



Universidad de Navarra

Facultad de Farmacia

Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



Universidad Pública de Navarra

Escuela de Estudios Sanitarios

*Máster Investigación Ciencias
de la Salud*

Evaluación de la respuesta antiproliferativa en cáncer colorrectal del oxaliplatino en monoterapia y en combinación

Trabajo fin de Máster

Máster Investigación en Ciencias de la Salud

Curso 2011-2012

Lorena de Pablo Maiso

Pamplona, 2012



Universidad de Navarra

Facultad de Farmacia



Universidad Pública de Navarra

Escuela de Estudios Sanitarios

La Prof. MARÍA JESÚS GARRIDO CID, y la Prof. LUCÍA RAMIREZ NASTO certifican el presente trabajo “Evaluación de la respuesta antiproliferativa en cáncer colorrectal del oxaliplatino en monoterapia y en combinación” presentado por la Licenciada LORENA DE PABLO MAISO, para optar al título de máster de Investigación en Ciencias de la Salud de la Universidad Pública de Navarra. Certifican que se ha realizado bajo su dirección, y una vez revisado, no encuentran objeciones para que sea presentado a su lectura y defensa.

Y para que así conste, firman el presente certificado en Pamplona, 10 de Junio de 2012.

Fdo: M.J Garrido Cid

Fdo: Lucía Ramírez Nasto

Agradecimientos

A la Universidad de Navarra y a la Universidad Pública de Navarra, por su labor académica y humana.

A mis directoras de proyecto, a María Jesús Garrido, por su firme intención de formarme científicamente y por su paciencia, y a Lucía Ramírez, por tener siempre una palabra alegre y por su disponibilidad.

A todo el departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, en especial, a Núria, por todas las horas en cultivos en tu proyecto, y por la gran parte que has tomado en éste. A los del laboratorio “Galénica”, a todos vosotros, en especial, Hugo, Ander y Luisa. Además me gustaría agradecer a la Dra. Blanco todas las palabras de animo que me ha transmitido.

A todos los que integran el Departamento de CAFT, en especial, a su directora, mi gran amiga, asesora académica, y ex jefa, Pilar Lostao.

A mis compañeros de Master, por todas esas horas que hemos pasado juntos. A nuestro grupito, Nelson, Xabi, Elena y Leyre, os deseo salud y mucha suerte.

A mis compañeras de piso en Pamplona, las de la carrera, y a las de estos años, Ana, Mentx, porque sin vosotras, todo hubiera sido tan diferente. Además de ser compañeras de piso y de trabajo, hemos sido inseparables.

A mis amigas y amigos de Nájera, a las de siempre y a los de no tan de siempre, por los fines de semana en los que todos somos una gran familia.

A mi familia, y mis abuelas muy particularmente, vosotras me habéis criado. Espero teneros muchos años más a mi lado.

A mis padres, por haberme dado siempre lo mejor. Una gran educación humana y personal. Porqué de vosotros he aprendido la constancia en el trabajo y el sacrificio de superación. No tengo palabras para todo lo que os tengo que agradecer.

Y a ti, Santi, porque a pesar de ser de “números”, me has aguantado todas las historias de laboratorio y me has ayudado hasta el ultimo día en este proyecto. Esto, forma parte de ti.

Resumen

El adenocarcinoma colorrectal (CRC) es por detrás del cáncer de pulmón, una de las principales causas de muerte en los países occidentales. La utilización de fármacos como oxaliplatino (L-OH), en monoterapia o combinado con otros compuestos, han demostrado un aumento significativo en la tasa de respuesta y supervivencia. El oxaliplatino, en primera línea dentro de la terapia de cáncer colorectal (CRC), es un derivado platínico de tercera generación, caracterizado por presentar efectos adversos más tolerables y reversibles que sus predecesores (cisplatino o carboplatino) (Sánchez-Cano y cols., 2009). La limitada eficacia del oxaliplatino en monoterapia ha llevado a la búsqueda de estrategias capaces de aumentar dicha eficacia. La inclusión del Cetuximab a dobletes de quimioterapia convencionales basados en fluorpirimidinas y L-OH o Irinotecan, ha demostrado en diversos estudios en fase II una alta eficacia a expensas de un perfil de toxicidad asumible (Prewett y cols., 2007; Balin-Gauthier y cols., 2006). Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta antiproliferativa en cáncer colorectal del oxaliplatino en monoterapia y en combinación en dos líneas celulares de CRC.

Además, se han evaluado diferentes métodos de viabilidad recogidas en la literatura. Tras la elección de un adecuado método de revelado, se han escogido dos líneas de adenocarcinoma humano (HT-29 y HCT-116) para el estudio *in vitro* las cuales se trataron con oxaliplatino (Eloxatin®) y con cetuximab (Erbix®), primero en monoterapia y posteriormente en combinación.

En un primer estudio de monoterapia, el efecto antitumoral del oxaliplatino fue concentración y tiempo dependiente, aunque la concentración tuvo una repercusión mayor en dicho efecto, que el tiempo de exposición. El efecto antiproliferativo fue

mayor en la línea HCT-116. En un segundo estudio de monoterapia, el tratamiento con cetuximab no mostró signos claros de inhibición en el crecimiento celular, especialmente en la línea HT-29. Y en los estudios de combinación de ambos fármacos, en la línea HT-29, el principal efecto para concentraciones altas, es el debido al oxaliplatino, mientras que a concentraciones bajas y tiempos de exposición largos, el cetuximab resulta esencial en el efecto antitumoral. Similares resultados a los descritos para la línea celular HT-29, se encontraron en los estudios realizados en la línea HCT-116, sin embargo, se encontró un mayor efecto, debido principalmente a la mayor sensibilidad que esta línea tiene a la acción del oxaliplatino.

Con lo que podemos concluir, que en los resultados de combinación, los datos in vitro obtenidos en este estudio demuestran que la administración secuencial de oxaliplatino y cetuximab (oxaliplatino→ →cetuximab) se traduce en mayores efectos citotóxicos que los observados con la aplicación de oxaliplatino solo. En general los resultados fueron igual de consistentes en ambas líneas, aunque la acción antiproliferativa fue mayor en la línea HCT-116, tal y como se esperaba en base a lo descrito anteriormente en el grupo, y respaldado por otros autores.

Abreviaturas	1
I. INTRODUCCIÓN	3
II. OBJETIVOS	8
III. MATERIAL Y MÉTODOS	10
1. Reactivos y líneas celulares	11
2. Métodos	
2.1.1 Líneas celulares	12
2.1.2 Productos	13
2.2 Estudios de viabilidad celular	13
2.2.1 Rojo Neutro / Neutral Red Uptake Assay	13
2.2.2 MTT / MTT Assay	14
2.2.3 Alamar Blue / Alamar Blue Assay	14
2.3 Curvas de calibrado	15
2.4 Estudios de citotoxicidad	16
2.4.1 Estudio 1: Estudio de respuesta a oxaliplatino	16
2.4.2 Estudio 2: Estudio de respuesta a cetuximab	18
2.4.3. Estudio 3: Estudio de combinación	19
2.4.4 Ensayo de viabilidad celular	19
2.5 Análisis estadístico	19

IV. RESULTADOS	
1. Estudios de viabilidad celular	
1.1 Comparación de diferentes métodos	22
1.2 Cinética de crecimiento en el tiempo	23
2. Estudios de citotoxicidad	
2.1 Estudio 1: Estudio de respuesta a oxaliplatino	24
2.2. Estudio 2: Estudio de respuesta a cetuximab	27
2.3 Estudio 3: Estudio de combinación en HT29	27
2.4 Estudio 3: Estudio de combinación en HCT116	27
V. DISCUSIÓN	32
VI. CONCLUSIÓN	39
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

Abreviaturas	Definición
AB	Alamar Blue
CDDP	Cisplatino
DACH	Diaminociclohexano
DMSO	Dimetil sulfoxido
HCT-116	Línea celular adenocarcinoma humano
HT-29	Línea celular adenocarcinoma humano
IC50	Concentración media mínima inhibitoria
L-OPH	Oxaliplatino
MTT	Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico
PBS	Buffer salino fosfatado
Pt	Platino
SW-480	Linea celular adenocarcinoma humano
SW-620	Linea celular adenocarcinoma humano

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer Colorrectal (CCR) es uno de los tipos de cáncer con mayor morbilidad y mortalidad en el mundo, especialmente en países occidentales (Parkin DM, et al.2005). Es la segunda causa de muerte común Europa (J. Ferlay P, y cols.2007). Tras el diagnóstico, el 19% de los casos de CCR son metastásicos, y tras el diagnóstico, a los 5 años, la tasa de supervivencia de los pacientes con CCR es del 63%, cae a 10% en estos pacientes (Jemal A, y cols.2005).

La lucha contra el cáncer colorrectal (CCR) incluye diversos tipos de tratamientos, entre ellos se encuentran los antitumorales clásicos o de síntesis química, y las nuevas moléculas o biofármacos (Sharma RI, y cols.2008). En los últimos años, uno de estos tratamientos incluye un derivado del platino, el oxaliplatino combinado con otros fármacos (Ekblad L, y cols.2012).

El oxaliplatino fue descubierto en 1976 en Japón. Fue comercializado con el nombre de Eloxatin® en 1996 en Europa, y en 2002 en Estados Unidos, para el tratamiento del cáncer colorrectal avanzado, y como adyuvante en el cáncer de colon en estadio III.

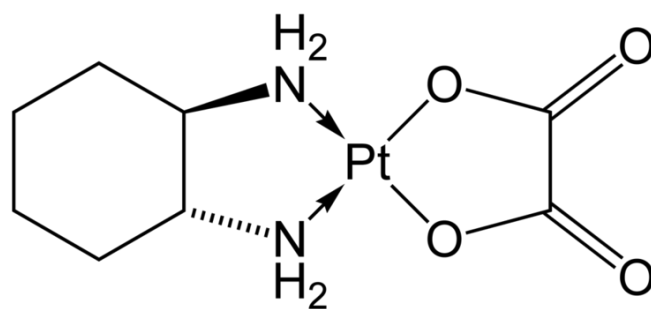


Figura 1: Estructura química del oxaliplatino (L-OHP). Peso molecular 397,3 kDa.

El oxaliplatino (L-OHP), en primera línea dentro de la terapia de cáncer colorrectal (CRC), es un derivado del platino de tercera generación, caracterizado por

presentar menores efectos adversos que su predecesores (cisplatino o carboplatino) (Sánchez-Cano, y cols. 2009).

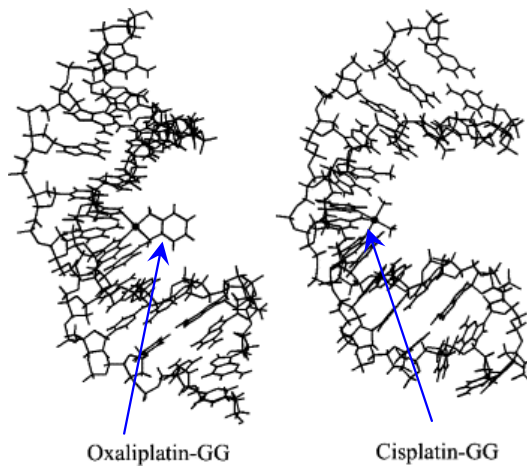


Figura 2: Imagen representativa de la formación de aductos del cisplatino y oxaliplatino.

La presencia de estos aductos de ADN conduce a la inhibición de la replicación celular, induciendo una parada del ciclo celular capaz de desencadenar una cascada de señales que llevan a la célula a la apoptosis (Raymond, y cols. 2002). Sin embargo, numerosos estudios clínicos han sido publicados con L-OHP como parte de una terapia de rescate para los tumores resistentes a cisplatino (Mishim, y cols. 2002; Stordal, y cols. 2007). Por tanto, aunque el mecanismo de acción es común para todos los miembros de esta familia, presentan algunas diferencias, que en el caso del oxaliplatino llevan a que sea eficaz en CCR mientras que cisplatino y carboplatino, no lo son. Estas diferencias don las que aún no se han podido dilucidar en su totalidad y son las que permiten su aplicación en diferentes tipos de tumores (Grothey A, y cols. 2004).

Sin embargo, la limitada eficacia del oxaliplatino en monoterapia ha llevado a la búsqueda de estrategias capaces de aumentar dicha eficacia. Entre ellas, está la combinación con nuevas biomoléculas como los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia receptores de membrana sobreexpresados, en determinadas células tumorales. Uno de estos receptores es el EGFR, (epidermal growth factor receptor). Uno de esos

anticuerpos monoclonales comercializados y aplicado al tratamiento del CCR, es el Cetuximab (Erbiximab®).

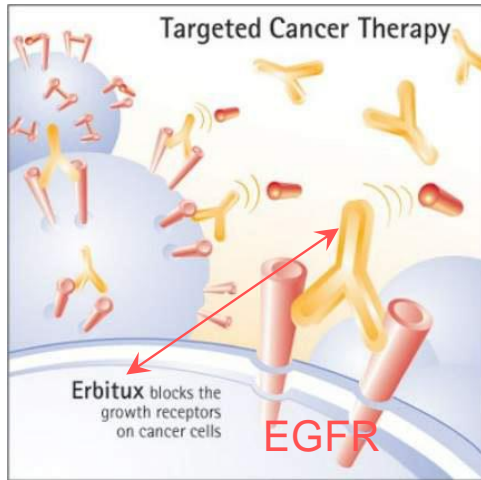


Figura 3: Esquema representativo de la unión del cetuximab al receptor de EGFR. (imagen cedida por <http://www.drugdevelopment-technology.com>)

Su incorporación a dobletes de quimioterapia convencionales basados en fluorpirimidinas (5-FU o el profármaco, capecitabina) con L-OH, o con Irinotecan, ha demostrado en diversos estudios en fase II, un aumento de la eficacia asociado a un perfil de toxicidad asumible clínicamente (Prewett, y cols. 2007; Balin-Gauthier D, y cols. 2006).

Cetuximab, es una IgG1 quimérica dirigido frente EGFR y parcialmente humanizada con el fin de disminuir la inmunogenicidad en los pacientes (Cunningham D, y cols. 2004; Tol J, y cols. 2010). Fue aprobado en Estados Unidos para el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal metastásico. Su mecanismo se centra en la inhibición de la fosforilación del receptor, proceso principalmente implicado en las vías de proliferación celular. A este anticuerpo, Cetuximab, también se le atribuyen propiedades antiangiogénicas que ayudarían a controlar la progresión de las células tumorales (Perrotte P, y cols.1999).



Figura 4: Presentación comercial del cetuximab, Erbitux®

A pesar de los recientes avances con la incorporación de estas nuevas estrategias, las tasas de respuesta siguen siendo bajas y la progresión de la enfermedad frecuente. (Prewett M, y cols.2007)

Los estudios *in vitro* son sistemas extremadamente controlados que representan una simplificación de tumor. Estos sistemas, permiten la exploración de la respuesta a un fármaco bajo condiciones experimentales concretas, y además, ayudan a discriminar entre mecanismos debidos a la acción del fármaco frente a los de la célula. De esta forma es posible identificar diferencias entre líneas y entre fármacos, aunque pertenezcan a la misma familia. Permiten explorar combinaciones entre compuestos que ayudan a entender regímenes posológicos en clínica, e incluso, a proponer cambios en los mismos (Moreno D, y cols.2008, 2010)

Por otro lado, la cuantificación del efecto antiproliferativo inducido por los diferentes compuestos utilizados en los estudios *in vitro*, deben de ser sensibles y reproducibles. Desde este punto de vista, se han probado diferentes técnicas descritas en la literatura para medir la viabilidad celular tras los diferentes ensayos. Entre las técnicas más populares, está la denominada MTT (reducción del metil-tiazol-tetrazolio a formazan) o Sulforodamina B. Sin embargo, existen otras como el Rojo Neutro o el

Azul Alamar (Alamar Blue) menos descritas, pero que presentan importantes ventajas dependiendo del tipo de estudio que se proponga. En el caso de la técnica del Alamar Blue, una de su principal ventaja es que permite seguir la misma muestra celular durante el tiempo que dure un experimento (Ahmed SA, y cols.1994).

II. OBEJTIVOS

El objetivo principal del estudio fue la caracterización del grado de inhibición proliferativa de la combinación oxaliplatino-cetuximab utilizada en primera línea de tratamiento para el cáncer colorrectal.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos y líneas celulares

Reactivos

El oxaliplatino (Eloxatin ®) [(1R,2R)-ciclohexano-1,2-diamina] (etanodioato-O,O') platino(II), L-OHP) y el Cetuximab (Erbix®) se obtuvieron del Servicio de Farmacia de la Clínica Universitaria de Navarra (CUN, Pamplona. España).

Los reactivos Neutral Red Solution (3-amino-7-dimethylamino-2-metil-fenazina-hidrocloruro), Trypan Blue Solution (colorantes celulares), Hepes (4-(2 Hydroxietyl)-piperazina-1-etanosulfónico), MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico), DMSO (Dimetil sulfóxido), y D-Glucosa (GC>99.5%) se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemical Company Inc. (Barcelona, España). Otros productos utilizados, como agua desionizada (Wasserlab, España).

Líneas celulares

Las líneas celulares HCT-116, HT-29, SW480 y SW620 (ATCC, American Type Culture Collection), corresponden a líneas estables de adenocarcinoma humano. Todas ellas son de tipo adherente y crecen en monocapa. Se cultivaron en flask de 75m² y se incubaron a 37°C en atmósfera con 5%CO₂.

Los medios de cultivo fueron una mezcla de DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) y Ham's F-10 (1:1 v/v), suplementado con un 10% de suero fetal bovino y gentamicina 0.01% para las SW480 Y SW620, y McCoy suplementado con un 10% de suero fetal bovino y un 0.01% de penicilina-estreptomina, para HT-29 y HCT-116. Todos los productos utilizados para cultivos celulares se obtuvieron de GIBCO (Life Technologies Corporation, Reino Unido).

2. Metodos

2.1.1 Líneas celulares

Las líneas se expandieron para la obtención de los stocks correspondientes que fueron congelados para usos posteriores. Su crecimiento y morfología se controlaron bajo supervisión óptica y microscópica.

Las células se recogieron mediante la adición de 2-3 ml de tripsina,(0.125 % v/v PBS) y se dejó actuar ante 5 minutos a 37°C y en una atmosfera húmeda de 5% CO₂. Trascurrido ese tiempo, se añadió un volumen de 4-6 mL de medio de cultivo para neutralizar la acción de la tripsina. La mezcla se recogió en un tubo y se centrifugó a 1500 rpm 5 minutos. Se deshechó el sobrenadante y se lavaron con PBS (10mL) para eliminar restos del medio y tripsina. Tras lavar las células se resuspendieron en medio de cultivo, y una alícuota se mezcló con trypan blue a una dilución (1:10), Un volumen de 10 µL de la mezcla se colocó en la cámara Neubauer para realizar el contaje de células viable y establecer el volumen necesario de la mezcla para cultivar dichas células a la concentración necesaria para realizar los posteriores estudios..



Lavado y tripsinización



Suspensión en 10 mL



Subcultivo.

Dilución

1:10

2.1.2 Productos

El oxaliplatino (Eloxatin®) y el cetuximab (Erbix®), se obtuvieron en el Servicio de Farmacia de la Clínica Universitaria. A partir de esta solución inicial de 5mg/mL en ambos compuestos se prepararon diferentes soluciones stock. En el caso del oxaliplatino se utilizó como disolvente la glucosa 5% (v/v), y para el cetuximab, el PBS.

2.2. Estudios de viabilidad celular.

Las diferentes líneas celulares se sembraron a diferentes densidades en placas de 96 pocillos, para establecer la cinética de proliferación a lo largo de una semana. Para cuantificar dicho crecimiento se pusieron a punto tres ensayos colorimétricos, previamente descritos en la literatura, rojo neutro, Alamar Blue y MTT.

2.2.1 Rojo Neutro/ Neutral Red Uptake Assay

El rojo neutro (3-amino-7-dimethylamino-2-metil-fenazina-hidrocloruro) es un colorante catiónico débil que se incorpora en células viables dentro de vacuolas citoplasmáticas, o formando gránulos por unión a sitios aniónicos. La cantidad de colorante incorporado en las células es directamente proporcional al número de células viables, y presenta un máximo de absorbancia a 533 nm. Para su ensayo se utilizó el filtro de 540 nm (Labsystems iEMS Reader MF (Finlandia)). Esta técnica ya había sido previamente validada en el grupo de trabajo.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se dejaron incubar durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo las placas se lavaron con 200 µl de PBS (pH 7,4) y se añadió 50 µl de una mezcla con colorante rojo neutro (3/6 de NaCl 1,8%, 2/6 agua bidestilada y 1/6 de Rojo neutro), a cada pocillo. Trascorrida una hora y media de incubación a 37°C, el pocillo se lavó con 200 µl de PBS y se le añadió 100 µl de solución de revelado (1/10

v/v de NaH_2PO_4 0,05 M, 4/10 v/v de agua bidestilada y 5/10 v/v de etanol 96%). La placa se colocó unos segundos en agitación y se leyeron a una λ de 540 nm, obteniendo así las correspondientes absorbancias. Cada experimento se realizó por triplicado.

2.2.2 MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazólico)

El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazólico), es una técnica colorimétrica que mide la actividad de la enzima succínico deshidrogenasa, situada en las mitocondrias celulares. El MTT es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa a su forma insoluble formazan. El producto de la reacción, el formazan queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización.

Para este ensayo, las células fueron tratadas con 5mg/mL de MTT, disuelto en PBS e incubadas a 37°C durante 2 horas. Tras este tiempo, las células fueron lavadas con PBS (200 μL) y tratadas con 200 μL de DMSO, solvente capaz de disolver el formazan. El procedimiento también se llevo a cabo en ausencia de células para la medida de un control negativo. La densidad óptica producida por este producto fue leída a una longitud de onda de 540 nm (Labsystems iEMS Reader MF (Finlandia))

2.2.3 Alamar Blue/Alamar Blue Assay (AB)

En esta técnica, el ingrediente activo de AB es la resazurina, un compuesto no tóxico, permeable a las células y de color azul. Al entrar en las células, resazurina se reduce a resorufina, que produce fluorescencia roja muy brillante o rosa. Las células viables realizan esta reacción, generando así una medida cuantitativa de la viabilidad o citotoxicidad.

La técnica de AB no produce lisis celular, lo que permite seguir en el tiempo la cinética de crecimiento de una misma muestra de células. Para este ensayo las células fueron

tratadas con el AB añadido al medio de cultivo, a una concentración final del 10% (v/v). Se realizó un control negativo, reactivos sin células, en el ensayo.

Para la optimización del tiempo de lectura, es decir el tiempo al que se produce el máximo de fluorescencia tras la reducción a resorufina, se probaron diferentes tiempos siguiendo los descritos en la literatura (Nakayama, y cols.1997; Hamid, y cols.2004). Para cada línea celular se incubaron a 37°C y en oscuridad, 4 tiempos diferentes, de 3, 5, 7 y 24 horas, respectivamente. Posteriormente la observancia de las muestras fueron medidas a las λ de 570nm y 600nm en un espectofotometro (Espectofotometro Power Wave XS equipado con el software KC junior, Biotek). Esta técnica correlaciona la proliferación celular con la magnitud del potencial REDOX de la reacción del colorante (Ahmed, y cols. 1994; Goegan, y cols. 1995; Nociari, y cols. 1998).

2.3 Curvas de calibrado.

Para cada técnica y línea celular, se realizaron estudios en los que se estableció la relación entre el número de células viables y la absorbancia obtenida. De esta forma se pudo establecer la densidad inicial idónea para que en placas de 96 pocillos, las células pudiesen crecer durante, al menos una semana, sin que se induzca muerte celular natural. Estas densidades fueron, 1000, 5000 y 10.000 células iniciales. Todos los ensayos de curvas de calibrado se realizaron por triplicado. Los resultados fueron analizados en el programa excel para obtener el grado de linealidad y por tanto, de correlación. Estos datos, sirvieron para la selección de la técnica que posteriormente se utilizaría para evaluar el impacto de los tratamientos antitumorales en las distintas líneas.

2.4 Estudios de citotoxicidad

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el apartado anterior, se eligieron las líneas, HCT-116 y HT-29 y la técnica del rojo neutro.

2.4.1 Estudio 1: Estudio de la respuesta al oxaliplatino.

El efecto citotóxico del oxaliplatino se estudió con el siguiente diseño experimental: en placas de 96 pocillos se sembraron 1000 células/pocillo/200µl sembradas de cada línea celular, HCT-116 y HT-29, y se incubaron durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo se añadieron dos tratamientos diferentes de oxaliplatino, 1µM y 5 µM. Estas concentraciones fueron elegidas sobre la base de los resultados obtenidos en el grupo, donde el rango de tratamientos ensayado fue de 0,1µM a 10µM, rango que está de acuerdo con los también publicados por otros autores (Arnauld, Gogal & Walsh, 2003 ; Dahan y cols., 2009). Los tiempos de exposición para cada uno de estos tratamientos fueron de 4 y 24 horas, tal y como se recoge en la figura . Las condiciones de experimentación se realizaron por triplicado.

Un esquema del protocolo de trabajo se muestra en la figura 2.

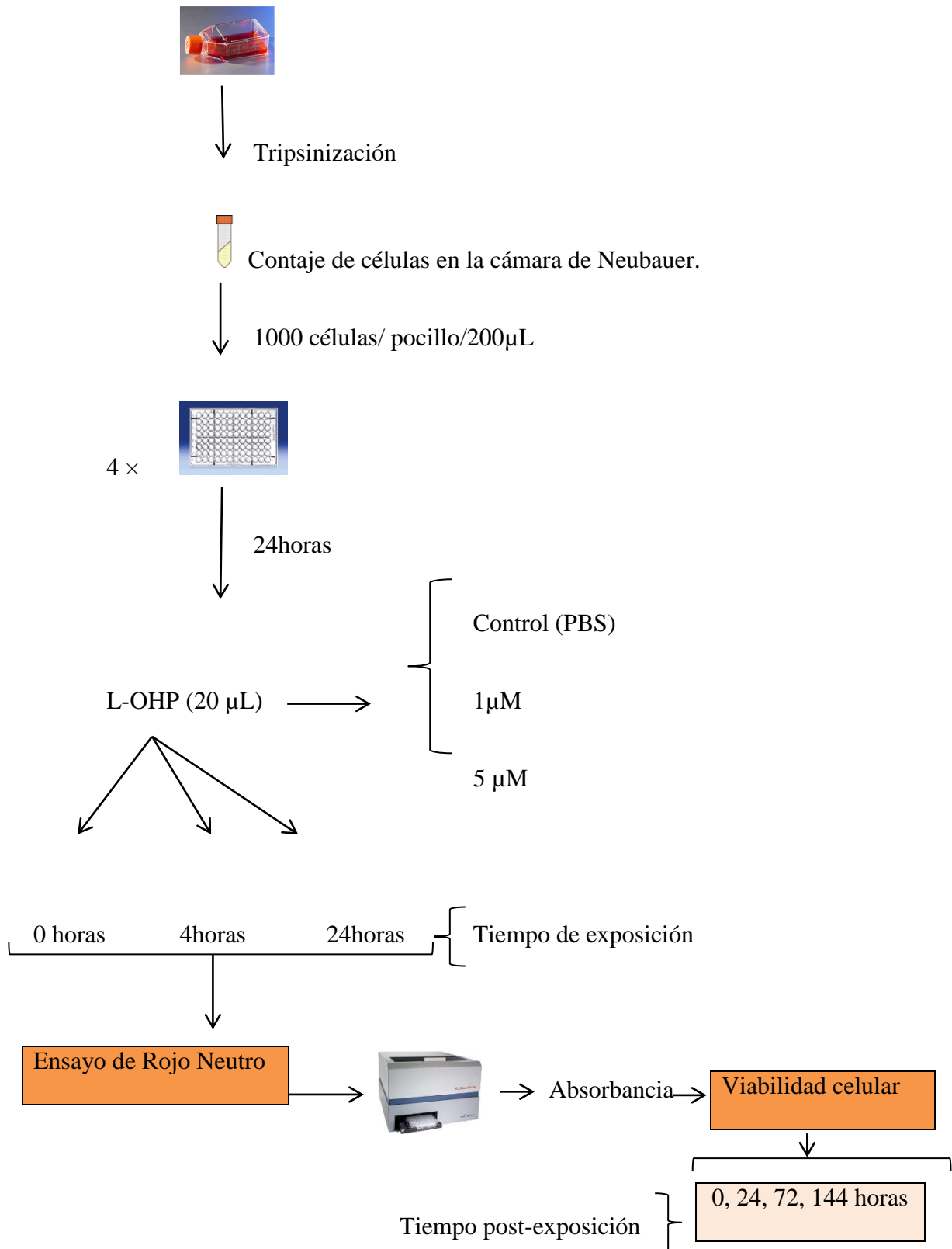


Figura 3. Representación esquemática del estudio 1

2.4.2 Estudio 2: Estudio de la respuesta al cetuximab.

Siguiendo con el protocolo anteriormente descrito, los tratamientos que se utilizaron para el cetuximab fueron los siguientes: 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estas concentraciones se seleccionaron según los datos publicados por Balin-Gauthier, D. y cols. 2006 y Dahan, y cols.2009. En este caso el tiempo de exposición fue de tan sólo 2 horas (figura 3). El estudio se realizó por triplicado.

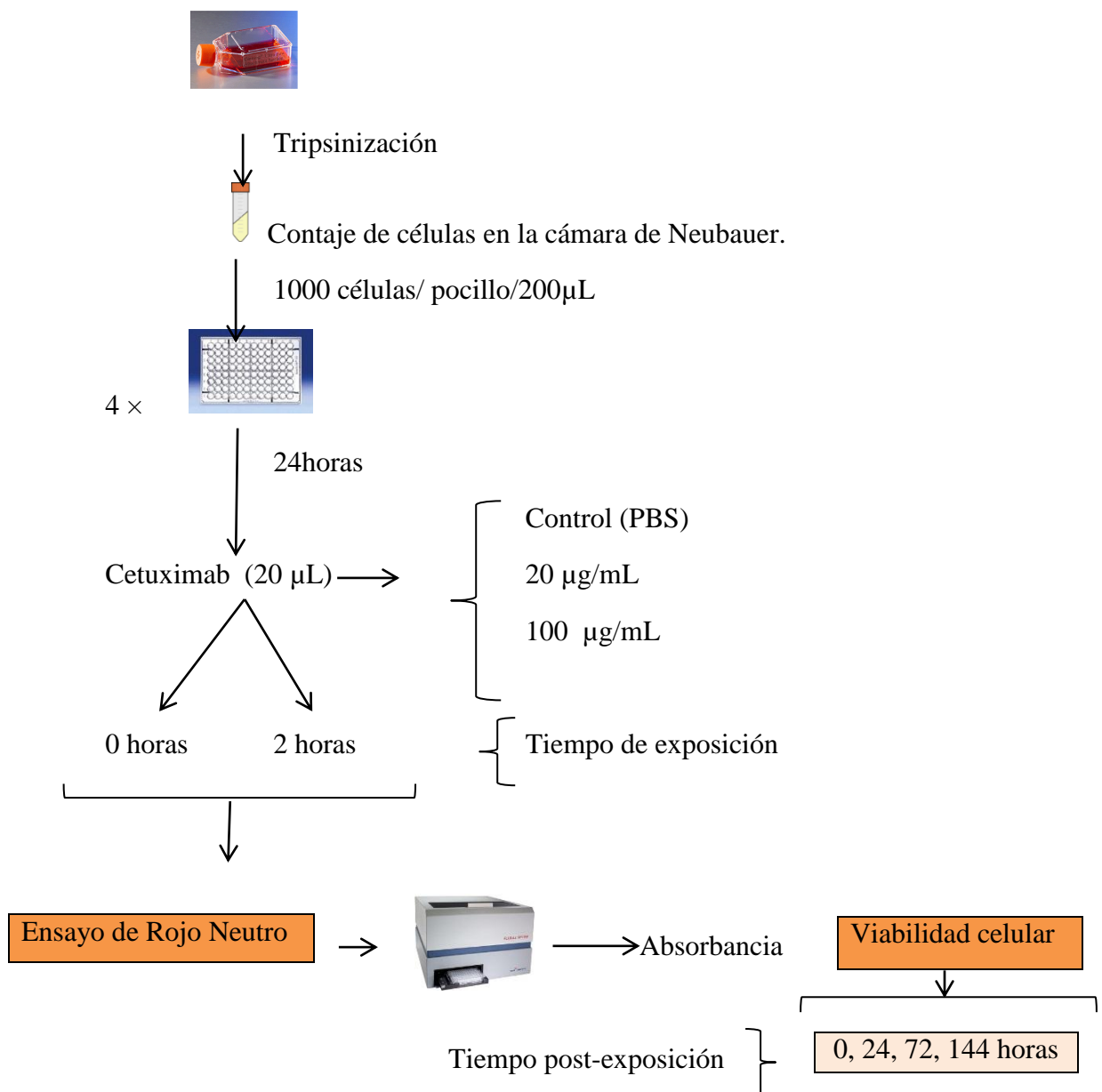


Figura 3. Representación esquemática del estudio 2

2.4.3 Estudio 3: Estudios de la combinación de oxaliplatino y cetuximab

En este estudio, las condiciones experimentales fueron las mismas que las utilizadas para el ensayo de cada fármaco por separado. Tal y como se recoge en la figura 3 , las concentraciones de oxaliplatino correspondientes a 1 μ M y 5 μ M se expusieron durante 4 o 24 horas. Trascurrido ese tiempo se retiró el antitumoral y se expuso durante 2 o 24 horas las concentraciones de 20 μ g/mL y 100 μ g/mL de cetuximab. Después del tiempo de exposición las células fueron lavadas y puestas a crecer en medio de cultivo libre de fármacos.

2.4.4. Ensayo de viabilidad celular.

En los tres estudios se midió el grado de viabilidad celular mediante la técnica del rojo neutro. Los resultados se expresaron en porcentaje de supervivencia celular tras los diferentes tratamientos y en base al control de cada uno de los grupos de estudio..

2.5 Análisis estadístico.

Los datos correspondientes a porcentaje de viabilidad celular de cada grupo de estudio, se se tabularon en medias y desviaciones estándar. Los datos se analizaron utilizando la prueba t de Student para la administración en monoterapia de los fármacos y un análisis de la varianza (ANOVA) con comparaciones post-hoc para las combinaciones de estos. El análisis estadístico se realizó utilizando SPSS V.15. La significancia estadística se estableció para una $P < 0.05$.

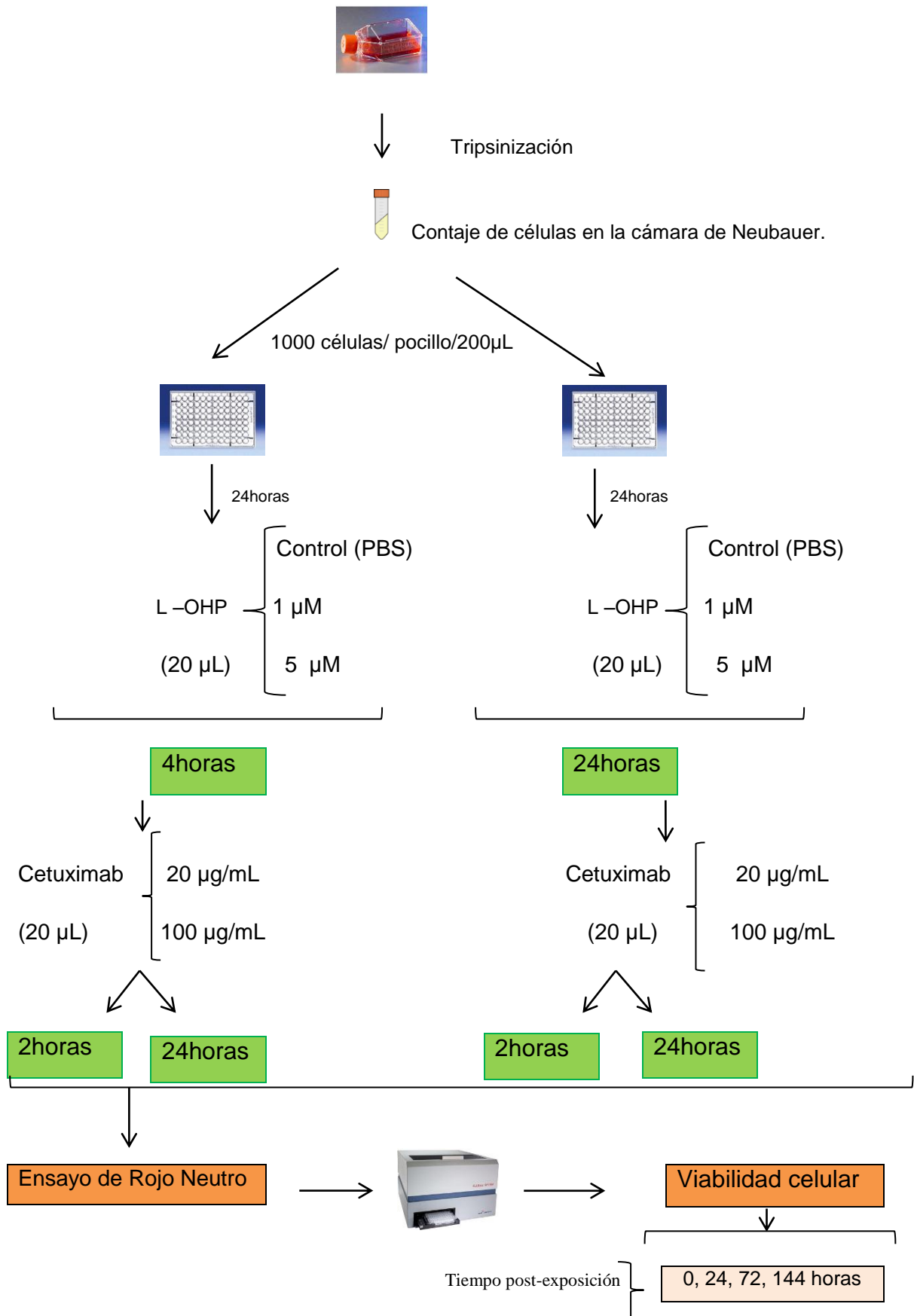


Figura 4: Representación esquemática estudio 3

IV. RESULTADOS

1. Estudios de viabilidad celular

1.1 Comparación de las diferentes técnicas para medir viabilidad celular

Las cuatro líneas celulares se sembraron en placas de 96 pocillos en un rango de densidades que fue desde $2,5 \times 10^3$ a 100×10^3 células/200 μ L pocillo. La relación entre absorbancia y número de células, se estableció para cada una de las técnicas de viabilidad celular. Se encontró que el grado de sensibilidad de cada una de las líneas fue diferente en función de la técnica utilizada. En general, HT-29 y HCT-116 respondieron mejor a las tres técnicas que SW-480 y SW-620. De hecho la técnica del rojo neutro fue la que mejores resultados dió para HT-29 y HCT-116 mientras que, el alamar blue fue la mejor para SW-480 y SW-620, tal y como se observa en la figura 5.

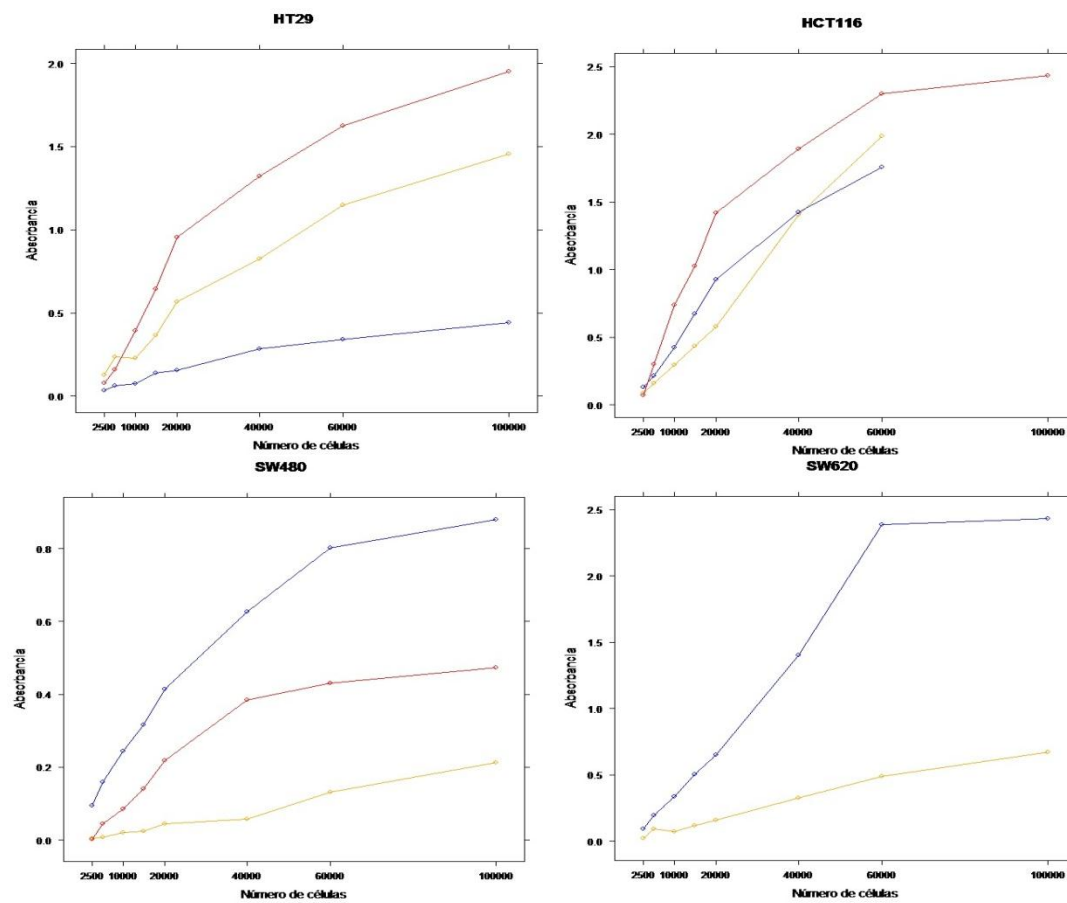


Figura 5: Curvas de calibrado obtenidas con Neutral Red Assay (■), MTT (■) y Alamar Blue (■) para todo el rango de concentraciones ensayadas ($2,5 \times 10^3$ y 100×10^3 células/pocillo). Los datos representan la media de tres experimentos independientes.

Los coeficientes de correlación que se obtuvieron con la técnica de rojo neutro para HT-29 fue de $R^2 = 0.991$ y de 0.982 para HTC-116, respectivamente. En ambos casos, el último punto correspondiente a 100×10^3 células/pocillo, no fueron incluidos. Esto es debido a que entre 60×10^3 y 100×10^3 células/pocillo, no se hicieron medidas intermedias que permitiesen establecer el máximo de absorbancia justo antes de llegar al plateau que se obtiene con 100×10^3 células/pocillo.

En el caso de las líneas SW480 y SW620, el comportamiento con la técnica de Alamar Blue, fue el mismo que el descrito anteriormente para el rojo neutro con las otras líneas celulares.

Los resultados de la técnica MTT no presentaron buenos grados de correlación en ninguna de las cuatro líneas aquí ensayadas.

Por tanto, sobre la base de la experiencia previa en el grupo con las líneas HT-29 y HCT-116 y la técnica del rojo neutro, se continuaron los estudios con estas líneas y técnica.

1.2 Cinética de crecimiento en el tiempo

Una vez seleccionada la técnica para medir viabilidad celular y las líneas tumorales, se realizaron experimentos para caracterizar el perfil temporal de la cinética de crecimiento celular en ambas líneas. De esta forma se pudo establecer la densidad inicial de siembra idónea, de forma que en placas de 96 pocillos, la células pudiesen crecer durante, al menos una semana, sin que se observara muerte celular natural. Estas densidades fueron, 1×10^3 , 5×10^3 y 10×10^3 células iniciales/pocillo. Los resultados

indicaron que 10×10^3 células/pocillo era una densidad elevada para realizar el estudio durante 144 horas, mientras que la menor densidad permitió obtener una curva durante 168 horas sin llegar a un plateau o muerte, tal y como se muestra en la figura 6.

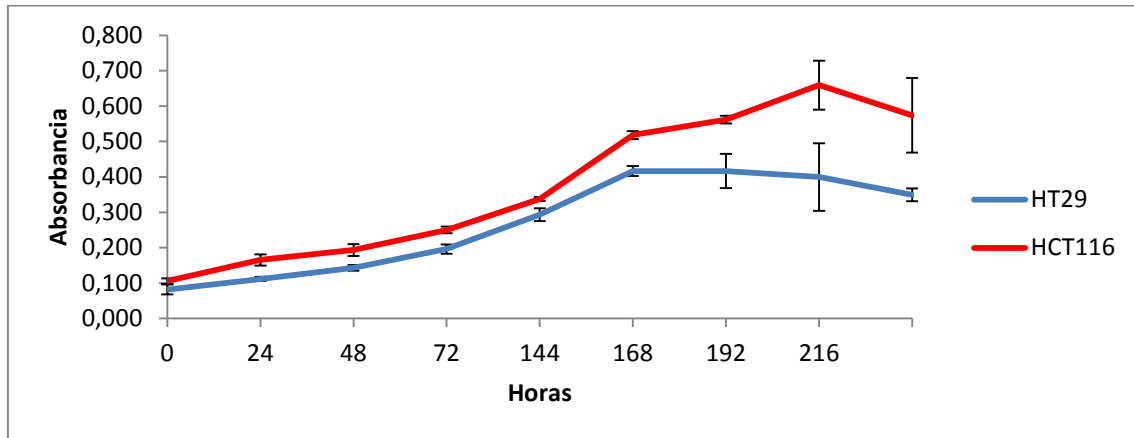


Figura 6: Curvas de crecimiento partiendo de una densidad inicial de 1×10^3 células/pocillo. Los datos representan la media \pm DS de tres experimentos independientes..

2. Estudios de citotoxicidad

2.1 Oxaliplatino libre

Las figuras 7 y 8 muestran que el efecto antitumoral del oxaliplatino es concentración y tiempo dependiente, aunque la concentración tuvo una repercusión mayor en dicho efecto (figura 8), que el tiempo de exposición (figura 7). El efecto se representa como porcentaje de viabilidad celular calculado en relación a cada grupo control para cada tiempo.

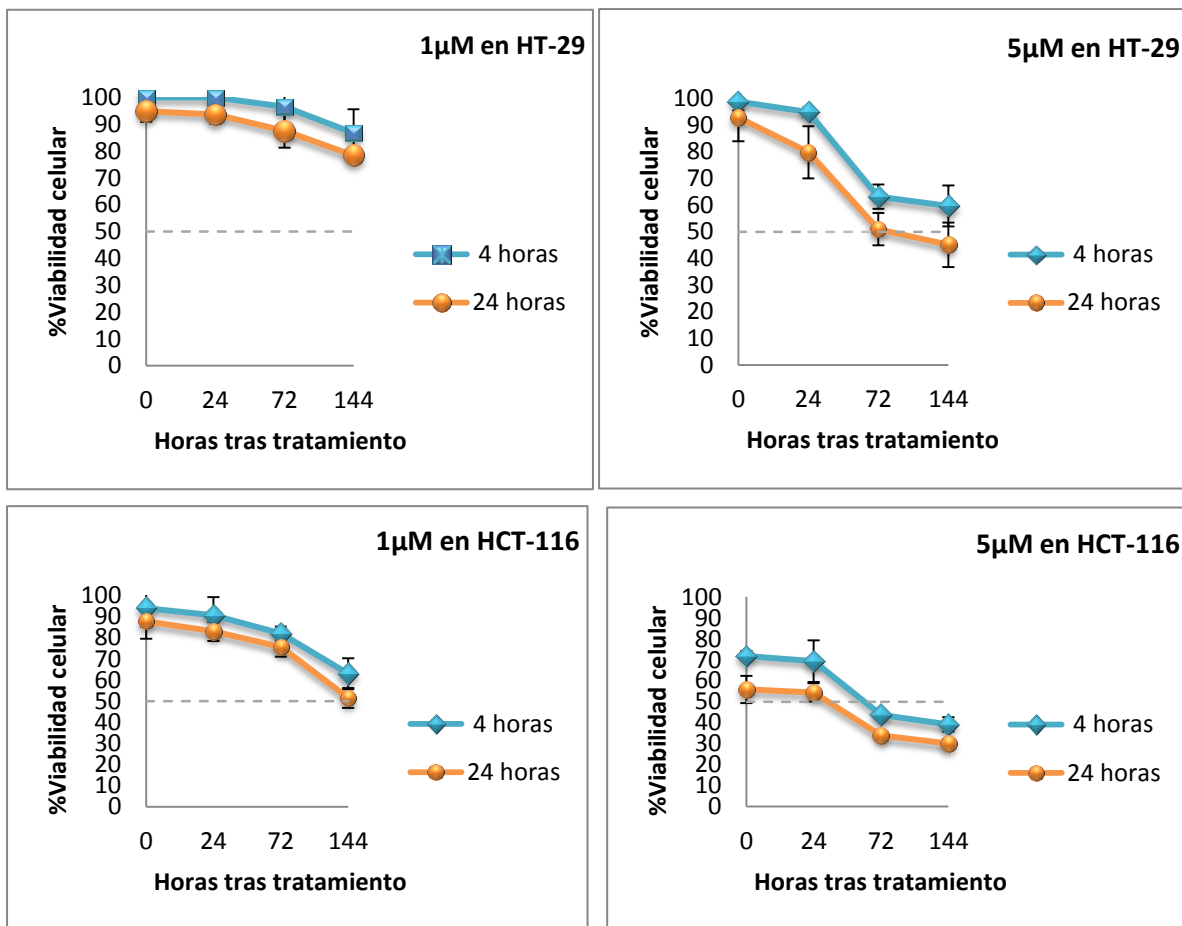


Figura 7: Efecto antiproliferativo de oxaliplatino en las líneas HT-29 (paneles superiores) y HCT-116 (paneles inferiores) tras dos diferentes tiempos de exposición, en función de la concentración. La densidad inicial fue de 1×10^3 células/pocillo y los datos representan la media \pm DS de tres experimentos independientes. La línea punteada indica el 50% de la viabilidad celular de manera que se puede obtener los valores de IC_{50} [concentración de fármaco capaz de inducir el 50% de inhibición del crecimiento celular respecto al control] en cada línea.

Estas figuras también muestra que la línea HCT-116 presentó mayor sensibilidad al oxaliplatino que la línea HT-29. Este dato queda claramente reflejado en el valor de viabilidad celular medida al tiempo 0, o momento en el que se retira el tratamiento. En ese punto HCT-116 a la concentración de 5 μ M, presentó niveles de inhibición del crecimiento entre 30 y casi 50%, respectivamente, para 4 y 24 horas de exposición. En este caso el tiempo de exposición llevó a un mayor efecto inhibitorio, aunque no llegó a ser estadísticamente significativo. Este resultado no se observó en la línea HT-29 en la que, en ningún caso se llegó al 10% de inhibición. Diferencias significativas en el

grado de inhibición se encontraron en el caso de HCT-116 tanto a las 4 como 24 horas de exposición al comparar los valores obtenidos para 1 μM y 5 μM . Estas diferencias fueron especialmente significativas tras 24 horas de tratamiento. En el caso de HT-29, las diferencias también se encontraron entre las concentraciones de 1 y 5 μM , respectivamente, a las 4 y 24 horas tras tratamiento, pero esta diferencia fue estadísticamente significativa a partir de las 72 horas postratamiento.

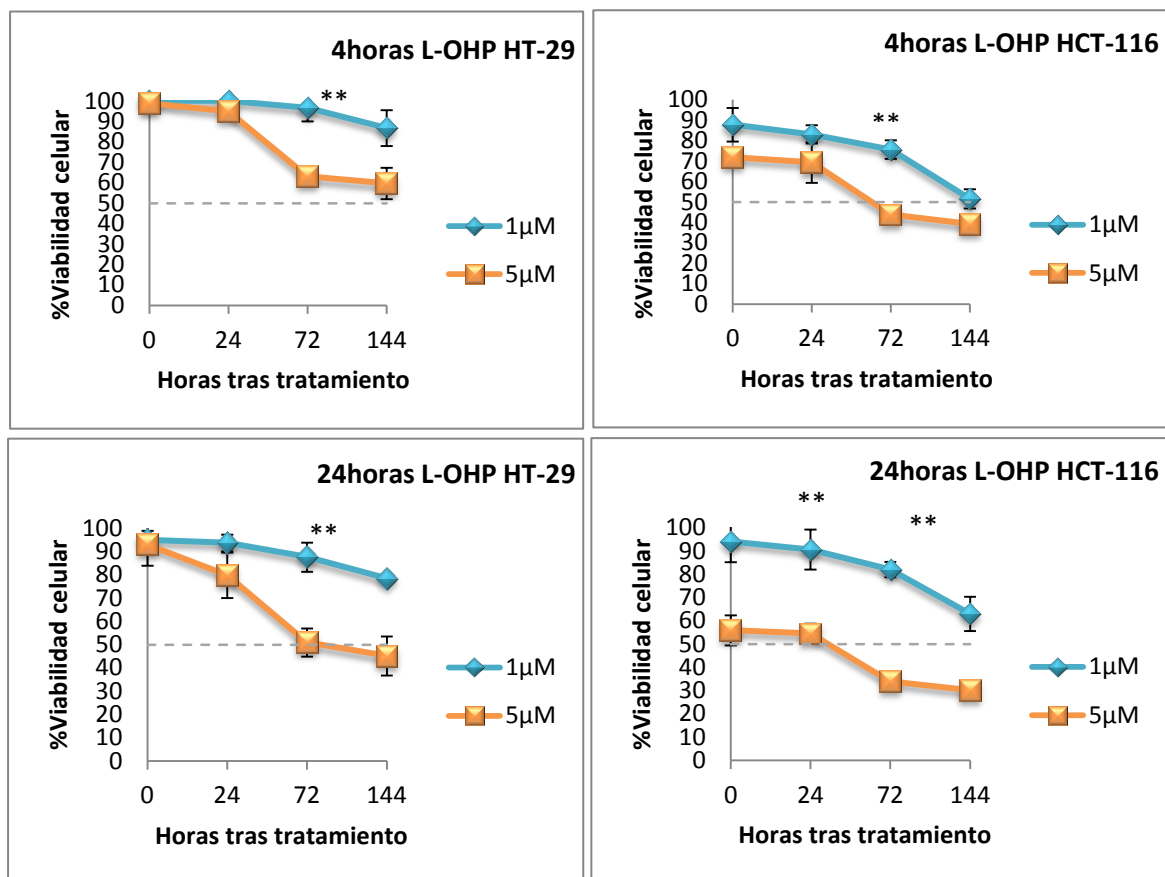


Figura 8: Efecto antiproliferativo de dos concentraciones de oxaliplatino en las líneas HT-29 (paneles izquierdos) y HCT-116 (paneles derechos) en función del tiempo de exposición. La densidad inicial fue de 1×10^3 células/pocillo y los datos representan la media \pm DS de tres experimentos independientes. La línea punteada indica el 50% de la viabilidad celular de manera que se puede obtener los valores de IC50 en cada línea

2.2. Cetuximab libre

El efecto del cetuximab se evaluó tras dos horas de exposición a las las concentraciones de 20 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$, previamente seleccionadas por Balin-Gauthier y colaboradores (2006), y Dahan y colaboradores. (2009).

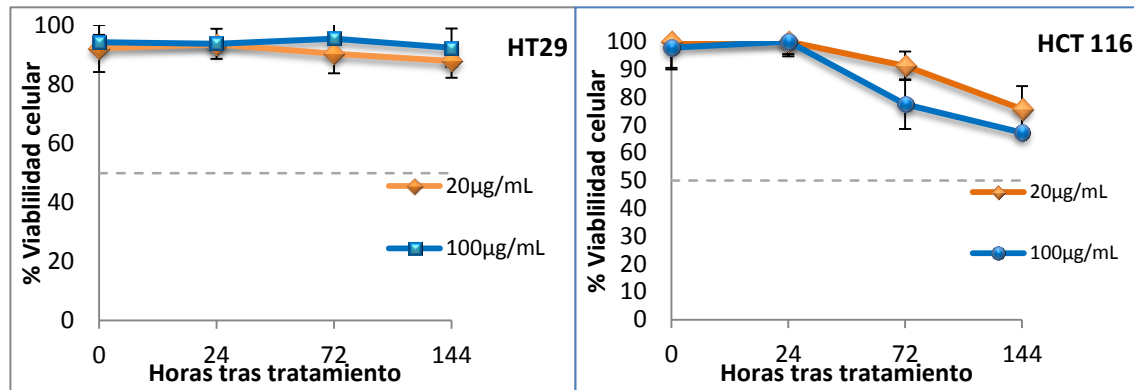


Figura 9: Perfil temporal del efecto antiproliferativo del cetuximab tras 2h de exposición a dos concentraciones diferentes para ambas líneas celulares. Datos representan la media y DS de tres experimentos independientes.

El tratamiento con cetuximab no mostró signos claros de inhibición en el crecimiento celular, especialmente en la línea HT-29. Sin embargo, en la línea HCT-116, la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ fue capaz de llegar a inhibir hasta un 30% de la proliferación celular a partir de las 72 horas postratamiento, aunque esta inhibición no llegó a ser un valor significativo entre concentraciones, y sí con el control ($p < 0.05$).

2.3 Combinaciones de tratamientos HT-29

La figura 10 muestra que para HT-29 la concentración de 1 mM de oxaliplatino tras 4h de exposición y 24h con cetuximab, no varió significativamente con respecto al tratamiento con oxaliplatino solo. Sin embargo, cuando se compararon los efecto antiproliferativos de esa misma concentración expuesta 24h y asociada al cetuximab, este efecto fue estadísticamente mayor que cuando se utilizó el oxaliplatino solo. Esta diferencia se observó únicamente para la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ de cetuximab. En

este caso, el efecto fue igual al observado para una concentración de 5 μM de oxaliplatino asociado a 20 mg/mL de cetuximab. Este dato, junto con el resultado obtenido para la asociación 5 μM de oxaliplatino y 100 $\mu\text{g/mL}$ de cetuximab, ambos 24h de exposición, muestran que el principal efecto para concentraciones altas, es el debido al oxaliplatino, mientras que a concentraciones bajas y tiempos de exposición largos, el cetuximab resulta esencial en el efecto antitumoral. Este datos también es corroborado para tiempos de exposición más cortos como se muestra en el panel superior de la figura 10.

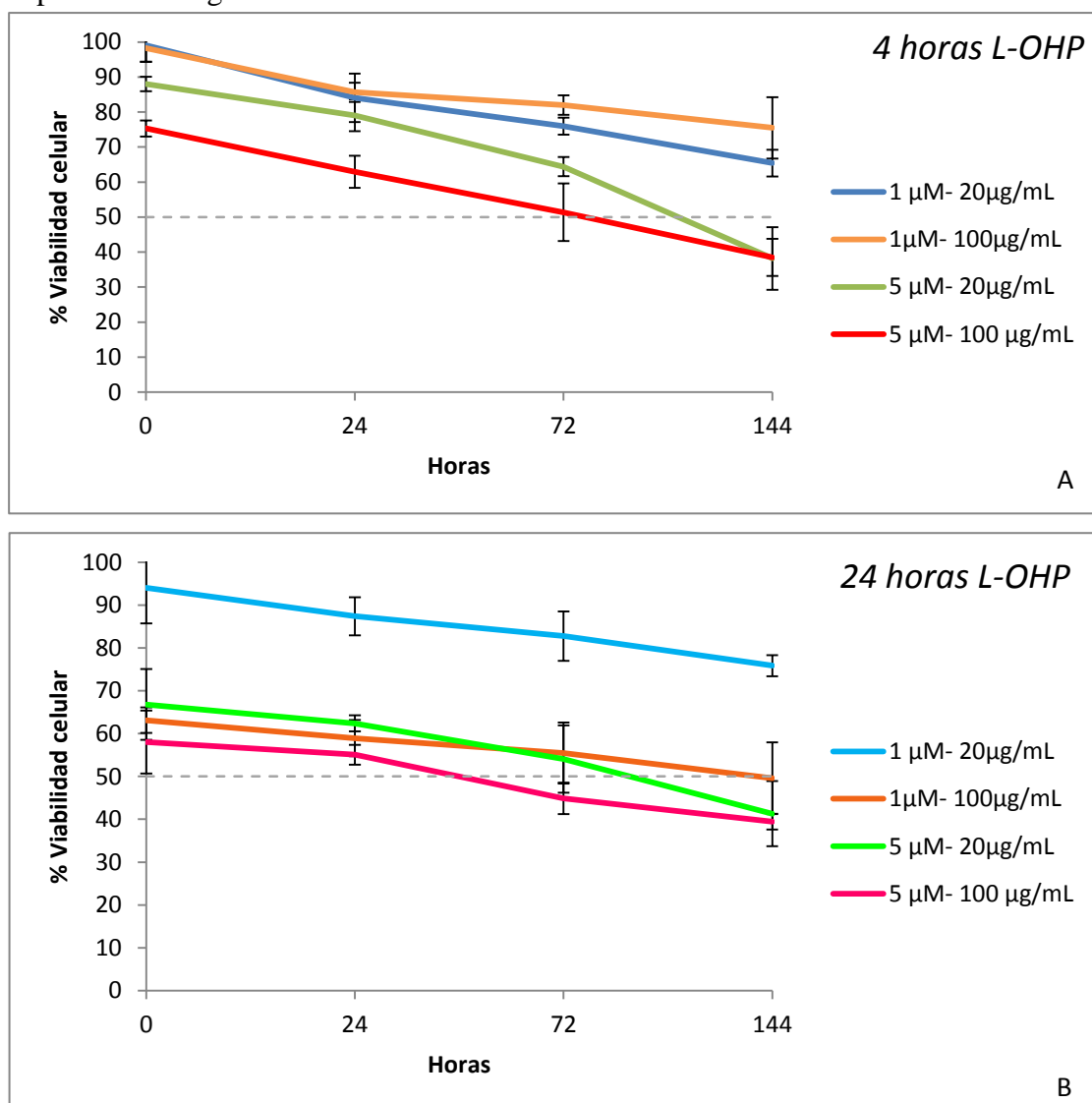


Figura 10: Porcentaje de viabilidad celular a lo largo de una semana tras retirar el tratamiento con oxaliplatino 1 y 5 mM durante 4 y 24 h, respectivamente, asociado con 24 h de exposición con cetuximab, 20 y 100 mg/mL, en la

línea HT-29. Los datos representan la media \pm DS de tres experimentos independientes. *A (α : 0.05) existen diferencias significativas a las 144 horas entre las 2 concentraciones de oxaliplatino. B (α : 0.05) diferencias desde el tiempo 0 hasta las 144 horas de la concentración 1 μ M-20 μ g/mL respecto de las demás

En la figura 11, se muestran los resultados obtenidos para la asociación de 1 mM de oxaliplatino a 4 h 24 h de exposición con 2h de exposición de 20 y 100 mg/mL de cetuximab, respectivamente. El tiempo de exposición del oxaliplatino fue el principal responsable de la acción antiproliferativa en las células HT-29, ya que el cetuximaba ambas concentraciones 2h, tuvo una influencia relativamente pequeña en el efecto medido.

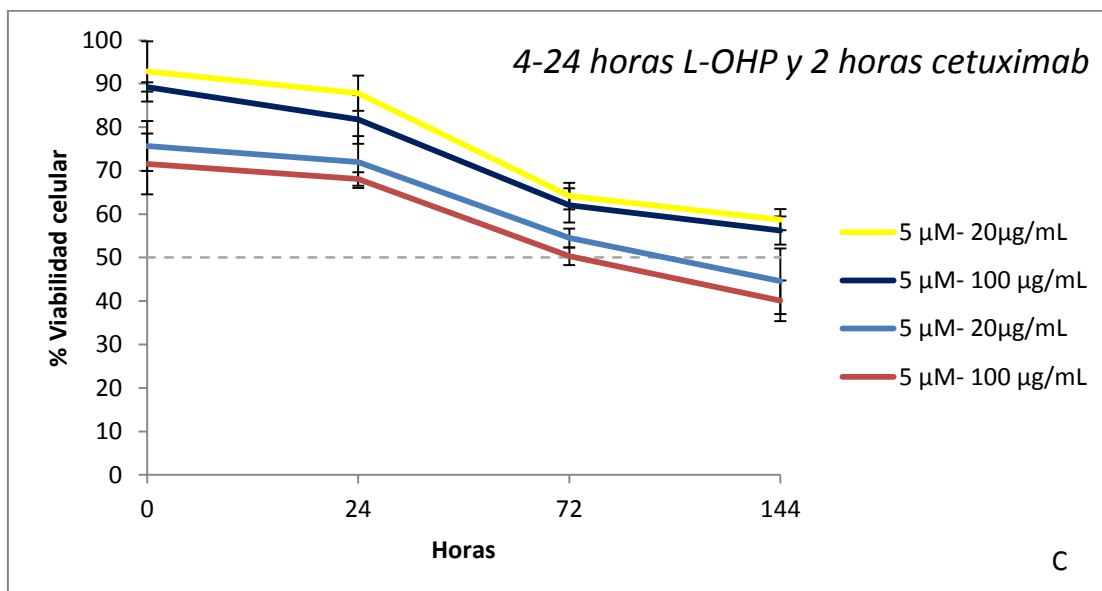


Figura 11: Porcentaje de viabilidad celular a lo largo de una semana tras retirar el tratamiento con oxaliplatino 1 mM durante 4 y 24 h, respectivamente, asociado con 2 h de exposición con cetuximab, 20 y 100 mg/mL, en la línea HT-29. Los datos representan la media \pm DS de tres experimentos independientes. *C (α : 0.05): diferencias a las 24, 72 y 144 horas entre los 2 tiempos de oxaliplatino.

2.4 Combinaciones de tratamientos HCT-116

Similares resultados a los descritos anteriormente para la línea celular HT-29, se encontraron en los estudios realizados en la línea HCT-116, tal y como se muestra en las figuras 13 y 14. La principal diferencia fue debida a la mayor sensibilidad que esta línea tiene a la acción del oxaliplatino, tal y como se observó en la figura 8.

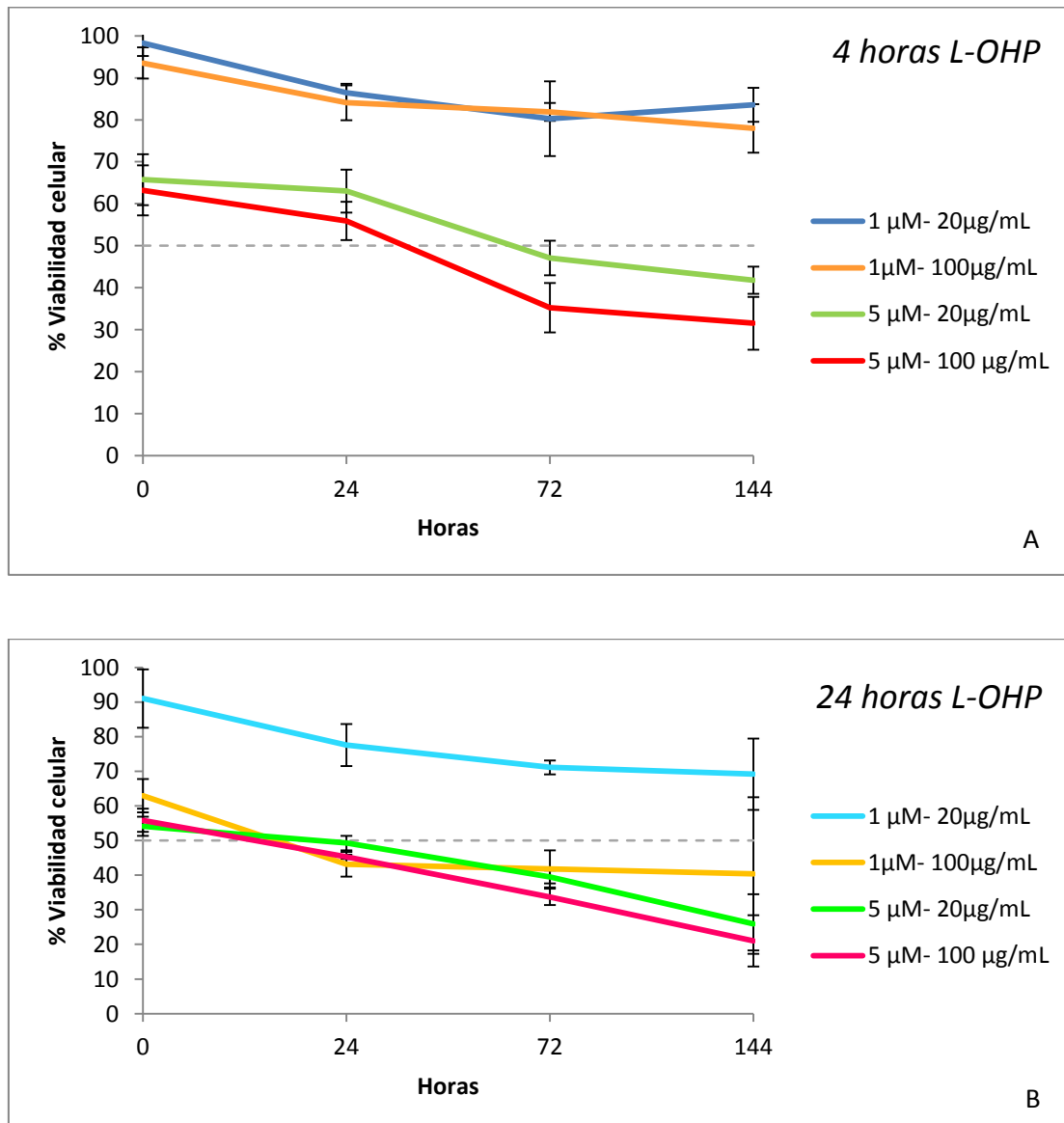


Figura 13: Porcentaje de viabilidad celular a lo largo de una semana tras retirar el tratamiento con oxaliplatino 1 y 5 mM durante 4 y 24 h, respectivamente, asociado con 24 h de exposición con cetuximab, 20 y 100 mg/mL, en la línea HCT-116. Los datos representan la media \pm DS de tres experimentos independientes. *A (α : 0.05) Existen diferencias entre las 2 concentraciones de oxaliplatino. B (α : 0.05) diferencias desde las 0 hasta las 144 horas post-tratamientos de 1μM/20 μg/mL respecto de todas, además a las 144 horas se observan diferencias entre las dos concentraciones de oxaliplatino.

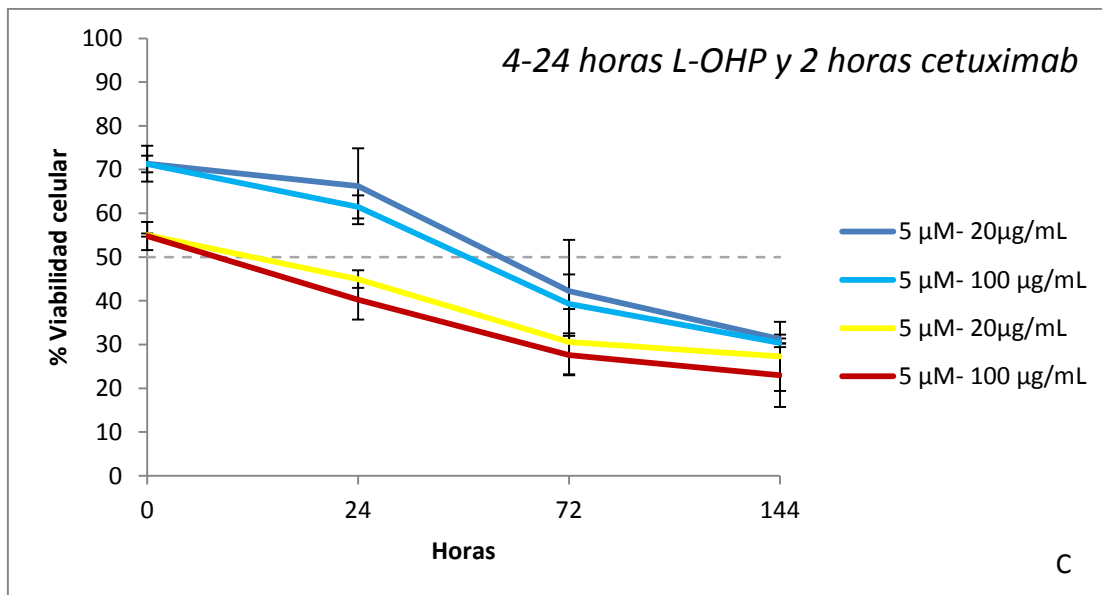


Figura 14: Porcentaje de viabilidad celular a lo largo de una semana tras retirar el tratamiento con oxaliplatino 1 mM durante 4 y 24 h, respectivamente, asociado con 2 h de exposición con cetuximab, 20 y 100 mg/mL, en la línea HCT-116. Los datos representan la media \pm DS de tres experimentos independientes. *C (α : 0.05) diferencias significativas entre los diferentes tiempos de oxaliplatino en 24, 72 y 144 horas.

En esta figura se observa que a pesar de encontrar ligeras diferencias entre 20 y 100 mg/mL de cetuximab para cada tratamiento, 4 o 24 h de exposición de oxaliplatino, no se encontró una significancia estadística en dichas diferencias. Por tanto, el efecto a tiempos cortos de exposición tampoco en este caso tuvo un impacto importante en el efecto antiproliferativo del oxaliplatino. Este resultado está en línea con el observado en la figura 9.

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se muestra el efecto antiproliferativo que el oxaliplatino solo o asociado con cetuximab, es capaz de ejercer en diferentes líneas de cáncer colorrectal humanas. Esta asociación se estableció sobre la base del actual tratamiento terapéutico que en CCR se administra en clínica.

Para realizar este trabajo fue necesario evaluar la sensibilidad y reproducibilidad de varias técnicas descritas en la literatura para medir viabilidad celular. Con cada una de ellas, se estableció el grado de correlación entre las distintas densidades celulares sembradas y la absorbancia obtenida para cada muestra.

Estas técnicas están basadas en diferentes mecanismos para cuantificar el número de células vivas o viables, tras un tratamiento específico con un antitumoral o agente tóxico. Entre ellas se han seleccionado las siguientes: Alamar Blue, MTT y Rojo Neutro. La citotoxicidad de los compuestos se aborda a través de estas técnicas, cuyo fundamento es la absorción de colorantes supra vitales. El ensayo deseable debe ser simple, rápido, fiable, sensible y seguro. En este caso, las tres técnicas se basan en ensayos colorimétricos. El MTT, ampliamente descrito y utilizado en literatura tiene diferentes variables (XTT, MTS, WSTS). El MTT (3 - (4,5 - Di metil tiazol -2-il) -2,5-di fenil tetrazolio bromuro) mide la actividad de las enzimas que reducen el compuesto MTT a formazan, dando un color púrpura. En los últimos años, el XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida) ha sido propuesto para reemplazar al actual ensayo MTT, debido a que produce una mayor sensibilidad y mayor rango dinámico. En nuestro trabajo, dicho ensayo mostró unos coeficientes de correlación (R^2) para HT-29 y HCT-116, inferiores a los de las otras dos técnicas. En general, esta técnica se utiliza para medidas puntuales en las que los resultados no se recogen en el tiempo, y siempre se expresan en relación al cambio de absorbancia con

un control. Teniendo en cuenta que en este estudio el efecto se valoró a lo largo de una semana, no se consideró lo suficientemente sensible como para su utilización.

El Rojo Neutro, Neutral Red Uptake Assay, es un colorante supra vital y modelo biológico ampliamente descrito para evaluar la viabilidad de diversas sustancias como plaguicidas y metales pesados (Reineke, y cols.2002). Esta técnica se basa en la acumulación del colorante en su forma protonada en lisosomas (Babich y Borenfreund, 1992). De esta forma, el tinte rojo queda atrapado en el interior de la célula, y para medirlo es necesario lisar la muestra de estudio (Mendoza A, y cols. 2008). Esta técnica presenta la ventaja de que la absorbancia es proporcional al número de células viables (Moreno y cols. 2009). Para las líneas HT-29 y HCT-116, los coeficientes de correlación obtenidos fueron de $R^2= 0.991$ y de 0.982 respectivamente. Valores elevados para una correlación valorada con 7 puntos correspondientes a las diferentes densidades de células. Dos tiempos de incubación con el colorante fueron analizados, 1,5 y 3 h. Los resultados fueron similares entre ellos, por lo que se estableció el tiempo más corto. Este resultado está en línea con el obtenido previamente para la línea DHD-K12Prob de adenocarcinoma de colon en ratas (Moreno y cols. 2009). Estos estudios, realizados previamente con el cisplatino en el grupo de trabajo, permitirán comparar los resultados obtenidos con ambos fármacos, cisplatino y oxaliplatino, en las diferentes líneas.

La técnica de Alamar Blue o colorante no tóxico tiene una amplia sensibilidad, detectando ligeros cambio en la densidad celular, y llegando a detectar valores tan bajos como 80 células / pocillo (O'Brien y cols., 2000). Sin embargo, esta técnica ha demostrado que depende del metabolismo celular y por lo tanto, presenta gran variabilidad de resultados entre líneas celulares (Nakayama, y cols. 1997; Al-Nasiry, y

cols. 2007). De hecho, el tiempo de incubación con el colorante varió entre 5 y 7 horas dependiendo de la línea. En el caso de la línea HT-29, dada la pendiente que se observa en la relación número de células/absorbancia (figura 5), cambios significativos en viabilidad, no quedan reflejados con suficiente sensibilidad en la absorbancia. Este, no es el caso de las líneas SW480 y SW620, donde las pendientes son muy pronunciadas y por tanto, muy sensible (figura 5).

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, se seleccionó la técnica del rojo neutro, debido a las ventajas que presentó en rapidez, sencillez y sensibilidad para las líneas propuestas.

El oxaliplatino ha mostrado ser eficaz en el tratamiento del cáncer de colon metastático y cáncer rectal (Arnauld S, y cols. 2003). Sin embargo, en monoterapia su eficacia es muy baja de ahí que se utiliza asociado a otros compuestos. En clínica, el oxaliplatino en combinación con 5-fluorouracilo (5-FU) y ácido folínico (AF) está indicado como terapia de primera línea para la cáncer colorrectal metastático.

Para estudiar en más detalle este hecho, fue necesario establecer un primer diseño, para evaluar la influencia de la exposición al fármaco, primero en monoterapia y posteriormente en combinación. Para este fin, se seleccionaron dos tiempos de exposición diferentes, 4 y 24 horas, una exposición corta y otra larga, respectivamente, para evaluar el impacto del tiempo en el efecto. Como se ha señalado anteriormente por otros autores, encontramos que el efecto del oxaliplatino fue tiempo y concentración dependiente (Pendyala, Creaven, 1993; Mishima, y cols. 2002). En monoterapia, los resultados mostraron que la concentración tuvo un impacto mayor en el efecto que el propio tiempo de exposición, el cual contribuyó de forma especial cuando la concentración fue mayor. Esto podría explicarse, al menos en parte, por el mecanismo

de acción del oxaliplatino, lo que hace que en clínica se administren dosis elevadas en tiempos cortos de 4, 3 y hasta 2 horas de infusión endovenosa. Los resultados de la figura 8, indican que durante 4 horas de exposición, la concentración de oxaliplatino necesaria para inducir un efecto importante debe ser muy alta. Este dato hace pensar en la aparición de un posible fenómeno de resistencia, sin embargo, ésta no se produce de forma sustancial, hasta después de al menos seis ciclos de tratamiento con este fármaco, tal y como comenta Mishima y colaboradores en 2002, en un estudio preclínico.

Por otra parte, el efecto antiproliferativo observado para el oxaliplatino fue mayor en la línea HCT-116 que en HT-29. Este resultado es apoyado por otros autores, que comentan la acción del gen p53 como responsable de esta diferencia en la acción del antitumoral (Tatiana y cols. 2007). De hecho, una alteración o mutación de este gen, como ocurre en la línea HCT-116, implica un aumento en la sensibilidad al fármaco antitumoral, en este caso al oxaliplatino. Esta sensibilidad, se produce por una mayor acumulación de células en la fase G1 del ciclo celular, que inducirían la apoptosis de las mismas.

Debido a la tolerabilidad de los efectos adversos del oxaliplatino y su relativa eficacia en cáncer de colon, en los últimos años se han ensayado asociaciones con nuevas biomoléculas, las cuales presentan a su vez, una menor incidencia de efectos adversos.

Sobre la base de los resultados de los últimos ensayos clínicos, de regímenes de combinación 5-fluorouracil/leucovorin y oxaliplatino (FOLFOX), se ha introducido otros agentes biológicos dirigidos a la angiogénesis o a determinados receptores, como el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), implicado en procesos de proliferación celular al régimen FOLFOX (Grothey y cols. 2004). De entre estas

moléculas, el cetuximab, un anticuerpo monoclonal dirigido al EGFR, ha demostrado mejorar la eficacia del oxaliplatino, tanto a nivel preclínico como clínico. Sin embargo, no son muchos los trabajos que a nivel celular han profundizado en este posible sinergismo entre ambos compuestos. De ahí que en este trabajo se hayan utilizado dos líneas con características moleculares diferentes en relación al oncogen p53 y la expresión del EGFR. Así, encontramos en la figura 13 que la línea HCT-116 mostró cierta tendencia a disminuir la proliferación celular tras el tratamiento con cetuximab, mientras que HT-29 no se vio influenciada (figura 10). Esto es debido a que el grado de expresión de los receptores EGF es mayor en HCT-116 que en HT-29, lo que explicaría esa tendencia. Similares resultados fueron descritos por Balin-Gauthier y colaboradores (2006), quienes además de establecer la correlación entre el grado de expresión del receptor, también lo hicieron para el grado de fosforilización basal de dicho receptor. Esto es debido a que el cetuximab es capaz de una vez que se une al receptor inhibe su fosforilización, bloqueando así su acción proliferativa.

El cetuximab es un anticuerpo monoclonal quimérico que se une al receptor de EGF, y provoca efectos en el crecimiento tumoral, la invasión, la angiogénesis y la metástasis. Cetuximab se une al receptor de EGF, esto se traduce a aumentar los efectos de la quimioterapia y radioterapia.

Respecto a los resultados de combinación, los datos *in vitro* obtenidos en este estudio demuestran que la administración secuencial de oxaliplatino y cetuximab (oxaliplatino→ →cetuximab) se traduce en mayores efectos citotóxicos que los observados con la aplicación de oxaliplatino solo. En general los resultados fueron igual de consistentes en ambas líneas, aunque la acción antiproliferativa fue mayor en la línea HCT-116, tal y como se esperaba en base a lo descrito anteriormente.

El beneficio del cetuximab se ha establecido en varios ensayos clínicos. Un ejemplo es el estudio NORDIC-VII, estudio multicéntrico de fase III, donde se observó la eficacia de cetuximab combinado con 5-fluorouracilo / ácido folínico y oxaliplatino (Nordic FLOX), tras una administración continua e intermitente, en pacientes CCR no tratados previamente.

En otros ensayos clínicos, el cetuximab se combinó con el irinotecán, 5-fluorouracilo y leucovorin (FOLFIRI) como tratamiento de primera línea para el cáncer colorrectal metastásico. El cetuximab más FOLFIRI en comparación con FOLFIRI solo, redujo el riesgo de progresión del cáncer colorrectal metastático en meses (Eric Van Cutsem, y cols. 2009).

Para poder establecer con más detalle la relación entre cetuximab y oxaliplatino, nuevos estudios se están realizando en el grupo de trabajo, con otras líneas de cáncer de colon y otros regímenes de administración. De esta forma se tratará de establecer, la influencia del receptor, del grado de fosoforilación basal y el efecto del p53, en el efecto antiproliferativo de ambos compuestos.

VI. CONCLUSIONES

En conclusión:

1. L-OHP mostró un efecto citotóxico in vitro dependiente del tiempo y de la concentración, en las dos líneas celulares de carcinoma humanos utilizados en este estudio.
2. El cetuximab en monoterapia no mostro ningún tipo de efecto citotóxico en ninguna de las dos líneas de adenocarcinoma.
3. La influencia del cetuximab en la combinación con el L-OHP potenció el efecto antiproliferativo del L-OHP en ambas líneas celulares.
4. La combinación de ambos fármacos mostró mayores efectos de muerte celular, especialmente en los tiempos largos de lectura de la viabilidad celular. Es decir, el mayor efecto citotóxico se retraso hasta los tiempos de 72 y 144 horas en la mayoría de las combinaciones.
5. La técnica del Rojo Neutro es un método sencillo rápido y de carácter cuantitativo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Ahmed SA, Gogal RM,Jr, Walsh JE. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods* 1994 Apr 15;170(2):211-224.

Arnould S, Hennebelle I, Canal P, Bugat R, Guichard S. Cellular determinants of oxaliplatin sensitivity in colon cancer cell lines. *Eur J Cancer* 2003 Jan;39(1):112-119.

Babich, H, Borenfreund, *In vitro Methods of Toxicology. Handbooks in Pharmacology and Toxicology.* 1992. CRC Press, Boca Raton, EE.UU.

Balin-Gauthier, D., Delord, J.P., Rochaix, P., Mallard, V., Thomas, F., Hennebelle, I., Bugat, R., Canal, P. & Allal, C. " In vivo and in vitro antitumor activity of oxaliplatin in combination with cetuximab in human colorectal tumor cell lines expressing different level of EGFR", *Cancer chemotherapy and pharmacology.* 2006 vol. 57, no. 6, pp. 709-718.

Bardelli, A, Pasi A J. The road to resistance: EGFR mutation and cetuximab. *Nature Medicine.* 2012. 18, 199–200

Broadbridge VT, Karapetis CS, Price TJ. Cetuximab in metastatic colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2012 May;12(5):555-65.

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004 Jul 22; 351(4):337-45.

Dahan L, Sadok A, Formento JL, Seitz JF, Kovacic H. Modulation of cellular redox state underlies antagonism between oxaliplatin and cetuximab in human colorectal cancer cell lines. *Br J Pharmacol* 2009 Sep;158(2):610-620.

Eric Van Cutsem, Claus-Henning Köhne., Erika Hitre, Jerzy Zaluski, Chung-Rong Chang Chien, Anatoly Makhson, y cols. Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *n engl j med* 360;14. april 2, 2009.

Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*. 2007 Mar;18(3):581-92.

Fink D, Zheng H, Nebel S, Norris PS, Aebi S, Lin TP, Nehme A, Christen RD, Haas M, MacLeod CL, Howell SB (1997) In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair. *Cancer Res* 57: 1841–1845

Goegan P, Johnson G, Vincent R. Effects of serum protein and colloid on AB assay in cell cultures. *Toxic In Vitro* 1995;9:257-266.

Grothey A, Goldberg RM. A review of oxaliplatin and its clinical use in colorectal cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2004 Oct;5(10):2159-2170.

Hong-Jo Choi, Jin Yong Shin. Colorectal Cancer with Multiple Metastases: Is Palliative Surgery Needed? *J Korean Soc Coloproctol* 2011;27(5):226-230. Review

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009 Jul-Aug;59(4):225-49

Lars Ekblad and Anders Johnsson. Cetuximab Sensitivity Associated with Oxaliplatin Resistance in Colorectal Cancer. . *Anticancer research* 2012. 32: 783-786

Mendoza A, Ramirez Romero, P. Ensayos Toxicológicos Para la Evaluación de Sustancias Químicas en Agua Y Suelo: La Experiencia en México Compilado. 2008. Instituto Nacional de Ecología.

Mishima M, Samimi G, Kondo A, Lin X, Howell SB. The cellular pharmacology of oxaliplatin resistance. *Eur J Cancer* 2002 Jul;38(10):1405-1412.

Moreno D, Troconiz IF, Enguita M, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Garrido MJ. Semi-mechanistic description of the in-vitro antiproliferative effect of different antitumour agents. *J Pharm Pharmacol* 2008 Jan;60(1):77-82.

Moreno D, Zalba S, Navarro I, Tros de Ilarduya C, Garrido MJ. Pharmacodynamics of cisplatin-loaded PLGA nanoparticles administered to tumor-bearing mice. *Eur J Pharm Biopharm* 2010 Feb;74(2):265-274.

Nannizzi S, Veal GJ, Giovannetti E, Mey V, Ricciardi S, Ottley CJ, y cols. Cellular and molecular mechanisms for the synergistic cytotoxicity elicited by oxaliplatin and pemetrexed in colon cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;66:547–558

Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods* 1997 May 26;204(2):205-208.

Nociari MM, Shalev A, Benias P, Russo C. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Meth* 1998;213:157-167.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin.* 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.

Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, Kuniyasu H, Eve BY, Hicklin DJ, Radinsky R, Dinney CP. Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res.* 1999 Feb;5(2):257-65.

Prewett M, Deevi DS, Bassi R, Fan F, Ellis LM, Hicklin DJ, Tonra JR. Tumors established with cell lines selected for oxaliplatin resistance respond to oxaliplatin if combined with cetuximab. *Clin Cancer Res.* 2007 Dec 15; 13(24):7432-40.

Raymond E, Faivre S, Chaney S, Woynarowski J, Cvitkovic E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol Cancer Ther.* 2002 Jan; 1(3):227-35. Review.

Sanchez-Cano C, Hannon MJ. Novel and emerging approaches for the delivery of metallo-drugs. *Dalton Trans.* 2009 Dec 28; (48):10702-11. Review.

Sharma RI, Smith TAD. Colorectal Tumor Cells Treated with 5-FU, Oxaliplatin, Irinotecan, and Cetuximab Exhibit Changes in ¹⁸F-FDG Incorporation Corresponding to Hexokinase Activity and Glucose Transport. *Journal of Nuclear Medicine.* 2008 August 2008;49(8):1386-94.

Stordal B, Pavlakis N, Davey R. Oxaliplatin for the treatment of cisplatin-resistant cancer: a systematic review. *Cancer Treat Rev* 2007 Jun;33(4):347-357.

T. Alcindor, N. Beauger. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr Oncol*. 2011 Jan;18(1):18-25.

Tatiana V. Rakitina, Irina A. Vasilevskaya, Peter J. O'Dwyer. Inhibition of G1/S transition potentiates oxaliplatin-induced cell death in colon cancer cell lines. *Biochem Pharmacol*. 2007. 1715–1726.

Tol J, Punt CJ. Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer: a review. *Clin Ther*. 2010 Mar; 32(3):437-53.

Tveit KM, Guren T, Glimelius B, Pfeiffer P, Sorbye H, Pyrhonen S, y cols. Phase III Trial of Cetuximab With Continuous or Intermittent Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin (Nordic FLOX) Versus FLOX Alone in First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: The NORDIC-VII Study. *J Clin Oncol*. 2012 May 20;30(15):1755-62.