematopoyética (p.e. U937), las células de colon que crecen *in vitro* adheridas al sustrato no entran en apoptosis de forma rápida por el efecto del tratamiento con inhibidores de Topoisomerasa I.

Además la ausencia de muerte celular programada parece ser en nuestro caso: a) un evento independiente del estado de p53, ya que es un hecho común en líneas salvajes (LoVo/LoVo-5FUR) y mutadas (HT29/ HT29-5FUR); b) independiente del estado de los genes reparadores del ADN (líneas RER-: HT29/HT29-5FUR, y RER+: LoVo/LoVo-5FUR).

- D I S C U S I Ó N -

El principal obstáculo en el tratamiento con quimioterapia del cáncer colorrectal avanzado (CRC) es la resistencia intrínseca que presenta este tipo de neoplasia a la mayoría de los fármacos utilizados actualmente en la clínica. Tal y como se ha comentado en la introducción, durante los últimos 40 años el 5-Fluorouracilo (5-FU) ha sido el tratamiento estándar en esta neoplasia. La práctica clínica demuestra que la administración durante largos períodos de tiempo de 5-FU conduce a la aparición de fenómenos de resistencia inducida al fármaco, lo que implica una menor efectividad del tratamiento. Los estudios *in vivo* realizados en pacientes tratados con 5-FU, demuestran la existencia de una correlación entre los niveles intratumorales de expresión de la Timidilato Sintasa (TS, la enzima diana para el 5-FU) y los fenómenos de resistencia a este agente (*Edler D y col, 2000; Lenz HJ y col, 1997*). Además, los avances en la biología molecular y en la clínica demuestran que esta resistencia es un evento multifactorial y que determinados parámetros biológicos podrían también estar condicionando la respuesta del tumor al tratamiento con 5-FU (*Kitchens ME y col 1999a; Bunz F y col, 1999; Van Triest B y col, 2000; Papamichael 2000*). En este punto, la administración de fármacos con mecanismos de acción diferentes al 5-FU, permite una mejora del tratamiento tanto en pacientes tratados como no tratados con 5-FU (*Abad A, 2001*).

En base a todo esto, el presente estudio ha pretendido integrar los conocimientos actuales de los mecanismos celulares y moleculares que constituyen la base de la resistencia adquirida a 5-FU, así como evaluar las pautas de asociación de otros fármacos encaminados a revertir los fenotipos de resistencia a 5-FU y establecer las bases bioquímicas y moleculares involucradas en la efectividad de estas combinaciones que tan activas se están mostrando en la clínica.

Un primer paso en el análisis de los mecanismos implicados en la aparición de la resistencia a 5-FU es el estudio *in vitro* con líneas celulares derivadas de tumores colorrectales inicialmente sensibles al tratamiento con 5-FU (HT29 y LoVo) y líneas celulares con resistencia inducida al 5-FU (HT29-5FUR y LoVo-5FUR) generadas por

exposición continuada a dosis crecientes del fármaco, hasta alcanzar una dosis de 5-FU 2 μ M en el caso de la línea HT29-5FUR y 7 μ M en el caso de la línea LoVo-5FUR.

Tal y como ocurriría en una situación *in vivo*, la exposición continuada a 5-FU de una población heterogénea de células tumorales (en el presente estudio HT29 y LoVo) conduce a la aparición selectiva de poblaciones con diferente grado de adaptación al fármaco. Tras una etapa inicial de elevada mortalidad celular, se selecciona una población refractaria que presenta una tasa de crecimiento estable y comparable a la de la línea parental sensible correspondiente. Estas poblaciones celulares resistentes (HT29-5FUR y LoVo-5FUR) presentan diferencias fenotípicas que permiten diferenciarlas de sus homólogas sensibles (como el aumento del tamaño celular, vacuolización del citoplasma). Dichas características se mantienen incluso cuando estas células resistentes se cultivan en medio libre de fármaco, indicando la irreversibilidad de su adaptación.

Estas líneas resistentes presentan además un patón de ciclo celular, no observándose en las mismas un incremento de células retenidas en fase de síntesis (fase S) pese a la presencia en el medio de cultivo del 5-FU. Este hecho es remarcable si tenemos en cuenta que el 5-FU es un agente ciclo-específico, y que por su mecanismo de acción es capaz de inhibir la síntesis del ADN y por tanto, su administración debería provocar una retención en la fase S del ciclo celular. Por tanto, la observación de un patrón de ciclo normal en las líneas resistentes en presencia del 5-FU en el medio de cultivo, muestra la adaptación de las mismas a este agente. Una posible explicación la encontraríamos en la literatura (*Longley DB y col, 2001*). Estos autores sugieren que sería la sobreexpresión de la *Timidilato Sintasa* (TS), la diana terapéutica del 5-FU, la que permitiría a estas células resistentes eludir o superar (“abrogate”) la retención en la fase S del ciclo celular que causaría el 5-FU en condiciones normales en una línea celular sensible al fármaco, confiriendo por tanto resistencia a los inhibidores de TS (fluoropirimidinas o antifolatos). La sobreexpresión de TS iría acompañada de una disminución en los niveles de ciclina E, ciclina A y cdk2 (*Longley DB y col, 2000*), que son elementos reguladores de la progresión del ciclo celular (complejo ciclina E/cdk2 regula la transición de G1 a S, y el complejo ciclina A/cdk2 regula la progresión al inicio de la fase S).

Las líneas LoVo-5FUR y HT29-5FUR mostraron una resistencia moderada de 3 y 5 veces superior respectivamente a las correspondientes líneas sensibles (LoVo y HT29). Esto significa que las dosis de 5-FU requeridas para conseguir la misma fracción inhibitoria del crecimiento celular en estas líneas resistentes son superiores a las requeridas por sus homólogas sensibles. Este fenotipo de resistencia se observó tanto en exposiciones cortas (24h) como en infusiones (5 días) en ambas líneas resistentes, siendo por tanto, un fenotipo independiente del tiempo de exposición a 5-FU.

Por otro lado existen evidencias, *in vivo* e *in vitro*, de que el proceso de adaptación de un tumor a un agente quimioterápico, incluye una serie de cambios genotípicos que pueden afectar a la sensibilidad de estos tumores no sólo a fármacos con el mismo mecanismo de acción sino también a fármacos con mecanismos de acción diferentes, en cuyo caso se habla de un fenotipo de resistencia cruzada (*cross-resistance pattern*). Así por ejemplo, determinadas líneas con resistencia adquirida a cisplatino (CDDP) presentan resistencia cruzada a Irinotecán (CPT-11; *Chen ZS y col, 1999*) o líneas resistentes a CPT-11 que presentan resistencia cruzada a inhibidores de Topoisomerasa II como el etopósido (*Kanzawa F y col, 1990*). Este hecho es particularmente importante si tenemos en cuenta que fármacos con mecanismos de acción diferentes al 5-FU tales como Oxaliplatino e Irinotecán (CPT-11) se incluyen en regímenes de poliquimioterapia en enfermos que han progresado al tratamiento.

Por tanto, creímos necesario determinar en este punto si la inducción de resistencia a 5-FU en nuestras líneas celulares alteraba la sensibilidad a otros agentes con actividad en cáncer colorrectal (CRC).

En el presente estudio, *no* se detectaron alteraciones en la sensibilidad a Oxaliplatino en ninguna de las líneas resistentes cuando se compararon con sus correspondientes parejas sensibles. En cambio, sí se observó un ligero patrón de resistencia cruzada a inhibidores de la Topoisomerasa I (TPT, CPT-11 y SN38) en la línea LoVo-5FUR, requiriéndose aproximadamente el doble de dosis de estos inhibidores en esta línea celular para conseguir las mismas fracciones de inhibición del crecimiento que en la línea parental LoVo. Este hecho puede ser relevante en la clínica si tenemos en cuenta que los inhibidores de Topoisomerasa I, en concreto el CPT-11, se

administra como segunda línea de terapia en enfermos con cáncer colorrectal avanzado que han progresado al tratamiento con 5-FU (*Van Custem E y col, 1999; Saltz LB y col, 2000, Rothenberg ML, 2001*)

Tras estas observaciones, el siguiente paso consiste en determinar las causas que originan esta resistencia al 5-FU en nuestras líneas celulares, así como evaluar la implicación de las mismas en la sensibilidad a otros agentes con mecanismos de acción diferente al 5-FU.

Se analizó en primer lugar, si el fenotipo de resistencia a 5-FU observado en las líneas celulares HT29-5FUR y LoVo-5FUR correlacionaba con alteraciones en la diana terapéutica del 5-FU, la Timidilato Sintasa (TS), ya sea a nivel de ADN (procesos de amplificación génica), ARNm (sobreexpresión del gen) y/o a nivel proteico (aumento de la traducción).

Uno de los fenómenos de resistencia descritos *in vitro* para este agente es la amplificación del gen que codifica para TS, localizado en el cromosoma 18p11.32 (*Schimke et al, 1984; Berger y col, 1985; Clark y col, 1987; Copur S y col, 1995*), que se asocia a un incremento en la transcripción (ARNm) y la traducción (proteína) de TS. De hecho, esta sobreexpresión del gen TS se ha correlacionado en la clínica con una peor respuesta al 5-FU, y constituye un marcador pronóstico de la respuesta al tratamiento a este agente (*Leichman y col, 1997; Salonga D y col, 2000; Edler D y col, 2000*). Se conoce además, la regulación *feed-back* negativa ejercida por la proteína TS libre sobre su ARN mensajero (ARNm) inhibiendo de esta manera su propia traducción (*Chu E y col, 1993*). El 5-FU actúa inhibiendo a la enzima impidiendo su unión al ARNm, por lo que la célula soporta una mayor traducción de TS que le permite evadir el tratamiento con 5-FU (*Chu E y col, 1991*). Existen sin embargo, otros mecanismos de regulación menos estudiados, que apuntan a la regulación post-traduccional de la enzima (*Kitchens ME y col, 1999b*). Estos autores sugieren que la inducción de TS en las líneas resistentes se debe a una estabilización de la enzima que al presentar un tiempo de vida media superior estaría más tiempo ligada al FdUMP (metabolito intermedio del 5-FU) formando el complejo ternario de inhibición, disminuyendo la

cantidad de TS libre para inhibir su propia traducción y permitiendo así a la célula evadir la presión del 5-FU.

El análisis por Southern Blot en las parejas sensible/resistente mostró la ausencia de amplificación génica de TS en las líneas HT29-5FUR y LoVo-5FUR, y por tanto, el fenotipo de resistencia a 5-FU observado en estas líneas no está relacionado con un incremento en el número de copias del gen. Este resultado está en consonancia con los descritos previamente por *Lessufleur T y col (1998)* en líneas celulares moderadamente resistentes a 5-FU. Se sabe que los tumores son heterogéneos, están compuestos por subpoblaciones celulares con diferentes características morfológicas y funcionales. Durante el proceso de inducción de resistencia se produce una diferenciación celular de algunos de los diferentes tipos de células que forman el tumor. A medida que la dosis de 5-FU incrementa, se va seleccionando una población con fenotipo similar al enterocítico que presenta un grado elevado de resistencia a la fármaco y muestra amplificación génica (*Lessufleur T y col, 1998*). A dosis moderadas de 5-FU, sin embargo, coexistirían distintas poblaciones con diversos grados de adaptación a la fármaco, la mayoría de las cuales aún no presentan amplificación génica, aunque sí otras alteraciones cromosómicas (ganancias/pérdidas) que les permitirían escapar a la presión del 5-FU. Estos datos coinciden con los resultados que obtuvimos en el análisis del genoma de las líneas resistentes por técnica de hibridación genómica comparativa (CGH) que comentaremos con más detalle posteriormente.

En cambio, se observó un patrón de sobreexpresión en los niveles de ARNm de TS en las líneas resistentes a 5-FU cuando se compararon con sus correspondientes líneas sensibles, tanto en presencia como en ausencia de 5-FU a la dosis a la que se había inducido la resistencia (2 μ M para HT29-5FUR y 7 μ M para LoVo-5FUR). Esta sobreexpresión es una característica estable de estas líneas celulares resistentes y explica en parte, la diferente sensibilidad que presentan al 5-FU cuando se comparan con sus homólogas sensibles. El incremento en los niveles de expresión de TS en presencia de 5-FU observado en todas las líneas celulares, puede interpretarse como la respuesta celular para evadir la presión del 5-FU y correlaciona con datos previos publicados en la literatura (*Chu E y col, 1993*).

Por otro lado, se observa que la línea celular LoVo presenta ya a nivel basal (en ausencia de 5-FU), el doble de expresión que la línea HT29. Estos resultados ya habían sido observados previamente en nuestro laboratorio (*Taron M, comunicación personal, 1999b*), y correlacionan con la dosis de 5-FU necesaria para la inducción de resistencia a 5-FU en el presente estudio (superior en el caso de la línea LoVo) y con la diferencia en la sensibilidad de estas líneas al 5-FU como agente único (exposición 5 días). Estudios posteriores realizados en nuestro laboratorio (*Martínez-Balibrea E y col, comunicación personal, 2002*) muestran que el incremento en los niveles basales de TS en la línea LoVo podrían explicarse por la presencia de un polimorfismo en la zona promotora del gen TS (3 secuencias de 28 pares de bases repetidas en tándem en la zona 5'UTR -*UnTranslated Region*- cercana al codón de inicio AUG, mientras que la línea HT29 presenta sólo 2 secuencias de 28 pares de bases). Estudios previos en la literatura muestran que la presencia de triples repeticiones (3/3) conduce a un incremento de 2,6 veces en los niveles de expresión del gen respecto a la doble repetición (genotipo 2/2) (*Horie N y col, 1995*).

Por otro lado y dado que la TS se halla implicada en procesos de replicación celular, el incremento observado en los niveles de expresión del gen en la línea LoVo cuando se compara con la línea HT29, podría estar también relacionado con las deficiencias en el sistema reparador de aparejamientos incorrectos o *mismatch repair system (MMR)* que presenta la línea LoVo (fenotipo RER+). Este sistema reparador, tal y como se comenta en la introducción, es el encargado de identificar y reparar las lesiones inducidas en el ADN por el apareamiento erróneo entre bases nucleicas originado por los fallos de las polimerasas del ADN durante la replicación celular. Algunos estudios previos en la literatura (*Kitchens ME y col, 1999a; Carethers JM y col, 1999*) muestran que las líneas deficientes en este sistema reparador (fenotipo RER+) presentan niveles incrementados de TS, lo que podría estar confiriéndoles una ventaja selectiva en el crecimiento celular. Este resultado podría tener una cierta relevancia clínica, si tenemos en cuenta que las deficiencias en el sistema reparador MMR son un hecho conocido/establecido en el cáncer colorrectal hereditario no ligado a la poliposis múltiple (HNPCC) y que afecta también a un 20% de los tumores colorrectales esporádicos (*Grife R y col, 1998, Abad A, 2000; Elsaleh H y col, 2001*). La presencia de niveles de TS superiores en estos tumores RER+ implicaría por un lado

una menor efectividad del tratamiento y por otro, que la administración de 5-FU podría estar seleccionando una población celular con mayor capacidad replicativa, lo que conduciría a una rápida progresión tumoral.

Posteriormente, se analizaron los niveles proteicos de TS en ausencia y presencia de 5-FU, para comprobar si la sobreexpresión observada a nivel de ARNm correlacionaba con un incremento en los niveles de proteína que permitieran explicar el fenotipo de resistencia a 5-FU observado en las líneas HT29-5FUR y LoVo-5FUR.

Las líneas resistentes presentaron en ausencia de 5-FU, una menor expresión proteica que sus correspondientes líneas parentales, dato que no concuerda con los niveles de expresión (ARNm) observados. La discordancia entre los niveles de expresión y proteína en las líneas resistentes podrían ser debidos en parte a una tasa de crecimiento celular ligeramente inferior a la de sus correspondientes líneas parentales (recordemos que TS es una enzima implicada directamente en la síntesis celular), aunque podría estar indicando también una mayor capacidad reguladora de la traducción por parte de la propia enzima en estas líneas celulares resistentes. Por último, señalar que igual que ocurría con los niveles de expresión del ARNm, los niveles basales de proteína TS en la línea LoVo fueron superiores a los observados para la línea HT29, dato que está en concordancia con resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio (*Taron M, comunicación personal, 1999b*).

En presencia de 5-FU, se observó un incremento en los niveles de TS total (libre + ligada formando el complejo ternario de inhibición) tanto en líneas sensibles como en resistentes, que se explica como la respuesta celular al 5-FU. La sobreexpresión del ARNm de TS en la línea HT29-5FUR, se traduce en un incremento en los niveles de proteína, hecho que justifica la diferente sensibilidad de esta línea al 5-FU cuando se compara con su homóloga sensible HT29. La línea LoVo-5FUR presenta niveles de TS inferiores a la línea parental LoVo con independencia de la presencia de 5-FU, lo que no correlaciona con la sobreexpresión de TS (los niveles de ARNm siempre fueron superiores en la línea LoVo-5FUR *versus* la línea LoVo) ni con las diferencias en la sensibilidad a 5-FU (las dosis inhibitorias en la línea LoVo-5FUR siempre fueron

superiores a las de la línea LoVo). Esta menor cantidad de proteína es una característica de esta línea y podría atribuirse bien a una mayor capacidad autorreguladora de TS o bien, tal y como muestra la literatura (*Kitchens ME y col, 1999a*) podría ser debido a una menor estabilidad del polipéptido resultante, que sería rápidamente degradado impidiendo su control sobre la traducción y requiriéndose por tanto niveles incrementados de ARNm para mantener los niveles adecuados de TS en esta línea celular. Por último quisiera señalar que esta discordancia entre los niveles de ARNm y proteína ya han sido descritos con anterioridad en la literatura (*Ethiense MC y col, 1995; Kitchens ME y col, 1999a*) y ponen de manifiesto la existencia de otros mecanismos de resistencia a 5-FU que incluyen alteraciones en el transporte, la metabolización, la enzima diana, la cinética celular y los procesos de protección frente a la apoptosis (*Van Triest B y col, 2000; Salonga y col, 2000; Papamichael D, 2000*).

Por último, me gustaría remarcar que el incremento en los niveles proteicos de TS en presencia de 5-FU en las líneas resistentes fue superior al de las líneas sensibles y correlacionó con un aumento en los niveles de TS libre (no ligada), lo que implica que estas líneas resistentes soportan una mayor traducción de TS que sus homólogos sensibles y explica su capacidad para proliferar en presencia del fármaco.

Se analizaron a continuación las características genéticas de las dos líneas con resistencia a 5-FU, HT29-5FUR y LoVo-5FUR, mediante técnica de *H*ibridación *G*enómica *C*omparativa (*CGH*). Los resultados obtenidos muestran la presencia en las líneas resistentes de diversas ganancias (5p, 6, 7p, 7q y 8q) y una pérdida (cromosoma 3q en la línea HT29-5FUR) de material genético en determinadas regiones cromosómicas cuando se compararan con las correspondientes líneas parentales sensibles. La acumulación de estas anomalías genéticas podría estar confiriendo a estas líneas HT29-5FUR y LoVo-5FUR una ventaja selectiva en el crecimiento, permitiendo a los clones resistentes predominar dentro de la población de células tumorales. Tal y como muestran algunos autores en la literatura (*Kitchens ME y col, 1999a; Carethers JC y col, 1999*) los tumores que presentan el fenotipo de errores de replicación (RER+) podrían acumular un mayor número de alteraciones cromosómicas como consecuencia de la deficiencia en la reparación de los errores ocurridos durante la

replicación. *A priori*, parece que la línea celular LoVo-5FUR acumularía un mayor número de ganancias, sin embargo, sería necesaria la inclusión de más líneas RER+ para confirmar esta hipótesis.

Los datos obtenidos por CGH coinciden con resultados previos descritos en la literatura utilizando técnicas citogenéticas clásicas (*Lessufleur T y col, 1991; McLeod HL y col, 1999*) en los que se demuestra que la inducción a dosis moderadas de 5-FU conduce a la aparición de determinados cambios en el balance cromosómico originados por el proceso de adaptación de la línea celular correspondiente a la presencia de la fármaco en el medio de cultivo. Algunas de las ganancias observadas en nuestro estudio ocurren además con frecuencia en tumores esporádicos colorrectales (*De Angelis PM y col, 1999*). Así por ejemplo, las ganancias en el cromosoma 8, podrían estar relacionadas con la existencia de un gen supresor tumoral aún por determinar en esta zona, o bien, podría tratarse de la amplificación del gen c-myc (localizado en el cromosoma 8) cuya sobreexpresión estaría relacionada con un aumento en la proliferación celular (ya que actúa regulando la transición de fase G0/G1 a fase S) (*Jonson LF y col, 1992; Pestalozzi BC y col, 1995*).

Cabe señalar también la alteración que presentan ambas líneas, HT29-5FUR y LoVo-5FUR, en el cromosoma 5p. Entre los diferentes *loci* en esta región encontramos el del gen NHE-3 (*Sodium/Proton Exchanger 3, Na⁺/H⁺*), localizado en el cromosoma 5p15.3, que está implicado en el mantenimiento del pH intracelular (*Thwaites DT y col, 1999*). Este gen podría estar sobreexpresado en las líneas resistentes, indicando la presencia de un mayor intercambio de protones entre la célula y el medio extracelular. La sobreexpresión de este gen se ha correlacionado también con un engrosamiento del volumen celular (*Ritter M y col, 2001*). El incremento de H⁺ en el interior celular provoca su expulsión hacia el exterior o hacia vesículas (hecho que justificaría el aspecto vacuolizado de la línea HT29-5FUR observado al microscopio óptico) importándose Na⁺ y H₂O hacia el interior celular, y provocando por tanto, un aumento del tamaño celular. Este dato coincide con la observación al microscopio óptico de un mayor tamaño de las líneas resistentes respecto a las correspondientes líneas parentales en el presente estudio y correlaciona con los descritos previamente en la literatura (*Lessufleur T y col, 1991*). Es importante además, tener en cuenta que el mantenimiento de la homeostasis celular en estas líneas resistentes en presencia de 5-FU, podría estar

representando un mecanismo de protección frente a procesos de apoptosis (ya que la acidificación intracelular es uno de los desencadenantes de la muerte celular programada) (Gottlieb RA, 1996).

También están localizados en este cromosoma 5p una familia de genes que codifican para las proteínas denominadas *factores relacionados con Topoisomerasas o Topoisomerase-related factors (TRF4 y TRF5)*. Un estudio reciente (Valowsky y col, 1999) muestra que niveles incrementados de estas proteínas están asociados a fenómenos de resistencia a inhibidores de Topoisomerasa I (camptotecina y sus análogos) porque alteran los procesos de recombinación homóloga e incrementan los mecanismos de reparación de las lesiones inducidas por este tipo de citotóxicos. Este hecho podría explicar, entre otras cosas, el patrón de resistencia cruzada a inhibidores de Topoisomerasa I observado en la línea LoVo-5FUR que presenta una ganancia de material genético en el brazo largo del cromosoma 5 (5p).

Otra zona de interés es el cromosoma 13 donde se encuentra localizado el gen que codifica para la proteína retinoblastoma (Rb) implicada en la proliferación celular (Weinberg RA y col, 1995). Se conoce por estudios previos en la literatura, que la línea celular HT29 presenta un mayor número de copias del gen Rb (Weinstein IB, 2000), sin embargo nada se conoce respecto a la otra línea utilizada en este estudio (LoVo) ni la trascendencia que la amplificación de este gen tiene en la progresión tumoral y la respuesta a quimioterapia con 5-FU u otros agentes utilizados en el tratamiento de los tumores colorrectales.

Referente a las pérdidas de material genético, sólo se observó una pérdida en la línea HT29-5FUR de la zona 3q12-qter. Entre los diferentes loci que mapan en esta zona, hallamos el del gen *c-MOAT o MRP-2*, transportador de aniones orgánicos. *A priori* es la sobreexpresión de este gen y no su pérdida la que se ha correlacionado con fenómenos de resistencia a inhibidores de topoisomerasa I (concretamente a CPT-11 y su metabolito activo, SN38) (Mathijssen RHJ y col, 2001).

En cambio, no se detectaron ganancias de material genético en la zona correspondiente al cromosoma 18p donde se localiza la Timidilato Sintasa (TS), dato que coincide con los resultados previos obtenidos por Southern Blot, ni en otras regiones como en el cromosoma 17q donde se localiza la p53.

En conclusión, el estudio por CGH de las líneas resistentes concuerda con la hipótesis inicial y muestra que la adaptación de estas líneas a 5-FU está mediada por la acumulación de aberraciones cromosómicas (ganancias/pérdidas) que contribuyen a la aparición de resistencia al fármaco y por tanto a la ineficacia del tratamiento. Estas alteraciones pueden además originar la aparición de fenómenos de resistencia cruzada a otros fármacos con mecanismos de acción diferente (inhibidores de Topoisomerasa I). Algunos estudios en la literatura señalan además que la acumulación de aberraciones cromosómicas en tumores se asocia a un fenotipo de mayor agresividad tumoral y peor pronóstico, pudiendo estar relacionada con una peor respuesta a la quimioterapia. (Ullman R y col, 1998; Van Dekken H y col, 1999). Así mismo este estudio abre la posibilidad de análisis de nuevos genes y dianas que podrían estar involucrados en la resistencia a 5-FU.

Otro de los objetivos de nuestro estudio consiste en determinar si la sensibilidad de las líneas celulares a los distintos fármacos utilizadas depende del estado de determinados parámetros biológicos como la p53 o el fenotipo RER+. Es necesario por tanto, caracterizar las líneas con resistencia adquirida con el objeto de determinar si durante el proceso de inducción de resistencia se han originado cambios en alguno de estos parámetros. Para ello secuenciamos las zonas correspondientes a los exones 5 al 8 del gen p53, puesto que la mayoría de alteraciones descritas para este gen se localizan en esta zona (*Hotspots* o zonas calientes) (Bullock AN y col, 2001). Los análisis confirmaron que las líneas resistentes mantienen el mismo genotipo que las correspondientes líneas parentales, salvaje en el caso de LoVo/LoVo-5FUR y mutado en el exón 8 (cambio de Arg→His, que ya había sido descrito con anterioridad por O'Connor PM y col, 1997).

Estudiamos también el estado de los genes reparadores del ADN (MMR) mediante el análisis de inestabilidad de microsatélites (MI). Se sabe que las células deficitarias en los genes reparadores se caracterizan por la acumulación de alteraciones en determinadas zonas no codificantes del genoma denominadas microsatélites (Grife R y col, 1998). En la actualidad, el Grupo Cooperativo para el HNPCC, establece que debe evaluarse al menos un panel de 5 marcadores (tres de ellos monomórficos) para determinar la presencia de inestabilidad de microsatélites (también denominado

fenotipo de errores de replicación, RER). Los análisis confirmaron que las líneas resistentes mantuvieron el mismo genotipo que las correspondientes líneas parentales: fenotipo RER- para las líneas HT29 y HT29-5FUR (no presentan MI) y RER+ en las líneas LoVo y LoVo-5FUR (evidenciado por la ausencia de la señal correspondiente a la zona del marcador BAT-26 que se localiza sobre la zona del gen MSH2, indicando el defecto en este gen reparador en estas líneas celulares, tal y como describen *Liu y col,(1995)* en la literatura).

Podemos por tanto concluir en esta primera parte del estudio, que la exposición continuada a 5-FU conduce a la aparición de una población celular con características genotípicas y fenotípicas distintas a la población inicial que les permiten adaptarse y proliferar en presencia del fármaco. El análisis de estas zonas amplificadas/delecionadas permitiría la identificación de nuevas dianas implicadas en la resistencia a 5-FU. Por otro lado, observamos que las líneas resistentes presentan niveles de expresión de TS incrementados, siendo éste un marcador predictivo de la respuesta a quimioterapia en tumores refractarios a 5-FU. Los niveles proteicos no siempre están en concordancia con los resultados obtenidos en la expresión de TS, hecho que demuestra la implicación de los cambios traduccionales y post-traduccionales de la enzima. Por último, señalar que la resistencia a 5-FU debe entenderse como un evento multifactorial que incluyen alteraciones que afectan a numerosos procesos implicados en la viabilidad de la célula tumoral.

La baja tasa de respuestas obtenidas en la clínica con el tratamiento con 5-FU ha sido ampliamente mejorada gracias a la introducción de nuevos citostáticos en el tratamiento de este tumor. Entre los nuevos agentes encontramos el Oxaliplatino, un agente platinado de tercera generación y los derivados de la camptotecina (Irinotecán y Topotecán) que actúan como inhibidores de la enzima ADN-Topoisomerasa I.

La observación *in vitro* de la actividad del Oxaliplatino como agente único frente a una gran variedad de tumores humanos, así como el efecto sinérgico de su combinación tanto *in vitro* como *in vivo* en tumores sensibles y refractarios al 5-FU observado en líneas de colon (*Raymond y col, 1998; Cvitkovic E y col, 1999*),

proporciona las bases para su utilización en la clínica. Sin embargo, poco se conoce sobre el papel que desempeña el Oxaliplatino en la combinación aunque existen algunas evidencias que sugieren que este platino actuaría incrementando los niveles del metabolito intermedio del 5-FU (FdUMP) lo que permitiría explicar la sinergia de estas asociaciones (*Cvitkovic E y col, 1999*). Otros estudios parecen apuntar que no existe una interacción directa sobre la zona promotora del 5-FU y que el Oxaliplatino al igual que otros agentes platinados análogos podría estar regulando la expresión del gen TS a través de la modulación de determinados factores de transcripción (Sp1, E2F-1,...) que actúan como elementos reguladores positivos de la transcripción de genes implicados en la síntesis de ADN tales como la TS o la Topoisomerasa I (*O'Dwyer PJ y col, 1999; Rudge TL y col, 2002*).

Basándose en estas evidencias, el presente estudio propone analizar el potencial citotóxico del Oxaliplatino administrado como agente único o en combinación con 5-FU en líneas sensibles y resistentes a este último. Además evaluamos el papel que determina el Oxaliplatino en la “reversión” de la resistencia al 5-FU. Por otro lado, el Oxaliplatino ha mostrado eficacia en combinaciones con agentes antitumorales como CDDP, CPT-11, Paclitaxel y Gemcitabina entre otros (*Cvitkovic E y col, 1998a, 1998b, 1999; Wasserman E y col, 1999*). Concretamente la asociación de Oxaliplatino con CPT-11 y/o su metabolito activo, SN38, ha demostrado ser muy efectiva *in vitro* tanto administrados de forma conjunta como secuencial (*Zeghari-Squalli y col, 1999; Guichard S y col, 2001*). Cabe esperar que otros inhibidores de Topoisomerasa I como el Topotecan (TPT) sean activos en combinación con Oxaliplatino tal y como muestran los estudios realizados en tumores de ovario (*Goldwasser F y col, 1999, Seiden M, 2001*), si bien esta asociación no se ha probado todavía en tumores de colon. Teóricamente, la administración de Oxaliplatino conduce a una inhibición de los procesos de replicación y transcripción celular. En este punto la célula intenta reparar el material genético dañado desencadenando procesos que conducen a la célula a una muerte por apoptosis (*Cvitkovic E y col, 1998a; Fink D y col, 1996*). Una manera de incrementar la toxicidad celular sería asociar el Oxaliplatino con un inhibidor de la Topoisomerasa I, dado que esta enzima se halla también implicada en los procesos de replicación, transcripción y reparación celular (*Pommier Y y col, 1998*). Así analizamos

si esta combinación (OXA/TPT) es sinérgica tanto en las líneas sensibles como resistentes a 5-FU, teniendo en cuenta además, que en el proceso de adaptación al 5-FU, la línea celular LoVo-5FUR mostró un patrón de resistencia cruzada a inhibidores de la Topoisomerasa I. Por último, analizamos si estas combinaciones (Oxaliplatino/5-FU y Oxaliplatino/TPT) potencian o no la citotoxicidad celular de forma independiente al estado de del fenotipo RER (RER+ en las líneas LoVo, LoVo-5FUR y DLD-1; RER- en el caso de HT29, HT29-5FUR y LS513) y el estado de la p53 (mutado para HT29, HT29-5FUR y DLD1, y silvestre o “wild-type” para LoVo, LoVo-5FUR y LS513), intentando elucidar si estos parámetros pueden alterar la acción de los diferentes agentes antitumorales administrados como agentes únicos o en combinación.

Globalmente los esquemas secuenciales de administración utilizados en este estudio resultaron sinérgicos a dosis moderadas de los fármacos con independencia del fenotipo de resistencia a 5-FU, el estado de p53 y/o el estado del sistema reparador del ADN. Únicamente la asociación 5FU→OXA en la línea LoVo-5FUR y la asociación TPT→OXA en la línea DLD-1 resultaron aditivas. Cabe señalar que la administración de Oxaliplatino previa a 5-FU y/o TPT permitió reducir las dosis de ambos fármacos en las líneas resistentes hasta niveles similares a los obtenidos en las líneas parentales sensibles, revirtiendo el fenotipo de resistencia a 5-FU en ambas líneas, y permitiendo en el caso de la línea LoVo-5FUR que presentaba un patrón de resistencia cruzada a inhibidores de Topoisomerasa I, disminuir las dosis de TPT hasta niveles similares a los requeridos por la línea LoVo. Por otro lado, la exposición a Oxaliplatino (a diferentes dosis) previa a la exposición continuada durante 5 días de 5-FU a las dosis a las que se indujo la resistencia en las líneas HT29-5FUR y LoVo-5FUR (2 μ M y 7 μ M, respectivamente), también resulta citotóxica y 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.

Los resultados obtenidos en este apartado concuerdan con resultados previos de la literatura (Raymond E y col, 1998; Zeghari-Squalli N, 1999) y muestran que las asociaciones Oxaliplatino con 5-FU y/o inhibidores de Topoisomerasa I son efectivas tanto en tumores colorrectales sensibles como refractarios a 5-FU. La asociación de

Oxaliplatino/Inhibidores de Topoisomerasa I es al menos tan efectiva como la combinación secuencial con 5-FU y representa una alternativa al tratamiento del cáncer colorrectal avanzado. De hecho los estudios en fase II de la combinación de Oxaliplatino e Irinotecán (CPT-11) muestran la efectividad de esta asociación en este tipo de tumores administrados tanto en primera como segunda línea de terapia (*Becouarn Y y col, 2001; Scheithauer W y col, 2002*). Asimismo, nuestros datos muestran la eficiencia *in vitro* de otros inhibidores de la Topoisomerasa I como el TPT combinados con Oxaliplatino en líneas colorrectales. Estos resultados concuerdan con datos previos obtenidos por nuestro grupo, que muestran que no existen diferencias moleculares a este nivel entre los diferentes inhibidores de Topoisomerasa I cuando se combinan con otros agentes con mecanismos de acción diferentes como el 5-FU o el Tomudex (*Taron M y col, 1999c*).

Una vez determinada la eficacia de la combinación de Oxaliplatino y 5-FU tanto en líneas sensibles como resistentes a 5-FU y tras la observación de este efecto de “reversión” de la resistencia a 5-FU observado en la línea HT29-5FUR, surge la cuestión de intentar elucidar qué mecanismos intervienen en la citotoxicidad de estos agentes en combinación tanto en las líneas sensibles como en las resistentes. Un primer nivel de aproximación consiste en el análisis de la TS, diana terapéutica del 5-FU, como parámetro directamente relacionado con la sensibilidad a este fármaco.

Los resultados muestran que la exposición a Oxaliplatino (administrado como agente único) disminuye los niveles de expresión (ARNm) de TS. Esto es lógico si tenemos en cuenta que el Oxaliplatino por su mecanismo de acción provoca la inhibición de la replicación celular, inhibición que se traduce en una disminución de la expresión de determinados genes implicados en estos procesos tales como la TS y la Topoisomerasa I, tal y como detallaremos posteriormente. Estos resultados coinciden con los presentados por *Pendyala L y col (2001)* que observan la disminución de la expresión de TS y γ GST en pacientes con cáncer colorrectal avanzado tras el tratamiento con Oxaliplatino. Los resultados sugieren que el Oxaliplatino podría estar influyendo en la transcripción de determinados genes implicados en la replicación del

ADN, o bien que tras el tratamiento con Oxaliplatino se estaría seleccionando una población celular determinada con este perfil de expresión génica.

Por otro lado, la caída de los niveles de expresión de TS en todas las parejas sensibles/resistentes correlaciona con la disminución de las dosis de 5-FU requeridas por estas líneas en el esquema secuencial de combinación Oxaliplatino → 5-FU, y permite explicar la sinergia observada en esta asociación. Además este dato es particularmente importante, en el caso de las líneas resistentes a 5-FU pues la exposición previa a Oxaliplatino “revierte” el fenotipo de resistencia en estas líneas celulares, sensibilizándolas de nuevo al tratamiento con 5-FU.

Analizamos también el perfil proteico de TS en los intervalos tras la exposición a Oxaliplatino como agente único. Teóricamente, si el Oxaliplatino actúa reteniendo la síntesis celular, los requerimientos de TS deberían disminuir. En las líneas parentales sensibles (HT29 y LoVo) se observó una disminución de los niveles proteicos de TS tras la exposición a Oxaliplatino. En cambio, en las líneas resistentes los niveles enzimáticos se mantuvieron ligeramente inferiores (LoVo-5FUR) o similares (HT29-5FUR) a los de los respectivos controles sin tratar. En el caso de la línea LoVo-5FUR los niveles de proteína correlacionaron con los niveles de expresión del gen (que se mantenían respecto al control sin tratar), pero no sucede lo mismo para la línea HT29-5FUR donde se observaba una clara disminución en la expresión del gen justo en el momento de retirar el Oxaliplatino del medio. La discordancia entre los niveles de proteicos y de expresión en esta línea podría obedecer a diferentes razones: 1) una mayor eficiencia de la traducción (*Kawakami K y col, 2001*); 2) una mayor estabilidad del polipéptido resultante que presentaría un tiempo de vida media más prolongado, 3) o quizás sea debido a una menor tasa de crecimiento en esta línea celular en relación a la correspondiente línea sensible, de forma que incorporaría una menor cantidad de Oxaliplatino por lo que la inhibición de la síntesis no sería total y por tanto, existirían niveles de TS suficientes para garantizar la inhibición de su traducción. Quizás una exposición más continuada a Oxaliplatino o una dosis mayor nos permitiría finalmente observar también la disminución proteica en esta línea HT29-5FUR. Por último, señalar que tal y como ya comentábamos anteriormente, las discordancias entre ARNm y proteína sugieren que los cambios traduccionales y post-traduccionales de la enzima también deben ser tenidos en cuenta.

Cuando comparamos los niveles de proteína TS en la asociación OXA/5-FU respecto a la exposición a 5-FU como agente único, observamos que igual que ocurría con la expresión del ARNm, los niveles enzimáticos aumentaron durante la exposición a 5-FU tanto administrado como agente único o en combinación con Oxaliplatino. Estos resultados están en la línea de datos previos en la literatura (*Chu E y col, 1993; Welsh SJ y col, 2000*) y se interpretan como la respuesta celular a la presión ejercida por el 5-FU. Aparece además una doble banda correspondiente a la TS ligada puesto que estamos administrando 5-FU (a las dosis DI_{50} para cada una de las líneas celulares). Globalmente se observó que a las 12h de exposición a 5-FU, los niveles de TS fueron ligeramente superiores para la asociación Oxaliplatino→5-FU respecto al 5-FU como agente único en las líneas celulares HT29 y HT29-5FUR, mientras que a las 24h de exposición a 5-FU los niveles totales de proteína fueron inferiores en aquellas células tratadas previamente con Oxaliplatino cuando se comparan con la exposición a 5-FU como agente único, dato que correlacionaría con los niveles de expresión del mensajero y con la disminución de la dosis de 5-FU en la combinación.

Los resultados de este apartado muestran que la asociación de Oxaliplatino/5-FU es sinérgica. La TS es un buen marcador de la respuesta a quimioterapia a 5-FU tanto administrado como agente único o en combinación. La exposición a Oxaliplatino previa a 5-FU en los esquemas secuenciales Oxaliplatino→5-FU en las líneas HT29/HT29-5FUR y LoVo/LoVo-5FUR conlleva una disminución en la expresión de TS (ARNm y proteína) cuando se compara con los niveles observados durante la exposición a 5-FU como agente único en todas las líneas celulares analizadas tanto sensibles como resistentes a 5-FU. Los cambios proteicos fueron ligeros en comparación a los observados a nivel de ARNm. La caída en los niveles de TS tras la exposición previa a Oxaliplatino en el esquema Oxaliplatino→5-FU correlaciona con la disminución de la dosis de 5-FU requerida en combinación por estas líneas y también con la reversión del fenotipo de resistencia a 5-FU en las líneas resistentes.

Para el caso de la asociación de Oxaliplatino e inhibidores de Topoisomerasa I también se analizó si la sinergia observada en las parejas sensibles/resistentes estaba o no relacionada con cambios en la expresión del gen Topoisomerasa I (ARNm) como parámetro directamente relacionado con la sensibilidad a los inhibidores de

Topoisomerasa I teniendo en cuenta además que, para el caso del TPT, la exposición previa a Oxaliplatino permitió sobrepasar el patrón de resistencia cruzada a este agente en la línea LoVo-5FUR, igualando las dosis de TPT requeridas en la combinación hasta dosis similares a las requeridas por la línea parental sensible.

Nuestros resultados muestran que tras la exposición a Oxaliplatino como agente único y justo en el momento de retirar el fármaco del medio de cultivo, existe una clara desregulación en los niveles de expresión de Topoisomerasa I. Sin embargo, durante la exposición a TPT tanto como agente único o tras la exposición previa a Oxaliplatino en el esquema secuencial OXA→TPT, se observa un incremento en los niveles de Topoisomerasa I que se traduce como la respuesta celular al fármaco, si bien este incremento al igual que sucedía con la TS es mucho menor cuando Oxaliplatino se administra previo a TPT. Para nuestro conocimiento, este es el primer estudio que muestra la disminución de los niveles de Topoisomerasa I tras la exposición previa a Oxaliplatino. Tal y como hemos comentado ya anteriormente para la TS, parece que el Oxaliplatino al igual que otros agentes platinados podría estar regulando la expresión de Topoisomerasa I secuestrando determinados factores de transcripción que activan la expresión del gen (*O'Dwyer y col, 1999*).

Esta disminución en la expresión de Topoisomerasa I permite explicar la sinergia de la asociación y justificar que sea posible reducir las dosis de TPT tras la administración de Oxaliplatino, incluso en aquellas líneas que presentaban resistencia cruzada a este agente (LoVo-5FUR). Sin embargo, y teniendo en cuenta que la disminución de los niveles de Topoisomerasa I constituye en sí un mecanismo de resistencia a CPT-11 y sus análogos (*Rothenberg ML, 2001*), nuestro estudio muestra que quizás sea necesario o aconsejable esperar un intervalo de tiempo tras la exposición a Oxaliplatino y antes de administrar el inhibidor de Topoisomerasa I, de forma que así podamos incrementar la efectividad de éste último, o bien, y dado que el esquema secuencial opuesto TPT→OXA resultó igualmente efectivo, sería aconsejable administrar el inhibidor de Topoisomerasa I previo al Oxaliplatino.

Además nuestro estudio está en la línea de otros presente en la literatura (*Zeghari-Squall N y col, 1999; Guichard S y col, 2001*) acerca de la asociación de

Oxaliplatino e Irinotecán que ya apuntaban a la existencia de una interacción entre ambos fármacos a nivel molecular que podría ser el origen del efecto sinérgico de la combinación secuencial. Por un lado, el Oxaliplatino actuaría favoreciendo la inhibición de la elongación de la síntesis celular durante un período más prolongado, mejorando así el efecto citotóxico provocado por el CPT-11. Asimismo, el CPT-11 actuaría enlenteciendo la reversión de los “aductos” (enlaces covalentes) que los agentes platinados generan con el ADN de forma que el Oxaliplatino estaría más tiempo ligado al ADN, favoreciéndose así su acción citotóxica. Por otro lado, es un hecho establecido que la Topoisomerasa I desempeña un papel en la reparación celular (*Gobert C y col, 1999*). Parece que esta enzima actuaría uniéndose a complejos reparadores del ADN (de la vía de los *Nucleotide Excision Repair*, NER), y también uniéndose directamente a la p53 mediante interacciones proteína-proteína (*Guichard S y col, 2001; Gobert C y col, 1999*). Su unión a estos complejos reparadores podría estar permitiendo entre otras cosas, el desplazamiento de la p53 al núcleo de manera que pueda ser activada (por otras moléculas relacionadas con la Topoisomerasa I como la caseína-KII) transactivando a su vez numerosos genes implicados en la reparación y/o en el caso que ésta no fuera posible activando las vías apoptóticas (*Gobert C y col, 1999*). Teniendo en cuenta estos datos, podríamos hipotetizar que la inhibición de la actividad de la Topoisomerasa I mediante agentes específicos (TPT en nuestro modelo y probablemente también otras camptotecinas) podrían “alterar” entre otras cosas el papel de esta enzima en la reparación, hecho que podría explicar al menos en parte el enlentecimiento de la reversión de los aductos generados por el Oxaliplatino y por tanto la menor eficiencia en la reparación de los mismos. Por otro lado, el propio Oxaliplatino es capaz de reducir los niveles de expresión de determinados genes de la vía reparadora del NER (ERCC1 y XPA) (*Guichard S y col, 2001*), y esa desregulación también podría estar contribuyendo a una menor reparación de los aductos que estarían más tiempo ligados al ADN lo que conllevaría un incremento en la citotoxicidad celular provocado por el fármaco. Los estudios actuales señalan que uno de los genes de reparación implicados directamente en la reparación de las lesiones inducidas por el Oxaliplatino, es el XRCC-1, perteneciente a la vía de reparación de *Base Excision Repair*, BER. Algunos estudios en pacientes afectados de cáncer de colon, muestran la correlación inversa entre la disminución en la actividad de esta enzima y la respuesta a Oxaliplatino

(*Stoehlmacher J y col, 2001*). Probablemente y al igual que ocurre con la vía NER, la administración de Oxaliplatino en estas líneas conduzca a una disminución en los niveles de esta enzima implicada en los procesos de reparación, aunque se requieren más estudios para confirmar estas hipótesis.

Asimismo, el hecho que Oxaliplatino esté durante más tiempo ligado al ADN se traduce probablemente en un bloqueo más persistente de la síntesis celular, hecho que favorece la acción de fármacos específicos de esta fase de síntesis tales como los inhibidores de Topoisomerasa I e inhibidores de TS (fluoropirimidinas). Este dato concuerda con la sinergia observada en estas asociaciones. De hecho existen evidencias (*Zeghari-Squalli N, y col, 1999*) que demuestran que tras la exposición a Oxaliplatino se produce una inhibición de la síntesis y la elongación del ADN, favoreciéndose de esta manera la actuación del inhibidor de Topoisomerasa I (SN38, metabolito activo del CPT-11). Este bloqueo de la síntesis correlaciona con la disminución que nosotros observamos en la expresión de Topoisomerasa I y también de TS tras la exposición a Oxaliplatino, pues el requerimiento celular de estos genes implicados en la síntesis es menor. *Zeghari-Squalli N y col*, muestran además que este bloqueo es mucho más marcado si se deja un pequeño intervalo de tiempo tras la administración de Oxaliplatino (3-6h) previo a la exposición a CPT-11, tal y como ya postulábamos anteriormente. Por otro lado, *Guichard S y col (2001)* demuestran además que mientras que el Oxaliplatino administrado como agente único no es capaz de activar a la enzima poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP), los inhibidores de la Topoisomerasa I (en concreto el CPT-11) son capaces de activar esta vía. Al administrar ambos fármacos en combinación, el Oxaliplatino reduciría la activación de la PARP debida a CPT-11, de manera que disminuye la señalización de reparación y retención del ciclo celular y se activan las cascadas de señalización que conducen a la apoptosis.

Señalar por último que nuestro estudio junto con otros presentes en la literatura, permite clarificar el mecanismo de interacción entre ambos fármacos (Oxaliplatino e inhibidores de Topoisomerasa I), y muestran también la complejidad de las vías implicadas en la sinergia de la combinación.

Por tanto, la caída en los niveles de expresión de TS y Topoisomerasa I correlaciona con la sinergia observada en estas combinaciones, pudiendo ser considerados como marcadores de la sensibilidad a inhibidores de TS e inhibidores de Topoisomerasa I, cuando estos agentes se administran solos o en combinación

Por otro lado, no hemos de olvidar el papel que determinados parámetros biológicos tales como la p53 o el estado de los genes reparadores, podrían estar contribuyendo a un incremento en la eficacia de las combinaciones estudiadas. De hecho, un estudio reciente sugiere que estos dos parámetros podrían ser utilizados en la clínica como marcadores predictivos de la respuesta a quimioterapia basada en 5-FU en pacientes afectos cáncer colorrectal (*Elsaleh H y col, 2001*).

Algunos estudios farmacológicos y clínicos demuestran la importancia de los defectos del sistema reparador de aparejamientos incorrectos o *Mismatch Repair* (MMR) en la respuesta a quimioterapia (*Anthoney DA y col, 1996; Aebi S y col, 1997*). Así la pérdida de la funcionalidad de alguno de estos genes reparadores correlaciona con la resistencia a cisplatino (CDDP), carboplatino y a otros agentes como los inhibidores de la Topoisomerasa II (*Fink D y col, 1998*), mientras que no parece alterar a la sensibilidad a otros fármacos como el 5-FU, Placitaxel u Oxaliplatino (*Aebi S y col, 1997*). En nuestro estudio no se observaron diferencias en la respuesta a 5-FU, Oxaliplatino y TPT administrados como agentes únicos y/o en combinación en las líneas celulares estudiadas. Más importante es remarcar que existen muy pocos estudios en la literatura que muestren la relación entre el estado del sistema reparador MMR y la expresión de determinados genes implicados en la síntesis de ADN (como TS y Topoisomerasa I). Parece que las células tumorales con deficiencias en el sistema MMR (fenotipo RER+) podría tener una ventaja selectiva en el crecimiento respecto a las células tumorales RER-, de forma que al proliferar más rápidamente presentarían niveles de TS superiores hecho que implicaría la menor eficacia del tratamiento con 5-FU. Por tanto, la bajada de expresión de TS, un gen implicado en la síntesis celular, observada tras la administración de Oxaliplatino en los esquemas secuenciales Oxaliplatino/5-FU justifica la eficacia de esta asociación incluso en tumores RER+. *Fink D y col (1998)* señalan que las proteínas del sistema reparador MMR podrían actuar como detectores de los *complejos de escisión* generados tras la unión de

determinados inhibidores de Topoisomerasa II a la enzima, o bien que actuarían estabilizando la acción de este tipo de agentes con lo que se incrementa el daño inducido en el ADN. Poco se conoce respecto al sistema reparador en el reconocimiento de las lesiones inducidas por los inhibidores de Topoisomerasa I. En el presente estudio no se encontraron diferencias en la sensibilidad a estos inhibidores en referencia al estado del sistema reparador. Nuestro estudio sugiere también la existencia de una posible interacción directa o indirecta entre Oxaliplatino y la enzima Topoisomerasa I, de forma que la disminución de los niveles de esta enzima tras la administración de Oxaliplatino en los esquemas secuenciales Oxaliplatino/TPT indicaría una menor capacidad de la célula tumoral para reparar el daño inducido en el ADN, por lo que se justifica la efectividad citotóxica de la asociación en las líneas celulares estudiadas. Sin embargo, la sinergia observada parece un evento independiente del estado del fenotipo RER+.

El papel de la p53, que aparece frecuentemente mutada en tumores, en la respuesta a quimioterapia ha sido ampliamente investigado, si bien los resultados son aún hoy controvertidos. Según un análisis realizado por el *National Cancer Institute* en un panel de 60 líneas celulares de tumores humanos (*O'Connor PM y col, 1997*), aquellas líneas con mutaciones en p53 tienden a ser menos sensibles cuando se comparan con las líneas *wild-type*, a la mayoría de los fármacos antineoplásicos incluyendo agentes que actúan directamente lesionado al ADN (platinos, entre otros), antimetabolitos (5-FU) e inhibidores de la Topoisomerasa I y II (*O'Connor PM y col, 1997; Yang B y col, 1996*). En el presente estudio, la sensibilidad de las líneas colorrectales a los diferentes fármacos utilizados (Oxaliplatino, TPT y 5-FU) administrados como agentes únicos y/o en combinación parece un hecho independiente del estado de p53.

Por otro lado, las evidencias sugieren que p53 desempeña al menos dos papeles en la respuesta a quimioterapia: actúa reteniendo el ciclo celular y favoreciendo la reparación (por su unión a complejos de reparación y a otras enzimas como la Topoisomerasa I) (*Gobert C y col, 1999*) y como activador de la apoptosis cuando las lesiones no pueden ser reparadas (*Bunz F y col, 1999*). Además, se conoce que la p53

forma complejos ribonucleoproteína con TS (*Chu E y col, 1999*), de forma que la TS tendría un efecto regulador negativo sobre la expresión de p53 (*Ju J y col, 1997*). Un estudio más reciente (*Paradiso A y col, 2000*), muestra que p53 podría también estar modulando de forma indirecta la expresión de TS a través de la modulación de determinados factores de transcripción. En base a ello, podríamos pensar que la bajada de expresión de TS y Topoisomerasa I observada tras la exposición previa a Oxaliplatino, podría contribuir a la activación y el mantenimiento de la expresión de p53 durante un período de tiempo más prolongado como respuesta al daño citotóxico, de forma que se activaría la señalización hacia apoptosis. Estos datos correlacionarían con el incremento en la citotoxicidad celular observados en estas combinaciones.

Se analizó finalmente, si la citotoxicidad observada en el esquema de asociación Oxaliplatino/5-FU estaba asociada a un proceso de muerte celular programada (apoptosis). Teóricamente, los fármacos antineoplásicos actúan bloqueando la proliferación celular y activando cascadas de señalización hacia que conducen finalmente a la célula a una muerte por apoptosis. Teniendo en cuenta que la asociación de Oxaliplatino/5-FU resulta en un incremento en la citotoxicidad celular cuando se compara con la administración de estos fármacos de forma individual, cabría esperar un incremento en los procesos de muerte celular. Por otro lado, y tal como se ha señalado anteriormente, se ha de tener en cuenta el papel de la función normal de p53 como mediador de la respuesta citotóxica a los distintos agentes utilizados en quimioterapia (*Ferreira CG y col, 1999; Bunz F y col, 1999; Brown JM y col, 1999; Schmidt CA y col, 2001*), por lo que las alteraciones en p53 podrían alterar estos procesos de respuesta observándose una menor tasa de inducción de apoptosis en las líneas p53 mutadas (HT29 y HT29-5FUR) cuando se comparan con líneas celulares p53 *wild-type* (LoVo y LoVo-5FUR en este caso).

La apoptosis celular es un proceso fisiológico complejo que incluye numerosos cambios morfológicos y bioquímicos que conducen finalmente a la fragmentación del ADN y a la muerte celular. Uno de los eventos primeros en este proceso es la externalización hacia la cara externa de la membrana citoplasmática de la fosfatidil serina (PS). El análisis con Anexina V/PI permite la detección de esta PS, permitiendo detectar por citometría de flujo, el porcentaje de células que han iniciado este proceso

de apoptosis. En el presente estudio no se detectó un incremento en la apoptosis tras el tratamiento con Oxaliplatino, 5-FU o la combinación secuencial OXA→5-FU en estas líneas celulares cuando se comparan con el respectivo control sin tratar. Tampoco observamos un patrón de apoptosis tras el análisis de fragmentación del ADN en las células tratadas, pese al incremento de citotoxicidad observado. Estas evidencias sugieren que la apoptosis no es el principal mecanismo de muerte celular en el modelo estudiado. La disminución o la ausencia de apoptosis debida al tratamiento ya ha sido descrita anteriormente en la literatura (*Roninson IB y col, 2001*) y puede explicarse por: 1) el incremento en el número de células con una retención permanente de la proliferación que presentan características fenotípicas de senescencia celular (*Chang BD y col, 1999; Roninson IB, 2001*); o bien, 2) un aumento en los procesos de muerte celular por catástrofe mitótica como consecuencia de una mitosis aberrante (*Roninson IB y col, 2001*). Este tipo de muerte celular ocurre en células que vuelven a entrar en ciclo después de la retención inducida por la administración de un agente quimioterápico. Pero mientras que este proceso parece ser un evento independiente del estado de p53 (*Roninson IB y col, 2001*), el estado del sistema reparador del ADN (fenotipo RER+) podría desempeñar un papel importante, pues al no reparar correctamente el ADN, estaría contribuyendo a la acumulación de más aberraciones provocando la entrada en mitosis de formas aberrantes. Por otro lado, las evidencias sugieren que el estado de los genes del sistema MMR desempeña un papel en la retención del ciclo en G2/M. La retención en G2 (punto de control antes de entrar en mitosis) es mucho menor en las células deficientes en MMR (fenotipo RER+), debido a una menor fosforilación y un menor tiempo de fosforilación (magnitud y duración) de la proteína cdc2 (complejo ciclina B1/cdc2 regula la transición de G2 a M) (*Yan T y col, Cancer Res 2001*).

Por último señalar, que estos dos procesos de muerte celular (senescencia y/o catástrofe mitótica) tras el tratamiento con quimioterapia puede tener relevancia en la clínica (*Roninson IB y col, 2001*). Así la micronucleación, característica de la catástrofe mitótica (*Widel M y col, 1999*) o la expresión de marcadores de senescencia inducida por el tratamiento con quimioterapia o radioterapia podrían ser utilizados como marcadores de respuesta. Por otro lado, la catástrofe mitótica se traduce *in vivo* en una necrosis celular que causa inflamación local (*Cohen-Jonathan E y col, 1999*) que sería

beneficiosa para el tratamiento antitumoral. La profundización en los mecanismos relacionados con los procesos de muerte celular podría contribuir a la eficacia de la terapia.

- CONCLUSIONES -

RESUMEN DE RESULTADOS

Objetivo 1.

1. La exposición continuada a 5-Fluorouracilo en las líneas sensibles HT29 y LoVo hasta dosis de 2 μ M y 7 μ M respectivamente, conduce a la selección de una población refractaria a 5-FU (HT29-5FUR y LoVo-5FUR). Por tanto, el 5-FU actúa como agente seleccionador destruyendo a la población sensible y seleccionando a la población resistente, reproduciendo así lo que ocurriría *in vivo*.
2. La población resistente a 5-FU presenta las siguientes características:
 - a) Una tasa de crecimiento estable y comparable a la de las células control tanto en presencia como ausencia de 5-FU (a la dosis a la que se ha inducido la resistencia).
 - b) Un patrón de ciclo celular comparable a la de las células parentales, no observándose retención en fase S pese a la presencia de 5-FU.
 - c) Las líneas HT29-5FUR y LoVo-5FUR presentan un grado de resistencia moderada de 5 y 3 veces superior respectivamente, a las correspondientes líneas sensibles HT29 y LoVo.
 - d) La inducción de resistencia a 5-FU en estas líneas no alteró la sensibilidad a Oxaliplatino ni tampoco a inhibidores de Topoisomerasa I cuando se comparan con las correspondientes líneas sensibles a excepción de la línea LoVo-5FUR que presentó un patrón de resistencia cruzada a inhibidores de Topoisomerasa I (TPT; CPT-11 y su metabolito activo SN-38).
 - e) Las líneas resistentes a 5-FU (HT29-5FUR y LoVo-5FUR) presentan un incremento en los niveles de expresión de TS (ARNm y proteína) que explica la diferente sensibilidad al fármaco. El incremento en la expresión de TS no se debe a un proceso de amplificación génica, tal y como muestra el análisis por Southern Blot.
 - f) El análisis por Hibridación Genómica Comparativa (CGH) muestra que *no* existe una ganancia en la zona cromosómica del 18p, donde se localiza el gen de la Timidilato Sintasa (TS) e identifica nuevas regiones de ganancias (5p, 6p, 7, 8q) y pérdidas (3q) cromosómicas potencialmente implicadas en la resistencia a 5-FU.
 - g) La inducción de resistencia a 5-FU en estas líneas no altera el estado de p53 ni del fenotipo RER.
3. La actividad de Oxaliplatino, Topotecán y 5-FU administrados como agentes únicos en líneas sensibles (HT29, LoVo, DLD-1 y LS-513) y resistentes a 5-FU (HT29-5FUR y LoVo-5FUR) es independiente del estado de p53 y/o del fenotipo RER.

Objetivo 2.

1. Los esquemas secuenciales propuestos son sinérgicos, a excepción de la línea LoVo-5FUR que mostró aditividad en el esquema secuencial 5-FU→OXA, la línea LS-513 en la misma combinación

donde se observa antagonismo a dosis medias/bajas de los fármacos y la línea DLD-1 que mostró aditividad en el esquema TPT→OXA a dosis medias/altas los fármacos.

2. La sinergia de estas asociaciones es independiente del fenotipo de resistencia a 5-FU, del estado de p53 y del estado del sistema reparador del ADN (fenotipo RER).
3. La exposición previa a Oxaliplatino en el esquema secuencial Oxaliplatino→5-FU en la línea HT29-5FUR, permite disminuir las dosis de 5-FU en la combinación hasta niveles similares a los obtenidos para la línea parental sensible HT29. Por tanto, ***la administración previa de Oxaliplatino es capaz de “revertir” el fenotipo de resistencia inducido a 5-FU en esta línea celular.***
4. La administración de Oxaliplatino en el esquema secuencial Oxaliplatino → TPT permite disminuir las dosis de TPT en todas las líneas celulares estudiadas. En concreto, en el caso de la línea LoVo-5FUR, la exposición previa a Oxaliplatino permite reducir las dosis de TPT en la combinación hasta niveles similares a los obtenidos para la línea parental sensible LoVo, permitiendo por tanto, ***“sobrepasar” el patrón de resistencia cruzada aparecido tras la inducción de resistencia a 5-FU en esta línea celular.***

Objetivo 3.

1. La exposición a Oxaliplatino administrado como agente único induce la desregulación de los niveles de expresión de TS (ARNm y proteína) y Topoisomerasa I (ARNm) tanto en las líneas sensibles como en las líneas resistentes a 5-FU.
2. La exposición a Oxaliplatino previa a 5-FU en los esquemas secuenciales Oxaliplatino→5-FU en las líneas HT29/HT29-5FUR y LoVo/LoVo-5FUR, conlleva una disminución en la expresión de TS (ARNm y proteína) cuando se compara con los niveles observados durante la exposición a 5-FU como agente único en todas las líneas celulares analizadas tanto sensibles como resistentes a 5-FU.
3. La exposición previa a Oxaliplatino en el esquema secuencial Oxaliplatino→TPT en la pareja LoVo/LoVo-5FUR, también se traduce en una disminución en los niveles de expresión del gen Topoisomerasa I cuando se compara con los niveles de expresión obtenidos durante la exposición a TPT como agente único en todas las líneas celulares analizadas.
4. La disminución en los niveles de expresión de TS y Topoisomerasa I tras la exposición previa a Oxaliplatino en todas las líneas celulares correlaciona con la disminución de la dosis de 5-Fluorouracilo y Topotecán en la combinación, respectivamente.

5. La caída en los niveles de TS y Topoisomerasa I tras la exposición previa a Oxaliplatino es independiente del estado de la p53 y/o del estado de los genes reparadores de apareamientos incorrectos (fenotipo RER+) en las parejas sensible/resistente.

6. No se observó un patrón claro de muerte por apoptosis en las muestras analizadas tras la exposición a OXA, 5FU como agentes únicos y en combinación (OXA/5FU), tanto en líneas sensibles (HT29 y LoVo) como resistentes a 5FU (HT29-5FUR y LoVo-5FUR). La ausencia de apoptosis parece además un evento independiente del estado de p53 y del fenotipo RER de estas líneas celulares.

CONCLUSIONES

Objetivo 1

1. La administración prolongada de 5-FU conduce a la selección dentro del tumor de una población celular que adquiere nuevas características genotípicas y fenotípicas respecto a la población inicial.
2. Estas características adquiridas les confieren una ventaja selectiva en el crecimiento permitiéndoles predominar dentro de la población tumoral.
3. La adaptación de estas líneas al 5-FU está mediada por la acumulación de aberraciones cromosómicas (ganancias/pérdidas) que contribuyen a la aparición de la resistencia a la droga, y por tanto, a la ineficacia del tratamiento
4. La sobreexpresión de *Timidilato Sintasa* ante la exposición a 5-FU es una característica de las células resistentes.
5. La inducción de resistencia a 5-FU puede generar resistencia cruzada a drogas con mecanismos de acción diferente a los que no habían sido expuestas previamente.
6. La actividad de Oxaliplatino, Topotecán y 5-FU administrados como agentes únicos es independiente del estado de p53 y/o de las deficiencias en el sistema reparador MMR (fenotipo RER).

OBJETIVO 2.

1. Las combinaciones de Oxaliplatino/5-FU y Oxaliplatino/TPT son sinérgicas tanto en líneas sensibles como resistentes a 5-FU

2. La sinergia de estas asociaciones es independiente del estado de p53 y del fenotipo RER
3. La combinación de Oxaliplatino/Inhibidores de Topoisomerasa I representan una alternativa en el tratamiento del cáncer colorrectal avanzado.

OBJETIVO 3.

1. La disminución en los niveles de expresión de TS (ARNm y proteína) debido a la exposición a Oxaliplatino previa a 5-FU en el esquema secuencial Oxaliplatino→5-FU cuando se compara con el 5-FU administrado como agente único, puede explicar la sensibilización *de nuevo* de las líneas resistentes al tratamiento con 5-FU
2. La disminución en los niveles de expresión del gen de la Topoisomerasa I provocada por la exposición de Oxaliplatino previa al inhibidor de Topoisomerasa I (TPT) en el momento de retirar el fármaco del medio, señala la necesidad de administrar los derivados de la camptotecina previo a Oxaliplatino, ya que niveles de expresión disminuidos de esta enzima representan uno de los mecanismos principales de resistencia al tratamiento con inhibidores de la Topoisomerasa I.
3. La desregulación de los niveles de expresión de TS y Topoisomerasa I tras la exposición a Oxaliplatino administrado como agente único y/o en combinación es un evento independiente del fenotipo de resistencia a 5-FU, el estado de p53 y/o del fenotipo RER
4. La apoptosis no es el mecanismo principal de muerte celular en la asociación de Oxaliplatino y 5-FU.

CONCLUSIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

La resistencia adquirida a 5-FU es un evento multifactorial. La asociación de Oxaliplatino e inhibidores de Topoisomerasa I representa una alternativa en el tratamiento de tumores colorrectales sensibles y refractarios a 5-FU. La desregulación de los niveles de expresión de Timidilato Sintasa y Topoisomerasa I tras la exposición a Oxaliplatino en los esquemas secuenciales Oxaliplatino/5-FU y Oxaliplatino/TPT dan una nueva interpretación al sinergismo observado en estas combinaciones tanto en tumores sensibles como en tumores que han progresado a 5-FU. La capacidad del Oxaliplatino para revertir la resistencia a 5-FU queda demostrada en la línea HT29-5FUR y estaría en relación con la caída de los niveles de TS. Es recomendable la administración de los derivados de la camptotecina previa a la administración de Oxaliplatino.

- BIBLIOGRAFIA -

1. Abad A, Taron M, Manzano JL. *Quimioterapia sistémica de las metástasis hepáticas*. Rev Cancer 2001, 15:37-43
2. Abad A. *Capítulo 29: cáncer de colon y recto*. En: Manual de Oncología Clínica y Molecular. Ed Arán, 2000
3. Abad A. *Oxaliplatino*. Rev Cancer 1998 (supl 1) 102-103
4. Adlar JW, Richman SD, Seymour MT y col. *Prediction of the response of colorectal cancer to systemic therapy*. Lancer Oncol 2002, 3: 75-82
5. Aebi S, Fink D, Gordon R y col. *Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair-deficient cells*. Clin Cancer Res 1997, 3:1763-1767
6. Anthony DA, McIlwrath LJ, Gallagher WM y col. *Microsatellite Instability, apoptosis and loss of p53 function in drug-resistant tumour cells*. Cancer Res 1996, 56: 1374-1381
7. Aschele C, Sobrero A, Faderan MA y col. *Novel mechanisms of resistance to 5-Fluorouracil in human colon cancer (HCT-8) sublines following exposure to two different clinically relevant dose schedules*. Cancer Res 1992, 2:1855-1864
8. Banerjee D, Schneiders B, Fu JZ y col. *Role of E2F-1 in chemosensitivity*. Cancer Res 1998, 58:4292-4296
9. Bates S, Ryan KM, Phillips AC y col. *Cell cycle arrest and DNA endoreplication following p21 waf-1/cip1 expression*. Oncogene 1998, 17:1691-1703
10. Becouarn Y, Gamelin E, Coudert B y col. *Randomized multicentre phase II study comparing a combination of fluorouracil and folinic acid and alternating irinotecan and oxaliplatin with oxaliplatin and irinotecan in fluorouracil-pretreated metastatic colorectal cancer patients*. J Clin Oncol 2001, 19(22): 4195-4201
11. Belt JA, Marina NM, Phelps DA y col. *Nucleoside transport in normal and neoplastic cells*. Adv Enzyme Regul (1993) 3:235-252
12. Berger SH, Jen CH, Johnson LF y col. *Thymidylate Synthase overproduction and gene amplification in fluorodeoxyuridine-resistant human cells*. Mol Pharmacol 1985, 28:461-467
13. Bogusky MS, McCormick F. *Proteins regulating ras and its relative*. Nature 1993, 366:643-654
14. Boige V, Fallik D, Borrini F y col. *Role of the DNA mismatch repair system in the responsiveness of Metastatic Colorectal Cancers to chemotherapy with CPT-11 (Irinotecan)*. Proc Am Assoc Cancer Res 2001, 696: 3749
15. Brown JM, Wouters BG. *Apoptosis, p53 and tumor cell sensitivity to anticancer agents*. Cancer Res 1999,59:1391-1399
16. Bullock AN, Fersht AR. *Rescuing the function of mutant p53*. Nature Reviews 2001, 1(1): 68-76
17. Bunz F, Durrant A, Lengauer C y col. *Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage*. Science 1998, 282: 1497-1501
18. Bunz F, Hwang PM, Torrance C y col. *Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents*. J Clin Invest 1999, 104 (3): 263-269
19. Cao D, Handschumacher RE, Pizzorno G. *Uridine Phosphorylase plays a crucial role in 5-fluorouracil metabolism and its anti-proliferative activity*. Proc Am Assoc Cancer Res 2001, 509:2741
20. Carethers JM, Chauhan DP, Fink D y col. *Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-Fluorouracil*. Gastroenterology 1999, 117:123-131
21. Carrato A. *Tomudex*. Rev Cancer 1998 supl 1: 97-99
22. Chaney SG, Vaisman A. *K Specificity of platinum DNA-repair*. J Inorg Biochem 1999, 77(1-2): 71-81
23. Chang BD, Broude EV, Dokmanovic M, y col. *A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents*. Cancer Res 1999, 59: 3761-3767.

24. Chazal M, Cheradarme S, Formento JL y col. *Decrease folypolyglutamates synthetase activity in tumors resistant to fluorouracil-folinic acid treatment: clinical data.* Clin Cancer Res (1997) 3:553-557
25. Chen ZS, Sumizawa T, Furukawa T y col. *An enhanced active efflux of CPT-11 and SN38 in cisplatin-resistant human KB carcinoma cells.* Cancer Letters 1999, 138(1-2): 13-22
26. Chu E, Koeller DM, Casey JL y col. *Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase.* Proc Natl Acad Sci 1991, 88:8977-8981
27. Chu E y col. *Regulation of Thymidylate Synthase in human colon cancer cells treated with 5-Fluorouracil and interferon-g.* Mol Pharmacol 1993, 43:527-533.
28. Chu E, Copur SM, Ju J y col. *Thymidylate Synthase protein and p53 mRNA form an in vivo ribonucleoprotein complex.* Mol Cell Biol 1999, 19(2): 1582-1594
29. Chung YM, Park S, Park JK y col. *Establishment and characterization of 5-Fluorouracil-resistant gastric cancer cells.* Cancer Lett 2000, 159(1): 95-101
30. Clark JL, Berger SH, Mittleman A y col. *Thymidylate Synthase gene amplification in a colon tumour resistant to fluoropyrimidine chemotherapy.* Cancer Treat Rep (1987) 71:261-265)
31. Cohen-Jonathan E, Bernard EJ, McKenna WG. *How radiation kill cells?* Curr Opin Chem Biol 1999, 3: 77-83
32. Copur S, Aiba K, Drake JC y col. *Thymidylate Synthase gene amplification in human colon cancer cell lines resistant to 5-Fluorouracil.* Biochem Pharmacol 1995, 49:1419-1426
33. Creemers GJ, Gerrits CJ, Schellens JH y col. *Phase II and pharmacological study of topotecan administered as a 21-days continuous infusion to patients with colorectal cancer.* J Clin Oncol 1996, 14: 2540-2545
34. Creemers GJ, Wanders J, Gamucci T y col. *Topotecan in colorectal cancer. A phase II study of the EORTC Early Clinical Trials Group.* Ann Oncol 1995 6:844-846
35. Cvitkovic E and Bekrada M. *Oxaliplatin: a new therapeutic option in colorectal cancer.* Sem Oncol 1999, 26(6): 647-662
36. Cvitkovic E, Chaney SG. *Oxaliplatin: a new option for the treatment of colorectal cancer.* Sem Oncol 1998a, 35(2) Supl 5
37. Cvitkovic E. *Ongoing and unsaid on oxaliplatin: the hope.* Br J Cancer 1998b, 77(Supl 4) 8-11
38. D'Arpa P, Beardmore C, Liu F. *Involvement of nucleic acid synthesis in cell killing mechanisms of topoisomerase I poisons.* Cancer Res 1990, 50(21):6919-24
39. De Angelis PM, Clausen OP, Scjølberg A y col. *Chromosomal gains and losses in primary colorectal carcinomas detected by comparative Genomic hybridisation and their associations with tumour DNA ploidy, genotypes and phenotypes.* Br J Cancer 1999, 80 (3-4): 526-535
40. Drake JC, Voeller DM, Allegra CJ y col. *The effect of dose and interval between 5-Fluorouracil and leucovorin on the formation of Thymidylate Synthase complex in human cancer cells.* Br J Cancer 1995, 71:1145-1150
41. Edler D, Hallström M, Johnston PG y col. *Thymidylate Synthase Expression: an independent prognostic factor for local recurrence, distant metastasis, disease-free and overall survival in rectal cancer.* Clin Cancer Res 2000, 6:1378-1384
42. Elsaleh H, Powell B, McCaul k y col. *p53 alteration and microsatellite instability have predictive value for survival benefit from chemotherapy in stage III colorectal carcinoma.* Clin Cancer Res 2001, 7:1343-1349
43. Eng WK, McCabe FL, Tan KB y col. *Development of a stable camptothecin-resistant subline of P388 leukemia with reduced Topoisomerase I content.* Mol Pharmacol 1990, 38(4): 471-480

44. Ethiene MC, Chéradame S, Fischel JL y col. *Response to 5-Fluorouracil therapy in cancer patients: the role of tumoral Dihydropyrimidine Dehydrogenase activity*. J Clin Oncol 1995, 13(7):1663-1670
45. Faivre S, Bourdon O, Bensmaine MA y col. *Placitaxel/Oxaliplatin association in pre-treated recurrent ovarian carcinoma patients*. Proc Am Soc Clin Oncol 1997, 16:369a
46. Fallik D, Sabourin JC, Bourini F y col. *Response of metastatic colorectal cancers to treatment with CPT-11 (Irinotecan): implications of the mismatched base repair system*. Gastroenterol Clin Biol 2000, 24(10): 917-922
47. Fearon ER y Vogelstein B A *genetic model for colorrectal carcinogenesis*. Cell 1990, 61:759-67
48. Ferreira CG, Tolis C, Giaccone G. *p53 and chemosensitivity*. Ann Oncol 1999, 10:1011-1021
49. Fink D, Aebi S, Howell SB. *The role of DNA mismatch repair in drug resistance*. Clin Cancer Res 1998, 4:1-6
50. Fink D, Nebel S, Aebi S, y col. *The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance*. Cancer Res 1996, 46:4481-4886
51. Fink D, Nebel S, Norris PS y col. *The effect of different chemotherapeutic agents on the enrichment of DNA mismatch repair- deficient tumour cells*. Br J Cancer 1998b, 77:703-708
52. Garland Publishing, NCBI. *Part IV: Cells in their social context. Chapter 24: Cancer*. In Molecular Biology of the cell. 3rd edition. 2001
53. Giaccone G. *Gemcitabine plus taxane combinations in non-small cell lung cancer*. Semin Oncol 1999, 26(1, Supl 4): 19-24
54. Gobert C, Skladanowski A, Larsen AK. *The interaction between p53 and DNA topoisomerase I is regulated differentially in cells with wild-type and mutant p53*. Proc Natl Acad Sci 1999, 96:10355-10360
55. Goldie JH, Coldman JJ. *A mathematical model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate*. Cancer Treat Rep 1979, 63:1727-1733
56. Goldwasser F, Bozec L, Zeghari-Squalli N y col. *Cellular pharmacology of the combination of oxaliplatin with topotecan in the IGROV-1 human ovarian cancer cell line*. Anticancer Drugs 1999, 10(2): 195-201
57. Goldwasser Fshimizu J, Jackman J y col. *Correlations between S and G2 arrest and the cytotoxicity of camptothecin in human colon carcinoma cells*. Cancer Res 1996, 56(19):4430-4437
58. Gorlick R, Bertino JR. *Drug resistance in colon cancer*. Sem Oncol 1999, 26(6): 606-611
59. Gottlieb RA. *Cell acidification in apoptosis*. Apoptosis 1996, 1:40-48
60. Grife R, Swallow C, Bapat B y col. *Molecular Biology of colorectal cancer*. En: Current problems in Cancer 1998, Vol 2, 1-68
61. Griffith DA, Jarvis SM. *High affinity sodium-dependent nucleobase transport in cultured renal epithelial cells (LLC-PK1)*. J Biol. Chem (1993) 268 (27):20085-20090
62. Guichard S, Arnould S, Hennebelle I y col. *Combination of oxaliplatin and irinotecan on human colon cancer cell lines: activity in vitro and in vivo*. Anticancer Drugs 2001 12:1-11
63. Hansen MF, Cavenee WK. *Genetics of cancer predisposition*. Cancer Res 1987, 47:5518-27
64. Harris BE, Carpenter JT, Diasio RB. *Severe 5-fluorouracil toxicity secondary to dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. A potentially more common pharmacogenetic syndrome*. Cancer 1991 68:499-501
65. Harris BE, Song R, Soong SJ y col. *Relationship between dihydropyrimidine dehydrogenase activity and plasma 5-Fluorouracil levels with evidence for circadian variation of enzyme activity and plasma drug levels in cancer patients receiving 5-Fluorouracil by protracted continuous infusion*. Cancer Res 1990, 50: 197-201
66. Hearne CM, Ghosh S, Todd JA y col. *Microsatellites for linkage analysis of genetic traits*. Trends Genet 1992, 68(3):499-501

67. Hermanek P, Wiebelt H, Staimner D y col. *Prognostic factors of rectum carcinoma- experience of the German multicentre study SGCRC. German Study Group Colo-Rectal carcinoma.* Tumori 1995, 81:60-64
68. Hertzberg RP, Caranfa MJ, Holden KG y col. *Modification of the hydroxy lactone ring of camptothecin. Inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity.* J Med Chem 1989, 32:715-720
69. Hoff PM, Ansari R, Batist G y col. *Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III study.* J Clin Oncol 2001, 19: 2282-2292
70. Horie N, Aiba H, Oguro K y col. *Functional Analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for Thymidylate Synthase.* Cell Struct Funct 1995, 20:191-197
71. Hsiang K, Lihou MG, Liu LF. *Arrest of replication forks by drug-stabilized Topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin.* Cancer Res 1989, 49: 5077-5082
72. Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S y col. *Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I.* J Biol Chem 1985, 260:14873-14878
73. Johnson LF. *G1 events and the regulation of genes for S-phase enzymes.* Curr Opin Cell Biol 1992, 4: 149-154
74. Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG y col. *Thymidylate Synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-Fluorouracil in human colorectal and gastric tumours.* Cancer Res 1995, 55:1407-1412
75. Ju J, Pedersen-Lane J, Maley F y col. *Regulation of p53 expression by Thymidylate Synthase.* Proc Natl Acad Sci 1997, 96:3769-3774.
76. Kaneda S, Takeishi K, Ayusawawa D y col. *Role in translation of a triple tandemly repeated sequence in the 5' Untranslated Region of human Thymidylate Synthase mRNA.* Nucleic Acid Res 1987, 15(3)
77. Kanzawa F, Nishio K, Kubota N y col. *Antitumour activities of a new indolocarbazole substance NB506 and establishment of NB506-resistant cell lines SBC3/NB.* Cancer Res 1995, 55:2806-2813
78. Kanzawa F, Sugimoto Y, Minato K y col. *Establishment of a camptothecin analogue (CPT-11)-resistant cell line of human non-small cell lung cancer: Characterisation and mechanism of resistance.* Cancer Res 1990, 50:5919-5924
79. Kasahara M, Takahashi Y, Nagata T y col. *Thymidylate Synthase expression correlates closely with E2F-1 expression in colon cancer.* Clin Cancer Res 2000, 6:2707-2711
80. Kawakami K, Omura K, Kanehira E y col. *Polymorphic tandem repeat in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancer.* Anticancer Res 1999, 19(4B): 3249-52
81. Kawakami K, Salonga D, Park JM y col. *Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the Thymidylate Synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression.* Clin Cancer Res 2001, 7: 4096-4101
82. Khine K, Goh HS, Smith DR. *Prognostic significance of chromosome 5q and 17p allelic deletion in colorectal adenocarcinomas.* Int J Oncol 1995, 7: 631-635
83. Kitchens ME, Forsthoefel AM, Barbour KW y col. *Mechanisms of acquired resistance to Thymidylate Synthase Inhibitors: the role of Enzyme Stability.* Mol Pharmacol 1999a, 56(5): 1063-1070
84. Kitchens ME, Forsthoefel AM, Raquife Z y col. *Ligand-mediated induction of Thymidylate Synthase occurs by enzyme stabilization.* J Biol. Chem 1999b, 274 (18): 12544-12547
85. Knudson AG. *Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes.* Cancer Res 1985, 45:1437-43

86. Kornman M, Danenberg K, Arber N y col. *Inhibition of cyclin D1 expression in human pancreatic cells is associated with increased chemosensitivity and decreased expression of multiple chemoresistance genes.* Cancer Res 1999, 3505-3511
87. Ladner RD, Lynch F, Groshen S y col. *dUTP nucleotidohydrolase isoform expression in normal and neoplastic tissues: Association with survival and response to 5-Fluorouracil in colorectal cancer.* Cancer Res (2000)60:3493-3503
88. Landis DM, Loeb LA. *Random sequences mutagenesis and resistance to 5-Fluorouracil in human thymidylate synthase.* J Biol Chem 273(40): 25809-25817
89. Larsen AK, Gobert C. *DNA topoisomerase I in oncology: Dr Jekyll or Mr Hyde.* Pathol Oncol Res 1999, 5(3): 171-178
90. Leichman LG, Lenz HJ, Leichman L y col. *Quantitation of intratumoral Thymidylate Synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion Fluorouracil and weekly Leucovorin.* J Clin Oncol 1997, 15:3223-3229
91. Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD y col. *Thymidylate Synthase mRNA level in adenocarcinoma of the stomach: a predictor for primary tumor response and overall survival.* J Clin Oncol 1996, 14:176-182
92. Lenz HJ, Hayashi K, Salonga D y col. *p53 point mutations and thymidylate synthase messenger RNA levels in disseminated colorectal cancer: an analysis of response and survival.* Clin Cancer Res 1998, 4:1243-1250
93. Lenz HJ, Groshen S, Tsao-Wei D y col. *The role of the XRCC-1 gene in platinum based treatment of advanced colorectal cancer.* Proc Am Assoc Clin Oncol, 2001
94. Lenz HJ, Zhang W, Zahedy S y col. *A 6-base pair deletion in the 3'UTR of the thymidylate synthase (TS) gene predicts TS ARNm expression in colorectal tumors: A possible candidate gene for colorectal cancer risk.* Proc Am Assoc Cancer Res 2002, 660:3274.
95. Lessufleur T, Kornowski A, Luccioni C y col. *Adaptation to 5-fluorouracil of the heterogeneous human colon tumor cell line HT29 results in the selection of cells committed to differentiation.* Int J Cancer 1991, 49:721-739
96. Lessufleur T, Violette S, Vasile-Pandrea y col. *Resistance to high concentrations of Methotrexate and 5-Fluorouracil of differentiated HT29 colon-cancer cells is restricted to cells of enterocytic phenotype.* Int J Cancer 1998, 76: 383-392
97. Liu B, Nicolaidis NC, Markowitz S y col. *Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability.* Nat Genetics 1995, 9:48-55.
98. Lock RB, Stribinskiene L. *Dual models of death induced by etoposide in human epithelial tumor cells allow Bcl-2 to inhibit apoptosis without affecting clonogenic survival.* Cancer Res 1996, 56:4006-4012
99. Longley DB, Ferguson PR, Boyer J y col. *Characterization of a Thymidylate Synthase (TS)-inducible cell line: A model system for studying sensitivity to TS- and non-TS-targeted chemotherapies.* Clin Cancer Res 2001, 7: 3533-3539
100. Lyss AP, Lilenbaum RC, Harris BE y col. *Severe 5-Fluorouracil toxicity in a patient with decreased dihydropyrimidine dehydrogenase activity.* Cancer Invest 1993, 11:239-240;
101. Maeda K, Chung YS, Ogawa Y y col. *Thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor expression associated with hepatic metastasis in gastric carcinoma.* Br J Cancer 1996, 73:884-888
102. Martínez-López E, Abad A, Font A. *Allelic loss on chromosome 18q as a prognostic marker in stage II colorectal cancer.* Gastroenterology 1998, 114:1180-1187

103. Mastran BA, Lynch FJ, Ladner RD. *Intracellular localization of nuclear and mitochondrial isoforms of dUTPase is determined by their respective amino termini*. Proc Am Assoc Cancer Res 2001, 508: 2736
104. Mathijssen RH, Van Alphen RJ, Verweij J y col. *Clinical pharmacokinetics and metabolism of Irinotecan (CPT-11)*. Clin Cancer Res 2001, 7: 2182-2194
105. McGuire WP, Blessing JA, Bookman MA y col. *Topotecan has substantial antitumour activity as First-line salvage therapy in platinum-sensitive epithelial ovarian carcinoma: a gynecologic oncology group study*. J Clin Oncol 2000, 18(5): 1062-1067
106. McLeod HL, Murray GI. *Tumours markers of prognosis in colorectal cancer*. Br J Cancer 1999 79(2): 191-203
107. Metzger R, Danenberg K, Leichman CG y col. *High basal level gene expression of Thymidylate Phosphorylase (Platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumours is associated with nonresponse to 5-Fluorouracil*. Clin Cancer Res (1998) 4:2371-2376
108. Mi Z, Burke TG. *Differential interaction of camptothecine lactone and carboxylate forms with human blood components*. Biochemistry 1994, 33:10325-10336
109. Muñoz, *Cáncer: Genes y Nuevas Terapias*. Ed Hélice, 1997
110. Murakami Y, Kazuno H, Emura T y col. *Different mechanisms of acquired resistance to fluorinated pyrimidines in human colorectal cancer cell lines*. Int J Cancer 2000, 17(2): 277-283
111. Nehemé A, Baskaran R, Nebel S y col. *Induction of JNK and c-Abl signalling by cisplatin and oxaliplatin in mismatch repair-proficient and -deficient cells*. Br J Cancer 1999, 79(7-8): 1104-1110
112. NHI consensus conference. JAMA 1990, 264:1444-1450
113. Nita ME, Hagawa H, Tominaga O y col. *5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins*. Br J Cancer 1998, 78(8) : 986-992
114. Nita ME, Tominaga O, Nagawa H. *Dihydropyrimidine dehydrogenase but not thymidylate Synthase expression is associated with resistance to 5-Fluorouracil in colorectal cancer*. Hepato-gastroenterology 1998, 45: 2117-2122
115. Nogué M. *Tegafur y bajas dosis de leucovorín oral en el cáncer colorrectal avanzado*. Rev Cancer 1998, 12 (supl 1) 110-111
116. O'Connell M, Mailiard JA, Kahn MJ y col. *Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months postoperative adjuvant therapy for colon cancer*. J Clin Oncol 1997, 15:24
117. O'Connor PM, Jackman J, Bae I y col. *Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen and correlation with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents*. Cancer Res 1997, 57:4285-4300
118. O'Dwyer PJ, Johnson SW, Hamilton TC. *Cisplatin and its analogues*. En: Pharmacology of Cancer Chemotherapy. Chapter 19, section 5, DeVita.
119. Ogunbiyi OA, Goodfellow PJ, Gagliardi G y col. *Prognostic value of chromosome 1p allelic loss in colon cancer*. Gastroenterology (1997) 113:761-766
120. Ohira T, Nishio K, Kanzawa F y col. *Hypersensitivity of NIH3T3 cells transformed by H-ras gene to DNA-topoisomerase I inhibitors*. Int J Cancer 1996, 67(5): 702-708
121. Papamichael D. *The use of thymidylate synthase inhibitors in the treatment of advanced colorectal cancer: Current Status*. Stem Cells 2000, 18(3): 166-175
122. Paradiso A, Simone G, Petroni S y col. *Thymidylate Synthase and p53 primary expression as predictive factors of advanced colorectal cancer patients*. Br J Cancer 2000, 82(3) :560-567

123. Paradiso AV, Maiello EM, Ranieri G. *Topoisomerase I (Topo-I) and thymidylate synthase (TS) primary tumor expression are predictive of response to CPT-11 in advanced colorectal cancer (CRC) patients.* Proc Am Soc Clin Oncol 2001, abstr. 599
124. Parsons R, Li GM, Longley M y col. *Mismatch repair deficiency in phenotypically normal human cells.* Science, 1995 268:78-740
125. Patterson AV, Talbot DC, Stratford IJ y col. *Thymidine Phosphorylase moderates thymidine-dependent rescue after exposure to the Thymidylate Synthase inhibitor ZD1694 (Tomudex) in vitro.* Cancer Res 1998, 58:2737-2740.
126. Pazdur R, Douillard JY, Skillings JR y col. *Multicenter Phase III study of 5-Fluorouracil (5-FU) or UFT in combination with Leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer.* Proc Am Soc Clin Oncol 1999, 18:263a (abst 1009)
127. Pazdur RA, Poyce ME. *Novel agents for colorectal cancer.* Expert Opin Invest Drugs. 1999 8(10): 1639-1652
128. Pelley RJ. *Oxaliplatin: a new agent for colorectal cancer.* Curr Oncol Rep 2001, 3:147-155
129. Pestalozzi BC, McGuin CJ, Kinsella TJ y col. *Increased Thymidylate Synthase protein levels are associated with proliferation but not cell cycle phase in asynchronous human cancer cells.* Br J Cancer 1995, 71(6): 1151-1157
130. Plasencia C, Taron M, Abad A y col. *Synergism of Oxaliplatin (OXA) with either 5-Fluorouracil (5-FU) or Topoisomerase I inhibitor in sensitive and 5FU-resistant cell lines is independent of DNA-mismatch repair and p53 status.* Proc Am Soc Clin Oncol 2000, 204 (abs. 793).
131. Plasencia C, Taron M, Abad A, Barnadas A. *Capítulo 15: Genes de quimiorresistencia.* En: Manual de Oncología clínica y Molecular. Ed Arán, 2000
132. Plasencia C, Taron M, Martínez E y col. *Down-regulation of Thymidylate Synthase gene expression after Oxaliplatin administration: implications for the synthesis activity of sequential Oxaliplatin/5-FU in sensitive and 5FU-resistant cell lines.* Proc Am Assoc Cancer Res 2001, (abs. 2735)
133. Pommier Y, Kerrigan D, Hartman KD. *K Phosphorylation of mammalian DNA topoisomerase I and activation by protein Kinase C.* J Biol Chem 1990, 265: 9418-9422
134. Pommier Y, Pourquier P, Fan Y y col. *Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme.* Biochem Biophys Acta 1998, 1400: 83-106
135. Pressaco J, Mitrovski B, Erlichman C y col. *Effects of Thymidylate Synthase inhibition on Thymidine Kinase activity and nucleoside transporters expression.* Cancer Res 1995, 55:1505-1508
136. Pullarkat ST; Gadhery V, Ingles SA y col. *Human Thymidylate Synthase gene polymorphism determines response to 5-FU chemotherapy.* Proc Am Assoc Cancer Res (2000) 243a: 942
137. Raymond E, Lawrence R, Izbicka E y col. *Activity of Oxaliplatin against human tumor colony-forming units.* Clin Cancer Res 1998 4: 1021-1029
138. Reid RJ, Fiorani P, Sugawara M y col. *CDC45 and DPB11 are required for processive DNA replication and resistance to DNA topoisomerase I mediated DNA damage.* Proc Natl Acad Sci 1999, 96(20): 11440-45
139. Ritter M, Fuerst J, Woll E y col. *Na⁺/H⁺ exchangers: linking osmotic dysequilibrium to modified cell function.* Cell Physiol Biochem 2001, 11(1): 1-18
140. Rixe O, Ortúzar W, Alvarez M y col. *Oxaliplatin, Tetraplatin, Cisplatin and Carboplatin: Spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen Panel.* Biochem Pharmacol 1996, 52:1855-1865

141. Roninson IB, Broude EV, Chan BD. *If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells.* Drug Resist Updates 2001, 4:303-313.
142. Rooney PH, Stevenson DA, Marsh S y col. *Comparative Genomic Hybridization analysis of chromosomal alterations induced by the development of resistance to Thymidylate Synthase inhibitors.* Cancer Res 1998, 58(22): 5042-5045
143. Rooney PH, Stevenson DAJ, Marsh S y col. Stevenson DA, Marsh S y col. *Comparative Genomic Hybridization Analysis of chromosomal aberrations induced by the development of resistance to Thymidylate Synthase inhibitors.* Cancer Res 1998, 58:5042-5045
144. Rothenberg ML. *Topoisomerase I inhibitors: Review and update.* Ann Oncol 1997, 8:837-855
145. Rothenberg, M.L. *Irinotecan (CPT-11): Recent developments and future directions – colorectal cancer and beyond.* The Oncologist 2001 6(1): 66-80
146. Rudge TL, Johnson LF. *Synergistic activation of the TATA-less mouse thymidylate synthase promoter by the Ets transcription factor GABP and Sp1.* Exp Cell Res 2002, 274(1):45-55
147. Rustum YM, Cao S. *New drugs in therapy of colorectal cancer preclinical studies.* Sem Oncol 1999 26(6): 612-620
148. Salonga D, Danenberg KD, Johnson M y col. *Colorectal tumors responding to 5-Fluorouracil have low gene expression levels of Dihydropyrimidine Dehydrogenase, Thymidylate Synthase and Thymidine Phosphorilase.* Clin Cancer Res 2000, 6:1322-1327
149. Saltz LB, Cox, JV, Blanke C y col. *Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer.* N Eng J Med 2000, 343: 905-1014
150. Scheithauer W, Komek GV, Raderer M. y col. *Combined Irinotecan and Oxaliplatin plus granulocyte colony-stimulating factor in patients with advanced fluoropyrimidine/leucovorin-pretreated colorectal cancer.* J Clin Oncol 1999, 17:902-906
151. Scheithauer W, Komek GV, Raderer M y col. *Randomized multicenter phase II trial of oxaliplatin plus irinotecan versus raltitrexed as first-line treatment in advanced colorectal cancer.* J Clin Oncol 2002, 20(1): 165-172
152. Schimke RT. *Gene amplification, drug resistance and cancer.* Cancer Res 1984, 44:1735-1742
153. Schmidt CA, Lowe SW. *Programmed cell death is critical for drug response in vivo.* Drug Resist Updates 2001, 4:132-134
154. Schulteis PJ, Clarke LL, Meneton P y col. K *Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger.* Nat Genet 1998, 19(3): 282-285
155. Seiden M. *Highlights in Ovarian Cancer.* The Oncologist 2000, 5:267-273
156. Shao RG, Cao CX, Shimizu T y col. *Abrogation of an S-phase checkpoint and potentiation of camptothecin cytotoxicity by 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in human cancer cell lines, possibly influenced by p53 function.* Cancer Res 1997, 57(18):4029-4035
157. Sherr CJ, Roberts JM. *Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases.* Genes Dev 1995, 9:1149-1163
158. Shimke RT. *Gene amplification, drug resistance and cancer.* Cancer Res 1984, 44:1735-1742
159. Shinka BK. *Topoisomerase inhibitors. A review of their therapeutic potential in cancer.* Drugs 1995, 49:11-19
160. Shirota Y, Stoehlmacher J, Brabender J y col. *ERCC-1 and Thymidylate Synthase mRNA levels predicts survival for colorectal cancer patients receiving combination Oxaliplatin and 5-Fluorouracil chemotherapy.* J Clin Oncol 2001, 19(23): 4298-4304

161. Sobrero AF, Aschele C, Bertino JR. *Fluorouracil in colorectal cancer –a tale of two drugs implications for biochemical modulation..* J Clin Oncol 1997, 15:368-381.
162. Stephan F, Etienne MC, Wallays C y col. *Depressed hepatic dihydropyrimidine dehydrogenase activity and fluorouracil-related toxicities.* Am J Med 1995, 99:685-688.
163. Stewart ZA, Pietenpol JA. *G2 checkpoint and anticancer therapy.* In: Cell cycle checkpoints and cancer. Landes Bioscience 2002, 155-178
164. Stoehlmacher J, Ghaderi V, Iobal S y col. *A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer.* Anticancer Res 2001, 21(4B): 3075-3079
165. Swain SM, Lipmann ME, Egan EF y col. *Fluorouracil and high-dose leucovorin in previously treated patients with metastatic breast cancer.* J Clin Oncol 1989, 7:890-899
166. Tabertero J. *Capecitabina en cáncer colorrectal avanzado.* Rev Cancer 12, 1998 supl 1:104-106
167. Takebayashi Y, Akiyami S, Akiba S y col. *Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase in human colorectal carcinoma.* J Natl Cancer Inst 1996, 88:1110-1117
168. Tanizawaa A, Kohn K, Kohlhagen G y col. *Differential stabilization of eukaryotic DNA topoisomerase I cleavable complexes by camptothecin derivatives.* Biochemistry 1995, 34:28702-28707
169. Taron M, Plasencia C, Abad A. *Preclinical synergy of Oxaliplatin (OXA), Topoisomerase I-inhibitor (Topotecan) and 5-Fluorouracil in sensitive and 5-Fluorouracil resistant HT29 cell line.* Proc Am Soc Clin Oncol, 1999c. Abst. 691
170. Taron M, Plasencia C, Guillot M y col. *Comparative analysis of Thymidylate Synthase expression and cell cycle profile after Topotecan or Irinotecan ± 5-Fluorouracil exposure.* Proc Am Assoc Cancer Res, 1999a
171. Taron M. *Nous esquemes d'administració d'un derivat de la camptotecina. Associació in vitro amb drogues específiques de cicle cel·lular.* Comunicació personal, 1999b.
172. Taron M, Camps C, Sàrries C y col. *Potential role of Lys751Gln XPD gene polymorphism in clinical outcome of gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer.* Proc Am Assoc Cancer Res, 2002 abs 1322.
173. Thwaites DT, Ford D, Glanville M y col. *H⁺ solute-induced intracellular acidification leads to selective activation of apical Na⁺/H⁺ exchange in human intestinal epithelial cells.* J Clin Invest 1999, 104:629-635
174. Toi M, Hoshina S, Taniguchi T y col. *Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in human breast cancer.* Int J Cancer 1995, 64:79-82.
175. Torres K, Horwitz SB. *Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent.* Cancer Res 1996, 56:4006-4012
176. Ullmann R, Schwendel A, Klemen H y col. *Unbalanced chromosomal aberration in neuroendocrine lung tumors as detected by CGH.* Human Pathology 1998, 29(10): 1145-1149
177. Vaisman A, Varchenko M, Umar A. *The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts.* Cancer Res 1998, 58:3579-3585
178. Valowsky C, Fitzhugh DJ, Castaño IB y col. *The topoisomerase-related function gene TRF4 affects cellular sensitivity to the antitumour agent camptothecin.* J Biol Chem 1999, 274(11): 7302-7308
179. Van Custem E, Cunningham D y col. *Clinical activity and benefit of Irinotecan (CPT11) in patients with colorectal cancer truly resistant to 5-Fluorouracil (5FU).* Eur J Cancer 1999, 35(1):54-59

180. Van Dekken H, Geelen E, Dinjens WN y col. *Comparative Genomic Hybridization of cancer of the gastroesophageal junction: deletion of 14q31-32.1 discriminates between esophageal (Barrett's) and gastric cardia adenocarcinomas.* Cancer Res 1999, 59(3) 748-752
181. Van Triest B, Pinedo HM, Van Hensbergen y col. *Thymidylate Synthase level as the main predictive parameter for sensitivity to 5-Fluorouracil but not for folate-based Thymidylate Synthase inhibitors in 13 non-selected colon cancer cell lines.* Clin Cancer Res 1999, 5:643-654
182. VanTriest B, Pinedo HM, Giaccone G y col. *Downstream molecular determinants of response to 5-fluorouracil and antifolate thymidylate Synthase Inhibitors.* Ann Oncol 2000, 11:385-391
183. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR y col. *Genetic alterations during colorectal tumor development.* N Eng J Med 1988, 319:525-532
184. Waserman y col *Combination of Oxaliplatin (LOHP) plus irinotecan (CPT-11) in patients with gastrointestinal tumours: Results of two independent phase I studies with pharmacokinetics.* J Clin Oncol 17: 1751, 1999
185. Weinberg RA. *The molecular basis of carcinogenesis: understanding the cell cycle clock.* Cytokines Mol Ther 1996, 2(2): 105-110
186. Weinberg RA. *The retinoblastoma protein and cell cycle control.* Cell 1995, 81:323-330
187. Weinstein IB. *Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis.* Carcinogenesis 2000, 21(5):857-864
188. Weinstein JN, Myers TG, O'Connor PM, y col. *An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer.* Science 1997, 275:343-349
189. Welsh SJ, Tittley J, Brunton L y col. *Comparison of Thymidylate Synthase (TS) protein up-regulation after exposure to TS inhibitors in normal and tumor cell lines and tissues.* Clin Cancer Res 2000, 6:2538-2546
190. White E. *Life, death and the pursuit of apoptosis.* Genes Dev 1996, 10:1-15
191. Widel M, Jedrus S, Owczarek S y col. *The increment of micronucleus frequency in cervical carcinoma drug irradiation in vivo and its prognostic value for tumour radiocurability.* Br J cancer 1999, 80:1599-1607
192. Wolmark N, Wieand HS, Rockette HE y col. *The prognostic significance of tumour location and bowel obstruction in Dukes' B and C colorectal cancer.* Ann Surg 1983, 198:743-750
193. Woynarowsky JM, Chapman GW, Napier C y col. *Sequence- and region-specificity of Oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA.* Mol Pharmacol 1998, 54(5): 770-777
194. Yan T, Schupp JE, Hwang HS y col. *Loss of DNA mismatch repair impacts defective cdc2 signalling and G2 arrest responses without altering survival after Ionizing Radiation.* Cancer Res 2001, 61: 8290-8297
195. Yang B, Stambrook PJ, Markowitz SD. *Wild-type p53 demonstrates functional dominance in a human colon carcinoma cell line in which it induces reversible growth arrest.* Clin Cancer Res 1996, 2:1649-1657
196. Zalceberg JR, Cunningham D, Van Custem E y col. *ZD1694: a novel Thymidylate Synthase Inhibitor with substantial activity in the treatment of patients with advanced colorectal cancer. Tomudex colorectal study group.* J Clin Oncol 1996 14: 716-721
197. Zeghari-Squalli N, Raymond E, Ctvikovic E y col. *Cellular pharmacology of the combination of the DNA topoisomerase I inhibitor SN38 and the Diaminocyclohexane Platinum derivative Oxaliplatin.* Clin Cancer Res, 1999, 5:1189-1196.