

Estudio de factores que condicionan la
sensibilidad al tratamiento con TK/GCV.
Diseño de estrategias combinadas para
potenciar la citotoxicidad de TK/GCV:

Silenciamiento de genes antiapoptóticos y virus
oncolíticos armados con TK

Daniel Abate-Daga

TESI DOCTORAL UPF / 2009

DIRECTOR DE LA TESI

Dra. Cristina Fillat Fonts

Programa Gens i Malalties. CRG-PRBB

Dipòsit Legal:

ISBN:

A mis padres, Odel e Hilda

Estudio de factores que condicionan la sensibilidad al tratamiento con TK/GCV. Diseño de estrategias combinadas para potenciar la citotoxicidad de TK/GCV: silenciamiento de genes antiapoptóticos y virus oncolíticos armados con TK

Memoria presentada por

Daniel Abate-Daga

Para optar por el grado de

Doctor por la Universitat Pompeu Fabra

Tesis de investigación realizada bajo la dirección de la Dra. Cristina Fillat Fonts, en el Centre de Regulació Genòmica Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB)

Tesis adscrita al Departament de Ciències Experimentals i de la Salut,
Facultat de Ciències de la Salut i de la Vida
Universitat Pompeu Fabra
Programa de Biomedicina
2009

Cristina Fillat i Fonts

Daniel Abate-Daga

Agradecimientos

Por muy extraño que pueda parecer, escribir esta sección resulta más complicado que describir los experimentos realizados durante toda una tesis y revisar la bibliografía relacionada con el tema. La explicación es sencilla: en doscientas páginas hay margen para preguntarse, proponer, describir, argumentar, contraargumentar y concluir a discreción. Por el contrario, expresar en unas pocas páginas la gratitud inspirada por todas y cada una de las personas que durante estos cinco años han contribuido a que este proyecto llegase a término, resulta sumamente laborioso.

En primer lugar, quiero agradecer a la supervisora de este trabajo, la Dra **Cristina Fillat**. Si tuviese que enumerar cronológicamente todas las razones comenzaría agradeciendo el hecho de haber contestado un email, hace casi seis años, desde el otro lado del Atlántico y acabaría agradeciendo la paciencia en las vísperas del depósito de esta memoria. Mi más sincera gratitud por la confianza y el apoyo brindado durante todo este tiempo, por haber sabido lograr el balance óptimo entre supervisión y libertad de acción, y por generar un espacio de trabajo estimulante y armonioso a la vez.

Hago extensivo el agradecimiento a los demás miembros del grupo (el ex-p15), por la solidaridad y el compañerismo demostrado día a día y por hacerme sentir en casa desde el primer momento. Por hacer que compartir tanta vida con ellos, dentro y fuera del laboratorio, sea un placer.

Quiero agradecer especialmente a Nuria, porque además de hacer gala de una eficiencia sobrehumana a la hora de trabajar y una predisposición infinita a compartir sus conocimientos, su ayuda en la confección y compaginación de esta memoria han sido cruciales. Por “prestarle” su familia las navidades que he pasado lejos de la mía.

A Jon, por su amistad dentro y fuera del laboratorio. Por estar siempre ahí para compartir las alegrías y brindar apoyo cuando las alegrías no abundan. Y por supuesto, por compartir los chipirones *alla Abalia*.

A Laura, por los ordenadores, las cañas, los viajes, las alegrías, los agobios y los conciertos compartidos durante estos años. Por enseñarme su ciudad, que no tardé en adoptar como propia.

A Meri H, por ser una fuente inagotable de conocimiento y por estar siempre dispuesta a brindar una mano antes de que se lo pidan. Por hacer posible que, estando parados en las antípodas en tantísimos aspectos, nos hayamos convertido en el “dúo dinámico” del estabulario y en muy buenos amigos fuera de éste.

A Anabel, la reina del diseño, por aportar tanta frescura al laboratorio.

A Xevi B y Ana M, los nuevos fichajes, por transmitir tanta ilusión y ganas de aprender.

A Xavi A, Anna C y Meri C, por ser la voz de la experiencia.

A los miembros del ex laboratorio p17. La vieja guardia: Maritxu, Nasi, Glori, Xavi, Gari y Carla, y las nuevas incorporaciones. Por hacer que la “convivencia” (tan temida por algunos, antes de producirse la fusión) resulte tan natural y placentera.

A los vecinos del ex-p35 (A y B o B y A, según como se mire), las figuritas repetidas de las Happy Hours (y otros eventos sociales) desde el principio de los tiempos.

Al ex-p13 y al CEGEN, esa extraña combinación de ciencia y surrealismo, por hacerme un lugarcito dentro del grupo y por estar tan adorablemente locos. Y en particular a Ester B, por las clases de català y la sonrisa siempre a punto. Aún sigo sin comprender cómo pude sobrevivir a los primeros 23 años de mi existencia sin conocer Torelló...

Y a todas las personas del CRG con las que cada día compartimos pasillo y/o terraza, por las conversaciones que duran lo que un cigarrillo, y por los debates sobre cine, que seguramente no tardarán en echarse en falta.

A los miembros de mi Comité de Tesis, los doctores Paco Real, Mariona Arbonés y Lauro Sumoy, quienes realizaron la evaluación anual de este proyecto, aportando valiosos comentarios y sugerencias.

A la Dra Olga Millán, y a la Laura Espanya y Dolors de la Fuente, nuestras colaboradoras del IAT. Por hacer que de un experimento con ratones un perfecto plan para sábado por la noche.

A los doctores Ramón Alemany y Manel Cascalló por compartir sus conocimientos sobre adenovirus y alguna que otra caña en el *after hours* de algún congreso.

A Noe, Brian, Sam y Vero, mis amigos del alma. Por mantener viva la amistad a pesar de los husos horarios y las toneladas de plancton que nos separan. Por acudir inmediatamente a los “comités de crisis” *on-line* cada vez que fue necesario y por .

Gloria y Roberto, por ser mis “padrinos científicos”, eterna fuente de consulta y, sobre todo, muy buenos amigos.

A los amigos que están este lado del charco: Esti, Urtzi, Marcos, Xavi, Berta, Sebas, Aritz, Amaia, Juli, Naren , Nuria, Pierre-Yves, Esther, y los del otro lado: Seba, Virgie, Sole, Paula, Marcos, Sabrina, Marce, por estar ahí, haciendo que las distancias sean relativas.

A mi familia, por el apoyo incondicional, en especial a mis hermanos, Mario y Miriam, y a mis padres, por adaptarse a las circunstancias y, sobre todo, a las distancias. Y por poner desde siempre tierra firme bajo mis pies.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, proyectos SAF2002-04122-C03-02 y BIO2005-08682-C03-02) y por una beca predoctoral de la Fundación Carolina, Programa de Oncología, 2004-2006.

Resumen

El sistema TK/GCV es, probablemente, la estrategia suicida mejor caracterizada hasta el momento. No obstante, se desconocen muchos aspectos relacionados con su mecanismo de acción. Con el objetivo de indentificar condicionantes de la respuesta TK/GCV, realizamos un estudio comparativo de la expresión de genes y de las vías de señalización que se activan en células sensibles y en células resistentes al tratamiento. Así, pudimos asociar la actividad de la quinasa Chk1, y la expresión de genes involucrados en el control del ciclo celular, con una mayor respuesta al sistema suicida. Así mismo, determinamos que la combinación de TK/GCV con el inhibidor de Chk1 UCN-01 produce un efecto antagónico en las células sensibles a TK/GCV. Por otro lado, la terapia combinada capaz de lisar las células e inducir muerte celular por fosforilación de GCV, en un único agente (ICOVIR11), resultó en una potenciación de sus efectos citotóxicos, permitiendo la compensación de la pérdida de potencia secundaria al uso de un promotor selectivo de tumor. Más aún, la expresión de TK como gen tardío de ICOVIR11, permitió la monitorización in vivo y de manera no invasiva, de la actividad TK y la replicación viral.

Abstract

Although extensively characterized, the paradigmatic suicide system TK/GCV conceals the details of its ultimate mechanism of action. In order to shed some light on this issue, we conducted a series of experiments with resistant and sensitive cell lines, allowing us to identify cell cycle-related genes that are deregulated in cells with induced resistance to TK/GCV. In addition, the association of Chk1 activation with a greater sensitivity to TK/GCV, pointed out the relevance of the cell cycle status at the moment of receiving the treatment, and its control in response to genotoxic insults. Treatment with a Chk1 inhibitor induced, in sensitive cells, an antagonistic effect on TK/GCV cytotoxicity. On the other hand, single-agent combination therapy of TK/GCV with adenoviral lysis resulted in enhanced cytotoxicity. In this setting the expression of TK as a late gene in an oncolytic adenovirus minimized the loss of potency associated to the conditioning of viral replication. On top of that, TK expression allowed for in vivo, real time, non-invasive monitoring of viral replication in mice, and was used to analyze the effects of treatment schedule on treatment outcome.

Prefacio

El tratamiento del cáncer plantea varios e importantes desafíos a la medicina moderna. El adenocarcinoma pancreático humano, en particular, representa actualmente la cuarta causa de muerte por cáncer en países industrializados, presentándose con un pronóstico sumamente desfavorable debido a la ausencia de terapias efectivas para su tratamiento. Entre las terapias experimentales que involucran la transferencia de genes, la que utiliza el sistema suicida TK/GCV constituye una alternativa prometedora para el tratamiento de esta y otras patologías. El presente trabajo ha sido realizado en el marco de un grupo de investigación que desde hace varios años aúna esfuerzos con el objetivo de optimizar la aplicación de este tratamiento, interviniendo a diversos niveles. En este contexto, el trabajo expuesto en esta memoria ha estado enfocado hacia el estudio de aspectos mecanísticos de la inducción de citotoxicidad por el sistema TK/GCV y de los procesos moleculares que condicionan la respuesta de las células tumorales al tratamiento, sobre la base de un análisis comparativo entre células con diferentes grados de sensibilidad y procurando integrar la información obtenida utilizando diversos modelos experimentales. Teniendo presente la variabilidad intrínseca que presentan las células tumorales, se ha hecho especial hincapié en el diseño, desarrollo y evaluación de terapias combinadas tendientes a incrementar su eficacia terapéutica, mediante el tratamiento conjunto con fármacos, con agentes moduladores de la expresión de genes endógenos y con estrategias de viroterapia, con el objetivo de ampliar el espectro de células tumorales susceptibles de ser eliminadas mediante la aplicación de la terapia con TK/GCV.

Índice

| | Pág |
|---|-----|
| Resumen..... | I |
| Prefacio..... | III |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Control de la proliferación celular..... | 3 |
| a) Control del ciclo celular..... | 3 |
| La vía pRb/E2F..... | 4 |
| Quinasas dependientes de ciclinas..... | 4 |
| Checkpoints..... | 5 |
| b) Muerte celular programada..... | 9 |
| 1.2. Cáncer de páncreas..... | 10 |
| a) Aspectos epidemiológicos y clínicos..... | 12 |
| b) Aspectos histopatológicos, citogenéticos y moleculares.... | 13 |
| c) Aspectos farmacológicos..... | 14 |
| 1.3. Terapia génica del cáncer | 15 |
| a) Terapias con genes suicidas..... | 15 |
| El sistema Timidina Quinasa/Ganciclovir (TK/GCV)..... | 16 |
| Fundamento y mecanismo de acción | 17 |
| Aplicaciones terapéuticas..... | 20 |
| Factores que condicionan la eficiencia citotóxica de TK/GCV..... | 21 |
| b) Interferencia de ARN..... | 24 |
| 1.4. Viroterapia del cáncer..... | 25 |
| a) Fundamento y mecanismo de acción | 25 |
| b) Adenovirus de replicación condicionada (CRAd)..... | 26 |
| Aspectos estructurales y genómicos..... | 26 |
| Infección por adenovirus en forma salvaje (ciclo lítico)..... | 27 |
| Estrategias para lograr la especificidad..... | 28 |
| c) Principales limitaciones..... | 31 |
| d) Virus armados..... | 32 |
| 1.5. Técnicas no invasivas para la monitorización <i>in vivo</i> del tratamiento con genes suicidas..... | 34 |

| | Pág |
|---|-----|
| 2. OBJETIVOS..... | 39 |
| 2.1. Objetivos generales..... | 41 |
| 2.2. Objetivos específicos..... | 41 |
| | |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 43 |
| 3.1. Técnicas relacionadas con la manipulación de ácidos nucleicos..... | 45 |
| a) ADN..... | 45 |
| a) 1. Extracción de ADN de células procariotas..... | 45 |
| Minipreparación de ADN..... | 45 |
| Maxipreparación | 45 |
| a) 2. Extracción de ADN total a partir de de tejidos..... | 46 |
| a) 3. Cuantificación de ADN..... | 46 |
| a) 4. Reacción en cadena de la polimerasa..... | 47 |
| a) 5. PCR en tiempo real | 49 |
| a) 6. Digestión con enzimas de restricción y modificación..... | 51 |
| Endonucleasas de restricción..... | 51 |
| Generación de extremos romos..... | 51 |
| a) 7. Clonaje de oligonucleótidos de ADN en plásmidos..... | 52 |
| Reacción de ligación..... | 52 |
| Clonado y amplificación de construcciones..... | 52 |
| a) 8. Eletroforesis en geles de agarosa..... | 53 |
| a) 9. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa..... | 53 |
| a) 10. Secuenciación..... | 54 |
| a) 11. Plásmidos y oligonucleótidos..... | 55 |
| a) 12. Transformación con ADN plasmídico..... | 56 |
| b) ARN..... | 56 |
| b) 1. Extracción de ARN total de células eucariotas..... | 56 |
| b) 2. Cuantificación y control de calidad..... | 57 |

| | Pág |
|--|-----|
| b) 3. Eliminación de ADN contaminante..... | 57 |
| b) 4. Síntesis de ADN copia (ADNc) | 57 |
| b) 5. Análisis transcriptómico mediante micrrays de oligonucleótidos..... | 58 |
| Generación de sondas de ARN copia (ARNc)..... | 58 |
| Hibridación..... | 58 |
| Adquisición de datos..... | 58 |
| Análisis de datos..... | 59 |
| 3.2 Técnicas relacionadas con la manipulación de proteínas. | 59 |
| a) Obtención y cuantificación de extractos proteicos..... | 59 |
| b) Electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida.... | 61 |
| c) Electrotransferencia (Western blot)..... | 62 |
| d) Detección inmunológica de proteínas..... | 63 |
| e) Inmunofluorescencia..... | 65 |
| f) Determinación de la actividad luciferasa <i>in vitro</i> | 66 |
| 3.4 Técnicas relacionadas con la manipulación de vectores adenovirales..... | 67 |
| a) Generación..... | 67 |
| - Recombinacion homóloga en células <i>E. coli</i> , cepa BJ5183..... | 68 |
| b) Amplificación..... | 69 |
| c) Purificación..... | 70 |
| d) Desalado del <i>stock</i> viral..... | 72 |
| e) Titulación del <i>stock</i> viral..... | 73 |
| f) Almacenamiento..... | 74 |
| 3.4 Técnicas relacionadas con la manipulación de células eucariotas..... | 75 |
| a) Líneas celulares derivadas de cáncer de páncreas..... | 75 |
| b) Otras líneas celulares utilizadas..... | 75 |
| c) Condiciones de cultivo..... | 76 |
| d) Propagación de células adherentes..... | 76 |
| e) Congelación y descongelación de stocks..... | 77 |

| | Pág |
|--|--------|
| f) Recuento de células..... | 77 |
| g) Determinación de la viabilidad celular..... | 78 |
| h) Cuantificación de células apoptóticas..... | 79 |
| i) Análisis de ciclo celular..... | 79 |
| j) Transfección transitoria de ADN plasmídico..... | 81 |
| -Precipitación con fosfato cálcico..... | 81 |
| -Transfección con lípidos catiónicos..... | 82 |
| k) Análisis de la síntesis de ADN en células en cultivo..... | 83 |
| l) Tratamiento con fármacos y análisis de interacción..... | 83 |
| 3.5 Técnicas relacionadas con la manipulación de animales de experimentación..... | 84 |
| a) Animales utilizados..... | 84 |
| b) Estabulación..... | 85 |
| c) Generación de tumores subcutáneos (xenoinjertos) en ratones atómicos..... | 85 |
| d) Medida del tamaño y seguimiento del crecimiento tumoral..... | 85 |
| e) Administración de fármacos..... | 86 |
| f) Administración de vectores virales..... | 86 |
| g) Tomografía por emisión de positrones (PET)..... | 86 |
| 3.6 Análisis estadístico de los datos..... | 87 |
| 4. RESULTADOS | 89 |
| 4.1. Estudio de la citotoxicidad del tratamiento TK/GCV sobre células de cáncer de páncreas. Mecanismo de acción y factores determinantes de sensibilidad..... | 91 |
| a) Estudio de la sensibilidad al sistema TK/GCV en líneas celulares de cáncer de páncreas..... | 91 |
| Dosis Inhibitoria 50%..... | 91 |
| Inducción de apoptosis..... | 94 |

| | Pág |
|--|-----|
| Ciclo celular..... | 96 |
| b) Estudio de la inducción de resistencia en células sensibles a TK/GCV..... | 99 |
| Generación de un modelo de resistencia inducida..... | 100 |
| Caracterización de la respuesta de las células NP-18AR al tratamiento con AdTK/GCV..... | 100 |
| - Análisis de la sensibilidad al tratamiento con AdTK/GCV..... | 100 |
| - Análisis de la inducción de apoptosis | 102 |
| - Análisis de la progresión del ciclo celular en respuesta al tratamiento | 102 |
| Análisis transcriptómico comparativo de la respuesta a TK/GCV de células NP-18 y NP18AR..... | 103 |
| - Diseño experimental..... | 103 |
| - Categorías sobrerrepresentadas..... | 104 |
| - Validación de los resultados mediante técnicas de biología molecular..... | 105 |
| - Validación funcional..... | 108 |
| - Expresión basal de GADD45A y CCNE1 e inducción en respuesta a TK/GCV, en líneas celulares..... | 111 |
| c) Estudio de la respuesta celular al daño en el ADN inducido por TK/GCV y su relación con la sensibilidad al tratamiento..... | 113 |
| - Activación del punto de restricción de fase S en células NP-18 tratadas con TK/GCV..... | 114 |
| - Fosforilación de Chk1 en BxPC-3 y NP-9..... | 116 |
| - Validación funcional de la participación de Chk1 en la respuesta a TK/GCV..... | 118 |
| - Efectos de la inhibición de Chk1 sobre la progresión en el ciclo celular..... | 119 |
| - Efectos de la inhibición de Chk1 sobre la síntesis de ADN..... | 120 |
| - Efectos de la inhibición de Chk1 sobre la sensibilidad a TK/GCV..... | 123 |
| 4.2 Estudio de estrategias para incrementar la potencia y/o la selectividad del sistema TK/GCV..... | 127 |
| a) Estudio del silenciamiento de un gen antiapoptótico para aumentar la potencia citotóxica del sistema TK/GCV..... | 127 |
| Expresión de genes antiapoptóticos en células de cáncer de páncreas..... | 127 |

| | Pág |
|--|-----|
| Silenciamiento del gen BCL2 mediante interferencia de ARN (RNAi) | 128 |
| -Selección de secuencias diana candidatas..... | 128 |
| - Construcción de un vector plasmídico para la expresión de ARN en conformación de horquilla (shRNA) | 129 |
| - Selección de shRNAs con eficacia silenciadora..... | 130 |
| - Construcción de un vector plasmídico bifuncional para la expresión conjunta de Tat8TK y shRNA..... | 130 |
| - Análisis de la eficacia citotóxica de la combinación del tratamiento TK/GCV con el silenciamiento de BCL2..... | 131 |
| - Producción de AdTat8TK-shBCL2-433..... | 133 |
| - Actividad de AdTat8TK-shBCL2-433..... | 133 |
| b) Estudio de la utilización de un adenovirus replicativo para incrementar la potencia citotóxica del sistema TK/GCV. Análisis de eficacia, elementos de seguridad y monitorización <i>in vivo</i> | 137 |
| Estudio de la combinación de la citotoxicidad inducida por TK/GCV con la muerte por lisis viral..... | 137 |
| - Comparación de la citotoxicidad inducida por AdTK/GCV y por AdRGDTat8TK-L <i>in vitro</i> | 137 |
| - Comparación de la citotoxicidad inducida por AdRGDTat8TK-L en presencia y ausencia de GCV <i>in vivo</i> | 141 |
| Estudio del uso del promotor de E2F como herramienta de control de la replicación adenoviral y de la expresión de TK..... | 142 |
| - Generación de pICOVIR11..... | 143 |
| - Producción y purificación de ICOVIR11..... | 143 |
| - Estudio comparativo de la potencia citotóxica de ICOVIR11, AdRGDTat8TK-L y AdRGDwt, en presencia y ausencia de ganciclovir..... | 145 |
| - Estudio comparativo de la potencia citotóxica de AdRGDwt y ICOVIR11/GCV en un modelo <i>in vivo</i> de cáncer de páncreas..... | 151 |
| - Estudio de la potencia citotóxica de ICOVIR11/GCV administrado sistémicamente en un modelo <i>in vivo</i> de cáncer de páncreas..... | 153 |

| | Pág |
|--|---------|
| Monitorización de la replicación de ICOVIR11 <i>in vivo</i> , mediante la detección de actividad de timidina quinasa por Tomografía de Emisión de Positrones..... | 155 |
| - Validación de la técnica de Tomografía por Emisión de Positrones para la detección <i>in vivo</i> de la actividad de timidina quinasa expresada mediante un vector adenoviral..... | 155 |
| - Detección y análisis curso-temporal de actividad TK en xenoinjertos de BxPC-3 inyectados con ICOVIR11..... | 157 |
| -Estudio de la influencia del régimen de aplicación del tratamiento ICOVIR11/GCV sobre su eficiencia antitumoral..... | 160 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 165 |
| 5.1. Condicionantes celulares de la acción de TK/GCV..... | 167 |
| 5.2. Implicaciones derivadas del mecanismo de acción de TK/GCV para el desarrollo de terapias combinadas..... | 173 |
| 5.3. TK/GCV en combinación con viroterapia..... | 177 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 185 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 189 |
| ANEXO..... | 113 |

INTRODUCCIÓN

“Curiosidad: Impulso humano que oscila entre lo grosero y lo sublime. Lleva a escuchar detrás de las puertas o a descubrir América”

José María Eça de Queirós

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Control de la proliferación celular

Los organismos multicelulares necesitan mantener un control minucioso de la proliferación celular para garantizar el correcto funcionamiento de todos sus componentes. Para mantener la estructura y la funcionalidad de cada tejido, es necesario garantizar la presencia de determinados tipos celulares de manera organizada, tanto en términos de localización espaciotemporal como de abundancia relativa. Para ello, dichos organismos han desarrollado mecanismos de control sobre la tasa de replicación y la viabilidad celulares, los cuales actúan, en muchas ocasiones, en detrimento de la supervivencia de células individuales.

Para incrementar el número de células eucariotas de una determinada población, éstas atraviesan cíclicamente una serie de fases que se diferencian entre sí en función del contenido de ADN genómico, de su actividad metabólica y del tamaño celular. Dichas fases se denominan: G0 (contenido de ADN = $2n$), que corresponde a las células quiescentes que han cesado de proliferar; G1 (contenido de ADN = $2n$), durante la cual se sintetizan las proteínas necesarias para la posterior síntesis de ADN y se acumulan nutrientes para hacer frente al costo energético del proceso, produciendo un aumento en el tamaño celular; S (contenido de ADN intermedio entre $2n$ y $4n$), durante la cual se replica el ADN genómico; G2 (contenido de ADN = $4n$), durante la cual se sintetizan los componentes celulares necesarios para generar dos células hijas idénticas a partir de la célula original, produciendo así un aumento de tamaño de ésta; M (contenido de ADN = $4n$), durante la cual cesa el incremento de tamaño celular y los cromosomas se ordenan en el ecuador preparándose para su posterior segregación, concluyendo con la citocinesis que da lugar a dos células hijas.

a) Control del ciclo celular

La tasa de proliferación celular es determinante durante el desarrollo embrionario para dar lugar a los tejidos del organismo y también en la edad adulta para conservar la funcionalidad de los

mismos. El control de este proceso está orquestado por una compleja red de eventos moleculares que, a partir de señales extracelulares como factores de crecimiento, abundancia/carencia de nutrientes, contacto con células vecinas, entre otros, activarán la entrada de las células en fase S, estimulándola a replicar su genoma y dividirse, o bien inducirán un estado de quiescencia y, eventualmente, la muerte de la célula. A continuación se mencionan algunos de los mediadores involucrados en el control de la progresión en el ciclo celular.

La vía pRb/E2F

El gen RB1 fue descubierto a raíz de la asociación entre la presencia de una forma mutante del mismo, con pérdida de función, y el desarrollo de tumores oculares (retinoblastoma), acuñándose así el concepto de gen supresor tumoral (Cavenee, Dryja et al. 1983). Posteriormente, se describió la actividad inhibitoria del producto de RB1, pRb, sobre la actividad transactivadora del factor de transcripción E2F (Chellappan, Hiebert et al. 1991). La actividad de E2F es crucial para la transición de fase G1 a S del ciclo celular, dado que activa la transcripción de genes necesarios para la síntesis de ADN (Leone, DeGregori et al. 1998). La inhibición que ejerce pRb sobre la actividad de E2F depende de la interacción física entre ambos, que puede ser a su vez inhibida por la hiperfosforilación de pRb. Las enzimas responsables de la fosforilación de pRb son las denominadas quinasas dependientes de ciclinas (CDK, *cyclin-dependent kinases*).

Quinasas dependientes de ciclinas

Las ciclinas son proteínas cuyos niveles varían a lo largo del ciclo celular, debido a una estricta regulación a nivel transcripcional, que permite la expresión de las mismas en los puntos del ciclo en los que es necesaria su función (Tabla I 1).

Tabla II. Fase de ciclo en que se expresa cada ciclina y CDK que regula.

| Fase de ciclo celular | Ciclina | CDK |
|-----------------------|---------|---------|
| G1 | D, E | 4, 2, 6 |
| S | A, E | 2 |
| G2 | A | 2 |
| M | B | 1 |

Estas proteínas ejercen un efecto regulador sobre la actividad enzimática de las quinasas dependientes de ciclinas, con las cuales forman complejos heterodiméricos con actividad serina/treonina quinasa. Dicha actividad es inhibida al disminuir los niveles celulares de ciclina, evento que produce la disociación del complejo.

Durante el transcurso de la fase G1 del ciclo celular, los niveles celulares de ciclina D aumentan, generándose así los dímeros CDK4/Ciclina D y/o CDK6/Ciclina D, capaces de fosforilar pRb en las posiciones Thr821 and Thr826 (Takaki, Fukasawa et al. 2005). Esta fosforilación produce la disrupción del complejo pRb-E2F, incrementándose de esta manera los niveles de E2F libre que será capaz de activar la transcripción de sus genes diana. Uno de estos genes es, a su vez, una ciclina: ciclina E, cuya actividad es necesaria para que se inicie la síntesis de ADN (Mazumder, DuPree et al. 2004).

Checkpoints

Durante la progresión en el ciclo celular, cada célula debe replicar la totalidad de su genoma. En una célula humana, esto implica copiar 3×10^9 pares de bases por cada división. Se estima que la tasa de errores del proceso de replicación del ADN genómico humano es de 1×10^{-9} , es decir, por cada mil millones de bases incorporadas en las nuevas moléculas de ADN, la maquinaria de síntesis mantiene la identidad de la secuencia original excepto por una base que es incorporada erróneamente. La alta fidelidad del proceso se debe a aspectos termodinámicos que favorecen el apareamiento específico entre las bases de las cadenas antiparalelas, pero también a la acción precisa de las enzimas ADN polimerasas involucradas en la síntesis del ADN, que presentan además actividad exonucleasa que les permite reemplazar bases incorporadas erróneamente (McCulloch and Kunkel 2008).

Además de los errores inherentes a la actividad de la maquinaria biosintética, existen otros factores capaces de comprometer la fidelidad en la transmisión del material genético a las células hijas, tales como la acción de metabolitos derivados del propio metabolismo de la célula (por ejemplos, especies reactivas de

oxígeno, radicales libres) o bien factores externos (radiación ultravioleta, radiaciones ionizantes, exposición a contaminantes o a agentes quimioterápicos con propiedades genotóxicas). Para mitigar este problema, existen mecanismos de control que evalúan si la célula está en condiciones de continuar su progresión en el ciclo de replicación, o bien debe detenerse para reparar el daño. Estos mecanismos de control se denominan *checkpoints* y actúan en distintos puntos del ciclo celular, siendo los más estudiados los que actúan en el final de la fase G1 (punto de restricción, PR), en el final de la fase G2, durante la fase M y durante la fase S. Los checkpoints de fase G1 (también conocido como de fase G1/S) y de fase S se activan en respuesta a insultos genotóxicos. El **checkpoint de fase G2** es el responsable de permitir el inicio del proceso de mitosis una vez se ha replicado el ADN genómico. El **checkpoint de la fase M**, también llamado *checkpoint* de huso mitótico o *checkpoint* de metafase, es el responsable de verificar que los cromosomas se han alineado en el ecuador de la célula, debido a la tensión bidireccional ejercida por las proteínas del huso mitótico. A continuación se describen brevemente los eventos moleculares que gobiernan el funcionamiento de los *checkpoints* activables por daño en el ADN.

El **punto de restricción al final de G1** es el responsable de permitir el inicio de la replicación del ADN. En células que deben entrar en quiescencia y en células que son sometidas a carencias de nutrientes, la proteína p16 (CDKN2A) se une a CDK4/6, desplazando a ciclina D, inhibiendo la fosforilación de pRb por el complejo CDK4/6-Ciclina D. Por el contrario, si existe una señal externa de proliferación, aumenta la expresión de ciclina D, la cual compite con p16 por la unión con CDK4/6, regulando positivamente la actividad quinasa del complejo, fosforilando pRb y desencadenando la transcripción de los genes dependientes de E2F (Weinberg 1995) (Bartek, Bartkova et al. 1996) (Sherr and Roberts 1999) (Sherr 2000), incluyendo el que codifica para la ciclina E, reguladora de la actividad de CDK2, necesaria para que se produzca el inicio y el desarrollo de la fase S (Bartek and Lukas 2001). En respuesta a un insulto genotóxico, se activa el checkpoint mediante la fosforilación de las quinasas ATM (del acrónimo en inglés de *Ataxia Telangiectasia Mutated*) y/o ATR (del acrónimo en inglés de *ATM- and Rad53-related*). Éstas, a su vez, activan las quinasas Chk2 y Chk1, que serán capaces de iniciar, mediante fosforilación,

el proceso de degradación proteosomal de la fosfatasa Cdc25. Esta fosfatasa es la encargada de desfosforilar Cdk2, permitiendo así la actividad enzimática del complejo Cdk2/Ciclina E. Al disminuir los niveles de Cdc25 por activación del eje ATM/ATR-Chk2/Chk1, Cdk2 se mantiene fosforilada, impidiendo así la activación de los genes de fase S, y las células retrasan su progresión, acumulándose en el final de la fase G1. Estos eventos constituyen la primera respuesta celular a las lesiones en el ADN, iniciándose entre veinte y treinta minutos después de producirse el daño, y manteniéndose durante un período de varias horas. No obstante, el mantenimiento prolongado de las células en fase G1 se consigue mediante otra vía, que se inicia simultáneamente a la vía temprana, pero los efectores de la vía tardía podrán ejercer su función biológica al cabo de varias horas. Esta segunda vía involucra la acumulación del producto del gen supresor tumoral p53 y la consiguiente activación transcripcional del inhibidor de ciclinas p21^{cip1/waf1}. La acumulación de p53 se debe principalmente a un incremento en la vida media de la proteína, mediante la fosforilación en la serina 15, por parte de ATR y/o ATM, además de la fosforilación en la serina 20, por parte de Chk1 y/o Chk2. Este incremento en los niveles de p53 induce un aumento en los niveles de p21^{cip1/waf1}, que resultará en una inhibición en la activada de Cdk2/ciclina E y en la consiguiente inhibición del tránsito de fase G1 a fase S. En caso de no repararse el daño en el DNA, p53 es la encargada, además, de inducir la eliminación de la célula, mediante muerte por apoptosis (Bartek and Lukas 2001).

El **checkpoint de fase S** es responsable, principalmente, de detener de manera transitoria la progresión del ciclo celular en caso de detectar daños en el ADN durante su biosíntesis, permitiendo así la reparación de la lesión o induciendo senescencia o muerte por apoptosis en caso de no poder solucionar el daño. Si bien el *checkpoint* de fase S es probablemente el menos caracterizado, su funcionamiento independiente de la funcionalidad de p53 lo convierte en virtualmente la única vía de control de la integridad del ADN en la mayor parte de las células tumorales, que presentan alteraciones en algún nivel de la vía de p53. Aún así, se pueden diferenciar tipos principales de respuesta a daño genotóxico durante fase S: el **checkpoint de replicación**, dependiente de la síntesis de ADN y el **checkpoint de fase S propiamente dicho**, que se activa

durante esta fase, pero la detección de las lesiones que lo activan se produce independientemente de la síntesis de ADN.

El *checkpoint* dependiente de replicación se activa cuando el avance de la horquilla de replicación de ADN se ve interrumpido por depleción de deoxinucleótidos, por inhibición de la enzima ADN polimerasa o bien colisión con una región del ADN que presenta una estructura aberrante, por ejemplo dímeros de timidina inducidos por radiación ultravioleta. La función de este *checkpoint* no sólo consiste en inhibir la activación de nuevos orígenes de replicación en el genoma, sino también en estabilizar la estructura de la horquilla de replicación para poder reestablecer la síntesis, una vez solucionado el problema, en el mismo punto en que se detuvo (Lopes, Cotta-Ramusino et al. 2001) (Tercero and Diffley 2001). La proteína de replicación A (RPA, de *Replication Protein A*) se une al ADN de cadena simple de la horquilla de replicación para permitir la acción de la ADN polimerasa durante el transcurso normal de la síntesis de ADN. Cuando ésta se ve inhibida, RPA es capaz de reclutar la proteína ATRIP (proteína que interacciona con ATR, *ATR-Interacting Protein*) y ATR (Helt, Cliby et al. 2005) (Zou and Elledge 2003), produciendo la activación de Chk1 y la consiguiente inhibición de los complejos Cdk/Ciclina, pero además inhibiendo la puesta el inicio de replicación de ADN en otros puntos del genoma, mediante un mecanismo que involucra las proteínas claspina, RAD17 y el complejo RAD9-RAD1-HUS1 (9-1-1) (Bartek, Lukas et al. 2004).

El *checkpoint* de fase S propiamente dicho (independiente de replicación), en cambio, es activado por lesiones tipo DSB (*Double Strand Breaks*, rupturas en ambas hebras del ADN), que pueden producirse por acción de radiaciones ionizantes, fármacos radiomiméticos o bien por síntesis de ADN a través de una estructura aberrante. A diferencia del *checkpoint* dependiente de replicación, el de fase S (también llamado intra-S) no necesita de la presencia de una horquilla de replicación para detectar el daño, de manera que lesiones presentes en regiones del genoma que no se están replicando son capaces de activar esta respuesta. Esta activación puede producirse por dos vías alternativas y a la vez complementarias. Por un lado, existe una respuesta rápida mediada por activación de ATM y subsecuente activación de Chk2, que será capaz de difundir en todo el núcleo celular en escasos segundos,

ejerciendo su actividad inhibitoria sobre la síntesis de ADN mediante la degradación de Cdc25A e inhibición de Cdk2/Ciclina E. La rápida activación de esta vía se debe en gran parte a que ATM se activa por autofosforilación, como consecuencia de los cambios topológicos que se producen en la cromatina circundante a las lesiones DSB, en contraposición con la otra vía de activación, dependiente de ATR, para cuya activación es necesario el procesamiento de las lesiones para generar regiones de ADN de simple cadena. Estas regiones serán recubiertas por RPA, que será capaz de reclutar los complejos ATR-ATRIP y desencadenar una respuesta similar a la del *checkpoint* dependiente de replicación. Es esta necesidad de procesamiento de las lesiones la que determina la acción tardía de esta vía de activación del checkpoint (Bartek, Lukas et al. 2004).

b) Muerte celular programada

La muerte celular programada, o apoptosis, es un proceso fisiológico que se encuentra frecuentemente desregulado en patologías neoplásicas. Este proceso fue originalmente definido como una serie de cambios morfológicos que precedían a la muerte celular, en contraposición a los cambios asociados a la muerte por necrosis. Algunos rasgos característicos de la muerte por apoptosis son la condensación de la cromatina, la disminución del tamaño del núcleo celular (picnosis) y la formación de cuerpos apoptóticos, es decir, restos celulares provistos de membrana plasmática. A nivel molecular, la muerte por apoptosis se caracteriza por el clivaje internucleosomal del ADN, por acción de un complejo enzimático denominado CAD (del acrónimo en inglés de Casapase-activated DNase). La activación de este complejo constituye el último evento de una cascada de activación, por clivaje proteolítico, de una familia de enzimas denominadas caspasas (del acrónimo en inglés de cysteinyl-aspartate-specific proteinase). Esta cascada puede ser iniciada, de acuerdo al modelo actualmente aceptado de inducción de apoptosis, por dos vías diferentes: la vía intrínseca (o mitocondrial) y la vía extrínseca (o mediada por receptores). En la vía intrínseca una serie de señales intra- y extracelulares (como por ejemplo: daño en el ADN producido por drogas o radiaciones ionizantes) estimulan la pérdida del potencial transmembrana de mitocondria ($\Delta\Psi_m$) y la liberación de factores pro-apoptóticos, como

citocromo *c*, al citosol. Como consecuencia, se forma un complejo multiproteico con actividad enzimática denominado apoptosoma, que conduce a la activación de la caspasa 9, iniciando la cascada de activación proteolítica mencionada anteriormente.

La vía extrínseca, en cambio, es desencadenada por el entrecruzamiento de los denominados receptores de muerte (*death receptors*) en respuesta a la unión de sus ligandos (TNF α , ligando de Fas, TRAIL). Seguidamente, los dominios de muerte (*death domains*) se unen al extremo carboxilo-terminal de la proteína FADD (del acrónimo en inglés de Fas-associated death domain-containing protein) produciendo la formación del complejo DISC (death-inducing receptor signalling complex) y la activación de la caspasa 8. Como consecuencia se produce la activación de la caspasa 3 y en este punto confluyen las dos vías de activación de apoptosis. En algunas líneas celulares se ha descrito la activación de Bid por acción de caspasa 8, conduciendo a la activación de la vía intrínseca (Scaffidi, Fulda et al. 1998). Se han descrito receptores capaces de unirse a ligandos como TRAIL y TNF α , entre otros, pero que carecen del dominio de muerte intracitoplasmático necesario para la transducción de señales, actuando de esta manera como moduladores de la activación de la vía extrínseca.

Por otra parte, proteínas de la familia de Bcl-2 ejercen un efecto regulatorio sobre la vía intrínseca, sea estimulando (Bax, Bid) o inhibiendo (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) la liberación de factores pro-apoptóticos de la membrana mitocondrial. Bcl-xL, además, es capaz de inhibir la inducción de apoptosis mediada por TRAIL en líneas celulares de cáncer de páncreas (Hinz, Trauzold et al. 2000). Existen, además, proteínas denominadas IAP (de *inhibitor of apoptosis*) capaces de inhibir ambas vías en varios niveles, cuya expresión alterada en líneas celulares derivadas de cáncer y en tejidos tumorales ha sido relacionada con el desarrollo de resistencia al tratamiento con quimioterápicos (Waxman and Schwartz 2003).

1.2 Cáncer de Páncreas

El páncreas es un órgano glandular de aproximadamente quince centímetros de longitud por tres centímetros de amplitud y dos

centímetros de grosor, localizado transversalmente en la cavidad abdominal, por detrás del estómago a la altura de la primera y segunda vértebras lumbares. Desde el punto de vista anatómico se lo puede dividir en tres porciones: la cabeza, el cuerpo y la cola. La cabeza del páncreas se localiza en el asa duodenal, formada por la segunda porción del duodeno, y constituye la región de mayor amplitud de la glándula. El cuerpo constituye la región que continúa desde la cabeza, ascendiendo ligeramente por detrás del estómago y estrechándose hasta culminar en la cola del páncreas, situada en el extremo izquierdo del abdomen, junto al bazo. Desde el punto de vista funcional se lo puede dividir en dos compartimentos con funciones especializadas y diferentes. El páncreas endocrino es el responsable de la producción y liberación en el torrente sanguíneo de las hormonas insulina, glucagón y somatostatina, involucradas en la regulación de los niveles sanguíneos de glucosa, además de grelina y del polipéptido pancreático, involucradas en la regulación de la función del páncreas exocrino. El páncreas exocrino, por su parte, es responsable de la producción de las enzimas involucradas en la digestión de alimentos a nivel intestinal, que son vertidas en duodeno como componentes del jugo pancreático, a través del conducto de Wirsung y el conducto de Santorini. El jugo pancreático está constituido principalmente por agua, sales minerales, bicarbonato y las enzimas digestivas tripsina, quimiotripsina, amilasa, carboxipeptidasa, lipasa, ribonucleasa y desoxirribonucleasa (Magee 2002).

Si bien se han descrito patologías neoplásicas tanto del compartimento endocrino como del compartimento exocrino, la vasta mayoría (aproximadamente el 95%) está constituida por tumores malignos del tejido exocrino. Los tumores del páncreas endocrino se clasifican en función de la hormona producida por la célula originaria del tumor, subclasificándose de acuerdo a la actividad secretoria de los mismo. Así, un insulinoma, un glucagonoma, un gastrinoma, un somatostatina y un VIPoma son tumores generados a partir de células productoras de insulina, glucagón, gastrina, somatostatina y péptido intestinal vasoactivo (VIP), respectivamente. Éstos a su vez pueden ser funcionales o no funcionales, dependiendo de si secretan o no las respectivas hormonas. Los tumores del páncreas exocrino se clasifican de acuerdo a su morfología, siendo los de morfología ductal los más frecuentes, denominados adedocarcinoma ductal de páncreas o PDA

(del acrónimo en inglés de *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*). A lo largo del presente trabajo se hará referencia a esta patología como adenocarcinoma pancreático, PDA o cáncer de páncreas, indistintamente.

a) Aspectos epidemiológicos y clínicos

A pesar de tener una incidencia de 37680 nuevos casos por año, posicionándose en decimotercera posición en términos de frecuencia, el cáncer de páncreas constituye la cuarta causa de muerte por cáncer en países desarrollados, con una mortalidad anual estimada en 34290 y una esperanza de vida mediana de seis meses desde el diagnóstico (Jemal, Siegel et al. 2008). La edad (superior a cincuenta años), el sexo masculino, la raza (negra), consumo de tabaco y dietas ricas en carnes y grasas, pancreatitis crónica y/o diabetes y exposición ocupacional a ciertos agentes químicos. A pesar de no ser considerada una enfermedad hereditaria, la presencia de casos de cáncer de páncreas en la familia incrementa las probabilidades de padecer la enfermedad (Cartwright, Richards et al. 2008).

El pronóstico desfavorable que presentan los pacientes y naturaleza agresiva de esta enfermedad se fundamentan en características anatomopatológicas de las lesiones tumorales, así como en aspectos farmacológicos de las células cancerosas. Aproximadamente el cincuenta por ciento de los pacientes presentan ictericia, debido a la hiperbilirrubinemia directa provocada por la compresión del esfínter de Oddi, en el caso de que el tumor primario se localice en la cabeza del páncreas. La localización retroperitoneal del páncreas dificulta la palpación del órgano durante la anemnesis, siendo necesaria la utilización de técnicas de bioimagen, como por ejemplo tomografía axial computerizada, para localizar las lesiones.

La ausencia de signos y síntomas específicos dificultan el establecimiento de un diagnóstico precoz. La enfermedad cursa de manera subclínica durante los primeros estadíos, siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad la presencia de lesiones metastásicas en hígado. Un escaso diez por ciento de los pacientes diagnosticados son candidatos a someterse a resección quirúrgica

del tumor, que constituye actualmente el único tratamiento con posibilidades de curación. Aún en ausencia de metástasis, la invasión de estructuras vasculares tales como vena porta, eje celíaco, vena o arteria mesentérica superior o de la arteria hepática constituye un criterio de exclusión para la aplicación de cirugía curativa (Cartwright, Richards et al. 2008).

b) Aspectos histopatológicos, citogenéticos y moleculares

El adenocarcinoma pancreático de fenotipo ductal se clasifica de acuerdo a un criterio histopatológico, dado su aspecto de ductos con desorganización del epitelio cúbico e invasión del lumen ductal, aunque existe una gran controversia en relación a la identidad de la célula que da origen a los tumores. No obstante, un modelo de progresión lineal describe la asociación entre la presencia de ciertas mutaciones y el estadio de la progresión tumoral. Así, una de las primeras alteraciones morfológicas observadas es la desestructuración del epitelio cuboidal, para dar lugar a un epitelio pseudoestratificado, durante la denominada metaplasia de transición, que posteriormente cambiará a un epitelio columnar con tinción positiva para mucina en el citoplasma de las células. Este estadio es considerado una lesión premaligna, denominada PanIN-1A (del acrónimo en inglés de *Pancreatic Intraepithelial Neoplasia-1A*, neoplasia intraepitelial pancreática 1 A). La presencia de lesiones papilares o micropapilares define el siguiente estadio, denominado PanIN-1B. Durante estos dos estadios tendrían lugar las primeras alteraciones genéticas y cromosómicas, que consisten en acortamiento telomérico (van Heek, Meeker et al. 2002) y activación del oncogén Kras (Lohr, Kloppel et al. 2005). La inactivación del gen supresor tumoral p16^{INK4A} y la sobreexpresión de la ciclina D1 se hallan con mayor frecuencia a partir del estadio PanIN-2, caracterizado por la pérdida de la polaridad basal de los núcleos del epitelio y por la presencia de atípias nucleares. Finalmente, durante el estadio PanIN-3 o adenocarcinoma *in situ*, caracterizado por el engrosamiento del epitelio, pleomorfismo nuclear e invasión del lumen ductal, se producirían las mutaciones con pérdida de función de los genes supresores tumorales p53 y BRCA1 y la pérdida de heterocigosis para el *locus* DPC4/SMAD4, alterando así la vía de señalización de TGF- β (Wilentz, Iacobuzio-Donahue et al. 2000; Hruban, Adsay et al. 2001; Maitra, Adsay et

al. 2003; Hruban, Takaori et al. 2004). Recientemente, se ha sugerido la revisión de dicho modelo, planteándose, por ejemplo, la posibilidad de la existencia de vías alternativas de progresión y de la presencia de barreras que bloquearían el avance de las lesiones hacia el establecimiento del adenocarcinoma. (Real, Cibrian-Uhalte et al. 2008).

Otras lesiones premalignas descritas, aunque menos caracterizadas, son las denominadas IPMN (del acrónimo en inglés de *Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm*, neoplasia mucoide papilar intraductal) y MCN (del acrónimo en inglés de *Mucinous Cystic Neoplasm*, neoplasia quística mucoide). Estas lesiones darían lugar al desarrollo de adenocarcinoma ductal pancreático por vías alternativas, presentando las mismas alteraciones genéticas, aunque variando probablemente el orden de aparición de las mismas.

c) Aspectos farmacológicos

Las células de adenocarcinoma ductal pancreático se caracterizan por ser refractarias al tratamiento con quimioterápicos convencionales. En pacientes diagnosticados con enfermedad local avanzada o con enfermedad metastásica, se aplica el fármaco gemcitabina como tratamiento paliativo de los síntomas de la enfermedad, presentando un modesto efecto prolongador de la supervivencia de los pacientes. Existen diversos estudios clínicos cuyo objetivo es conseguir incrementar la esperanza de vida de los pacientes, mediante la aplicación combinada de gemcitabina con otros fármacos antineoplásicos, tales como 5-fluorouracilo, cisplatino, cetuximab, entre otros (Cartwright, Richards et al. 2008). En la línea de los tratamientos con regímenes multimodales, la aplicación de un regimen de quimioterapia con gemcitabina en pacientes que habían sido sometidos a resección quirúrgica del tumor indujo un incremento en el tiempo de supervivencia de los mismos (Neoptolemos, Stocken et al. 2004), alentando el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas que involucren quimioterapia y que permitan la instauración de un regimen más localizado y agresivo.

1.3 Terapia Génica del Cáncer

La terapia génica se define como el conjunto de tratamientos que utilicen material genético (ADNc, ARN, etc) como agente terapéutico, incluyendo un amplio y variado espectro de estrategias terapéuticas, dependiendo de la enfermedad a tratar y del tejido diana. Dentro de las terapias diseñadas para tratar enfermedades neoplásicas, cuyo objetivo no es la corrección a largo plazo de una función fisiológica sino la destrucción de las células diana, pueden distinguirse tres grupos que engloban la mayor parte de estrategias terapéuticas: terapias tendientes a potenciar la acción del sistema inmune (mediante expresión de citoquinas o quimioquinas en el tejido tumoral, o mediante la expresión de receptores antigénicos en células del sistema inmune, entre otras), terapias con genes tóxicos (que producen un efecto citotóxico directo en las células tumorales) y terapias con genes suicidas (que permiten la activación enzimática de prodrogas en metabolitos citotóxicos).

a) Terapias con genes suicidas (GDEPT, VDEPT)

La terapia con genes suicidas, también conocida como quimioterapia molecular, GDEPT (del acrónimo en inglés de *Gene Directed Enzyme Prodrug Therapy*, terapia con prodroga activada enzimáticamente, dirigida por genes) o VDEPT (*Virus Directed Enzyme Prodrug Therapy*) cuando se utilizan vectores virales para transferir el gen terapéutico, consiste en la expresión exógena de un gen o ADNc que codifica para una enzima capaz de convertir una prodroga inocua en un metabolito tóxico. Dicha prodroga es administrada sistémicamente, y sólo será capaz de inducir citotoxicidad en las células que hayan incorporado el transgén. La principal ventaja de este tipo de terapias frente a la quimioterapia convencional, radica en la posibilidad de alcanzar altas concentraciones del principio activo en el tejido diana, minimizando los efectos adversos asociados al tratamiento. Esta acción localizada trae aparejada un incremento en la ventana terapéutica del tratamiento, permitiendo el establecimiento de una terapia más agresiva (Portsmouth, Hlavaty et al. 2007).

La especificidad tisular depende tanto de la enzima terapéutica como del vector de transferencia génica utilizado. Así, en una

situación ideal, la enzima terapéutica no debe expresarse en otros tejidos del organismo y su expresión ectópica debe ser necesaria y suficiente para metabolizar eficientemente una gran cantidad de prodroga en el tejido tumoral. Para alcanzar esta situación, se utilizan habitualmente enzimas de organismos no mamíferos. La naturaleza inmunogénica de las enzimas provenientes de otras especies constituye el principal efecto colateral, que puede tener efectos positivos y negativos en términos de inducción de una respuesta antitumoral. Por un lado, la expresión de antígenos virales o bacterianos en las células tumorales puede estimular el sistema inmune del paciente, produciendo el reclutamiento y la activación de células inmunes efectoras, contribuyendo a combatir el establecimiento de un microambiente inmunosupresor que se encuentra habitualmente en tumores (Gagandeep, Brew et al. 1996; Kianmanesh, Perrin et al. 1997; Vile, Castleden et al. 1997; Yamamoto, Suzuki et al. 1997; Altaner 2008). Sin embargo, el desarrollo de una respuesta inmune contra proteínas expresadas en el vector de transferencia génica puede condicionar negativamente la eficiencia de posteriores readministraciones de la terapia, debido a la destrucción o la neutralización de los vectores de transferencia antes de que alcancen el tejido diana.

Para la mayoría de los sistemas suicidas se ha descrito que células que no expresan el gen terapéutico, pero que se encuentran en la vecindad de células que sí lo expresan, son afectadas por la citotoxicidad del sistema. Este fenómeno se denomina Efecto Adyacente o *bystander effect*, y se produce por la transferencia de metabolitos tóxicos de la prodroga de una célula a otra. La naturaleza de dicha transferencia depende del sistema terapéutico y del tipo celular, incluyendo la endocitosis de fragmentos de células apoptóticas cargadas de metabolitos y la comunicación intercelular mediada por uniones *gap* (Altaner 2008).

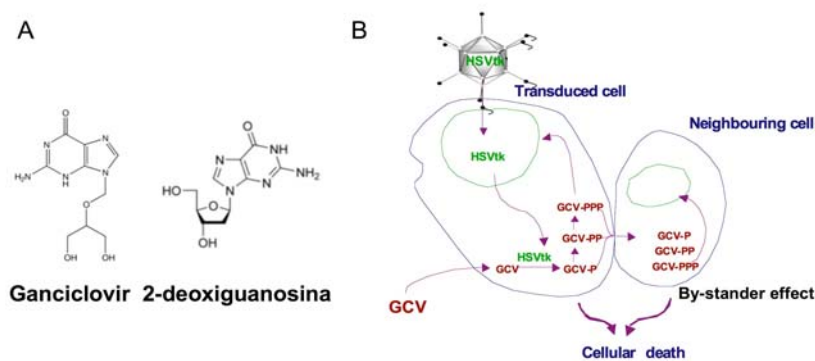
El sistema Timidina Quinasa/Ganciclovir (TK/GCV)

Entre las terapias con genes suicidas destaca la que utiliza el gen de la timidina quinasa del virus Herpes simplex y el compuesto ganciclovir, ampliamente utilizado para el tratamiento de infecciones causadas por virus de la familia Herpesviridae. Este sistema ha sido extensamente estudiado tanto *in vitro* como en

modelos preclínicos para el tratamiento de patologías neoplásicas, algunas de las cuales se detallan a continuación.

Fundamento y mecanismo de acción

La acción terapéutica del sistema se basa en la baja especificidad de sustrato que presenta la enzima timidina quinasa viral, en comparación con su homóloga en humanos. Así, la enzima viral es capaz de fosforilar, además de su sustrato natural (timidina), análogos de nucleósido tales como ganciclovir (Moolten 1986) (Esquema II A). Esta propiedad es aprovechada, en el tratamiento de infecciones con *Herpes simplex* o citomegalovirus, para inhibir la replicación viral mediante la interrupción de la síntesis de ADN viral por la incorporación de ganciclovir trifosforilado en las moléculas sintetizadas *de novo*. Al carecer del grupo hidroxilo en la posición 3' del anillo desoxiribosa, la enzima encargada de la síntesis de ADN se ve imposibilitada de catalizar la unión fosfodiéster con el siguiente nucleótido de la molécula.



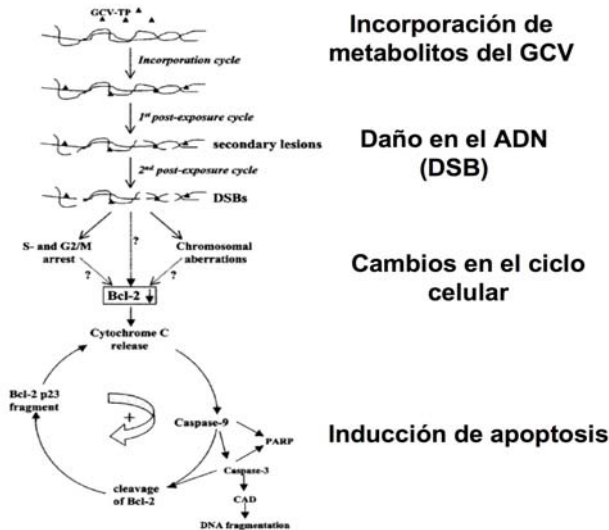
Esquema II. Sistema TK/GCV. A) El GCV es un análogo del deoxinucleósido 2-deoxiguanosina. B) Tras la transferencia del gen de la TK del virus del herpes, las células transducidas expresan la enzima TK, capaz de iniciar la cadena de fosforilaciones que generarán la especie GCV trifosfato (GCV-PPP). Este compuesto será capaz de incorporarse a las moléculas de ADN sintetizadas *de novo*, produciendo la muerte de la célula transducida y también la de células vecinas no transducidas, mediante el tráfico intercelular de los metabolitos fosforilados del GCV. Este efecto se denomina “efecto adyacente” o “*bystander effect*”. Adaptado de (Fillat, Carrio et al. 2003).

En el contexto de la terapia génica, el objetivo que se pretende alcanzar es inducir un efecto citotóxico en la célula diana mediante la expresión exógena de la timidina quinasa viral, que catalizará la reacción de fosforilación de ganciclovir. Esta fosforilación desencadenará la posterior fosforilación de la prodroga por quinasas celulares tales como guanilato quinasa y fosfoglicerato quinasa, generando las especies bi y trifosforiladas de ganciclovir, respectivamente (Fillat, Carrio et al. 2003). La analogía estructural entre el ganciclovir trifosforilado y el nucleótido 2'-desoxiguanosina permite la incorporación de aquellos en las cadenas nascentes de ADN celular. Así, el ganciclovir trifosforilado es capaz de actuar como un inhibidor competitivo de la ADN polimerasa celular, y de generar interrupciones en la doble hebra de ADN, desencadenando una cascada de eventos celulares resultantes en la inhibición de la proliferación celular y/o la muerte por apoptosis (Fillat, Carrio et al. 2003) (Esquema I1 B).

A pesar de haber sido objeto de múltiples estudios utilizando diferentes líneas celulares, no existe un consenso en relación al mecanismo de inducción de apoptosis en respuesta al tratamiento. En un trabajo realizado en células B16F10 de melanoma murino, Wei y colaboradores reportaron la inducción de un arresto en las fases S y G2 del ciclo celular como consecuencia del tratamiento con TK/GCV. El arresto se produciría por la presencia de daños en el ADN que no pueden ser corregidos por la maquinaria celular de reparación de ADN y, en caso de prolongarse en el tiempo, induciría una acumulación de p53 y la muerte de las células por apoptosis (Wei, Chao et al. 1998). En un estudio posterior realizado sobre estas células y otras tres líneas tumorales e ratón (NG4TL, H6 y 1MEA 7R.1.) los autores reportan un incremento en los niveles de Fas (CD95/APO-1), ligando de Fas (Fas-L) y dos mediadores situados por debajo de éstos en la cascada de señalización (RIP y caspasa-3). Dicha sobreexpresión ocurre después del aumento de p53 y precede la inducción de apoptosis, sugiriendo que ésta podría ser mediada por la vía de Fas/Fas-L (Wei, Chao et al. 1998). Otro estudio, realizado en células de neuroblastoma humano SHEP, muestra un incremento de la expresión de Fas y TNFR en la membrana plasmática, en respuesta al tratamiento con TK/GCV, así como acumulación de p53 y agregado de Fas de manera independiente de FasL. Como consecuencia se produce la activación la vía de inducción de apoptosis mediada por receptores

(vía extrínseca), con activación de caspasa-8 (Beltinger, Fulda et al. 1999). Paralelamente se ha descrito, a nivel mitocondrial, la existencia de un mecanismo de amplificación de la señal apoptótica iniciada por la vía extrínseca. El tratamiento con TK/GCV en células SHEP produjo alteraciones mitocondriales tales como pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y liberación de citocromo *c* de la membrana mitocondrial hacia el citosol, induciendo así la activación de caspasas efectoras y la posterior fragmentación internucleosomal del ADN, indicativa de muerte celular por apoptosis (Beltinger, Fulda et al. 1999).

Por otro lado, un estudio realizado en células CHO demuestra que el tratamiento con TK/GCV es capaz de inducir apoptosis y que dicha inducción es secundaria a la formación de lesiones en ambas hebras del ADN llamadas *double-strand breaks* (DSB) y posterior arresto del ciclo celular en sus fases S y G2/M, de una manera dependiente de la replicación de ADN. Los autores proponen un modelo en el cual la incorporación de ganciclovir trifosforilado en cadenas crecientes de ADN ocasiona, tras sucesivos ciclos de replicación de ADN, la formación de DSB que, a su vez, serían capaces de producir una disminución a nivel postraduccional de los niveles de Bcl-2. No está claro el mecanismo causante de esta disminución, pero como consecuencia se produce una liberación masiva de citocromo *c* desde la membrana mitocondrial hacia el citoplasma, iniciando así la cascada apoptótica por la vía intrínseca: activación secuencial de caspasa-9, caspasa-3, clivaje de Bcl-2 con liberación de un fragmento de 23 kDa con actividad proapoptótica (Kirsch, Doseff et al. 1999), que a su vez produce la liberación de más citocromo *c* de membrana mitocondrial. De esta manera se genera un circuito de retroalimentación positiva que amplifica la señal proapoptótica. La enzima caspasa-3 es la responsable directa de la activación de la enzima ADNasa activada por caspasas (CAD) que llevará a cabo la fragmentación internucleosomal del ADN (Tomicic, Thust et al. 2002)(Esquema I2).



Esquema I2. Mecanismo de inducción de toxicidad de TK/GCV. En un primer ciclo de síntesis de ADN, GCV-PPP es incorporado en las nuevas moléculas por la ADN polimerasa. A continuación, tras consecutivas replications del ADN, el GCV-PPP incorporado generará lesiones del tipo DSB. Éstas desencadenan la muerte de la célula por apoptosis, precedida de arresto en fase S o en fase S y G2/M del ciclo celular. Adaptado de (Tomacic, Thust et al. 2002)

Aplicaciones terapéuticas

El sistema TK/GCV ha sido ensayado, en humanos, como abordaje terapéutico contra enfermedades neoplásicas (Fillat, Carrio et al. 2003) y también como elemento de profilaxis para la “enfermedad injerto contra huésped”, secundaria a transplantes alogénicos de médula ósea, linfocitos T o precursores hematopoiéticos (Bordignon, Bonini et al. 1995; Bonini, Ferrari et al. 1997; Verzeletti, Bonini et al. 1998; Markt, Bonini et al. 1999; Garin, Garrett et al. 2001; Ciceri, Bonini et al. 2005; Ciceri, Bonini et al. 2007; Xu, Zhu et al. 2008). Hasta el momento, no se ha documentado la aplicación de esta terapia en humanos para el tratamiento del cáncer de páncreas, pero existen evidencias alentadoras en relación su uso en el tratamiento de glioma. Un estudio aleatorizado realizado en pacientes sometidos a resección quirúrgica de tumores primarios o recidivas de gliomas, demostró que la aplicación en la cama tumoral de microinyecciones de un

adenovirus que codifica para la enzima TK, y la posterior administración por vía intravenosa de ganciclovir, era capaz de prologar significativamente la supervivencia de los pacientes, en comparación con los pacientes del grupo control, a los que se les aplicó radioterapia (Immonen, Vapalahti et al. 2004). Actualmente, se está realizando un estudio multicéntrico en el que se está evaluando, además, la eficiencia de la combinación de la terapia con TK/GCV y otros protocolos quimioterapéuticos (Ylä-Herttuala, S; comunicación oral congreso anual de la ESGCT, 2008).

Factores que condicionan la eficiencia citotóxica de TK/GCV

La no disponibilidad de muestras quirúrgicas y de datos provenientes de ensayos clínicos en los que se haya aplicado un tratamiento con TK/GCV en pacientes con cáncer de páncreas, dificulta la tarea de identificar factores que condicionan la eficiencia antitumoral de esta terapia. No obstante, los datos provenientes de ensayos clínicos con TK/GCV para el tratamiento de otras patologías, o bien de estudios realizados en modelos animales y celulares de cáncer de páncreas, constituyen una valiosa fuente de información a la hora de predecir los posibles obstáculos que deberá enfrentar el sistema TK/GCV para inducir la respuesta esperada, algunos de los cuales se enumeran a continuación.

Dado que la principal causa de mortalidad y morbilidad asociada al cáncer de páncreas se debe a la presencia de lesiones secundarias en órganos distantes, principalmente en hígado, el objetivo último de la instauración de un tratamiento con TK/GCV sería la administración sistémica tanto de la prodroga como del vector de expresión de TK. Así, la primera barrera que deberá sortear el sistema es de carácter farmacocinético, siendo, la biodisponibilidad del vector, altamente dependiente de la irrigación de los tumores y del tropismo del vector por tejidos distintos del tejido diana. Los vectores adenovirales, por ejemplo, poseen un elevado tropismo por tejido hepático, siendo retenida la mayor parte de los viriones en este órgano cuando se los administra por vía parenteral, hecho que puede traer aparejada no solo la presencia de hepatotoxicidad, sino también una disminución en la dosis efectiva de vector que alcanzará el tejido diana. En el tratamiento de metástasis hepáticas de tumores pancreáticos, el órgano diana es el hígado, pero el tejido diana no es el parénquima hepático, sino las lesiones tumorales.

Para hacer frente a este problema, se han intentado optimizar las propiedades de los vectores adenovirales modificando su tropismo natural (redireccionamiento o *targeting* transduccional) mediante la modificación genética de los vectores para que expresen proteínas de la cápside de distintos serotipos virales (pseudotipado) (Haviv, Blackwell et al. 2002). Otro abordaje al problema de la citotoxicidad derivada de la transducción de células distintas de las células diana, pero que no evita la retención hepática del vector, consiste en restringir la expresión de genes terapéuticos a las células diana mediante el uso de promotores específicos de tejido o de tumor, aún cuando el vector es capaz de infectar otras células de manera no específica (*targeting* transcripcional) (Saukkonen and Hemminki 2004). De manera similar, se han desarrollado recientemente vectores lentivirales en los cuales la selectividad celular en la expresión del transgén no está ligada sólo al control de la transcripción, sino además al control de la vida media de los transcritos mediante un mecanismo dependiente de la expresión de miRNAs endógenos (*detargeting* postranscripcional) (Brown, Venneri et al. 2006). Esta tecnología ha sido aplicada en el contexto de vectores adenovirales para controlar su replicación en una estrategia de viroterapia (Ylosmaki, Hakkarainen et al. 2008) y se espera que sea extensamente aplicada en estrategias de terapia génica en el futuro.

La segunda barrera que deben atravesar los vectores administrados por vía parenteral, y que también deben sortear los vectores administrados de manera local, es la resistencia que impone el tejido a la difusión del mismo, limitando así su capacidad de transducir células tumorales. Se estima que un vector inyectado directamente en la masa tumoral será capaz de transducir un radio de siete capas celulares a partir del sitio de inyección. Algunas estrategias estudiadas para mitigar esta limitación apuntan a la amplificación del efecto citotóxico mediante la potenciación del efecto adyacente. Esto se puede lograr mediante la modulación de la expresión de proteínas responsables de la formación de uniones intercelulares (Zhang, Acevedo et al. 1995; Touraine, Ishii-Morita et al. 1998; Carrio, Mazo et al. 2001; Nicholas, Read et al. 2003; Udawatte and Ripps 2005; Jimenez, Fox et al. 2006)(García-Rodríguez, L; comunicación personal) (Fick, Barker et al. 1995; Robe, Princen et al. 2000; Robe, Joloi et al. 2004) o bien mediante

el agregado de dominios de transducción proteicos (PTD) a la enzima TK (Cascante, Huch et al. 2005; Tasciotti and Giacca 2005). Una vez que el virus contacta físicamente la célula, es necesario que ésta exprese en su membrana el receptor CAR (Cocksakie-Adenovirus Receptor) para que se lleve a cabo la infección. Así, una baja expresión tumoral de este receptor impactará negativamente en la capacidad del vector de expresar el gen terapéutico. Para paliar este problema, se han desarrollado estrategias de *targeting* transduccional utilizando péptidos adaptadores bifuncionales, que bloquean el ligando viral al tiempo que le confieren la capacidad de unirse a otro receptor celular altamente expresado en las células tumorales, como por ejemplo el receptor de FGF2 (Huch, Abate-Daga et al. 2006). Alternativamente, mediante la modificación genética del genoma viral, que produce la expresión del tripéptido RGD (Arginina-Glicina-Aspártico) en el dominio *knob* de la fibra adenoviral, se puede redireccionar la infección para que se produzca mediante α v integrinas (Suzuki, Fueyo et al. 2001).

Una vez infectada la célula, resulta de vital importancia la correcta expresión del gen terapéutico. Se ha documentado la aparición de subpoblaciones de células que se mantienen insensibles al ganciclovir, aún habiendo incorporado el gen TK. La caracterización de estas células reveló que la expresión de dicho gen se veía comprometida, por la presencia de mutaciones, deleciones (Garin, Garrett et al. 2001; Fogar, Greco et al. 2003), silenciamiento mediado por metilación de promotores (Kuriyama, Sakamoto et al. 1998) o bien por generación de mensajeros no funcionales debido a *splicing* alternativo (Bennour, Ferrand et al. 2008). Estas alteraciones en la expresión del transgén fueron documentadas en sistemas donde dicha expresión se obtenía mediante el uso de vectores integrativos (retrovirus), pero no existen evidencias de que esto ocurra al utilizar vectores que se mantienen dentro del núcleo de manera episomal, sin integrarse en el genoma.

Además de los problemas asociados con la expresión del gen terapéutico, se han descrito factores moleculares de la célula diana que podrían conferirles resistencia al tratamiento. Así, Hamel y colaboradores demostraron que la muerte celular mediada por efecto adyacente inducido por el tratamiento con TK/GCV era inhibida por la expresión del gen antiapoptótico BCL2 (Hamel,

Magnelli et al. 1996). Por otro lado, Adachi y colaboradores demostraron que la sobreexpresión del transportador de nucleótidos MRP4, perteneciente a la familia de transportadores de membrana ABC (ATP-Binding Cassette), aumentaba la expulsión de los metabolitos de ganciclovir, disminuyendo así su concentración intracelular, y ejercía un efecto protector sobre la muerte celular por TK/GCV (Adachi, Sampath et al. 2002). La expresión de las formas salvajes de p21 y p53 también ha sido asociada con la eficiencia del sistema TK/GCV. Así, en un modelo celular de carcinoma de ovario, Ziller y colaboradores reportaron que la expresión exógena de p21^{cip1/waf1} incrementaba la sensibilidad a TK/GCV, estimulando la muerte por apoptosis (Ziller, Lincet et al. 2004). Paralelamente, van Dillen y colaboradores demostraron que la citotoxicidad inducida por TK/GCV se veía comprometida en células que expresaban formas mutantes de p53 (van Dillen, Mulder et al. 2005).

Estas observaciones indican que la identificación de genes cuya expresión esté relacionada con la capacidad de respuesta celular al tratamiento con TK/GCV permitiría el diseño de estrategias tendientes a modular (mediante técnicas basadas en el fenómeno de interferencia de ARN, por ejemplo) la expresión de dichos genes, que podrían ser utilizadas como potenciadores del efecto citotóxico del sistema TK/GCV en el tratamiento de cáncer de páncreas, aumentando así su eficiencia terapéutica.

b) Interferencia de ARN (RNAi, *RNA interference*)

El descubrimiento del fenómeno de interferencia de ARN (RNAi), conjuntamente con la finalización de la secuenciación completa del genoma humano (Venter, Adams et al. 2001), ha abierto las puertas de una promisoriosa tecnología para el estudio de la función génica y para el tratamiento de enfermedades, mediante el silenciamiento de la expresión génica (Hannon 2002).

Se trata de un proceso de varias etapas, que implica la formación de pequeños fragmentos de ARN de doble cadena, de aproximadamente unos 21-23 nucleótidos. La cadena antiparalela de cada dúplex sirve de molde para el reconocimiento específico de secuencia que permitirá el silenciamiento génico postranscripcional

ejecutado por un complejo multiproteico denominado RISC (del acrónimo en inglés de *RNAi-Induced Silencing Complex*). El silenciamiento de la expresión de los genes diana puede producirse por degradación del ARN mensajero, cuando el fragmento de 21-23 nucleótidos es completamente complementario al mismo (McManus, Petersen et al. 2002; McManus and Sharp 2002), o bien mediante represión de la traducción cuando la complementariedad no es completa y existen nucleótidos no apareados dentro de la secuencia (Kim, Krichevsky et al. 2004). En el primer caso, el componente Argonauta 2 del complejo RISC produce un corte en la secuencia del ARNm, mientras que en el segundo caso, la unión del ARN de 21-23 nucleótidos a la región no traducida 3' (3' UTR, del acrónimo en inglés de 3' *Untranslated Region*) interfiere con la maquinaria traduccional de la célula. Adicionalmente, se ha descrito que fragmentos de 21-23 nucleótidos de ARN son capaces de inhibir la expresión génica a nivel transcripcional mediante metilación de promotores (Kawasaki and Taira 2004; Morris, Chan et al. 2004). Tanto la degradación del mensajero como la inhibición de la traducción pueden ser inducidas mediante la transfección de oligonucleótidos de 21-23 pares de base denominados siRNA (del acrónimo en inglés de *short interfering RNAs*); mediante la transfección o transducción de vectores que expresan fragmentos de ARN con secuencias palindrómicas, que se pliegan para formar estructuras en horquillas denominadas shRNA (del acrónimo en inglés de *short hairpin RNAs*) (Paddison, Caudy et al. 2002); o bien, mediante la transfección o transducción de vectores que expresan los denominados microRNAs, que constituyen el sustrato natural para la maquinaria de RNAi (Nelson and Weiss 2008). Cuando se utilizan shRNAs y microRNAs, estas moléculas son procesadas por la enzima DICER, para dar lugar a las estructuras de doble cadena de ARN que se incorporará al complejo RISC.

1.4 Viroterapia del cáncer

a) Fundamento y mecanismo de acción

La viroterapia consiste en la utilización de virus para la destrucción de células tumorales como consecuencia de su ciclo vital que involucra la lisis de la célula hospedadora. Para ello se han

ensayado estrategias utilizando diferentes tipos de virus, como reovirus, virus de la estomatitis vesicular, virus vaccinia (Ring 2002), virus de la papera y adenovirus (Chiocca 2002), siendo estos últimos los más utilizados.

b) Adenovirus de replicación condicionada (CRAd)

Para la utilización de virus que no presentan, en su forma salvaje, selectividad para realizar su infección y/o replicación en células tumorales sin afectar células no tumorales, es necesario introducir elementos de seguridad que garanticen la ausencia de efectos adversos relacionados con la lisis de células no tumorales. Tal es el caso de los adenovirus. Los adenovirus del serotipo 5 (el serotipo más estudiado como vector de transferencia génica y/o agente terapéutico en estrategias que involucran la destrucción de células mediante lisis viral) presentan un elevado tropismo por una amplia variedad de tipos celulares, principalmente células epiteliales. Para circunscribir la acción lítica de estos virus a células tumorales se han utilizado diversas estrategias que involucran la modificación de su genoma, generando así los llamados adenovirus de replicación condicionada (CRAd, del acrónimo en inglés de *Conditionally Replicative-Adenovirus*) o bien adenovirus oncolíticos, cuando su acción lítica está restringida a células tumorales. A continuación se ilustran algunos conceptos básicos relacionados con el ciclo natural de la infección con adenovirus en forma salvaje, y se enumeran algunas de las estrategias utilizadas para la generación de virus oncolíticos.

Aspectos estructurales y genómicos

Los adenovirus son virus sin envoltura lipídica, que pertenecen al género Mastadenovirus, dentro de la familia *Adenoviridae*. Se conocen 51 serotipos diferentes, clasificados en 6 grupos (A-F) con propiedades de infectividad y patogenicidad variables entre los grupos. Contienen un genoma de ADN lineal de doble cadena, de unas 36 kb, flanqueados por unas regiones denominadas ITR (del acrónimo en inglés de *Inverted Terminal Repeats*) y cuyos extremos 5' están unidos covalentemente a la proteína terminal (TP) (Rekosh, Russell et al. 1977). El ADN viral se encuentra asociado, además, a la proteína VII y al péptido *mu* (Anderson, Young et al. 1989), las

cuales mediante su unión a las proteínas V y VI, permiten la asociación de ADN con la cápside viral (Matthews and Russell 1995).

La cápside está formada por ocho proteínas estructurales denominadas II (que forma trímeros denominados “hexón”), III (que forma pentámeros, denominados “pentón”), IIIa, IV (que forma trímeros, denominados “fibra”), IVa2, VI, VIII y IX, siendo las más abundantes la fibra, pentón y hexón. Éstas se organizan formando una estructura icosaédrica, con las caras del icosaedro formadas por la proteína hexon y los vértices formados por la proteína pentón, desde los cuales se proyectan hacia el exterior las proteínas fibra. La proteína fibra presenta dos regiones estructural y funcionalmente distinguibles: en el dominio *shaft* (cuerpo de la fibra) encontramos el dominio de unión glicosaminoglicanos del tipo heparán-sulfato (HS-GAG), mientras que en el extremo de la fibra encontramos el dominio *knob*, responsable de la interacción del virus con su receptor celular CAR (*Coxsackie-adenovirus receptor*) (Russell 2000; Zhang and Bergelson 2005).

Aproximadamente unas 50 proteínas virales se transcriben a partir de unidades transcripcionales solapadas a lo largo del genoma, en ambas cadenas del ADN. La generación de distintos ARN mensajeros mediante *splicing* alternativo permite la producción de esta diversidad de proteínas a partir del genoma viral (Verma and Weitzman 2005). En cuanto a la conservación del genoma entre serotipos, se observa una elevada homología en la secuencia genómica de la mayoría de los genes, a excepción de los que codifican para la proteína fibra (principal determinante antigénico de serotipo) y de las secuencias ITR (Shenk 1996).

Infección por adenovirus en forma salvaje (ciclo lítico)

La unión del dominio knob, de la cápside adenoviral, con el receptor celular CAR inicia el proceso de infección de la célula. Esta interacción facilita, a su vez, la interacción con el motivo RGD (Arginina-Glicina-Ácido Aspártico) de la proteína pentón con su receptor celular, las $\alpha\beta$ integrinas (Wickham, Mathias et al. 1993; Nemerow 2002; Zhang and Bergelson 2005). Esta interacción estimula la formación de vesículas de clatrina, resultando en la internalización de las partículas virales. A continuación, la cápside

viral es desensamblada y el material genético, traslocado al núcleo mediante un proceso que involucra su asociación con la proteína p32 (Russell 2000), donde las enzimas ADN polimerasas celulares II y III iniciarán la transcripción del genoma viral. Los primeros genes en ser transcritos son los denominados tempranos E1A, E1B, E2, E3 y E4. Los productos de estos genes están encargados de poner en marcha la maquinaria celular necesaria para la replicación del genoma viral y producción de partículas virales, a la vez que regulan la expresión de los genes virales que se transcriben a continuación. La segunda ola de transcripción corresponde a la de los genes IX y IVa2, denominados genes retardados y posteriormente se transcriben los genes denominados tardíos, que codifican para los componentes estructurales de la cápside y para las enzimas involucradas en el ensamblaje de las nuevas partículas virales. La liberación de los viriones producidos causa la lisis de la célula infectada, por lo que el proceso se denomina “ciclo lítico” (Ng 2002), aunque se ha descrito recientemente la inducción de autofagia como parte del mecanismo de inducción de citotoxicidad (Jiang, Gomez-Manzano et al. 2007) (Alonso, Jiang et al. 2008; Yokoyama, Iwado et al. 2008).

Estrategias para lograr la especificidad

Como parte de su ciclo natural, los adenovirus necesitan utilizar la maquinaria biosintética de la célula infectada para producir viriones. Para ello es necesario que las células expresen las proteínas involucradas en la síntesis de ADN, típicamente expresadas durante la fase S del ciclo celular. Esta característica podría utilizarse para asegurar que la replicación viral estará restringida a células con alta tasa proliferativa (en particular, células tumorales). Sin embargo, los adenovirus han desarrollado la capacidad de inducir la entrada en fase S en células infectadas, mediante la interacción entre la proteína viral E1A, en estado salvaje, y la proteína celular pRb. Esta interacción produce la disociación del complejo pRb-E2F, resultando en un incremento en los niveles de E2F libre, señal que produce la activación transcripcional de genes de fase S (Bandara and La Thangue 1991).

Una de las primeras estrategias tendientes a restringir la replicación viral a células tumorales se basaba en la alta frecuencia de alteraciones en la vía de p53 que se observa en células tumorales, en

comparación con células normales. El adenovirus mutante en E1B55kDa, *dl1520* (patentado bajo el nombre ONYX-015, y comercializado en China como H101) presenta una delección de la región que codifica para la proteína E1B de 55kDa. Esta proteína, durante una infección con la forma salvaje del adenovirus, es capaz de inactivar p53, impidiendo que induzca un arresto en la fase G0/G1 del ciclo celular y / o la muerte por apoptosis, permitiendo así la replicación del virus (Barker and Berk 1987). Inicialmente se creía que, al carecer de esta proteína, ONYX-015 podría replicar sólo en células que no presenten una vía de p53 funcional, y podría infectar células no tumorales pero no sería capaz de replicar en ellas, ya que la activación de p53 inhibiría la progresión a fase S y eventualmente desencadenará la muerte por apoptosis antes de que el virus haya sido capaz de replicar su ADN y ensamblar los nuevos viriones (Bischoff, Kirn et al. 1996), aunque posteriormente se sugirió que la selectividad se debía a una alteración en la exportación nuclear del ARN mensajero viral (O'Shea, Johnson et al. 2004). A pesar de los resultados alentadores obtenidos *in vitro*, los resultados de ensayos clínicos realizados en humanos utilizando ONYX-015 han generado dudas acerca de su capacidad de inducir un efecto terapéutico significativo cuando se aplica como único agente, e incluso sobre su selectividad (Crompton and Kirn 2007).

Otra aproximación ensayada para conferir selectividad tumoral a virus replicativos es la delección de pequeñas regiones en el dominio de unión de E1A con pRb, evitando así la interacción de pRB con E1A y, por consiguiente, la liberación de E2F. De esta manera se espera que la replicación del virus en células quiescentes sea baja o nula, mientras que en células tumorales sea alta. Basándose en este principio, se desarrollaron los adenovirus oncolíticos $\Delta 24$ (Fueyo, Gomez-Manzano et al. 2000) (Suzuki, Fueyo et al. 2001) (Bauerschmitz, Lam et al. 2002) y *dl922-947* (Heise, Hermiston et al. 2000).

Otro mecanismo celular utilizado para conferir especificidad tumoral a la replicación viral es el que involucra la respuesta celular a moléculas virales. Se ha descrito que la protein-quinasa R (PKR), en respuesta a la de ARN viral de doble cadena, es capaz de fosforilar la subunidad reguladora del factor eucariota de iniciación 2 (eIF2). La fosforilación inhibitoria de eIF2 impide la síntesis de proteínas, evento que en el contexto de las infecciones virales

actuaría como mecanismo de defensa del organismo ante la replicación del virus (Kitajewski, Schneider et al. 1986) (Pathak, Nielsen et al. 1988). Sin embargo, los adenovirus poseen un mecanismo para evadir este sistema que consiste en la síntesis de moléculas de ARN denominadas VA RNA (del acrónimo en inglés de *Viral-Associated RNAs*) capaces de interaccionar a PKR, inhibiendo su activación por otros ARN virales de doble cadena, permitiendo así la correcta expresión de proteínas virales (Katze, DeCorato et al. 1987). El potencial uso de este mecanismo en el desarrollo de virus oncolíticos radica en la observación de que el producto del oncogén Ras es capaz de ejercer el mismo efecto sobre PKR que los VA RNAs (Mundschau and Faller 1992). Así, la utilización adenovirus delecionados en VA RNAs (*dl1331*) permite la replicación de los mismos en células que presenten una activación de Ras (aproximadamente un 80% de los tumores (Macaluso, Russo et al. 2002)) mientras que la replicación será inhibida en células normales mediante la activación de PKR (Cascallo, Capella et al. 2003).

Finalmente, otra estrategia consiste en restringir la expresión de E1A a células tumorales mediante el uso de promotores específicos. Dado que E1A regula, directa o indirectamente, la transcripción de prácticamente todos los genes virales, el control transcripcional de la expresión de E1A mediante el uso de un promotor que se encuentre diferencialmente activado en células tumorales permitiría la restricción de la replicación viral a dichas células. Así, se ha estudiado el uso de promotores o fragmentos de promotores de proteínas con expresión diferencial en algún tipo de tumor como por ejemplo, el promotor del antígeno prostático específico (PSA) (Rodriguez, Schuur et al. 1997), de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Yamamoto, Alemany et al. 2001; Davydova, Le et al. 2004; Tekant, Davydova et al. 2005; Ramirez, Vickers et al. 2008), de la osteocalcina (Matsubara, Wada et al. 2001; Hsieh, Yang et al. 2002), de la alfa-fetoproteína (AFP) (Hallenbeck, Chang et al. 1999), del receptor del activador de plasminógeno uroquinasa-símil (uPAR, Huch, M; comunicación personal), hTERT (Huang, Zhang et al. 2004; Kawashima, Kagawa et al. 2004), entre muchos otros.

Una característica observada en la práctica totalidad de los tumores es una alteración en la vía pRB-E2F. Independientemente del nivel en el cual se encuentre dicha alteración, la presencia de elevados

niveles del factor de transcripción E2F libre es una característica de las células tumorales independientemente del tejido que les dio origen. Esta propiedad ha sido utilizada para generar vectores en los cuales la expresión de la proteína viral E1A está regulada por un promotor activable por E2F, como por ejemplo el promotor endógeno de E2F (Majem, Cascallo et al. 2006; Cascallo, Alonso et al. 2007).

c) Principales limitaciones

El sistema inmune constituye una de las principales barreras que debe sortear un virus terapéutico para ejercer su función. De manera similar a lo descrito para los adenovirus no replicativos utilizados como vectores de transferencia en estrategias de terapia génica, los adenovirus oncolíticos administrados por vía parenteral se enfrentarán a la presencia de anticuerpos bloqueantes. Estos anticuerpos bloqueantes pueden estar presentes en el momento de la primera administración debido a infecciones anteriores con adenovirus en forma salvaje. Posteriormente, se espera que individuos inmunocompetentes desarrollen una respuesta inmune al virus terapéutico, que comprometerá la eficiencia de administraciones subsecuentes del virus. Se espera que la inmunogenicidad de un adenovirus replicativo sea mayor que la de un vector de transferencia no replicativo, dado que en este caso sólo el gen terapéutico se estará expresando, mientras que la infección con virus replicativos producirán la síntesis de todas las proteínas, incrementando así su presentación antigénica. Además de los anticuerpos bloqueantes, no existe información certera sobre el efecto de otros componentes del sistema inmune, en gran parte debido a la escasez de modelos animales inmunocompetentes permisivos a la replicación de los adenovirus diseñados para ser utilizados en pacientes. En este sentido, Thomas y colaboradores demostraron que la aplicación de un preconditionamiento inmunomodulador con ciclofosfamida, resultante en una inmunosupresión global e inespecífica, incrementaba la eficiencia antitumoral de un adenovirus replicativo, administrado por vía intratumoral en un modelo de xenoinjertos en hamster (Thomas, Spencer et al. 2006; Thomas, Spencer et al. 2008). Se espera que estudios realizados con inmunosupresores selectivos permitan

analizar el efecto de los diferentes componentes del sistema inmune, y diseñar estrategias para potenciar el efecto antitumoral de los adenovirus, mediante regímenes de inmunomodulación tendientes a suprimir o bien polarizar la respuesta inmune (por ejemplo, hacia un perfil TH1, estimulando la inmunidad celular en detrimento de la inmunidad humoral).

Recientemente, se han comenzado a ensayar estrategias, para incrementar la llegada del virus al tumor, que se basan en la utilización de células transportadoras con capacidad de migrar al tejido tumoral. En este sentido, se han estudiado las propiedades de diversos tipos celulares para ser usadas en estrategias tipo “Caballo de Troya” (células del sistema inmune, células madre, células tumorales) y con diferentes virus oncolíticos (*Herpes simplex*, virus de la papera, virus de enfermedad de Newcastle, virus de la estomatitis vesicular, entre otros, (Guo, Thorne et al. 2008)). En relación al uso de estas estrategias para la aplicación de adenovirus oncolíticos, un estudio realizado en un modelo animal de cáncer de ovario diseminado demostró que el tratamiento con células progenitoras mesenquimales (MPC, del acrónimo en inglés de *Mesenchymal Progenitor Cells*) previamente infectadas con un adenovirus replicativo era capaz de prolongar el tiempo de supervivencia de los animales, no sólo en comparación con el grupo control no tratado, sino también con el grupo que recibió el adenovirus mediante en ausencia de células transportadoras (Komarova, Kawakami et al. 2006). Sin embargo, un estudio publicado recientemente demostró que células madre derivadas de tejido adiposo (ASC, del acrónimo en inglés de *Adipose derived Stem Cell*) son capaces de migrar al tumor pero no son capaces de actuar como transportadoras de un gen terapéutico cuando son transducidas con adenovirus (Lamfers, Idema et al. 2009). La identificación de células con capacidad de migración a tumor y que sean resistentes, a la vez que permisivas, a la replicación adenoviral tiene un gran potencial en el desarrollo de estrategias de viroterapia más seguras y eficientes.

d) Virus armados

Con el objetivo de incrementar la potencia citotóxica de los virus oncolíticos, se han desarrollado estrategias que involucran su uso

como vectores de transferencia para terapia génica, además de su uso como agente terapéutico *per se*. Desde el punto de vista de la terapia génica, se espera que la replicación, en el tejido tumoral, de un virus oncolítico que expresa el gen terapéutico permitirá la transducción de un mayor número de células, y la amplificación del efecto del sistema suicida.

Los resultados obtenidos a partir del uso de adenovirus replicativos armados con TK, en combinación con ganciclovir, han arrojado resultados contradictorios en cuanto al beneficio real de la combinación. Si bien algunos estudios demostraban que el tratamiento con el adenovirus armado en combinación con ganciclovir era más citotóxico que el tratamiento con el virus solo (Wildner, Blaese et al. 1999; Wildner, Morris et al. 1999; Nanda, Vogels et al. 2001), algunos autores han reportado que el agregado de ganciclovir comprometía el efecto terapéutico del virus solo (Morris and Wildner 2000; Wildner and Morris 2000; Wildner and Morris 2000; Lambright, Amin et al. 2001), o bien no producía ningún efecto en términos de eficiencia citotóxica, mientras que disminuía el número de viriones, debido a la acción virostática del ganciclovir (Raki, Hakkarainen et al. 2007). En una aproximación más compleja, en la que se utilizaba un adenovirus replicativo armado con TK y CD, se demostró que la adición de las prodrogas ganciclovir y 5-FC no sólo incrementaba el efecto citotóxico del virus replicativo, sino que además ejercía un efecto radiosensibilizador sobre células de cáncer de próstata (Kim, Kim et al. 1994; Kim, Kim et al. 1995; Freytag, Rogulski et al. 1998; Rogulski, Freytag et al. 2000; Rogulski, Wing et al. 2000; Freytag, Paielli et al. 2002).

Más recientemente, Anh y colaboradores describieron el uso de un adenovirus oncolítico con especificidad para células de cáncer de próstata, armado con el gen TK. En este contexto, la adición de ganciclovir incrementó el efecto citotóxico y antitumoral del virus. En relación al aparente efecto negativo o carente de beneficio terapéutico de la adición de ganciclovir (reportado anteriormente por otros autores) los autores de este trabajo postulan que se debe a que el tratamiento con la prodroga se iniciaba inmediatamente después de la inyección viral, remarcando así la importancia del régimen de aplicación del virus y la prodroga (Ahn, Lee et al. 2009). En relación a este punto, resultados obtenidos en nuestro

laboratorio indican que, en el contexto de un adenovirus replicativo, cuando la expresión del gen TK se produce en la fase tardía de expresión de genes virales, es posible minimizar el efecto virostático del agregado de ganciclovir, que resulta en un incremento de la citotoxicidad inducida por el virus. Además, resultados obtenidos en un modelo animal de tumores pancreáticos indicaron que el régimen de aplicación de las dosis de adenovirus y prodroga determina si el agregado de ganciclovir producirá un efecto benéfico o negativo sobre la citotoxicidad inducida por la replicación viral (Cascante, Abate-Daga et al. 2007).

1.5 Técnicas no invasivas para la monitorización *in vivo* del tratamiento con genes suicidas

La monitorización de la localización, intensidad y cinética de la expresión de transgenes, así como su funcionalidad, de manera no invasiva en humanos permitiría establecer un control en tiempo real del tratamiento antitumoral en estrategias de terapia génica. Para ello, se han ensayado diversas metodologías a nivel experimental que utilizan técnicas de medicina nuclear para la generación de bioimágenes, alguna de las cuales se utilizan en la práctica clínica con fines diagnósticos (Serganova, Mayer-Kukuck et al. 2008). En términos generales, estas estrategias aprovechan la actividad del producto del gen terapéutico para aumentar la captación de un radiotrazador. A continuación se describe brevemente el fundamento de tres metodologías que están siendo ensayadas en estudios preclínicos y/o clínicos para su aplicación en pacientes: la generación de imágenes por resonancia magnética (MRI, del acrónimo en inglés de *Magnetic Resonance Imaging*) la tomografía computerizada por emisión de fotón único (SPECT, del acrónimo en inglés de *Single Photon-Emission Computed Tomography*) y la tomografía por emisión de positrones (PET, del acrónimo en inglés de *Positron Emission Tomography*).

La generación de imágenes por espectroscopía de resonancia magnética nuclear fue documentada por primera vez en 1973 y se basa en la detección de la energía que emiten los núcleos de ciertos átomos cuando vuelven a su estado de precesión basal, tras haber sido sometidos a un potente campo magnético externo resultante en el alineamiento de sus movimientos de precesión o *spin* (Lauterbur

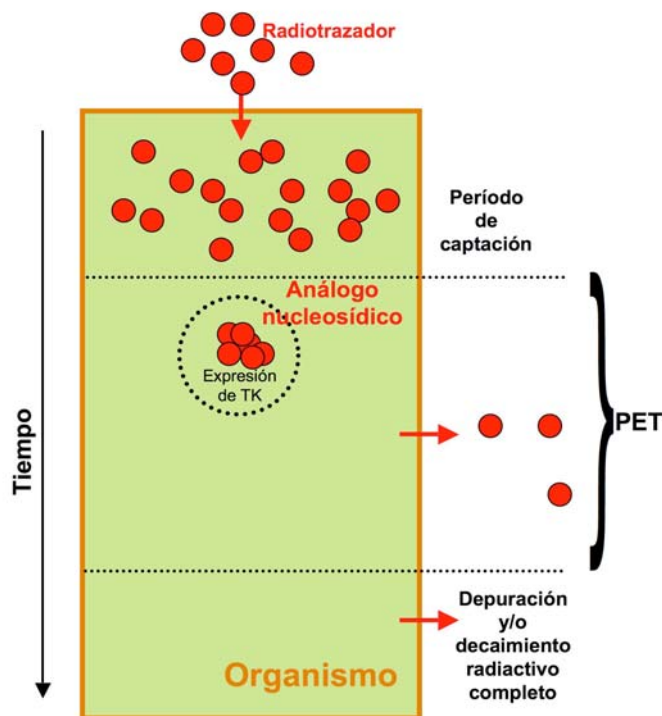
1989). Uno de los núcleos susceptibles de ser detectados por resonancia magnética nuclear es el de los átomos de hidrógeno presentes en las moléculas de agua, uno de los principales componentes del cuerpo humano. Dado que los núcleos de hidrógeno presentes en los diferentes tejidos del organismos presentan propiedades de resonancia magnética diferenciales, se han desarrollado técnicas para la reconstrucción de imágenes anatómicas de alta resolución que se utilizan en la práctica clínica con fines diagnósticos. En el contexto de la terapia con genes suicida, se ha estudiado su uso para monitorizar la acumulación de metabolitos de 5-fluorocitosina, en un modelo animal que presentaba tumores generados a partir de células que expresaban las enzimas Citosina Deaminasa (CD) y Uracilfosforibosiltransferasa (UPRT). En este caso, la detección se basa en la concentración de los metabolitos de 5-FC en las células que expresan el gen terapéutico, por su incorporación en las moléculas de ADN sintetizadas *de novo*. Así, dicha concentración podrá ser detectada mediante análisis de la resonancia magnética de los núcleos de ^{19}F -Fluor, presentes en las moléculas de 5-FC. De esta manera, la 5-FC actuaría a la vez como prodroga y como radiotrazador (Xing, Deng et al. 2008).

La técnica de SPECT, en cambio, se basa en la detección de la emisión de un fotón de radiación gamma por parte de un radiotrazador. Los radionúclidos utilizados más comunmente como trazadores son el Tecnecio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) y el Iodo-123 (^{123}I) (Haberkorn 2008). En el contexto de la terapia con genes suicida, recientemente se han publicado los resultados de un ensayo clínico de fase I en el que se utilizaba un adenovirus replicativo armado con los genes suicidas TKsr39 y CD, además del gen marcador hNIS, que era inyectado directamente en la próstata de pacientes. Este gen marcador codifica para el transportador de membrana Sodio-Ioduro Sinporter, que se expresa normalmente en la membrana basolateral de las células del epitelio de la glándula tiroidea, permitiendo el transporte contra gradiente de un átomo de yodo hacia el interior de la célula y de dos átomos de sodio hacia el exterior (Dohan, De la Vieja et al. 2003). Esta propiedad es aprovechada para detectar células que lo expresan, utilizando ^{123}I como trazador. Así, la incorporación del trazador se vió incrementada en las células que fueron transducidas por el adenovirus armado, brindando información sobre la localización anatómica de las células transducidas (Barton, Stricker et al. 2008). En este contexto no es

posible evaluar la actividad de los genes terapéuticos, sin embargo, se han desarrollado trazadores susceptibles de ser detectados mediante técnicas de SPECT que actúan como sustrato del gen terapéutico, tal es el caso de las moléculas $^{123}\text{I-D-FIAU}$ y $^{125}\text{I-D-FIAU}$. Se trata de análogos nucleosídicos que actúan como sustrato de la enzima TK, incorporándose posteriormente en las cadenas de ADN sintetizadas *de novo*. La acumulación de los radiotrazadores en células que expresan TK de manera estable fue detectada mediante SPECT en un modelo animal (Choi, Zhuang et al. 2005). Esta técnica se ha utilizado además para estudios básicos de genómica funcional (Haberhorn and Altmann 2003; Haberhorn, Altmann et al. 2004).

Al igual que las técnicas de SPECT, la tomografía por emisión de positrones o PET se basa en la detección de radiación gamma. La diferencia radica principalmente en que la fuente de dicha radiación no es el trazador en sí mismo. En PET se utilizan trazadores marcados con radionúclidos que, durante el proceso de decaimiento radiactivo, emiten un positrón. Esta partícula subatómica tiene escaso poder de penetración, y en un radio de aproximadamente dos milímetros colisionará con un electrón, neutralizando su carga eléctrica. Este fenómeno se denomina anihilación, y resulta en la liberación simultánea de dos fotones de radiación gamma, en un ángulo de 180° , aproximadamente. La detección de estos dos fotones emitidos simultáneamente en direcciones opuestas permite estimar la ubicación de la fuente de radiación, y la reconstrucción de imágenes tridimensionales (Phelps, Hoffman et al. 1975). De acuerdo a la naturaleza del trazador, se podrán así localizar tejidos con actividades biológicas específicas. Por ejemplo, la administración de la molécula ^{18}F -fluorodeoxiglucosa (^{18}F -FDG) permite localizar tejidos con alta incorporación de glucosa en las células, dado que esta molécula es captada por las células por un mecanismo similar al de la incorporación de glucosa. Así, aquellas células con una tasa metabólica elevada incorporarán grandes cantidades de FDG, permitiendo su acumulación. Dicha acumulación podrá ser detectada por PET y a partir de estos datos se podrá obtener información sobre la localización anatómica donde se localizan estas células con metabolismo acelerado. Este principio se utiliza en la práctica clínica para la localización de células cancerosas, con fines diagnósticos y de seguimiento de tratamientos antitumorales. De manera similar, mediante el uso de análogos

nucleosídicos marcados con ^{18}F es posible detectar células que expresan la enzima TK. En este caso, el mecanismo por el cual el trazador es retenido dentro de la célula está relacionado con la síntesis de ADN, y con la incorporación del trazador en las moléculas de ADN que están siendo sintetizadas, previa fosforilación por TK. Así, sólo las células que hayan sido modificadas para expresar TK tendrán una señal positiva de PET (Gambhir, Barrio et al. 1999; Sangro, Qian et al. 2002; Min and Gambhir 2008) (Esquema I3).



Esquema I3. Tomografía por emisión de positrones. Tras la administración sistémica de un compuesto con actividad biológica y marcado radiactivamente, éste se distribuirá por los tejidos del organismo quedando retenido en aquellos en los cuales tenga lugar el proceso biológico en el que participa el compuesto. En caso de utilizarse un análogo nucleosídico, el proceso biológico que permitirá su retención será la actividad de timidina quinasa. De esta manera, tras un período de captación que variará según el organismo, el exceso de trazador será eliminado de los tejidos y del torrente sanguíneo. Es en esta situación cuando se adquieren las imágenes PET. Posteriormente, el radiotrazador es también eliminado del organismo y/o su actividad radiactiva decae completamente.

Diversos estudios realizados en modelos animales han demostrado la viabilidad del uso de la técnica de PET para la detección de la actividad TK, tanto en modelos generados a partir de células tumorales que expresan establemente el gen TK, células hematopoiéticas transducidas *ex vivo* (Miletic, Fischer et al. 2007; Yaghoubi, Jensen et al. 2009), tumores inyectados con adenovirus, sindvirus (Tseng, Zanzonico et al. 2006), virus del herpes simple (Kuruppu, Brownell et al. 2007) y vectores derivados de virus adenoasociados (Soghomonyan, Hajitou et al. 2007) y, finalmente, en el parénquima hepático de macacos inyectados con adenovirus no replicativos que expresan TK (Fontanellas, Hervas-Stubbs et al. 2009). Además, esta técnica ha sido aplicada con éxito para la detección de la actividad TK inducida por la aplicación de un adenovirus replicativo armado con los genes de la TK y de la CD, en un modelo de cáncer de próstata en perros, como prueba de concepto para el desarrollo de un ensayo clínico de fase I en humanos (Freytag, Barton et al. 2007).

La aplicabilidad de esta técnica para la detección de la expresión de timidina quinasa inducida con fines terapéuticos en humanos también ha sido demostrada. Peñuelas y colaboradores observaron que las lesiones tumorales retenían de manera específica niveles detectables de un análogo de penciclovir marcado con ^{18}F , tras la administración intratumoral de un adenovirus no replicativo que codifica para la enzima TK (Peñuelas, Mazzolini et al. 2005).

OBJETIVOS

“La formulación de un problema, es más importante que su solución”

Albert Einstein

2. Objetivos

2. 1 Objetivos generales

Identificar procesos celulares y mediadores moleculares que condicionan la eficacia citotóxica del sistema TK/GCV, en células de adenocarcinoma pancreático, y diseñar estrategias combinadas tendientes a potenciar su acción terapéutica.

2. 2 Objetivos específicos

Caracterizar la sensibilidad de las células tumorales pancreáticas al sistema TK/GCV, *in vitro*, y analizar la relevancia del control del ciclo celular en la inducción de citotoxicidad por TK/GCV.

Generar y caracterizar un modelo celular de inducción de resistencia a TK/GCV. Identificar genes con expresión diferencial en células resistentes, como candidatos a genes de resistencia.

Desarrollar un vector que permita la expresión de TK conjuntamente con el silenciamiento de la expresión de BCL2, para validarlo como diana terapéutica en tratamientos combinados.

Comparar la eficacia citotóxica de un adenovirus replicativo armado con el gen suicida TK con la de un vector adenoviral no replicativo que expresa TK.

Analizar el impacto del uso de un promotor específico de tumor, para el control de la replicación viral y de la expresión de TK, sobre la potencia citotóxica de un adenovirus replicativo armado con el gen TK.

Evaluar el uso de la tomografía por emisión de positrones para monitorizar la expresión de TK y la replicación adenoviral *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

"In the long history of humankind (and animal kind, too) those who learned to collaborate and improvise most effectively have prevailed"

Charles Darwin

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Técnicas relacionadas con la manipulación de ácidos nucleicos

a) ADN

a) 1. Extracción de ADN plasmídico de células procariotas

-Minipreparación de ADN

Esta técnica se utiliza para la obtención de pequeñas cantidades (20-50µg) de ADN plasmídico a partir de un cultivo bacteriano axénico, basándose en la precipitación del ADN plasmídico en presencia de isopropanol y sales, a partir de un lisado bacteriano desproteneizado. Brevemente, se inoculan 5mL de medio LB-Ampicilina con bacterias provenientes de una colonia aislada, se incuba durante toda la noche a 37°C y posteriormente se aísla el sedimento celular de una alícuota de 1.5mL por centrifugación a 6000rpm. Las células se resuspenden en un tampón isotónico en presencia de RNasa A (Tampón P1) y se procede a la lisis alcalina en presencia de SDS (Tampón P2), a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se neutraliza el medio mediante la adición de un tampón de pH ácido (Tampón P3) y se separan por centrifugación las proteínas y, con ellas, el ADN cromosómico. Finalmente, el ADN plasmídico se precipita con isopropanol y se lava con etanol 70%. El ADN se mantiene en tampón TE, almacenado a -20°C.

Tampón TE:

10mM Tris-Cl pH 8
1mM EDTA

-Maxipreparación de ADN

Esta técnica permite obtener grandes cantidades (100-500µg) de ADN plasmídico de alta pureza. Se utilizó el kit comercial Qiagen^R Plasmid Maxi Kit de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La técnica se basa en la elevada afinidad del ADN por una resina de intercambio aniónico, en condiciones de baja y media fuerza iónica.

En estas condiciones, el ARN, las proteínas y otros contaminantes de bajo peso molecular no presentan afinidad por la resina, siendo así separados del ADN. En presencia de altas concentraciones de sales, el ADN es eluido de la resina y el proceso se completa con la precipitación del ADN con isopropanol y su posterior lavado con etanol 70%. El ADN se mantiene en tampón TE, almacenado a -20°C.

a) 2. Extracción de ADN total a partir de tejidos

Se purificó ADN total (genómico y adenoviral) de tejidos mediante una extracción fenol-clorofórmica, seguida de precipitación en presencia de alcohol y sales, basada en el protocolo descrito por Gross-Bellard (Gross-Bellard, Oudet et al. 1973). Brevemente, se congelan las muestras a -80°C y se trituran con un mortero, en presencia de nitrógeno líquido para evitar su descongelación, hasta obtener un polvo fino. Posteriormente, se procede al lisado de la muestra en presencia de Proteinasa K (Tampón de Lisis) durante 24 horas a 50°C. A continuación, se separa el ADN de las proteínas y del ARN mediante extracción con una mezcla de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (proporción 25:24:1). Se descartan la fase orgánica (que contiene el ARN) y la interfase (donde se localizan las proteínas), conservando el ADN presente en la fase acuosa, el cual será precipitado a continuación mediante la adición de isopropanol en presencia de sales. Para finalizar, el ADN precipitado se lava con etanol al 70% y se resuspende en tampón TE para su posterior almacenamiento.

Tampón de Lisis:

10mM Tris-Cl pH 8
25mM EDTA pH 8
100mM NaCl
0,5% (p/v) SDS
0,1mg/mL Proteinasa K

a) 3. Cuantificación de ADN

La concentración de ADN se determinó por medición de la absorbancia a una longitud de onda de 260nm, en un espectrofotómetro Ultrospec 3100 pro (Amersham Biosciences). La

ecuación que relaciona la concentración de ADN con la densidad óptica es la siguiente:

$$[\text{ADN}] = \text{DO}_{260} \times \text{FD} \times 50 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

donde,

[ADN] es la concentración de ADN en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

FD es el factor de dilución

DO_{260} es la densidad óptica de la solución, medida a 260nm

Adicionalmente, se puede realizar una valoración aproximada del grado de pureza del ADN, calculando el cociente $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$. Para la realización de experimentos de transfección en células eucariotas se recomienda utilizar diluciones de ADN con un cociente superior o igual a 1,8.

a) 4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La técnica de PCR permite la amplificación *in vitro* de un fragmento específico de ADN, mediante la actividad de la enzima ADN polimerasa de *Thermophilus aquaticus* (Taq polimerasa), que incorporará deoxinucleótidos (dNTP) a los oligonucleótidos (cebadores o *primers*) complementarios a los extremos de la región que se desea amplificar, usando una hebra de ADN desnaturalizado como molde. La especificidad de la reacción viene dada por la secuencia nucleotídica de los dos cebadores, que deben estar diseñados para que no hibriden en otra región del genoma, además de las regiones flanqueantes al fragmento a amplificar. Para obtener suficiente cantidad de ADN amplificado (amplicón) se debe repetir al menos veinticinco veces el ciclo de desnaturalización-hibridación de cebadores-síntesis de ADN-desnaturalización. Para esto se somete a la mezcla de reacción a cambios programados de temperatura, según se describe a continuación:

Programa:

| | | | |
|------|-------------|--------|---------------------|
| 94°C | 5 minutos | } -35x | (Desnaturalización) |
| 94°C | 60 segundos | | (Desnaturalización) |
| 60°C | 60 segundos | | (Hibridación) |
| 72°C | 60 segundos | | (Síntesis de ADN) |
| 72°C | 10 minutos | | (Síntesis de ADN) |

La temperatura de hibridación de los cebadores y el tiempo de síntesis de ADN serán diferentes de acuerdo a la secuencia nucleotídica de los cebadores y a la longitud del amplicón, respectivamente. Las condiciones deben establecerse experimentalmente, pero suele realizarse utilizando una temperatura de hibridación 5°C menor a la temperatura teórica de disociación del 50% de los cebadores de su secuencia complementaria. La duración del período de síntesis de ADN suele establecerse en sesenta segundos para amplificar un fragmento de una kilobase, o un tiempo proporcional al número de pares de base del amplicón, manteniendo dicha relación.

La reacción se realiza con los sustratos presentes desde el comienzo del programa, de ahí la necesidad de utilizar una enzima resistente a la incubación a 94°C del paso de desnaturalización, como la Taq polimerasa. La mezcla de reacción se detalla a continuación:

Reacción de PCR:

10-50 ng de ADN molde
1x Tampón de reacción (Roche)
(1,5 mM MgCl₂ incluido en el tampón)
0,2 mM de cada dNTP (Pharmacia Biotech)
10 µM de cada cebador
0,5 U de Taq polimerasa (Roche)

Cebadores utilizados:

| | |
|---------------|---------------------------|
| TK F: | CTCATCCCGCCGACCT |
| TK R: | CACGACCCGCCGCCCTG |
| E1A(icovir)_F | CGCGTTAAAGCCAATAGGAA |
| E2F_R | CGGCCATTTCTTCGGTAATA |
| E1A_F | ATCGAAGAGGTACTGGCTGA |
| E1A_R | CCTCCGGTGATAATGACAAG |
| Hexon_F | GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC |
| Hexon_R | CAGCACGCCGCGGATGTCAAAG |

En este trabajo se utilizó un termociclador ABI GeneAmp 9600

(Applied Biosystems) para llevar a cabo los programas cíclicos de cambio de temperatura.

a) 5. PCR en tiempo real

Para la medida semicuantitativa relativa de fragmentos específicos de ADN copia, se utilizó la técnica de PCR en tiempo real, utilizando el colorante SYBRgreen (Roche) en un termociclador de capilares LightCycler (Roche). La técnica se basa en la cuantificación de la fluorescencia de la tinta, cuya señal aumenta al estar intercalada en ADN de doble cadena. En cada ronda de síntesis de ADN, se generan nuevas moléculas de ADN de doble cadena y la señal de SYBRgreen aumenta. El ciclo en el cual la intensidad de fluorescencia es significativamente mayor a la señal del colorante sin estar unido a ADN se denomina *Crossing Point* (Cp). Cuanto mayor sea la concentración del ADN específico a cuantificar, menor será el valor de Cp. Así, la abundancia relativa de una secuencia en una determinada muestra con respecto a la misma molécula en otra muestra se puede calcular mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Ratio} = E_{\text{diana}}^{\Delta\text{Cp}} / E_{\text{referencia}}^{\Delta\text{Cp}}$$

donde,

Ratio es la relación entre la expresión del gen diana en las condiciones de interés con respecto a las condiciones control

$E_{\text{diana/referencia}}$ es la eficiencia de la reacción de PCR para el gen diana o el de referencia. Se calcula como la pendiente de la curva que surge de relacionar los valores de Cp con la concentración de un ADN diana. En este caso, se utilizaron concentraciones relativas obtenidas mediante el análisis de diluciones seriadas de una mezcla de ADNs

ΔCp es la diferencia entre los Cp del gen control y del gen de interés

Se utilizaron oligonucleótidos sintetizados y purificados por HPLC (Sigma-Genosys) a modo de cebadores. Las secuencias nucleotídica de los mismos se listan a continuación:

TK_{RT_F}
TK_{RT_R}

ATCTTGGTGGCGTGAAACTC
TAGCGTGGGCATTTTCTG

GADD45_F CGGACCTGCACTGCGT
 GADD45_R ATAAGTTGACTTAAGGCAGGATCCTT
 (Napieralski, Ott et al. 2005)

CCNE1_F TGGGCAAATAGAGAGGAAGTC
 CCNE1_R TTCAGGGTATCAGTGGTGC
 (Ullmannova, Stockbauer et al. 2003)

GPC3_F GTGCCATTCTCAACAACGC
 GPC3_R TCATTCCATTCCTTGCTGCC
 (Baer, Nees et al. 2004)

ACTB_F AGAGCTACGAGCTGCCTGAC
 ACTB_R AAAGCCATGCCAATCTCATC
 (Baer, Nees et al. 2004)

GPC4_F AAGGACTTGCCATGGTTCAC
 GPC4_R ACGTGGCTAAAGGTCACCAC

NMU_F GAAGACACAGAAGTTGGGCAAGT
 NMU_R CTCTTCATTCTTCTCTCATGCAGGT
 (Shetzline, Rallapalli et al. 2004)

WNT5A_F AGGGCTCCTACGAGAGTGCT
 WNT5A GACACCCCATGGCACTTG
 (Yang, Hwang et al. 1998)

POLK_F CCTCAAGAGAAAATGTGTAATTCAA
 POLK_R CATTGTGCCTGGCCTAACTAA

Las secuencias de los cebadores fueron extraídas de las publicaciones que se indican en cada caso, o diseñadas utilizando el programa informático Primer3.

El programa de termociclador utilizado fue el siguiente:

| | | | |
|---------|-------------|--------|---------------------|
| 95°C | 10 minutos | } -35x | (Desnaturalización) |
| 95°C | 15 segundos | | (Desnaturalización) |
| 60°C | 5 segundos | | (Hibridación) |
| 72°C | 9 segundos | | (Síntesis de ADN) |
| 68-95°C | 10 minutos | | (fusión) |

La cuantificación de fluorescencia se realizó al final de cada incubación de síntesis de ADN (72°C), excepto para GPC3, para el que se realizaron las mediciones a 80°C.

a) 6. Digestión con enzimas de restricción y modificación

-Endonucleasas de restricción

Para llevar a cabo la generación de construcciones plasmídicas mediante el clonado de fragmentos de restricción u oligonucleótidos, y para la generación de vectores adenovirales a partir de genomas recombinantes, se utilizaron las siguientes enzimas de restricción, siguiendo las instrucciones de los respectivos fabricantes: *Bam*HI (Fermentas), *Bgl*II (Fermentas), *Eco*RV (Fermentas), *Hind*III (Fermentas), *Kpn*I (Fermentas), *Not*I (Fermentas), *Pac*I (New England Biolabs), *Pme*I (New England Biolabs), *Sal*I (Fermentas), *Swa*I (Fermentas) y *Xba*I (Fermentas). En la mayoría de los casos, se realiza la reacción enzimática en un volumen final de 20 µL, mezclando 1-5 µg de ADN, el tampón provisto por el fabricante para ser usado con cada enzima, 1 IU de enzima por cada microgramo de ADN a digerir, en agua destilada. La mezcla se incubó al menos dos horas a la temperatura óptima de cada enzima (37°C en la mayoría de los casos) y posteriormente se purificó(n) el/los fragmentos de ADN mediante electroforesis preparativa en gel de agarosa.

-Generación de extremos romos

Aprovechando la actividad 5' → 3' ADN polimerasa del fragmento Klenow de ADN polimerasa I de *E coli*, se generaron extremos romos a partir de extremos cohesivos generados por digestión con *Hind*III. Para ello, se incubó el ADN con la enzima Klenow (USB), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se mezcló, en agua destilada, el ADN que contiene extremos 3' cohesivos con el tampón de la enzima (provisto por el fabricante), 100 µM de cada dNTP, 1 mM DTT y 1 IU de enzima por microgramo de ADN. Se incubó la mezcla durante media hora a temperatura ambiente y luego se purificó el ADN mediante electroforesis preparativa en gel de agarosa.

a) 7. Clonaje de oligonucleótidos de ADN en plásmidos

Se sintetizaron por separado las hebras sentido y antisentido de la secuencia a clonar en el plásmido y se purificaron mediante HPLC (Sigma-Genosys). Posteriormente, se resuspendieron los oligonucleótidos en agua, a una concentración de 250 pM.

Un volumen de 10 µL de cada oligonucleótido fue incubado con igual cantidad de su oligonucleótido complementario en 180 µL de Tampón de Hibridación 1x durante treinta minutos a 95°C y posteriormente se mantuvieron a temperatura ambiente para dejarlos enfriar gradualmente a 25°C. Los dímeros resultantes fueron clonados mediante ligación, en una relación molar inserto:plásmido de 40:1.

Tampón de Hibridación:

10 mM Tris-HCl

100 mM NaCl

-Reacción de ligación

Consiste en la formación de uniones fosfodiéster entre grupos 5'-fosfato y grupos 3'-hidroxilo utilizando una enzima extraída del fago T4 (T4 DNA ligase, Roche). El proceso es dependiente de ATP y se realiza a 16°C durante toda la noche. Para reacciones de 10 µL de volumen final se ensayan varios ratios molares inserto:vector (en este trabajo, de 1:20 y 1:40, partiendo de 60 ng de vector). Los productos de reacción se utilizan seguidamente para transformar bacterias competentes.

- Clonado y amplificación de construcciones

Para la amplificación de las construcciones que contienen secuencias palindrómicas se utilizaron las bacterias quimiocompetentes LyoComp GT116 (Invivogen), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se trata de células *E coli* a las cuales se les han eliminado los genes *sbcC* y *sbcD*, que codifican para los componentes del complejo proteico SbcCD, capaz de reconocer y clivar secuencias palindrómicas, como los ARN en horquilla (*hairpins*).

a) 8. Electroforesis en geles de agarosa

Con el objetivo de separar fragmentos de ADN de diferente tamaño, sea de manera analítica o preparativa, se utilizó la técnica de electroforesis en geles de agarosa. Esta técnica se basa en la capacidad de las moléculas de ADN, cargadas negativamente por los grupos fosfato, de migrar hacia el ánodo (anaforesis) cuando son sometidas a un campo eléctrico. Si dichas moléculas son colocadas en una matriz porosa (en este caso el gel de agarosa), la capacidad de migración se verá restringida por el tamaño de los poros, generándose un gradiente de velocidades de migración en función del tamaño de las moléculas de ADN. Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron geles con una concentración de agarosa (Seakem LE Agarose, Cambrex Biosciences) que varió entre 0,8% p/v y 2% p/v en tampón TBE 0,5x, dependiendo del tamaño de los fragmentos que se desaba separar. Los geles contenían, además, 0,5 µg/mL de bromuro de etidio (Sigma), un agente intercalante que emite fluorescencia, al exponerse a la luz ultravioleta, cuando está asociado a una doble hebra de ADN, permitiendo así su visualización. En cada electroforesis se incluyó un carril con un marcador de peso molecular (1 kb DNA ladder, Invitrogen) y las muestras fueron diluidas en un tampón de carga, antes de ser cargadas en el gel, con el fin de conferirles mayor densidad y color.

Tampón TBE 0,5x:

45 mM Tris
45 mM Ácido bórico
0,002 mM EDTA

Tampón de carga 6x:

0,25% p/v Azul de bromofenol
0,25% p/v Xilencianol
40% Sacarosa

a) 9. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Se utilizó el kit comercial Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, tras separar los fragmentos de ADN por electroforesis en gel de agarosa teñido

con bromuro de etidio, se visualizan las bandas en un transiluminador de luz ultravioleta (UV) y se aísla la banda de interés utilizando un bisturí. Se solubiliza el trozo de agarosa en un tampón provisto por el kit y se aplica en una membrana de silica-gel. La alta afinidad del ADN por la membrana permite la elución de impurezas y posteriormente se recupera el ADN por elución utilizando un tampón de baja fuerza iónica.

a) 10. Secuenciación

Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de vectores plasmídicos y de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas de restricción. Las condiciones de reacción de marcaje fueron diferentes en uno y otro caso, según se describe a continuación, pero en ambos se obtuvo la secuencia mediante el método de terminación por dideoxinucleótidos (ddNTPs) marcados fluorescentemente (kit BigDye 3.0). Ambas reacciones de marcaje se realizaron en un termociclador Techgene (Techne).

Reacción de marcaje para secuencias de ADN plasmídico:

100 ng de plásmido
0,32 mM de cebador T3
2 μ L de reactivo BigDy3 3.0
en un volumen final de 10 μ L.

Programa:

| | | |
|------|-------------|-------|
| 94°C | 3 minutos | } 28x |
| 94°C | 30 segundos | |
| 50°C | 15 segundos | |
| 60°C | 4 minutos | |

Tras la reacción de marcaje, los productos se purifican mediante cromatografía de exclusión molecular para eliminar restos de reactivos, tales como agregados de fluoróforos, que podrían interferir en el análisis de las secuencias. Para tal fin, se utilizaron columnas Autoseq G-50 y Sephadex G-50 (Amersham Bioscience Biotech). Las secuencias fueron obtenidas utilizando un secuenciador capilar ABI3100, en la Unidad de Genómica de la Universitat Pompeu Fabra.

a) 11. Plásmidos y oligonucleótidos

El plásmido pAVU6+27 fue cedido gentilmente por el Dr Albert Jordan (Yang, Chen et al. 2005). Los vectores de clonado de CCNE1 (full-length clone, IRAUp969H0878D) y GADD45A (EST clone, IMAGp99811012777Q) fueron adquiridos del banco de clones ImaGenes GmbH (Germany). Los plásmidos pBluescript S/K +/-, pShuttle-CMV, pLxSN y pLHCx fueron adquiridos a la casa comercial Stratagene. El plásmido pSFFV-Bcl2-neo fue cedido gentilmente por la Dra Àngels Sierra.

Al igual que los oligonucleótidos utilizados como cebadores, los oligonucleótidos utilizados para construir el vector de expresión de shRNAs fueron adquiridos a la casa comercial Sigma-Genosys. En este caso, el tipo de purificación fue por HPLC.

Oligo B-Sense

TCGACGCTGCACCTGACGCCCTTCACAAGCTTGTGAAGGGCGTCAGGT
GCAGCTTTTT

Oligo B-AntiSense

CTAGAAAAAGCTGCACCTGACGCCCTTCACAAGCTTGTGAAGGGCGT
CAGGTGCAGCG

Oligo C-Sense

TCGACGGGACGCTTTGCCACGGTGGTAAGCTTACCACCGTGGCAAAG
CGTCCCTTTTT

Oligo C-AntiSense

CTAGAAAAAGGGACGCTTTGCCACGGTGGTAAGCTTACCACCGTGGC
AAAGCGTCCCG

Oligo D-Sense

TCGACGGGAGGATTGTGGCCTTCTTTAAGCTTAAAGAAGGCCACAATC
CTCCCTTTTT

Oligo D-Sense

CTAGAAAAAGGGAGGATTGTGGCCTTCTTTAAGCTTAAAGAAGGCCA
CAATCCTCCCG

a) 12. Transformación con ADN plasmídico

Se utilizaron células *E. coli* de la cepa JM109 en fase exponencial de crecimiento en medio LB (densidad óptica del cultivo a $\lambda_{600\text{nm}} = 0.3 - 0.4$). Las células fueron permeabilizadas por tratamiento con polietilenglicol (PEG) y posteriormente incubadas en hielo durante 30 minutos con el producto de las reacciones de ligación descritas más arriba, facilitando así la entrada del ADN a las células. A continuación se incuban las células a 37°C en medio LB sin antibiótico durante 45 minutos a fin de permitir que las células que hayan incorporado el plásmido sinteticen las enzimas que les confieren resistencia a antibióticos. Posteriormente se procede a sembrar el cultivo en placas de LB-Agar suplementado con el antibiótico apropiado. Al cabo de una incubación de toda la noche a 37°C se pueden visualizar las colonias transformantes.

b) ARN

b) 1. Extracción de ARN total de células eucariotas

Se utilizó el reactivo comercial TriPure Isolation Reagent (Roche) para la extracción de ARN total a partir de células en cultivo. La técnica comprende tres pasos: homogeneización y lisis celular con inactivación de nucleasas por el tiocianato de guanidina presente en el reactivo; extracción fenol-clorofórmica y precipitación con isopropanol.

Para los ensayos de hibridación en microarrays de ADN los ARNs fueron purificados utilizando el kit comercial RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen). Esta técnica también involucra un paso de lisis celular con un tampón que contiene un inactivador de nucleasas (isotiocianato de guanidina) pero la purificación de ARN se realiza por unión a una membrana de sílica gel, en condiciones de alta salinidad y en presencia de etanol. Los contaminantes no son retenidos por la membrana, permitiendo así la eliminación de los mismos, durante lavados sucesivos, y la posterior elución del ARN con agua destilada.

b) 2. Cuantificación y control de calidad

Se realizó la cuantificación espectrofotométrica de ARN extraído midiendo la absorbancia o densidad óptica de una dilución 1/50 de muestra, a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 3100 pro (Amersham Biosciences). La ecuación que relaciona la densidad óptica de la solución con la concentración de ARN es la siguiente:

$$[\text{ARN}] = \text{DO}_{260} \times \text{FD} \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

donde,

[ARN] es la concentración de ARN en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

FD es el factor de dilución

DO_{260} es la densidad óptica de la solución, medida a 260nm

Adicionalmente, se puede realizar una valoración aproximada del grado de pureza del ARN calculando el cociente $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$. Se recomienda trabajar con ARNs que posean un cociente mayor o igual a 1,8.

Para los ensayos de hibridación en *microarrays*, la concentración de ARN fue cuantificada utilizando un espectrofotómetro NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies) y la integridad del ARN, así como las cantidades relativas de las fracciones 18S y 28S de ARN ribosomal fueron evaluadas utilizando el RNA 6000 Nano Assay Kit en un analizador 2100 Bioanalyzer (Agilent), según las recomendaciones del fabricante

b) 3. Eliminación de ADN contaminante

Con el objetivo de eliminar trazas de ADN contaminante en las muestras de ARN purificado a partir de células, las muestras fueron tratadas con el kit comercial Turbo DNA-free (Ambion), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

b) 4. Síntesis de ADN copia (ADNc)

Para la síntesis de ADNc a partir de ARN total, se utilizó el kit comercial RETROscript[®] (Ambion Inc) siguiendo las indicaciones

del fabricante. Partiendo de 1 μg de ARN por reacción, se realizó la transcripción reversa a ADNc por acción de la enzima Transcriptasa Reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV-RT), utilizando cebadores al azar, de diez nucleótidos de longitud.

b) 5. Análisis transcriptómico mediante micrarrays de oligonucleótidos

- Generación de sondas de ARN copia (ARNc)

El ARN de las muestras a analizar fue utilizado como molde para la síntesis de sondas fluorescentes utilizando el sistema comercial Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent). Brevemente, se realiza una retrotranscripción del ARN utilizando la enzima MMLV-RT y un cebador que contiene una secuencia oligonucleotídica de deoxitimidinas (oligo dT, que permite la unión del cebador a la cola de poliadeninas de los ARN mensajeros) y la polimerasa del fago T7. En este paso se sintetiza el ARNc. La ARN polimerasa del fago T7 incorporará el nucleósido citidina trifosfato (CTP) marcado con el fluorocromo cyanina 3 ($\lambda_{\text{excitación}} = 532 \text{ nm}$) o cyanina 5 ($\lambda_{\text{excitación}} = 633 \text{ nm}$).

- Hibridación

Las sondas se mezclaron en tampón de hibridación In situ Hybridization Kit Plus (Agilent) y se realizó una hibridación competitiva de dos colores en *microarrays* de oligonucleótidos de 60mer H22K (Agilent) durante 18 horas en agitación, a 60°C en la unidad de Microarrays del CRG.

- Adquisición de datos

Las imágenes fluorescentes fueron obtenidas usando un lector Agilent G2565BA a un a potencia del LASER y del fotomultiplicador del 100%. La cuantificación se realizó utilizando el programa informático GenePix 6.0 software (Axon, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) utilizando la opción *irregular feature finding*.

- Análisis de datos

Los datos crudos fueron filtrados y normalizados usando el paquete Limma, desarrollado en el marco del proyecto *Biconductor* (Gentleman, Carey et al. 2004) utilizando en entorno de programación estadístico R. Se realizó normalización Lowess para la señal de los canales. Los genes analizados fueron clasificados como diferencialmente expresados cuando sus valores para el estadístico empírico B Bayes se encontraron por encima del percentil 95 y presentaron un cambio de intensidad (fold change) con un valor absoluto igual o superior a 1,2. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el paquete Limma en el entorno R (Wettenhall and Smyth 2004).

3.2 Técnicas relacionadas con la manipulación de proteínas

a) Obtención y cuantificación de extractos proteicos

Los extractos proteicos fueron obtenidos mediante lisis celular utilizando diferentes tampones de lisis, dependiendo de la localización subcelular de la proteína que se deseaba detectar, según se detalla a continuación.

Detección de Bcl-2:

0,5 % Tritón X-100
300 mM NaCl
50 mM Tris-HCl pH 7,4
1 mM PMSF (agregado justo antes de usar)

Se utilizan entre 75 μ L y 100 μ L de tampón para una placa de 60 mm de diámetro. La lisis se realiza en hielo, durante 30 minutos y posteriormente se centrifuga durante 15 minutos a 4°C, a 150000 rpm. El sedimento se descarta y se trasvasa el sobrenadante a un tubo nuevo, almacenándose a -80°C hasta el momento de su utilización.

Detección de PARP:

25 mM Tris-HCl pH 7,5

1% SDS
2 mM EDTA
4 mg/mL β -glicerofosfato

Se utilizan entre 75 μ L y 100 μ L de tampón para una placa de 60 mm de diámetro. La lisis se realiza a 98°C durante 10 minutos y posteriormente se centrifuga durante 15 minutos a 15000 rpm, conservándose el sobrenadante y descartando el sedimento celular, que se almacena a -80°C hasta el momento de su utilización.

Detección de histona γ -H2AX:

10 mM HEPES pH 7,9
1,5 mM MgCl₂
10 mM KCl
0,5 mM DTT (agregado justo antes de usar)
1,5 mM PMSF (agregado justo antes de usar)

La fracción soluble en ácido fue extraída mediante el protocolo sugerido por el proveedor del anticuerpo anti- γ -H2AX. Brevemente, habiendo recogido las células y habiéndolas lavado en PBS, se resuspenden los sedimentos celulares en 5-10 volúmenes de tampón de lisis y se agrega posteriormente HCl hasta alcanzar una concentración final de 0,2M, dejando incubar durante treinta minutos en hielo. A continuación se centrifuga a 11000 x g durante diez minutos a 4°C para separar la fase soluble en ácido (sobrenadante) del sedimento correspondiente a la fracción no soluble. El exceso de ácido es eliminado mediante diálisis contra ácido acético 0,1 M y luego contra agua.

Extractos Nucleares (Tampón hipotónico):

10 mM HEPES pH 7,4
10 mM KCl
1,5 mM MgCl₂
0,1 mM EDTA
1 mM DTT
0,15% v/v Nonidet P-40 (NP-40, IGEPAL)
1x Inhibidor de Proteasas (agregado justo antes de usar)
10 mM NaVO₃ (agregado justo antes de usar)

Extractos Nucleares (Tampón de lisis):

- 25 mM Tris-Cl pH 7,5
- 1 mM EDTA
- 1% p/v SDS
- 20 mM β -glicerofosfato
- 1x Inhibidor de Proteasas (agregado justo antes de usar)
- 10 mM NaVO_3 (agregado justo antes de usar)

Este protocolo es una adaptación del descrito por Brunet *et al* (Brunet, Kanai et al. 2002) para la obtención de extractos nucleares. Consta de un primer paso de lisis con un tampón hipotónico, preservando la integridad nuclear. Tras incubar 10 minutos en hielo y centrifugar a 4°C durante 5 minutos y a 800 x g se descarta el sobrenadante, que contiene la fracción citoplasmática, y se lisa el sedimento nuclear con un tampón que contiene 1 % SDS. Posteriormente, se centrifuga a 16000 x g durante 15 minutos y a 4°C de temperatura. Se trasvasa el sobrenadante a un tubo nuevo y se conserva a -80°C hasta el momento de su utilización.

La concentración proteica de los extractos fue determinada utilizando el sistema comercial BCA (Promega), basado en la reacción de Biuret (reducción de Cu^{++} a Cu^+ por los enlaces peptídicos en medio alcalino) y posterior cuantificación espectrofotométrica del complejo formado por el catión Cu^+ y el reactivo BCA ($\lambda = 562$ nm). La concentración proteica de los extractos fue interpolada en la curva patrón (concentración vs absorbancia) realizada con soluciones estándar de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina. Las mediciones de densidad óptica se realizaron utilizando un lector de ELISA Versamax Microplate Reader (Molecular Devices), en placas de 96 pocillos.

b) Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para llevar a cabo la separación de proteínas según su peso molecular, se utilizó la técnica descrita por Laemmli, que consiste en tratar los extractos proteicos con un agente reductor (2-mercaptoetanol) y un detergente aniónico (SDS) para destruir la

estructura cuaternaria de las proteínas y posteriormente someterlas a electroforesis en un gel de poliacrilamida. Las proteínas son atraídas hacia el ánodo debido a las cargas negativas aportadas por el SDS y la separación de las mismas se consigue gracias a las diferencias en su capacidad de migrar a través de la malla de poliacrilamida, dependiendo de su peso molecular.

En todos los experimentos se utilizó un gel compuesto por una fase concentradora, conteniendo un 4% de poliacrilamida, y una fase separadora cuyo porcentaje de poliacrilamida varió según el experimento. La electroforesis se realizó durante 90 minutos a 120 voltios, en una cubeta electroforética Miniprotean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad) y se utilizó un marcador de peso molecular preteñido Benchmark[®] o HiMark para proteínas de alto peso molecular (Invitrogen).

Tampón de desnaturalización y carga (Laemmli 6x):

350 mM Tris-Cl pH 6,8
30% (v/v) Glicerol
10% (p/v) SDS
0,6 M Ditioneitol (DTT)
0,012% (p/v) Azul de bromofenol

Tampón de electroforesis 1x:

25 mM Tris-base
20 mM Glicina
0,1% (p/v) SDS

c) Electrotransferencia (Western Blot)

Una vez separadas las proteínas se realizó la electrotransferencia de las mismas a una membrana de nitrocelulosa Hybond[™] (Amersham) utilizando la cuba electroforética Miniprotean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad). Se aplicó una corriente de 400 miliamperios durante una hora, a 4°C, en un tampón que contiene metanol al 20%. Pasado este tiempo se retiró la membrana y se realizó una tinción inespecífica con el colorante Ponceau-S (Sigma) para corroborar la presencia de proteínas en la membrana.

Tampón de transferencia 1x:

25 mM Tris-Cl pH 8,3

200 mM Glicina

20% (v/v) Metanol

d) Detección inmunológica de proteínas

La membrana de nitrocelulosa tiene la capacidad de unir proteínas de manera inespecífica por lo que, una vez transferidas las proteínas separadas electroforéticamente, es necesario bloquear la membrana para evitar que los anticuerpos que se utilizarán para el revelado inmunológico se adhieran a la misma. Esto se consigue incubándola con una suspensión de proteínas que no presente reactividad inmunológica cruzada con la proteína que se intenta visualizar. En el presente trabajo se utilizó un tampón de bloqueo que contenía leche descremada en polvo al 5%, incubando durante una hora a temperatura ambiente, y posteriormente se procedió a la incubación con los anticuerpos primarios. Alternativamente, para la detección del fosfopéptido P-Chk1 se utilizó un tampón de bloqueo que contenía un 5% de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) en lugar de leche, para evitar una posible reacción cruzada del anticuerpo con la proteína caseína presente en la leche.

A continuación, se presenta una tabla-resumen donde se detallan el nombre comercial, las diluciones utilizadas, el isotipo, la fuente y los proveedores que comercializan los diferentes anticuerpos primarios que fueron utilizados en este trabajo:

| Nombre | Dilución utilizada | Isotipo | Fuente | Clonalidad | Casa comercial |
|--|--------------------|---------|--------|------------|--------------------------|
| Gadd45a (H-165) sc-797 | 1/1000 | IgG | Conejo | Policlonal | Santa Cruz Biotechnology |
| ATR (H-300) sc-28901 | 1/1000 | IgG | Conejo | Policlonal | Santa Cruz Biotechnology |
| Cyclin E (HE-12) sc-247 | 1/200 | IgG2b | Ratón | Monoclonal | Santa Cruz Biotechnology |
| Bcl2 (100) sc-509 | 1/200 | IgG1 | Ratón | Monoclonal | Santa Cruz Biotechnology |
| Lamin B1 (H-90) sc-20682 | 1/500 | IgG | Conejo | Policlonal | Santa Cruz Biotechnology |
| Chk1 (G-4) sc-8408 | 1/1000 | IgG2a | Ratón | Monoclonal | Santa Cruz Biotechnology |
| Chk2 (H-300) sc-9064 | 1/500 | IgG | Conejo | Policlonal | Santa Cruz Biotechnology |
| hILP/XIAP | 1/1000 | IgG1 | Ratón | Monoclonal | BD Biosciences Pharmigen |
| Phospho-Chk1 (Ser345) (133D3) | 1/200 | IgG | Conejo | Monoclonal | Cell Signaling |
| hPARP | 1/5000 | IgG1 | Ratón | Monoclonal | BD Biosciences Pharmigen |
| Phospho-Chk2 (Thr68) | 1/200 | IgG | Conejo | Policlonal | Cell Signaling |
| Cdc25A clone DC5120 | 1/500 | IgG2a | Ratón | Monoclonal | Upstate |
| gamma-H2AX (ser1391) clone JBW301 | 1/1000 | IgG1 | Ratón | Monoclonal | Millipore |

En todos los casos se realizó la incubación del anticuerpo primario (que confiere especificidad al inmunorrevelado) durante toda la noche a 4°C, con agitación constante. Las diluciones de anticuerpo se realizaron en tampón de hibridación de anticuerpos con leche o albúmina sérica bovina según el caso.

Antes de incubar con el anticuerpo secundario (que permite la visualización de las bandas de proteína) se lava la membrana tres veces con TBS 0,1% Tween-20. La incubación se realiza, al igual que para el anticuerpo primario, en tampón de hibridación de anticuerpos, pero durante una hora a temperatura ambiente.

Los anticuerpos secundarios utilizados en este trabajo fueron:

Anti-Inmunoglobulinas de ratón: Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (Dako); dilución 1:5000; generado en conejo, inmunorreactivo contra las inmunoglobulinas de ratón sin especificidad de isotipo.

Anti-Inmunoglobulinas de conejo: Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (Dako); dilución 1:5000; generado en cabra, inmunorreactivo contra inmunoglobulinas de conejo sin especificidad de isotipo.

El revelado se realizó utilizando el sistema comercial ECL Western Blot Detection Reagents (Amersham Biosciences) según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, la enzima peroxidasa de rábano (HRP, del inglés *Horseradish Peroxidase*), unida covalentemente a los anticuerpos secundarios, cataliza la reacción de oxidación del reactivo luminol. Esta reacción transcurre con liberación de fotones que pueden ser detectados utilizando una cámara tipo CCD. El equipo utilizado en este trabajo fue el Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (Fujifilm) y el programa informático para la adquisición de las imágenes fue el ImageReader LAS-300Pro (Fujifilm). Posteriormente, se realizó la cuantificación densitométrica de las bandas utilizando el programa Image Gauge v4.22 (Fujifilm).

Tampón de bloqueo/hibridación de anticuerpos:

5% leche descremada en polvo (o 5% BSA)
0,1% Tween-20 (Sigma)
TBS 1x

TBS 1x:

10 mM Tris-Cl pH 7,5
100 mM NaCl

e) Inmunofluorescencia

γ -H2AX

Para la detección inmunológica de γ -H2AX se utilizó el anticuerpo comercial Anti-phospho-Histone H2A.X (ser139), clon JBW301 (Millipore), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, tras lavar las células con TBS, éstas son fijadas con una mezcla de etanol:ácido acético 95:5 durante cinco minutos y posteriormente incubadas con albúmina sérica bovina al 3% en TBS, para bloquear la unión inespecífica de anticuerpos. El anticuerpo primario se incubó a una concentración de 2 μ g/mL, en presencia de 3% de albúmina sérica bovina, durante una hora. Transcurrido este tiempo, se realiza un lavado con TBS y se incuban las muestras con una dilución 1/400 de anticuerpo secundario (Alexa488 anti Mouse, DAKO) durante 1,5 horas.

P-Chk2

Para la detección inmunológica de la proteína Chk2 fosforilada en la treonina 68 se utilizó el anticuerpo comercial Phospho-Chk2 (Thr68) (Cell Signaling), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, las células, cultivadas en cubreobjetos, son lavadas con PBS y posteriormente fijadas y permeabilizadas con metanol, durante diez minutos a -20°C. Posteriormente, se elimina la autofluorescencia mediante incubación con 0,1% de borohidruro de sodio (Sigma) en TBS, durante cinco minutos. A continuación, los cubreobjetos son lavados en TBS y las células incubadas en tampón de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente, tras lo cual se incuban las muestras con una dilución 1/4 del anticuerpo primario en TBS suplementado con 1% de albúmina sérica bovina. Transcurrido ese tiempo, se lavan las muestras con TBS y se incuban durante 1,5 horas con una dilución 1/400 de anticuerpo secundario (Alexa555 anti Rabbit, DAKO) en TBS suplementado con albúmina sérica bovina.

Tampón de bloqueo:

10% Suero de caballo
1% BSA
1x PBS

Todas las imágenes fueron adquiridas en un microscopio Zeiss Observer (Carl-Zeiss), utilizando el programa informático AxioVision Release 4.7.1.

f) Determinación de la actividad luciferasa in vitro

La determinación de la actividad de la enzima luciferasa en extractos celulares se realizó utilizando el sistema comercial Luciferase Assay System (Promega), basado en la reacción de oxidación dependiente de ATP y cationes magnesio divalentes del reactivo Luciferina. Dicha reacción es catalizada por la enzima Luciferasa de luciérnaga y como producto de la reacción se genera Oxiluciferina, AMP, pirofosfato, dióxido de carbono y se libera luz, fenómeno conocido con el nombre de quimioluminiscencia. Esta

luz emitida puede ser cuantificada y es directamente proporcional a la cantidad de enzima presente en el extracto.

Los extractos celulares se obtuvieron utilizando tampón de lisis Reporter Lysis Buffer (Promega), congelando a -80°C y posteriormente descongelando hasta alcanzar temperatura ambiente, produciendo así la lisis de las células. A partir de $10\ \mu\text{L}$ de extracto se midió la actividad luciferasa mediante el agregado del reactivo *Luciferine* (Firefly Luciferase Assay Kit, Promega) y posterior cuantificación de la luz emitida en un luminómetro Orion Microplate Luminometer (Berthold Detection Systems). Los resultados se normalizaron con la concentración de proteínas del extracto y se expresaron como RLU (del inglés *Relative Luciferase Units*) / μg de proteína.

3.4 Técnicas relacionadas con la manipulación de vectores adenovirales

a) Generación

Para la generación del vector adenoviral AdTat8TK-shBcl2 se utilizó el protocolo descrito por el grupo del Dr Vogelstein (He, Zhou et al. 1998). Este protocolo consiste en tres pasos. Primero, el clonaje de la secuencia de interés en el plásmido pShuttle, que contiene regiones de homología con el genoma adenoviral. Segundo, la generación del plásmido que contiene el genoma adenoviral, incluyendo la secuencia insertada, mediante recombinación homóloga entre el plásmido pShuttle linealizado y el plásmido denominado *backbone* que contiene el genoma viral. La recombinación se realiza mediante cotransformación de los plásmidos en la cepa BJ5183 de *Escherichia coli*. Tercero, la generación de partículas virales mediante la transfección del plásmido recombinante en células de la línea HEK 293. Al tratarse de un adenovirus no replicativo, el genoma viral utilizado para generar el AdTat8TK-shBcl2 carece de un gen E1A funcional, de manera que la amplificación del mismo debe realizarse en una línea celular capaz de complementar la función deficiente. La línea HEK 293, derivada de células de riñón embrionario humano, expresa el gen exógeno E1A de manera estable, permitiendo así la activación

transcripcional de los genes necesarios para la replicación viral. A continuación se describe cada uno de los pasos.

- Recombinación homóloga en células *E. coli*, cepa BJ5183

Para la generación de los genomas recombinantes de vectores adenovirales, se utilizó la cepa BJ5183 de *E. coli* (Stratagene). Esta cepa expresa las enzimas necesarias para producir la recombinación homóloga entre el genoma adenoviral y el fragmento clonado en el plásmido lanzadera pShuttle-CMV.

Las bacterias fueron cultivadas en medio líquido de Luria-Bertani (LB) o bien en medio sólido LB-Agar, suplementados con el correspondiente anticuerpo para cada marcador de selección.

LB:

10 g/L de triptona
5 g/L de extracto de levadura
5 g/L de NaCl

LB-Agar:

1x LB
1,5% (p/v) agar

Antibióticos utilizados:

50 mg/L de ampicilina
o 30 mg/L de kanamicina

En un tubo *eppendorf* se mezclaron 5 μ L del plásmido pShuttle-CMV-Tat8tk-shBcl2 (Kn+) linearizado (por digestión con *PmeI*) con 100ng de plásmido *backbone* (p3602, Ap+), en hielo. A continuación, se agregaron 20 μ L de células electrocompetentes BJ5183 (Stratagene) y se colocó la muestra en una cubeta de electroporación de 0,2 cm de diámetro. Para inducir la incorporación del ADN por parte de las células bacterianas, se aplicó un pulso eléctrico utilizando un electroporador (Gene Pulser II System, Bio-Rad) siguiendo las condiciones que se describen a continuación:

200 Ω de resistencia
25 μ F de capacitancia

2,5 KV de voltaje

Inmediatamente después del pulso eléctrico, se agregaron 500 μ L de LB en la cubeta y se recogió toda la mezcla en un tubo. Se incubó a 37°C en agitación durante una hora y posteriormente se plaqueó todo el volumen en placas de petri con medio LB-Agar, suplementado con kanamicina. Durante el proceso de recombinación homóloga, el gen de resistencia a ampicilina presente en el plásmido *backbone* es escindido, de manera que el plásmido resultante sólo posee el gen de resistencia a kanamicina, proveniente del plásmido pShuttle-CMV. Así, mediante cultivo en medio suplementado con kanamicina se espera seleccionar aquellas bacterias en las que se haya producido correctamente la recombinación. Tras una noche de incubación a 37°C, se aislaron las colonias producidas y se generaron cultivos en 3mL de LB-Kn. Con el fin de evitar múltiples recombinaciones, el cultivo en medio líquido proveniente de las colonias aisladas no debe prolongarse más de 16 horas. Así mismo, una vez aislado el ADN plasmídico mediante una minipreparación realizada a partir de los cultivos en medio líquido, y habiendo seleccionado los plásmidos recombinantes en función de sus patrones de restricción, se transformaron los plásmidos en bacterias de la cepa JM109, carente de Recombinasa A. Los cultivos de JM109 fueron utilizados para realizar una maxipreparación del plásmido recombinante, denominado pAdTat8TK-shBcl2. La presencia del transgén Tat8TK y de la secuencia codificante para el ARN en horquilla con especificidad para Bcl-2 fueron confirmadas mediante secuenciación directa.

A continuación se realizó una transfección mediante precipitación con fosfato cálcico del plásmido pAdTat8TK-shBcl2, previamente linearizado mediante digestión enzimática con *PacI*. Las células transfectadas fueron mantenidas en cultivo hasta la observación de efecto citopático producido como consecuencia de la replicación del adenovirus.

b) Amplificación

La observación mediante microscopio óptico de la presencia de efecto citopático en el cultivo se utilizó como criterio para decidir el

tiempo de cultivo, de las células infectadas, hasta su recolección y preparación de extractos que serán utilizados en infecciones subsecuentes. En este punto, se obtiene la máxima cantidad de partículas virales en el interior de las células, justo antes de que se produzca la lisis celular y la liberación de las partículas virales. Las células recogidas con la ayuda de un *scraper* son sometidas a tres ciclos de congelación/descongelación con el objetivo de lisar las células y liberar las partículas virales. Tras una centrifugación de diez minutos a 2000rpm, se recoge el sobrenadante, y se descarta el precipitado de debris celular.

El protocolo para la amplificación viral establece que a partir del primer extracto se realice una primera amplificación en células 911, a partir de las cuales se obtendrá un segundo extracto que será utilizado para inocular un mayor número de células HEK 293 (un total de 30 placas de 150mm de diámetro, a un 80% de confluencia). En el caso particular del adenovirus AdTat8TK-shBcl2, sin embargo, debido a la detección de adenovirus con capacidad de replicación (E1A+) generados durante este proceso, el protocolo original fue modificado para obviar el primer paso de infección y así disminuir las probabilidades de que ocurra una recombinación homóloga que le permita al adenovirus adquirir el gen E1A de las células empaquetadoras. Para el resto de los adenovirus utilizados en este trabajo, se utilizó el protocolo completo de amplificación.

Una vez acabadas las rondas de amplificación, se recogieron las células al observarse efecto citopático completo en el cultivo y se separó el pellet celular del medio de cultivo antes de la lisis por congelación/descongelación. En este caso se descartó el sobrenadante y se conservó el pellet de células infectadas el cual, tras ser sometido a los tres ciclos de congelación/descongelación, fue centrifugado para separar la suspensión viral del debris celular. Al sobrenadante recogido de esta centrifugación se lo denominó “extracto crudo”.

c) Purificación

Para obtener un *stock* adenoviral completamente libre de restos celulares, se sometió el extracto crudo a un paso de purificación por

ultracentrifugación preparativa en gradiente de cloruro de cesio (CsCl, Calbiochem), según el protocolo descrito por Becker *et al* (Becker, Noel et al. 1994). Brevemente, se preparan tres soluciones de CsCl de densidades 1,5g/mL; 1,35g/mL y 1,25g/mL, respectivamente. Tras esterilizar las soluciones mediante filtración al vacío a través de filtros con un diámetro de poro igual a 0,22µm (Stericup, Millipore) se prepara un gradiente discontinuo agregando secuencialmente 0,5mL de la solución de 1,5g/mL de densidad; 3mL de la solución de 1,35g/mL y finalmente 3mL de la solución de 1,25g/mL. Por encima de la tercera capa del gradiente se agrega hasta 5,5 mL de extracto crudo. En caso de agregarse una cantidad de extracto crudo inferior a 5,5mL se completa el volumen con PBS enriquecido (PBS++). La aplicación de cada una de las soluciones de CsCl, así como la aplicación del extracto crudo y del PBS++, debe realizarse gota a gota, evitando que se mezclen las fases.

A continuación se centrifugan las muestras según las siguientes condiciones:

Velocidad = 35.000rpm

Temperatura = 15°C

Tiempo = 1,5 horas

Aceleración y desaceleración = mínimas

Tras la ultracentrifugación, se observa una capa superior turbia y de color amarillento correspondiente a los restos celulares y, por debajo, el gradiente de CsCl. Los adenovirus tienen una densidad estimada ligeramente menor a 1,35g/mL, por lo que al ser ultracentrifugados en estas condiciones se separará de los restos celulares y se localizará en forma de banda blanquecina en la interfase entre las dos capas superiores de CsCl. Por encima de ésta, se observa una segunda banda, más tenue, correspondiente a formas inmaduras de virus. Esta segunda banda deberá ser descartada junto con los restos celulares. A continuación se recoge la banda inferior de virus, perforando la pared del tubo con una aguja y aspirando con una jeringa, o bien retirando cuidadosamente las capas superiores y recogiendo con una pipeta automática. En cualquier caso, se debe recoger la banda de virus en el menor volumen posible de líquido.

La banda recogida se diluye en CsCl 1,35g/mL y se somete a una segunda ultracentrifugación en las mismas condiciones que la

primera, pero extendiendo la duración a 18-20 horas. Esta segunda centrifugación permite una mejor separación de la banda correspondiente a formas inmaduras de virus, facilitando así la obtención de un *stock* adenoviral de mayor pureza. Se recoge la banda inferior correspondiente al adenovirus y se procede a su desalación.

Para la purificación de todos los adenovirus utilizados en este trabajo se emplearon tubos Ultra-Clear^R (14 x 89 mm, Beckman) en un rotor SW 41 Ti (Beckman). Se utilizó una ultracentrífuga preparativa Optima LK-100 (Beckman).

PBS++:

PBS 1x, pH 7,3
0,68 mM CaCl₂
0,5 mM MgCl₂

PBS 1x, pH 7,3:

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM Na₂HPO₄
1,4 mM KH₂PO₄

d) Desalado del *stock* viral

El CsCl fue eliminado de la suspensión adenoviral mediante cromatografía por exclusión molecular en columnas PD-10 (GE Healthcare) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, equilibrando la columna con PBS++. Se recogieron fracciones de 500 µL y se determinó la presencia de virus en cada una de ellas mediante la medición de la densidad óptica a 260nm tras haber procesado una muestra de cada fracción como se indica en el apartado siguiente. Las fracciones que contenían virus fueron reunidas y se les agregó un 10% (v/v) de glicerol, con el fin de minimizar los efectos del proceso de congelación/descongelación sobre el título viral del *stock*.

e) Titulación del *stock* viral

Para la realización de los experimentos documentados en la presente memoria se utilizó el número de partículas virales (vp, del acrónimo en inglés de *viral particles*) como medida de cantidad de virus y las unidades derivadas de dosis viral (vp/cell) o concentración (vp/mL). La determinación del número de partículas virales se realizó mediante la cuantificación de la densidad óptica del ADN viral en una dilución del *stock* purificado, previo tratamiento con un tampón que contiene dodecil-sulfato sódico (SDS), para la solubilización de las proteínas de la cápside viral.

Brevemente, se prepara una dilución del *stock* adenoviral en el tampón de SDS y se incuba diez minutos a 56°C. Posteriormente, se centrifuga treinta segundos a 10.000 rpm y se mide la densidad óptica del sobrenadante a 260 nm. A partir de la densidad óptica del ADN viral se puede calcular el número de partículas virales mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{Adv}] = \text{DO}_{260} \times \text{factor de dil.} \times 1,1 \times 10^{12}$$

donde,

[Adv] = concentración del adenovirus expresada en vp/mL

DO₂₆₀ = densidad óptica de la solución medida a 260 nm

Adicionalmente, se mide la densidad óptica de la solución a 280 nm. La relación entre la densidad óptica a 260 nm y la densidad óptica a 280 nm es una medida de la calidad del *stock* viral, siendo óptima una relación cercana a 1,2.

Este procedimiento se utilizó tanto para la titulación del *stock* como para la determinación de la presencia de adenovirus en las fracciones de la columna de desalación, variando solamente en la composición del “blanco”, siendo de glicerol al 10% (v/v) en el primer caso y PBS++ en el segundo.

Además del título de partículas virales medido por densidad óptica, se calculó el número de partículas con capacidad infectiva (TU, del acrónimo en inglés de *Transducing Units*). La técnica utilizada se basa en la detección de células que, tras ser infectadas, expresan la proteína viral del hexón. Si la suspensión de virus utilizada para infectar la monocapa de células es lo suficientemente diluida como para que una célula sólo sea infectada por un virión, entonces

contando el número de células que producen la proteína viral podremos calcular en número de viriones infectivos o TU que había en el volumen de suspensión utilizada para infectar, y en el *stock* viral. La detección de células que expresan la proteína hexón se realiza mediante inmunofluorescencia, utilizando el sobrenadante de un hibridoma productor de un anticuerpo monoclonal con especificidad para la proteína del hexón (sobrenadante cedido gentilmente por el Dr Ramón Alemany).

Brevemente, se siembran las células HEK293 a razón de 5×10^4 células por pocillo (en placa de 96 pocillos) conjuntamente con 100 μ L de una dilución viral. Se realizan las infecciones con diluciones seriadas de virus, normalmente con un factor de dilución entre 10^6 y 10^{12} , y se cultivan durante 12-16 horas. Al cabo de este tiempo, las células son lavadas con PBS⁺⁺ suplementado con 1% BSA, y fijadas con metanol a -20°C durante veinte minutos. Posteriormente se incuban las células con una dilución 1/3 de sobrenadante de hibridoma en PBS⁺⁺ a 37°C durante una hora y media. A continuación se lava con PBS⁺⁺ y se incuba durante dos horas en oscuridad con el anticuerpo secundario específico para inmunoglobulinas de ratón, conjugado con Alexa488. Las células con tinción positiva se cuentan en un microscopio de fluorescencia invertido y se calcula el número de TU según la siguiente fórmula:

$$[\text{Adv}] = n \times \text{factor de dil.} \times 1000 \times 1/100$$

donde,

[Adv] = concentración del adenovirus expresada en TU/mL

n = células verdes por pocillo

f) Almacenamiento

Los *stocks* virales fueron almacenados a -80°C en PBS⁺⁺ con 10% (v/v) de glicerol. Se fracciaron en alícuotas pequeñas para evitar la necesidad de congelar y descongelar repetidas veces la misma alícuota.

3.4 Técnicas relacionadas con la manipulación de células eucariotas

a) Líneas celulares derivadas de cáncer de páncreas

NP-9: línea celular derivada de una metástasis peritoneal de adenocarcinoma pancreático humano (Reyes, Villanueva et al. 1996).

NP-18: línea celular derivada de una metástasis hepática de adenocarcinoma pancreático humano (Reyes, Villanueva et al. 1996).

NP-31: línea celular derivada de un tumor pancreático primario moderadamente diferenciado (Reyes, Villanueva et al. 1996).

BxPC-3: línea celular derivada de adenocarcinoma pancreático humano (ATCC N° CRL-1687).

MIA PaCa-2: línea celular derivada de adenocarcinoma pancreático humano (ATCC N° CRL-1420).

PANC-1: línea celular derivada de carcinoma ductal pancreático humano (ATCC N° CRL-1469).

RWP-1: línea celular derivada de una metástasis hepática de carcinoma ductal de páncreas humano (Dexter, Matook et al. 1982).

b) Otras líneas celulares utilizadas

HEK 293: línea celular humana derivada de tejido epitelial de riñón embrionario, transformadas con el gen adenoviral E1A.

HEK 293T: células de la línea HEK 293 modificadas para expresar constitutivamente el antígeno T del virus SV40.

911: línea celular derivada de retinoblastos embrionarios humanos transformados con el gen adenoviral E1A.

IMR90: línea celular derivada de fibroblastos de pulmón humanos

A549: línea celular derivada de carcinoma pulmonar humano. ATCC N° CCL-185.

Lás líneas celulares NP-9, NP-18 y NP-31 fueron generadas por implantación de muestras tumorales humanas en el tejido subcutáneo de ratones inmunodeficientes, en el Laboratorio de Investigación Gastrointestinal del Servicio Digestivo del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona (Reyes, Villanueva et al.

1996). Las células de la línea RWP-1 fueron cedidas amablemente por el Dr Francisco X Real; la línea HEK 293 fueron cedidas por el Dr Ramon Alemany, las células HEK 293T fueron cedidas por la Dra Susana de la Luna y las demás líneas fueron adquiridas directamente de la ATCC.

c) Condiciones de cultivo

Todas las células utilizadas en este trabajo se cultivaron en medio de cultivo suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO, Invitrogen), penicilina 100 U/mL y estreptomycin 100 µg/mL (GIBCO, Invitrogen). Las líneas HEK 293, HEK 293T, NP-9, BxPC-3, MIA PaCa-2, PANC-1, RWP-1, A549, IMR90 y 911 se cultivaron en medio DMEM (GIBCO, Invitrogen), suplementado con L-glutamina 2 mM (GIBCO, Invitrogen). Las células de las líneas NP-18 y NP-31, sin embargo, fueron cultivadas en medio RPMI 1641 (GIBCO, Invitrogen). Los cultivos se mantuvieron a 37°C con una humedad relativa del 70-80% y un 5% de dióxido de carbono.

La manipulación de las líneas celulares se realizó en una cabina de bioseguridad de nivel 2, con flujo laminar vertical. Los residuos fueron inactivados con hipoclorito de sodio 20% antes de ser descartados como residuos de riesgo sanitario.

d) Propagación de células adherentes

Las células fueron mantenidas en placas de 10 centímetros de diámetro, en monocapa, hasta alcanzar un porcentaje de confluencia del 80%, momento en el que se procedía a la disgregación de la monocapa y a su separación de la placa mediante tratamiento con tripsina. Brevemente, se retira el medio de cultivo y se lava la monocapa con PBS 1x. A continuación se agrega tripsina-EDTA 1x (GIBCO, Invitrogen) y se incuba a 37°C durante 1-5 minutos, hasta que se observa la disociación de la monocapa por microscopía óptica. Para interrumpir la tripsinización, se agrega medio de cultivo completo (los inhibidores de tripsina presentes en el suero fetal bovino inactivan la tripsina) y se fracciona la suspensión

celular resultante en un ratio de entre 1:3 a 1:8, según la línea celular.

e) Congelación y descongelación de stocks

Para su almacenamiento a largo plazo, las líneas celulares se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido. Para evitar una disminución de la viabilidad celular en las muestras congeladas por la formación de cristales de agua, se utilizó un agente crioprotector (10% DMSO, Sigma-Aldrich, en suero fetal bovino) y se congelaron gradualmente. Para conseguir una disminución de temperatura de aproximadamente 1°C por minuto se introdujeron los crioviales en un recipiente con isopropanol y éste, a su vez, en un congelador de -80°C. Habiendo transcurrido al menos 4 horas, los crioviales fueron almacenados en un tanque de nitrógeno líquido.

Para la descongelación de líneas celulares se introdujeron los crioviales en un baño de agua a 37°C y se diluyó la suspensión celular en 10 mL de medio completo. Inmediatamente después, se centrifugaron las células durante 5 minutos a 800 x g para reemplazar el medio de cultivo por otros 10 mL de medio fresco. El objetivo de este proceso es minimizar el tiempo en que las células están expuestas al DMSO.

f) Recuento de células

El número de células se realizó en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) con tinción de azul de tripano (Sigma) para la discriminación entre células viables y no viables. El azul de tripano es expulsado de las células viables pero es retenido en células muertas, que se observarán teñidas de color azul al microscopio óptico. Para el recuento de células se carga por capilaridad una gota de suspensión celular en la cámara y se cuentan las células presentes en cada uno de los 4 cuadrantes divididos en 16 cuadrados de 0,25 mm x 0,25 mm. La concentración de células en la suspensión se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{células}] = n \times \text{FD} \times 10^4$$

donde,

[células] = número de células por mililitro de suspensión

FD = factor de dilución

n = promedio de número de células en cada cuadrante

Alternativamente, se utilizó un contador celular automático Coulter Z2 (Beckman). La técnica se basa en el aumento de resistencia eléctrica entre dos electrodos que se genera al pasar una partícula (célula) a través del orificio que comunica los electrodos. La intensidad del pulso eléctrico que se genera es proporcional al volumen de la partícula, y el número de pulsos equivale al número de partículas que han atravesado el orificio. Al utilizar células adherentes, se procedió a tripsinizar los cultivos y se suspendieron las células en el tampón isotónico electrolítico Isoton^R (Beckman) y se cuantificaron las partículas con diámetro entre 8 μm y 24 μm . Esta medición no permite discriminar entre células viables y células no viables presentes en la suspensión, pero dado que las líneas utilizadas en este trabajo crecen adheridas a una placa, y que las células muertas se desprenden de la misma, asumimos que estas últimas se eliminarán al remover el medio de cultivo y durante el lavado con PBS 1x, por lo que en la suspensión a cuantificar sólo habrá células viables. Este postulado fue corroborado mediante comparación de métodos, observándose una buena correlación entre los resultados obtenidos con el conteo en hemocitómetro con colorante supravital y los obtenidos mediante conteo automatizado.

g) Determinación de la viabilidad celular

Para experimentos de dosis-respuesta en formato de placas de 96 pocillos se utilizó una técnica que permite estimar la viabilidad relativa de un cultivo, en función de la actividad metabólica de las células. El reactivo de Bromuro de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), soluble en medio acuoso, es reducido por enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial, que se encuentran activas solamente en células viables. El producto de la reacción es el compuesto azul de tetrazolio, que precipita en el interior de la célula y que puede ser solubilizado en DMSO. La densidad óptica de la solución resultante, medida a una longitud de

onda de 550 nm, será proporcional al número de células viables presentes en la muestra. Para llevar a cabo el experimento, se retira el medio de cultivo de las células y se agregan 100 μ L de MTT diluido en medio completo, a una concentración de 0,7 mg/mL. Se incuban las células en condiciones estándar de cultivo durante 20-30 minutos y luego se remueve la solución de MTT en medio de cultivo, para disolver el precipitado con 100 μ L de DMSO por cada pocillo. Durante este trabajo, se cuantificó la densidad óptica de las soluciones de azul de tetrazolio utilizando un espectrofotómetro de placa (Versamax Microplate Reader^R). El valor de absorbancia de las muestras que no habían recibido tratamiento se consideró equivalente al 100% de viabilidad, siendo los demás valores de viabilidad referenciados a éste.

h) Cuantificación de células apoptóticas

El porcentaje de células apoptóticas se cuantificó mediante una técnica de citometría de flujo basada en la detección de la externalización de fosfatidil-serina. Un aumento en la exposición de este fosfolípido en la cara externa de la membrana plasmática correlaciona con la inducción de apoptosis, desde fases tempranas. Así, aprovechando la afinidad de la molécula anexinaV por la fosfatidil-serina, es posible detectar células apoptóticas utilizando una molécula de AnexinaV conjugada con el fluorocromo FITC (istotiocianato de fluoresceína) y analizando la intensidad de fluorescencia de cada célula mediante citometría de flujo. Para el marcaje de las células se utilizó el producto comercial (Molecular Probes), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La adquisición de los datos se realizó en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson) del servicio de citometría de flujo de la Universitat Pompeu Fabra.

i) Análisis de ciclo celular

El análisis de los perfiles de ciclo celular se realizó cuantificando el contenido de ADN de las células, mediante tinción con Hoechst 33342 (Sigma) y posterior análisis por citometría de flujo. El colorante Hoechst 33342 se une selectivamente al ADN,

intercalándose en el surco menor de la doble hélice, y emite luz visible a una longitud de onda de 483 nm cuando se hace incidir un haz de luz ultravioleta a una longitud de onda 343 nm. La naturaleza lipofílica de este compuesto hace posible la tinción de células sin necesidad de permeabilizarlas previamente, pudiéndose realizar tanto la tinción como la cuantificación del contenido de ADN utilizando células viables.

Brevemente, se tripsinizan las células a analizar y se resuspenden en medio de cultivo completo suplementado con Hoechst 33342 a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$, para ser incubadas a 37°C durante una hora. Transcurrido este tiempo, se analizan las muestras en un citómetro de flujo con una fuente de luz ultravioleta. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia de cada evento (célula) permite la generación de un histograma de frecuencia en el que se grafica el número de células que presenta una determinada intensidad. Dado que la intensidad de dicha fluorescencia es proporcional al contenido de ADN celular, y que éste varía de acuerdo a la fase del ciclo celular, se puede interpretar el histograma como la distribución del contenido de ADN celular en el cultivo analizado. Así, en un histograma típico se puede identificar un pico correspondiente a las células en fase G0/G1 del ciclo celular (contenido de ADN = n), un segundo pico a una intensidad de fluorescencia aproximadamente dos veces superior al primer pico, correspondiente a las células en fase G2/M (contenido de ADN = $2 \times n$) y un valle entre los picos, correspondiente a las células que están sintetizando ADN, es decir, en fase S (contenido de ADN intermedio).

Los datos fueron adquiridos en un citómetro LSR (Becton Dickinson) utilizando el programa informático Cell Quest™ v3.3 (Becton Dickinson), en el Servicio de Citometría de Flujo de la Universitat Pompeu Fabra. Los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular fueron calculados utilizando el programa informático ModFit 3.0 (LTTM Software).

j) Transfección transitoria de ADN plasmídico

-Precipitación con fosfato cálcico

La técnica se basa en la captación, por parte de las células eucariotas, del precipitado de fosfato cálcico y ADN formado al mezclar una solución tamponada que contiene aniones fosfato (*HEPES Buffered Solution*, HBS) con una solución de cloruro cálcico que contiene el ADN a transfectar. El protocolo utilizado incluía, además, el tratamiento previo de las células con cloroquina, para inhibir la actividad de las enzimas DNAsas lisosomales, impidiendo así su degradación en endosomas secundarios.

Brevemente, se retira el medio de cultivo y se reemplaza por medio fresco suplementado con cloroquina (Sigma) a una concentración final de 25 μM . A continuación, se prepara la mezcla de ADN y CaCl_2 (Sigma) en un tubo de polipropileno:

5-10 μg de ADN
439 μL de agua destilada
61 μL de CaCl_2 2M

Tras homogeneizar la mezcla se agregan, gota a gota, 500 μL de HBS 2x, al tiempo que se burbujea la mezcla con una pipeta pasteur y un pipeteador automático, con el objetivo de favorecer la formación de cristales pequeños de fosfato cálcico. La mezcla resultante se agrega a las células gota a gota y se mantienen éstas en cultivo en presencia del precipitado durante 16 horas (excepcionalmente, en la transfección de células HEK 293 con el genoma del virus AdTat8TK-shBcl2, se mantuvo el precipitado durante sólo 6 horas). Transcurrido este tiempo, se remueve el medio de cultivo, se realiza un lavado con PBS 1x y se agrega medio fresco.

Tampón HBS 2x:

50 mM HEPES (Sigma)
10 mM KCl (Sigma)
12 mM D-Glucosa (Sigma)
280 mM NaCl (Sigma)
1,5 mM Na_2HPO_4 (Sigma)

Se prepararon al menos tres soluciones de diferentes pH, entre 6,9 y 7,1; se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -20°C hasta el momento de utilización. Cada vez que se preparó el tampón, se evaluó la eficiencia de transfección de cada una de las soluciones con distintos pH, para escoger aquella que presentaba la mayor eficiencia.

-Transfección con lípidos catiónicos

Se utilizó, alternativamente, el kit comercial Lipofectamine 2000™ en combinación con PLUS™ Reagent (Invitrogen) en medio de cultivo Opti-MEM™ (Invitrogen), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La técnica se basa en la asociación de las moléculas de ADN a un polímero cargado positivamente, que favorece la interacción del ADN con la membrana plasmática de las células a transfectar, facilitando su internalización (Felgner, Gadek et al. 1987). Brevemente, para transfectar una placa de 60 mm de diámetro se prepararon las siguientes mezclas:

Mezcla A:

3 µg de ADN plasmídico
300 mL de Opti-MEM™ sin suero y sin antibióticos
18 µL de PLUS™ Reagent

Mezcla B:

12 µL de Lipofectamine 2000™
300 µL de Opti-MEM™

La Mezcla A se deja reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos y a continuación se le agrega la Mezcla B. La mezcla resultante se incuba otros 15 minutos a temperatura ambiente y, transcurrido este tiempo, se le agregan 2,4 mL de Opti-MEM™, se homogeniza y se agregan el volumen total a las células a transfectar. La mezcla de transfección se mantiene 12 horas y luego se reemplaza por medio fresco.

k) Análisis de la síntesis de ADN en células en cultivo

El análisis de la síntesis de ADN se realizó utilizando el kit comercial Click-iT™ EdU Flow Cytometry Assay (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. La técnica se basa en la incorporación de un análogo de timidina (EdU, 5-etinil-2'-deoxiuridina) en el ADN sintetizado *de novo* y su posterior marcaje con una tinta fluorescente (Alexa Fluor® 488) que permitirá su detección mediante técnicas de citometría de flujo. El marcaje se realiza mediante una reacción covalente, catalizada por cationes cobre divalentes, entre un grupo alquino presente en el análogo nucleosídico y un grupo azida presente en el colorante fluorescente. La tinción con un segundo colorante (Click-iT™ CellCycle 488-Red, $\lambda_{\text{excitación}} = 546 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 647 \text{ nm}$) permite el análisis concomitante del perfil de ciclo celular, pudiendo identificar en qué fase se del ciclo se encuentran las células marcadas con Click-iT™ EdU. Para la realización de los experimentos detallados en esta memoria, se incubaron las células en presencia del análogo nucleosídico durante períodos de 24 horas y posteriormente se fijaron y permeabilizaron las células para proceder al marcaje siguiendo estrictamente el protocolo proporcionado por la casa comercial. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson) utilizando el programa informático Cell Quest™ v3.3 (Becton Dickinson), en el Servicio de Citometría de Flujo de la Universitat Pompeu Fabra.

l) Tratamiento con fármacos y análisis de interacción

Para realizar los tratamientos con 7-hidroxistaurosporina o UCN-01 (Sigma-Aldrich), se disolvió la droga en DMSO a una concentración de 300 μM (1000x) y se almacenaron alícuotas a -20°C. Posteriormente, se le agregó al medio de cultivo de las células el volumen necesario para que la concentración final fuese de 300 nM, o bien un volumen idéntico de DMSO a modo de control negativo. Para el análisis de combinación de fármacos, las células fueron tratadas con dosis crecientes de UCN-01. Tras construir curvas dosis-respuesta para cada uno de los tratamientos por separado (UCN-01 y TK/GCV), y en combinación, se calcularon

los valores del índice de combinación mediante la siguiente fórmula (Chou and Talalay 1984):

$$CI = (D_{1,2} / D_1) + (D_{2,1} / D_2)$$

donde,

CI = índice de combinación, para una dada fracción de inhibición de viabilidad (FI)

$D_{1,2}$ = la dosis del fármaco 1 necesario para producir una dada FI cuando es administrado en combinación con el fármaco 2

D_1 = la dosis de fármaco 1 necesario para producir una dada FI cuando es administrado individualmente

$D_{2,1}$ = la dosis del fármaco 2 necesario para producir una dada FI cuando es administrado en combinación con el fármaco 1

D_2 = la dosis de fármaco 2 necesario para producir una dada FI cuando es administrado individualmente

Las dosis de los fármacos (administrados individualmente o en combinación) para cada nivel de inhibición pueden calcularse a partir de la ecuación de Hill, utilizando el coeficiente de Hill y el valor de ID50 estimados mediante regresión no lineal (Ver apartado 8)

3.5 Técnicas relacionadas con la manipulación de animales de experimentación

Los experimentos descritos en este trabajo se han realizado de acuerdo con los procedimientos aprobados por el correspondiente Comité de Experimentación Animal (CEEA) del PRBB, cumpliendo con la normativa establecida por las directrices de la Comunidad Europea 2003/65/CE para el apropiado cuidado y uso de animales con fines de investigación.

a) Animales utilizados

Se utilizaron ratones atímicos de la cepa Balb/C nu/nu de sexo masculino y de entre 4 y 5 semanas de edad (Charles River).

b) Estabulación

Los animales fueron mantenidos en condiciones estériles, estabulados en jaulas ventiladas con aire filtrado y manipulados en campanas de flujo laminar. Así mismo, las jaulas, la viruta y el agua fueron esterilizadas mediante autoclave y la comida, mediante rayos gamma.

Durante los experimentos, los animales fueron sometidos a una dieta ordinaria de laboratorio, con acceso a agua y comida *ad libitum*. La temperatura se mantuvo controlada entre 22-24°C y se les aplicó un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas.

c) Generación de tumores subcutáneos (xenoinjertos) en ratones atímicos

Para el análisis *in vivo* de los efectos antitumorales de los diferentes tratamientos estudiados se utilizó un modelo de tumores subcutáneos generados a partir de una suspensión de células tumorales pancreáticas humanas, inyectada por vía subcutánea. La línea celular utilizada para la generación de los xenoinjertos fue BxPC-3. Brevemente, las células se cultivan *in vitro* hasta obtener cantidad suficiente. Para evitar la inducción de senescencia y/o apoptosis de las células a inyectar, los cultivos no deben superar el 70-80% de confluencia. Por tratarse de células adherentes, se remueven las células de la placa de cultivo mediante tripsinización, se resuspenden en solución fisiológica (0,9% NaCl, Braun), y se cuentan las células viables mediante tinción con un colorante supravital (Azul de tripano), en cámara de Neubauer. A continuación, se inyectan 3×10^6 células en el tejido subcutáneo de los animales utilizando una aguja de 29gauge. A cada ratón se le inyectan células en los dos flancos anteriores o posteriores, según el experimento.

d) Medida del tamaño y seguimiento del crecimiento tumoral

El volumen de los tumores se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$V = a^2 \times b \times \pi/6$$

donde,

V = volumen del tumor en milímetros cúbicos

a = diámetro inferior

b = diámetro superior

La medición de los diámetros se realizó utilizando un calibre digital (Digitronic Caliper 110-15DDL, Wilson Wolpert) cada dos días.

e) Administración de fármacos

La administración de la droga ganciclovir (Cimevene) se realizó por vía intraperitoneal, a una dosis de 100 mg/kg.

f) Administración de vectores virales

Los animales fueron tratados con adenovirus por inyección intratumoral, recibiendo una dosis diaria de 1×10^{10} partículas virales, en un volumen de hasta 20 μL , distribuidos en dos inyecciones. Para tal fin, se utilizó una jeringa Hamilton de 10 μL de capacidad con una aguja de 25 mm de longitud y 33 G.

g) Tomografía por emisión de positrones (PET)

La tomografía por emisión de positrones se basa en la detección de los fotones emitidos (simultáneamente y en direcciones opuestas) como consecuencia de la colisión de un positrón, emitido por un radionúclido, con un electrón. Mediante el uso de algoritmos matemáticos se puede calcular el punto de origen de la radiación y situarlo en un eje de coordenadas tridimensionales. Cuando el radionúclido forma parte de una molécula con actividad biológica, puede usarse a modo de radiotrazador para localizar procesos biológicos en un organismo vivo.

En este trabajo se utilizó [^{18}F]FEAU, un sustrato de la enzima timina quinasa del virus *Herpes simplex*, a modo de trazador. Este compuesto es capaz de incorporarse en las moléculas de ADN

sintetizadas *de novo* tras haber sido fosforilado por la enzima viral, produciendo la retención del mismo (y por consiguiente una acumulación del radionúclido ^{18}F) en tejidos que expresan dicha enzima. Así, la molécula [^{18}F]FEAU puede ser utilizada para la localización y cuantificación de la actividad enzimática de la timidina quinasa viral.

Los experimentos de tomografía por emisión de positrones fueron realizados en colaboración con el Departamento de Preclínica e Imagen Animal del *Institut d'Alta Tecnologia* del PRBB (IAT-PRBB), a cargo de la Dra Olga Millán. Las imágenes fueron adquiridas en un tomógrafo para roedores microPET R4 (Concorde Microsystems). El radiotrazador [^{18}F]FEAU fue sintetizado en el Departamento de Radioquímica del IAT-PRBB.

Los animales fueron inyectados con 1,85-3,7MBq (50-100 μCi) de [^{18}F]FEAU por vía intravenosa y las imágenes fueron adquiridas al menos 2 horas más tarde. El tiempo de adquisición fue de 12,5 minutos.

3.6 Análisis estadístico de los datos

a) El análisis de categorías sobrerrepresentadas en los experimentos de hibridación en *microarrays* fueron realizados mediante el programa informático EASE (*Expression Analysis Systematic Explorer*) (Hosack, Dennis et al. 2003) e IPA (*Ingenuity Pathway Assist*[®], Ingenuity Systems Inc).

b) Los análisis de comparación de medias fueron realizados mediante el programa informático SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), aplicando una prueba no paramétrica basada en el estadístico U de Mann-Whitney.

c) Los análisis por regresión no lineal para la construcción de curvas dosis-respuesta, así como el cálculo de los valores de ID50 y su error estándar (SE), fue realizado mediante análisis iterativo basado en la ecuación de Hill, utilizando el software GraFit v3.0 (Erithacus Software).

Ecuación de Hill (modificada):

$$\% \text{ Viabilidad} = (V_{\max} \times D_x^h) / (ID50^h + D_x^h)$$

donde,

V_{\max} = viabilidad máxima del sistema (100%)

D_x = dosis del fármaco

h = coeficiente de Hill

ID50 = dosis inhibitoria del 50%

d) El análisis estadístico de la expresión relativa de genes fue realizado mediante una prueba de remuestreo utilizando la herramienta REST[®] (Relative Expression Software Tool)(Pfaffl 2001; Pfaffl, Horgan et al. 2002).

e) Los análisis de comparación de curvas de crecimiento tumoral se realizaron mediante ANOVA para medidas repetidas, utilizando el programa informático SPSS.

f) Las funciones de supervivencia de los ratones sometidos a tratamientos antitumorales fueron estimadas mediante análisis de Kaplan-Meier, utilizando la prueba de log-rank para comparar las distribuciones de supervivencia para los diferentes tratamientos. Para ello se utilizó el programa informático SPSS.

RESULTADOS

"The true mystery of the world is the visible, not the invisible"

Oscar Wilde

4. RESULTADOS

4.1 Estudio de la citotoxicidad del tratamiento TK/GCV sobre células de cáncer de páncreas. Mecanismo de acción y factores determinantes de sensibilidad

a) Estudio de la sensibilidad al sistema TK/GCV en líneas celulares de cáncer de páncreas

Dosis Inhibitoria 50%

Con el objetivo de caracterizar la sensibilidad de un panel de líneas celulares derivadas de adenocarcinoma pancreático humano al tratamiento con TK/GCV, se realizaron estudios de dosis-respuesta tratando las células con dosis crecientes del vector adenoviral AdTK (entre 0 y 100000 vp/célula) y una concentración constante de ganciclovir (10 µg/mL). Para ello, se sembraron las células en placas de 96 pocillos a razón de 3000 células por pocillo. La infección se realizó durante 4 horas y posteriormente se inició el tratamiento con ganciclovir. Al cabo de 5 días de iniciado el tratamiento con la prodroga, se realizó el ensayo colorimétrico de MTT para determinar la viabilidad celular y calcular el valor de dosis inhibitoria del 50% (ID50) para cada línea celular. La ID50 equivale a la dosis viral necesaria para producir una inhibición del 50% en la viabilidad del cultivo celular, con respecto al control (dosis viral = 0, [GCV] = 10 µg/mL). Las líneas celulares estudiadas fueron clasificadas como sensibles o resistentes en función de sus valores de ID50, siendo los de las líneas resistentes entre 32 y 264 veces superiores a los de las líneas sensibles. Los valores de viabilidad en respuesta al tratamiento y la curva de regresión de cada línea se muestran en la figura 1A. La ID50 de cada línea, así como los límites del intervalo de confianza para el 99% se listan en la Tabla R1.

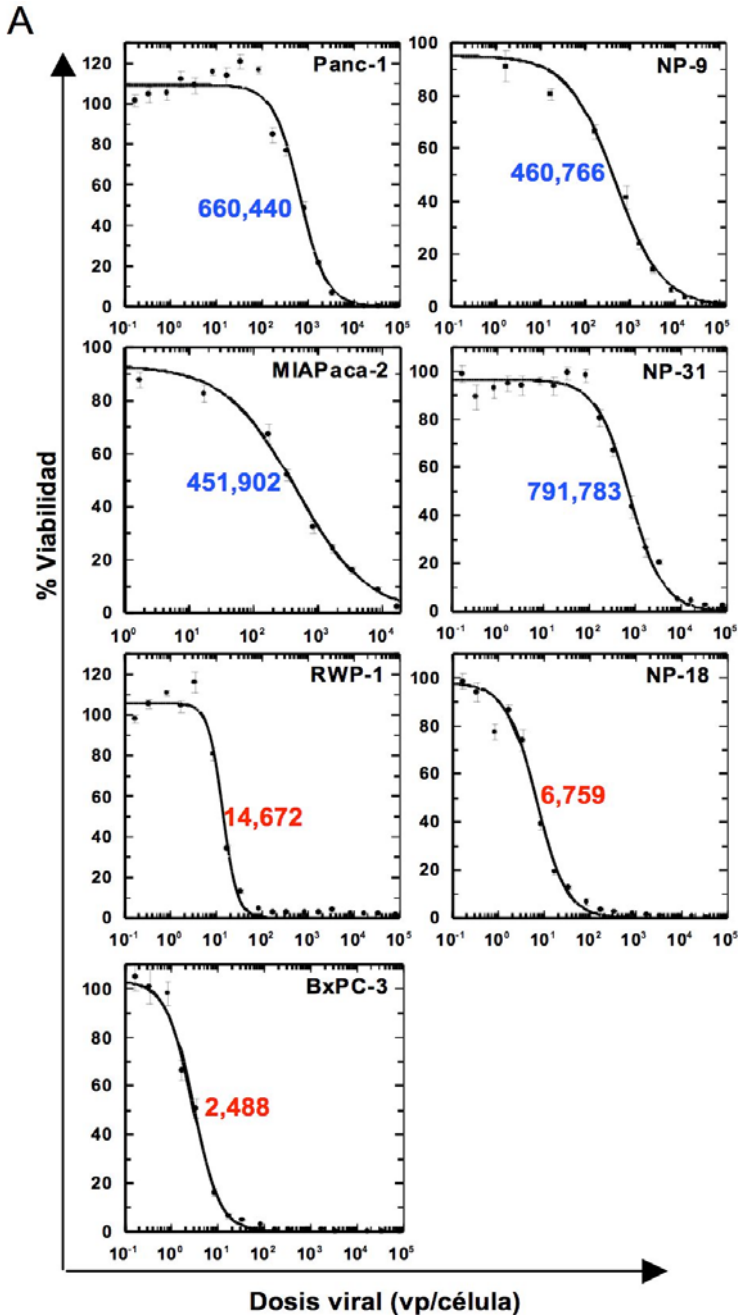


Figura 1. Sensibilidad a TK/GCV. A) Análisis dosis-respuesta de células derivadas de adenocarcinoma pancreático humano transducidas con AdTK a las dosis indicadas y tratadas con [GCV] = 10 µg/mL durante 5 días. La viabilidad celular fue cuantificada mediante la técnica de MTT y los valores fueron graficados como porcentajes con respecto a la viabilidad del cultivo con dosis viral = 0. Media de al menos 3 experimentos independientes +/- error estándar.

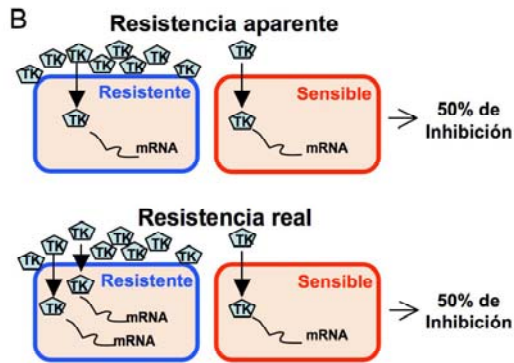


Figura 1 (cont.). Los valores de ID₅₀ para cada línea se indican en rojo o azul según se hayan clasificado como sensible o resistente, respectivamente. B) Si la diferencia de sensibilidad entre dos líneas celulares es sólo dependiente de la infectividad, la expresión de ARNm del gen terapéutico necesaria para obtener el mismo efecto inhibitorio será idéntica. Por el contrario, si existe una diferencia de sensibilidad independiente de la infectividad, serán necesarias más copias de ARNm del gen terapéutico para obtener el mismo efecto.

Tabla R1. ID₅₀ e intervalos de confianza del 99% para AdTK/GCV

| Línea celular | ID ₅₀ | C199% |
|---------------|------------------|-----------------------|
| NP-9 | 460,766 | (326,010 ; 595,522) |
| NP-31 | 761,783 | (607,471 ; 916,094) |
| MIAPaca-2 | 451,902 | (315,272 ; 588,532) |
| PANC-1 | 660,440 | (532,212 ; 788,667) |
| NP-18 | 6,759 | (5,825 ; 7,692) |
| BxPC-3 | 2,953 | (2,488 ; 3,417) |
| RWP-1 | 13,672 | (12,307 ; 15,036) |

Uno de los pasos limitantes en el proceso de infección adenoviral es el reconocimiento del dominio Knob de la fibra del adenovirus por parte de su receptor celular CAR. Es por ello que la infectividad de las diferentes líneas celulares está condicionada por los niveles de expresión de CAR en la membrana plasmática. Esta situación podría inducir falsas interpretaciones de los resultados de los experimentos de dosis-respuestas, en relación a la sensibilidad de las células al tratamiento. Puede darse el caso, por ejemplo, que una menor respuesta al tratamiento se deba a una menor entrada de virus al interior de la célula y, por consiguiente, una menor expresión de la enzima bioactivadora TK. (Fig 1 B). Para evaluar si las diferencias de respuesta se debían exclusivamente a una diferencia de infectividad se analizaron los niveles de expresión del ARN mensajero TK en cada una de las líneas, tras haberlas transducido

con una dosis viral equivalente a su ID50. Es decir, se analizaron mediante PCR en tiempo real los niveles relativos de transcrito del gen terapéutico TK que se necesita para producir, en cada línea celular, el mismo efecto citotóxico (inhibición del 50% en la viabilidad del cultivo). Tomando como referencia la expresión de TK en RWP-1, y asignándole arbitrariamente el valor de uno, observamos que todas las líneas resistentes necesitan expresar una mayor cantidad de transcrito TK para que se produzca una inhibición de la viabilidad del 50% (25,99 veces en NP-9, p -valor = 0,001; 7,41 veces en NP-31, p -valor = 0,001; 17,23 veces en MIAPaca-2, p -valor = 0,001; 34,42 veces en PANC-1, p -valor = 0,001). En las líneas sensibles, sin embargo, la expresión de una menor cantidad de transcrito TK es suficiente para producir dicha inhibición (0,50 veces en NP-18, p -valor = 0,001; 0,04 veces en BxPC-3, p -valor = 0,001), indicando que la diferencia en infectividad no explica totalmente las diferencias en sensibilidad y sugiriendo la presencia de mecanismos celulares capaces de producir estas diferencias.

Inducción de apoptosis

Se evaluó, mediante el análisis del clivaje de la proteína poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), la inducción de apoptosis en cada una de las líneas celulares estudiadas, cada una de ellas tratadas a una dosis viral equivalente a su ID50 y en presencia de ganciclovir, durante 5 días. PARP es una proteína de 113 kDa, susceptible de clivaje proteolítico por parte de las caspasas 3 y 9. Como resultado, se generan dos fragmentos, uno de 89 kDa y uno de 24 kDa, de manera que un aumento en la abundancia de los fragmentos de menor peso molecular es indicativo de una inducción de la actividad de las caspasas y, por ende, de la activación de muerte celular programada.

En este trabajo se utilizó la detección inmunológica de los fragmentos de 113 kDa y de 89 kDa mediante Western blot, observándose claramente la aparición de la banda de 89 kDa en respuesta al tratamiento en todas las líneas estudiadas, a excepción de la línea NP-9 (Fig 2 A). Para confirmar la ausencia de inducción de apoptosis en NP-9, se utilizó otra técnica de detección de apoptosis, basada en la externalización

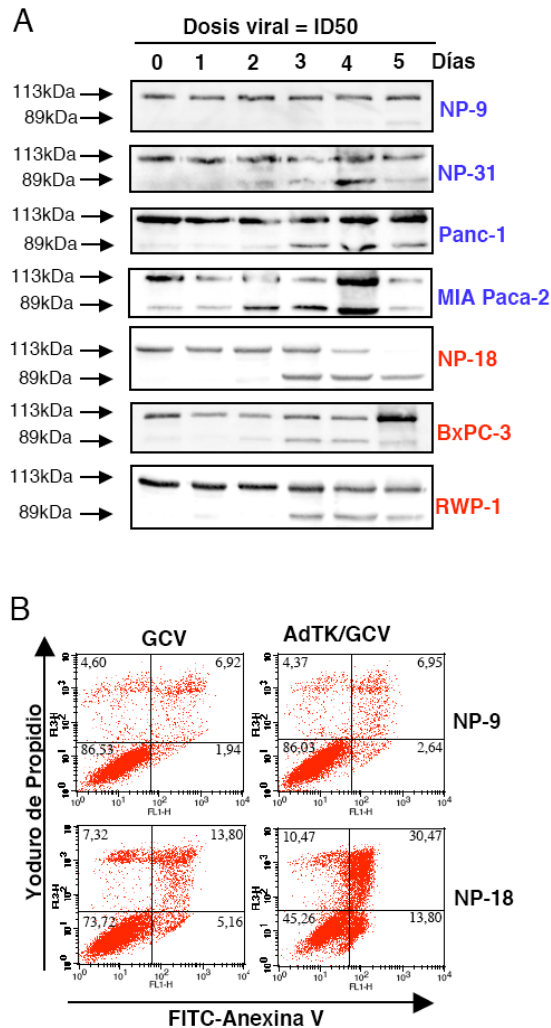


Figura 2 Inducción de apoptosis. El tratamiento con TK/GCV induce apoptosis en 6 de 7 líneas analizadas. A) Células NP-9, NP-31, PANC-1, MIAPaca-2, NP-18, BxPC-3 y RWP-1 fueron tratadas con dosis isotóxicas (ID50) de AdTK/GCV. Se prepararon extractos proteicos de células totales cada 24hs y se analizó el clivaje de PARP por Western blot. B) La ausencia de inducción de apoptosis en NP-9 fue confirmada mediante tinción con FITC-Anexina V y yoduro de propidio. Experimento representativo de tres experimentos independientes.

de fosfatidil-serina en la membrana plasmática. Este fenómeno coincide temporalmente con las fases tempranas de inducción de apoptosis, período durante el cual se conserva la integridad de la membrana. Para detectar este aumento de fosfatidil-serina en la

membrana plasmática se utilizó el marcaje con Anexina V conjugada con FITC y se cuantificó mediante citometría de flujo. Adicionalmente, se tiñeron las células con yoduro de propidio para detectar células necróticas y células en estados avanzados de apoptosis, cuyas membranas son permeables a yoduro de propidio, permitiendo su difusión al núcleo y asociación con el ADN, produciendo una señal positiva en el canal rojo. Las células resistentes NP-9 y las células sensibles NP-18 fueron tratadas cada una a una dosis viral equivalente a su ID50 y una concentración de ganciclovir de 10 µg/mL durante 5 días. Transcurrido este tiempo, tanto las células adheridas como las células suspendidas en el medio de cultivo fueron incubadas con Anexina V y con yoduro de propidio. Como se muestra en la figura 2 B, mientras las células NP-18 tratadas presentaban un porcentaje de células apoptóticas mayor al de las células control, que sólo habían recibido ganciclovir (44,24% y 8,56%, respectivamente), las células NP-9 tratadas presentaron valores semejantes a los de las células control (17,41% y 12,64%, respectivamente).

Ciclo celular

A continuación se estudió la respuesta a TK/GCV, en términos de progresión en el ciclo celular, en las diferentes líneas celulares. Se analizó el contenido de ADN de cada una de las líneas durante 5 días. Para ello, cada línea fue transducida con AdTK a una dosis equivalente a su ID50 y posteriormente cultivada en presencia de ganciclovir a una concentración de 10 µg/mL. Paralelamente y a modo de control, se cultivaron en presencia de ganciclovir células de cada una de las líneas sin haber sido transducidas.

Los datos obtenidos mostraron una marcada polarización en la respuesta al tratamiento, observándose un aumento de la población con un contenido de ADN correspondiente a células en fase de síntesis de ADN (fase S) o en fase S y G2/M entre las líneas sensibles (Fig 3 A), mientras que entre las células resistentes sólo MIA Paca-2 experimentó un claro aumento de células en fase S (temprana) (Fig 3 B). Las células control de cada una de líneas tendieron a incrementar el porcentaje de células en fase G0/G1 a lo largo de los días, coincidiendo con la llegada de los cultivos al 100% de confluencia.

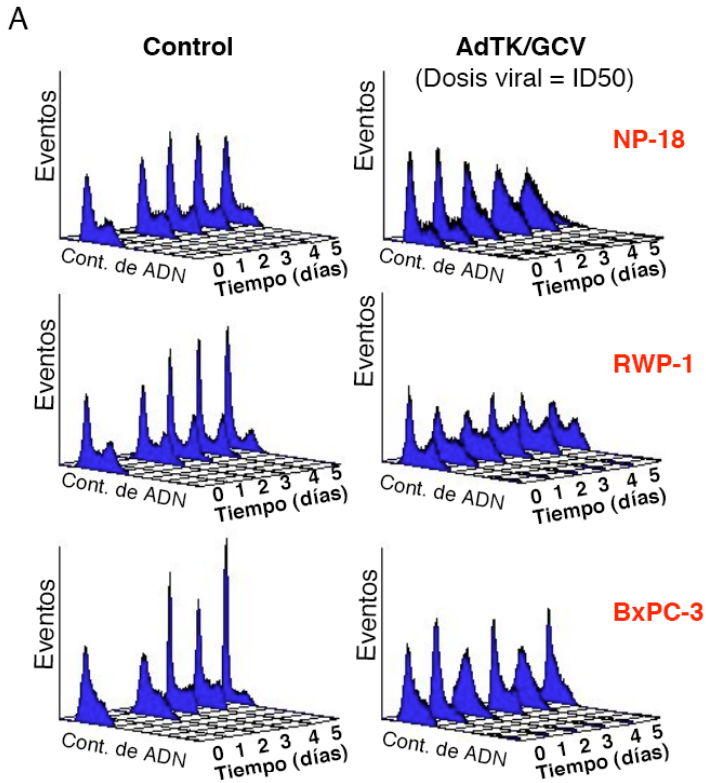


Figura 3. Análisis de ciclo celular en células NP-18, RWP-1, BxPC3 tratadas con dosis isotóxicas (ID50) de AdTK/GCV, mediante tinción con Hoechst 33342. Las células fueron tripsinizadas e incubadas durante 1h con Hoechst 33342 previo a la adquisición en citómetro de flujo, cada 24 hs. A) Las líneas sensibles NP-18, RWP-1 y BxPC-3 se acumularon en fase S, mientras que las líneas resistentes NP-9, NP-31, MIAPaca-2 y PANC-1 (B) no presentaron cambios en sus perfiles de ciclo celular. Experimento representativo de 3 experimentos independientes.

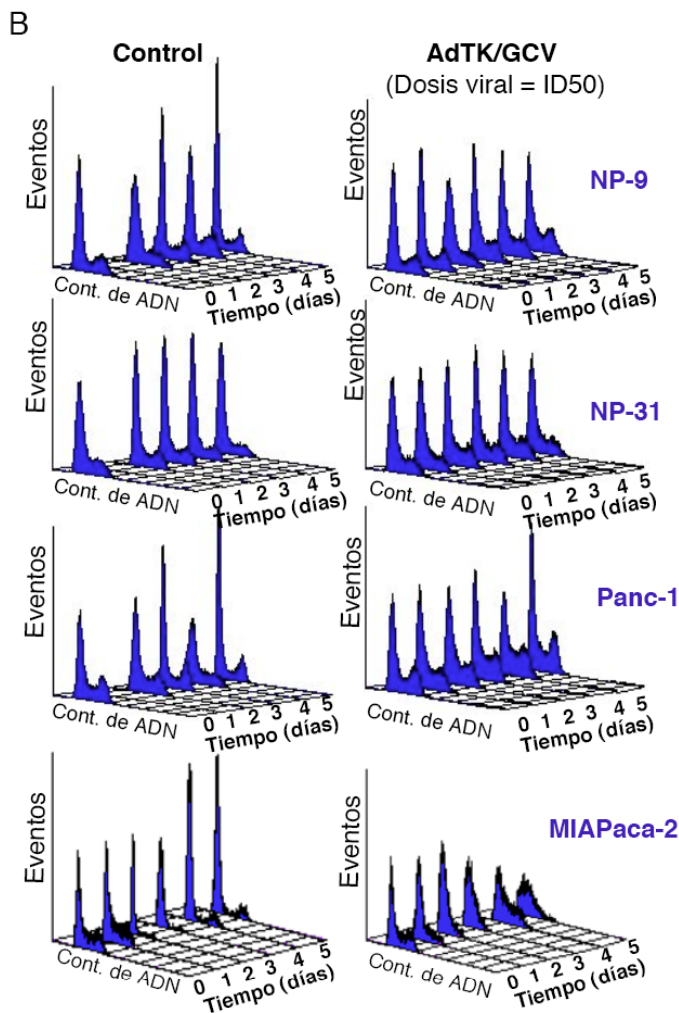


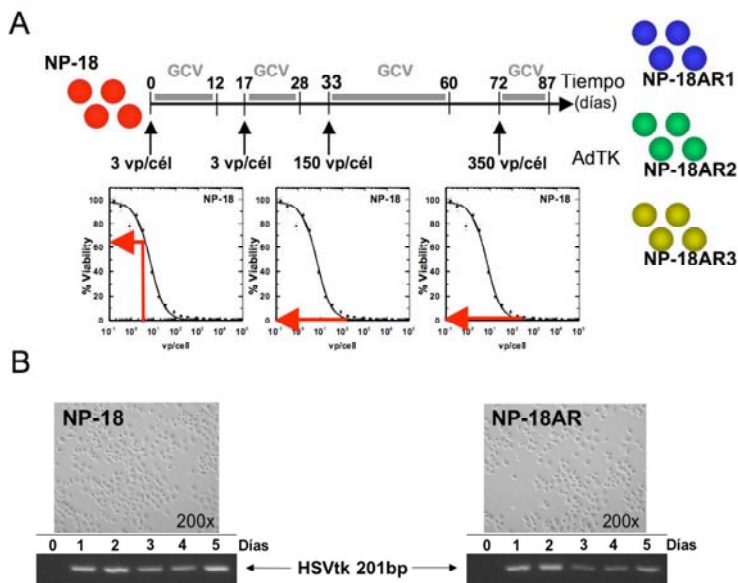
Figura 3. (cont.)

Estos resultados sugieren que el tratamiento con TK/GCV induce citotoxicidad, al menos parcialmente, mediante la inducción de muerte por apoptosis en la mayoría de las células de adenocarcinoma pancreático humano. El tratamiento induce, además, una acumulación de células en fase S o en fase S y G2/M, notablemente con mayor eficiencia en las células sensibles. Esta acumulación podría ser parte del mecanismo de citotoxicidad inducida por TK/GCV, y la capacidad de las células de retardar la progresión en el ciclo celular podría ser un factor determinante de la sensibilidad al tratamiento.

b) Estudio de la inducción de resistencia en células sensibles a TK/GCV

Generación de un modelo de resistencia inducida

Con el objetivo de evaluar si la exposición repetida de las células tumorales al tratamiento con el sistema TK/GCV es capaz de condicionar la respuesta de las células supervivientes ante una nueva aplicación del tratamiento, se transdujeron células de la línea sensible NP-18 con una dosis de AdTK de 3 vp/célula. A continuación, las células fueron cultivadas durante 12 días en presencia de GCV y posteriormente fueron cultivadas durante 5 días en medio de cultivo fresco, en ausencia de ganciclovir. Este procedimiento se repitió secuencialmente 3 veces, siendo las dosis virales utilizadas de 3 vp, 150 vp y 350 vp y la duración del tratamiento con ganciclovir posterior a cada una de las transducciones de 11 días, 27 días y 15 días, respectivamente (Fig 4



A). **Figura 4. Generación de células resistentes.** A) Células NP-18 fueron sometidas a 4 rondas de transducción con dosis crecientes de AdTK y posterior tratamiento con [GCV]= 10µg/mL. Se generaron 3 líneas independientes NP-18AR1, NP-18AR2 y NP-18AR3. B) Micrografías con magnificación del 200x de células NP-18 y NP-18AR. RT-PCR de TK.

Las células que sobrevivieron a las 4 rondas de transducción-ganciclovir fueron denominadas NP-18AR, no presentando alteraciones morfológicas apreciables por microscopía óptica de contraste de fase y conservando la capacidad de expresar el ARN mensajero del gen terapéutico TK tras ser transducidas nuevamente con AdTK (Fig 4 B). Se generaron tres líneas distintas (NP-18AR1, NP-18AR2 y NP-18AR3) aplicando el procedimiento descrito, en cada caso de forma independiente.

Caracterización de la respuesta de las células NP-18AR al tratamiento con AdTK/GCV

- Análisis de la sensibilidad al tratamiento con AdTK/GCV

Se realizaron experimentos de tipo dosis-respuesta con dosis crecientes de AdTK y posterior tratamiento a una dosis constante de ganciclovir (10 µg/mL) para determinar los valores de ID50 de AdTK para las líneas NP-18AR. Los valores obtenidos fueron de 32,76 vp/célula; 69,97 vp/célula y 49,82 vp/célula para NP-18AR1, NP-18AR2 y NP-18AR3, respectivamente. Es decir, sus valores de ID50 fueron 4,8 (*p*-valor < 0,01); 10,4 (*p*-valor < 0,01) y 7,4 (*p*-valor < 0,01) veces superior al valor de ID50 de NP-18, respectivamente (Fig 5 A).

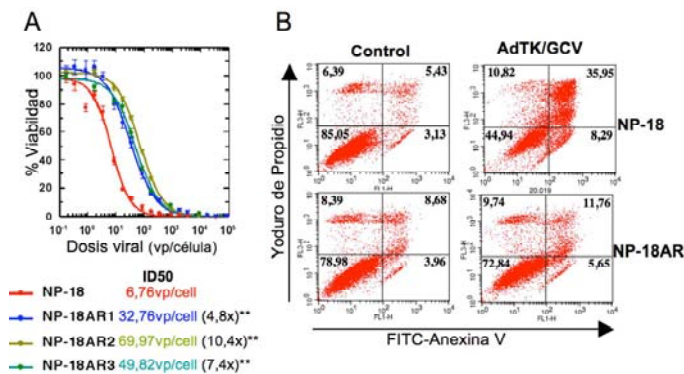


Figura 5. Caracterización del modelo de resistencia inducida. A) Estudio dosis-respuesta de sensibilidad AdTK/GCV. Se indican los valores de ID50 para cada línea expresados como valores absolutos y relativos a ID50 de NP-18 (entre paréntesis). Media de al menos 3 experimentos independientes. ** *p*-valor < 0,01. B) Análisis de inducción de apoptosis, a 5 días de tratamiento, por tinción con FITC-Anexina V/PI. Experimento representativo de 3 experimentos independientes.

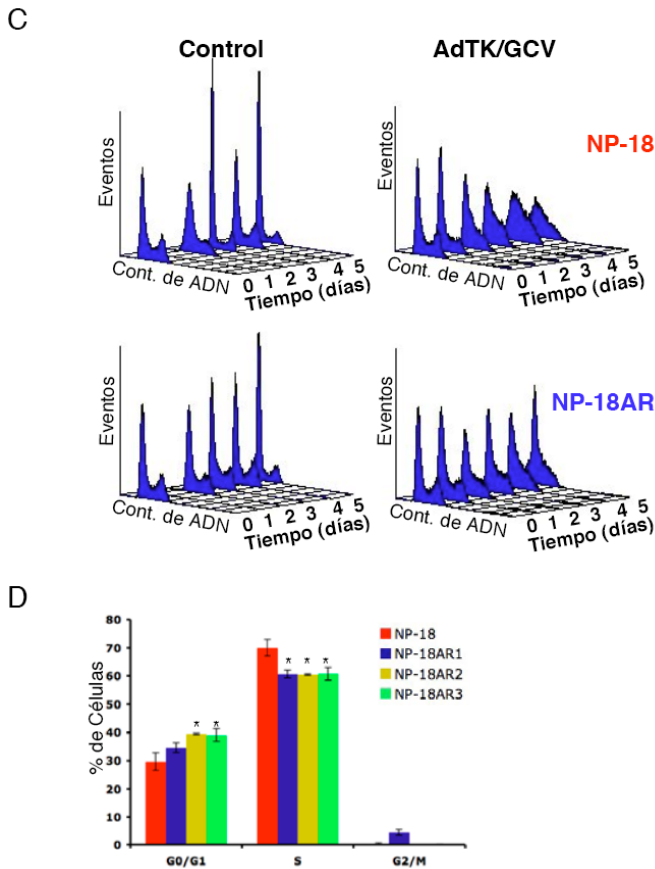


Figura 5 (cont.) C) Análisis curso-temporal de ciclo celular en células NP-18 y NP-18AR tratadas con AdTK/GCV ([AdTK] = 20vp/célula; [GCV] = 10 μ g/mL). Se observa un menor acúmulo en fase S en las células NP-18AR. Experimento representativo de 3 experimentos independientes. D) Análisis de distribución en el ciclo celular a 3 días de tratamiento. Media de tres experimentos +/- error estándar. * p -valor < 0,05.

Con el objetivo de evaluar si la diferencia en sensibilidad al tratamiento se debía a una menor permisividad de las células NP-18AR a la infección con AdTK, se analizaron los niveles de ARN mensajero de TK en las líneas NP-18, NP-18AR1, NP-18AR2 y NP-18AR3 tras ser infectadas cada una de ellas a una dosis viral equivalente a su ID50. Los niveles relativos de transcrito en las líneas NP-18AR, expresados como múltiplos de los niveles de transcrito en la línea NP-18, fueron en los tres casos superiores a la unidad [3,69 (p -valor = 0,001), 10,70 (p -valor = 0,001) y 5,61 (p -valor = 0,001) veces, respectivamente], indicando que la

disminución en la sensibilidad de NP-18AR no era debido a cambios en la infectividad.

- Análisis de la inducción de apoptosis

Se realizó el marcaje con Anexina V y yoduro de propidio para detectar células apoptóticas mediante citometría de flujo. Se cuantificaron los porcentajes de células positivas para Anexina V en NP-18 y NP-18AR2, ambas transducidas con AdTK a una dosis viral de 20 vp/célula y tratadas durante 5 días con ganciclovir, hallándose un 44,24% de células NP-18 positivas y un 17,41% de células NP-18AR2 positivas, indicando una menor inducción de apoptosis en éstas últimas en comparación con las células que nunca antes habían recibido tratamiento (Fig 5 B).

-Análisis de la progresión del ciclo celular en respuesta al tratamiento

Se realizó un estudio curso-temporal de los perfiles de ciclo celular mediante cuantificación del contenido de ADN por tinción con Hoechst 33342 tras haber transducido las células con AdTK a una dosis de 20 vp/célula y haberlas cultivado en presencia de ganciclovir. Se adquirieron los datos cada 24 horas en un citómetro de flujo. Los resultados mostraron que en ambas líneas se producía el aumento de la proporción de células con un contenido de ADN correspondiente a la fase S del ciclo, como se ha descrito para las líneas celulares sensibles al tratamiento, aunque se intuía una menor acumulación en las células NP-18AR2 en comparación con sus células parentales NP-18 (Fig 5 C). Para confirmar esta diferencia y tener una medida cuantitativa de la misma, se repitió el estudio, esta vez analizando el contenido de ADN celular a tres días de tratamiento y por triplicado. El porcentaje de células NP-18 en fase S a tres días de tratamiento fue del 70%, mientras que los porcentajes de células NP-18AR1, NP-18AR2 y NP-18AR3 fueron de 60,7%; 60,5 y 60,8%; respectivamente (p -valor_{NP-18AR1 vs NP-18} = 0,008; p -valor_{NP-18AR2 vs NP-18} = 0,014 y p -valor_{NP-18AR3 vs NP-18} = 0,021). Paralelamente, se observó un mayor porcentaje de células en G0/G1 en NP-18AR2 y NP-18AR3 que en NP-18 (39,5%; 39,3% y 29,66%, respectivamente; p -valor_{NP-18AR2 vs NP-18} = 0,014 y p -valor_{NP-18AR3 vs NP-18} = 0,021) (Fig 5 D).

Estos resultados indican que el tratamiento prolongado con

TK/GCV es capaz de desensibilizar las células que hayan sobrevivido al tratamiento. En el caso particular de la línea sensible NP-18, dicha desensibilización está asociada a una disminución en el número de células que inducen apoptosis y acumulación en fase S en respuesta al tratamiento, aportando más indicios acerca de un posible papel de los mecanismos de control de ciclo celular en la sensibilidad a TK/GCV.

Análisis transcriptómico comparativo de la respuesta a TK/GCV de células NP-18 y NP18AR

-Diseño experimental

Células de la línea NP-18 de las sublíneas derivadas NP-18AR1, NP-18AR2 y NP-18AR3 fueron sometidas a tratamiento con TK/GCV mediante transducción con AdTK a una dosis de 20 vp/célula, durante cuatro horas, y posterior incubación en presencia de ganciclovir a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante tres días. Transcurrido este tiempo se cosecharon las células (adheridas y flotantes) y se purificó ARN total, a partir del cual se sintetizó ADN copia, mediante transcripción reversa, y posteriormente las sondas de RNA copia, marcadas fluorescentemente. Los fluorocromos utilizados fueron Cianina 3 y Cianina 5 (Fig 6 A).

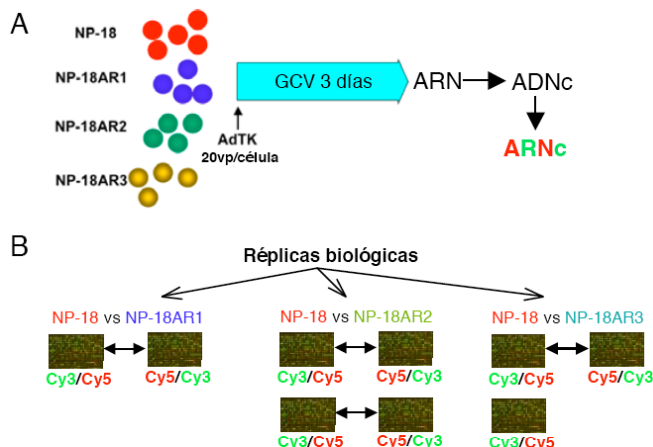


Figura 6. Hibridación en *microarrays*. A) Las células NP-18 y NP-18AR fueron tratadas con [AdTK] = 20 vp/célula y [GCV] = 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 3 días. El ARN fue utilizado para sintetizar sondas marcadas con Cy3 o Cy5. B) Se realizaron 9 hibridaciones competitivas, incluyendo réplicas biológicas y técnicas.

A partir de cada muestra se generaron dos sondas, cada una de ellas marcadas con uno de los fluorocromos, con el objetivo de realizar, para cada comparación, al menos dos hibridaciones intercambiando el fluorocromo utilizado para cada muestra, permitiendo así la corrección *a posteriori* de sesgos inducidos por una mayor eficiencia de marcaje con Cianina 3 o con Cianina 5.

Las muestras provenientes de células NP-18 fueron hibridadas independientemente con cada una de las muestras de NP-18AR, a modo de réplicas biológicas, alcanzando así un total de nueve hibridaciones competitivas: NP-18 vs NP-18AR1 (una hibridación directa y una con inversión de marcaje), NP-18 vs NP-18AR2 (dos hibridaciones directas y dos con inversión de marcaje), NP-18 vs NP-18AR3 (dos hibridaciones directas y una con inversión de marcaje).

Se utilizaron, como plataforma de análisis, los *microarrays* Agilent 22K, en cuya matriz se hallan representadas más de 22000 secuencias codificantes del genoma humano (Fig 6 B).

- Categorías sobrerrepresentadas

Estableciendo como criterio de selección un valor de cambio de expresión (*Fold Change*, FC) con un valor absoluto igual o superior a 1,2; se halló una población de 381 secuencias codificantes diferencialmente expresadas entre las células NP-18 y NP-18AR. Dentro de esta población se hallaron varias categorías estadísticamente sobrerrepresentadas mediante el análisis con el programa de análisis EASE (*Expression Analysis Systematic Explorer*), tales como aquellas que agrupan genes que codifican para componentes del nucleosoma ($p\text{-valor}_{\text{Bonferroni}} = 1,12 \times 10^{-2}$), componentes de la cromatina ($p\text{-valor}_{\text{Bonferroni}} = 2,26 \times 10^{-2}$), o bien para proteínas vinculadas al ensamblaje de los mismos ($p\text{-valor}_{\text{Bonferroni}} = 1,35 \times 10^{-2}$ y $1,91 \times 10^{-2}$, para ensamblaje de nucleosoma y de cromatina, respectivamente) (Fig 7 A). Adicionalmente, mediante el análisis con el programa informático IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*), se hallaron categorías generales significativamente sobrerrepresentadas tales como genes relacionados con cáncer ($p\text{-valor} = 6,62 \times 10^{-23}$); muerte celular ($p\text{-valor} = 1,69 \times 10^{-21}$); control de la expresión génica ($p\text{-valor} = 3,78 \times 10^{-17}$); control del crecimiento celular y de la proliferación ($p\text{-valor} = 1,67 \times 10^{-15}$); control del ciclo celular ($p\text{-valor} = 4,57 \times 10^{-11}$);

replicación, recombinación y reparación de ADN (p -valor= $3,72 \times 10^{-5}$); funcionamiento y mantenimiento celular (p -valor= $1,12 \times 10^{-3}$) y morfología tumoral (p -valor= $6,10 \times 10^{-3}$) (Fig 7 B).

A

***EASE v2.0**

| Componente celular | Genes | p -valor (Bonferroni) |
|--------------------|-------|-------------------------|
| -Nucleosoma: | 13 | 0,0112 |
| -Cromatina: | 18 | 0,0226 |

Proceso biológico

| | | |
|---------------------------|----|--------|
| -Ensamblaje de nucleosoma | 12 | 0,0135 |
| -Ensamblaje de cromatina | 14 | 0,0191 |

B

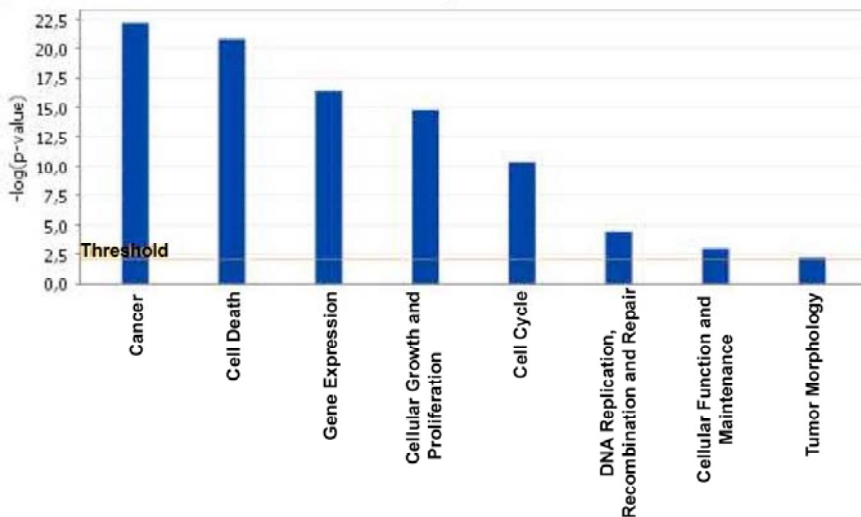
***IPA**

Figura 7. Categorías sobrerrepresentadas. A) Resultados de análisis con el software EASE. B) p -valor para las principales categorías sobrerrepresentadas, utilizando el software Ingenuity Pathway Analysis. En ambos casos, se estableció un p -valor $< 0,05$ como límite de significancia.

En las Tablas R2 y R3 se muestran 20 genes más sobrerregulados y lo 20 más subregulados, respectivamente.

- Validación de los resultados mediante técnicas de biología molecular

A modo de validación molecular de los resultados del experimento de *microarrays* se analizaron mediante RT-PCR los niveles relativos, en las células NP-18AR con respecto a NP-18, de ARN mensajero de los genes GADD45A, NMU, WNT5A, GPC4, POLK,

Tabla R2. 20 genes más sobrerregulados

| Acceso GenBank | Símbolo | Nombre | Fold Change |
|----------------|----------|---|-------------|
| NM_001448 | GPC4 | Glypican 4 | 4,30 |
| NM_006681 | NMU | Neuromedin U | 3,96 |
| NM_002222 | ITPR1 | Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1 | 3,15 |
| NM_000429 | MAT1A | Adenosyltransferase I, alpha | 3,02 |
| NM_014585 | SLC40A1 | Solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1 | 2,62 |
| NM_002970 | SAT | Spermidine/spermine N1-acetyltransferase | 2,40 |
| NM_022126 | LHPP | Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase | 2,35 |
| NM_002073 | GNAZ | Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha z polypeptide | 2,28 |
| NM_198991 | KCTD1 | Potassium channel tetramerisation domain containing 1 | 2,28 |
| NM_022126 | LHPP | Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase | 2,25 |
| NM_145729 | MRPL24 | Mitochondrial ribosomal protein L24 , transcript variant 1 | 2,24 |
| NM_004948 | DSC1 | Desmocollin 1, transcript variant Dsc1b | 2,19 |
| NM_032367 | ZBED3 | Zinc finger, BED domain containing 3 | 2,11 |
| NM_005952 | MT1X | Metallothionein 1X | 2,11 |
| NM_175622 | MT1J | Metallothionein 1J | 2,08 |
| NM_018242 | FLJ10847 | Hypothetical protein FLJ10847 | 1,98 |
| NM_005950 | MT1G | Metallothionein 1G | 1,98 |
| NM_003022 | SH3BGRL | SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like | 1,97 |
| NM_021939 | FKBP10 | FK506 binding protein 10, 65 kDa | 1,96 |
| NM_001846 | COL4A2 | Collagen, type IV, alpha 2 | 1,96 |

Tabla R3. 20 genes más subregulados

| Acceso GenBank | Símbolo | Nombre | Fold Change |
|----------------|---------|---|-------------|
| NM_002425 | MMP10 | Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2) | -5,34 |
| NM_015894 | STMN3 | Stathmin-like 3 | -3,51 |
| NM_002306 | LGALS3 | Lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3) | -3,18 |
| NM_018476 | BEX1 | Brain expressed, X-linked 1 | -3,07 |
| NM_001730 | KLF5 | Kruppel-like factor 5 (intestinal) | -2,71 |
| NM_000416 | IFNGR1 | Interferon gamma receptor 1 | -2,33 |
| NM_181526 | MYL9 | Myosin, light polypeptide 9, regulatory (MYL9), transcript variant 2, | -2,29 |
| NM_005269 | GLI1 | Glioma-associated oncogene homolog 1 (zinc finger protein) | -2,18 |
| NM_000064 | C3 | Complement component 3 | -2,08 |
| NM_021158 | TRIB3 | Tribbles homolog 3 (Drosophila) | -2,01 |
| NM_030753 | WNT3 | Wingless-type MMTV integration site family, member 3 | -1,94 |
| NM_174901 | FAM9C | Family with sequence similarity 9, member C | -1,93 |
| NM_001823 | CKB | Creatine kinase, brain | -1,92 |
| NM_152437 | ZFOC1 | Zinc finger protein ZFOC1 | -1,87 |
| NM_015535 | DNAPT6 | DNA polymerase-transactivated protein 6 | -1,83 |
| NM_024576 | OGFRL1 | Opioid growth factor receptor-like 1 | -1,79 |
| NM_014667 | VGLL4 | Vestigial like 4 (Drosophila) | -1,78 |
| NM_018663 | PXMP2 | Peroxisomal membrane protein 2, 22kDa | -1,76 |
| NM_001444 | FABP5 | Fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated) | -1,75 |
| NM_001938 | DR1 | Down-regulator of transcription 1, TBP-binding (negative cofactor 2) | -1,74 |

CCNE1 y GPC3. Los resultados del experimento, resumidos en la Tabla R4, permiten confirmar los resultados obtenidos a partir de los microarrays, incluso para el gen WNT5A, cuyo valor de cambio de expresión es inferior al valor de línea de corte que se estableció para el análisis. Es interesante destacar que los valores absolutos de la regulación hallados mediante RT-PCR para los genes GADD45A, WNT5A y POLK fueron aproximadamente el doble del valor hallado mediante el experimento de hibridación competitiva.

Tabla R4. Genes validados por RT-PCR

| Gen | Nombre | FC array | FC RT-PCR |
|---------|---|----------|-----------|
| GPC4 | Glypican 4 | 4,3 | 5,05 |
| NMU | Neuromedin U | 3,95 | 3,49 |
| GADD45A | Growth arrest and DNA-damage inducible, alpha | 1,47 | 3,46 |
| POLK | DNA Polymerase kappa | 1,45 | 3,45 |
| WNT5A | Wingless-type MMTV integration site family, member 5A | 1,12 | 2,16 |
| CCNE1 | Cyclin E1 | -1,69 | -1,68 |
| GPC3 | Glypican 3 | -3,44 | -4,46 |

- Validación funcional

De entre los genes validados por RT-PCR, se escogieron dos para su validación funcional. De esta manera, se pretende establecer una posible relación causal entre la regulación de estos genes y la inducción de resistencia. Los genes candidatos fueron CCNE1, que codifica para la proteína ciclina E, un modulador de la enzima CDK2 cuya función es necesaria para que se produzca el tránsito de la fase G1 a la fase S del ciclo celular y GADD45A, cuya expresión es inducida como parte de los mecanismos de respuesta a insultos genotóxicos, produciendo un arresto en fase S del ciclo celular. Se escogieron estos genes debido a que su expresión diferencial coincide con el fenotipo de las células NP-18AR en lo que se refiere a cambios en los perfiles de ciclo celular, y además porque otros genes cuya expresión se encuentra relacionada con la expresión de CCNE1 y GADD45 se han visto regulados en el mismo sentido, en el experimento de hibridación competitiva (Fig 8).

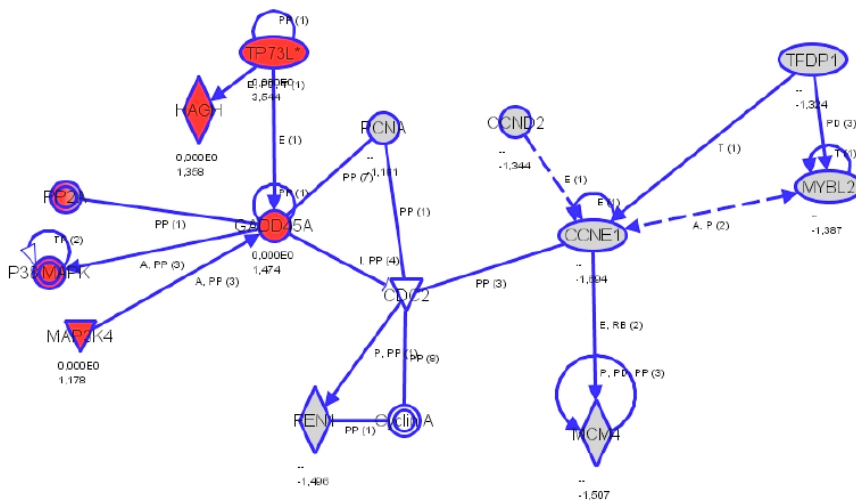


Figura 8. Red de interacciones CCNE1 y GADD45A. Genes cuya expresión está relacionada con la actividad y/o expresión de ciclina E1 (CCNE1) o GADD45A y que también se encuentran diferencialmente expresados. Genes sobrerregulados en el experimento de *microarray* señalados en rojo y genes subregulados, en gris.

Las secuencias codificantes de GADD45A y CCNE1 fueron clonadas en los vectores pLHCx y pLxSN, generándose así las construcciones pLHC-GADD45A y pL-CCNE1-SN, respectivamente.

Células de la línea resistente MIAPaca-2 fueron transfectadas con la construcción y pL-CCNE1-SN (Fig 9 A), obteniéndose un incremento moderado en la expresión de ciclina E de aproximadamente 2,3 veces, en comparación con los niveles basales observados en las células MIAPaca-2 transfectadas con el plásmido pLxSN a modo de control (Fig 9 B). Este cambio en la expresión fue suficiente para inducir un incremento en el porcentaje de células en fase S y G2/M del 43,08% en las muestras control a 51,49% en células transfectadas con pL-CCNE1-SN (Fig 9 C). Se analizó, además la sensibilidad de las células transfectadas con pL-CCNE1-SN y con pLxSN al tratamiento con TK/GCV mediante un estudio de tipo dosis-respuesta, calculando el valor de ID50 para el vector AdTK. Los resultados indican que la sobreexpresión de ciclina E produce una disminución de aproximadamente un 20% del valor de ID50, indicativo de un aumento de la sensibilidad al tratamiento

TK/GCV (Fig 9 D).

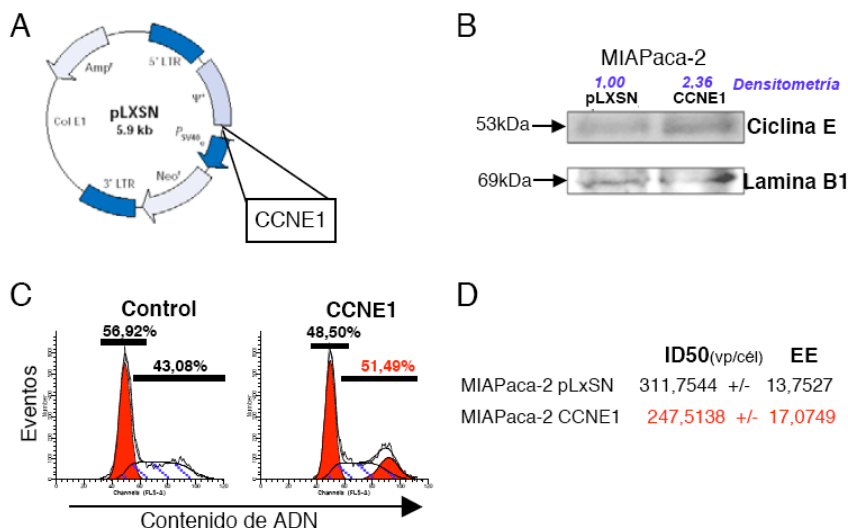


Figura 9. Validación funcional de CCNE1. A) Diagrama del plásmido de expresión pL-CCNE1-SN. B) Sobreexpresión de ciclina E en células MIAPaca-2 transfectadas con pL-CCNE1-SN confirmada por Western blot. C) Distribución de ciclo celular y D) sensibilidad a AdTK/GCV de las células MIAPaca-2 transfectadas con pL-CCNE1-SN. B) y C) Experimento representativo de 3 experimentos independientes. D) Media de 3 experimentos.

Paralelamente, se transfectaron células de la línea sensible RWP-1 con la construcción pLHC-GADD45A (Fig 10 A), observándose un marcado aumento de la expresión de GADD45A en estas células en comparación con las células RWP-1 transfectadas con pLHCx a modo de control, cuya expresión basal de GADD45A fue prácticamente indetectable mediante Western blot (Fig 10 B).

Esta sobreexpresión no produjo cambios en el porcentaje de células en fase S y G2/M del ciclo celular (Fig 10 C), pero sí en la sensibilidad a TK/GCV, aumentando la ID50 para AdTK/GCV de 34,70 +/- 2,36 vp/célula a 44,23 +/- 4,15 vp/célula, esto es, una disminución de aproximadamente 27% en la sensibilidad a TK/GCV (Fig 10 D).

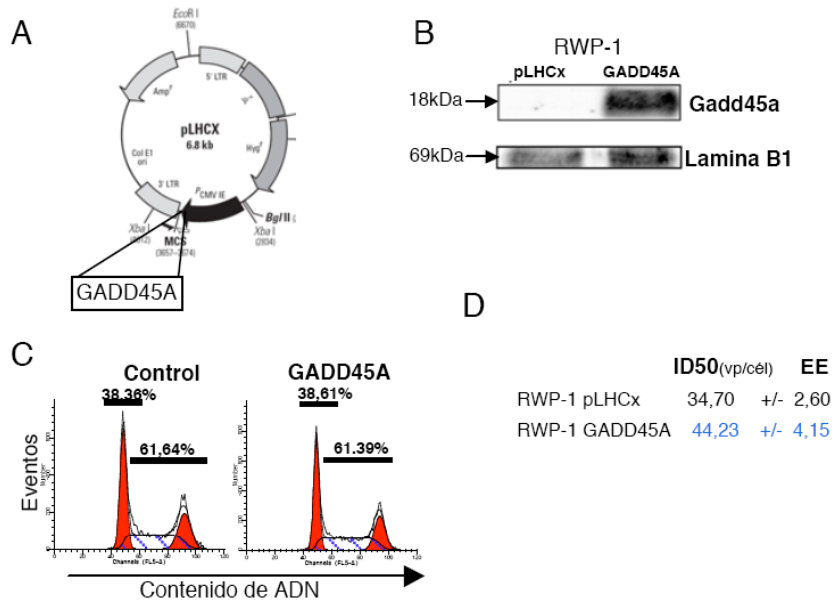


Figura 10. Validación funcional de GADD45A. A) Diagrama del plásmido de expresión pLHC-GADD45A. B) Sobreexpresión de Gadd45a en células RWP-1 transfectadas con pLHC-GADD45A confirmada por Western blot. C) Distribución de ciclo celular y D) sensibilidad a AdTK/GCV de las células RWP-1 transfectadas con pLHC-GADD45A. B) y C) Experimento representativo de 3 experimentos independientes. D) Media de 3 experimentos.

- Expresión basal de GADD45A y CCNE1 e inducción en respuesta a TK/GCV, en líneas celulares

Con el objetivo de verificar si diferencias en la expresión basal de estos genes, o en su inducción en respuesta al tratamiento, pueden ser la causa de las diferencias de sensibilidad intrínseca observadas entre las diferentes líneas celulares, se analizaron los niveles de expresión del ARN mensajero de CCNE1 y GADD45A en las siete líneas estudiadas. Los niveles basales de cada uno de los transcritos se expresaron de manera relativa a los niveles encontrados en NP-18 (arbitrariamente asignado el valor de la unidad). En cuanto a los niveles de expresión tras aplicar el tratamiento a dosis isotóxicas (ID50), se expresaron, los niveles de transcrito, de manera relativa a los niveles basales de cada línea. Así, se observó que sólo BxPC-3 presentaba niveles de expresión de GADD45A distinguibles de los de NP-18 (NP-9: 0,976 veces, p -valor= 0,178; NP-31: 1,44 veces,

p -valor = 0,178; BxPC-3: 1,873 veces, p -valor= 0,001; MIAPaca-2= 1,057 veces, p -valor= 0,351; PANC-1= 5,187, p -valor=0,178; RWP-1= 4,155, p -valor= 0,178) (Fig 11A). En cuanto a la expresión basal de CCNE1, observamos que todas las líneas analizadas, a excepción de RWP-1, presentaban niveles más bajos de ARN mensajero de CCNE1 que NP-18. (NP-9: 0,283 veces, p -valor= 0,001; NP-31: 0,201 veces, p -valor = 0,001; BxPC-3: 0,144 veces, p -valor= 0,001; MIAPaca-2= 0,186 veces, p -valor= 0,001; PANC-1= 0,225 p -valor=0,001; RWP-1= 0,570, p -valor= 0,178) (Fig 11B).

La expresión del ARN mensajero de ambos genes se vio incrementada en respuesta al tratamiento, a excepción de CCNE1 en células RWP-1. Mientras la magnitud de la inducción de GADD45A tendía a ser superior en las células resistentes (NP-9: 12,424 veces, p -valor= 0,001; NP-31: 12,295 veces, p -valor = 0,001; BxPC-3: 3,580 veces, p -valor= 0,001; MIAPaca-2= 28,940 veces, p -valor= 0,001; PANC-1= 13,501, p -valor= 0,001; RWP-1= 7,835, p -valor= 0,001) (Fig 11 B), no se observó ninguna asociación de este tipo para la inducción de CCNE1 (NP-9: 2,338 veces, p -valor= 0,001; NP-31: 2,278 veces, p -valor = 0,001; BxPC-3: 1,778 veces, p -valor= 0,001; MIAPaca-2= 6,148 veces, p -valor= 0,001; PANC-1= 2,713, p -valor= 0,001; RWP-1= 1,075, p -valor= 0,100) (Fig 11 D)

Estos datos sugieren que la expresión basal de CCNE1 y de GADD45A no permiten predecir universalmente el grado de sensibilidad, pero alteraciones en su expresión podrían estar vinculadas a la adquisición de resistencia inducida por el tratamiento. Estudios orientados a establecer si la inducción de estos genes está causalmente vinculada a la mayor o menor inducción de acúmulo de células en fase S del ciclo celular, y si dicha inducción forma parte del mecanismo de acción de TK/GCV, podrían proporcionar la posibilidad de intervención mediante su regulación para optimizar el rendimiento del sistema TK/GCV. Así mismo, la validación funcional de otros genes regulados sin un vínculo anteriormente descrito con el control del ciclo celular o con la inducción de resistencia, podría ayudar a esclarecer algunos aspectos desconocidos del mecanismo de acción de este sistema suicida.

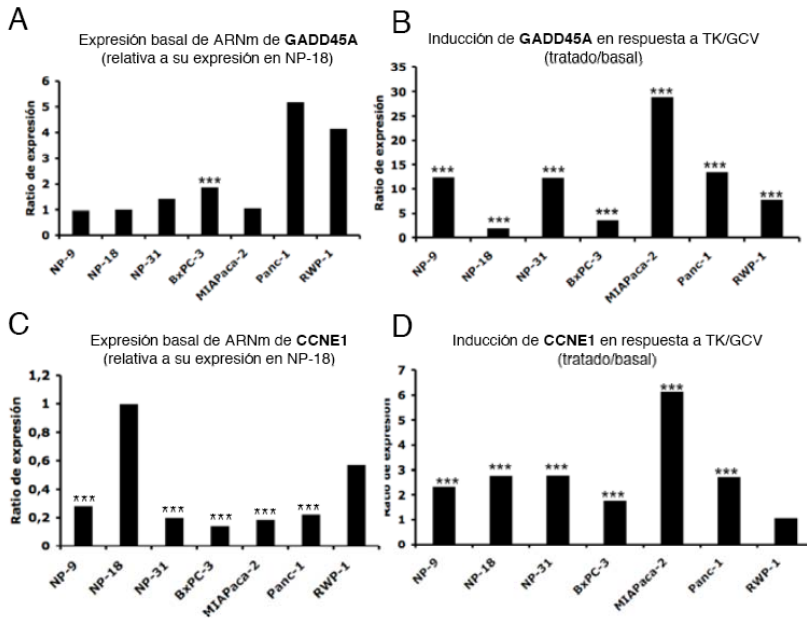
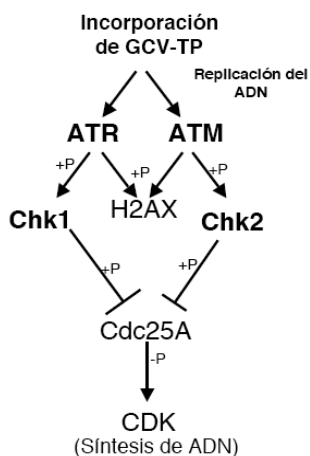


Figura 11. Expresión basal de CCNE1 y GADD45A e inducción en respuesta al tratamiento con TK/GCV. Para cada línea se analizaron, mediante RT-PCR los niveles, de ARNm de: A) GADD45A en estado basal. B) GADD45A en respuesta al tratamiento con TK/GCV C) CCNE1 en estado basal D) CCNE1 en respuesta al tratamiento con TK/GCV. Los resultados están expresados como ratios de expresión con respecto a NP-18 en los análisis de expresión basal, y como ratios de expresión con respecto al estado basada de cada línea, en los estudios de inducción. *** p -valor $\leq 0,001$.

c) Estudio de la respuesta celular al daño en el ADN inducido por TK/GCV y su relación con la sensibilidad al tratamiento

En condiciones fisiológicas, existen mecanismos moleculares tendientes a detectar lesiones en el ADN genómico y a activar la maquinaria de reparación, de cuyo éxito dependerá la supervivencia de la célula. Los efectores de estos mecanismos varían de acuerdo a la naturaleza de la lesión y al punto del ciclo celular en el que se encuentren las células en el momento de producirse la misma. Así, para las lesiones producidas durante la síntesis de ADN (fase S), las quinasas ATR y ATM son capaces de detectar regiones del genoma donde se ha interrumpido la síntesis de ADN o donde se han producido lesiones de tipo *Double Strand Break* (DSB),

respectivamente. Estas quinasas, a su vez, activan mediante fosforilación las quinasas Chk1 y Chk2, responsables de la fosforilación de Cdc25A que actuará como iniciador del proceso de ubiquitinación y degradación proteasomal de la misma (Esquema R1). Esta disminución en los niveles de Cdc25A trae aparejada una inhibición de la actividad de la quinasa dependiente de ciclinas CDK2 que se traducirá, a su vez, en una inhibición de la progresión en el ciclo celular que permitirá la reparación de las lesiones y posterior reestablecimiento de la misma. En caso de verse imposibilitada la reparación de las lesiones, se activan los mecanismos de muerte celular programada o senescencia.



Esquema R1. Vías involucradas en el *checkpoint* de fase S. La incorporación de los metabolitos fosforilados de GCV produce lesiones en el DNA genómico que activan a las quinasas ATR y ATM. Éstas, a su vez, catalizarán la fosforilación activadora de Chk1 y Chk2, respectivamente. La actividad de estas enzimas modulará la estabilidad de Cdc25A, resultando en su degradación proteasómica, y en la inhibición de la actividad del complejo CDK2/Ciclina E. La fosforilación de otro sustrato de las enzimas ATR y ATM, la histona H2AX, es utilizada como indicador de daño en el ADN.

Sobre esta base, nos propusimos caracterizar la respuesta al daño genotóxico inducido por TK/GCV en el contexto de una línea celular tumoral, y evaluar la posible asociación entre la actividad de estas vías y la sensibilidad al tratamiento.

-Activación del punto de restricción de fase S en células NP-18 tratadas con TK/GCV

Para evaluar si el tratamiento con TK/GCV era capaz de activar el *checkpoint* de fase S, células de la línea sensible NP-18 fueron tratadas con AdTK a una dosis de 300 vp/célula y posteriormente cultivadas en presencia de 10 µg/mL de ganciclovir. El análisis mediante Western blot mostró que a partir de 12 horas de aplicado el tratamiento existe un leve incremento en los niveles de H2A.X fosforilada, alcanzando a las 48 horas niveles diez veces superiores

a los basales (Fig 12 A).

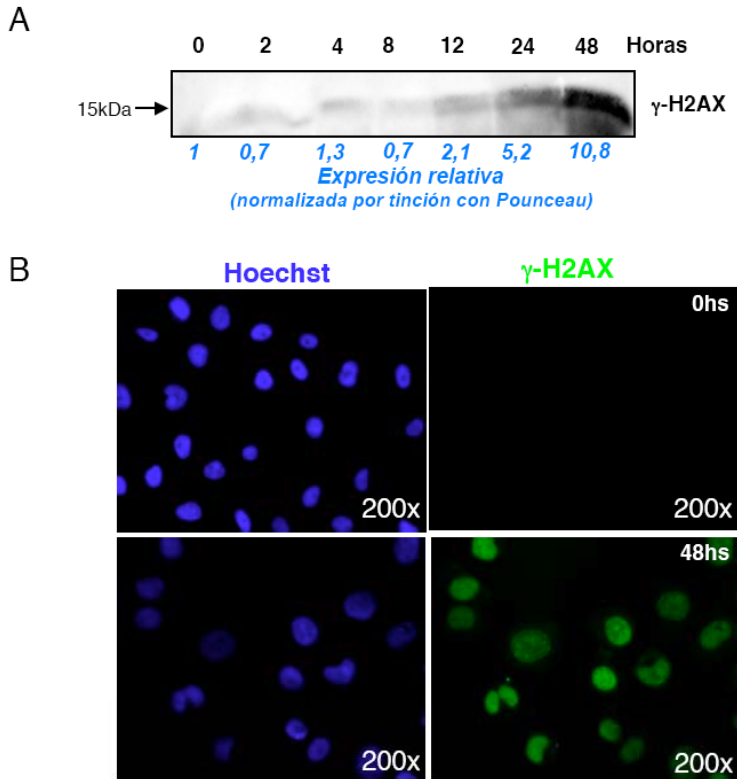


Figura 12. Detección de daño en el ADN en NP-18. A) Detección curso-temporal de la fosforilación de histona H2AX mediante Western blot. Células NP-18 fueron tratadas con [AdTK/GCV] = 50 x ID50 y se prepararon extractos de fracción ácido-soluble a los tiempos indicados. La señal de cada banda fue normalizada por la intensidad de tinción de rojo Ponceau y expresada como valores relativos a la señal a t= 0. B) Detección de la fosforilación de histona H2AX, mediante inmunofluorescencia, en NP-18 tratadas con [AdTK/GCV] = 50 x ID50. Microfotografías realizadas con una magnificación de 200x.

Mediante inmunofluorescencia se confirmó la fosforilación de la histona H2A.X, observándose un marcaje positivo a partir de las 48 horas de tratamiento (Fig 12 B). Se analizaron también los niveles de Cdc25A en el tiempo, observándose una disminución a partir de las 72 horas de tratamiento. (Fig 13).

Con el objetivo de determinar si la respuesta celular al insulto genotóxico se lleva a cabo preferentemente mediante la vía ATR-

Chk1 (relacionada tradicionalmente con la respuesta a inhibición de síntesis de ADN) o mediante la vía ATM-Chk2 (asociada a la

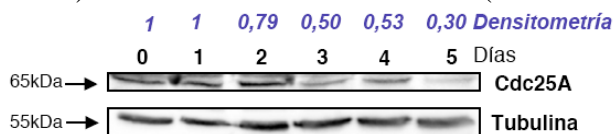


Figura 13. Degradación de Cdc25A. Análisis curso-temporal de los niveles de la proteína Cdc25A mediante Western blot. Células NP-18 fueron tratadas con [AdTK/GCV] = 50 x ID50. Se prepararon extractos totales cada 24hs. La expresión de Cdc25A en cada punto temporal se expresa como intensidad de señal normalizada por expresión de tubulina y referenciada a los niveles observados al inicio del tratamiento.

respuesta a lesiones DSB), se evaluó la fosforilación de Chk1 en posición Ser345 y de Chk2 en posición Thr68 en función del tiempo. Resultados obtenidos mediante Western blot en células NP-18 muestran un marcado incremento en la forma fosforilada de Chk1 mientras que la fosforilación de Chk2 se produce de manera tardía y con menor magnitud que la fosforilación de Chk1 (Fig 14 A). Al analizar mediante Western blot la cinética de fosforilación de ambas quinasas durante el primer día de tratamiento, se confirmó que la fosforilación de Chk1 es un evento anterior a la fosforilación de Chk2, que se produce sin cambios apreciables en los niveles de Chk1 (Fig 14 B). La fosforilación de Chk2 fue confirmada mediante inmunofluorescencia, detectándose claramente a las 48 horas (Fig 14 C).

Al analizar el clivaje de PARP en respuesta al tratamiento con TK/GCV, se observó que la fosforilación de Chk1 se producía previo a la inducción de apoptosis (Fig 15).

- Fosforilación de Chk1 en BxPC-3 y NP-9

Con el objetivo de evaluar la activación de esta vía en células que presentan diferentes sensibilidades al tratamiento, las líneas NP-9 (resistente) y BxPC-3 (sensible) fueron tratadas transducidad con AdTK, cada una de ellas a una dosis cincuenta veces superior a su propia ID50, y se las trató con 10µg/mL de ganciclovir durante cuatro días, preparándose extractos celulares totales cada veinticuatro horas. Los niveles de Chk1 fosforilada en posición Serina 345 fueron analizados mediante Western blot, observándose

un débil incremento en células NP-9 (4,6 veces; según cuantificación densitométrica) a las veinticuatro horas de iniciado el tratamiento, que luego retornó a niveles basales. En BxPC-3, en cambio, los niveles de Chk1 fosforilada comenzaron a incrementarse a partir de las veinticuatro horas, pero alcanzaron un máximo de treinta veces los niveles basales, a tres días de iniciado el tratamiento (Fig 16).

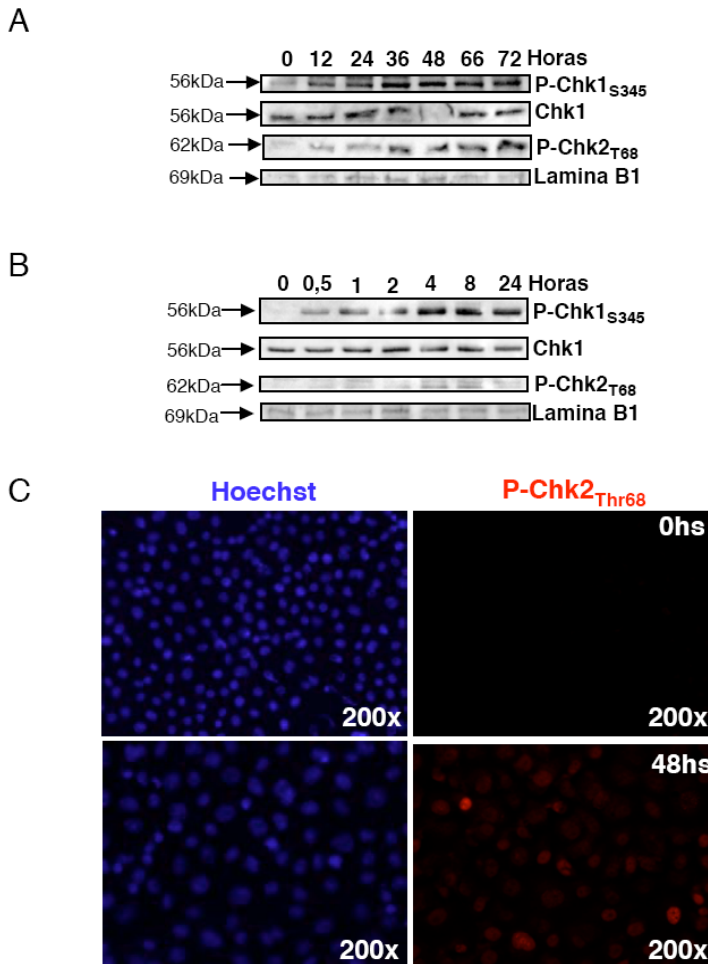


Figura 14. Activación de las quinasas de *checkpoint*. A) y B) Análisis curso-temporal por Western blot, sobre extractos nucleares de NP-18 tratadas con [AdTK/GCV] = 50 x ID50, de la fosforilación activadora de las histonas Chk1 y Chk2. La fosforilación de Chk1 es anterior a la fosforilación de Chk2. C) Inmunofluorescencia para la detección de P-Chk2 en células NP-18 tratadas con [AdTK/GCV] = 50 x ID50, a 48hs de iniciado el tratamiento.

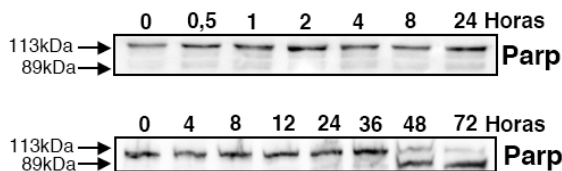


Figura 15. Cinética de inducción de apoptosis. Ensayo de clivaje de PARP para la detección de la inducción de apoptosis. Las células NP-18 fueron tratadas con [AdTK/GCV] = 50 x ID50 y cultivadas durante los tiempos indicados. Se prepararon extractos totales que fueron resueltos por SDS-PAGE, transferidos a membranas de nitrocelulosa y revelados con un anticuerpo específico para PARP. Se detectó la forma clivada de la proteína a partir de las 48 hs de iniciado el tratamiento.

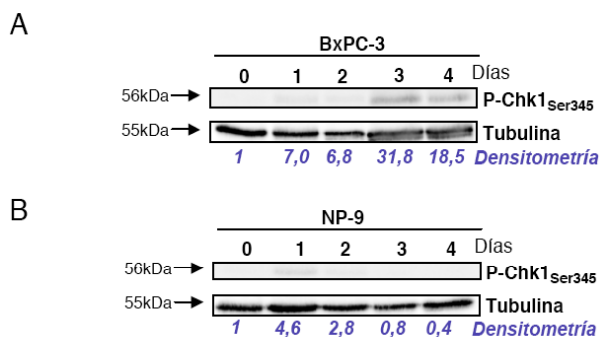


Figura 16. Fosforilación de Chk1 en BxPC-3 y NP-9. Western blot de células sensibles BxPC-3 (A) y resistentes NP-9 (B) tratadas con [AdTK/GCV] = 50 x ID50. Se prepararon extractos proteicos totales cada 24 hs y se resolvieron mediante SDS-PAGE. La forma fosforilada de Chk1 fue detectada mediante inmunorevelado de los Western blots y los niveles medidos por densitometría se expresan normalizados por la expresión de tubulina en cada carril, y referenciados a los niveles presentes al inicio del tratamiento.

Validación funcional de la participación de Chk1 en la respuesta a TK/GCV

El fármaco UCN-01 o 7-OH-Staurosporina tiene la capacidad de inhibir la actividad enzimática de P-Chk1, pero no la de P-Chk2, cuando se utiliza a una concentración de 300 nM, permitiendo de esta manera estudiar los efectos de la inhibición de la vía ATR-Chk1 sobre las alteraciones del ciclo celular inducidos por el tratamiento con TK/GCV y sobre su eficacia citotóxica.

-Efectos de la inhibición de Chk1 sobre la progresión en el ciclo celular

Se ha descrito que el tratamiento con el fármaco UCN-01 produce un arresto en fase G0/G1 del ciclo celular e induce la muerte celular programada en varios tipos celulares, por lo que nos propusimos evaluar el efecto de dicha droga sobre la progresión en el ciclo celular y sobre los cambios en la progresión inducidos por TK/GCV, en un modelo de cáncer de páncreas.

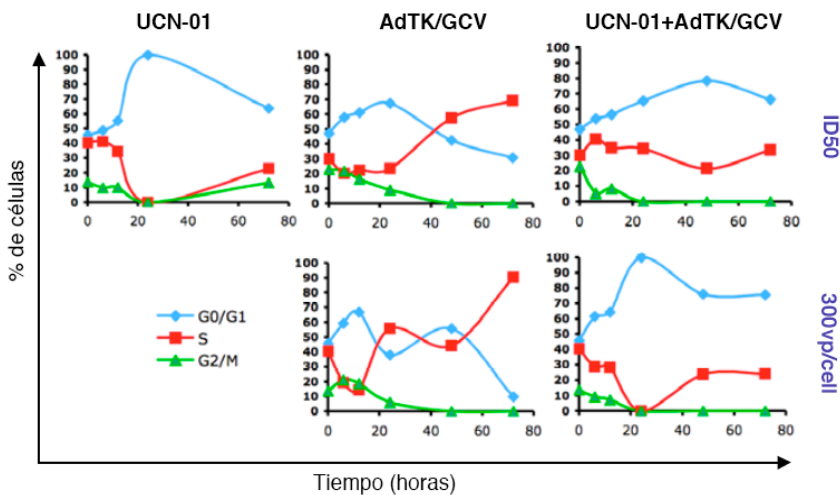


Figura 17. Inhibición de Chk1 y ciclo celular. Estudio curso-temporal de la distribución de células en cada fase del ciclo celular, en respuesta al tratamiento con UCN-01, AdTK/GCV o la combinación de ambos. El análisis se realizó utilizando dos dosis diferentes de AdTK: ID50 y 50 x ID50, cuantificando el porcentaje de células en cada fase, mediante tinción con Hoechst 33342 y adquisición por citometría de flujo. Se muestran los resultados de un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

En la figura 17 se muestran los resultados obtenidos al tratar células de la línea NP-18 con 300 nM de UCN-01; AdTK/GCV a una dosis de virus igual a su ID50 y a una dosis de 300 vp/célula; o con una combinación de AdTK/GCV, a una dosis igual a su ID50 y a una dosis de 300 vp/célula, ambas en combinación con UCN-01 a una concentración de 300 nM.

Mientras el tratamiento con AdTK/GCV induce un aumento del

porcentaje de células en fase S, tanto cuando se aplica a una dosis igual a su ID50 como cuando se aplica a una dosis cincuenta veces superior, el tratamiento con UCN-01 produce un marcado aumento del porcentaje de células en fase G0/G1 alcanzando un valor cercano al 100% a veinticuatro horas de establecerse el mismo. Cuando ambos tratamientos fueron aplicados conjuntamente, se observó una inhibición del incremento de células en fase S inducido por AdTK/GCV.

Estos resultados sugieren que el tratamiento con TK produce la activación del *checkpoint* de fase S mediante la vía que involucra la fosforilación de Chk1.

-Efectos de la inhibición de Chk1 sobre la síntesis de ADN

Con el objetivo de confirmar si el retraso en la progresión del ciclo celular está asociada a una inhibición en la síntesis de ADN, y para evaluar la participación de Chk1 en dicha inhibición, nos propusimos analizar cuantitativamente la actividad de síntesis de ADN de los cultivos tratados con TK/GCV. Para ello, se utilizó el kit comercial *Click-iT™ EdU Flow Cytometry Assay* (Invitrogen) que emplea el análogo nucleosídico 5-etinil-2'-deoxiuridina (EdU) como marcador de síntesis de ADN. EdU es incorporado por las células que están sintetizando activamente ADN, y esta incorporación puede ser detectada mediante revelado con un compuesto fluorescente y el número de células positivas, cuantificado mediante citometría de flujo.

Se sembraron células de la línea NP-18 en placas de 60 mm de diámetro, a razón de 3×10^5 células por placa. Veinticuatro horas más tarde las células fueron transducidas con AdTK a una dosis de 300 vp/célula, durante cuatro horas. Al cabo de este tiempo, se retiró el medio de transducción y se estableció este momento como inicio del experimento (t_0). Para obtener una medida cuantitativa de la síntesis de ADN en respuesta a TK/GCV, UCN-01 o la combinación de ambos, durante las primeras veinticuatro horas de aplicado el tratamiento con ganciclovir, las células fueron divididas en cuatro grupos:

Grupo Control: medio fresco

Grupo UCN-01: medio fresco adicionado con 10 μ M del reactivo

EdU y 300 nM de UCN-01 a t_0 .

Grupo AdTK/GCV: medio fresco adicionado con 10 $\mu\text{g/mL}$ de ganciclovir a t_0 .

Grupo AdTK/GCV + UCN-01: medio fresco adicionado con 10 $\mu\text{g/mL}$ de ganciclovir a t_0 .

Los cuatro grupos fueron incubados en presencia de 10 μM de EdU y, al cumplirse las veinticuatro horas de iniciado el tratamiento (t_1), las células fueron recogidas por tripsinización, fijadas y almacenadas para su posterior revelado (Ver esquema en Fig. 18 A).

En paralelo se analizó el efecto de TK/GCV, sólo o en combinación con UCN-01, sobre la síntesis de ADN durante el período comprendido entre las 24 y 48 horas de iniciado el tratamiento con ganciclovir. Para ello, el tratamiento con ganciclovir fue iniciado a t_0 , mientras que tanto el reactivo EdU como UCN-01 (en los grupos que corresponda) fue aplicado a partir de las veinticuatro horas (t_1). En este caso, las células de todos los grupos fueron recogidas por tripsinización y fijadas a las 48 horas (t_2) (Ver esquema en Fig 18 B).

Un grupo adicional, que fue cultivado en ausencia de EdU, fue incluido en el experimento a modo de control negativo y utilizado para determinar la línea de corte para la intensidad de fluorescencia correspondiente a las células con marcaje positivo y negativo de EdU.

Al analizar mediante citometría de flujo el porcentaje de células con marcaje positivo para EdU, se observó que, durante las primeras 24 horas, el 45% de las células había incorporado EdU, indicando así que el 45% de las células habían sintetizado ADN *de novo* durante este período (Fig 16 A). Esto implica que, en caso de ser cultivadas en presencia de ganciclovir, el 45% de las células habría tenido la capacidad de incorporarlo. De las células que fueron cultivadas en presencia de ganciclovir durante las primeras 24 horas, sólo el 35% sintetizó ADN *de novo*, siendo la diferencia respecto al grupo control estadísticamente significativa (p -valor= 0,003). Por su parte, de las células que fueron cultivadas en presencia de UCN-01 durante las primeras 24 horas, el 40% de las células habían sintetizado ADN durante este período, siendo la diferencia con

respecto al control estadísticamente significativa (p -valor= 0,04).

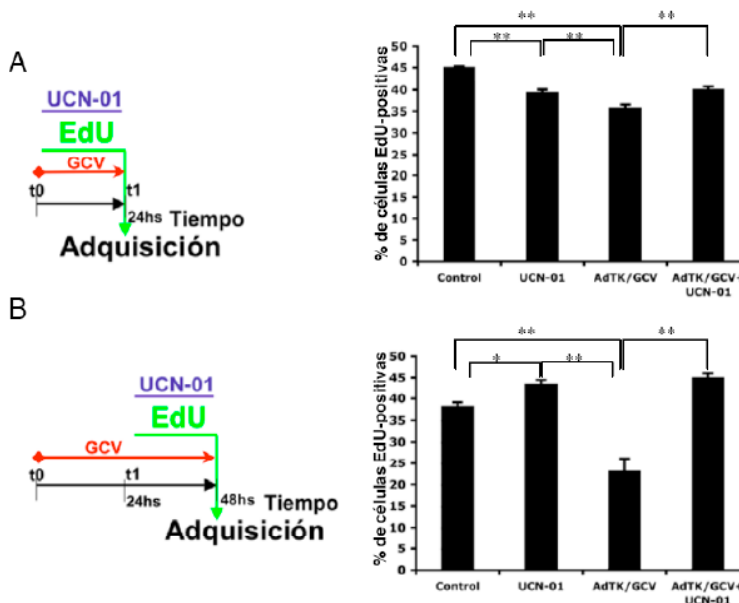


Figura 18. Inhibición de Chk1 y síntesis de ADN. Análisis de la síntesis de ADN en células NP-18 entre 0-24hs (A) o 24-48hs (B) de iniciado el tratamiento con [AdTK/GCV] = 50 x ID50, en presencia o ausencia de [UCN-01] = 300. Valores expresados como porcentajes de células positivas para el análogo nucleosídico EdU. Se muestran las medias de 3 experimentos independientes. * p -valor < 0,05; ** p -valor < 0,01.

Curiosamente, cuando ambos tratamientos fueron aplicados conjuntamente durante las 24 horas, se encontró que el 40% de las células era positiva para EdU, es decir que la inhibición de la síntesis de ADN inducida por TK/GCV se vio parcialmente revertida (p -valor= 0,001). Este efecto fue aún más notorio en los grupos en los que el tratamiento con UCN-01 y la incubación con EdU fueron aplicadas durante las últimas 24 horas de tratamiento con ganciclovir (esto es, comenzando cuando las células ya habían sido tratadas con ganciclovir durante 24 horas). En estas condiciones se observó que, del grupo control, el 38% de las células eran positivas para EdU, mientras que sólo el 23% de las células que habían sido tratadas con ganciclovir desde t0 habían sintetizado ADN durante las últimas 24 horas, siendo la diferencia estadísticamente significativa (p -valor= 0,004). Al aplicar, durante las últimas 24 horas, el tratamiento con UCN-01 conjuntamente con GCV, el porcentaje de células con marcaje positivo para EdU fue del 45%, indicando que UCN-01 es capaz de inhibir la inhibición en la síntesis de ADN inducida por TK/GCV (p -valor= 0,006) (Fig 18

B).

-Efectos de la inhibición de Chk1 sobre la sensibilidad a TK/GCV

Con el objetivo de evaluar el efecto de la inhibición de P-Chk1 sobre la eficiencia citotóxica de TK/GCV, se analizó la interacción entre ambos tratamientos calculando el índice de combinación (*Combination Index*, CI). Este parámetro relaciona la dosis de cada uno de los tratamientos que se necesita para obtener un dado efecto cuando se aplican individualmente, con la dosis de cada uno de los tratamientos que se necesita para obtener el mismo efecto cuando son aplicados conjuntamente. Así, un valor de CI igual a la unidad es indicativo de efecto aditivo de los dos tratamientos; un valor superior a uno es indicativo de antagonismo, mientras que un valor inferior a uno es indicativo de sinergismo positivo entre la acción de ambos tratamientos. Para realizar el análisis, se construyeron curvas-dosis respuesta para el tratamiento con UCN-01 a partir de las medidas de viabilidad celular resultantes tras aplicar un tratamiento de cuatro días con dosis crecientes del fármaco, en cada una de las líneas celulares. Posteriormente, para cada línea celular se calculó la relación entre las ID50 de cada tratamiento y se repitió el experimento tratando las células, esta vez, con dosis crecientes de ambos tratamientos de manera que la relación entre las dosis de cada uno sea, en cada punto, constante e igual a la relación entre las ID50. Dado que se ha descrito que UCN-01 es capaz de inducir un arresto en fase G1 (Otsubo, Bhawal et al. 2007), para evitar que el tratamiento con UCN-01 inhibiese la síntesis de ADN e interfiriese con la incorporación de ganciclovir, se retardó el inicio del tratamiento con este fármaco hasta 24 horas después de iniciado el tratamiento con ganciclovir. De esta manera, se espera que las células hayan sido capaces de incorporar ganciclovir durante el primer día de tratamiento.

Al cabo de cinco días de iniciado el tratamiento con ganciclovir, y de cuatro días de iniciado el tratamiento con UCN-01, se cuantificó la viabilidad celular de los cultivos mediante la técnica de MTT. Con estos datos se construyeron curvas dosis-respuesta y se calcularon los valores de ID50 para cada uno de los tratamientos. A continuación se calculó, para cada línea celular, la dosis necesaria para inducir una reducción en la viabilidad del cultivo o una fracción de inhibición (FI, del acrónimo en inglés de *Fractional Inhibition*) del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% y 90%

con cada uno de los tratamientos, aplicados individualmente o en combinación. Con estos datos se calcularon los valores de CI para cada nivel de inhibición, según la fórmula que se muestra en la figura 19. Los resultados muestran un claro efecto antagónico de la combinación para las líneas celulares NP-18, BxPC-3 y RWP-1. El efecto observado en las otras líneas celulares fue variable dependiendo de la FI analizada, hallándose un efecto aditivo o moderadamente sinérgico en las líneas NP-9 y NP-31, un efecto aditivo en la línea PANC-1 y, curiosamente, un efecto antagónico en MIA Paca-2 a cuando se analizó a valores de FI menores al 50%, mientras que la curva tendió hacia la zona de efecto aditivo o moderadamente sinérgico a valores de FI superiores (Fig 19).

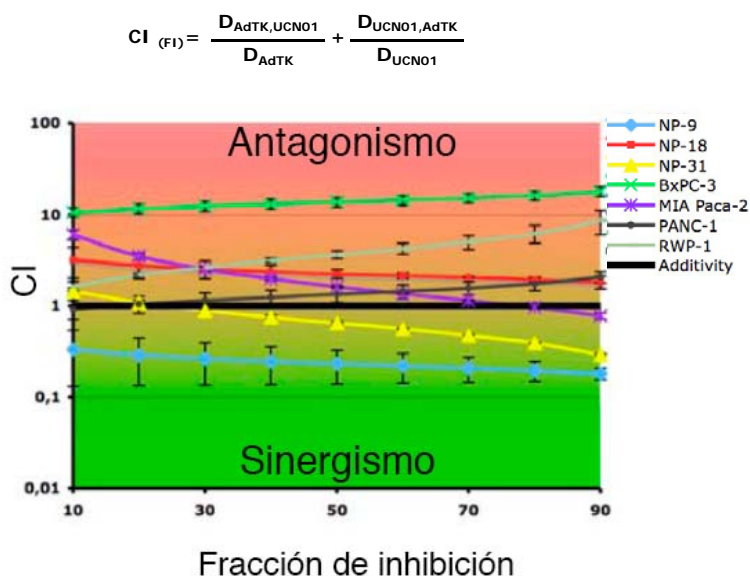


Figura 19. Análisis de interacción entre tratamientos. Se calculó el valor de CI para la combinación de AdTK/GCV con UCN-01, a los niveles de fracción de inhibición indicados. Se muestran las medias de 3 experimentos independientes +/- error estándar. $D_{AdTK,UCN01}$ y $D_{UCN01,AdTK}$: dosis AdTK o UCN-01, respectivamente, necesarias para obtener una determinada FI, cuando ambos agentes se administran en combinación. D_{AdTK} y D_{UCN-01} : dosis de AdTK o UCN-01, respectivamente, necesarias para obtener una determinada FI cuando los agentes se aplican por separado.

Estos resultados confirman la participación, al menos parcial, de Chk1 en los cambios en los perfiles de ciclo celular y la inhibición de la síntesis de ADN inducidos por el tratamiento con TK/GCV. Es importante resaltar, además, que la inhibición farmacológica del

checkpoint mediado por Chk1 produjo un efecto antagónico a la citotoxicidad inducida por TK/GCV en aquellas células que responden al tratamiento inhibiendo su progresión en el ciclo celular en fase S. Esta observación indicaría que la aplicación de un inhibidor de *checkpoint* como estrategia adyuvante para sensibilizar las células a un tratamiento genotóxico deben ser cuidadosamente analizada para tipo celular y para cada sistema terapéutico.

Los resultados de esta primera parte aportan datos sobre la relevancia que tienen los cambios producidos en el ciclo celular en respuesta al tratamiento con TK/GCV, como parte de su mecanismo de inducción de citotoxicidad. Adicionalmente, el hallazgo de genes con expresión diferencial en células resistentes al tratamiento con TK/GCV plantea una lista de potenciales genes de resistencia, cuyas funciones no están relacionadas con el control del ciclo celular.

4.2 Estudio de Estrategias para Incrementar la Potencia y/o la Selectividad del Sistema TK/GCV

a) Estudio del silenciamiento de un gen antiapoptótico para aumentar la potencia citotóxica del sistema TK/GCV

Siendo la inducción de apoptosis el evento culminante del mecanismo de acción postulado para TK/GCV, la citotoxicidad inducida por el tratamiento podría verse aumentada al amplificar la señal proapoptótica o disminuir las señales antiapoptóticas en la célula diana. Sobre esta base, se analizó la expresión de algunos de los genes directamente relacionados con la inducción y/o con la inhibición de la apoptosis, con el objetivo de diseñar una estrategia de sensibilización mediante la modulación de la expresión de dichos genes.

Expresión de genes antiapoptóticos en células de cáncer de páncreas

Se analizaron, mediante Western blot, los niveles proteicos de los genes antiapoptóticos XIAP y BCL2, y los del gen proapoptótico BAX, en células de las líneas NP-9, NP-18, NP-31, BxPC-3, MIAPaca-2, PANC-1 y RWP1 con el objetivo de definir un patrón de expresión de estos genes que pueda estar relacionado con el fenotipo de resistencia a TK/GCV. Como se muestra en la figura 20, se observó una marcada expresión de Bcl-2 en las líneas NP-9 y RWP-1, una expresión moderada en NP-18, BxPC-3 y MIAPaca-2, y una expresión baja en las células NP-31 y PANC-1. A su vez, la expresión de XIAP se encontró elevada en células NP-18, PANC-1 y RWP-1, y moderada en las células NP-9, NP-31 y BxPC-3. Por su parte, todas las líneas estudiadas presentaron niveles similares de Bax, mostrando una sutil diferencia las células NP-9 y PANC-1, con una expresión ligeramente menor que el resto. La relación entre los niveles de Bax y Bcl-2, que en muchas ocasiones resulta más informativa que los niveles absolutos de una y otra proteína, tampoco permitieron establecer una relación entre la sensibilidad de las células a TK/GCV y posibles desbalances en la expresión de estas moléculas que pudieran estar asociadas a una alteración en las vías de inducción de apoptosis. No obstante, para descartar la presencia de dichas alteraciones sería necesario realizar un análisis detallado, no sólo de los niveles proteicos, sino además de la

funcionalidad de estas proteínas y de otros mediadores y efectores de las vías relacionadas con la inducción de muerte celular programada.

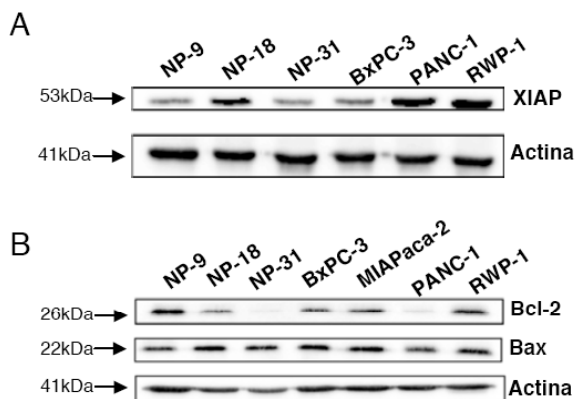


Figura 20. Expresión de genes antiapoptóticos y proapoptóticos en líneas celulares de cáncer de páncreas. Se evaluó mediante Western blot la expresión basal de las proteínas A) XIAP y B) Bcl-2 y Bax.

Silenciamiento del gen BCL2 mediante interferencia de ARN (RNAi)

A pesar de no hallarse una clara asociación entre los niveles de expresión de los genes XIAP, BCL2 y BAX con la respuesta a TK/GCV en las líneas celulares analizadas, se decidió explorar si la inhibición de un gen antiapoptótico podría influir en la sensibilidad celular al tratamiento. Para ello, se diseñó una estrategia que utiliza la tecnología RNAi como herramienta para disminuir los niveles de expresión de dicho gen, según se describe a continuación.

- Selección de secuencias diana candidatas

Se escogieron tres secuencias de veintiún nucleótidos de la región codificante del gen BCL2 que comenzaran en guanina (en la posición 5'), que tuviesen un contenido de guaninas y/o citidinas entre el 55% y 75% y que no presentaran homología con otras regiones del genoma humano, según se pudo verificar mediante una búsqueda utilizando la herramienta BLAST en la base de datos GenBank. Las tres secuencias escogidas, que se muestran en la figura 21 A, corresponden a los veintiún nucleótidos presentes a partir de las posiciones 354, 381 y 433 del ADNc anotado con el

número de acceso a GenBank: M14745.

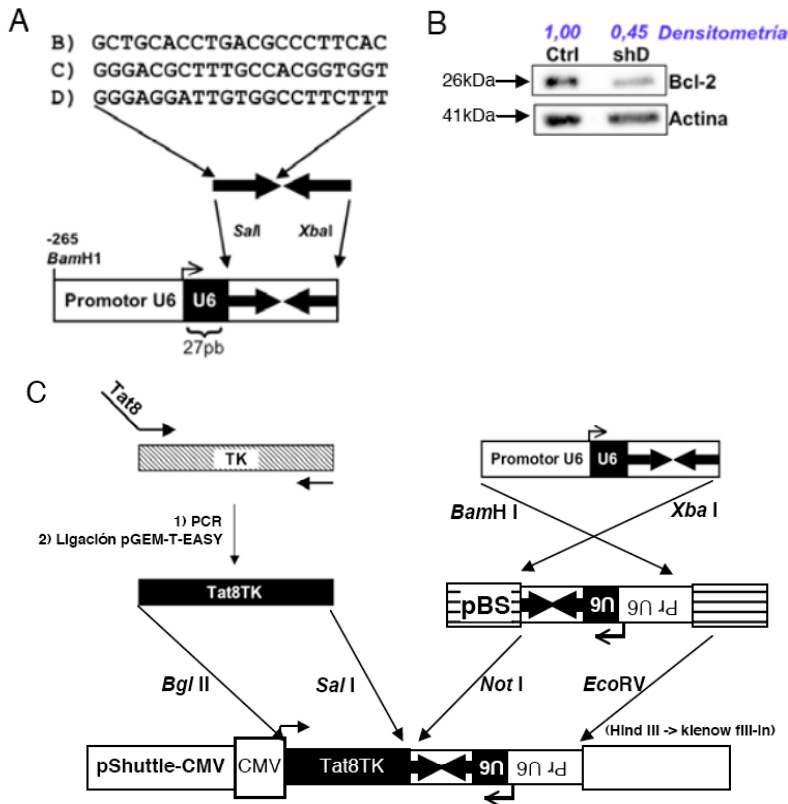


Figura 21. Silenciamiento de BCL2. A) Construcción de los vectores pAVU6+27-shBCL2B, pAVU6+27-shBCL2C y pAVU6+27-shBCL2D pShuttle-CMV-Tat8TK-shBCL2. B) Western blot para Bcl-2 a partir de extractos de células HEK293T transfectadas con pAVU6+27-shBCL2B o pAVU6+27. Cuantificación densitométrica de los niveles de proteína Bcl-2 normalizados por expresión de actina y expresados en relación a los niveles de Bcl-2 en el control transfectado con pAVU6+27. C) Representación esquemática de la generación de la construcción pShuttle-CMV-Tat8TK-shBCL2, mediante clonaje secuencial del ADNc de Tat8TK y del cassette de expresión del shRNA específico para BCL2 en el plásmido lanzadera pShuttle-CMV.

- Construcción de un vector plasmídico para la expresión de ARN en conformación de horquilla (shRNA)

Para la generación de vectores de expresión de shRNAs con especificidad para las secuencias diana del gen BCL2, se

sintetizaron tres pares de oligonucleótidos complementarios de manera que, tras hibridar entre sí, forman tres fragmentos de ADN de doble cadena que consta, en la cadena 'sentido', de (ver esquema en figura 21 A):

- a) un extremo cohesivo *SaII*
- b) la secuencia escogida
- c) una región espaciadora de seis pares de bases (diana *HindIII*)
- d) el complemento reverso de la secuencia escogida
- e) cinco deoxitimidinas (señal de terminación para la ARN polimerasa III)
- f) extremo cohesivo *XbaI*

(la secuencia completa de cada uno de los oligonucleótidos se detallan en el capítulo Materiales y Métodos).

Cada par de oligonucleótidos fue incubado independientemente y cada uno de los fragmentos resultantes fueron clonados en el vector pAVU6+27, dando lugar a las construcciones pAVU6+27-shBCL2-354, pAVU6+27-shBCL2-381 y pAVU6+27-shBCL2-433, en función de la posición del primer nucleótido de la secuencia diana en el ADNc M14745.

- Selección de shRNAs con eficacia silenciadora

Con el objetivo de escoger una construcción que fuera capaz de silenciar la expresión de Bcl-2, células de la línea HEK293T fueron transfectadas con las construcciones generadas. Al cabo de 48 horas se analizaron los niveles proteicos de Bcl-2 mediante Western blot, observándose que la construcción pAVU6+27-shBCL2-433 es capaz de reducir los niveles de Bcl-2 en aproximadamente un 50 %, con respecto al valor basal de células HEK293 transfectadas con el plásmido vacío (Fig 21 B).

- Construcción de un vector plasmídico bifuncional para la expresión conjunta de Tat8TK y shRNA

A continuación, se procedió a la construcción de un vector plasmídico para la expresión conjunta de la proteína de fusión Tat8TK y el shRNA con especificidad para Bcl-2, mediante el

proceso que se esquematiza en la figura 21 C. En primer lugar, se amplificó por PCR la región codificante de TK, utilizando un par de cebadores de los cuales el correspondiente a la región 5' contiene, además de la zona de homología con el ADNc de TK, los nucleótidos que codifican para el péptido Tat8. El amplicón resultante fue clonado en el vector pGEM-T-EASY y amplificado mediante maxipreparación (realizado en nuestro laboratorio por Alex Rojas). El plásmido resultante fue, a su vez, digerido con *Bgl*II y *Sal*I y el fragmento liberado fue clonado en el plásmido pShuttle-CMV, dando lugar a la construcción pShuttle-CMV-Tat8TK. Paralelamente, se extrajo mediante digestión con *Bam*HI y *Xba*I el fragmento de pAVU6+27-shBCL2-433 que contiene el promotor y los primeros veintisiete pares de bases del ARN nucleolar U6 y la secuencia palindrómica correspondiente a los oligonucleótidos clonados. Este fragmento se subclonó en el plásmido pBluescriptS/K +/-, entre las dianas de restricción *Xba*I y *Bam*HI, generando así la construcción pBSU6+27-shBCL2-433, de la cual se extrajo, a su vez, el inserto mediante digestión con *Not*I y *Eco*RV. El fragmento liberado fue clonado en el plásmido pShuttle-CMV-Tat8TK, previa digestión de éste con *Hind*III y generación de un extremo romo mediante digestión con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E coli* (*Klenow fill-in*). Así, se obtuvo la construcción pShuttle-CMV-Tat8TK-shBCL2-433, en la cual se verificó la presencia del ADNc de Tat8TK y del cassette de expresión de shRNA contra BCL2 mediante secuenciación directa.

- Análisis de la eficacia citotóxica de la combinación del tratamiento TK/GCV con el silenciamiento de BCL2

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad de la enzima Tat8TK y la potencia citotóxica de la combinación con shBCL1-433 se transfectaron, mediante precipitación con fosfato cálcico, células HEK293T con la construcción pShuttle-CMV-Tat8TK-shBCL2-433 o con pShuttle-CMV-Tat8TK a modo de control. Veinticuatro horas después de la transfección, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos, a razón de 3000 células por pocillo, y se inició el tratamiento con 10 µg/mL de ganciclovir o con medio fresco, por triplicados. Al cabo de tres días se midió la viabilidad de los cultivos mediante la técnica de MTT y se graficaron los resultados como porcentajes de viabilidad, tomando como 100% de viabilidad el valor de absorbancia del cultivo transfectado con pShuttle-CMV-

Tat8TK cultivado en ausencia de ganciclovir. Como se observa en la figura 22 A, el tratamiento con ganciclovir redujo el porcentaje de células viables a 11,8% en las células transfectadas con pShuttle-CMV-Tat8TK y a 7% en las células transfectadas con pShuttle-CMV-Tat8TK-shBCL2-433. La transfección con esta última construcción, en ausencia de ganciclovir, produjo una reducción en la viabilidad del cultivo a 61,1% del control, indicando que el silenciamiento de BCL2 podría inducir citotoxicidad por sí mismo.

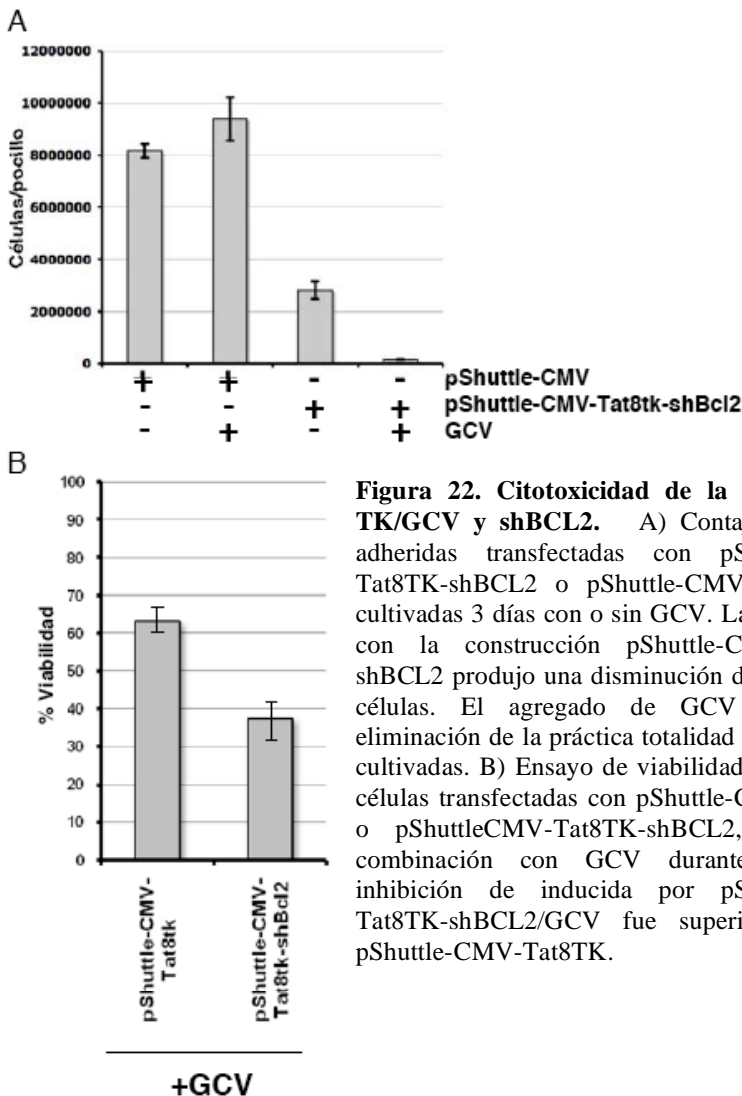


Figura 22. Citotoxicidad de la combinación TK/GCV y shBCL2. A) Contaje de células adheridas transfectadas con pShuttle-CMV-Tat8TK-shBCL2 o pShuttle-CMV (control) y cultivadas 3 días con o sin GCV. La transfección con la construcción pShuttle-CMV-Tat8TK-shBCL2 produjo una disminución del número de células. El agregado de GCV produjo la eliminación de la práctica totalidad de las células cultivadas. B) Ensayo de viabilidad por MTT en células transfectadas con pShuttle-CMV-Tat8TK o pShuttleCMV-Tat8TK-shBCL2, ambas en combinación con GCV durante 48hs. La inhibición de inducida por pShuttle-CMV-Tat8TK-shBCL2/GCV fue superior a la de pShuttle-CMV-Tat8TK.

Una vez corroborada la funcionalidad de la enzima TK codificada por pShuttle-CMV-Tat8TK-shBCL2, se realizó una comparación entre la inhibición de viabilidad celular inducida por Tat8TK/GCV con o sin silenciamiento de BCL2. Para ello, se transfectaron células HEK293T con pShuttle-CMV-Tat8TK o pShuttle-CMV-Tat8TK-BCL2 y se analizó la viabilidad celular de las mismas tras dos días de tratamiento con ganciclovir. La expresión combinada de Tat8TK y shRNA específicos para BCL2 produjo una mayor inhibición que la expresión de Tat8TK en solitario (Fig 22B).

- Producción de AdTat8TK-shBCL2-433

Se cotransformaron el plásmido pShuttle-CMV-Tat8tk-shBcl2 y el plásmido que contiene el genoma viral en células *E coli* de la cepa BJ5183 (recombinasa positiva) para que se lleve a cabo la integración de los transgenes en el genoma viral. Tras escoger los clones recombinantes, se verificó por secuenciación directa la presencia del cDNA de TK y del promotor U6 con la secuencia del shRNA.

Posteriormente, se transfectó esta construcción en células HEK293 para la producción de los viriones y su posterior amplificación. Se purificó el adenovirus mediante ultracentrifugación en gradientes de CsCl y se determinó el título de partículas virales utilizando una técnica espectrofotométrica, obteniéndose un título viral de 8×10^9 vp/mL. La cuantificación de partículas con capacidad de transducción (TU), realizada mediante la técnica de tinción de la proteína hexón, indicó un título viral de $1,5 \times 10^7$ TU/mL.

- Actividad de AdTat8TK-shBCL2-433

Se evaluó la capacidad silenciadora de AdTat8TK-shBCL2-433 a la vez que su potencia citotóxica en una línea celular resistente que expresa altos niveles de Bcl-2: NP-9. Para ello, se plaquearon células NP-9 en placas de 24 pocillos, a razón de 2×10^4 células por pocillo y veinticuatro horas más tarde fueron infectadas durante cuatro horas con AdTat8TK-shBCL2-433, o AdTat8TK, a seis dosis diferentes y por duplicado: 0, 1, 10, 10^2 , 10^3 y 10^4 vp/célula. Una placa se utilizó para evaluar cualitativamente la inducción de toxicidad con cada uno de los virus, en presencia y ausencia de ganciclovir, por ello se incubó la mitad de los pocillos de cada virus

con 10 µg/mL de ganciclovir y la otra mitad se cultivó con medio fresco durante tres días. Transcurrido este tiempo, se tiñeron las células con azul de metileno, observándose una menor tinción a partir de la dosis viral de 10^3 , en las células infectadas con AdTat8TK que recibieron, además, ganciclovir, mientras que las células infectadas con AdTat8TK que no recibieron la prodroga no manifestaron ningún cambio apreciable en la viabilidad de los cultivos. Por el contrario, las células infectadas con AdTat8TK-shBCL2-433 presentaron una menor tinción, que los controles no infectados, a partir de la dosis de 10^3 vp/célula, independientemente de haber sido tratadas con ganciclovir o no (Fig 23 A). Paralelamente, se infectó una segunda placa, con las mismas dosis de virus que el experimento anterior, pero no se agregó ganciclovir en ningún pocillo. Al cabo de tres días se recogieron las células y se prepararon extractos proteicos para analizar la expresión de Bcl-2 por Western blot. Como se muestra en la figura 23 B, los niveles de Bcl-2 se vieron disminuidos a un 30% en las células NP-9 tratadas con AdTat8TK-shBCL2-433 a una dosis de 10^4 vp/célula, con respecto al control no infectado, pero no se observaron cambios en las células transducidas con el mismo virus a dosis más bajas, ni en aquellas transducidas con AdTat8TK.

Para obtener una medida cuantitativa de la potencia citotóxica de AdTat8TK-shBCL2-433, en comparación con AdTat8TK, se realizaron curvas dosis-respuesta de uno y otro adenovirus en presencia de una dosis constante de ganciclovir (10 µg/mL) en células NP-18 y se calcularon los valores de ID50 a tres días de iniciado el tratamiento con la prodroga, según se muestra en la figura 23 C. Sorprendentemente, el tratamiento con AdTat8TK-shBCL2-433 en presencia de ganciclovir no sólo fue menos potente que el tratamiento con AdTat8TK con ganciclovir (ID50= 2033,51 vp/célula y 93,39 vp/célula, respectivamente) sino que fue menos potente que el tratamiento con AdTat8TK-shBCL2-433 sólo (ID50= 769,06 vp/célula).

Con el objetivo de hallar una explicación para el efecto que ejerce ganciclovir cuando se combina con AdTat8TK-shBCL2-433, se analizó la presencia de viriones recombinantes con capacidad de replicar. Resultados obtenidos previamente en el laboratorio indicaban que, en células NP -18, el tratamiento con

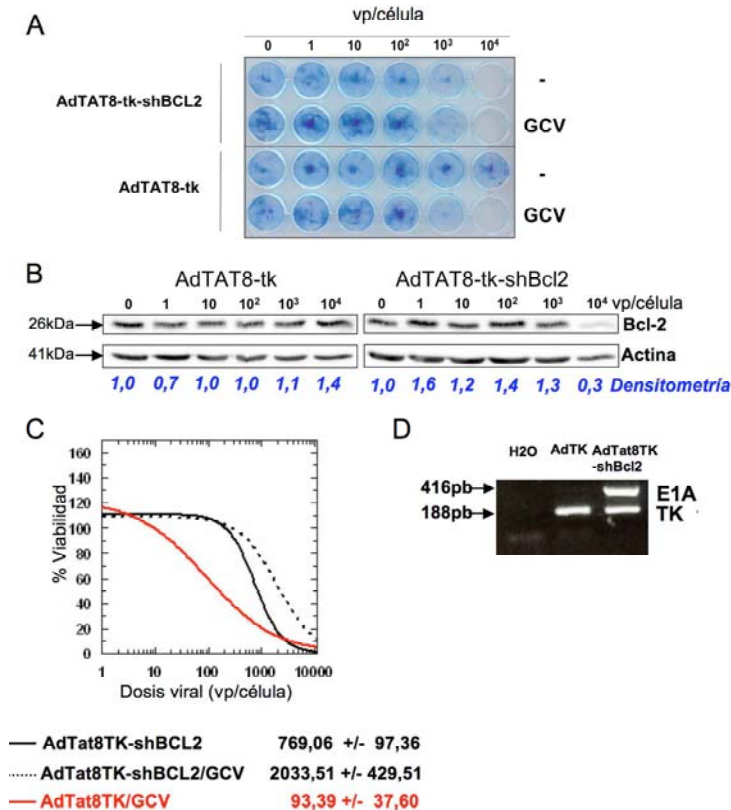


Figura 23. Citotoxicidad de AdTat8TK-shBCL2-433 en NP-9 y NP-18.

A) Las células resistentes a TK/GCV NP-9 fueron sembradas en placas de 24 pocillos. Tras ser infectadas con las dosis indicadas de AdTat8TK o AdTat8TK-shBCL2 y se las cultivó en presencia o ausencia de GCV y al cabo de 3 días se tiñeron las células adheridas con azul de metileno. B) En paralelo, se analizaron por Western blot los niveles proteicos de Bcl-2 en células NP-9 transducidas en idénticas condiciones a las descritas en (A) y cultivadas en ausencia de GCV durante 48hs. Los resultados de la densitometría se expresan normalizados por los niveles de actina y como múltiplos de los niveles de Bcl-2 en las células sin transducir. C) Curvas dosis-respuesta para AdTat8TK/GCV y AdTat8TK-shBCL2-433 en presencia y ausencia de GCV. Se indican los valores de ID50 de cada tratamiento +/- el error estándar. D) RT-PCR *multiplex* de TK y E1A, en células NP-18 transducidas con AdTK o AdTat8TK-shBCL2-433.

ganciclovir inhibía parcialmente la citotoxicidad inducida por el efecto lítico de un virus replicativo armado con la enzima TK, presumiblemente debido a una acción viroestática de los metabolitos de la prodroga (Cascante, Abate-Daga et al. 2007). En base a aquellas observaciones, se planteó una hipótesis, para explicar los

resultados de este experimento, según la cual parte de la citotoxicidad observada en el experimento sería producida por adenovirus contaminantes con capacidad de replicación. Así, la adición de ganciclovir interferiría con la replicación de los mismos, induciendo un efecto antagónico. Se analizó mediante RT-PCR *multiplex* la expresión de ARNm que codifica para E1A (gen deletado del genoma adenoviral en los vectores de primera generación) y del ARNm de TK en el ARN total de células NP-18 transducidas previamente con AdTat8TK-shBCL2-433. Como se muestra en la figura 23 D, las células infectadas con AdTat8TK-shBCL2-433 expresaban tanto TK como E1A, indicando la presencia de partículas virales contaminantes con capacidad de replicación.

Lo descrito en este apartado indica que el silenciamiento de BCL2 podría tener una potencial aplicación como estrategia adyuvante para la potenciación de la citotoxicidad inducida por TK/GCV, principalmente en base a los resultados obtenidos en células HEK 293T. No obstante, la validación de BCL2 como gen de resistencia a TK/GCV en células tumorales no pudo llevarse a cabo debido a inconvenientes técnicos en la producción de un *stock* concentrado de AdTat8TK-shBCL2-433 libre de adenovirus replicativos contaminantes. En base a la observación de una inhibición en el crecimiento de las células productoras del adenovirus, se postuló que la toxicidad inducida por el silenciamiento de BCL2 en las mismas, sumada a la presencia de secuencias palindrómicas en el genoma del adenovirus, podrían generar un ambiente propicio para la selección de adenovirus que han incorporado el gen E1A de las células empaquetadoras mediante eventos de recombinación. Como alternativa se planteó la posibilidad de desensibilizar las células HEK293T al silenciamiento de BCL2, consiguiendo la expresión de altos niveles de la proteína mediante transfección estable, o bien de rediseñar el vector, utilizando una secuencia miRNA bajo el control de un promotor inducible en lugar de una secuencia shRNA expresada constitutivamente. Con el objetivo de priorizar el avance de las demás líneas de investigación descritas en este trabajo, se discontinuó el estudio de validación de BCL2 como diana terapéutica en este punto, pero consideramos que la optimización del proceso de producción de adenovirus que expresan TK y moléculas silenciadoras de BCL2 podría dar lugar a la aplicación de estrategias con un gran potencial terapéutico.

b) Estudio de la utilización de un adenovirus replicativo para incrementar la potencia citotóxica del sistema TK/GCV. Análisis de eficacia, elementos de seguridad y monitorización *in vivo*

Estudio de la combinación de la citotoxicidad inducida por TK/GCV con la muerte por lisis viral

- Comparación de la citotoxicidad inducida por AdTK/GCV y por AdRGDTat8TK-L *in vitro*

Se realizó un análisis de tipo dosis-respuesta para comparar la sensibilidad de las líneas celulares NP-18, NP-31, PANC-1 y BxPC-3 al tratamiento con el sistema TK/GCV cuando la transferencia del ADNc de la enzima TK se realizaba utilizando bien un vector no replicativo de primera generación (AdTK) de expresión constitutiva, o bien un vector adenoviral replicativo que expresa el gen terapéutico como gen de fase tardía (AdRGDTat8TK-L, ver esquema en figura 24 A), generado previamente en el laboratorio (Cascante, Abate-Daga et al. 2007). Para tal fin, se sembraron células de cada una de las líneas en placas de 96 pocillos y 24 horas más tarde se infectaron por triplicado con dosis crecientes de AdTK o AdRGDTat8TK-L, durante cuatro horas. Transcurrido este tiempo, se reemplazó el medio de infección por medio fresco, el cual fue, a su vez, reemplazado 24 horas más tarde por medio fresco suplementado con 10µg/mL de GCV. Al cabo de tres días se realizó un ensayo de MTT para cuantificar la viabilidad de los cultivos, se construyeron curvas de tipo dosis-respuesta y se calcularon los valores de ID50 para cada tratamiento y para cada línea celular. Los resultados indicaron, que en las cuatro líneas celulares estudiadas, el tratamiento con AdRGDTat8TK-L/GCV fue más potente (esto es, presentó menor ID50) que el tratamiento con AdTK/GCV. La magnitud del incremento en la potencia varió según la línea celular, entre 9 o 11 veces en las líneas PANC-1 y NP-18, respectivamente, y 2 veces tanto en la línea BxPC-3 como en la línea NP-31 (Fig 24 B).

Resultados

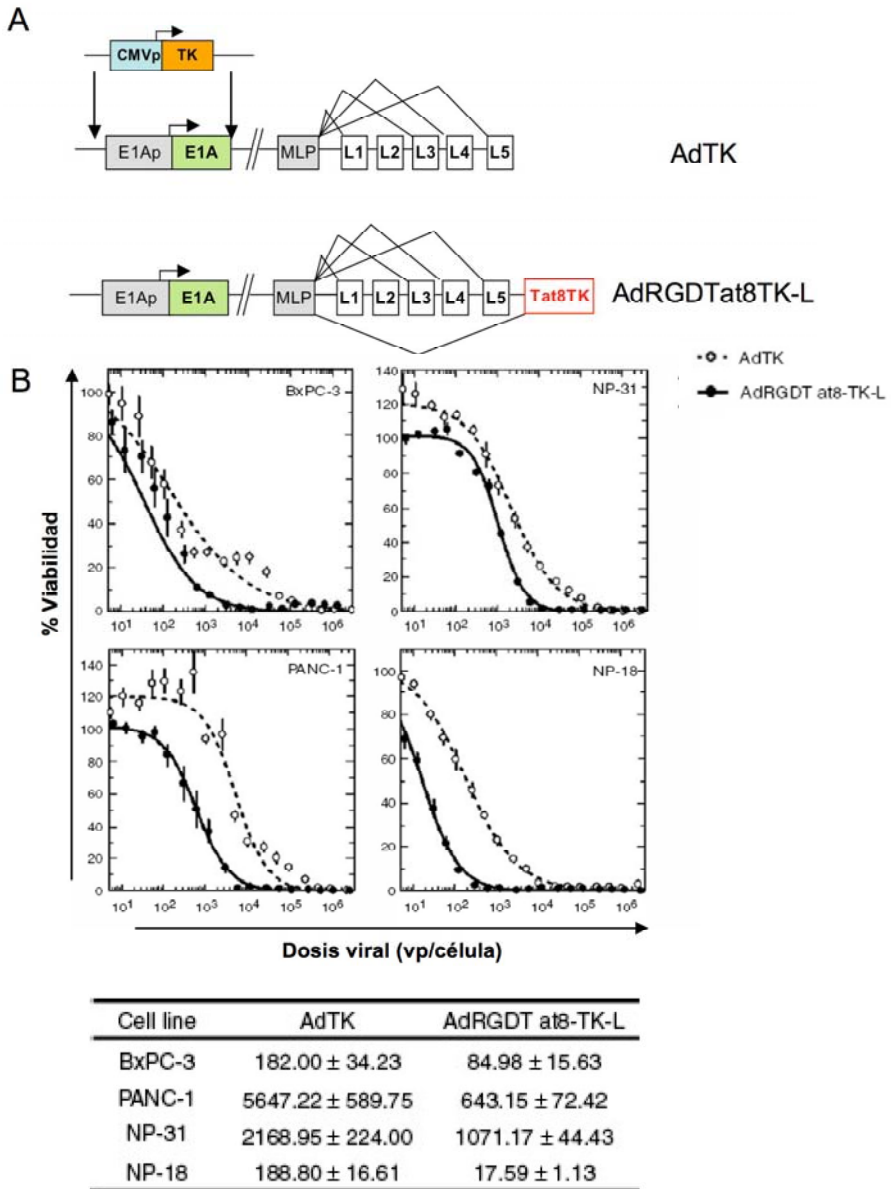


Figura 24. AdRGDTat8TK-L/GCV vs AdTK/GCV. A) Representación esquemática de parte del genoma de AdTK y de AdRGDTat8TK-L. En AdTK, el gen E1A y su promotor son reemplazados por el cassette de expresión de TK bajo el control del promotor CMV. En AdRGDTat8TK-L, el ADNc de Tat8TK está clonado bajo el control del MLP, que producirá la expresión de un transcrito policistrónico conteniendo los genes tardíos y Tat8TK con un sitio aceptor de *splicing* en el extremo 5'. B) Curvas dosis-respuesta para AdTK y AdRGDTat8TK-L en líneas BxPC-3, NP-31, PANC-1 y NP-18. En la tabla se listan los valores de ID50 con sus respectivos errores estándar.

Dado que el virus AdRGDTat8TK-L presenta una modificación en el dominio *Knob* de la proteína de la Fibra de la cápside, que modifica el tropismo natural del adenovirus hacia su receptor celular CAR favoreciendo la infección mediada por integrinas, se realizó un estudio tendiente a determinar si el incremento en potencia se debió exclusivamente a una mayor eficiencia de transducción de AdRGDTatTK-L con respecto a la de AdTK. Se utilizaron dos vectores adenovirales reporteros que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control de un promotor constitutivo CMV, siendo el único rasgo distintivo entre ambos vectores la presencia (AdTLRGD) o ausencia (AdTL) del motivo RGD en el dominio *Knob* de la fibra.

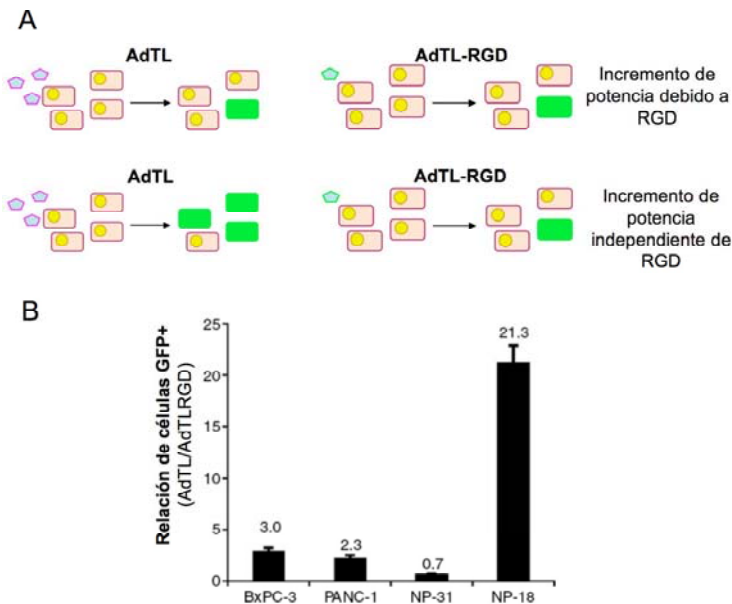


Figura 25. Infectividad y potencia citotóxica. A) Representación esquemática del experimento de comparación de infectividad de AdTL y AdTL-RGD a dosis virales correspondientes a las ID50 de AdTK y de AdRGDTat8TK-L, respectivamente. En caso de ser, la diferencia de citotoxicidad de éstos últimos, dependiente exclusivamente de una mayor infectividad debido a la modificación RGD, el porcentaje de células transducidas por un y otro virus a estas dosis sería idéntico. Por el contrario, un mayor porcentaje de células transducidas con AdTL que con AdTL-RGD, es indicativo de una mayor citotoxicidad, de AdRGDTat8TK-L, independiente del incremento de infectividad otorgado por el motivo RGD. B) Relación de porcentajes de células transducidas con AdTL y AdTL-RGD para las líneas BxPC-3, PANC-1, NP-31 y NP-18 +/- error estándar.

Cada línea celular fue transducida a una dosis viral de AdTL igual a su ID50 para AdTK y a una dosis viral de AdTLRGD igual a su ID50 para AdRGDTat8TK-L. Si asumimos que la infectividad de AdTL es igual a la de AdTK y que la de AdTLRGD es igual a la de AdRGDTat8TK-L, se espera que para cada línea celular la relación de los porcentajes de células que expresan GFP, tras ser infectadas con AdTL o con AdTLRGD, sea igual a uno si la diferencia entre la potencia de AdTK/GCV y AdRGDTat8TK-L/GCV se debe exclusivamente a una diferencia en infectividad. Esta situación se podría interpretar de la siguiente manera: para obtener un mismo efecto citotóxico (en este caso: inhibición de la viabilidad del cultivo en un 50%) se necesita alcanzar el mismo porcentaje de células transducidas con uno u otro vector (AdTK o AdRGDTat8TK-L), independientemente de que para alcanzar esta igualdad sea necesario agregar al medio de infección una mayor cantidad de AdTK que de AdRGDTat8TK-L. Por el contrario, si la relación de porcentajes de células infectadas con AdTL que expresan GFP con respecto al porcentaje de células infectadas con AdTLRGD que cumplen esta condición es mayor a uno, podríamos inferir que necesitaríamos un mayor número de células transducidas con AdTK para obtener el mismo efecto citotóxico que se obtendría con un menor número de células transducidas con AdRGDTat8TK-L. Este resultado indicaría que existe una diferencia de potencia citotóxica real entre ambos vectores, independiente de las diferencias en sus eficiencias de transducción (ver esquema en figura 25A). En la figura 25B se muestran los resultados obtenidos con las células NP-18, BxPC-3, NP-31 y PANC-1. La relación de porcentajes de células positivas para el vector AdTL y AdTLRGD fue superior a uno para las líneas NP-18 (21,3), BxPC-3 (3) y PANC-1 (2,3), mientras que fue inferior a uno para la línea NP-31 (0,7).

Estos resultados demuestran que el tratamiento con un adenovirus replicativo armado con TK, en combinación con ganciclovir, induce una mayor citotoxicidad *in vitro* que el tratamiento con un vector adenoviral no replicativo que expresa TK, en combinación con ganciclovir. Mediante la comparación entre los valores de ID50 de uno y otro virus, podríamos afirmar que la combinación AdRGDTat8TK-L/GCV es más potente que la combinación AdTK/GCV en un factor de 2,14; 8,78; 2,02 y 10,73 veces para las líneas BxPC-3, PANC-1, NP-31 y NP-18, respectivamente.

- Comparación de la citotoxicidad inducida por AdRGDTat8TK-L en presencia y ausencia de GCV *in vivo*

Resultados obtenidos previamente en el laboratorio indican que, en células BxPC-3, el tratamiento combinado con AdRGDTat8TK-L y GCV es capaz de inducir citotoxicidad más eficientemente que el tratamiento con AdRGDTat8TK-L en ausencia de GCV, tanto *in vitro* como *in vivo*, cuando se administran de manera alternada el vector viral y la prodroga. Sin embargo, los resultados *in vitro* obtenidos con las células de la línea NP-18 muestra claramente que GCV produce un efecto antagónico sobre la citotoxicidad inducida por AdRGDTat8TK-L (Cascaete, Abate-Daga et al. 2007, ver Anexo). Con el objetivo de comprobar si este efecto antagónico se manifiesta *in vivo*, se estudió la actividad antitumoral del virus, en presencia y ausencia de GCV, en un modelo animal de tumores subcutáneos, generados como xenoinjertos tras inoculación de células NP-18. Cuando los tumores hubieron alcanzado un volumen promedio de 100 mm³ los ratones fueron separados aleatoriamente en tres grupos: Control, AdRGDTat8TK-L/GCV y AdRGDTat8TK-L. A los grupos AdRGDTat8TK-L/GCV y AdRGDTat8TK-L se les administraron diariamente 2×10^{10} vp/tumor del virus AdRGDTat8TK-L, los días 0, 1, 7 y 8 del tratamiento. Al grupo AdRGDTat8TK-L/GCV se le administró, además, una dosis diaria de 100mg/kg de GCV durante los días 4, 5, 6, 11, 12 y 13 de tratamiento, mientras que al grupo AdRGDTat8TK-L se le administró, en su lugar, PBS. Tras realizar el seguimiento del volumen tumoral, se observó que ambos grupos tratados con AdRGDTat8TK-L presentaron un retraso en la progresión tumoral con respecto al grupo control, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p\text{-valor}_{\text{AdRGDTat8TK-L/GCV vs Control}} = 0,0173$; $p\text{-valor}_{\text{AdRGDTat8TK-L vs Control}} = 0,0391$) pero no se observó diferencia significativa entre los grupos tratados con virus ($p\text{-valor} = 0,7410$) (Fig 26).

Si bien ganciclovir puede inducir un efecto viroestático y comprometer la citotoxicidad inducida por AdRGDTat8TK-L en una línea celular y en un contexto *in vitro*, al analizar los efectos en un modelo *in vivo* no se observó ningún efecto antagónico derivado de la aplicación de la prodroga, sugiriendo que el peor efecto que podría provocar la administración de la misma es la ausencia de un beneficio terapéutico, pero no una interferencia con la acción

terapéutica del virus.

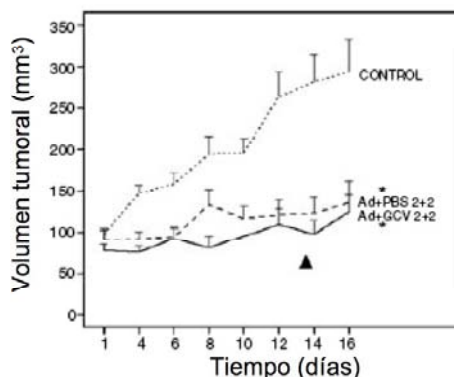


Figura 26. Influencia de GCV sobre la actividad antitumoral de AdRGDTat8TK-L en xenoinjertos de células NP-18. Seguimiento del volumen tumoral tras aplicar un tratamiento con AdRGDTat8TK-L (it) (línea discontinua), AdRGDTat8TK-L (it) + GCV (ip) (línea continua) o solución salina (it e ip) (línea de puntos). La flecha indica el final de tratamiento. Volúmenes expresados como medias de 10 tumores/grupo +/- error estándar. * p -valor < 0,05.

Estudio del uso del promotor de E2F como herramienta de control de la replicación adenoviral y de la expresión de TK

Con el objetivo de restringir la replicación viral y la expresión de TK a tejido tumoral, se generó un nuevo vector adenoviral clonando la secuencia codificante del péptido de fusión Tat8-TK bajo el control del *Major Late Promoter* del genoma de ICOVIR5. Al reemplazar el promotor endógeno del gen temprano E1A por un promotor cuya actividad transcripcional depende de los niveles celulares de E2F libre, ICOVIR5 es un adenovirus de replicación selectiva en células que presenten una alteración en la vía de Rb. La presencia de la señal de poliadenilación del virus SV40 y la secuencia DM en la región 5' de la unidad transcripcional E2Fp-E1A permite "aislar" la misma de la actividad transcripcional inespecífica de otras regiones del genoma viral (por ejemplo, secuencias *enhancer*). A su vez, la presencia de una deleción, de 24 pares de bases ($\Delta 24$), en la región codificante de E1A que corresponde al dominio proteico responsable de la disrupción del complejo Rb-E2F, impide que se produzca un incremento en los niveles celulares de E2F libre como consecuencia de la expresión de E1A. La región codificante de E1A $\Delta 24$ posee, además, la secuencia *Kozak* en el sitio de inicio de la traducción, elemento que

incrementa la traducción del transcrito de E1A Δ 24. En conjunto, estos elementos permiten disminuir significativamente la toxicidad de ICOVIR5 cuando es administrado sistémicamente en estrategias de viroterapia (Majem, Cascallo et al. 2006; Cascallo, Alonso et al. 2007).

- Generación de pICOVIR11

El genoma de ICOVIR11 fue generado por Juan Miguel Camacho, en el grupo del Dr Ramon Alemany, mediante recombinación homóloga entre los plásmidos pNKFiberRGDTat8TK y pICOVIR5SwaCAU. Brevemente, el plásmido pNKFiberRGDTat8TK (generado previamente en el laboratorio por Anna Cascante) fue digerido con las enzimas *NotI* y *KpnI* para liberar el fragmento que contine el ADNc de la fusión Tat8TK y parte de la región codificante de la proteína Fibra. En paralelo, se realizó la digestión enzimática del plásmido pICOVIR5SwaCAU con *SwaI* para linearizarlo, permitiendo así la posterior inserción del ADNc de Tat8TK detrás de la secuencia correspondiente a la proteína Fibra, tras ser transformados en *S cerevisiae* cepa YPH857. Posteriormente, se purificó el ADN de las levaduras y se utilizó para transformar células *E coli* mediante electroporación, a partir de las cuales se seleccionaron los clones recombinantes en función de sus marcadores de resistencia y de sus perfiles de restricción con *EcoRV*. A continuación se procedió a amplificar el clon que contenía la construcción pICOVIR11 y se realizó la purificación del mismo mediante maxipreparación.

- Producción y purificación de ICOVIR11

Células de la línea HEK293 fueron transfectadas con pICOVIR11, previa linearización del mismo mediante digestión con la enzima *PacI*, utilizando el sistema comercial *Superfect Transfection Reagent*. Al cabo de 5-7 días se observó efecto citopático producido por la replicación y liberación de partículas virales mediante lisis de las células empaquetadoras. En este punto se recogieron las células junto con el medio de cultivo para ser usado como iniciador del proceso de amplificación del vector adenoviral, que se llevó a cabo en células de la línea A549, carentes de E1A. Se escogieron estas células debido a que su elevada expresión de E2F libre permite la activación transcripcional de la unidad E2Fp-E1A del genoma

adenoviral, sin que exista riesgo de un recombinación homóloga que resulte en la generación de viriones con capacidad de expresar E1A bajo el control de su promotor endógeno. Las células infectadas fueron recogidas al observarse efecto citopático generalizado, separadas del sobrenadante, y lisadas mediante tres ciclos de congelación-descongelación. El extracto resultante fue sometido a ultracentrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio con el objetivo de aislar las partículas virales, que fueron almacenadas a -80°C para su posterior utilización. El título viral obtenido fue de $8,8 \times 10^{11}$ vp/mL ($1,02 \times 10^9$ TU/mL).

La presencia de E2Fp-E1A, así como de las secuencias codificantes de TK, Hexón y E1A, fue analizada mediante PCR usando ADN como molde, o bien mediante RT-PCR utilizando ARN mensajero de células infectadas con ICOVIR11 (ver esquema en Fig 27 A).

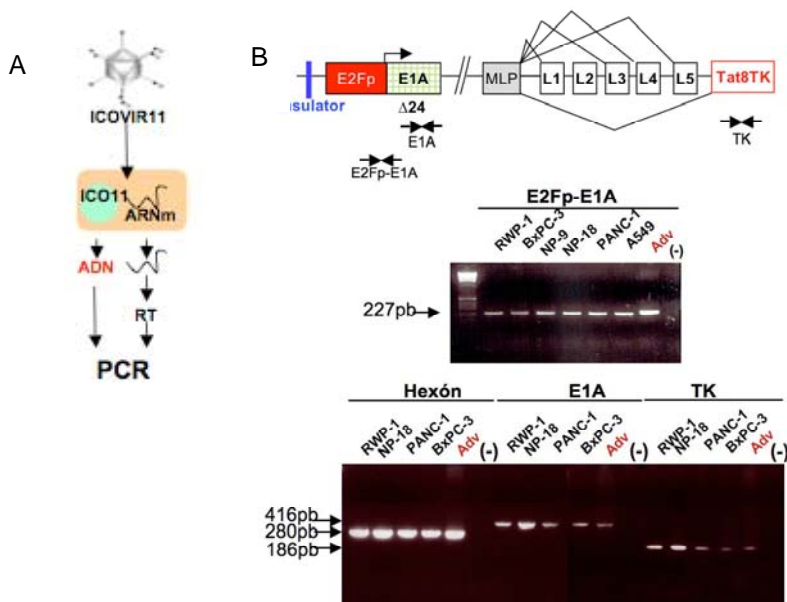


Figura 27. ICOVIR11. A) Representación esquemática del experimento de control de calidad del adenovirus ICOVIR11. Tras infectar las células (5×10^5 células/placa 10 cm \varnothing) con ICOVIR11 (1000vp/célula), se purificó ADN y ARN. Éste últimos fue utilizado como molde para la reacción de transcripción reversa, y tanto el producto de esta reacción, como el ADN fueron sometidos a PCR para verificar la presencia de E1A, E2Fp-E1A, hexón, y TK, tanto a nivel de transcrito como a nivel de ADN (sólo en NP-18). B) Representación esquemática de parte del genoma de ICOVIR11, sitios de hibridación de cebadores y resultados de PCR.

Como se muestra en la figura 27 B, el vector posee todos los elementos funcionales analizados y las células infectadas con ICOVIR11 son capaces de expresar el ARN mensajero de los mismos.

- Estudio comparativo de la potencia citotóxica de ICOVIR11, AdRGDTat8TK-L y AdRGDwt, en presencia y ausencia de ganciclovir

Con el objetivo de evaluar el posible impacto de la introducción de la secuencia codificante de Tat8TK y de los elementos de control de replicación viral en la potencia citotóxica de los adenovirus replicativos de serotipo 5, se realizó un análisis de tipo dosis-respuesta comparando la sensibilidad de las líneas celulares NP-9, NP-18, BxPC-3 y Panc-1 al tratamiento con los adenovirus que se enumeran a continuación. AdRGDwt: adenovirus de serotipo 5 cuya única diferencia con la forma salvaje consiste en la presencia de una secuencia RGD en el dominio *knob* de la proteína Fibra. AdRGDTat8TK-L: además de la secuencia RGD posee la secuencia codificante del péptido de fusión Tat8TK bajo el control del promotor de expresión tardía MLP. ICOVIR11: se diferencia de AdRGDTat8TK-L por la presencia de los elementos de control de replicación de la serie ICOVIR, esto es, reemplazo del promotor endógeno de E1A por el promotor de E2F, la delección $\Delta 24$ en la secuencia de E1A, la presencia de un elemento aislante (señal de poliadenilación de SV40 y secuencia DM) y la presencia de la secuencia *Kozak* en E1A. El tratamiento con cada uno de estos virus fue realizado en presencia y en ausencia de ganciclovir durante tres días, comenzando a las veinticuatro horas de la transducción, con el objetivo de evaluar también el efecto del tratamiento combinado con ganciclovir. Los experimentos se realizaron por triplicados en placas de 96 pocillos y la viabilidad relativa de los cultivos se calculó a partir de los resultados del experimento de MTT, asignando el valor correspondiente al 100% de viabilidad a las células que no fueron transducidas.

Las curvas dosis-respuesta para cada una de las líneas y cada uno de los tratamientos se muestran en la figura 28. Los valores de ID50 y sus correspondientes intervalos de confianza para el 95% se listan en la Tabla 5.

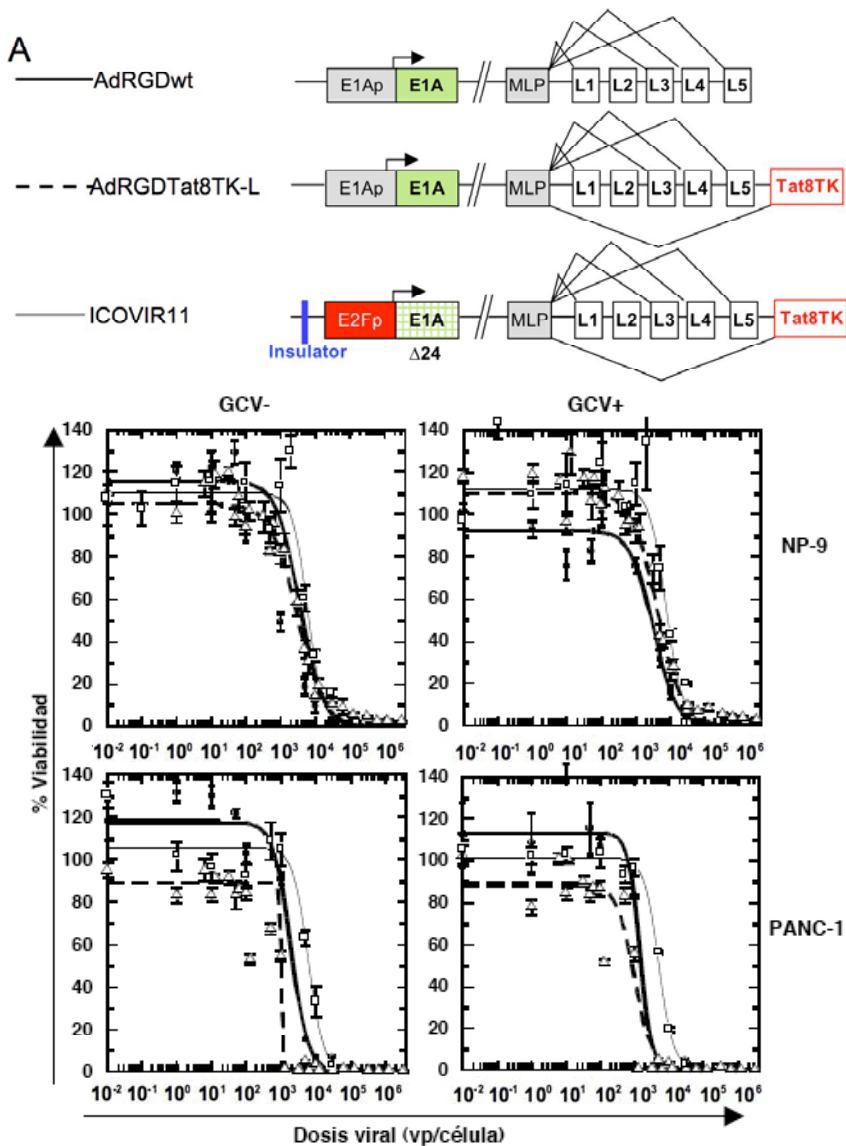


Figura 28. ICOVIR11 vs AdRGDTat8TK-L vs AdRGDwt. Curvas dosis-respuesta de ICOVIR11, AdRGDTat8TK-L y AdRGDwt, en presencia (derecha) o ausencia (izquierda) de GCV. Las células fueron cultivadas durante 4 hs en presencia de los virus respectivos. Al cabo de 24 hs se inició el tratamiento con [GCV] = 10 μ g/mL durante 3 días y posteriormente se evaluó la viabilidad celular mediante la técnica de MTT. Se muestran los porcentajes de viabilidad con respecto a los cultivos tratados con [virus]= 0 vp/célula, como medias de 3 experimentos independientes con sus respectivos errores estándar. A) Líneas NP-9 y PANC-1 (resistentes a TK/GCV).

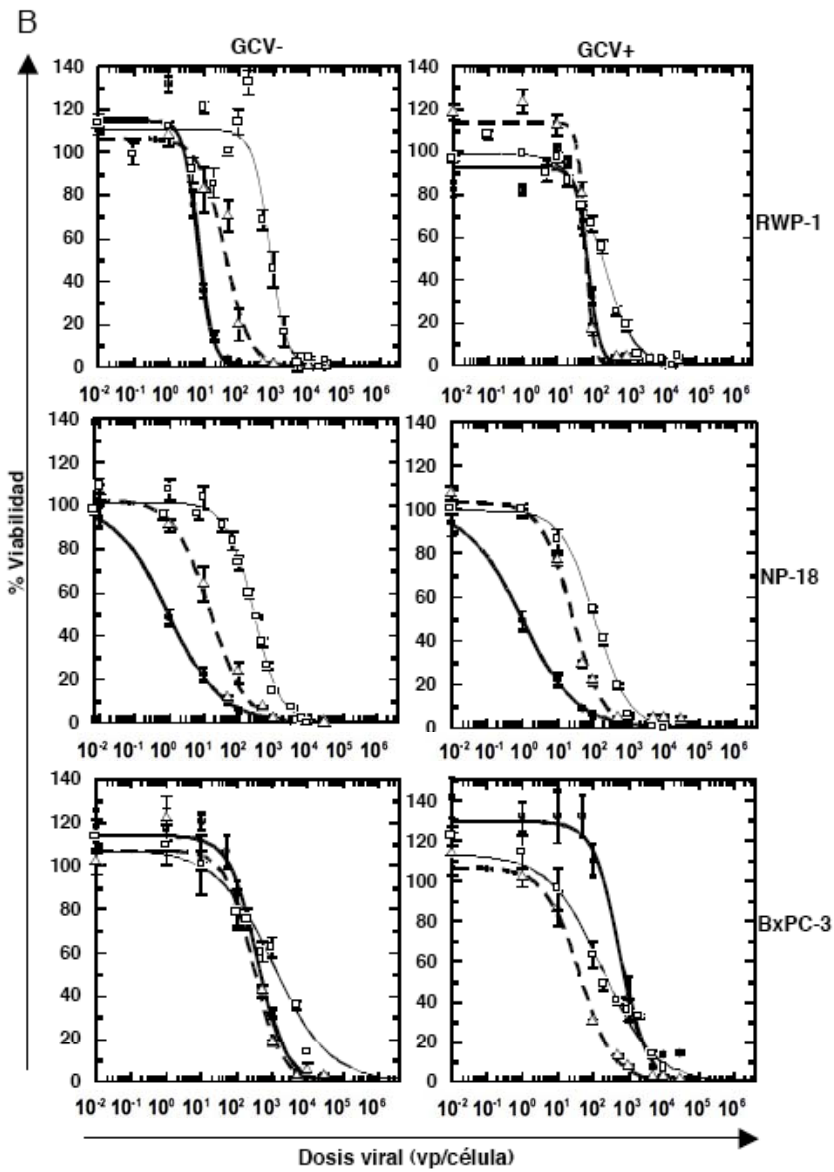


Figura 28. (cont.) B) Líneas RWP-1, NP-18 y BxPC-3 (sensibles a TK/GCV).

Tabla R5. ID50 y CI95% para AdRGGwt, AdRGDTat8TK-L e ICOVIR11

| Línea /Tratamiento | ID50 [vp/célula] | CI95% |
|----------------------------|----------------------------|------------------------|
| NP-9 AdRGDwt | 3580,63 | (2666,28 ; 4494,97) |
| NP-9 AdRGDwt +GCV | 3132,33 | (2057,02 ; 4207,64) |
| NP-9 AdRGDTat8TK-L | 2811,83 | (2235,48 ; 3388,18) |
| NP-9 AdRGDTat8TK-L + GCV | 4076,44 | (3388,09 ; 4764,78) |
| NP-9 ICOVIR11 | 6284,12 | (4545,15 ; 8023,09) |
| NP-9 ICOVIR11 + GCV | 7972,30 | (5844,38 ; 10100,22) |
| PANC-1 AdRGDwt | 1891,00 | (1365,69 ; 2416,31) |
| PANC-1 AdRGDwt +GCV | 1414,51 | (427,65 ; 2401,37) |
| PANC-1 AdRGDTat8TK-L | 985,57 | (832,80 ; 1138,34) |
| PANC-1 AdRGDTat8TK-L + GCV | 1028,51 | (989,92 ; 1067,10) |
| PANC-1 ICOVIR11 | 6399,09 | (4872,94 ; 7925,24) |
| PANC-1 ICOVIR11 + GCV | 5338,12 | (4358,01 ; 6318,23) |
| NP-18 AdRGDwt | 0,95 | (0,62 ; 1,28) |
| NP-18 AdRGDwt +GCV | 0,97 | (0,59 ; 1,36) |
| NP-18 AdRGDTat8TK-L | 15,07 | (10,47 ; 19,67) |
| NP-18 AdRGDTat8TK-L + GCV | 25,81 | (21,96 ; 29,65) |
| NP-18 ICOVIR11 | 277,08 | (245,90 ; 308,26) |
| NP-18 ICOVIR11 + GCV | 119,24 | (99,69 ; 138,79) |
| RWP-1 AdRGDwt | 7,02 | (6,16 ; 7,88) |
| RWP-1 AdRGDwt +GCV | 75,05 | (65,15 ; 84,95) |
| RWP-1 AdRGDTat8TK-L | 40,07 | (28,24 ; 51,89) |
| RWP-1 AdRGDTat8TK-L + GCV | 63,01 | (57,37 ; 68,65) |
| RWP-1 ICOVIR11 | 784,95 | (648,01 ; 921,90) |
| RWP-1 ICOVIR11 + GCV | 199,99 | (170,25 ; 229,74) |
| BxPC-3 AdRGDwt | 383,95 | (234,93 ; 532,97) |
| BxPC-3 AdRGDwt +GCV | 581,53 | (178,92 ; 984,15) |
| BxPC-3 AdRGDTat8TK-L | 294,33 | (195,85 ; 392,80) |
| BxPC-3 AdRGDTat8TK-L + GCV | 42,48 | (24,10 ; 60,85) |
| BxPC-3 ICOVIR11 | 1143,75 | (514,16 ; 1773,34) |
| BxPC-3 ICOVIR11 + GCV | 185,71 | (100,40 ; 271,02) |

Así, se observa que las líneas resistentes a TK/GCV **NP-9** y **Panc-1** no experimentaron un aumento significativo en la toxicidad inducida por cada uno de los adenovirus ensayados, al ser tratadas conjuntamente con ganciclovir (NP-9: $ID_{50_{AdRGDwt}} = 3580,63$ vp/célula; $ID_{50_{AdRGDwt+GCV}} = 3132,33$ vp/célula; $ID_{50_{AdRGDTat8TK-L}} = 2811,83$ vp/célula; $ID_{50_{AdRGDTat8TK-L+GCV}} = 4076,44$ vp/célula; $ID_{50_{ICOVIR11}} = 6284,12$ vp/célula; $ID_{50_{ICOVIR11+GCV}} = 7972,30$ vp/célula; Panc-1: $ID_{50_{AdRGDwt}} = 1891,00$ vp/célula; $ID_{50_{AdRGDwt+GCV}} = 1414,51$ vp/célula; $ID_{50_{AdRGDTat8TK-L}} = 985,57$ vp/célula; $ID_{50_{AdRGDTat8TK-L+GCV}} = 1028,51$ vp/célula; $ID_{50_{ICOVIR11}} = 6399,09$ vp/célula; $ID_{50_{ICOVIR11+GCV}} = 5338,12$ vp/célula).

Las células de la línea sensible **NP-18** no experimentaron ningún cambio significativo en la citotoxicidad inducida por AdRGDwt tras incubarse en presencia de ganciclovir ($ID_{50_{AdRGDwt}} = 0,95$ vp/célula; $ID_{50_{AdRGDwt+GCV}} = 0,97$ vp/célula), mientras que se observó una menor inducción de citotoxicidad (mayor ID_{50}) cuando fueron tratadas con AdRGDTat8TK-L en combinación con ganciclovir, en comparación con el tratamiento con AdRGDTat8TK-L en ausencia de ganciclovir ($ID_{50_{AdRGDTat8TK-L}} = 15,07$ vp/célula; $ID_{50_{AdRGDTat8TK-L+GCV}} = 25,81$ vp/célula), de acuerdo con lo descrito anteriormente. Sin embargo, el tratamiento conjunto con ganciclovir incrementó la citotoxicidad inducida por ICOVIR11 ($ID_{50_{ICOVIR11}} = 277,08$ vp/célula; $ID_{50_{ICOVIR11+GCV}} = 119,24$ vp/célula). Este efecto diferencial del tratamiento con ganciclovir entre AdRGDTat8TK-L e ICOVIR11 se observó también en las células de la línea **RWP-1** ($ID_{50_{AdRGDTat8TK-L}} = 40,07$ vp/célula; $ID_{50_{AdRGDTat8TK-L+GCV}} = 63,01$ vp/célula; $ID_{50_{ICOVIR11}} = 784,95$ vp/célula; $ID_{50_{ICOVIR11+GCV}} = 199,99$ vp/célula), sin embargo, en esta línea celular, el tratamiento con ganciclovir sí tuvo un efecto en la citotoxicidad de AdRGDwt, reduciendo de manera significativa su potencia citotóxica ($ID_{50_{AdRGDwt}} = 7,02$ vp/célula; $ID_{50_{AdRGDwt+GCV}} = 75,05$ vp/célula).

Las células de la línea sensible **BxPC-3** no presentaron diferencias en la citotoxicidad de AdRGDwt en presencia o ausencia de ganciclovir ($ID_{50_{AdRGDwt}} = 383,95$ vp/célula; $ID_{50_{AdRGDwt+GCV}} = 581,53$ vp/célula), mientras que el agregado de ganciclovir incrementó el efecto citotóxico tanto de AdRGDTat8TK-L como de ICOVIR11 ($ID_{50_{AdRGDTat8TK-L}} = 294,33$ vp/célula; $ID_{50_{AdRGDTat8TK-L+GCV}} = 294,33$ vp/célula; $ID_{50_{ICOVIR11}} = 784,95$ vp/célula; $ID_{50_{ICOVIR11+GCV}} = 199,99$ vp/célula).

Resultados

$L+GCV= 42,48$ vp/célula; $ID50_{ICOVIR11}= 1143,75$ vp/célula; $ID50_{ICOVIR11+GCV}= 185,71$ vp/célula).

Como medida cuantitativa de un posible cambio en la potencia citotóxica del adenovirus replicativo armado con la enzima TK debido al uso del promotor E2F en lugar del promotor viral endógeno, se calcularon los cocientes entre las ID50 de ICOVIR11 y AdRGDTat8TK-L (en presencia o ausencia de ganciclovir, por separado), obteniéndose los resultados que se enumeran a continuación, en la Tabla R6.

| Línea celular | ICOVIR11/ AdRGDTat8TK-L | |
|---------------|----------------------------|------|
| | GCV- | GCV+ |
| NP-9 | 2,23 | 1,96 |
| PANC-1 | 6,49 | 5,19 |
| RWP-1 | 19,58 | 3,17 |
| NP-18 | 18,39 | 4,62 |
| BxPC-3 | 3,84 | 4,37 |

Tabla R6. Factor de pérdida de potencia de ICOVIR11 con respecto a AdRGDTat8TK-L, expresado como el cociente entre sus ID50.

En todas las líneas celulares analizadas se observó una disminución en la potencia citotóxica del adenovirus armado con TK cuando se agregó un promotor E2F como control transcripcional de la expresión de E1A, tanto en presencia como en ausencia de ganciclovir. En aquellas células previamente descritas como sensibles a TK/GCV, sin embargo, dicha pérdida de potencia tuvo una menor magnitud cuando los virus se aplicaban con combinación con ganciclovir. Es decir, el sistema TK/GCV es capaz de ejercer un efecto atenuante sobre la pérdida de potencia producida por el uso de un promotor específico para el control de la replicación viral. Es interesante remarcar, además, que el efecto inhibitorio de ganciclovir sobre la citotoxicidad de AdRGDTat8TK-L, previamente reportado en las células NP-18 y observado también en las células RWP-1, no se observó cuando estas células fueron tratadas con ICOVIR11.

Un resultado semejante, en cuanto a pérdida de potencia, se observó al comparar las ID50 de ICOVIR11 con las de AdRGDwt, a excepción de las células de la línea BxPC-3. En esta línea celular, la compensación ejercida por el sistema TK/GCV sobre la pérdida de potencia fue total, obteniéndose valores de ID50 indistinguibles

desde el punto de vista estadístico, pero tendiente a ser inferior para el tratamiento con ICOVIR11/GCV (ID₅₀= 185,87 vp/célula) que para el tratamiento con AdRGDwt/GCV (581,53 vp/célula), siendo el cociente entre ambos valores de 0,32.

- Estudio comparativo de la potencia citotóxica de AdRGDwt y ICOVIR11/GCV en un modelo *in vivo* de cáncer de páncreas

Con el objetivo de validar, en un modelo *in vivo*, los resultados que muestran que ICOVIR11, en combinación con ganciclovir, es capaz de inducir un efecto citotóxico sobre células BxPC-3 equiparable al inducido por AdRGDwt, se utilizó un modelo de tumores subcutáneos generados como xenoinjertos en el tejido subcutáneo de ratones atímicos (2 tumores/ratón). Cuando los tumores hubieron alcanzado un volumen promedio de 50 mm³ se separaron los animales en tres grupos de manera que los promedios de los volúmenes de los tres grupos fuesen iguales. Un grupo (n= 5 ratones) recibió una dosis intratumoral diaria de 2×10^{10} vp de ICOVIR11 por cada tumor los días 0, 1, 7 y 8 del tratamiento, seguidas de una dosis intraperitoneal diaria de ganciclovir de 100 mg/kg los días 4, 5, 6, 11, 12 y 13. El segundo grupo (n= 5 ratones) fue tratado con una dosis intratumoral diaria de 2×10^{10} vp de AdRGDwt por cada tumor los días 0, 1, 7 y 8 del tratamiento. El tercer grupo (n= 5 ratones) recibió 20 µL solución salina por vía intratumoral los días 0, 1, 7 y 8. Como se muestra en la figura 29 A, tanto el tratamiento con AdRGDwt como el tratamiento con ICOVIR11 en combinación con ganciclovir fueron capaces reducir significativamente la tasa de crecimiento de los tumores, en comparación con el grupo control, que solo recibió solución salina (p -valor_{ICOVIR11/GCV vs salino}= 0,001 , p -valor_{AdRGDwt vs salino}= 0,012). Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre el crecimiento de los tumores tratados con AdRGDwt y el de los tumores tratados con ICOVIR11/GCV (p -valor_{ICOVIR11/GCV vs AdRGDwt}= 0,321).

Se estimó, para cada grupo, la probabilidad de supervivencia, para cada ratón, como función del tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento. Los grupos tratados con AdRGDwt o ICOVIR11/GCV vieron incrementada significativamente su probabilidad de supervivencia con respecto al grupo control (log-rank= 0,0005 y 0,0023; respectivamente), mientras que no se halló diferencia

Resultados

significativa entre los dos grupos tratados (log-rank= 0,7851). Las medianas de supervivencia fueron de 6 días, 12 días y 16 días para los grupos salino, AdRGDwt y ICOVIR11/GCV, respectivamente (Fig 29 B).

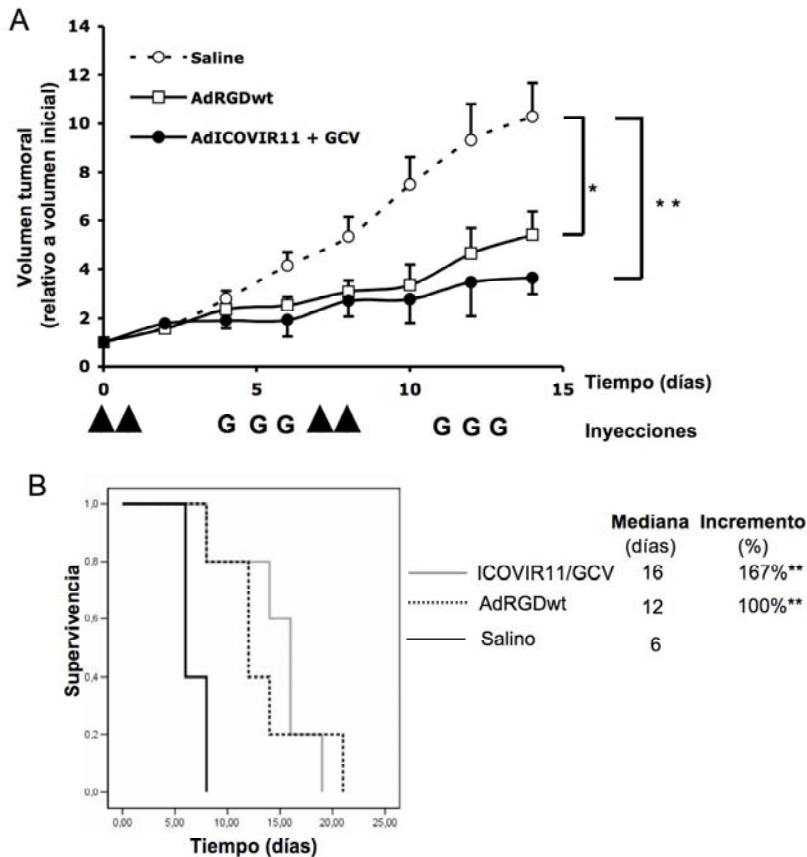


Figura 29. ICOVIR11 vs AdRGDwt *in vivo*. Comparación de los efectos antitumorales inducidos por ICOVIR11/GCV y por AdRGDwt en xenoinjertos subcutáneos generados a partir de células BxPC-3. A) Curvas de crecimiento tumoral para los grupos tratados con ICOVIR11/GCV, AdRGDwt y solución salina (control). Los valores se expresan como múltiplos del volumen original (50mm³, en promedio) con sus respectivos errores estándar (n= 10 tumores/grupo). Las flechas indican los días en que se administraron las dosis virales intratumorales. Las dosis intraperitoneales de GCV fueron administradas los días indicados con una letra G. B) Análisis de supervivencia de los ratones. Se utilizó como criterio de punto final la presencia de al menos un tumor que haya quintuplicado su volumen original (n= 5 ratones/grupo) * *p*-valor < 0,05; ** *p*-valor < 0,01.

Integrando los resultados de los experimentos *in vitro* y del

experimento realizado en ratones, podemos concluir que la ganancia de especificidad derivada del uso de un promotor específico para el control de la expresión de E1A (y en consecuencia de la replicación viral) trae aparejada una disminución en la potencia citotóxica de la oncólisis viral, como se ha reportado anteriormente (Casallo, Alonso et al. 2007). Sin embargo, la combinación de la oncólisis viral con el sistema TK/GCV podría ayudar a paliar esta pérdida de potencia, y la magnitud de dicha compensación dependerá en gran medida de la sensibilidad intrínseca, de cada célula, al tratamiento con TK/GCV.

- Estudio de la potencia citotóxica de ICOVIR11/GCV administrado sistémicamente en un modelo *in vivo* de cáncer de páncreas

Un factor determinante de la eficiencia de los tratamientos antitumorales administrados sistémicamente es la biodisponibilidad del agente terapéutico en el tejido diana. Debido a ello, se planteó la necesidad de evaluar la capacidad, del tratamiento con ICOVIR11/GCV, de inducir un efecto antitumoral cuando éste era aplicado de manera sistémica. Para ello se generaron tumores subcutáneos de células BxPC-3 en ratones atómicos (2 tumores/ratón). Cuando los tumores hubieron alcanzado un volumen promedio de 100 mm^3 se separaron los ratones en 2 grupos de manera que el promedio de volúmenes de cada grupo fuese cercano a 100 mm^3 . Al primer grupo ($n= 5$ ratones) se le administraron $150 \mu\text{L}$ de solución salina por vía intravenosa mientras que al segundo grupo ($n= 5$ ratones) se le administró una dosis única de 5×10^{10} vp de ICOVIR11 por ratón, estableciéndose el día de la inyección intravenosa como “día 0” de tratamiento. A continuación, se le aplicó al grupo tratado con ICOVIR11 una dosis diaria de 100 mg/kg de ganciclovir los días 4, 5, 6, 11, 12 y 13.

Se realizó el seguimiento del crecimiento tumoral en el tiempo, obteniéndose la gráfica que se muestra en la figura 30 A donde se observa que los tumores de los ratones que recibieron el tratamiento con ICOVIR11 por vía intravenosa y ganciclovir por vía intraperitoneal experimentaron una disminución en la velocidad de crecimiento en comparación con los tumores de los animales control, que sólo recibieron inyecciones de solución salina. Así mismo, el análisis de Kaplan-Meier de la probabilidad de supervivencia de los ratones en ausencia de tumores que hayan

quintuplicado el volumen original mostró diferencias significativas entre los grupos (p -valor= 0,084), con un incremento de la mediana de supervivencia del 116,7% para el grupo tratado (mediana grupo tratado= 13 días, mediana grupo control= 6 días) (Fig 30 B).

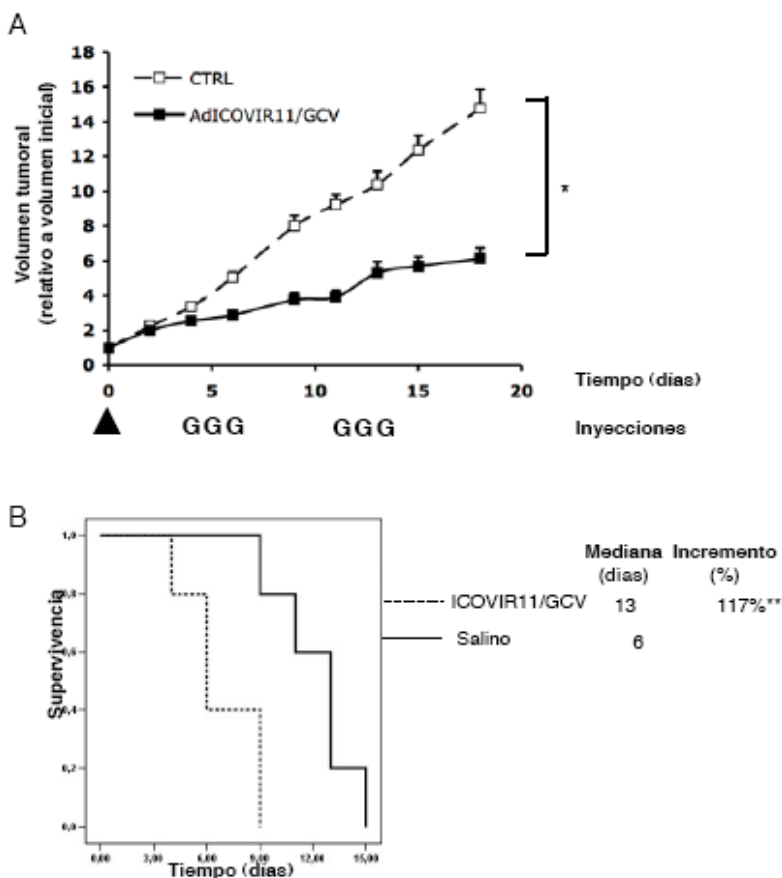


Figura 30. Efecto antitumoral de ICOVIR11/GCV administrado sistémicamente. A) Curva de crecimiento tumoral de xenoinjertos generados a partir de células BxPC-3, tratados con ICOVIR11/GCV o solución salina. Los valores se expresan como múltiplos del volumen original (50mm³, en promedio) con sus respectivos errores estándar (n= 10 tumores/grupo). Las flechas indican los días en que se administraron las dosis virales intratumorales. Las dosis intraperitoneales de GCV fueron administradas los días indicados con una letra G. B) Análisis de supervivencia de los ratones. Se utilizó como criterio de punto final la presencia de al menos un tumor que haya quintuplicado su volumen original (n= 5 ratones/grupo) * p -valor < 0,05; ** p -valor < 0,01.

Estos resultados indican que ICOVIR11, en combinación con ganciclovir, es lo suficientemente potente como para inducir un efecto antitumoral, aún cuando se administra sistémicamente.

Monitorización de la replicación de ICOVIR11 *in vivo*, mediante la detección de actividad de timidina quinasa por Tomografía de Emisión de Positrones

La posibilidad de realizar un seguimiento en tiempo real de la replicación viral y de su localización anatómica constituiría una valiosa herramienta para garantizar la seguridad del tratamiento. En el contexto de un vector adenoviral de replicación condicionada y armado con la enzima TK como gen tardío, la detección *in vivo* de su actividad enzimática permitiría determinar en qué tejidos se estaría replicando el adenovirus, y en qué tejido se podría inducir un efecto citotóxico mediante la administración sistémica de ganciclovir. A diferencia de lo que sucede con los adenovirus oncolíticos que carecen de TK, en el contexto utilizando ICOVIR11 esto puede realizarse gracias a la capacidad de la enzima TK de fosforilar, además de timidina y ganciclovir, otros análogos de nucleósidos cuyas formas fosforiladas se incorporarán al ADN sintetizado *de novo* y que son susceptibles de ser marcados con radionúclidos. Las emisiones pueden ser detectadas y utilizadas para obtener información sobre la localización espacial de los mismos. Este fenómeno presenta un gran potencial para el desarrollo de nuevas técnicas no invasivas de monitorización de la actividad TK.

- Validación de la técnica de Tomografía por Emisión de Positrones para la detección *in vivo* de la actividad de timidina quinasa expresada mediante un vector adenoviral

Se escogió como radiotrazador el nucleósido análogo pirimidínico FEAU (2'-[¹⁸F]fluoro-5-etil-1-β-D-arabinofuranosiluridina), marcado con el radionúclido ¹⁸F cuyo decaimiento radiactivo se produce mediante emisión de positrones (Fig 31 A). Como primera aproximación, se realizó un análisis *in vitro* de la incorporación de [¹⁸F]-FEAU en células NP-18 transducidas con dos vectores adenovirales no replicativos diferentes, que codifican para la enzima TK (AdTK) o para la proteína de fusión Tat8TK (AdTat8TK), en ambos casos bajo el control transcripcional del

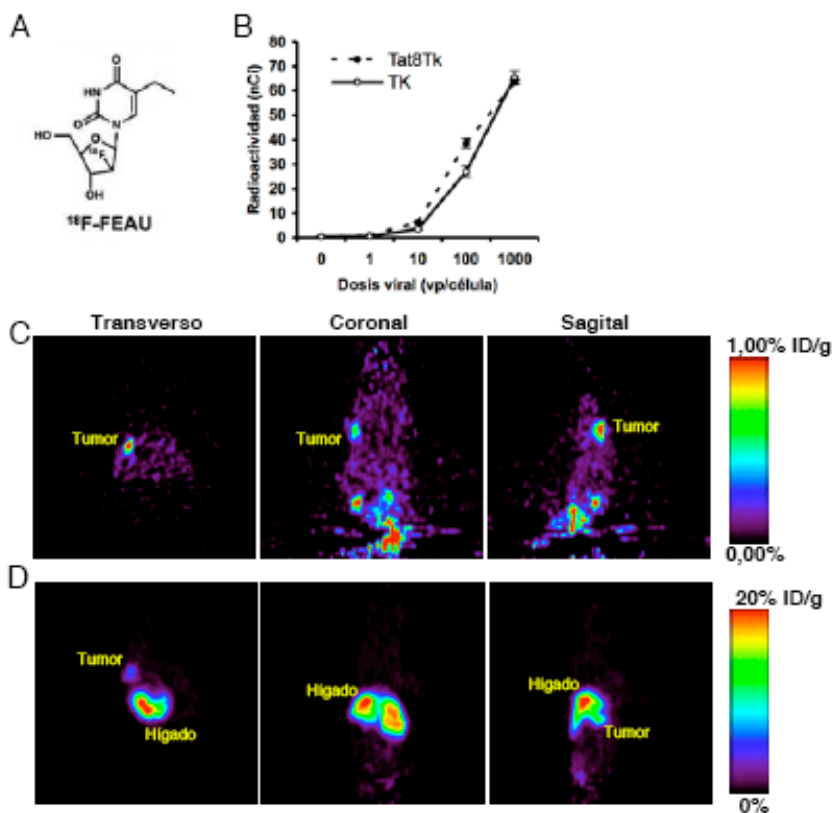


Figura 31. Tomografía por emisión de positrones. A) Estructura química del radiotrazador análogo nucleosídico [^{18}F]-FEAU. B) Retención del radiotrazador en células NP-18 transfectadas con AdTK o AdTat8TK a las dosis indicadas. Al cabo de 24 hs, las células fueron incubadas en presencia de $0,91\mu\text{Ci}$ de [^{18}F]-FEAU por pocillo (en placas de 24 pocillos), durante 2hs. Posteriormente se removió el trazador no incorporado y se cuantificó la radiactividad en las células. Se grafican las medias de los cuadruplicados \pm sus desviaciones estándar. C) Captación de [^{18}F]-FEAU por tumores subcutáneos generados a partir de células CWR-GLT, que expresan TK constitutivamente. Imágenes en escala de colores indicando la intensidad de la señal (expresada en %ID/g). D) Captación de [^{18}F]-FEAU por xenoinjertos de células BxPC-3 a los 3 días de ser inyectados con AdTK por vía it. En C) y D) las imágenes fueron adquiridas tras dos horas de captación del trazador inyectado por vía iv.

promotor CMV. Para ellos, se sembraron células NP-18 por duplicado en placas de veinticuatro pocillos, a razón de 20000 células por pocillo. Al cabo de veinticuatro horas las células fueron transducidas durante cuatro horas con dosis 0, 1, 10, 100 y 1000 vp/célula de AdTK o AdTat8TK. Transcurrido un día de la

infección, se cambió el medio de las células, agregando 500 μL de medio fresco suplementado con 0,91 μCi de $[^{18}\text{F}]\text{-FEAU}$, por pocillo. Se mantuvieron las células en condiciones estándar de cultivo celular durante dos horas y, transcurrido ese tiempo, se removió el medio de cultivo, lavando con PBS para eliminar restos de $[^{18}\text{F}]\text{-FEAU}$ no retenido en las células. Se tripsinizaron las células y se cuantificó la radiactividad de la mismas en un contador de centelleo, hallando los resultados que se muestran en la figura 31 B: las células transducidas con cualquiera de estos vectores fueron capaces de retener $[^{18}\text{F}]\text{-FEAU}$ específicamente, en una manera dependiente de la dosis de virus.

A continuación, se evaluó la capacidad de la técnica de detectar actividad TK *in vivo*, mediante la retención del radiotrazador en tumores subcutáneos generados a partir de células CWR-GLT, que expresan de manera estable la enzima TK, o bien en tumores de células BxPC-3, a los que se les administraron tres inyecciones de 2×10^{10} vp/tumor de AdTK, por vía intratumoral, cinco días antes de la adquisición de las imágenes PET. El radiotrazador fue administrado por vía intravenosa a través de la vena de la cola dos horas antes de la adquisición de las imágenes, para permitir su distribución sistémica y la excreción del exceso de trazador que no quede retenido específicamente por actividad TK.

La reconstrucción de las imágenes permitió detectar una señal en el tumor generado a partir de células CWR-GLT (Fig 31 C) y en los tumores generados a partir de células BxPC-3 que recibieron inyecciones de AdTK (Fig 31 D). El ratón que recibió AdTK por vía intratumoral mostró, además, una fuerte señal en hígado.

- Detección y análisis curso-temporal de actividad TK en xenoinjertos de BxPC-3 inyectados con ICOVIR11

Para determinar si la técnica es lo suficientemente sensible como para detectar la actividad TK derivada de la infección con ICOVIR11 se realizó un estudio utilizando tumores subcutáneos generados por inyección subcutánea de células BxPC-3 en los flancos anteriores de ratones atímicos. Cuando los tumores hubieron alcanzado un volumen promedio de 200 mm^3 , se les administró una inyección de 2×10^{10} vp/tumor en sólo uno de los tumores y se llevó a cabo la adquisición de las imágenes PET a tres, cuatro y

cinco días (Fig 32 A).

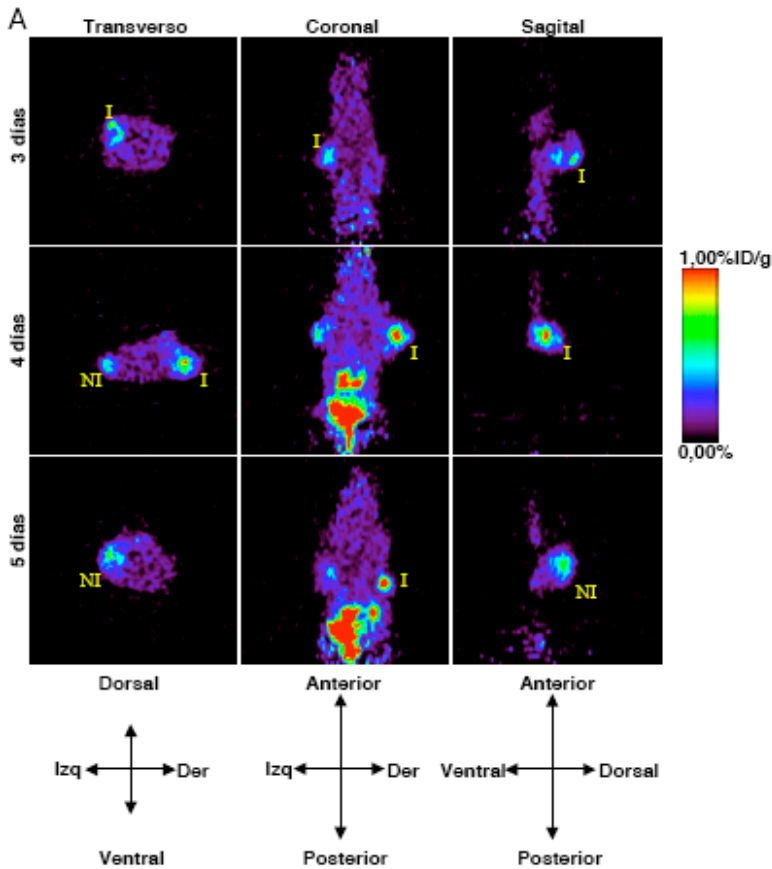


Figura 32. Detección de la replicación de ICOVIR11 mediante PET. A) Retención del radiotrazador xenoinjertos de BxPC-3 inyectados con ICOVIR11 por vía i.t. Las imágenes fueron adquiridas a 3, 4 y 5 días de la administración del virus y después de 2hs de captación tras la inyección del trazador. Se observa señal específica en los tumores inyectados (I) y también en tumores contralaterales no inyectados (NI). B) Cuantificación de la señal obtenida en los VOI tridimensionales correspondientes a cada tumor. Las diferencias entre la señal registrada en los tumores inyectados y la señal no específica registrada en la cavidad torácica (Bg) fueron estadísticamente significativas a partir del cuarto día post-inyección del virus. C) Cuantificación de la señal registrada en los VOI correspondientes a los tumores contralaterales no inyectados. D) PCR para la detección del gen de la proteína Hexón en los tumores inyectados (I), tumores contralaterales no inyectados (NI), tumores de ratones naïve que no fueron inyectados con ICOVIR11 y en un control positivo de ADN viral. * p -valor < 0,05.

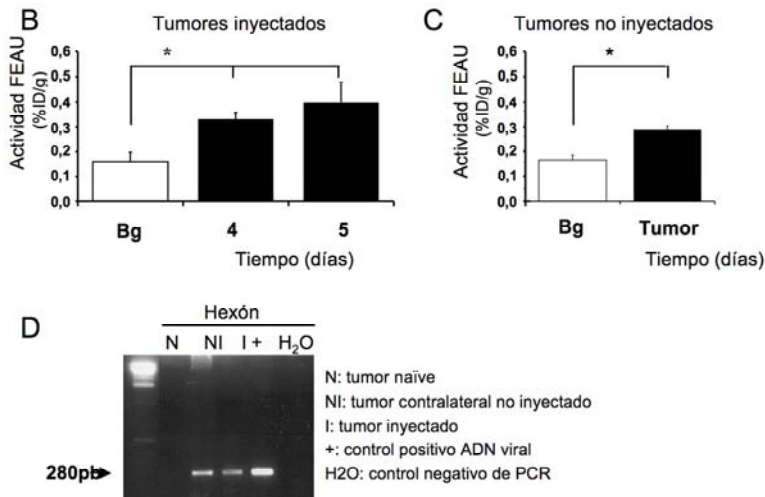


Figura 32. Detección de la replicación de ICOVIR11 mediante PET.
(cont.)

Con el objetivo de obtener una medida cuantitativa de la actividad TK, se calcularon volúmenes de interés (VOI, del acrónimo en inglés de *Volume of Interest*) correspondientes a cada uno de los tumores y se cuantificó la actividad, expresándose como porcentaje de la dosis total inyectada por gramo (%ID/g). Se cuantificó, además, la actividad inespecífica en la cavidad torácica, para obtener el valor de línea de base. La actividad de los tumores fue aproximadamente el doble de la actividad inespecífica de la cavidad torácica a partir del cuarto día postinyección, siendo la diferencia estadísticamente significativa (p -valor día 3= 0,182; p -valor día 4= 0,046 y p -valor día 5= 0,02) (Fig 32 B).

Sorprendentemente, se detectó también señal superior a la de la línea de base en aquellos tumores no inyectados, contralaterales de los que habían recibido ICOVIR11, presentando a 4 y 5 días de la inyección una actividad superior a la actividad inespecífica de la cavidad torácica (p -valor= 0,039) (Fig 32 C). La presencia del genoma adenoviral en tumores inyectados, así como en los tumores contralaterales, fue confirmada mediante PCR del gen de la proteína hexon (Fig 32 D).

-Estudio de la influencia del régimen de aplicación del tratamiento ICOVIR11/GCV sobre su eficiencia antitumoral

Un estudio realizado previamente en el laboratorio, sobre tumores subcutáneos generados a partir de células BxPC-3, demostraba que dependiendo de la pauta de administración de AdRGDTat8TK-L y ganciclovir condicionaba la eficiencia antitumoral de la combinación de muerte por lisis viral y por TK/GCV: si se administraban cuatro inyecciones intratumorales de adenovirus seguidas de seis inyecciones intraperitoneales de ganciclovir, la combinación ejercía un efecto antitumoral semejante al ejercido por la administración de virus solamente. Sin embargo, cuando se alternaban dos inyecciones de adenovirus con las de ganciclovir, el tratamiento combinado era capaz de producir un efecto antitumoral significativamente superior al de AdRGDTat8TK-L solo (Cascante, Abate-Daga et al. 2007).

Sobre esta base se decidió evaluar si este efecto era aplicable también a ICOVIR11, por lo que se realizó un experimento *in vivo* administrando ICOVIR11 en xenoinjertos generados en ratones atímicos, según se describe a continuación. Se inyectaron células de la línea BxPC-3 en los flancos anteriores de ratones de la cepa Balb/c nude, a razón de 3×10^6 células en cada flanco. Cuando los tumores hubieron alcanzado un volumen promedio de 200 mm^3 se distribuyeron los animales en cuatro grupos, manteniendo un volumen promedio por grupo cercano a 200 mm^3 y se les administraron inyecciones intratumorales de ICOVIR11 o solución salina e inyecciones intraperitoneales de 100 mg/kg de ganciclovir o solución salina siguiendo 4 protocolos diferentes Ver esquema en figura 33 A:

Protocolo A: una inyección diaria de 2×10^{10} vp/tumor de ICOVIR11 los días 0, 1, 7 y 8; una inyección diaria de ganciclovir por vía intraperitoneal los días 4, 5, 6, 11, 12 y 13.

Protocolo B: una inyección diaria de 2×10^{10} vp/tumor de ICOVIR11 los días 0, 1, 2 y 3; una inyección diaria de ganciclovir por vía intraperitoneal los días 6, 7, 8, 9, 10 y 11.

Protocolo C: una inyección diaria de 2×10^{10} vp/tumor de ICOVIR11 los días 0, 1, 7 y 8; una inyección diaria de 200 μL de solución salina por vía intraperitoneal los días 4, 5, 6, 11, 12 y 13.

Grupo Control: una inyección diaria de 20 μL de solución salina los días 0, 1, 7 y 8; una inyección diaria de 200 μL de solución salina por vía intraperitoneal los días 4, 5, 6, 11, 12 y 13.

Al finalizar el tratamiento (día 14) se midieron los volúmenes tumorales, observándose una inhibición estadísticamente significativa del crecimiento tumoral en el grupo tratado con el Protocolo A, en comparación con el grupo control (p -valor= 0,005). Los grupos que recibieron el tratamiento de acuerdo a los protocolos B y C experimentaron una tendencia a la inhibición con respecto al grupo control, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa (p -valor Protocolo B= 0,126; p -valor Protocolo C= 0,195) (Figura 33 A).

Para determinar si la influencia del protocolo de administración del tratamiento sobre la eficiencia del mismo está relacionada con diferencias en el número de partículas virales funcionales, se evaluó la actividad TK en los ratones, mediante la técnica de PET, al finalizar el tratamiento (Figura 33 B). Como se muestra en la figura 33 C, los ratones que habían recibido el tratamiento de acuerdo al protocolo A presentaron una señal de aproximadamente el doble de magnitud de la señal no específica medida en la cavidad torácica, siendo la diferencia estadísticamente significativa (p -valor= 0,038). Si bien los tumores tratados con el protocolo C presentaron una actividad semejante a la de los tumores correspondientes al protocolo A, su actividad no fue distinguible, desde el punto de vista estadístico, de la señal no específica (p -valor= 0,121). Sin embargo, tanto los tumores del protocolo A como del protocolo C presentaron una señal superior a la de los tumores del protocolo B, siendo ambas diferencias estadísticamente significativas (p -valor_{A vs B}= 0,021, p -valor_{C vs B}= 0,034), mientras que la señal de los tumores del protocolo B fue indistinguible de la señal inespecífica (p -valor= 0,522).

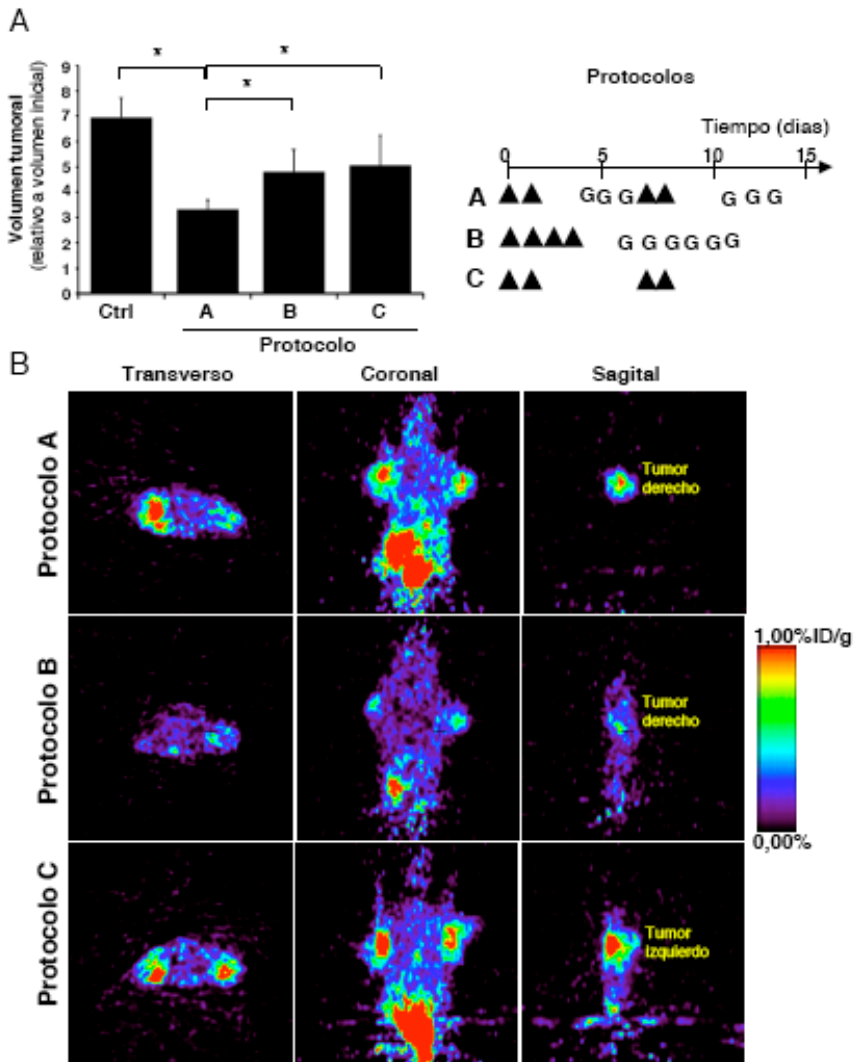


Figura 33. Régimen de aplicación de virus/GCV y actividad TK. A) Volúmenes tumorales, relativos al volumen inicial, de xenoinjertos de células BxPC-3 tratados con ICOVIR/GCV aplicando dos protocolos distintos (Protocolo A y Protocolo B, ver esquema), ICOVIR11 (Protocolo C) o solución salina (Control). B) Al finalizar los tratamientos, se monitorizó la actividad TK mediante PET. Ambos tumores inyectados. C) Cuantificación de la retención de [¹⁸F]-FEAU en los tumores. * *p*-valor < 0,05.

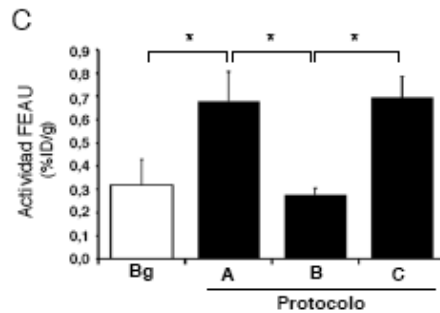


Figura 33. Régimen de aplicación de virus/GCV y actividad TK. (cont.)

En conjunto, los resultados presentados en este apartado indican que el armado de adenovirus replicativos con el gen TK resulta en un incremento de su potencia citotóxica cuando se aplica en combinación con ganciclovir. Este efecto constituye una herramienta interesante para mitigar la pérdida de potencia citotóxica que experimentan los adenovirus replicativos al aplicar estrategias tendientes a aumentar su especificidad (en el presente trabajo, la utilización de un promotor activo en células tumorales para el control transcripcional de E1A). Otra ventaja del armado con TK es la posibilidad de monitorizar la localización y la replicación del virus en tiempo real y de manera no invasiva. Mediante la técnica de tomografía por emisión de positrones esto es posible, gracias a la utilización de análogos nucleosídicos a modo de radiotrazadores, que se concentrarán en las células que expresen la enzima TK. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente en el laboratorio (Cascante, Abate-Daga et al. 2007), y confirmados en el presente trabajo, acerca de la importancia del régimen de aplicación de virus y prodroga en el resultado final de la terapia, la monitorización de la replicación viral permitiría la instauración de un tratamiento tendiente a inducir un efecto citotóxico o bien tendiente a suprimir la replicación del virus, en función de la localización de la actividad TK (en el órgano diana o en un tejido sano, respectivamente).

DISCUSIÓN

“Si viéramos realmente el Universo, tal vez lo entenderíamos”

Jorge Luis Borges

5. DISCUSIÓN

5.1 Condicionantes celulares de la acción de TK/GCV

La ausencia de una terapia eficaz para el tratamiento del adenocarcinoma pancreático ha alentado el desarrollo de terapias experimentales basadas en la transferencia de genes suicidas, entre las cuales se encuentra la que emplea el sistema TK/GCV. Si bien este tratamiento ha demostrado inducir un efecto benéfico objetivo en la prevención de recaídas en pacientes sometidos a resección quirúrgica de gliomas (Immonen, Vapalahti et al. 2004), no existen datos sobre su aplicación en humanos para el tratamiento de adenocarcinoma pancreático.

Los resultados de estudios realizados en modelos preclínicos de cáncer de páncreas varían desde la ausencia de efecto terapéutico (Fogar, Greco et al. 2003) hasta resultados prometedores tanto en ratones atímicos (Carrio, Romagosa et al. 1999) como en modelos inmunocompetentes (Makinen, Loimas et al. 2000) de la enfermedad. Sin embargo, en la mayoría de los casos en que sí se observó efecto terapéutico, éste consistía en un retraso en la progresión tumoral, siendo la regresión tumoral un evento poco frecuente. La principal limitante del éxito del tratamiento está relacionada con el número de células tumorales que el vector de transferencia génica será capaz de transducir, pero también existen células transducidas que se muestran refractarias al tratamiento.

Estudios *in vitro* utilizando vectores retrovirales para la transferencia del gen suicida TK, han demostrado que las líneas celulares derivadas de cáncer de páncreas presentan diferentes sensibilidades al sistema TK/GCV (Carrio, Mazo et al. 2001; Greco, Fogar et al. 2002). Así, en el presente trabajo se observó también una marcada variabilidad entre las diferentes líneas celulares, en términos de sensibilidad a TK/GCV, utilizando un vector adenoviral. Las siete líneas celulares analizadas podían subdividirse en un grupo de líneas resistentes y otro de líneas sensibles. Curiosamente, un aumento en la población de células con contenido de ADN equivalente a la fase S del ciclo celular fue observado en las tres líneas sensibles estudiadas, mientras que este

comportamiento sólo fue observado en una de las cuatro líneas resistentes analizadas. Dicho aumento de la proporción de células en fase S (o en S y G2/M) como consecuencia del tratamiento con TK/GCV había sido descrito como un evento asociado al mecanismo de acción del sistema, en un estudio realizado en células CHO (Tomicic, Thust et al. 2002), pero no se le había otorgado un valor predictivo de sensibilidad al tratamiento.

Un rasgo característico de las células tumorales es su heterogeneidad. Debido a la elevada tasa de proliferación y a la inestabilidad genómica que presentan estas células, la sensibilidad a agentes quimioterapéuticos es variable entre los diferentes tipos de cáncer, entre diferentes pacientes e, incluso, entre las diferentes células de un mismo tumor. Algunas condiciones propias del microambiente tumoral como el grado irrigación pueden afectar la llegada del agente terapéutico a la célula diana de manera circunstancial y otros, tales como la hipoxia, son capaces de inducir, de forma permanente, resistencia a la muerte por apoptosis (Cosse and Michiels 2008). Este y otros fenómenos podrían explicar, en parte, las diferencias observadas en términos de sensibilidad a TK/GCV en líneas celulares que no han sido previamente expuestas a dicho tratamiento.

Por otro lado, teniendo en cuenta que el tratamiento es capaz de inducir mutaciones e inestabilidad genómica (Tomicic, Thust et al. 2002), cabe la posibilidad de que en determinadas condiciones éste pueda actuar como un inductor de variabilidad genética y, a la vez, como una presión selectiva para el enriquecimiento de subpoblaciones que hayan adquirido un rasgo que proporcione una ventaja selectiva. Este fenómeno podría generar células tumorales refractarias, como se ha descrito para otros sistemas terapéuticos (Luqmani 2005), comprometiendo seriamente la eficiencia del tratamiento.

La mayor parte de los estudios tendientes a evaluar este fenómeno utilizando el sistema TK/GCV se realizaron utilizando vectores virales integrativos (retrovirus) para la expresión de TK. En este contexto, la adquisición de resistencia a ganciclovir se debía, en la mayoría de los casos, a una disminución en los niveles de expresión de TK secundaria a mutaciones o deleciones del transgén (Yang, Hwang et al. 1998; Garin, Garrett et al. 2001), o bien a

silenciamiento por metilación de promotores. Más aún, dicha resistencia era revertida al volver a expresar la TK mediante una nueva transducción (Yang, Hwang et al. 1998).

En el presente trabajo hemos desarrollado un modelo de resistencia inducida a partir de la transducción repetida, con TK de células, sensibles NP-18, utilizando un vector no integrativo (adenovirus). Después de cada transducción, se aplicó un tratamiento con ganciclovir. De esta manera, se logró aislar células hasta diez veces más resistentes que las células parentales que presentaron, además, características similares a las observadas en las células intrínsecamente resistentes, como una menor inducción de apoptosis y un menor incremento de la población en fase S del ciclo celular, en respuesta al tratamiento. Una asociación similar, entre inducción de resistencia y un menor porcentaje de células en fase S en respuesta al tratamiento (y de células apoptóticas) fue descrita por De Angelis y colaboradores en un estudio utilizando 5-FU como quimioterápico y células HCT119 como modelo de cáncer de colon (De Angelis, Svendsrud et al. 2006).

El análisis transcriptómico comparativo de las células con resistencia inducida arrojó una lista de genes regulados que podrían explicar el fenómeno de disminución de sensibilidad. Entre las funciones sobrerrepresentadas se hallaron categorías de genes que codifican para componentes de la cromatina y de los nucleosomas, así como de genes involucrados en el ensamblaje de los mismos. La expresión de estos genes (en su mayoría histonas) se halla finamente regulada, activándose durante la fase S del ciclo celular e inhibiéndose como consecuencia de la activación de la respuesta a daño en el ADN (Zhao 2004). Así, dicha regulación podría reflejar una alteración en los mecanismos de control de ciclo celular en respuesta a insultos genotóxicos. Otras categorías sobrerrepresentadas incluyen grupos de genes generales como aquellos involucrados en el desarrollo de cáncer, en la muerte celular, en el control de la expresión génica y, notablemente, genes relacionados con el control del ciclo celular, del crecimiento y proliferación celulares y de la replicación, recombinación y reparación de daño en el ADN, entre otras.

Seis genes diferencialmente expresados (GPC4, NMU, GADD45A, POLK, WNT5A, CCNE1 y GPC3) con potencial relevancia

biológica y/o terapéutica relación a la inducción de resistencia, fueron validados mediante PCR en tiempo real y dos de ellos (CCNE1 y GADD45) fueron validados, además, mediante ensayos funcionales.

Uno de los genes con mayor intensidad de regulación (3,5-4 veces) entre las líneas sensibles y resistentes es el que codifica para el neuropéptido neuromedina U (NMU), que se encontraba sobrepresado en células resistentes NP-18AR. Su función fisiológica no es del todo clara, habiéndose descrito su participación en procesos tan variados como contracción de músculo liso, transporte de iones, percepción de estímulos sensoriales, entre otras (Brighton, Szekeres et al. 2004). No obstante, su expresión en tejidos del tracto gastrointestinal y la reciente descripción de la sobrepresión de NMU y de su receptor en células de cáncer de páncreas, en asociación con una mayor capacidad de migración e invasión, apuntan hacia un posible papel de NMU en el desarrollo de metástasis de cáncer de páncreas (Ketterer, Kong et al. 2008). A pesar de que actualmente no existen evidencias que permitan vincular NMU con el control del ciclo celular, la inducción de apoptosis u otro proceso relacionado a la sensibilidad a TK/GCV, dado que NMU es uno de los genes con una mayor magnitud de sobreexpresión en las células con resistencia inducida, consideramos que éste puede ser un gen candidato para el estudio de su implicación en el desarrollo de resistencia a TK/GCV

Entre los genes regulados involucrados en el control del ciclo celular, se analizó la expresión de CCNE1, que codifica para la ciclina E1 (activadora de la CDK2) y que se encuentra subexpresada en las células resistentes. La actividad de ciclina E1 es necesaria para el tránsito de las células de fase G1 a fase S del ciclo celular, y para el inicio de la replicación del ADN (Moroy and Geisen 2004)) y participa, además, en la inducción de apoptosis en respuesta a insultos genotóxicos (Mazumder, DuPree et al. 2004; Mazumder, Plesca et al. 2007). En este trabajo se muestra no sólo la menor expresión del ARN mensajero de ciclina E1 en células con resistencia inducida a TK/GCV, sino también el efecto sensibilizador que ejerce su expresión ectópica en células resistentes MIAPaca-2, frente a la acción del tratamiento. Dicha expresión produjo, además, una disminución en el porcentaje de células en fase G0/G1, sugiriendo una posible asociación entre su función en

la transición de fase G1 a S con el efecto sensibilizador, aunque no se puede descartar un efecto mediado por su participación en la inducción de apoptosis

El producto del gen GADD45A, cuya expresión es superior en las células resistentes NP-18AR que en las células NP-18, participa en diversas funciones celulares relacionadas con el control del ciclo celular, la reparación del ADN y la inducción de apoptosis en respuesta a daño en el ADN (Zhan 2005). Se ha visto, además, que su expresión cumple un papel importante en la inducción de arresto en fase G1 debido a confluencia (Zhang, Ma et al. 2003).

Los efectos de la expresión de GADD45A sobre la viabilidad y en la proliferación de células de cáncer de páncreas es un tanto contradictoria. Así, Scheiner y colaboradores describieron una asociación entre la expresión de GADD45A y una mayor viabilidad y tasa de proliferación de células de cáncer de páncreas (Schneider, Weber et al. 2006); y Niedergethmann y colaboradores asociaron una mayor expresión de GADD45A con la generación de metástasis hepáticas (Niedergethmann, Alves et al. 2007). Sin embargo, Li y colaboradores reportaron recientemente que la expresión ectópica de GADD45A en células de cáncer páncreas, utilizando un vector adenoviral, era capaz de inducir arresto en fase G2/M del ciclo celular (Li, Qian et al. 2009). Desde el punto de vista epidemiológico, el análisis de muestras quirúrgicas de pacientes con cáncer de páncreas indicó que una mayor expresión de GADD45A estaba asociada a un peor pronóstico (Yamasawa, Nio et al. 2002; Dong, Dong et al. 2007).

El efecto de la expresión de GADD45A sobre la respuesta a insultos genotóxicos como exposición a quimioterápicos o a radiaciones es variable según el tumor de origen de las células analizadas y el estado funcional de otros miembros de la respuesta a daño en el ADN (revisado en (Hildesheim and Fornace 2002). En células de cáncer de páncreas se ha descrito que la inducción conjunta de la expresión de GADD45A y de p21 (WAF1) en respuesta al tratamiento con el inhibidor de metilasas 5-aza-2'-deoxicitidina está asociada a una a una mayor respuesta al tratamiento (Missiaglia, Donadelli et al. 2005). Nuestros resultados, demuestran que la expresión ectópica de GADD45A provoca una disminución en la sensibilidad en células intrínsecamente resistentes a TK/GCV,

sugiriendo que la expresión de otros factores y/o la funcionalidad de otras vías de señalización asociadas podría condicionar el efecto de la expresión de GADD45A sobre la respuesta a TK/GCV.

Otro gen regulado que ha sido validado por PCR en tiempo real, y que podría estar directamente vinculado a la inducción de resistencia es el que codifica para la polimerasa de ADN kappa (POLK). Esta enzima pertenece a la familia “Y” de polimerasas de ADN de baja fidelidad y se ha descrito su participación en la síntesis de ADN que no se ve inhibida por la presencia de lesiones (TLS, del acrónimo en inglés de *translesion synthesis*) y, como consecuencia, en el fenómeno de adaptación a los insultos genotóxicos (Bavoux, Hoffmann et al. 2005). Su actividad ha sido relacionada con la re-entrada en el ciclo celular después de su arresto en fase S en respuesta al genotóxico BPDE (Bi, Slater et al. 2005) y se ha demostrado que la actividad de otra polimerasa de la misma familia, la polimerasa eta (POLH), es capaz de modular la sensibilidad celular al tratamiento con cisplatino (Albertella, Green et al. 2005) y/ con gemcitabina (Chen, Cleaver et al. 2006). Así, un incremento en la expresión de POLK podría proporcionar a la célula la capacidad de continuar la síntesis de ADN y su progresión en el ciclo celular, sin ser afectada por las señales de inhibición de crecimiento proporcionadas por las vías de *checkpoint* de fase S.

El estudio realizado en el presente trabajo en relación a la activación de estas vías en respuesta a TK/GCV, proporciona nueva información sobre su mecanismo de acción. Si bien se observó una activación de la vía mediada por Chk2, compatible con el modelo que propone a las lesiones DSB como el insulto genotóxico inductor de citotoxicidad tras varias rondas de replicación de ADN (Rubsam, Davidson et al. 1998; Tomicic, Thust et al. 2002), nuestros resultados indican que la activación de la vía mediada por Chk1 se produce de manera más temprana y con mayor intensidad que la vía de Chk2, en células sensibles a TK/GCV. Teniendo en cuenta la cinética de fosforilación de Chk1, proponemos que la activación de dicha vía sería provocada, al menos inicialmente, por otro estímulo diferente de las lesiones DSB, como puede ser la inhibición de las polimerasas de ADN ejercida por los metabolitos fosforilados de ganciclovir (Ilsley, Lee et al. 1995). Estos datos, conjuntamente con la observación de que la inhibición farmacológica de la actividad de Chk1, utilizando UCN-01,

produce una inhibición de los eventos asociados a la aplicación de TK/GCV y compromete su efecto citotóxico en células sensibles al tratamiento, indican que la activación de esta vía constituiría un factor de sensibilidad a dicho tratamiento.

5.2 Implicaciones derivadas del mecanismo de acción de TK/GCV para el desarrollo de terapias combinadas

El efecto de la combinación de TK/GCV con UCN-01 tiene relevancia no sólo desde el punto de vista de la elucidación, a nivel básico, de la participación de Chk1 en el mecanismo de acción de TK/GCV, sino también en relación directa con su aplicación en tratamientos quimiosensibilizadores. El fundamento de esta aplicación consistía en evitar, mediante la inhibición del arresto celular en respuesta al insulto genotóxico, que la célula diana tenga la capacidad de reparar el daño inducido por el tratamiento (Tao and Lin 2006). En este sentido, se han iniciado ensayos clínicos utilizando este y otros inhibidores de Chk1 para potenciar el efecto citotóxico de fármacos como gemcitabina, doxorubicina, inhibidores de topoisomerasa I y cisplatino, entre otros (revisado en (Tse, Carvajal et al. 2007).

Existe un solo estudio en el que se evalúa el efecto de la combinación de UCN-01 con TK/GCV. Para ellos se utilizaron líneas celulares derivadas de cáncer de colon, observándose un efecto potenciador de UCN-01 sobre la toxicidad inducida por TK/GCV. Sin embargo, esta acción puede no atribuirse directamente a una inhibición de Chk1 dado que a las concentraciones utilizadas en los experimentos descritos en este artículo, UCN-01 es capaz de inhibir la actividad de otras enzimas, como por ejemplo la proteína-quinasa C (PKC) (McMasters, Wilbert et al. 2000).

En el contexto de cáncer de páncreas, un estudio publicado recientemente muestra un efecto sensibilizador, producido por la inhibición de Chk1 (utilizando el inhibidor específico PD-321852), a la acción de gemcitabina en células BxPC-3, MIAPaca-2 y PANC-1. Los autores demuestran, sin embargo, que el tratamiento producía además una inhibición de Rad51, involucrado en la

reparación del daño a ADN, y esta inhibición podría ser clave para la potenciación del efecto citotóxico (Parsels, Morgan et al. 2009), más allá del efecto en la progresión del ciclo celular.

En este contexto, nuestros resultados plantean la necesidad de realizar una revisión del paradigma de la quimiosensibilización de células tumorales mediante la inhibición de las vías de *checkpoint*, al poner de manifiesto que existen poblaciones celulares en las que la combinación tendrá un efecto sinérgico y aquellas en las cuales el efecto será antagónico.

Dada la variabilidad que presentan los tumores de diferentes pacientes, el desarrollo de terapias personalizadas para el tratamiento de patologías neoplásicas constituye, hoy por hoy, una de las principales metas en la investigación oncológica (van't Veer and Bernards 2008). En este sentido, se ha descrito recientemente la posibilidad de predecir de manera individualizada el efecto antitumoral del tratamiento con gemcitabina, a partir de los resultados obtenidos en ensayos de citotoxicidad *ex vivo*. (Michalski, Erkan et al. 2008). De manera análoga, si además de la sensibilidad se evaluase el grado de activación de la vía ATR-Chk1 en respuesta al tratamiento, este ensayo podría aportar información sobre la conveniencia de administrar UCN-01 como adyuvante.

Los patrones globales de expresión génica también pueden resultar de utilidad como criterio predictivo de respuesta al tratamiento. El extenso legado de la era genómica en términos de información sobre la expresión de genes en diferentes procesos fisiopatológicos, y en términos de disponibilidad de nuevas tecnologías para el análisis de secuencia y expresión de genes, ha sentado las bases para el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas, pronósticas y de seguimiento de un tratamiento, basadas en el análisis a gran escala de expresión de genes. Así, contamos hoy con datos sobre la expresión de genes con la formación de diversos tipos de tumores (Foekens, Wang et al. 2008) incluyendo cáncer de páncreas (Ko and Tempero 2009; Voidonikolas, Gingras et al. 2009) y sobre aspectos farmacogenómicos de algunos de ellos (Shai, Reichardt et al. 2008).

En términos de respuesta a TK/GCV sólo se encuentra en bibliografía un estudio en el que se analiza la expresión de genes en tumores generados a partir de células de hepatocarcinoma murino

que habían sido transducidas con un vector retroviral bicistrónico, para la expresión de TK y de interleuquina 2 (Stefani, Barzon et al. 2005). En este contexto, no es posible diseccionar los genes de expresión alterada debido al tratamiento con TK/GCV de aquellos modulados por la acción de interleuquina 2, por lo que el presente trabajo constituye el primer análisis pangenómico de expresión diferencial de mensajeros de genes entre células con diferentes sensibilidades a TK/GCV.

Otra aplicación atractiva del análisis de expresión diferencial de genes, entre células resistentes y células sensibles, sería la identificación de genes de resistencia. Esta información permitiría diseñar estrategias tendientes a modular la expresión de genes endógenos para sensibilizar las células a tratamiento con TK/GCV. Dos genes, CCNE1 y GADD45A, han sido validados funcionalmente en el presente trabajo como posible gen sensibilizador, el primero, y como inductor de resistencia, el segundo. Sin embargo, remitiéndonos estrictamente a los resultados aquí expuestos no es posible atribuir relevancia terapéutica a la expresión ectópica de ciclina E1 *per se*, dada la escasa magnitud de la sensibilización observada. Estos datos abren la puerta, no obstante, al desarrollo de nuevas estrategias tendientes a propiciar las condiciones necesarias para el óptimo funcionamiento del sistema TK/GCV, basadas, por ejemplo, en la modulación farmacológica del ciclo celular. Por otra parte, las funciones de ciclina E1 ligadas a la inducción de apoptosis merecen un estudio detallado, para determinar si, mediante su expresión utilizando un método más eficiente que la transfección de ADN plasmídico, sería posible inducir un efecto terapéutico independiente del control del ciclo celular.

La modulación del ciclo celular como estrategia para sensibilizar las células a la muerte inducida por TK/GCV ha sido estudiada por otros autores mediante el incremento de células en fase S, previa inhibición de la síntesis de poliaminas con eflornitina (α -difluorometilornitina o DFMO) tres días antes de aplicar GCV. Este preconditionamiento resultó en una potenciación de la citotoxicidad de TK/GCV en células de glioma de rata 9L (Pasanen, Karppinen et al. 2003), efecto que no pudo ser obtenido mediante el aumento en el catabolismo de las poliaminas (en lugar de la inhibición de su síntesis (Wahlfors, Karppinen et al. 2006). Mediante esta

aproximación se pretendía, en cierta medida, sincronizar las células para asegurar que un mayor número de las mismas sean capaces de incorporar metabolitos tóxicos de ganciclovir durante la aplicación del tratamiento, ya que en estado basal, no todas las células (incluso las tumorales) se encuentran sintetizando ADN. De manera similar, el estímulo de la entrada en fase S y de la síntesis de ADN, mediado por la expresión exógena de la proteína adenoviral E1A, ha sido estudiado como estrategia para incrementar la citotoxicidad inducida por TK/GCV (Parada, Hernandez Losa et al. 2003). No obstante el efecto potenciador observado, el estímulo de la proliferación de células tumorales comporta una serie de consideraciones en términos de seguridad que dificultan la aplicabilidad de esta estrategia en pacientes.

En cuanto a la expresión de GADD45A, se ha reportado que su expresión mediante transducción con un vector adenoviral era capaz de incrementar el efecto quimioterapéutico de los fármacos etopósido, cisplatino y 5-FU en células PANC-1 (Li, Qian et al. 2009). En el presente trabajo, sin embargo, se observó no sólo que una mayor expresión endógena de GADD45A estaba asociada a una menor respuesta a TK/GCV en el modelo de resistencia inducida, sino además, que su expresión exógena disminuía el efecto citotóxico de TK/GCV en la línea RWP-1. Esta aparente discrepancia entre los resultados previamente publicados y los obtenidos en este trabajo podría deberse al estado funcional de otros genes relacionados. Es importante destacar que tanto la línea celular utilizada en el modelo de resistencia inducida como la línea celular en la que se evaluó el efecto de la introducción de GADD45A son células intrínsecamente sensibles a TK/GCV, por lo que el efecto de dicha expresión en otras líneas celulares podría ser sustancialmente diferentes. De hecho, hemos demostrado que la línea celular utilizada en el estudio publicado por Li y colaboradores (PANC-1) es intrínsecamente resistente a TK/GCV, por lo que sería interesante evaluar qué influencia tendría la expresión de GADD45A sobre la respuesta al tratamiento en el contexto celular de PANC-1.

Resulta evidente que la respuesta a daño en el ADN es una red compleja y ramificada de mecanismos moleculares. El balance de la acción de las diferentes ramas puede resultar en efectos radicalmente opuestos dependiendo del tratamiento, del *background* genético y del estado funcional de estas vías en las células diana. La

profundización en el conocimiento del funcionamiento de dichos mecanismos permitirá la optimización de los tratamientos, mediante la estimulación del efecto citostático ligado al arresto en ciclo celular, más la inhibición de la reparación del daño a ADN que conducirá a la apoptosis y/u otros tipos de muerte celular.

Globalmente, estos resultados suman nueva información al creciente cuerpo de evidencias que resaltan la relevancia del control del ciclo celular de las células tumorales, previo a la aplicación del tratamiento y también en respuesta al mismo. Más aún, los datos del presente trabajo aportan información que podría ayudar a elaborar un perfil de células tumorales que responden a TK/GCV, que permitiría predecir su eficacia de manera individualizada en pacientes con cáncer de páncreas, a partir de la caracterización de la expresión génica y de la activación de las vías de *checkpoint* en muestras de tumor provenientes de biopsias o muestras quirúrgicas de pacientes oncológicos.

5.3 TK/GCV en combinación con viroterapia

La variabilidad biológica intrínseca de las células tumorales plantean la necesidad de regímenes terapéuticos multimodales para el tratamiento de patologías neoplásicas. En este sentido, la viroterapia se presenta como un buen candidato para el desarrollo de tratamientos combinados, permitiendo la utilización de un virus replicativo como agente terapéutico en sí mismo y como vehículo para la transferencia génica (Bauzon and Hermiston 2008). Más allá de la conveniencia técnica de utilizar un único agente, la viroterapia con adenovirus replicativos presenta el atractivo de ser capaz de inducir la muerte de células madre tumorales por un mecanismo independiente de apoptosis (Jiang, Gomez-Manzano et al. 2007).

Mediante la utilización de un adenovirus replicativo armado con un gen suicida, se espera no sólo una suma de efectos, sino una potenciación de la terapia génica debido a un mayor número de células transducidas, y una potenciación de la viroterapia mientras la acción del sistema genoterapéutico sea compatible con la replicación viral. La utilización de TK para el armado de adenovirus replicativos ha sido ensayada en diversos modelos, con la esperanza de obtener un efecto sinérgico entre la acción de los

dos sistemas. No obstante, se ha postulado que los metabolitos fosforilados de ganciclovir podrían interferir con la replicación del genoma del virus, afectando la formación de la progenie viral y comprometiendo el efecto lítico del virus, hecho que explicaría el efecto antagonico de la combinación reportada por algunos autores (Freytag, Rogulski et al. 1998; Rogulski, Wing et al. 2000). Un trabajo realizado previamente en el laboratorio indicaba que utilizando un adenovirus replicativo que expresa una variante de TK [Tat8TK(Cascante, Huch et al. 2005)] como gen tardío (AdRGDTat8TK-L) se lograba que su expresión en la célula diana se produjese tras la replicación del genoma viral. De esta manera, si bien el ganciclovir afectaba parcialmente la formación de nuevas partículas víricas, el tratamiento combinado resultaba en una mayor citotoxicidad que la inducida por el tratamiento con el virus solamente, en tres de cuatro líneas celulares estudiadas (Cascante, Abate-Daga et al. 2007). En el marco de este trabajo de tesis se demostró que, en un contexto *in vivo*, los tumores generados a partir de células NP-18 (en las que *in vitro* se había observado el efecto inhibitorio de ganciclovir sobre la citotoxicidad del adenovirus armado) respondían por igual al tratamiento combinado de AdRGDTat8TK-L con ganciclovir que al tratamiento con el virus en solitario. Es decir, en el peor de los escenarios, el ganciclovir no incrementaba el efecto antitumoral de AdRGDTat8TK-L, pero tampoco lo disminuía. Más aún, se demostró que el efecto citotóxico de AdRGDTat8TK-L/GCV era superior al de un adenovirus no replicativo que expresa TK bajo el promotor constitutivo CMV (AdTK) (Cascante, Abate-Daga et al. 2007).

Con el objetivo final de proponer a AdRGDTat8TK-L como un candidato para su utilización en el tratamiento de cánceres humanos, era necesario aplicar una herramienta de control capaz de garantizar la selectividad de su acción citotóxica en células tumorales. Dado que replicación de adenovirus en estado salvaje carece de dicha selectividad, se ha estudiado la utilización de adenovirus mutantes, deficientes en funciones necesarias para su replicación, que pueden ser complementadas por las células tumorales, pero no por células normales (por ejemplo, los adenovirus *dl922/947* y *AdΔ24*). Paralelamente, se han desarrollado sistemas que supeditan la expresión de genes virales necesarios para su replicación al control transcripcional de promotores activados en

células tumorales (Nettelbeck 2008), e incluso se ha ensayado el control de la expresión de dichos genes a nivel traduccional (Stoff-Khalili, Rivera et al. 2008). En el presente trabajo se utilizó un sistema que permite la replicación viral en células que presentan inactivación de pRB, mediante el uso de la forma mutada de E1A $\Delta 24$ expresada bajo el control del promotor de E2F. Así, se generó un adenovirus de replicación condicionada armado con TK, denominado ICOVIR11. Al igual que AdRGDTat8TK-L, ICOVIR11 expresa Tat8TK como gen tardío y presenta además una secuencia aislante en la región 5' río arriba de la unidad transcripcional de E1A, que impide la expresión inespecífica de E1A a partir de la actividad transcripcional de otros elementos en *cis*. Dicha secuencia aislante consiste en una señal de poliadenilación y en un elemento *insulator* presente en el *locus* de la distrofia miotónica (DM-1) (Majem, Cascallo et al. 2006). Adicionalmente, se ha incluido la secuencia Kozak, que ayuda a incrementar la traducción del ARN mensajero de E1A (Kozak 1986; Cascallo, Alonso et al. 2007) y la inserción del motivo RGD en la proteína fibra para redirigir la infección hacia un mecanismo mediado por integrinas (Suzuki, Fueyo et al. 2001).

En este contexto, la expresión tardía de Tat8TK no sólo minimiza la interferencia de ganciclovir en la replicación viral, sino que además subordina su expresión a la replicación viral, y por ende estará también restringida a células con altos niveles de E2F libre sumando un nivel adicional de selectividad. Estrategias similares fueron descritas por Carette y colaboradores quienes mostraron que, mediante la expresión del gen reportador de la luciferasa de luciérnaga bajo el control del MLP de un adenovirus oncolítico, era posible distinguir las células donde el virus replicaba de las células que habían sido transducidas, pero en las que la replicación había sido inhibida farmacológicamente (Carette, Graat et al. 2005).

Una posible desventaja que se deriva de la utilización de un promotor selectivo es la pérdida de potencia en la expresión de E1A en comparación con la obtenida bajo el control del promotor viral, que podría afectar la potencia del sistema en determinadas poblaciones de células tumorales. Si bien Cascalló y colaboradores demostraron que la introducción de la secuencia Kozak en el inicio de la traducción del gen de E1A permitía compensar la pérdida de potencia secundaria a la utilización de un sistema de replicación

condicionada (Cascallo, Alonso et al. 2007), nuestros resultados muestran que aunque ICOVIR11 posee la secuencia Kozak, la utilización del sistema E2Fp-E1A Δ 24 reduce su potencial oncolítico en comparación con el adenovirus armado AdRGDTat8TK y con el adenovirus AdRGDwt en las líneas celulares estudiadas. No obstante, la citotoxicidad inducida por el sistema TK/GCV podría compensar esta pérdida de potencia en las líneas celulares intrínsecamente sensibles a TK/GCV, igualando la potencia del virus AdRGDwt en una de las líneas celulares estudiadas, tanto *in vitro* como *in vivo* cuando se administró el virus de manera intratumoral. La administración sistémica de ICOVIR11, a su vez, fue capaz de inducir un efecto antitumoral. Así, teniendo en cuenta la heterogeneidad característica de las células tumorales, la utilización de diversos elementos que permitan incrementar la potencia permitirá inducir un efecto citotóxico en un mayor número de células.

Es interesante resaltar, además, que el efecto inhibitorio de ganciclovir sobre la citotoxicidad de AdRGDTatTK-L, descrito anteriormente en células NP-18 y presente también en células RWP-1 *in vitro*, no fue observado sobre ICOVIR11. Esta diferencia podría deberse a que, al ser ICOVIR11 menos potente que AdRGDTat8TK-L en términos de actividad lítica, la contribución relativa de TK/GCV al efecto citotóxico podría ser mayor que el efecto inhibitorio de ganciclovir sobre la replicación viral. Un concepto similar había sido sugerido por Raki y colaboradores, al argumentar que en el contexto de un adenovirus capaz de inducir una oncolisis potente, la citotoxicidad mediada por TK/GCV no era capaz de incrementar la potencia del adenovirus, en contraposición con resultados obtenidos con otros sistemas en los que el efecto oncolítico era menos eficiente y se observaba una potenciación inducida por el tratamiento con ganciclovir (Raki, Hakkarainen et al. 2007).

La viroterapia puede verse también favorecida por la combinación con terapia génica a un nivel que no está directamente relacionado con un aumento de potencia citotóxica, pero que podría tener implicaciones técnicas a la hora de optimizar la aplicación de un dado tratamiento. Se trata de la posibilidad de monitorizar en tiempo real y de manera no invasiva la localización y, en determinados casos como el de ICOVIR11, la actividad funcional

de un virus oncolítico armado con TK mediante tomografía por emisión de positrones. La utilización de esta técnica para la detección *in vivo* de virus replicativos que expresan TK ha sido documentada por Jacobs y colaboradores, en un estudio en el que analizaban la expresión de TK inducida un virus HSV-1 recombinante replicativo, en un modelo murino de glioma. El radiotrazador utilizado fue ^{124}I -FIAU, demostrándose su retención en células que expresaban la TK viral, pero obteniéndose una señal cuya intensidad se encontraba en el límite de detección de la técnica de PET. Así, los autores plantean la necesidad de incrementar la relación señal/ruido utilizando, por ejemplo, un sistema más potente para la expresión de TK (Jacobs, Tjuvajev et al. 2001). Más tarde, Kuruppu y colaboradores describieron la utilización de la tomografía por emisión de positrones para la detección de otro virus HSV-1 oncolítico, utilizando el radiotrazador ^{18}F -FHBG. En este caso, se obtuvo una robusta señal tomográfica que alcanzaba su máximo a las seis horas desde la administración del virus, pero que disminuía conforme se incrementaba la oncolisis, impidiendo la detección de la actividad TK conforme se incrementaba el número de partículas virales. Este fenómeno fue atribuido a una menor retención tumoral del trazador, debido a la lisis de las células diana, limitando el uso de la técnica para la monitorización de la replicación de este virus (Kuruppu, Brownell et al. 2007). En relación a la detección de adenovirus replicativos, Freytag y colaboradores utilizaron el radiotrazador ^{18}F -FHBG para la detección de un adenovirus de replicación no condicionada, armado con una variante de la timidina quinasa del virus herpes y la enzima citosina deaminasa. Esta técnica, experimentada en perros a los que se les había administrado el virus por inyección intrapancreática, les permitió detectar la presencia del virus en el órgano inyectado (Freytag, Barton et al. 2007), pero al ser la expresión de los transgenes independientes de la replicación viral, esta técnica no aporta información acerca de la replicación del virus.

Los experimentos realizados en el presente trabajo, utilizando el radiotrazador ^{18}F -FEAU, indican que la técnica de tomografía por emisión de positrones es lo suficientemente sensible como para detectar la actividad timidina quinasa inducida por la transducción de células tumorales con ICOVIR11. A diferencia de los resultados obtenidos por Kuruppu y colaboradores, la señal fue estable durante el período de tiempo analizado (a partir de 4 días post-inyección de

ICOVIR11 y hasta dos semanas después), durante el cual se espera que el virus haya sido capaz de replicar y lisar las células infectadas. Es interesante destacar que la técnica permitió, además, detectar la actividad timidina quinasa presente en tumores que no habían sido inyectados con ICOVIR11 pero en los cuales demostramos, mediante detección de ADN viral, la presencia de adenovirus. Teniendo en cuenta estos resultados, conjuntamente con la observación de que la inyección intratumoral del vector no replicativo AdTK inyectado por vía intratumoral era capaz, en este modelo, de inducir actividad de TK en tejido hepático, podemos inferir que en estas condiciones ICOVIR11 es capaz de alcanzar el torrente sanguíneo y ser capaz de infectar y replicar en células tumorales. Así, la estabilidad del virus en circulación y la capacidad de detectarlo en tejidos donde no ha sido inyectado directamente, resultan de gran interés para el desarrollo de terapias basadas en la administración sistémica del virus.

Mediante esta técnica se analizó la actividad timidina quinasa presente en los tumores con los diferentes grados de respuesta, obtenidos al aplicar diferentes pautas de administración de virus y prodroga. Este efecto había sido descrito anteriormente en el laboratorio para AdRGDTat8TK-L (Cascante, Abate-Daga et al. 2007) y en el presente trabajo, para se confirmó que también se cumple para ICOVIR11. Así, se estableció que mediante la administración alternada de ICOVIR11 y ganciclovir se conseguía una actividad de timidina quinasa semejante a la obtenida sin administrar ganciclovir y mayor a la conseguida mediante el protocolo en el que las dosis de ganciclovir se comienzan a administrar después de la última dosis de adenovirus. En términos de efecto antitumoral, el protocolo de administración alternada fue más eficiente que el protocolo de administración secuencial. De esta manera, hemos podido corroborar la hipótesis planteada anteriormente en el laboratorio, según la cual la mayor eficiencia antitumoral del protocolo de administración alternada está relacionada a una mayor actividad de timidina quinasa.

Asumiendo que la intensidad de la actividad de TK es indicativa de la cantidad de adenovirus replicando activamente, estos resultados confirman, además, que el tratamiento con ganciclovir es capaz de potenciar el efecto antitumoral de adenovirus replicativos armados con TK. Si bien la aplicación del tratamiento con ICOVIR11 en

solitario resultaba en unos niveles de similares de actividad TK (y presumiblemente de virus replicativo) que el tratamiento alternado con gancilovir, el primero no era capaz de inducir el mismo efecto antitumoral.

Esta aplicación de la TK como actividad marcadora de replicación viral también podría utilizarse para optimizar el protocolo de administración de virus, prodroga y, eventualmente, otro agente terapéutico que pudiese influir en la acción del sistema ICOVIR11/GCV. La correcta administración de virus y gancilovir cobra especial importancia en el caso de ICOVIR11, ya que gancilovir podría interferir con su replicación no sólo mediante la incorporación directa de sus metabolitos fosforilados en las moléculas de ADN viral, sino además, porque el efecto inhibitorio de estos metabolitos sobre la progresión en ciclo celular podría provocar una disminución en los niveles intracelulares de E2F libre, comprometiendo así la expresión de E1A.

En un contexto clínico, esta técnica permitiría el seguimiento del tratamiento en tiempo real, y constituiría un posible criterio para la decisión de establecer un protocolo con efecto citotóxico o uno con efecto virostático, según la replicación viral sea detectada en el tejido diana o en un tejido donde podría ejercer un efecto colateral no deseado.

CONCLUSIONES

"L'originalitat consisteix en tornar als orígens"

Antoni Gaudí

6. Conclusiones

Las líneas celulares de adenocarcinoma pancreático humano presentan diversos grados de sensibilidad al sistema TK/GCV, pudiéndose clasificar como sensibles o resistentes según su respuesta. El incremento de células en fase S o fase S y G2/M en respuesta al tratamiento está relacionado con la sensibilidad de las células al sistema TK/GCV.

La exposición repetida al tratamiento con TK/GCV induce un fenotipo resistente en células de adenocarcinoma pancreático humano originalmente sensibles. El desarrollo del fenotipo de resistencia inducida involucra cambios en la expresión de genes que codifican para componentes de la cromatina y genes involucrados en el ensamblaje de los nucleosomas, así como de genes relacionados con el control de la proliferación celular, de la respuesta a daño en el ADN y en el control celular.

El aumento de células en fase S en respuesta al tratamiento con TK/GCV coincide temporalmente con la activación del *checkpoint* de fase S, siendo la quinasa Chk1 un importante mediador en este proceso. La inhibición farmacológica de la actividad quinasa de Chk1 inhibe parcialmente la activación del *checkpoint* de fase S y produce un efecto antagónico sobre la citotoxicidad de TK/GCV en células sensibles. El éxito de la administración de UCN-01 como terapia adyuvante para TK/GCV en humanos podría estar condicionada por la funcionalidad del *checkpoint* de fase S.

El silenciamiento de la expresión del gen antiapoptótico BCL2 es capaz de potenciar la citotoxicidad de TK/GCV.

La expresión de TK como gen tardío de un adenovirus replicativo induce mayor citotoxicidad que la expresión de TK por un vector adenoviral no replicativo, ambos en presencia de ganciclovir.

El uso de un promotor altamente activo en células tumorales (promotor de E2F-1) para el control de la replicación adenoviral reduce parcialmente la potencia citotóxica de un adenovirus replicativo, armado con TK como gen tardío.

El tratamiento conjunto con ganciclovir permite compensar, en células sensibles a TK/GCV, la pérdida de potencia derivada del uso del promotor de E2F-1 como elemento de selectividad. Dicha compensación permite, a la combinación ICOVIR11/GCV, inducir un efecto citotóxico y antitumoral equiparable al de un adenovirus replicativo sin especificidad para células tumorales.

La técnica de tomografía por emisión de positrones, utilizando el radiotrazador FEAU, permite la detección de la actividad de timidina quinasa inducida por vectores adenovirales que expresan dicha enzima como gen tardío e, indirectamente, la replicación de los mismos.

El régimen de administración de ICOVIR11 y ganciclovir condiciona la respuesta al tratamiento y este fenómeno está asociado a diferencias en la actividad de timidina quinasa inducida en los tumores.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Adachi, M., J. Sampath, et al. (2002). "Expression of MRP4 confers resistance to ganciclovir and compromises bystander cell killing." J Biol Chem **277**(41): 38998-9004.
- Ahn, M., S. J. Lee, et al. (2009). "Enhanced combined tumor-specific oncolysis and suicide gene therapy for prostate cancer using M6 promoter." Cancer Gene Ther **16**(1): 73-82.
- Albertella, M. R., C. M. Green, et al. (2005). "A role for polymerase eta in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage." Cancer Res **65**(21): 9799-806.
- Alonso, M. M., H. Jiang, et al. (2008). "Delta-24-RGD in combination with RAD001 induces enhanced anti-glioma effect via autophagic cell death." Mol Ther **16**(3): 487-93.
- Altaner, C. (2008). "Prodrug cancer gene therapy." Cancer Lett **270**(2): 191-201.
- Anderson, C. W., M. E. Young, et al. (1989). "Characterization of the adenovirus 2 virion protein, mu." Virology **172**(2): 506-12.
- Baer, C., M. Nees, et al. (2004). "Profiling and functional annotation of mRNA gene expression in pediatric rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma." Int J Cancer **110**(5): 687-94.
- Bandara, L. R. and N. B. La Thangue (1991). "Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor." Nature **351**(6326): 494-7.
- Barker, D. D. and A. J. Berk (1987). "Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection." Virology **156**(1): 107-21.
- Bartek, J., J. Bartkova, et al. (1996). "The retinoblastoma protein pathway and the restriction point." Curr Opin Cell Biol **8**(6): 805-14.
- Bartek, J., C. Lukas, et al. (2004). "Checking on DNA damage in S phase." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 792-804.
- Bartek, J. and J. Lukas (2001). "Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage." FEBS Lett **490**(3): 117-22.

- Barton, K. N., H. Stricker, et al. (2008). "Phase I study of noninvasive imaging of adenovirus-mediated gene expression in the human prostate." Mol Ther **16**(10): 1761-9.
- Bauerschmitz, G. J., J. T. Lam, et al. (2002). "Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus." Cancer Res **62**(5): 1266-70.
- Bauzon, M. and T. W. Hermiston (2008). "Exploiting diversity: genetic approaches to creating highly potent and efficacious oncolytic viruses." Curr Opin Mol Ther **10**(4): 350-5.
- Bavoux, C., J. S. Hoffmann, et al. (2005). "Adaptation to DNA damage and stimulation of genetic instability: the double-edged sword mammalian DNA polymerase kappa." Biochimie **87**(7): 637-46.
- Becker, T. C., R. J. Noel, et al. (1994). "Use of recombinant adenovirus for metabolic engineering of mammalian cells." Methods Cell Biol **43 Pt A**: 161-89.
- Beltinger, C., S. Fulda, et al. (1999). "Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(15): 8699-704.
- Bennour, E., C. Ferrand, et al. (2008). "Abnormal expression of only the CD34 part of a transgenic CD34/herpes simplex virus-thymidine kinase fusion protein is associated with ganciclovir resistance." Hum Gene Ther **19**(7): 699-709.
- Bi, X., D. M. Slater, et al. (2005). "DNA polymerase kappa is specifically required for recovery from the benzo[a]pyrene-dihydrodiol epoxide (BPDE)-induced S-phase checkpoint." J Biol Chem **280**(23): 22343-55.
- Bischoff, J. R., D. H. Kirn, et al. (1996). "An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells." Science **274**(5286): 373-6.
- Bonini, C., G. Ferrari, et al. (1997). "HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia." Science **276**(5319): 1719-24.
- Bordignon, C., C. Bonini, et al. (1995). "Transfer of the HSV-tk gene into donor peripheral blood lymphocytes for in vivo modulation of donor anti-tumor immunity after allogeneic bone marrow transplantation." Hum Gene Ther **6**(6): 813-9.

- Brighton, P. J., P. G. Szekeres, et al. (2004). "Neuromedin U and its receptors: structure, function, and physiological roles." Pharmacol Rev **56**(2): 231-48.
- Brown, B. D., M. A. Venneri, et al. (2006). "Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer." Nat Med **12**(5): 585-91.
- Brunet, A., F. Kanai, et al. (2002). "14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport." J Cell Biol **156**(5): 817-28.
- Carette, J. E., H. C. Graat, et al. (2005). "Replication-dependent transgene expression from a conditionally replicating adenovirus via alternative splicing to a heterologous splice-acceptor site." J Gene Med **7**(8): 1053-62.
- Carrio, M., A. Mazo, et al. (2001). "Retrovirus-mediated transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase and connexin26 genes in pancreatic cells results in variable efficiency on the bystander killing: implications for gene therapy." Int J Cancer **94**(1): 81-8.
- Carrio, M., A. Romagosa, et al. (1999). "Enhanced pancreatic tumor regression by a combination of adenovirus and retrovirus-mediated delivery of the herpes simplex virus thymidine kinase gene." Gene Ther **6**(4): 547-53.
- Cartwright, T., D. A. Richards, et al. (2008). "Cancer of the pancreas: are we making progress? A review of studies in the US Oncology Research Network." Cancer Control **15**(4): 308-13.
- Cascallo, M., M. M. Alonso, et al. (2007). "Systemic toxicity-efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway." Mol Ther **15**(9): 1607-15.
- Cascallo, M., G. Capella, et al. (2003). "Ras-dependent oncolysis with an adenovirus VAI mutant." Cancer Res **63**(17): 5544-50.
- Cascante, A., D. Abate-Daga, et al. (2007). "GCV modulates the antitumoural efficacy of a replicative adenovirus expressing the Tat8-TK as a late gene in a pancreatic tumour model." Gene Ther **14**(20): 1471-80.
- Cascante, A., M. Huch, et al. (2005). "Tat8-TK/GCV suicide gene therapy induces pancreatic tumor regression in vivo." Hum Gene Ther **16**(12): 1377-88.

- Cavenee, W. K., T. P. Dryja, et al. (1983). "Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma." Nature **305**(5937): 779-84.
- Chellappan, S. P., S. Hiebert, et al. (1991). "The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein." Cell **65**(6): 1053-61.
- Chen, Y. W., J. E. Cleaver, et al. (2006). "A novel role of DNA polymerase eta in modulating cellular sensitivity to chemotherapeutic agents." Mol Cancer Res **4**(4): 257-65.
- Chiocca, E. A. (2002). "Oncolytic viruses." Nat Rev Cancer **2**(12): 938-50.
- Choi, S. R., Z. P. Zhuang, et al. (2005). "SPECT imaging of herpes simplex virus type1 thymidine kinase gene expression by [(123)I]FIAU(1)." Acad Radiol **12**(7): 798-805.
- Chou, T. C. and P. Talalay (1984). "Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors." Adv Enzyme Regul **22**: 27-55.
- Ciceri, F., C. Bonini, et al. (2005). "Modulation of GvHD by suicide-gene transduced donor T lymphocytes: clinical applications in mismatched transplantation." Cytherapy **7**(2): 144-9.
- Ciceri, F., C. Bonini, et al. (2007). "Antitumor effects of HSV-TK-engineered donor lymphocytes after allogeneic stem-cell transplantation." Blood **109**(11): 4698-707.
- Cosse, J. P. and C. Michiels (2008). "Tumour hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression." Anticancer Agents Med Chem **8**(7): 790-7.
- Crompton, A. M. and D. H. Kirn (2007). "From ONYX-015 to armed vaccinia viruses: the education and evolution of oncolytic virus development." Curr Cancer Drug Targets **7**(2): 133-9.
- Davydova, J., L. P. Le, et al. (2004). "Infectivity-enhanced cyclooxygenase-2-based conditionally replicative adenoviruses for esophageal adenocarcinoma treatment." Cancer Res **64**(12): 4319-27.
- De Angelis, P. M., D. H. Svendsrud, et al. (2006). "Cellular response to 5-fluorouracil (5-FU) in 5-FU-resistant colon cancer cell lines during treatment and recovery." Mol Cancer **5**: 20.

- Dohan, O., A. De la Vieja, et al. (2003). "The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance." Endocr Rev **24**(1): 48-77.
- Dong, M., Q. Dong, et al. (2007). "Expression of Gadd45a and p53 proteins in human pancreatic cancer: potential effects on clinical outcomes." J Surg Oncol **95**(4): 332-6.
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, et al. (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7413-7.
- Fick, J., F. G. Barker, 2nd, et al. (1995). "The extent of heterocellular communication mediated by gap junctions is predictive of bystander tumor cytotoxicity in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 11071-5.
- Fillat, C., M. Carrio, et al. (2003). "Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: fifteen years of application." Curr Gene Ther **3**(1): 13-26.
- Foekens, J. A., Y. Wang, et al. (2008). "The use of genomic tools for the molecular understanding of breast cancer and to guide personalized medicine." Drug Discov Today **13**(11-12): 481-7.
- Fogar, P., E. Greco, et al. (2003). "Suicide gene therapy with HSV-TK in pancreatic cancer has no effect in vivo in a mouse model." Eur J Surg Oncol **29**(9): 721-30.
- Fontanellas, A., S. Hervas-Stubbs, et al. (2009). "PET imaging of thymidine kinase gene expression in the liver of non-human primates following systemic delivery of an adenoviral vector." Gene Ther **16**(1): 136-41.
- Freytag, S. O., K. N. Barton, et al. (2007). "Replication-competent adenovirus-mediated suicide gene therapy with radiation in a preclinical model of pancreatic cancer." Mol Ther **15**(9): 1600-6.
- Freytag, S. O., D. Paielli, et al. (2002). "Efficacy and toxicity of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy in combination with radiation therapy in an orthotopic mouse prostate cancer model." Int J Radiat Oncol Biol Phys **54**(3): 873-85.
- Freytag, S. O., K. R. Rogulski, et al. (1998). "A novel three-pronged approach to kill cancer cells selectively: concomitant viral, double suicide gene, and radiotherapy." Hum Gene Ther **9**(9): 1323-33.

- Fueyo, J., C. Gomez-Manzano, et al. (2000). "A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo." Oncogene **19**(1): 2-12.
- Gagandeep, S., R. Brew, et al. (1996). "Prodrug-activated gene therapy: involvement of an immunological component in the "bystander effect"." Cancer Gene Ther **3**(2): 83-8.
- Gambhir, S. S., J. R. Barrio, et al. (1999). "Assays for noninvasive imaging of reporter gene expression." Nucl Med Biol **26**(5): 481-90.
- Garin, M. I., E. Garrett, et al. (2001). "Molecular mechanism for ganciclovir resistance in human T lymphocytes transduced with retroviral vectors carrying the herpes simplex virus thymidine kinase gene." Blood **97**(1): 122-9.
- Gentleman, R. C., V. J. Carey, et al. (2004). "Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics." Genome Biol **5**(10): R80.
- Greco, E., P. Fogar, et al. (2002). "Retrovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer in pancreatic cancer cell lines: an incomplete antitumor effect." Pancreas **25**(2): e21-9.
- Gross-Bellard, M., P. Oudet, et al. (1973). "Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells." Eur J Biochem **36**(1): 32-8.
- Guo, Z. S., S. H. Thorne, et al. (2008). "Oncolytic virotherapy: molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses." Biochim Biophys Acta **1785**(2): 217-31.
- Haberkorn, U. (2008). "PET and SPECT." Handb Exp Pharmacol(185 Pt 2): 13-35.
- Haberkorn, U. and A. Altmann (2003). "Functional genomics and radioisotope-based imaging procedures." Ann Med **35**(6): 370-9.
- Haberkorn, U., A. Altmann, et al. (2004). "Impact of functional genomics and proteomics on radionuclide imaging." Semin Nucl Med **34**(1): 4-22.
- Hallenbeck, P. L., Y. N. Chang, et al. (1999). "A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma." Hum Gene Ther **10**(10): 1721-33.

- Hamel, W., L. Magnelli, et al. (1996). "Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells." Cancer Res **56**(12): 2697-702.
- Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." Nature **418**(6894): 244-51.
- Haviv, Y. S., J. L. Blackwell, et al. (2002). "Adenoviral gene therapy for renal cancer requires retargeting to alternative cellular receptors." Cancer Res **62**(15): 4273-81.
- He, T. C., S. Zhou, et al. (1998). "A simplified system for generating recombinant adenoviruses." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2509-14.
- Heise, C., T. Hermiston, et al. (2000). "An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy." Nat Med **6**(10): 1134-9.
- Helt, C. E., W. A. Cliby, et al. (2005). "Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage." J Biol Chem **280**(2): 1186-92.
- Hildesheim, J. and A. J. Fornace, Jr. (2002). "Gadd45a: an elusive yet attractive candidate gene in pancreatic cancer." Clin Cancer Res **8**(8): 2475-9.
- Hinz, S., A. Trauzold, et al. (2000). "Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis." Oncogene **19**(48): 5477-86.
- Hosack, D. A., G. Dennis, Jr., et al. (2003). "Identifying biological themes within lists of genes with EASE." Genome Biol **4**(10): R70.
- Hruban, R. H., N. V. Adsay, et al. (2001). "Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions." Am J Surg Pathol **25**(5): 579-86.
- Hruban, R. H., K. Takaori, et al. (2004). "An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms." Am J Surg Pathol **28**(8): 977-87.
- Hsieh, C. L., L. Yang, et al. (2002). "A novel targeting modality to enhance adenoviral replication by vitamin D(3) in androgen-independent human prostate cancer cells and tumors." Cancer Res **62**(11): 3084-92.
- Huang, Q., X. Zhang, et al. (2004). "A novel conditionally replicative adenovirus vector targeting telomerase-positive tumor cells." Clin Cancer Res **10**(4): 1439-45.

- Huch, M., D. Abate-Daga, et al. (2006). "Targeting the CYP2B 1/cyclophosphamide suicide system to fibroblast growth factor receptors results in a potent antitumoral response in pancreatic cancer models." Hum Gene Ther **17**(12): 1187-200.
- Ilsley, D. D., S. H. Lee, et al. (1995). "Acyclic guanosine analogs inhibit DNA polymerases alpha, delta, and epsilon with very different potencies and have unique mechanisms of action." Biochemistry **34**(8): 2504-10.
- Immonen, A., M. Vapalahti, et al. (2004). "AdvHSV-tk gene therapy with intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study." Mol Ther **10**(5): 967-72.
- Jacobs, A., J. G. Tjuvajev, et al. (2001). "Positron emission tomography-based imaging of transgene expression mediated by replication-conditional, oncolytic herpes simplex virus type 1 mutant vectors in vivo." Cancer Res **61**(7): 2983-95.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2008). "Cancer statistics, 2008." CA Cancer J Clin **58**(2): 71-96.
- Jiang, H., C. Gomez-Manzano, et al. (2007). "Examination of the therapeutic potential of Delta-24-RGD in brain tumor stem cells: role of autophagic cell death." J Natl Cancer Inst **99**(18): 1410-4.
- Jimenez, T., W. P. Fox, et al. (2006). "Connexin over-expression differentially suppresses glioma growth and contributes to the bystander effect following HSV-thymidine kinase gene therapy." Cell Commun Adhes **13**(1-2): 79-92.
- Katze, M. G., D. DeCorato, et al. (1987). "Adenovirus VAI RNA complexes with the 68 000 Mr protein kinase to regulate its autophosphorylation and activity." Embo J **6**(3): 689-97.
- Kawasaki, H. and K. Taira (2004). "Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells." Nature **431**(7005): 211-7.
- Kawashima, T., S. Kagawa, et al. (2004). "Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer." Clin Cancer Res **10**(1 Pt 1): 285-92.
- Ketterer, K., B. Kong, et al. (2008). "Neuromedin U is overexpressed in pancreatic cancer and increases invasiveness via the hepatocyte growth factor c-Met pathway." Cancer Lett.

- Kianmanesh, A. R., H. Perrin, et al. (1997). "A "distant" bystander effect of suicide gene therapy: regression of nontransduced tumors together with a distant transduced tumor." *Hum Gene Ther* **8**(15): 1807-14.
- Kim, J., A. Krichevsky, et al. (2004). "Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(1): 360-5.
- Kim, J. H., S. H. Kim, et al. (1994). "Selective enhancement by an antiviral agent of the radiation-induced cell killing of human glioma cells transduced with HSV-tk gene." *Cancer Res* **54**(23): 6053-6.
- Kim, J. H., S. H. Kim, et al. (1995). "Selective enhancement of radiation response of herpes simplex virus thymidine kinase transduced 9L gliosarcoma cells in vitro and in vivo by antiviral agents." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **33**(4): 861-8.
- Kirsch, D. G., A. Doseff, et al. (1999). "Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c." *J Biol Chem* **274**(30): 21155-61.
- Kitajewski, J., R. J. Schneider, et al. (1986). "Adenovirus VAI RNA antagonizes the antiviral action of interferon by preventing activation of the interferon-induced eIF-2 alpha kinase." *Cell* **45**(2): 195-200.
- Ko, A. H. and M. A. Tempero (2009). "Personalized medicine for pancreatic cancer: a step in the right direction." *Gastroenterology* **136**(1): 43-5.
- Komarova, S., Y. Kawakami, et al. (2006). "Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses." *Mol Cancer Ther* **5**(3): 755-66.
- Kozak, M. (1986). "Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes." *Cell* **44**(2): 283-92.
- Kuriyama, S., T. Sakamoto, et al. (1998). "Expression of a retrovirally transduced gene under control of an internal housekeeping gene promoter does not persist due to methylation and is restored partially by 5-azacytidine treatment." *Gene Ther* **5**(10): 1299-305.
- Kuruppu, D., A. L. Brownell, et al. (2007). "Positron emission tomography of herpes simplex virus 1 oncolysis." *Cancer Res* **67**(7): 3295-300.
- Lambright, E. S., K. Amin, et al. (2001). "Inclusion of the herpes simplex thymidine kinase gene in a replicating adenovirus

- does not augment antitumor efficacy." Gene Ther **8**(12): 946-53.
- Lamfers, M., S. Idema, et al. (2009). "Homing properties of adipose-derived stem cells to intracerebral glioma and the effects of adenovirus infection." Cancer Lett **274**(1): 78-87.
- Lauterbur, P. C. (1989). "Image formation by induced local interactions. Examples employing nuclear magnetic resonance. 1973." Clin Orthop Relat Res(244): 3-6.
- Leone, G., J. DeGregori, et al. (1998). "E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase." Genes Dev **12**(14): 2120-30.
- Li, Y., H. Qian, et al. (2009). "Adenoviral-mediated gene transfer of Gadd45a results in suppression by inducing apoptosis and cell cycle arrest in pancreatic cancer cell." J Gene Med **11**(1): 3-13.
- Lohr, M., G. Kloppel, et al. (2005). "Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis." Neoplasia **7**(1): 17-23.
- Lopes, M., C. Cotta-Ramusino, et al. (2001). "The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks." Nature **412**(6846): 557-61.
- Luqmani, Y. A. (2005). "Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy." Med Princ Pract **14 Suppl 1**: 35-48.
- Macaluso, M., G. Russo, et al. (2002). "Ras family genes: an interesting link between cell cycle and cancer." J Cell Physiol **192**(2): 125-30.
- Magee, D. a. B., JS. (2002). "Anatomy, histology, embryology and developmental anomalies of the pancreas. In *Gastrointestinal and Liver Disease*, Feldman, MF, L and Selisenger, MH. ." **1**: 859-869.
- Maitra, A., N. V. Adsay, et al. (2003). "Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray." Mod Pathol **16**(9): 902-12.
- Majem, M., M. Cascallo, et al. (2006). "Control of E1A under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator reduces the toxicity of oncolytic adenovirus Ad-Delta24RGD." Cancer Gene Ther **13**(7): 696-705.

- Makinen, K., S. Loimas, et al. (2000). "Evaluation of herpes simplex thymidine kinase mediated gene therapy in experimental pancreatic cancer." J Gene Med **2**(5): 361-7.
- Markteli, S., C. Bonini, et al. (1999). "Potential of gene therapy in bone marrow transplantation." BioDrugs **11**(1): 1-6.
- Matsubara, S., Y. Wada, et al. (2001). "A conditional replication-competent adenoviral vector, Ad-OC-E1a, to cotarget prostate cancer and bone stroma in an experimental model of androgen-independent prostate cancer bone metastasis." Cancer Res **61**(16): 6012-9.
- Matthews, D. A. and W. C. Russell (1995). "Adenovirus protein-protein interactions: molecular parameters governing the binding of protein VI to hexon and the activation of the adenovirus 23K protease." J Gen Virol **76** (Pt 8): 1959-69.
- Mazumder, S., E. L. DuPree, et al. (2004). "A dual role of cyclin E in cell proliferation and apoptosis may provide a target for cancer therapy." Curr Cancer Drug Targets **4**(1): 65-75.
- Mazumder, S., D. Plesca, et al. (2007). "Interaction of a cyclin E fragment with Ku70 regulates Bax-mediated apoptosis." Mol Cell Biol **27**(9): 3511-20.
- McCulloch, S. D. and T. A. Kunkel (2008). "The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases." Cell Res **18**(1): 148-61.
- McManus, M. T., C. P. Petersen, et al. (2002). "Gene silencing using micro-RNA designed hairpins." Rna **8**(6): 842-50.
- McManus, M. T. and P. A. Sharp (2002). "Gene silencing in mammals by small interfering RNAs." Nat Rev Genet **3**(10): 737-47.
- McMasters, R. A., T. N. Wilbert, et al. (2000). "Two-drug combinations that increase apoptosis and modulate bak and bcl-X(L) expression in human colon tumor cell lines transduced with herpes simplex virus thymidine kinase." Cancer Gene Ther **7**(4): 563-73.
- Michalski, C. W., M. Erkan, et al. (2008). "Ex vivo chemosensitivity testing and gene expression profiling predict response towards adjuvant gemcitabine treatment in pancreatic cancer." Br J Cancer **99**(5): 760-7.
- Miletic, H., Y. Fischer, et al. (2007). "Bystander killing of malignant glioma by bone marrow-derived tumor-infiltrating progenitor cells expressing a suicide gene." Mol Ther **15**(7): 1373-81.

- Min, J. J. and S. S. Gambhir (2008). "Molecular imaging of PET reporter gene expression." Handb Exp Pharmacol(185 Pt 2): 277-303.
- Missiaglia, E., M. Donadelli, et al. (2005). "Growth delay of human pancreatic cancer cells by methylase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine treatment is associated with activation of the interferon signalling pathway." Oncogene **24**(1): 199-211.
- Moolten, F. L. (1986). "Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy." Cancer Res **46**(10): 5276-81.
- Moroy, T. and C. Geisen (2004). "Cyclin E." Int J Biochem Cell Biol **36**(8): 1424-39.
- Morris, J. C. and O. Wildner (2000). "Therapy of head and neck squamous cell carcinoma with an oncolytic adenovirus expressing HSV-tk." Mol Ther **1**(1): 56-62.
- Morris, K. V., S. W. Chan, et al. (2004). "Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells." Science **305**(5688): 1289-92.
- Mundschau, L. J. and D. V. Faller (1992). "Oncogenic ras induces an inhibitor of double-stranded RNA-dependent eukaryotic initiation factor 2 alpha-kinase activation." J Biol Chem **267**(32): 23092-8.
- Nanda, D., R. Vogels, et al. (2001). "Treatment of malignant gliomas with a replicating adenoviral vector expressing herpes simplex virus-thymidine kinase." Cancer Res **61**(24): 8743-50.
- Napieralski, R., K. Ott, et al. (2005). "Combined GADD45A and thymidine phosphorylase expression levels predict response and survival of neoadjuvant-treated gastric cancer patients." Clin Cancer Res **11**(8): 3025-31.
- Nelson, K. M. and G. J. Weiss (2008). "MicroRNAs and cancer: past, present, and potential future." Mol Cancer Ther **7**(12): 3655-60.
- Nemerow, G. R. (2002). "Biology of Adenovirus Cell Entry. In Adenoviral Vectors for Gene Therapy, Curiel, D.T.a.D., Joanne T (ed). Academic Press: London." 19-38.
- Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, et al. (2004). "A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer." N Engl J Med **350**(12): 1200-10.

- Nettelbeck, D. M. (2008). "Cellular genetic tools to control oncolytic adenoviruses for virotherapy of cancer." J Mol Med **86**(4): 363-77.
- Ng, P. a. G., Frank L. (2002). "Adenoviral Vector Construction I: Mammalian Systems. In Adenoviral Vectors for Gene Therapy, Curiel, D.T.a.D., Joanne T. (ed). Academic Press: London. ." 71-104.
- Nicholas, T. W., S. B. Read, et al. (2003). "Suicide gene therapy with Herpes simplex virus thymidine kinase and ganciclovir is enhanced with connexins to improve gap junctions and bystander effects." Histol Histopathol **18**(2): 495-507.
- Niedergethmann, M., F. Alves, et al. (2007). "Gene expression profiling of liver metastases and tumour invasion in pancreatic cancer using an orthotopic SCID mouse model." Br J Cancer **97**(10): 1432-40.
- O'Shea, C. C., L. Johnson, et al. (2004). "Late viral RNA export, rather than p53 inactivation, determines ONYX-015 tumor selectivity." Cancer Cell **6**(6): 611-23.
- Otsubo, A., U. K. Bhawal, et al. (2007). "UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) induces apoptosis and G1 arrest of both primary and metastatic oral cancer cell lines in vitro." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **103**(3): 391-7.
- Paddison, P. J., A. A. Caudy, et al. (2002). "Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells." Genes Dev **16**(8): 948-58.
- Parada, C., J. Hernandez Losa, et al. (2003). "Adenovirus E1a protein enhances the cytotoxic effects of the herpes thymidine kinase-ganciclovir system." Cancer Gene Ther **10**(2): 152-60.
- Parsels, L. A., M. A. Morgan, et al. (2009). "Gemcitabine sensitization by checkpoint kinase 1 inhibition correlates with inhibition of a Rad51 DNA damage response in pancreatic cancer cells." Mol Cancer Ther **8**(1): 45-54.
- Pasanen, T., A. Karppinen, et al. (2003). "Polyamine biosynthesis inhibition enhances HSV-1 thymidine kinase/ganciclovir-mediated cytotoxicity in tumor cells." Int J Cancer **104**(3): 380-8.
- Pathak, V. K., P. J. Nielsen, et al. (1988). "Structure of the beta subunit of translational initiation factor eIF-2." Cell **54**(5): 633-9.

- Penuelas, I., G. Mazzolini, et al. (2005). "Positron emission tomography imaging of adenoviral-mediated transgene expression in liver cancer patients." Gastroenterology **128**(7): 1787-95.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Pfaffl, M. W., G. W. Horgan, et al. (2002). "Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic Acids Res **30**(9): e36.
- Phelps, M. E., E. J. Hoffman, et al. (1975). "Application of annihilation coincidence detection to transaxial reconstruction tomography." J Nucl Med **16**(3): 210-24.
- Portsmouth, D., J. Hlavaty, et al. (2007). "Suicide genes for cancer therapy." Mol Aspects Med **28**(1): 4-41.
- Raki, M., T. Hakkarainen, et al. (2007). "Utility of TK/GCV in the context of highly effective oncolysis mediated by a serotype 3 receptor targeted oncolytic adenovirus." Gene Ther **14**(19): 1380-8.
- Ramirez, P. J., S. M. Vickers, et al. (2008). "Optimization of conditionally replicative adenovirus for pancreatic cancer and its evaluation in an orthotopic murine xenograft model." Am J Surg **195**(4): 481-90.
- Real, F. X., E. Cibrian-Uhalte, et al. (2008). "Pancreatic cancer development and progression: remodeling the model." Gastroenterology **135**(3): 724-8.
- Rekosh, D. M., W. C. Russell, et al. (1977). "Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA." Cell **11**(2): 283-95.
- Reyes, G., A. Villanueva, et al. (1996). "Orthotopic xenografts of human pancreatic carcinomas acquire genetic aberrations during dissemination in nude mice." Cancer Res **56**(24): 5713-9.
- Ring, C. J. (2002). "Cytolytic viruses as potential anti-cancer agents." J Gen Virol **83**(Pt 3): 491-502.
- Robe, P. A., O. Jolois, et al. (2004). "Modulation of the HSV-TK/ganciclovir bystander effect by n-butyrate in glioblastoma: correlation with gap-junction intercellular communication." Int J Oncol **25**(1): 187-92.

- Robe, P. A., F. Princen, et al. (2000). "Pharmacological modulation of the bystander effect in the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy system: effects of dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate, alpha-glycyrrhetic acid, and cytosine arabinoside." Biochem Pharmacol **60**(2): 241-9.
- Rodriguez, R., E. R. Schuur, et al. (1997). "Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells." Cancer Res **57**(13): 2559-63.
- Rogulski, K. R., S. O. Freytag, et al. (2000). "In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy." Cancer Res **60**(5): 1193-6.
- Rogulski, K. R., M. S. Wing, et al. (2000). "Double suicide gene therapy augments the antitumor activity of a replication-competent lytic adenovirus through enhanced cytotoxicity and radiosensitization." Hum Gene Ther **11**(1): 67-76.
- Rubsam, L. Z., B. L. Davidson, et al. (1998). "Superior cytotoxicity with ganciclovir compared with acyclovir and 1-beta-D-arabinofuranosylthymine in herpes simplex virus-thymidine kinase-expressing cells: a novel paradigm for cell killing." Cancer Res **58**(17): 3873-82.
- Russell, W. C. (2000). "Update on adenovirus and its vectors." J Gen Virol **81**(Pt 11): 2573-604.
- Sangro, B., C. Qian, et al. (2002). "Tracing transgene expression in cancer gene therapy: a requirement for rational progress in the field." Mol Imaging Biol **4**(1): 27-33.
- Saukkonen, K. and A. Hemminki (2004). "Tissue-specific promoters for cancer gene therapy." Expert Opin Biol Ther **4**(5): 683-96.
- Scaffidi, C., S. Fulda, et al. (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." Embo J **17**(6): 1675-87.
- Schneider, G., A. Weber, et al. (2006). "GADD45alpha is highly expressed in pancreatic ductal adenocarcinoma cells and required for tumor cell viability." Int J Cancer **118**(10): 2405-11.
- Serganova, I., P. Mayer-Kukuck, et al. (2008). "Molecular imaging: reporter gene imaging." Handb Exp Pharmacol(185 Pt 2): 167-223.

- Shai, R. M., J. K. Reichardt, et al. (2008). "Pharmacogenomics of brain cancer and personalized medicine in malignant gliomas." Future Oncol **4**(4): 525-34.
- Shenk, T. (1996). "The Viruses and Their Replication. In Fields Virology, BN Fields, D.K.a.P.H. (ed). Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia." 2111-2148.
- Sherr, C. J. (2000). "The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited." Cancer Res **60**(14): 3689-95.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." Genes Dev **13**(12): 1501-12.
- Shetzline, S. E., R. Rallapalli, et al. (2004). "Neuromedin U: a Myb-regulated autocrine growth factor for human myeloid leukemias." Blood **104**(6): 1833-40.
- Sohomonyan, S., A. Hajitou, et al. (2007). "Molecular PET imaging of HSV1-tk reporter gene expression using [¹⁸F]FEAU." Nat Protoc **2**(2): 416-23.
- Stefani, A. L., L. Barzon, et al. (2005). "Systemic efficacy of combined suicide/cytokine gene therapy in a murine model of hepatocellular carcinoma." J Hepatol **42**(5): 728-35.
- Stoff-Khalili, M. A., A. A. Rivera, et al. (2008). "Cancer-specific targeting of a conditionally replicative adenovirus using mRNA translational control." Breast Cancer Res Treat **108**(1): 43-55.
- Suzuki, K., J. Fueyo, et al. (2001). "A conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency." Clin Cancer Res **7**(1): 120-6.
- Takaki, T., K. Fukasawa, et al. (2005). "Preferences for phosphorylation sites in the retinoblastoma protein of D-type cyclin-dependent kinases, Cdk4 and Cdk6, in vitro." J Biochem **137**(3): 381-6.
- Tao, Z. F. and N. H. Lin (2006). "Chk1 inhibitors for novel cancer treatment." Anticancer Agents Med Chem **6**(4): 377-88.
- Tasciotti, E. and M. Giacca (2005). "Fusion of the human immunodeficiency virus type 1 tat protein transduction domain to thymidine kinase increases bystander effect and induces enhanced tumor killing in vivo." Hum Gene Ther **16**(12): 1389-403.
- Tekant, Y., J. Davydova, et al. (2005). "Oncolytic adenoviral therapy in gallbladder carcinoma." Surgery **137**(5): 527-35.

- Tercero, J. A. and J. F. Diffley (2001). "Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint." Nature **412**(6846): 553-7.
- Thomas, M. A., J. F. Spencer, et al. (2006). "Syrian hamster as a permissive immunocompetent animal model for the study of oncolytic adenovirus vectors." Cancer Res **66**(3): 1270-6.
- Thomas, M. A., J. F. Spencer, et al. (2008). "Immunosuppression enhances oncolytic adenovirus replication and antitumor efficacy in the Syrian hamster model." Mol Ther **16**(10): 1665-73.
- Tomicic, M. T., R. Thust, et al. (2002). "Ganciclovir-induced apoptosis in HSV-1 thymidine kinase expressing cells: critical role of DNA breaks, Bcl-2 decline and caspase-9 activation." Oncogene **21**(14): 2141-53.
- Touraine, R. L., H. Ishii-Morita, et al. (1998). "The bystander effect in the HSVtk/ganciclovir system and its relationship to gap junctional communication." Gene Ther **5**(12): 1705-11.
- Tse, A. N., R. Carvajal, et al. (2007). "Targeting checkpoint kinase 1 in cancer therapeutics." Clin Cancer Res **13**(7): 1955-60.
- Tseng, J. C., P. B. Zanzonico, et al. (2006). "Tumor-specific in vivo transfection with HSV-1 thymidine kinase gene using a Sindbis viral vector as a basis for prodrug ganciclovir activation and PET." J Nucl Med **47**(7): 1136-43.
- Udawatte, C. and H. Ripps (2005). "The spread of apoptosis through gap-junctional channels in BHK cells transfected with Cx32." Apoptosis **10**(5): 1019-29.
- Ullmannova, V., P. Stockbauer, et al. (2003). "Relationship between cyclin D1 and p21(Waf1/Cip1) during differentiation of human myeloid leukemia cell lines." Leuk Res **27**(12): 1115-23.
- van Dillen, I. J., N. H. Mulder, et al. (2005). "Influence of p53 status on the HSV-Tk/GCV-induced bystander effect in a panel of human ovarian carcinoma cell lines." Oncol Res **15**(3): 151-9.
- van Heek, N. T., A. K. Meeker, et al. (2002). "Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia." Am J Pathol **161**(5): 1541-7.
- van't Veer, L. J. and R. Bernards (2008). "Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns." Nature **452**(7187): 564-70.

- Venter, J. C., M. D. Adams, et al. (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-51.
- Verma, I. M. and M. D. Weitzman (2005). "Gene therapy: twenty-first century medicine." Annu Rev Biochem **74**: 711-38.
- Verzeletti, S., C. Bonini, et al. (1998). "Herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer for controlled graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia: clinical follow-up and improved new vectors." Hum Gene Ther **9**(15): 2243-51.
- Vile, R. G., S. Castleden, et al. (1997). "Generation of an anti-tumour immune response in a non-immunogenic tumour: HSVtk killing in vivo stimulates a mononuclear cell infiltrate and a Th1-like profile of intratumoural cytokine expression." Int J Cancer **71**(2): 267-74.
- Voidonikolas, G., M. C. Gingras, et al. (2009). "Developing a Tissue Resource to Characterize the Genome of Pancreatic Cancer." World J Surg.
- Wahlfors, T., A. Karppinen, et al. (2006). "Polyamine depletion and cell cycle manipulation in combination with HSV thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy." Int J Oncol **28**(6): 1515-22.
- Waxman, D. J. and P. S. Schwartz (2003). "Harnessing apoptosis for improved anticancer gene therapy." Cancer Res **63**(24): 8563-72.
- Wei, S. J., Y. Chao, et al. (1998). "S- and G2-phase cell cycle arrests and apoptosis induced by ganciclovir in murine melanoma cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase." Exp Cell Res **241**(1): 66-75.
- Weinberg, R. A. (1995). "The retinoblastoma protein and cell cycle control." Cell **81**(3): 323-30.
- Wettenhall, J. M. and G. K. Smyth (2004). "limmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data." Bioinformatics **20**(18): 3705-6.
- Wickham, T. J., P. Mathias, et al. (1993). "Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment." Cell **73**(2): 309-19.
- Wildner, O., R. M. Blaese, et al. (1999). "Therapy of colon cancer with oncolytic adenovirus is enhanced by the addition of herpes simplex virus-thymidine kinase." Cancer Res **59**(2): 410-3.

- Wildner, O. and J. C. Morris (2000). "The role of the E1B 55 kDa gene product in oncolytic adenoviral vectors expressing herpes simplex virus-tk: assessment of antitumor efficacy and toxicity." Cancer Res **60**(15): 4167-74.
- Wildner, O. and J. C. Morris (2000). "Therapy of peritoneal carcinomatosis from colon cancer with oncolytic adenoviruses." J Gene Med **2**(5): 353-60.
- Wildner, O., J. C. Morris, et al. (1999). "Adenoviral vectors capable of replication improve the efficacy of HSVtk/GCV suicide gene therapy of cancer." Gene Ther **6**(1): 57-62.
- Wilentz, R. E., C. A. Iacobuzio-Donahue, et al. (2000). "Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression." Cancer Res **60**(7): 2002-6.
- Xing, L., X. Deng, et al. (2008). "Non-invasive molecular and functional imaging of cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase fused with red fluorescence protein." Acta Oncol **47**(7): 1211-20.
- Xu, K., F. Zhu, et al. (2008). "Prophylaxis of graft-versus-host disease by lentiviral-mediated expression of herpes simplex virus-thymidine kinase and ganciclovir treatment." Transplant Proc **40**(8): 2665-9.
- Yaghoubi, S. S., M. C. Jensen, et al. (2009). "Noninvasive detection of therapeutic cytolytic T cells with 18F-FHBG PET in a patient with glioma." Nat Clin Pract Oncol **6**(1): 53-8.
- Yamamoto, M., R. Alemany, et al. (2001). "Characterization of the cyclooxygenase-2 promoter in an adenoviral vector and its application for the mitigation of toxicity in suicide gene therapy of gastrointestinal cancers." Mol Ther **3**(3): 385-94.
- Yamamoto, S., S. Suzuki, et al. (1997). "Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated killing of tumor cell induces tumor-specific cytotoxic T cells in mice." Cancer Gene Ther **4**(2): 91-6.
- Yamasawa, K., Y. Nio, et al. (2002). "Clinicopathological significance of abnormalities in Gadd45 expression and its relationship to p53 in human pancreatic cancer." Clin Cancer Res **8**(8): 2563-9.
- Yang, L., R. Hwang, et al. (1998). "Mechanisms for ganciclovir resistance in gastrointestinal tumor cells transduced with a retroviral vector containing the herpes simplex virus thymidine kinase gene." Clin Cancer Res **4**(3): 731-41.

- Yang, Z. G., Z. Chen, et al. (2005). "Inhibition of hepatitis B virus surface antigen expression by small hairpin RNA in vitro." World J Gastroenterol **11**(4): 498-502.
- Ylosmaki, E., T. Hakkarainen, et al. (2008). "Generation of a conditionally replicating adenovirus based on targeted destruction of E1A mRNA by a cell type-specific MicroRNA." J Virol **82**(22): 11009-15.
- Yokoyama, T., E. Iwado, et al. (2008). "Autophagy-inducing agents augment the antitumor effect of telomerase-sense oncolytic adenovirus OBP-405 on glioblastoma cells." Gene Ther **15**(17): 1233-9.
- Zhan, Q. (2005). "Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage." Mutat Res **569**(1-2): 133-43.
- Zhang, L. X., P. Acevedo, et al. (1995). "Upregulation of gap junctional communication and connexin43 gene expression by carotenoids in human dermal fibroblasts but not in human keratinocytes." Mol Carcinog **12**(1): 50-8.
- Zhang, X., L. Ma, et al. (2003). "Role of Gadd45alpha in the density-dependent G1 arrest induced by p27(Kip1)." Oncogene **22**(27): 4166-74.
- Zhang, Y. and J. M. Bergelson (2005). "Adenovirus receptors." J Virol **79**(19): 12125-31.
- Zhao, J. (2004). "Coordination of DNA synthesis and histone gene expression during normal cell cycle progression and after DNA damage." Cell Cycle **3**(6): 695-7.
- Ziller, C., H. Lincet, et al. (2004). "The cyclin-dependent kinase inhibitor p21(cip1/waf1) enhances the cytotoxicity of ganciclovir in HSV-tk transfected ovarian carcinoma cells." Cancer Lett **212**(1): 43-52.
- Zou, L. and S. J. Elledge (2003). "Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes." Science **300**(5625): 1542-8.

ANEXO

Huch M, Abate-Daga D, Roig JM, González JR, Fabregat J, Sosnowski B, Mazo A, Fillat C. [Targeting the CYP2B 1/cyclophosphamide suicide system to fibroblast growth factor receptors results in a potent antitumoral response in pancreatic cancer models.](#) Hum Gene Ther. 2006 Dec;17(12):1187-200.

Cascante A, Abate-Daga D, Garcia-Rodríguez L, González JR, Alemany R, Fillat C.

[GCV modulates the antitumoural efficacy of a replicative adenovirus expressing the Tat8-TK as a late gene in a pancreatic tumour model.](#)

Gene Ther. 2007 Oct;14(20):1471-80. Epub 2007 Aug 23.

