

Tesis Doctoral

Esferoides como modelo predictivo de respuesta tumoral a la terapia génica : Estudio de los efectos de la transferencia génica no viral del sistema gen suicida y del gen de interferón-beta en esferoides derivados de melanoma espontáneo canino

Gil Cardeza, María Lourdes

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Gil Cardeza, María Lourdes. (2011). Esferoides como modelo predictivo de respuesta tumoral a la terapia génica : Estudio de los efectos de la transferencia génica no viral del sistema gen suicida y del gen de interferón-beta en esferoides derivados de melanoma espontáneo canino. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Gil Cardeza, María Lourdes. "Esferoides como modelo predictivo de respuesta tumoral a la terapia génica : Estudio de los efectos de la transferencia génica no viral del sistema gen suicida y del gen de interferón-beta en esferoides derivados de melanoma espontáneo canino". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Esferoides como modelo predictivo de respuesta tumoral a la terapia génica.
Estudio de los efectos de la transferencia génica no viral del sistema gen suicida y
del gen de interferón-beta en esferoides derivados de melanoma espontáneo
canino.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en
el área Ciencias Biológicas

María Lourdes Gil Cardeza

Director de tesis: Dr. Gerardo C. Glikin.

Director Asistente: Dra. Liliana M.E. Finocchiaro.

Consejero de Estudios: Dr. Gerardo C. Glikin.

Lugar de trabajo: Unidad de Transferencia Genética, Área Investigación, Instituto de
Oncología "Dr. Ángel H. Roffo", Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2011.

ESFEROIDES COMO MODELO PREDICTIVO DE RESPUESTA TUMORAL A LA TERAPIA GÉNICA

Estudio de los efectos de la transferencia génica no viral del sistema gen suicida y del gen interferón-beta en esferoides derivados de melanoma espontáneo canino

Los esferoides constituyen un modelo experimental que se asemeja más al comportamiento de los tumores *in vivo* que sus respectivas monocapas. Por lo tanto su estudio e implementación en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para combatir el cáncer es de suma importancia. En el presente estudio demostramos que la respuesta a la transferencia no viral del sistema gen suicida HSV tk /GCV de esferoides formados a partir de líneas celulares derivadas de tumores de melanoma espontáneo canino correlaciona mejor con la respuesta de los pacientes que sus respectivas monocapas. También observamos que la resistencia multicelular (MCR) al sistema HSV tk /GCV presente en los esferoides probablemente se deba a una rápida repoblación de las células resistentes al tratamiento en esta configuración espacial. La gran cantidad de líneas cuyos esferoides resultaron ser sensibles al sistema HSV tk /GCV y/o a la transferencia no viral del gen cIFN- β (80% sobre un total de 15 líneas) y el mantenimiento de la sensibilidad al ser co-transferidos demuestran la gran potencialidad terapéutica de la co-administración de ambos genes.

Como alternativa a la electroporación, encontramos una forma menos agresiva de aumentar la penetración intracelular de bleomicina: la lipofección. Encontramos que el sistema *lipoplexes*/bleomicina es altamente efectivo pues la presencia de los *lipoplexes* sensibiliza a las células al efecto citotóxico de la bleomicina, posiblemente estimulando el ingreso de la droga a las células mediante un transporte activo.

Palabras claves: bleomicina, esferoides, interferón-beta canino, *lipoplexes*, sistema HSV tk /GCV.

SPHEROIDS AS A PREDICTIVE MODEL TO STUDY THE TUMOR RESPONSE TO GENE THERAPY

Study of the effects of the non viral gene transfer of the suicide gene system and the interferon-beta gene on spheroids derived from spontaneous canine melanoma

Spheroids are an experimental model *in vitro* that resembles more accurately the tumor behavior observed *in vivo* than monolayers. So the study and implementation of spheroids in the development of new therapeutic strategies to fight cancer is very important. At the present study we demonstrated that the response to the non viral gene transfer of the suicide gene system HSVtk/GCV on spheroids derived from spontaneous canine melanoma tumors better correlates to the patient's response than their monolayers counterparts. We also observed that the multicellular resistance (MCR) to the HSVtk/GCV system when cells are cultured as spheroids is probably due to a rapid re-population of the cells that were resistant to the therapy. The high amount of spheroids which were sensitive to the HSVtk/GCV system and/or to the non viral transfer of the cIFN- β gene (80% over a total of 15) together with the maintenance of the sensitivity when the genes were co-transferred, demonstrates the high therapeutic potentiality of the co-administration of both genes.

We then studied the sensitivity to the *lipoplexes*/bleomycin system. We found that the new therapeutic strategy is highly effective since the *lipoplexes* sensitizes the cells to the cytotoxic effect of bleomycin, presumably by stimulating an active incorporation of the drug inside the cells.

Keywords: bleomycin, canine interferon beta, HSVtk/GCV system, *lipoplexes*, spheroids.

ABREVIATURAS

β -gal: β -galactosidasa

β -gal+cIFN- β : co-lipofección del gen de β -galactosidasa y del gen de interferón-beta canino

β -gal+HSVtk: co-lipofección del gen de β -galactosidasa y del gen de la timidina kinasa del virus herpes simplex

cIFN- β : interferón-beta canino

cIFN- β +HSVtk: co-lipofección del gen de interferón-beta canino y del gen de la timidina kinasa del virus herpes simplex

Esf: esferoide

GCV: ganciclovir

HSVtk: timidina kinasa del virus herpes simplex

/GCV: agregado de GCV 24 horas post-lipofección

Mc: monocapa

MCR: resistencia multicelular

psCMV: plásmido *small* de expresión transitoria portador del promotor del citomegalovirus

Br, Bk, Btl, Cl, Ds, Fk, Kg, Rka, Rkb, Rd, Sc, Tr: líneas celulares derivadas de melanoma espontáneo canino de mucosa oral

Ak: línea celular derivada de melanoma espontáneo canino de la mucosa ocular

LI: línea celular derivada de metástasis hepática de melanoma mucoso espontáneo canino

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgarme las becas para mi formación científica.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y a la Universidad de Buenos Aires por los subsidios otorgados a la Unidad de Transferencia Génica.

Al Instituto de Oncología “Dr. Ángel H. Roffo” por permitirme investigar en sus instalaciones.

A mis directores, la Dra. Liliana Finocchiaro y el Dr. Gerardo Glikin, quienes confiaron en mí desde el principio, me dieron libertad para investigar y supieron llevar mis torpezas con buen humor. Lili, gracias por tu paciencia y ayuda, tanto en lo profesional como en lo personal. Jefe, gracias por tu dirección.

Al equipo de UTG por su compañerismo tanto laboral como personal. A Ana Bihary, Ana Varela y Graciela Zenobi por preparar el material, sin su trabajo hubiese sido imposible la realización de mi tesis. A Marcela Villaverde, María Doris Riveros, Ruth Cwirenbaum y Úrsula Rossi por compartir sus conocimientos y por las discusiones tanto científicas como filosóficas.

A la gente del área de Investigación del Instituto por estar siempre que los necesité, en especial a la Dra. Elisa Bal de Kier Joffé, al Dr. Martín Krasnapolski y al Ldo. Diego Raffo por su asistencia en el microscopio.

Al personal del Instituto por hacer su trabajo y así permitirme hacer el mío.

A los dueños de los pacientes caninos y felinos que confiaron y siguen confiando en UTG.

A los gatos y perros por su compañerismo y entrega. En especial a Arrayán y Reimon.

A las Ldas. Estefanía Bello y Laura Gutiérrez por las discusiones científicas.

Al Ldo. Ramiro Lorenzo Lopez del laboratorio del Dr. Rubinstein en el INGEBI por prestarme el SYBR Green.

A mis amigas y amigos Anette, Copi, Dani, Filipón, Hagui, Jesi, Lau, Manchu, Nati S, Nati T y Teté, por escucharme y acompañarme siempre.

A Alfredo, mi compañero de ruta.

A mi familia, en especial a mis viejos quienes me dieron las herramientas para buscar mi vocación y a mi hermana Belén por escucharme, aconsejarme y darme prioridad en el uso del auto los fines de semanas que tuve que ir al laboratorio.

A Nélida De Carlini

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	10
En busca de nuevos modelos experimentales	11
<i>Esferoides multicelulares</i>	11
<i>Oncología comparada</i>	15
<u>Melanoma espontáneo canino</u>	16
Terapia génica	17
<i>Los liposomas catiónicos son vehículos eficientes, sencillos y seguros</i>	17
<i>Terapia génica del cáncer (o antineoplásica)</i>	19
<u>El sistema gen suicida: HSVtk/GCV</u>	20
<u>Interferón-β</u>	21
Hacia una geno-quimioterapia	22
OBJETIVOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Inmunocitoquímica	27
Plásmidos	27
Preparación de liposomas y transfección <i>in vitro</i>	28
Tinción de la enzima β-galactosidasa	28
Ensayos de viabilidad	28
Ensayo de la fosfatasa ácida (APH)	29
APH vs. MTS	31
Crecimiento de Esferoides	35
Diámetro de esferoides a los 12 días	35
Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	35
Pacientes	35
Tratamiento	35
Curvas dosis-respuesta a la bleomicina	36
Curva de <i>lipoplexes</i> y lipofección a 8°C	36
Depleción de potasio	36
Tinción de <i>lipoplexes</i> con SYBR Green	37
Estadística	39

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
Establecimiento y caracterización de líneas celulares derivadas de melanoma espontáneo canino.....	41
<i>Las líneas celulares de melanoma mostraron una considerable heterogeneidad</i>	<i>41</i>
<i>Las células tumorales expresaron in vitro marcadores específicos para melanoma ..</i>	<i>41</i>
<i>Las células de melanoma crecieron in vitro como esferoides multicelulares.....</i>	<i>43</i>
Respuesta a la transferencia génica no viral del sistema del gen suicida HSVtk/GCV	45
<i>Los esferoides de melanoma presentaron respuestas variadas al gen suicida.....</i>	<i>45</i>
<i>Citotoxicidad del gen suicida a una concentración intratumoral de GCV similar a la utilizada in vivo.....</i>	<i>48</i>
<i>La resistencia de los esferoides al gen suicida in vitro se correlacionó inversamente con la sensibilidad de la monocapa</i>	<i>50</i>
<i>La sensibilidad de los esferoides al gen suicida in vitro se correlacionó con la respuesta de los tumores de los pacientes caninos in vivo</i>	<i>50</i>
<i>La resistencia de las células tumorales al gen suicida in vivo e in vitro se debería al recrecimiento.....</i>	<i>53</i>
<i>La resistencia por re-crecimiento al tratamiento con HSVtk/GCV fue confirmada por citometría de flujo.....</i>	<i>54</i>
Respuesta a la transferencia génica no viral del gen interferón-beta canino	56
<i>Los esferoides de melanoma presentaron respuestas variadas a la transferencia del gen interferón-beta canino</i>	<i>56</i>
Hacia una poligenoterapia: respuesta a la co-transferencia génica no viral del gen interferón-beta canino y del sistema gen suicida/GCV	58
<i>La co-transfección de ambos genes terapéuticos no modifica la respuesta de los esferoides a los genes por separado.....</i>	<i>59</i>
<i>La cantidad de células con la que se forman los esferoides influye en la supervivencia celular.....</i>	<i>60</i>
Hacia una geno-quimioterapia: respuesta al tratamiento combinado de bleomicina y lipofección del gen interferón-β canino o de gen suicida/GCV	62
<i>La co-incubación con bleomicina no afecta la expresión de la β-galactosidasa.....</i>	<i>63</i>
<i>Sensibilidad a la bleomicina de las líneas de melanoma espontáneo canino</i>	<i>63</i>
<i>El aumento en la sensibilidad a la bleomicina no depende de la actividad transcripcional del plásmido.....</i>	<i>64</i>
<i>La co-incubación con los lipoplexes aumenta la sensibilidad a bleomicina.....</i>	<i>69</i>
<i>La sensibilidad a la bleomicina es dependiente de la concentración de lipoplexes....</i>	<i>70</i>
<i>La sensibilidad a la bleomicina es dependiente de la temperatura.....</i>	<i>71</i>

<i>La sensibilidad del sistema lipoplexes/bleomicina depende del potasio intracelular ..</i>	<i>72</i>
<i>El ingreso de los lipoplexes a la célula disminuye a bajas temperaturas</i>	<i>73</i>
<u>La tinción con SYBR Green es sensible a cambios en la cantidad de lipoplexes ...</u>	<u>74</u>
<u>La incubación a 8°C disminuye la cantidad de células que incorporan lipoplexes ..</u>	<u>74</u>
En busca de nuevas terapias en nuevos modelos experimentales	78
CONCLUSIONES	80
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

INTRODUCCIÓN

ESFEROIDES COMO MODELO PREDICTIVO DE RESPUESTA TUMORAL A LA TERAPIA GÉNICA

La falta de efectividad de una gran parte de las terapias antineoplásicas cuestiona, entre otras cosas, los modelos experimentales usados para la investigación y el desarrollo de las mismas. En un rastreo clásico primero se seleccionan las drogas con propiedades citotóxicas en líneas celulares *in vitro* para luego pasar a modelos *in vivo*, los animales de laboratorio. Los animales más usados en la investigación y desarrollo de drogas con actividad antitumoral son los ratones debido a su pequeño tamaño, fácil manipulación, rápida reproducción, corta vida media y bajo costo de mantenimiento. La mayoría de los estudios sobre terapia génica en cáncer en modelos animales utilizaron líneas celulares tumorales que fueron mantenidas en cultivo por muchas generaciones o por múltiples trasplantes xenogénicos en ratones inmunodeficientes, generalmente implantadas en forma heterotópica en tejidos no relacionados con su lugar de origen. Si se ve a la enfermedad como un estado de desequilibrio del organismo, se entiende que un organismo sano es aquel que se mantuvo o retorna al estado de equilibrio. En los enfermos avanzados de cáncer uno de los mayores desequilibrios se produce por un sistema inmune disfuncional incapaz de reaccionar adecuadamente frente a los antígenos tumorales. Esto hace que la recuperación de la funcionalidad del sistema inmunológico sea condición *sine qua non* para volver al estado de equilibrio y así vencer a la enfermedad. Bajo estas suposiciones la investigación de nuevas terapias antitumorales en animales inmunodeficientes, condición necesaria para el desarrollo de tumores xenogénicos, termina utilizando a los animales como un tubo de ensayo con vasos sanguíneos. Este modelo experimental es un poco más cercano a la realidad pero dista bastante de simular las condiciones de la enfermedad, no muy distinto de un modelo *in vitro*. Esto lo termina convirtiendo en un modelo poco eficaz (alta probabilidad de resultados no trasladables y alto costo). Esta tesis tiene como fin contribuir a la investigación y desarrollo de un modelo experimental para el desarrollo de nuevas terapias antineoplásicas que sea más eficiente y menos cruento.

En busca de nuevos modelos experimentales

Esferoides multicelulares

Los esferoides multicelulares (Esf) constituyen un modelo experimental *in vitro* de complejidad intermedia entre los cultivos en monocapa (Mc) y los tumores *in vivo* (Altamirano NA *et al.* 2007, Bates RC *et al.* 2000, Casais CC *et al.* 2006, Dangles V *et al.*

2002, Desoize B & Jardillier JC 2000, Hamilton G *et al.* 1998, Muller-Klieser W 1997, Santini MT & Rainaldi G 1999, Sutherland RM 1998). A pesar de presentar muchas de las limitaciones que acarrea un modelo experimental *in vitro*, ofrece una herramienta muy interesante para pruebas de sensibilidad a drogas citotóxicas, ya que se utilizan células adaptadas a las condiciones impuestas por la configuración espacial adquirida. Una de las adaptaciones es la resistencia multicelular (*multicellular resistance*, MCR) producida por el entorno sólido de un tejido, que es un obstáculo mayor para muchas terapias antitumorales (Desoize B & Jardillier JC 2000, Santini MT & Rainaldi G 1999). Esta es una propiedad intrínseca de los tumores *in vivo* que normalmente no se manifiesta en células cultivadas en monocapa, pero sí cuando son cultivadas como esferoides multicelulares.

Una vez que las células han establecido contacto con su microambiente (células homólogas, heterólogas y matriz extracelular), pueden cambiar su sensibilidad (comparadas con las respectivas monocapas) a las drogas antineoplásicas. La resistencia multicelular comienza en menos de 24 horas después de iniciar el cultivo en esferoides, y en muchos casos las células pueden volverse resistentes a la mayoría de las drogas antitumorales, a la inmunoterapia y a diversas clases de radioterapia (Desoize B & Jardillier JC 2000).

Los mecanismos involucrados incluyen:

- inhibición de la apoptosis por contacto entre células o entre célula y matriz;
- alta proporción de células quiescentes;
- modulación de la expresión de proteínas, incluyendo topoisomerasas y enzimas de reparación del DNA;
- potenciales problemas de permeabilidad; y
- presencia de un centro hipóxico y/o necrótico (Desoize B & Jardillier JC 2000).

Se puede considerar al esferoide como un todo, compuesto por una mezcla de estados celulares (capa externa o proliferativa; capa media o quiescente; capa interna o centro necrótico) que interaccionan entre sí *in vitro*. La interacción puede darse de manera directa (célula-célula) o indirecta (difusión de factores solubles). Fue demostrado que estos agregados tridimensionales simulan fidedignamente el entorno celular que se encuentra en los tumores *in vivo* (Altamirano NA *et al.* 2007, Desoize B & Jardillier JC 2000, Finocchiaro LME *et al.* 2004, Santini MT & Rainaldi G 1999, Sutherland RM 1998). En los tumores, las células en proliferación están usualmente localizadas a unas pocas capas celulares de distancia de los vasos sanguíneos, mientras que las células quiescentes y necróticas se ubican a distancias progresivas de los vasos. La distancia

entre los vasos y las áreas necróticas, medida en varios tumores humanos y de roedor, varía entre 50 y 250 μm . Notablemente, esta distancia es aproximadamente la misma que se observa en esferoides desde la periferia hasta la zona de necrosis, y depende del tipo celular y de su tasa metabólica, del grado de empaquetamiento celular y de las concentraciones de sustratos en el medio de cultivo. Para la mayoría de las células humanas creciendo bajo condiciones óptimas de oxígeno y nutrientes, el grosor de las capas de células viables que rodean a los centros necróticos en los esferoides es de 100 a 220 μm , con volúmenes extracelulares del 35 al 55%, valores similares a los encontrados en tumores *in vivo* (Sutherland RM 1998).

A través de estas pequeñas distancias, de alrededor de 10 a 20 diámetros celulares, pueden desarrollarse diferencias significativas en el microambiente celular. Generalmente, la mayor parte de las células en división se encuentran de la tercera a la quinta capa más externa. Las células quiescentes se ubican más internamente e incluyen una importante proporción de células que son viables y replicativas cuando se las saca de este entorno. Estas células pueden ser reclutadas para repoblar el compartimiento proliferativo, fenómeno difícil de lograr cuando se cultivan las células en monocapa (Muller-Klieser W 1997).

Todo estas similitudes entre la biología tumoral y la biología del esferoide hace que el crecimiento *in vitro* de los esferoides mantenga las características de crecimiento observadas *in vivo* en los tumores. Ambas curvas empiezan con una rápida fase de crecimiento y luego les sigue una etapa más lenta donde se mantienen por un tiempo, dependiendo de las propiedades biológicas de cada célula (**Fig. 1**). Esta disminución en la tasa de crecimiento es conocido como retraso exponencial y está contemplado en la fórmula matemática conocida como Ecuación de Gompertz desarrollada en 1825 por Gompertz para el modelo actuarial, aplicada por primera vez en un contexto biológico y económico en 1932 por Winsor y aplicada por primera vez al crecimiento tumoral por Laird en 1964 (Araujo RP & McElwain DLS 2004).

La principal desventaja de los esferoides es la dificultad técnica que conlleva ya que la mayoría de las técnicas que se utilizan en cultivo celular han sido diseñadas para cultivos en monocapa. Sin embargo, en los últimos años se han publicado trabajos donde se superan algunas de las limitaciones. Por ejemplo en el trabajo de Wieswald LB *et al.* se describe un protocolo para inmunofluorescencia utilizando un microscopio confocal en esferoides pequeños. Otro ejemplo es el protocolo para medir viabilidad celular en esferoides publicado por Friederich J *et al.*. Más aún, el número de publicaciones que usa esferoides ha aumentado en los últimos 10 años. La cantidad de artículos publicados en 2010 triplica en número a los trabajos publicados en el año 2000 (313 vs 111) (**Fig. 2**).

Más aún, palabras tales como neuroesferas, mamoesferas y melanoesferas empiezan a ser comunes en lenguaje científico cotidiano. Uno de los hallazgos más interesantes en los últimos años es que, al crecer en 3D, las células expresan marcadores celulares similares a los encontrados en las biopsias de los tumores de los cuales derivan (Schmidt P *et al.* 2011 y Somasundaram R *et al.* 2011). Estos marcadores no se encuentran cuando se cultivan a las células en monocapa. En muchos de los casos los marcadores corresponden a células madres sugiriendo semejanzas entre el nicho biológico de los esferoides *in vitro* y el nicho biológico de los tumores *in vivo*.

Todo esto convierte a los esferoides multicelulares en un modelo con excelente potencial para aplicaciones biomédicas y clínicas, ya que combinan la relevancia de la organización tisular con el ambiente controlado por la metodología *in vitro* (Altamirano NA *et al.* 2007, Bates RC *et al.* 2000, Casais CC *et al.* 2006, Dangles V *et al.* 2002, Desoize B & Jardillier JC 2000, Hamilton G *et al.* 1998, Muller-Klieser W 1997, Santini MT & Rainaldi G 1999, Sutherland RM 1998). Su implementación en el laboratorio abarata los costos para el rastreo de drogas con efectos citotóxicos sobre la célula tumoral *per se*, ya que reduce el número de animales de laboratorio al permitir diseñar los experimentos con datos más precisos.

En pocas palabras, representan un modelo experimental más real para optimizar y predecir la eficacia de terapias antitumorales en los correspondientes tumores *in vivo vitro* (Altamirano NA *et al.* 2007, Bates RC *et al.* 2000, Casais CC *et al.* 2006, Dangles V *et al.* 2002, Desoize B & Jardillier JC 2000, Hamilton G *et al.* 1998, Muller-Klieser W 1997, Santini MT & Rainaldi G 1999, Sutherland RM 1998).

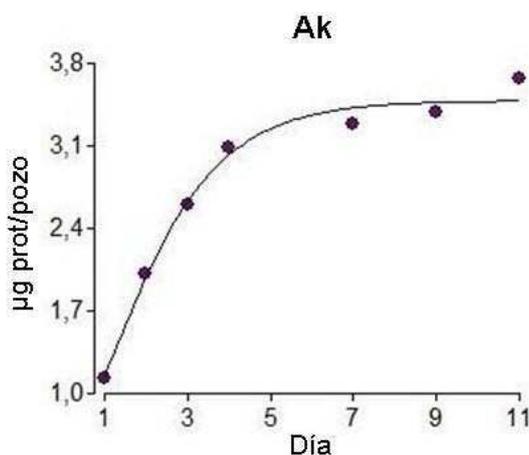


Figura 1: Curva de crecimiento de esferoides de la línea de melanoma espontáneo canino Ak. Se sembraron 20000 células por pozo de placa de 96 cubierta con agar. Las proteínas se determinaron en un pool de 8 pozos por el método de Bradford. La curva correlacionó con la ec. de Gompertz: $\mu\text{g prot} = 3,5 * e^{(-2,3 * e^{(-0,7 * \text{día})})}$. (CM error Gompertz = 0,02 contra CM error exponencial = 0,3). n = 2.

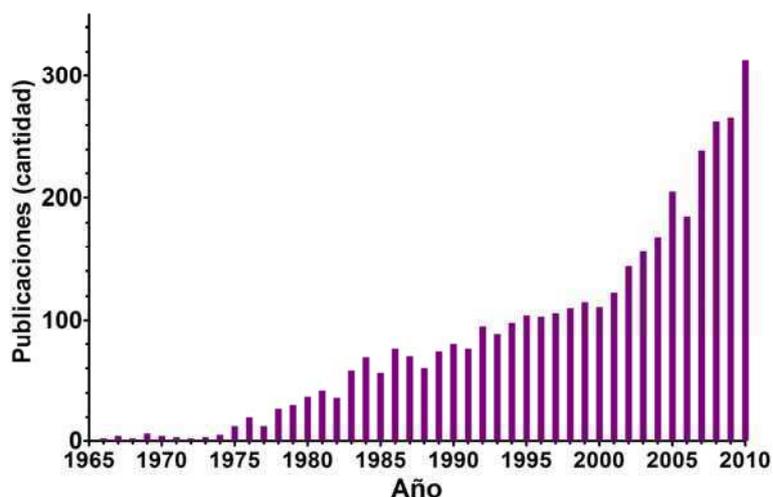


Figura 2: Cantidad de artículos publicados por año desde 1965. Los datos fueron extraídos del buscador PUBMED utilizando la palabra esferoides (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

Oncología comparada

La oncología comparada es posible debido al gran aumento en el número de familias que poseen animales de compañía. Las ventajas que presenta la implementación de este modelo sobre el uso de animales de laboratorio son (Porrello A *et al.* 2006 y Vail DM *et al.* 2000):

- 1) Comparten el mismo ambiente que sus amos, por lo que están expuestos a los mismos agentes ambientales potencialmente carcinogénicos. Podrían ser considerados como centinelas.
- 2) Representan mejor la variabilidad genética y fenotípica pues son poblaciones generalmente abiertas.
- 3) La fisiopatología de estos animales con tumor espontáneo, refractario a la terapia tradicional, frecuentemente con enfermedad avanzada se corresponde casi exactamente con lo que sucede en pacientes humanos.
- 4) Muchas de las neoplasias espontáneas de estas mascotas presentan una histología, una genética tumoral, una biología y una respuesta a la terapia muy similar a la de los correspondientes tumores humanos.
- 5) Son más comparables con el cáncer desarrollado en humanos en términos de tamaño y cinética celular, probablemente debido a las similitudes genéticas entre humanos y perros puestas en evidencia con la secuenciación de ambos genomas (Kirkness EF *et al.* 2003).
- 6) La mayoría de estos animales llega a geronte, donde existe el mayor riesgo de cáncer.

- 7) Generalmente, después de la cirugía queda una masa tumoral de suficiente tamaño como para hacer estudios moleculares y celulares.
- 8) Los ensayos clínicos en animales de compañía pueden tener mejor aceptación en la sociedad que la experimentación con animales de laboratorio.
- 9) Permite estudiar la toxicidad emética de agentes antineoplásicos.

Este modelo también permite obtener resultados rápidamente porque, en general, los tumores se desarrollan con más velocidad que en los humanos. La principal desventaja del modelo es la falta de herramientas específicas de la especie para su investigación, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, sondas, productos recombinantes (Porrello A *et al.* 2006 y Vail DM *et al.* 2000). Sin embargo esta desventaja puede ser fácilmente superada si se producen los mismos. Dicho de otra manera, si aumenta el número de grupos que implementan el diseño y desarrollo de nuevas terapias para combatir el cáncer en animales de compañía, aumentaría la demanda y por ende la oferta de las herramientas específicas de las especies involucradas.

Melanoma espontáneo canino

El melanoma maligno canino es muy común en perros, y los sitios de aparición más frecuentes incluyen a la cavidad oral, la zona digital, la piel y el ojo. A diferencia del melanoma humano, el canino no se encuentra asociado a la exposición solar. Sin embargo, los melanoma orales, comúnmente mucosos, se asemejan al melanoma mucoso humano de cabeza y cuello en su biología y respuesta a los tratamientos. Son muy agresivos localmente y altamente metastáticos, dispersándose normalmente en los nódulos linfáticos y pulmones. Al igual que en humanos, el melanoma mucoso canino es refractario a la remoción quirúrgica, quimioterapia y radioterapia (Porrello A *et al.* 2006 y Vail DM *et al.* 2000).

Actualmente hay varias terapias que están siendo implementadas en este modelo de investigación. Entre ellas se encuentran:

- 1) Extractos de *Corinobacterium Parvum* (MacEwen EG *et al.* 1986).
- 2) Plásmidos que expresan genes que codifican para la tirosinasa humana (Bergman PJ *et al.* 2003).
- 3) Plásmidos portadores de genes que codifican para citocinas (Dow SW *et al.* 1998).
- 4) Vacuna estimulada por citocinas y terapia génica con gen suicida como tratamientos adyuvantes de cirugía. (Finocchiaro LME & Glikin GC 2008).

Terapia génica

Se ha definido a la terapia génica como la transferencia de ácidos nucleicos (DNA o RNA) a células somáticas de pacientes que resulte en un efecto terapéutico. Para ello es necesario superar las barreras biológicas y lograr la entrada del ácido nucleico en las células de interés y su expresión dentro de las mismas. Los vectores se pueden dividir en dos grandes grupos: los virales y los no virales. Dentro de los vectores virales más usados clínicamente hasta junio de 2011 están los adenovirus (24,4% n = 414) y los retrovirus (20,7 % n = 355) (<http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>). Los adenovirus son no integrativos mientras que los retrovirus sí lo son. Esto hace que la detección de la expresión de los transgenes en los adenovirus no sea tan prolongada en el tiempo como la de los retrovirus. Sin embargo, la integración al genoma de la célula de los retrovirus podría provocar mutagénesis por inserción o silenciamiento del transgén. La principal limitación en el uso de los adenovirus como vectores para la transferencia génica *in vivo* es la gran cantidad de individuos que presentan inmunidad preexistente a este tipo de virus (97%). Aunque una pequeña inflamación en la zona tumoral es favorable, gran parte de los adenovirus son neutralizados por los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes (Räty JK *et al.* 2008).

Dentro de los vectores no virales la transferencia de DNA plasmídico desnudo o del DNA complejado con liposomas catiónicos (lipofección) son los más usados en ensayos clínicos (18,7% n = 320 y 6,4% n = 109, respectivamente) (<http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>). Los liposomas catiónicos están entre los vectores más prometedores para la terapia génica del cáncer pues son 1) no-infectivos, 2) tienen baja inmunogenicidad, 3) baja toxicidad, 4) alta estabilidad y 5) menor costo de producción (Felgner PL & Ringold GM 1994, Gao X & Huang 1995). La ventaja de los adenovirus por sobre la lipofección es la mayor expresión del transgén *in vitro* debido a su alta tasa de infección. Sin embargo, dado el alto porcentaje de individuos que presentan anticuerpos antiadenovirus, es posible que la expresión del transgén *in vivo* no difiera tanto entre ambas estrategias (Räty JK *et al.* 2008).

Los liposomas catiónicos son vehículos eficientes, sencillos y seguros

Los lípidos catiónicos se asocian espontáneamente con el DNA plasmídico por interacción de cargas para formar estructuras llamadas *lipoplexes*, en las cuales el DNA está protegido de la degradación. Estos complejos tienen alta afinidad por las membranas celulares, cargadas negativamente, debido a un exceso de cargas positivas. El mecanismo de entrada de *lipoplexes* más estudiado es la endocitosis (Gao X & Huang L 1995, Khalil *et al.* 2006, Rejman J *et al.* 2004 y 2005, Resina S *et al.* 2009, Vaughan

EE *et al.* 2006). Para que el DNA sea transcrito por la maquinaria celular tiene que llegar al núcleo. Para lograrlo los *lipoplexes* deben escapar de los endosomas antes de ser degradados, el DNA tiene que disociarse de los lípidos catiónicos e ingresar al núcleo atravesando la membrana nuclear (**Fig. 3**). También se ha visto que estos complejos pueden entrar a la célula mediante fusión de los lípidos catiónicos con los lípidos de las membranas celulares (**Fig. 3**) (Felgner PL & Ringold GM 1989, Khalil *et al.* 2006, Marchini *et al.* 2011, Zuhorn IS & Hoekstra D 2002).

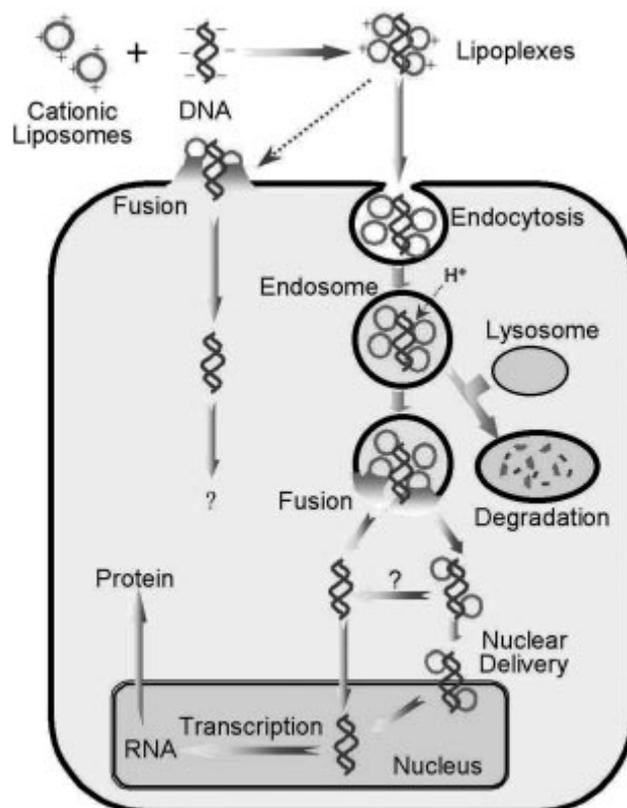


Figura 3: Rutas y barreras celulares de la transferencia génica no-viral. El DNA puede ingresar a la célula ya sea por endocitosis o por fusión de membranas (Khalil *et al.* 2006).

Los lípidos catiónicos que se utilizan para formar liposomas constan generalmente de cuatro dominios funcionales: una cabeza polar cargada positivamente, un espaciador de longitud variable, un conector y una cola hidrofóbica. Su diversidad estructural es amplia, aunque en general se trata de derivados del colesterol, lipopolilisina y algunos surfactantes de doble cadena. Los liposomas catiónicos normalmente contienen un lípido catiónico y un lípido neutro (co-lípido), que les brinda estabilidad. La razón por la cual existe tan amplia diversidad en las formulaciones es que la eficiencia de estos vehículos varía mucho *in vitro* e *in vivo*, según los tipos celulares, los tejidos blanco y la vía de

administración, por lo tanto es crucial la elección del lípido adecuado para cada experimento o tratamiento (Felgner JH *et al.* 1994). El grupo polar catiónico es crítico para la toxicidad y la eficiencia de transfección de estos lípidos.

Los experimentos del trabajo se realizaron con una mezcla de dos formulaciones de lípido/co-lípido: DMRIE/DOPE y DC-Chol/DOPE (**Fig. 4**).

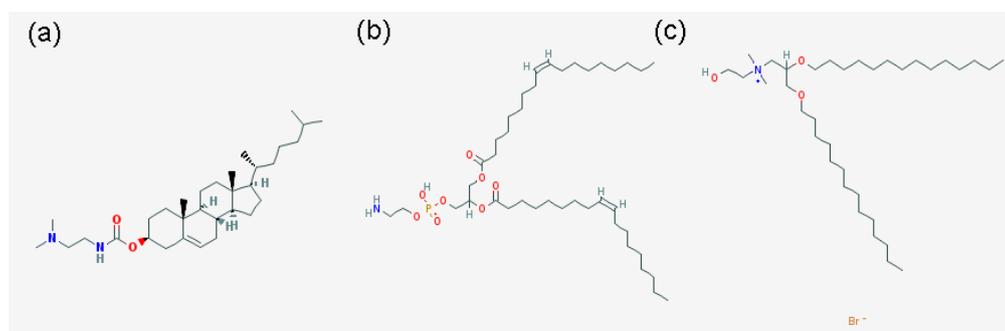


Figura 4: Estructura química de los lípidos catiónicos utilizados en este trabajo. (a) DC-CHOL, (b) DOPE y (c) DMRIE. (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Estos vectores son químicamente definidos, pueden ser preparados en grandes cantidades y su control de calidad resulta sencillo, y por lo tanto económico. Otra ventaja de este sistema sobre otros métodos es la amplia variedad de células receptoras, su limitada toxicidad en animales o humanos, su fácil uso y un mejor estándar de bioseguridad que los vectores virales. Pueden ser administrados en forma intravenosa y pueden transferir genes a muchos tipos de tejidos (Räty JK *et al.* 2008).

Terapia génica del cáncer (o antineoplásica)

Cómo se expuso al inicio de la Introducción, el cáncer no es solamente una enfermedad genética en la que las células presentan mutaciones en genes relacionados con el control del crecimiento y la apoptosis, sino un sistema complejo en el cual las células tumorales han subvertido y atraído a células normales para colaborar en la transformación neoplásica. Todo esto conduce a alteraciones funcionales que confieren la capacidad de evasión inmune, invasión y metástasis y por tanto, lleva a la muerte del individuo. Ciertas terapias génicas del cáncer llevan implícita la presunción de que debe haber alguna propiedad de las células neoplásicas que las distinga lo suficiente de las células normales como para permitir eliminarlas sin toxicidad para su contraparte normal. Sin embargo, a medida que la enfermedad avanza las células somáticas tumorales se van desdiferenciando (pérdida de marcadores celulares), dificultando la implementación de estrategias de reconocimiento de la célula tumoral. Otra estrategia comúnmente

empleada en la terapia génica contra el cáncer es la de proporcionar a la célula tumoral alguna proteína reguladora clave del ciclo celular que tienen defectuosa como por ejemplo p53. El problema de este tipo de estrategias es que basa su éxito en la homogeneidad de las células tumorales de un mismo tumor y entre tumores de distintos individuos, característica difícil de encontrar en algunos tipos de tumores, sobre todo cuando la enfermedad está muy avanzada. Es por esto que nos limitamos a estudiar la actividad antitumoral de dos modalidades independientes de las características biológicas e histopatológicas con las que se clasifican a los tumores: el sistema de gen suicida de HSV tk /GCV y la transferencia del gen de un inmuno-modulador, el interferón- β .

El sistema gen suicida: HSV tk /GCV

En la terapia con genes suicidas las células tumorales son modificadas genéticamente para que expresen un gen que las sensibiliza a drogas que de otra manera serían inocuas (Oldfield EH *et al.* 1993).

Uno de los sistemas de gen suicida más usado es el que codifica para la enzima timidina kinasa (tk) del virus herpes simplex (HSV). Dicha enzima confiere sensibilidad a la pro-droga de baja toxicidad ganciclovir (GCV), que es monofosforilada por la HSV tk y luego fosforilada por las kinasas celulares hasta trifosfato, convirtiéndose en un análogo de guanósina que interrumpe la síntesis del DNA. Así funciona como un terminador de cadena, que provoca la muerte celular (**Fig. 5**). Por lo tanto, toda célula que exprese la HSV tk será eliminada por esta droga.

Varios estudios han demostrado que el GCV es tóxico incluso para células tumorales adyacentes que no expresan el gen de la HSV tk . Este efecto es denominado *bystander* (citotoxicidad sobre el entorno) y posee una importancia fundamental en el tratamiento terapéutico (Culver KW *et al.* 1992). El efecto *bystander* es un complejo proceso biológico que involucra varios mecanismos, que pueden no ser los mismos *in vitro* que *in vivo*. En ciertos modelos tumorales ocurre una completa regresión cuando sólo un 10% de las células o de la masa tumoral expresan el gen suicida y el animal es tratado con GCV. El efecto *bystander in vivo* se basa en tres procesos que causan la regresión del tumor: la quimio-sensibilización de las células tumorales al GCV, la necrosis tumoral hemorrágica por ruptura de la vasculatura tumoral y consiguiente depleción de nutrientes, y la inmunidad antitumoral (Freeman SM *et al.* 1999).

Otra ventaja del sistema HSV tk /GCV es que no requiere una expresión prolongada en el tiempo del transgén pues las células que lo expresan mueren luego de una corta exposición al GCV, la apoptosis se inicia a las 6 h y ocurre durante varios días. Más aún, puede ser utilizado como vacuna tumoral, ya que el GCV no es inmunosupresor y la

masa tumoral destruida puede estimular una respuesta inmune antitumoral. De hecho, se demostró que las células tratadas con HSVtk/GCV son antigénicas y en algunos casos más antigénicas que las células tumorales irradiadas (Martin LA & Lemoine NR 1996). Es más, la combinación de este sistema suicida y vacunas antitumorales es sinérgica. El sistema HSVtk/GCV puede proveer un evento necesario para el éxito de la inmunoterapia: un microambiente tumoral inmunoestimulante que expresa moléculas inmunoregulatoras necesarias para que se desarrolle la respuesta inmune, cuando las células efectoras presentes en la circulación entren al tumor (Ramesh R *et al.* 1996). Resultados preliminares de nuestro laboratorio muestran que la transferencia génica no viral del sistema HSVtk/GCV en ratones con melanoma murino (B16) aumenta el metabolismo celular de ganglios linfáticos observado con la técnica PET (tomografía por emisión de positrones).

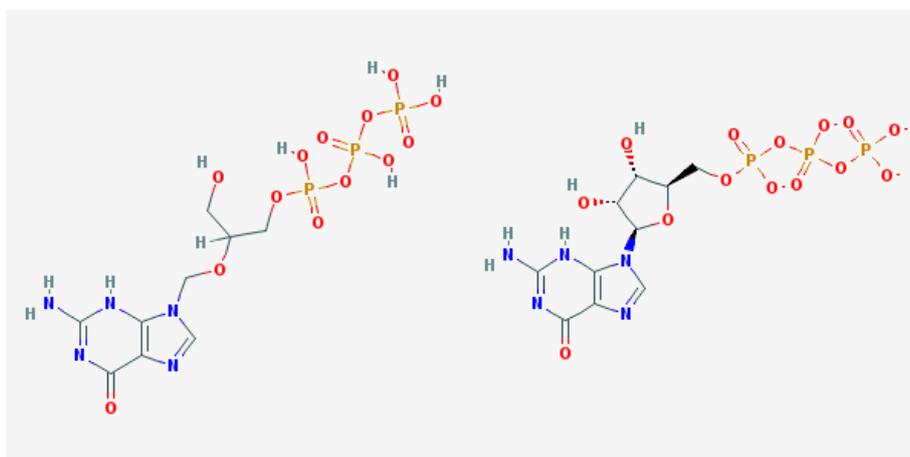


Figura 5: Estructura química del GCV trifosfato (izquierda) y de la guanosina trifosfato (GTP, derecha).

GCVTP: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=451390&loc=ec_rcs

GTP: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6830&loc=ec_rcs.

Interferón- β

Los interferones (IFNs) son citocinas con actividad antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora. Constituyen dos grandes clases de familias, tipo I y tipo II. Los IFNs de tipo I constan de 5 grupos distintos de proteínas: IFN- α , β , δ , τ y ω mientras que IFN- γ es el único tipo II. La principal fuente de IFN- α son los fagocitos mononucleares; la principal fuente de IFN- β son los fibroblastos. Algunas de las acciones biológicas de los IFNs tipo I son: inhibición de la replicación viral, aumento en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, estimulación del desarrollo de linfocitos T *helper* 1 pues aumenta el número de receptores para la IL-12, aumento en la actividad citolítica

de los linfocitos *natural killers* e inhibición la proliferación de células tumorales (Abbas Ak *et al.* 2004 y Fujimura T *et al.* 2009).

La bioterapia sistémica con el IFN tipo I (IFN- α 2b: producido en *E. coli* mediante la técnica del DNA recombinante) es una terapia aprobada por la FDA (Food and Drug Administration, USA) en el año 1993 para el tratamiento adyuvante de distintas neoplasias especialmente para pacientes con melanoma resecao estadio IIb o III, con alto riesgo de recurrencia o de metástasis distantes. En estos pacientes, el IFN- α mejora la supervivencia libre de enfermedad respecto de los controles (3,8 vs. 2,8 años) (Kirkwood JM *et al.* 2000). Sin embargo, el tratamiento con IFN- α/β está asociado a considerable toxicidad sistémica, que limita la compleción de la terapia en aproximadamente un 25% de los pacientes y deteriora considerablemente la calidad de vida de los mismos.

Una forma de evitar la toxicidad de los interferones tipo I podría ser la administración continua de dosis bajas (Slaton JW *et al.* 1999). Este tipo de farmacocinética podría lograrse con la terapia génica, donde la propia célula tumoral es la productora de IFN. De hecho, en un trabajo publicado el año pasado, demostramos que la terapia génica no viral del IFN- β no presenta toxicidad en nuestros pacientes caninos (Finocchiaro *et al.*, 2011).

Hoy en día hay tres productos disponibles para el tratamiento del cáncer en pacientes humanos basados en la transferencia génica, los tres utilizan vector adenoviral. Uno expresa p53 (GendicineTM), otro es un adenovirus oncolítico de replicación condicional (OncorineTM) y el tercero se basa en el sistema de gen suicida de la timidina kinasa asociado al ganciclovir (Cerepro[®]). Además hay un producto veterinario que utiliza vector plasmídico (no viral) que expresa la tirosinasa humana como antígeno xenogénico para el melanoma canino (OnceptTM).

Hacia una geno-quimioterapia

Para lograr un efecto antitumoral más potente mediante una estrategia terapéutica agresiva, se podrían combinar los efectos citotóxicos, antiangiogénicos e inmunostimulantes del gen IFN- β y del sistema del gen suicida/prodroga HSVtk/GCV con drogas quimioterapéuticas.

Esta consideración llevó a proponer, como paso previo de la investigación clínica veterinaria que se realiza en nuestro laboratorio, la evaluación de los efectos de la combinación de la bioterapia por transferencia de genes con bleomicina, un quimioterapéutico usado habitualmente en oncología (**Fig. 6**). La bleomicina es un antibiótico glicopeptídico con actividad antineoplásica debido a su actividad endonucleasa (Jingyang

C & Stubbe J 2005, Mir LM *et al.* 1996). Es de alto interés como tratamiento para el melanoma pues en la piel no se expresa una hidrolasa capaz de inactivar a la bleomicina (Jingyang C & Stubbe J 2005). Sin embargo la bleomicina es un péptido hidrofílico, incapaz de atravesar las membranas celulares. Para lograr superar esta barrera se han desarrollado distintas estrategias. Una de ellas es la administración de bleomicina complejada con liposomas (Bleosome™) para el tratamiento tópico de cáncer de piel que no sea melanoma (Lau G *et al.* 2005). Otra estrategia descrita en la literatura es la de utilizar la envoltura del virus Sendai conjugada en gelatina catiónica (CG-HVJ-E) como vehículo (Mima H *et al.* 2006). Ambas estrategias requieren cuantificar los mg de bleomicina en el interior de las moléculas transportadoras. En un abordaje diferente el grupo del Dr. Mir LM demostró que la electroporación de células tumorales las sensibilizaba al efecto de la bleomicina (el IC 50 disminuye 700 veces en células DC-3F) y que la sensibilización se debe a que aumenta la cantidad de moléculas de bleomicina en el citoplasma (Orlowsky S *et al.* 1998, Poddevin B *et al.* 1991). Más aún, se han llevado a cabo protocolos clínicos donde se usa a la electroporación como método para transferir la droga a células tumorales (Breton M & Mir LM 2011, Jingyang C & Stubbe J 2005, Spugnini EP *et al.* 2006).

La bleomicina se comercializa como una mezcla de péptidos producidos por el hongo *Streptomyces verticillis*. A diferencia de otras drogas quimioterapéuticas, la bleomicina tiene baja actividad mielosupresora y produce muy poca inmunosupresión, lo que la convierte en una droga muy atractiva para el tratamiento del cáncer (Jingyang C & Stubbe J 2005).

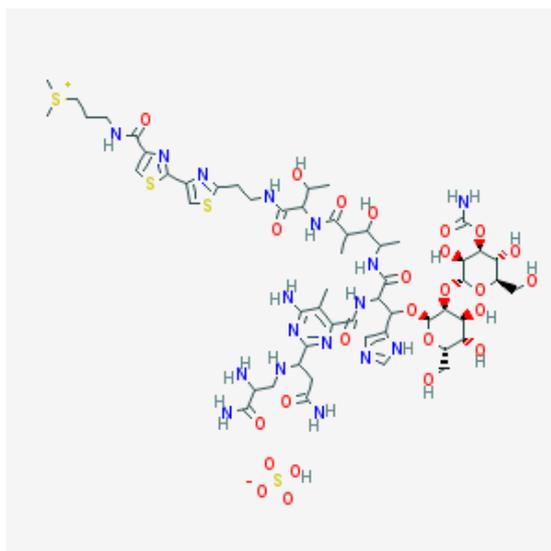


Figura 6: Estructura química de la bleomicina sulfatada
(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=72466>).

OBJETIVOS

Objetivos del presente trabajo:

1. Obtener y caracterizar nuevas líneas tumorales derivadas de melanoma mucoso espontáneo canino.
2. Evaluar la citotoxicidad de la transferencia no viral del sistema gen suicida HSV tk /GCV y del gen cIFN- β en líneas derivadas de melanoma mucoso espontáneo canino creciendo en dos configuraciones espaciales: monocapas y esferoides.
3. Comparar la sensibilidad al sistema gen suicida/prodroga HSV tk /GCV de las monocapas y sus respectivos esferoides con la respuesta *in vivo* del cuál derivó el cultivo.
4. Diseñar y desarrollar nuevas estrategias para combatir el cáncer que incluyan la transferencia no viral de DNA plasmídico.
5. Estudiar los factores que influyen en la citotoxicidad de las nuevas estrategias desarrolladas.

**MATERIALES
Y
MÉTODOS**

Cultivo Celular

Los cultivos celulares se establecieron a partir de tumores de melanoma espontáneo canino extirpados mediante cirugía. Los tumores se procesaron por digestión enzimática con Pronasa 0,01% (Sigma, St. Louis, MO, USA) y DNasa 0,035% (Sigma) y/o cortaron en forma mecánica en medio de cultivo sin suero (Freshney 1986). Las células obtenidas se cultivaron en monocapas y esferoides multicelulares a 37°C en una atmósfera formada por aire 95 % y de CO₂ 5 % en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) con 10 % de suero fetal bovino (Invitrogen) y antibióticos. Las líneas celulares se mantuvieron realizando repiques seriados mediante tripsinización (tripsina 0,25% y EDTA 0,02% en PBS) de monocapas subconfluentes. Para formar los esferoides multicelulares se cubrieron las placas con una capa de agar 1,5%.

Inmunocitoquímica

Las células se cultivaron sobre cubreobjetos hasta alcanzar un 50 % de confluencia en las condiciones arriba mencionadas. Luego se lavaron, se fijaron con acetona fría, se secaron y se re-hidrataron para ser incubadas con los siguientes anticuerpos monoclonales humanos siguiendo las indicaciones de los fabricantes: melan A (BioGenex, San Ramon CA, USA; clon A103), S-100 (BioGenex; clon 15E2E2), GP100 (BioGenex; clon HMB45), vimentina (Dako, Denmark; clon V9); cytokeratina (Dako; clones AE1/AE3). Luego de ser lavadas, se incubaron con inmunoglobulinas Multi-Link (BioGenex) conjugadas con estreptavidina/peroxidasa y se revelaron con 3,3'-diaminobenzidina.

Plásmidos

El plásmido psCMV β se construyó reemplazando el gen para la timidina kinasa de HSV del plásmido psCMV tk (Finocchiaro LME *et al.*, 2004) con el gen de β -galactosidasa de *E. Coli* del plásmido pCMV β (MacGregor GR & Caskey T 1989). El plásmido psCMVcIFN β se construyó reemplazando el gen para la β -galactosidasa de *E. Coli* con el gen del interferón-beta canino. Los plásmidos se amplificaron en la cepa DH5 α de *E. coli* (Invitrogen). Las bacterias se cultivaron en medio LB con neomicina 100 μ g/ml y los plásmidos se purificaron mediante cromatografía de intercambio iónico (Qiagen, Valencia, CA, USA).

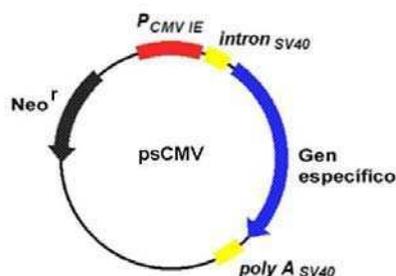


Figura 7: Estructura del plásmido utilizado en este trabajo. Neo: gen de resistencia a la neomicina para selección en bacterias. PCMV IE: promotor temprano inmediato del citomegalovirus. Intrón y cola de poly A: del virus SV40.

Preparación de liposomas y transfección *in vitro*

DC-Chol (3 β [N-(N',N'-dimetilamino-etano)-carbamoil colesterol) y DMRIE (1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetil-hidroxietilamonio bromuro) fueron sintetizados y donados por BioSidus (**Fig. 4 a y c**). DOPE (1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidil etanolamina) fue adquirido a Sigma (**Fig. 4 b**). Los liposomas se prepararon a una relación molar de lípido/co-lípido de 3:2 (DC-Chol:DOPE) o 1:1 (DMRIE:DOPE) para luego ser sonicados cómo se describió previamente (Felgner JH *et al.* 1994 y Gao X & Huang L 1995). Se optimizó la mezcla de lípidos para cada línea celular de manera de obtener la mayor expresión del gen marcador (β -galactosidasa) y la menor citotoxicidad. Las lipofecciones se realizaron incubando los cultivos celulares a una densidad celular de entre 3 y 7 x 10⁴ células/cm² (cerca de un 40 % confluencia) con *lipoplexes* (1 μ l liposomas/cm² y 0,5 μ g DNA/cm²) en medio libre de suero por un lapso de 3 a 6 horas. Las co-lipofecciones se realizaron mezclando 0,3 μ g DNA/cm² de cada gen con 1 μ l liposomas/cm². En la co-lipofección con bleomicina se le agregó 3 μ g/ml de la droga al medio libre de suero luego de los *lipoplexes*.

Tinción de la enzima β -galactosidasa

Para cuantificar la eficiencia de expresión, 24 horas post lipofección las células lipofectadas con el plásmido psCMV β se tripsinizaron, fijaron en suspensión, tiñeron de azul con 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido (X-GAL, Sigma) y se contaron en cámara de Neubauer bajo microscopio invertido (Finocchiaro LME *et al.*, 2004).

Ensayos de viabilidad

Veinticuatro horas después de cambiar el medio libre de suero por medio con suero fetal bovino las células se tripsinizaron y se contaron las células transfectadas con el gen de β -galactosidasa bajo microscopio en cámara de Neubauer. Para formar monocapas, se sembraron en placas regulares de 96 pozos a una densidad de 3,5–7,0x10³

células/pozo mientras que para formar esferoides se cultivaron sobre agar sólido 1,5 % a una densidad de 500 a 20000 células/pozo, dependiendo de la línea celular. En todos los ensayos se midió la viabilidad celular a los 5 días para las monocapas y a los 12 días para los esferoides con el reactivo colorimétrico MTS siguiendo las indicaciones del fabricante (Promega, Madison, WI, USA) y/o con el ensayo de la fosfatasa ácida (ver sección viabilidad por APH). El porcentaje de sobrevida se calculó relativizando las absorbancias a la transfección control con el gen de β -galactosidasa.

Para las curvas de sensibilidad al ganciclovir (GCV) se agregaron en el día de la resiembra (24 h post-lipofección) dosis crecientes de la droga: de 0,01 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ (sintetizado y donado por BioSidus). El porcentaje de sobrevida celular se calculó como el cociente entre las absorbancias de las células incubadas en presencia y en ausencia de GCV. La sensibilidad al GCV, expresada como la concentración de la pro-droga que inhibe la supervivencia celular en un 50 % de (IC 50), se estimó a partir de las curvas dosis respuesta.

Ensayo de la fosfatasa ácida (APH)

Se adaptó el protocolo de Friedrich J *et al.* 2009. Se lavaron las células con 200 μl de PBS para sacar restos de suero pues puede interferir en la medición. Luego se agregó 100 μl de PBS y 100 μl de buffer APH (0,1 M de acetato de sodio pH 5,2; 0,1% tritón y 2 mg/ml de para-nitrofenol fosfato (Sigma) agregado en el momento). Para lavar los esferoides se centrifugaron las placas de 96 pozos para poder tomar la mayor cantidad de sobrenadante (200 μl sobre un volumen total de 250 μl) sin tomar los esferoides. Luego se incubaron a 37°C durante 1 hora y 30 minutos y se revelaron con el agregado de 10 μl de NaOH 1 N. La absorbancia se leyó en lector de ELISA a 405 nm.

Para validar la técnica en nuestro laboratorio se sembraron cantidades crecientes de células, tanto en monocapas como en esferoides, y se revelaron con distintas técnicas que permiten determinar la viabilidad celular (mc: APH, MTS, cristal violeta y proteínas (Bradford MM); esf: APH y MTS). Las monocapas fueron reveladas 18 horas después de la siembra (**Fig. 8 y Tabla 1**) y los esferoides a los 12 días de crecimiento (**Fig. 9 y Tabla 2**). En ambas figuras el número de células sobre el eje X corresponde al inóculo inicial de células. Los valores de los coeficientes de determinación a una ecuación lineal más cercanos a 1 se obtuvieron con la técnica de APH. Por lo tanto podemos concluir que es la técnica más apropiada para detectar cambios en la cantidad de células en ambas configuraciones espaciales en las cuatro líneas celulares evaluadas.

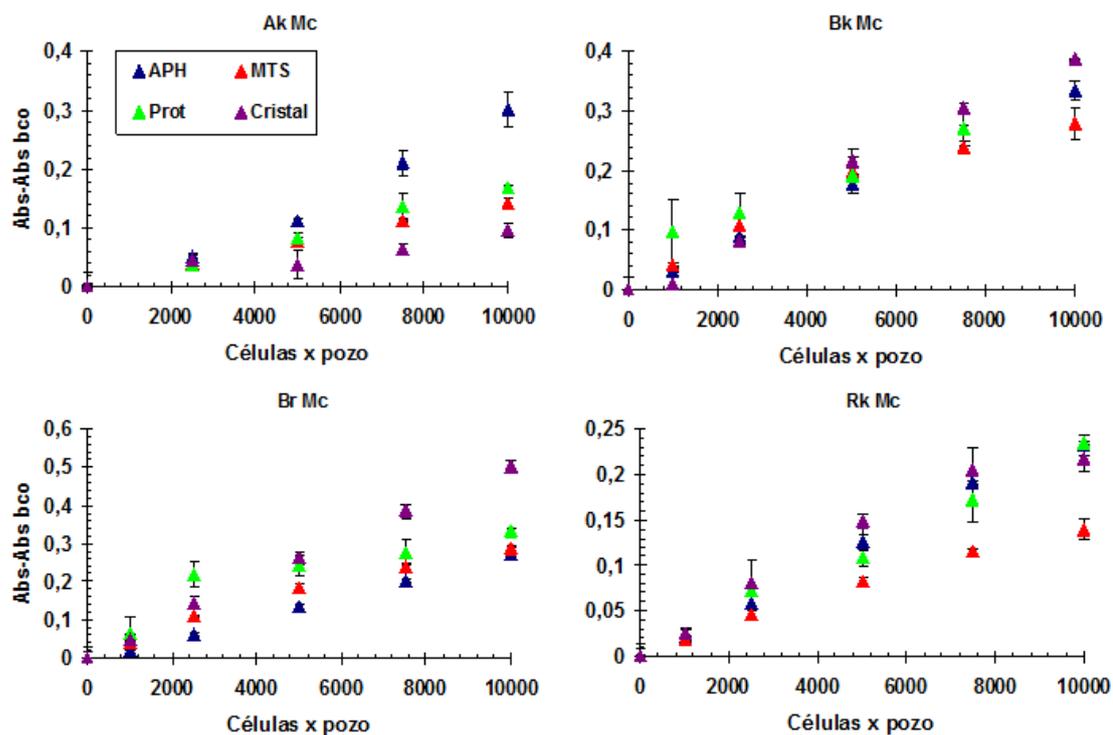


Figura 8: Determinación de la viabilidad celular de monocapas. Se sembraron cantidades crecientes de células en placa de 96 pozos y a las 18 horas se les determinó la viabilidad celular mediante 4 técnicas: Cristal violeta (▲), Proteínas (▲), APH (▲) y MTS (▲). Los resultados se presentan como la media \pm el error estándar ($n=4$).

Línea celular	Coeficiente determinación lineal (mc)			
	APH	MTS	Proteínas	Cristal Violeta
Ak	0,981	0,996	0,995	0,886
Bk	0,997	0,959	0,846	0,990
Br	0,999	0,973	0,942	0,998
Rkb	0,995	0,990	0,994	0,958

Tabla 1: Coeficientes de determinación lineal de las monocapas. Se trazó la curva de tendencia lineal sobre cada curva de la figura 6 ($n = 6$) y se le calculó el coeficiente de determinación a una ec. lineal (R^2).

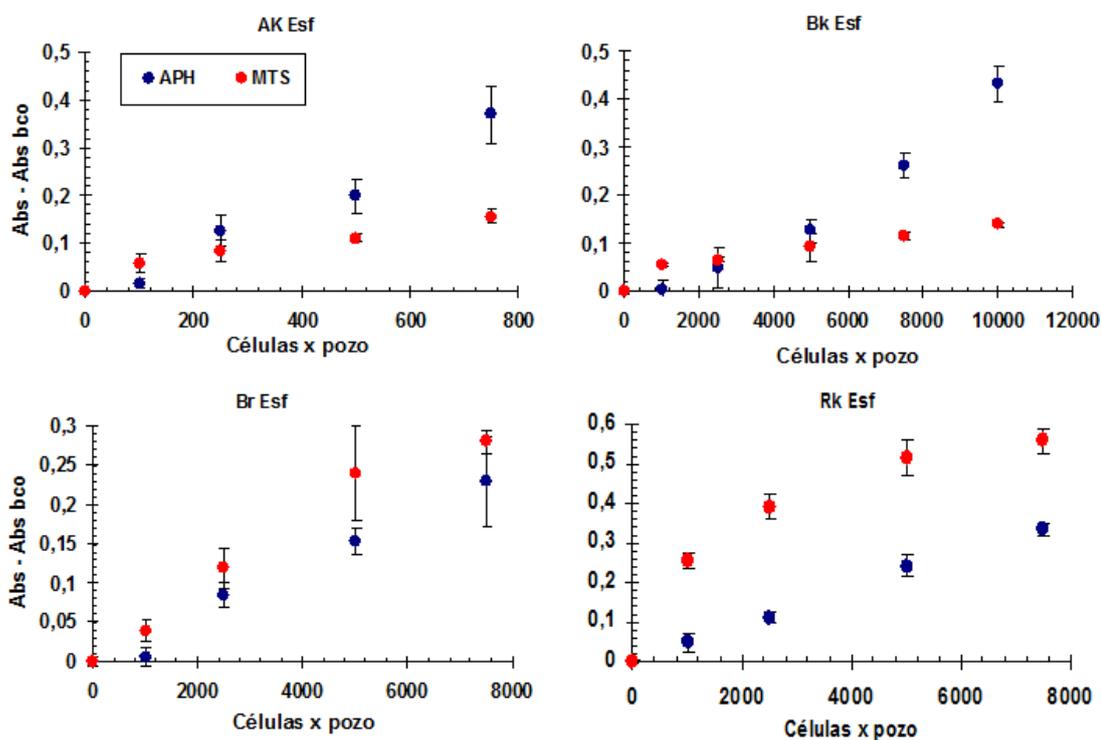


Figura 9: Determinación de la viabilidad celular de esferoides. Se sembraron cantidades crecientes de células en placas de 96 pozos cubiertos con una fina capa de agar al 1,5% y a los 12 días se les determinó la viabilidad celular mediante 2 técnicas: APH (●) y MTS (●). Los datos se presentan como la media ± el error estándar (n=8).

Línea celular	Coeficiente determinación lineal (esf)	
	APH	MTS
Ak	0,977	0,926
Bk	0,955	0,915
Br	0,986	0,965
Rkb	0,997	0,865

Tabla 2: Coeficientes de determinación lineal de los esferoides. Se trazó la curva de tendencia lineal sobre cada curva de la figura 2 (Ak; Br y Rk n = 5; Bk n = 6) y se le calculó el coeficiente de determinación a una ec. lineal (R^2).

APH vs. MTS

Con el objetivo de obtener un esferoide único por pozo se modificó el número de células iniciales. Para Bk, Br y Rkb el número resultó ser 5000 células por pozo mientras que para Ak la cantidad necesaria fue 10 veces menor, 500 células. Aunque los resultados obtenidos en las curvas de absorbancia vs. número de células indican que la técnica de APH es la más apropiada para medir viabilidad celular, (Figs. 8 y 9 y Tabla 1 y 2) decidimos comparar los valores de sobrevivencia celular obtenidos con la técnica de APH con los obtenidos mediante la técnica de MTS para la lipofección del gen cIFN- β y

del sistema gen suicida/GCV de las monocapas y sus respectivos esferoides en 4 líneas celulares: Ak, Bk, Br y Rkb (**Fig. 10**).

Como muestra la **Fig. 10**, no se observaron diferencias significativas entre los valores de supervivencia de las monocapas obtenidos con las 2 técnicas enzimáticas para ninguno de los 2 tratamientos genéticos. Sin embargo, los valores de sobrevivencia para la lipofección del gen cIFN- β en Br se hicieron significativamente distintos al control de β -galactosidasa cuando fueron revelados con la técnica de APH (**Fig. 10, barras amarillas rayadas, símbolo (*)**). Al analizar los porcentajes de sobrevivencia de los esferoides se encontró que hay diferencias significativas en la lipofección del gen cIFN- β y del sistema gen suicida/GCV entre ambas técnicas en los esferoides de Ak, Bk y Rkb que expresan cIFN- β (**Fig. 10, barras amarillas rellenas, símbolo (o)**) y en los esferoides de Ak y Bk que expresan HSVtk más el agregado de GCV (**Fig. 10, barras rojas rellenas, símbolo (o)**), siendo siempre mayores los porcentajes de sobrevivencia calculados con MTS. La diferencia más notable se ve en los esferoides de Ak que expresan el gen cIFN- β ya que de acuerdo al revelado con MTS parecerían resistentes al tratamiento (**Fig. 10, barras amarillas cuadrículadas**). Esto se debe a que el tratamiento con el gen de cIFN- β desarmó al esferoide (**Fig. 11**). Lo mismo ocurrió en los esferoides de Bk y Rkb. En todos ellos, los valores de sobrevivencia parecieron más elevados con la técnica MTS respecto a los calculados con APH.

Un análisis cualitativo de los esferoides de la **Fig. 11** demostró que el método de APH proporcionó los valores de supervivencia que se parecen más a la apreciación visual de las fotografías. Más aún, al comparar los porcentajes de sobrevivencia calculados con ambas técnicas enzimáticas con los calculados a partir de los volúmenes de los esferoides se pudo apreciar que para ambos tratamientos los valores hallados con APH se ajustaron más a los hallados a partir de los volúmenes que los calculados con las absorbancias de MTS (**Fig. 12**).

Estos resultados junto con los resultados de las **Figs. 8 y 9** indican que la técnica de APH es la más apropiada para determinar la viabilidad celular tanto en monocapas como en esferoides.

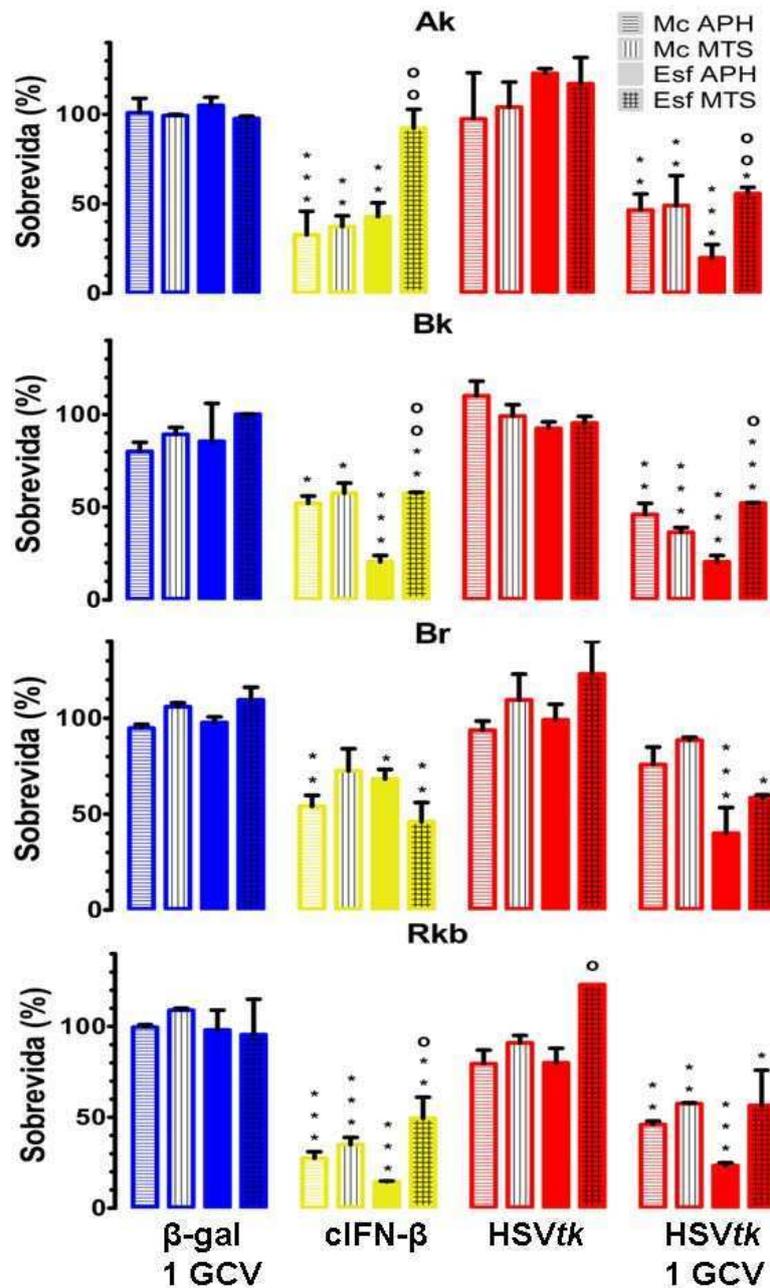


Figura 10: Respuesta a la lipofección del gen cIFN-β y al sistema gen suicida/GCV de monocapas y esferoides reveladas con las técnicas de APH o MTS. El ensayo se realizó como se describe en la secciones de transfección *in vitro* y viabilidad celular. Los valores de sobrevivida se calcularon relativizando las absorbancias a los valores de las células lipofectadas con el gen de la β-galactosidasa sin GCV. Los esferoides de Ak se formaron sembrando 500 células por pozo de placa de 96 mientras que los de Bk, Br y Rkb se formaron sembrando 5000 células por pozo. Todas las líneas fueron incubadas con 1 μg/ml de GCV salvo los esferoides de Ak que se incubaron con 0,5 μg/ml de GCV ya que 1 μg/ml de GCV resultó tóxico en los esferoides que expresan β-gal. n = 3. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de dos vías. β-gal 1 GCV vs. cIFN-β o HSVtk 1 GCV: (***) p<0,001; (**) p<0,01; (*) p <0,05. APH vs. MTS: (oo) p<0,01 y (o) p<0,05.

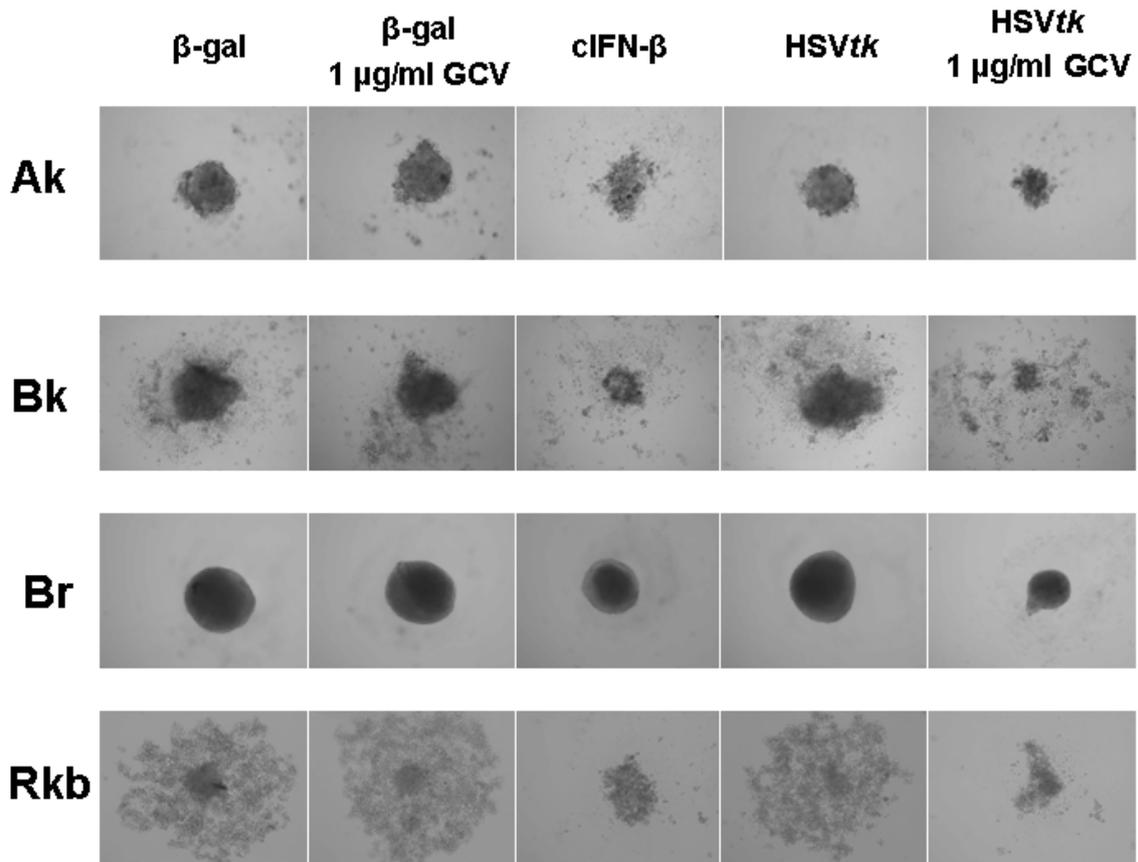


Figura 11: Fotografías de los esferoides de las líneas de melanoma canino lipofectados con el gen del cIFN- β o con el gen HSVtk más el agregado de 1 $\mu\text{g/ml}$ de GCV. Las fotos se sacaron al día 12 con microscopio invertido a un aumento de 100x y se corresponden a los experimentos de la Fig. 10. En el caso de Ak, cuyos esferoides se formaron con 500 células por pozo, se agregó 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de GCV.

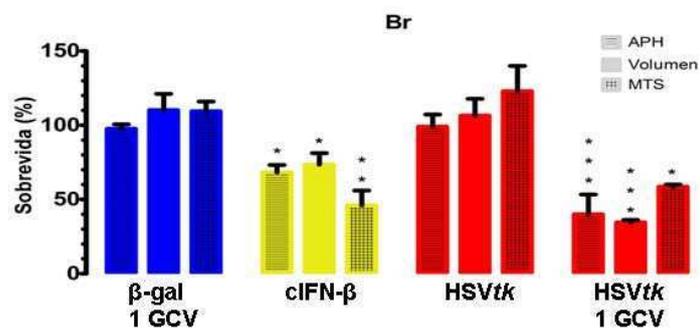


Figura 12: Comparación de los valores de sobrevivencia de los esferoides de la línea celular Br calculados con las 2 técnicas enzimáticas (APH y MTS) o midiendo volumen. El ensayo se realizó como se describe en las secciones de transfección *in vitro* y viabilidad celular. $n = 3$. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de dos vías. $\beta\text{-gal 1 GCV}$ vs. cIFN- β o HSVtk 1 GCV: (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$. Volumen vs. APH o MTS no dio diferencias significativas.

Crecimiento de Esferoides

El tamaño de los esferoides multicelulares se calculó durante un período de 15 días midiendo el diámetro con cámara de Neubauer bajo microscopio invertido (Casais CC *et al.* 2006 y Finocchiaro LME *et al.*, 2004). Para evitar la fusión de los esferoides se los cultivó en placas de 100 mm y se los diluyó periódicamente. El diámetro se determinó como el promedio de dos diámetros. Los resultados se expresaron como el promedio (de un mínimo de 15 esferoides) \pm error del promedio (n: 4 experimentos independientes).

Diámetro de esferoides a los 12 días

Se cultivaron los esferoides en placa de 96 pozos. Se sembró una cantidad de células de manera de lograr un esferoide único por pozo. Se midieron 2 diámetros por esferoide utilizando el programa NIS-elements BR (modo básico) del microscopio Nikon modelo eclipse TE 2000-S. Se calculó el volumen según: $\pi \cdot (\text{diám. menor})^2 \cdot \text{diám. mayor} / 6$.

Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Células sin tratar y lipofectadas con los genes HSVtk o β -gal se cultivaron por 48 horas en presencia de GCV 1 $\mu\text{g/ml}$. Luego se tripsinizaron, se fijaron en etanol 70% (v/v) a -20°C por 1 h, se incubaron con RNasa y se tiñeron con ioduro de propidio 10 $\mu\text{g/ml}$ por 30 min en oscuridad. Las muestras se evaluaron en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACScan (Franklin Lakes, NJ, USA) en un sólo canal y se analizaron los datos con el programa CellQUEST de Becton Dickinson (Altamirano NA *et al.* 2007).

Pacientes

Perros con diagnóstico confirmado de melanoma fueron reclutados para el estudio (Finocchiaro *et al.*, 2008 y Finocchiaro LME & Glikin GC 2008). Los propietarios de los perros fueron notificados acerca de la naturaleza experimental del tratamiento, y todos firmaron en conformidad su consentimiento (Finocchiaro *et al.*, 2008 y Finocchiaro LME & Glikin GC 2008). El tratamiento fue ejecutado por profesionales veterinarios especialmente entrenados.

Tratamiento

Los pacientes seleccionados para este estudio presentaron enfermedad local (tumor parcialmente resecaado o recurrencia post-quirúrgica) y recibieron en el tumor remanente o áreas adyacentes múltiples inyecciones de *lipoplexes* portadores de psCMVtk (DNA1-4 mg) co-administrado con GCV (5-20 mg), de acuerdo al tamaño tumoral. Así continuaron con el tratamiento semanal en forma crónica o hasta la desaparición de toda evidencia de enfermedad local (Finocchiaro LME & Glikin GC 2008). Además, entre 5 y 10 días después de la cirugía, los pacientes fueron sometidos a control clínico y tratados una vez por semana, por 5 semanas, con una vacuna subcutánea compuesta por células

tumorales autólogas y/o alogénicas formolizadas y células xenogénicas CHO irradiadas productoras de 20–30 mg de hIL-2 y hGM-CSF (Finocchiaro LME & Glikin GC 2008). Los volúmenes tumorales se calcularon como $4/3 \times \pi \times r_1 \times r_2 \times r_3$.

Curvas dosis-respuesta a la bleomicina

Se sembraron las células en placas de 24 pozos y se las co-incubó con concentraciones crecientes de bleomicina (de 0,1 a 30 $\mu\text{g/ml}$) como se indica en el apartado de transfecciones *in vitro*. Una vez terminada la transfección se procedió como se indica en la sección de viabilidad celular. La viabilidad se determinó con la técnica de APH.

Curva de lipoplexes y lipofección a 8°C

Las diluciones de *lipoplexes* se realizaron a partir de los *lipoplexes* 1X (1 μl liposomas/ cm^2 y 0,5 μg DNA/ cm^2). Para bajarle la temperatura a las células se las incubó 1 h antes de la transfección con medio fresco en la heladera en un recipiente de tapa hermética con agua y 5% CO_2 y se mantuvieron en esas condiciones durante la transfección. Al finalizar el tiempo de incubación con los *lipoplexes* se descartó el medio y las células se lavaron 3 veces con medio con suero a la temperatura correspondiente para terminar el proceso de lipofección y descartar remanentes de bleomicina y *lipoplexes*. Una vez terminada la transfección se procedió como se indica en la sección de viabilidad celular. La viabilidad celular se determinó con la técnica de APH.

Depleción de potasio

Se armó un protocolo para sacar el potasio de las células tumorales adaptando los procedimientos descriptos por Larkin JM (1983) y por Rejman J (2004 y 2005). Se lavaron las células con buffer sin potasio (140 mM NaCl; 20 mM Hepes pH 7,4; 1 mM CaCl_2 ; 1 mM MgCl_2 y 1 mg/ml d-glucosa). Para quitar el potasio se las incubó por 5 min en medio hipotónico (1:1 agua:buffer sin potasio) seguido de 3 lavados de 5 min cada uno con buffer sin potasio para darle tiempo a las células de volver a su tonicidad. Las células control recibieron el mismo tratamiento pero con buffer con potasio (140 mM NaCl; 20 mM Hepes pH 7,4; 1 mM CaCl_2 ; 1 mM MgCl_2 ; **10mM KCl** y 1 mg/ml d-glucosa). Finalmente se les agregó un volumen mínimo del buffer con o sin potasio, se agregaron los *lipoplexes* y la bleomicina y se incubaron por 30, 60 y 90 minutos. Una vez terminada la transfección se procedió como se indica en la sección de viabilidad celular. La viabilidad celular se determinó con la técnica de APH.

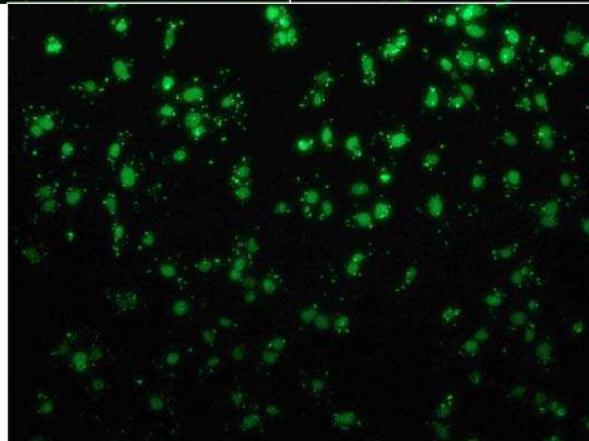
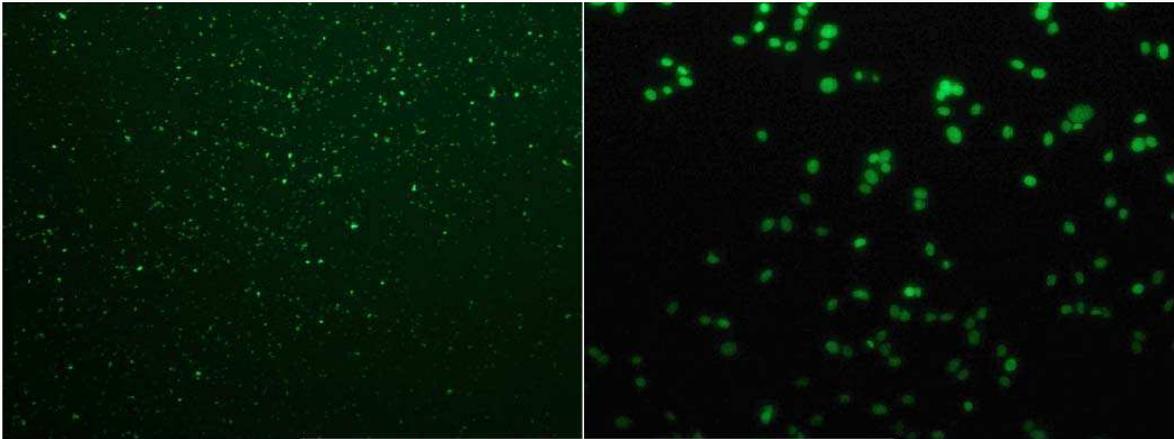
Tinción de *lipoplexes* con SYBR Green

El DNA plasmídico se incubó con SYBR Green (9X) por 5 minutos. Luego se agregó la mezcla de lípidos catiónicos y las células se lipofectaron en las condiciones normales. Para la tinción con DAPI se les agregó medio con suero con distintas diluciones de DAPI (1X; 10X y 100X) y se las dejó incubando durante 1 hora antes de iniciar la lipofección. Al finalizar la transfección las células se lavaron 1 vez con medio sin suero y se fijaron con una solución de glutaraldehído y formaldehído en PBS. La solución de fijación fue agregada secuencialmente, diluida en medio sin suero (25%; 50% y 100%). Las fotos se sacaron con el microscopio de fluorescencia Nikon modelo eclipse TE 2000-S con aumento de 200X.

Los *lipoplexes* se vieron como puntos discretos fuera y dentro del citoplasma de las células (**Fig. 13 arriba izquierda y abajo derecha, respectivamente**). Como control se incubaron las células con el DNA plasmídico solo. En estas células no se detectó ningún puntillado en el citoplasma (**Fig. 13 arriba derecha**). En ambos casos se observó una fuerte tinción nuclear, debido al SYBR Green remanente. El exceso de SYBR Green no es trivial pues de esta manera se asegura que todos los *lipoplexes* estén teñidos y hace más fácil la determinación de células positivas (puntillado citoplasmático) ya que se tiñen los núcleos de todas las células (al superponer las fotos sacadas con luz blanca y con las de luz fluorescente la intensidad del puntillado disminuye bastante, dificultando la determinación de células positivas). Más aún, la intensidad en la fluorescencia al incubar las células con DNA plasmídico preteñido con SYBR Green fue siempre menor que la intensidad observada en las células incubadas con SYBR Green solo, indicando que el SYBR Green se une al DNA plasmídico. Para tratar de discernir entre el nuevo DNA incorporado y el DNA de la célula se preteñieron las células con DAPI y luego se las incubó con los *lipoplexes* teñidos con SYBR Green. Normalmente el DAPI se usa para teñir células fijadas, por lo tanto se probaron las 3 diluciones mencionadas en el párrafo superior. Las diluciones 1X y 10X no lograron teñir la totalidad de las células. La concentración óptima fue 100X. Lamentablemente, cuando se observaron las células luego de la incubación con los *lipoplexes* se vio que el exceso de DAPI tiñó algunos de los *lipoplexes*. Por lo tanto la preteñición con DAPI no ayuda a discernir entre el nuevo DNA incorporado y el DNA celular. También se intentó teñir las células con falloidina, para poder observar los filamentos de actina y así poder delimitar los bordes celulares. Sin embargo, la tinción disminuyó la cantidad de *lipoplexes* dentro de la célula. Por todo esto, se decidió trabajar solamente con SYBR Green. Se sacaron fotos con luz blanca de todos los sectores de las placas que fueron fotografiados con fluorescencia. De esta manera, si en el momento de contabilizar la cantidad de

Lipoplexes 1X en SN

Ak+DNA plasmídico



Ak+lipoplexes 1X

Figura 13: Observación de los *lipoplexes* teñidos con SYBR Green bajo microscopio de fluorescencia. SN = solución. Concentración de DAPI = 100X. Las fotos se sacaron con un aumento 200X.

células con puntillado citoplasmático había alguna duda sobre a cual célula pertenecía el puntillado, se podría recurrir a la foto con luz blanca para una correcta determinación.

Primero se estudió la presencia de puntos en el citoplasma a lo largo del tiempo. Para ello se incubaron a Ak y Rkb con la concentración 1X de *lipoplexes* y se fueron fijando las células a distintos tiempos: 30, 60, 90, 120 y 150 min. En ambas líneas celulares la intensidad de fluorescencia y la cantidad de puntos por célula fue aumentando a lo largo del tiempo. En Ak la intensidad se mantuvo constante a partir de los 90 min de incubación mientras que en Rkb se mantuvo a partir de los 120 min. Al incubar con SYBR Green solo la intensidad de la fluorescencia fue la misma a los 30 y 120 min, sugiriendo que el aumento en la intensidad durante la incubación con los *lipoplexes* se debe a una mayor incorporación de los mismos a lo largo del tiempo. En vista de los resultados obtenidos se decidió observar a Ak y a Rkb a los 120 min en los experimentos posteriores.

Estadística

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (e.e.m.) (n: número de experimentos independientes). La verificación de los supuestos de los análisis estadísticos se hizo con el Infostat versión Libre. El análisis estadístico se hizo con el demo del programa GraphPad Prism versión 5.0. Las diferencias entre las medias de los grupos fueron determinadas por análisis de la varianza de una vía o de dos vías (ANOVA). En ambos casos se usó el post-test de Bonferroni para determinar el nivel de significación entre las medias. En los casos donde se analizó el ajuste a curvas dosis-respuesta se seleccionó la ecuación de Respuesta normalizada vs. logaritmo de concentración con pendiente de Hill variable.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento y caracterización de líneas celulares derivadas de melanoma espontáneo canino

Las líneas celulares de melanoma mostraron una considerable heterogeneidad

Quince líneas celulares de melanoma canino, obtenidas por el procesamiento de tumores extraídos con cirugía de: mucosa oral (Br, Bk, Btl, Cl, Ds, Fk, Kg, Rka, Rkb, Rd, Sc, Tr) y ocular (Ak) y metástasis hepática (LI) se mantuvieron en cultivo por más de 100 repiques.

De acuerdo a los tiempos de duplicación (TD) de los cultivos con bajos repiques (de 20 a 60), se dividieron en 3 grupos: un grupo de rápido crecimiento con TD \approx 23 h (Bk, Cl, Ds, Fk, LI, Sc, Tr), otro intermedio con TD \approx 29 h (Br, Rka) y otro lento con TD \approx 40 h (Ak, Btl, Bts, Kg, Rd, Rkb) (**Tabla 3**).

Cultivadas en monocapa, 13 líneas mostraron una morfología fibroblastoide y otras 2 epitelioide. Con respecto a la adherencia al plástico, 8 líneas presentaron una adherencia débil, como ya se informó para otras líneas derivadas de melanoma canino, mientras que las restantes presentaron una adherencia normal.

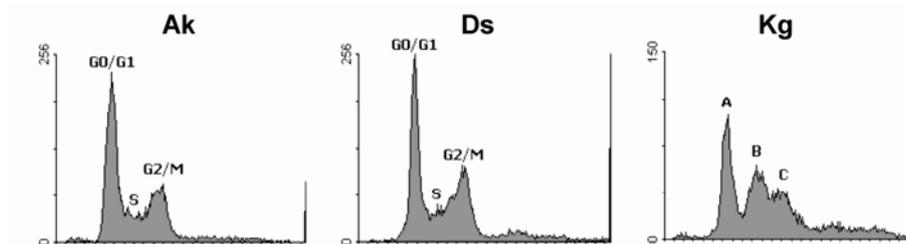


Figura 14: Análisis por citometría de flujo. Células creciendo en monocapa por 2 días fueron cosechadas fijadas y teñidas con yoduro de propidio. El contenido de DNA se analizó por citometría de flujo como se describe en Materiales y Métodos.

Kg presentó tres tipos celulares diferentes: (i) tipo fibroblastoide, (ii) células grandes con un núcleo claramente distinguible y (iii) células grandes multinucleadas (datos no mostrados). Esta heterogeneidad celular de Kg fue corroborada por citometría de flujo donde se observan 3 picos (**Fig. 14**). Esta diversidad se debería al hecho de que los cultivos no fueron sometidos a procesos específicos de selección.

Las células tumorales expresaron in vitro marcadores específicos para melanoma

Los melanocitos provienen del neuroectodermo embrionario y retienen la capacidad de diferenciarse a células tipo fibroblastoide o epitelioide. Esta característica hace muy difícil

la identificación del melanoma canino en tumores amelanóticos, necesitándose la determinación de marcadores específicos para facilitar el diagnóstico.

La inmunocitoquímica de células creciendo en monocapa evidenció una tinción pareja y leve de vimentina (un filamento intermedio que es expresado en tejidos normales mesenquimáticos y neuroectodérmicos) en 9 de las 15 líneas celulares. Las líneas celulares restantes, Bk, Btl, Bts, Rd, Rka y Tr presentaron una expresión de vimentina elevada. La expresión de S100, una isoforma de la proteína de unión a calcio que es expresada en células de origen neuroectodérmico, fue elevada en Br, Btl, Kg, moderada en Ak, Ll, Rd, Sc y baja en Bk, Bts, Cl, Ds, Fk, Rka, Rkb, Tr. Otros dos antígenos de melanoma utilizados como marcadores por su alta especificidad y sensibilidad son el Melan A (expresado en células pigmentadas) y el gp100 (expresado en melanocitos activados). La tinción de Melan A fue alta en Ak, Br, Btl, Ds, Rd; moderada en Bts, Kg, Rkb, Sc; baja en Bk, Cl, Rka, Tr y negativa en Fk, Ll (provenientes de tumores amelanóticos). La expresión de gp100 se presentó alta en Br, moderada en Btl, Rd; baja en Ak, Bk, Cl, Ds, Kg, Rka, Sc y negativa en Bts, Fk, Ll, Tr.

#	Línea Celular	Tiempo de Duplicación (h)	Vimentina	S100	Melan A	Gp100	Citoqueratina
1	Ak	40,4 ± 0,9	+	++	+++	+	-
2	Bk	22,0 ± 2,0	+++	+	+	+	++
3	Br	29,6 ± 0,2	+	+++	+++	++++	++++
4	Btl	45,0 ± 4,1	++++	+++	+++	++	-
5	Bts	35,1 ± 3,0	++++	+	++	-	-
6	Cl	20,8 ± 0,2	+	+	+	+	-
7	Ds	22,2 ± 1,9	+	+	+++	+	-
8	Fk	22,3 ± 2,4	+	+	-	-	-
9	Kg	41,3 ± 2,3	+	++++	++	+	-
10	Ll	21,5 ± 1,7	+	++	-	-	-
11	Rd	43,0 ± 1,1	++++	++	++++	++	+++
12	Rka	28,0 ± 2,0	++++	+	+	+	++
13	Rkb	36,7 ± 0,6	+	+	++	n.d.	-
14	Sc	25,7 ± 0,3	+	++	++	+	-
15	Tr	22,0 ± 1,0	++++	+	+	-	+

Tabla 3: Marcadores tumorales en células de melanoma canino cultivadas en monocapa. Células creciendo por 3 días en monocapa fueron fijadas y teñidas con marcadores específicos para diagnóstico de melanoma como se describe en Materiales y Métodos. El crecimiento en función del tiempo fue determinado por conteo de células que excluían azul tripán. n.d.: no determinado.

Aunque se esperaba una tinción negativa para citoqueratina (marcador específico de queratinocitos) 5 líneas celulares mostraron tinciones positivas (Bk, Br, Rd, Rka, Tr).

Estas 5 líneas también tiñeron positivamente para vimentina. La co-expresión de estos dos marcadores, relacionada con un comportamiento más invasivo y metastático (Hendrix MJ *et al.* 1992), se debería a un estado de dediferenciación de estas células tumorales o a la presencia de células del estroma tumoral. En resumen, tanto el análisis morfológico como los resultados de las tinciones inmunocitoquímicas confirmaron el diagnóstico de melanoma (**Tabla 3**).

Las células de melanoma crecieron in vitro como esferoides multicelulares

Todas las líneas de melanoma canino fueron capaces de crecer como esferoides multicelulares en suspensión (**Fig. 15**).

El curso temporal de la formación de esferoides varió entre una línea y otra, así como el tamaño, la forma y el grado de compactación de los mismos. Es sumamente interesante notar la alta similitud que suele existir entre los esferoides y los tumores sólidos *in vivo* que los originan (Ramos-Vara JA *et al.* 2000). Así, determinadas líneas celulares formaron esferoides muy compactos y generalmente redondeados donde las células aparecían íntimamente asociadas entre ellas impidiendo distinguir los límites intercelulares (Ak, Br, Btl, Bts, Cl, Ds, Fk, Ll, Rd), mientras que otras formaron agregados de compactación intermedia (Kg, Sc, Tr) o más laxos e irregulares, en los que fue posible observar claramente células individuales (Bk, Rka, Rkb).

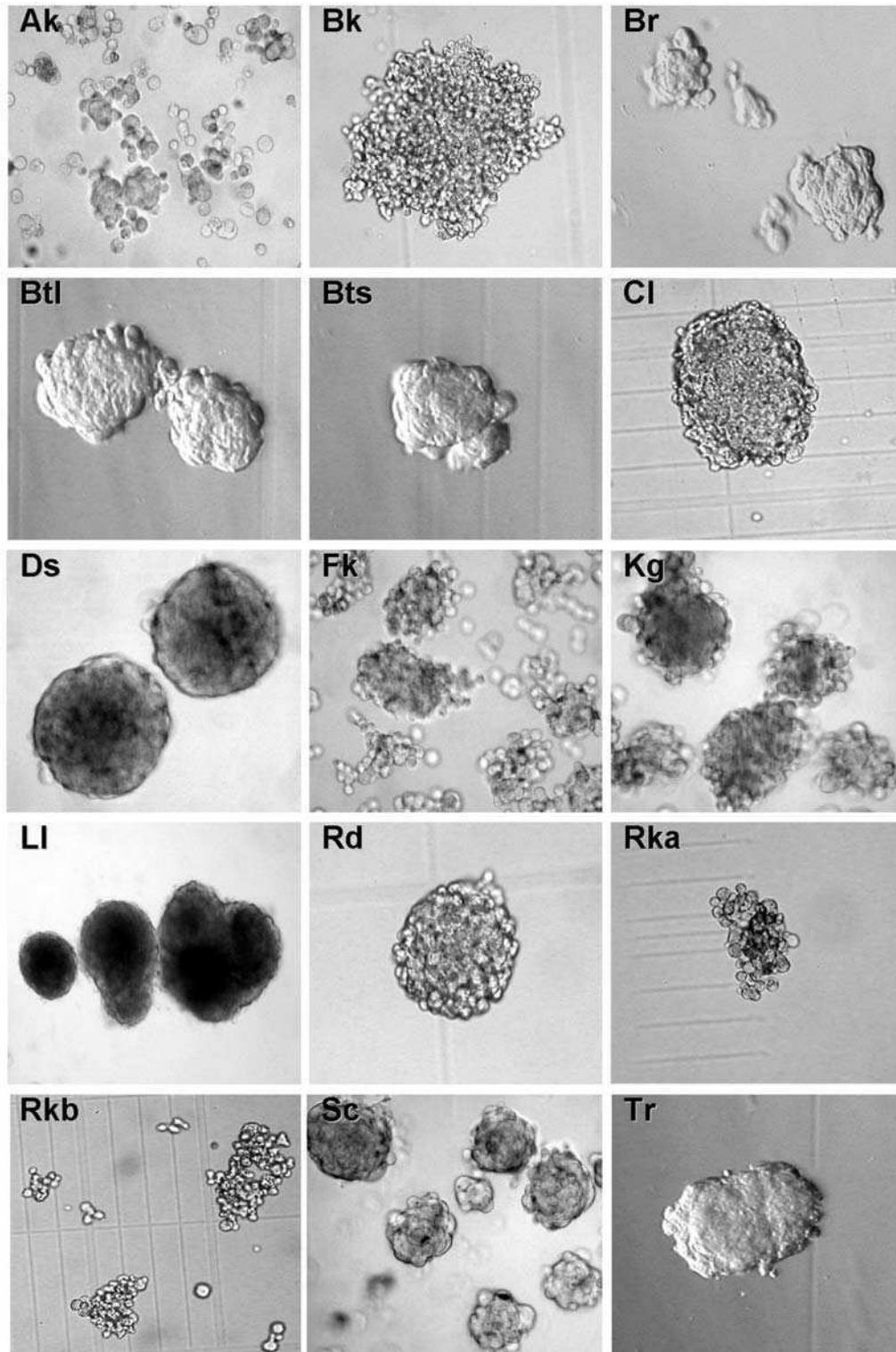


Figura 15: Morfología de los esferoides de melanoma canino. Células derivadas de melanomas caninos creciendo en suspensión por 3 días fueron observadas por microscopio invertido de contraste de fases y fotografiados (200X).

Respuesta a la transferencia génica no viral del sistema del gen suicida HSVtk/GCV

Los esferoides de melanoma presentaron respuestas variadas al gen suicida

Los esferoides multicelulares constituyen el modelo *in vitro* más adecuado para evaluar el efecto de la configuración espacial de las células tumorales sobre el tratamiento con el gen de la timidina kinasa del herpes virus simplex/ganciclovir (HSVtk/GCV) (Altamirano NA *et al.* 2007, Finocchiaro LME *et al.* 2004 y Mueller-Kleiser W 1997). La citotoxicidad de concentraciones crecientes (0,01 a 1000 µg/ml) de la pro-droga GCV fue ensayada en células de melanoma que expresaban transitoriamente β-gal o HSVtk, cultivadas como monocapas o esferoides. Como se observa en la **Fig. 16**, las monocapas sub-confluentes derivadas de diferentes tumores mostraron sensibilidades muy distintas al sistema HSVtk/GCV. Las monocapas más sensibles fueron Ak, Bk, Kg, Rka, Rkb, Sc cuyas eficiencias de transfección variaron de 26-53% (Ak, Bk, Rka, Sc) a 9-12% (Kg, Rkb). Por otra parte las monocapas de Br, Fk, Ll con porcentajes de lipofección intermedios (10-17%) y las de Rd con baja eficiencia (2%), fueron resistentes al tratamiento HSVtk/GCV.

Otro grupo, con porcentajes de transfección entre bajos e intermedios (Btl, Bts, Cl, Ds, Tr: 5-20%), presentó respuestas parciales al sistema ensayado. Dentro de este último grupo, las células Ds controles de lipofección (β-gal) presentaron una sensibilidad basal elevada a GCV, probablemente debido a una actividad timidina kinasa intrínseca aumentada, resultando en una curva dosis respuesta similar a la de las células Ds que expresaban HSVtk.

HSVtk no sensibilizó significativamente a Br, Fk, Ll en ninguna configuración espacial; mientras que Ak, Bts, Ds, Rka, Tr presentaron sensibilidades similares en esferoides y monocapas.

Por otro lado, en células Bk, Btl, Cl, Kg, Rkb, Sc, lipofectadas con HSVtk se observó un corrimiento hacia la derecha de las curvas de supervivencia de los esferoides con respecto a las de sus respectivas monocapas. Esta observación pondría en evidencia el fenotipo de resistencia multicelular (MCR) en los esferoides.

Sorprendentemente se produjo un corrimiento hacia la izquierda en las curvas de supervivencia de Rd y Tr para las dosis de relevancia farmacológica de GCV (1-10 µg/ml). Este fenómeno podría estar asociado a un importante efecto *bystander* que contrarrestó la resistencia multicelular en la configuración 3D.

La gran sensibilidad de los esferoides de Ak al sistema gen suicida/GCV, con curvas de supervivencia similares en monocapas y esferoides, se debería al alto porcentaje de

lipofección de las mismas (53%). No obstante, las curvas de supervivencia de Tr, cuya eficiencia de transfección es intermedia (18%), también resultaron similares entre sí.

La gran variabilidad en las eficiencias de lipofección de las células podría explicar la heterogeneidad de las respuestas. Sin embargo, no se encontró ninguna correlación entre la supervivencia de monocapas y de esferoides sensibles, con sus porcentajes de transfección respectivos (datos no mostrados).

Como se observa en la **Tabla 4**, las concentraciones inhibitorias 50 (IC 50) de los esferoides y monocapas evidenciaron que la sensibilidad de los esferoides al tratamiento con gen suicida es cuantitativamente distinta en cada tumor.

Comparados con sus respectivas monocapas, los esferoides Bk, Btl, Cl, Kg, Rkb, Sc que expresaban el gen de HSV tk , resultaron ser ligeramente sensibles al GCV mientras que los de Bts, Ds, Rka fueron medianamente sensibles. Al comparar los esferoides lipofectados con β -gal (controles) con los que expresan HSV tk se observa que los de Ak, Ds, Rd, Rka, Rkb, Sc y Tr fueron de 3 a 1064 veces más sensibles, lo que apoyaría la factibilidad de aplicación de este tratamiento *in vivo*.

Por otra parte, los esferoides de Fk, Kg, Ll lipofectados con HSV tk no evidenciaron un aumento significativo de sensibilidad en comparación con los esferoides que expresan β -gal.

A las concentraciones más bajas de GCV se observaron valores de supervivencia mayores al 100% en algunas líneas tumorales (Bk, Br, Btl, Bts, Cl). Aunque las curvas de supervivencia de HSV tk siempre estuvieron por debajo de las de β -gal, sus elevados valores de supervivencia (>50%) impidieron determinar las IC 50 de ambas.

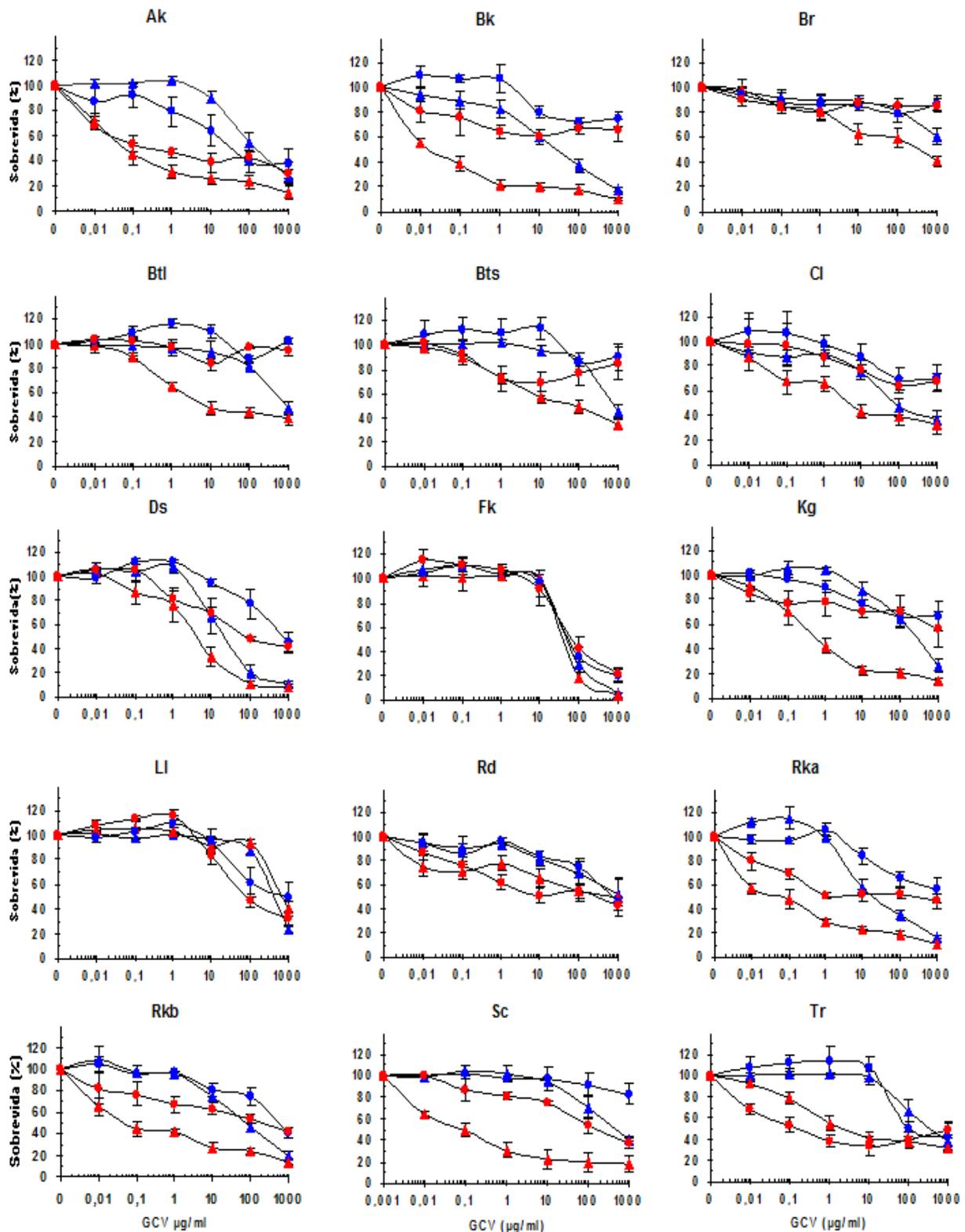


Figura 16: Efectos de HSVtk/GCV sobre monocapas y esferoides *in vitro*. Curvas dosis-respuesta al GCV de células de melanoma canino lipofectadas con β -gal- (\blacktriangle , \bullet) y HSVtk- (\blacktriangle , \bullet) creciendo como monocapas (\blacktriangle , \blacktriangle) o esferoides (\bullet , \bullet). El ensayo se realizó como se describe en Materiales y Métodos. La viabilidad celular se determinó con el ensayo de MTS. n = 4.

Línea celular	Monocapas (Sobrevida %)		Esferoides (Sobrevida %)		β -gal/HSVtk		HSVtk: Esf / Mc	Eficiencia de Lipofección (%)
	β -gal	HSVtk	β -gal	HSVtk	Mc	Esf		
Ak	230 \pm 78	0,27 \pm 0,19	34 \pm 17	0,82 \pm 0,22	849	41	3	53 \pm 14
Bk	12 \pm 7	0,025 \pm 0,01	>1000	>1000	474	>1	>40500	43 \pm 8
Br	>1000	297 \pm 144	>1000	>1000	3,4	>1	>3,4	10 \pm 1
Bts	760 \pm 163	105 \pm 74	>1000	>1000	7,3	>1	>9,6	11 \pm 3
Btl	750 \pm 166	6,8 \pm 1,5	>1000	>1000	110	>1	> 146	5 \pm 2
Cl	79 \pm 50	5,0 \pm 2,0	>1000	>1000	15	>1	186	20 \pm 4
Ds	30 \pm 10	3,0 \pm 2,0	390 \pm 132	77 \pm 15	10	5	25	9 \pm 5
Fk	68 \pm 23	39 \pm 3,0	56 \pm 19	67 \pm 21	1,7	0,8	2	10 \pm 3
Kg	309 \pm 131	0,64 \pm 0,45	>1000	>1000	483	>1	>1500	9 \pm 4
LI	470 \pm 58	477 \pm 62	64 \pm 26	159 \pm 114	1	0,4	0,3	17 \pm 8
Rd	336 \pm 212	202 \pm 117	730 \pm 76	30 \pm 5	1,7	24	0,15	2 \pm 1
Rka	24 \pm 16	0,05 \pm 0,02	>1000	0,94 \pm 0,04	474	>1064	19	32 \pm 9
Rkb	76 \pm 32	0,045 \pm 0,01	578 \pm 153	205 \pm 81	1690	2,8	4550	12 \pm 1
Sc	392 \pm 123	0,14 \pm 0,05	>1000	133 \pm 68	2798	>8	946	26 \pm 11
Tr	354 \pm 110	2,6 \pm 1,2	108 \pm 32	0,17 \pm 0,09	135	650	0,06	18 \pm 3

Tabla 4: Sensibilidad al GCV de células que expresan HSVtk y β -gal cultivadas como esferoides y monocapas. La eficiencia de lipofección se determinó como se describe en materiales y métodos. Los datos de sobrevida corresponden a las medias \pm error estándar de la media de las concentraciones de GCV que produjeron un 50% de reducción de la viabilidad celular en los experimentos mostrados en la Fig 16.

Citotoxicidad del gen suicida a una concentración intratumoral de GCV similar a la utilizada in vivo

Se estimó la citotoxicidad del gen suicida HSVtk a la concentración farmacológicamente relevante de GCV (1 μ g/ml), similar a la utilizada en nuestros pacientes caninos (3 μ g/ml). En estas condiciones, semejantes a las usadas *in vivo*, el gen suicida/GCV eliminó una parte substancial de las células que expresaban HSVtk, sin afectar a las células que expresaban β -gal (**Fig. 16**).

Cuando se crecieron en monocapas subconfluentes, 4 de las 15 líneas celulares lipofectadas con el gen de HSVtk no fueron sensibles al GCV (1 μ g/ml) (**Fig. 17a**), mientras que las 11 líneas celulares restantes mostraron valores de supervivencia significativamente menores a los valores de los controles β -gal (**Fig. 17b,c**). Tres de las 4 líneas cuyas monocapas resultaron insensibles al gen suicida/GCV, mantuvieron el fenotipo al crecer como esferoides. Solamente el crecimiento de los esferoides de Rd resultó inhibido por el tratamiento ($p < 0,001$). En el grupo de monocapas sensibles (11 líneas celulares), 7 líneas (Ak, Bk, Bts, Ds, Rka, Rkb, Tr) mantuvieron una respuesta significativa al ser cultivadas en 3D mientras que las 4 restantes la perdieron (Btl, Cl, Kg y Sc).

Sólo 6 líneas de las 11 del grupo sensible presentaron un fenotipo resistente (MCR), donde la supervivencia de las monocapas (%Mc) fue significativamente menor que la de los esferoides (%Esf). De todos modos, 2 de 6 líneas celulares con MCR y las 5 de 5 que no presentaron MCR mostraron valores de supervivencia como esferoides significativamente menores a los de los controles (que expresaban β -gal). Estos resultados sugieren que a pesar del efecto MCR, el sistema HSVtk/GCV resultó lo suficientemente efectivo como para ser aplicado exitosamente en células de melanoma tanto *in vitro* como *in vivo* en un 50% de los casos.

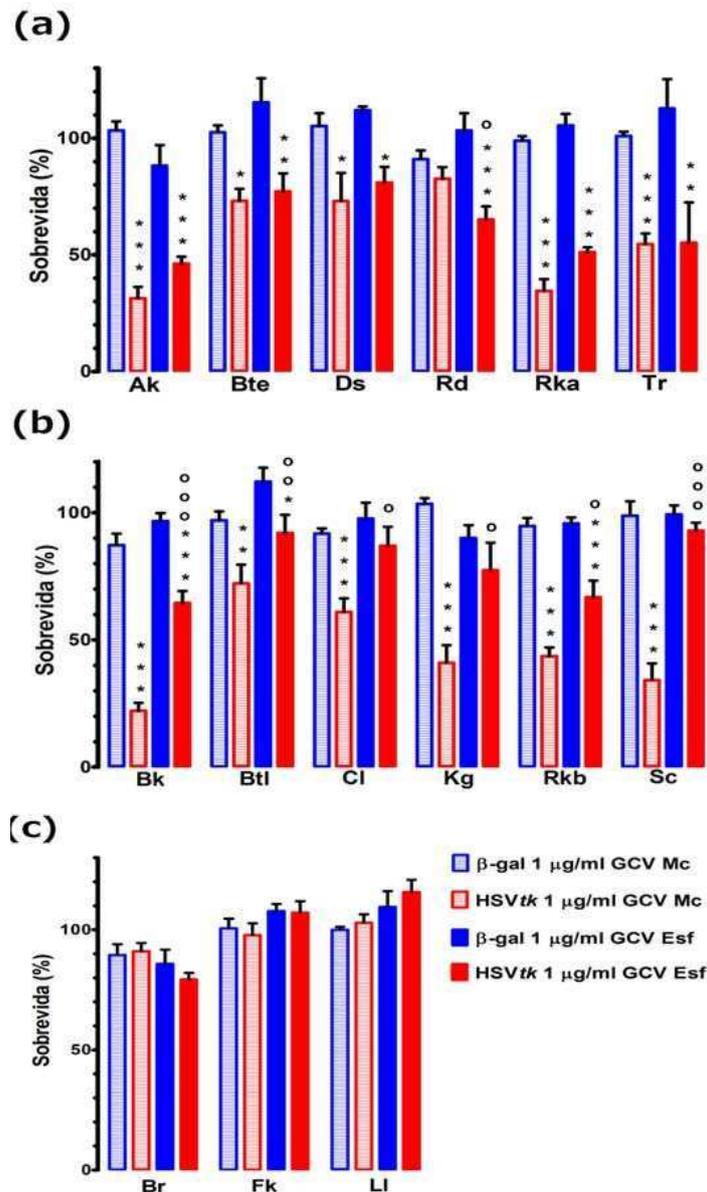


Figura 17: Sensibilidad al GCV 1 μ g/ml de células que expresan HSVtk y β -gal cultivadas como esferoides y monocapas. Los resultados corresponden a los porcentajes de supervivencia de la Fig. 15 para la dosis de 1 μ g/ml de GCV. (a) Células que no presentaron MCR; (b) células que presentaron MCR; (c) monocapas no sensibles al sistema HSVtk/GCV. HSVtk vs. β -gal: (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$. Esferoides vs. monocapas: (ooo) $p < 0,001$; (o) $p < 0,05$.

La resistencia de los esferoides al gen suicida *in vitro* se correlacionó inversamente con la sensibilidad de la monocapa

Para cuantificar el efecto de la configuración espacial en la acción del sistema suicida se definió un índice de resistencia multicelular (MCRi) como: $MCRi = (\%Esf - \%Mc)/\%Mc$.

Como se observa en la **Fig. 18**, se encontró una correlación inversa entre el MCRi y el porcentaje de supervivencia de las monocapas, aparentemente con una tendencia potencial ($R^2 = 0,81$).

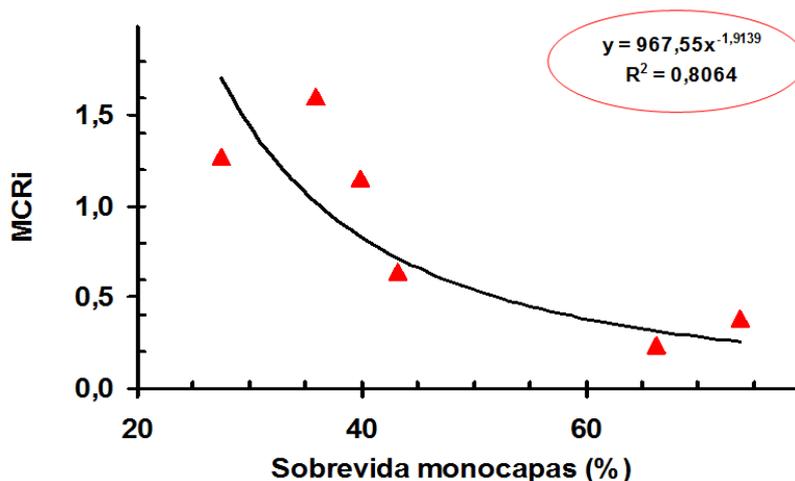


Figura 18: Índice de resistencia multicelular (MCRi). Correlación respecto de la supervivencia de la monocapa correspondiente a la concentración de GCV 1 μ g/ml. Cada punto corresponde a una línea celular. Sólo las líneas celulares que presentaron MCR se incluyeron en el gráfico. La curva de tendencia fue calculada por regresión potencial.

La sensibilidad de los esferoides al gen suicida *in vitro* se correlacionó con la respuesta de los tumores de los pacientes caninos *in vivo*

Como ya fue informado (Finocchiaro LME *et al.* 2008 y Finocchiaro LME & Glikin GC 2008), los pacientes con melanoma espontáneo canino recibieron inyecciones intratumorales de *lipoplexes* conteniendo el gen HSVtk y GCV una vez por semana, durante 5 semanas. La **Tabla 5** resume la respuesta a la terapia de gen suicida de los tumores *in vivo* y de las líneas celulares derivadas de éstos al ser cultivadas *in vitro* en monocapa y esferoides.

Entre los 6 tumores (Btl, Bts, Br, Cl, Ds, Sc) que presentaron una enfermedad estable (SD) durante las 5 semanas de tratamiento con gen suicida (**Tabla 5**), 4 (Bts y Ds exceptuado) mantuvieron la insensibilidad al sistema HSVtk/GCV al ser crecidos como esferoides, mientras que 5 de 6 (Br exceptuado) fueron sensibles al ser cultivados en monocapa.

Paciente/ línea celular	<i>In vivo</i>				<i>In Vitro</i>		
	Índice mitótico tumoral	Volumen Tumoral		Respuestas clínicas	Sobrevida (%)		Grado de compactación de esferoides
		Inicial (cm ³)	Final (%)		Monocapas	Esferoides	
Ak	2,5±0,3	1,0±0,2	25,0±3,0	PR	31±5	46±3	+++
Bk	3,3±0,7	15,0±2,0	49,0±5,0	PR	22±3	64±5	+
Br	4,2±0,5	4,0±0,4	70,0±8,0	SD	87±7	79±3	+++
Btl	4,0±0,6	25,0±3,0	123,0±14,0	SD	65±3	97±8	+++
Bts	2,5±0,3	87,0±9,0	59,0±7,0	SD	72±5	72 ±10	+++
Cl	2,0±0,4	36,0±5,0	85,0±9,0	SD	66±6	87±8	+++
Ds	4,1±0,5	17,0±2,3	65,0 ±8,0	SD	73±12	81±8	+++
Fk	4,5±0,7	12,0±2,0	>600	PD	98±5	107±5	+++
Kg	3,5±0,4	3,0±1,0	50,0±7,0	PR	41±8	78±13	++
LI	4,5±0,6	13±1,4	>345 n.t.	PD	103±4	116±6	+++
Rd	3,9±0,5	25,0±3,5	48,0±6,0	PR	78±5	62±6	+++
Rka	3,2±0,4	20,0±2,4	43,0±5,0	PR	30±4	51±2	+
Rkb	3,0±0,3	55,0±7,8	48,0±7,0	PR	42±5	67±7	+
Sc	4,0±0,4	12,0±1,5	62,0±8,0	SD	34±7	84±3	++
Tr	2,2±0,2	22,0±3,2	35,0±5,0	PR	55±6	38±5	++

Tabla 5: Respuestas del melanoma a la transferencia de gen suicida *in vitro* vs. *in vivo*. Los pacientes caninos fueron tratados y los volúmenes tumorales se midieron el día 42 como fue descrito (Finocchiaro LME & Glikin GC 2008) Los porcentajes de sobrevida de monocapas y esferoides corresponden a una concentración de GCV 1µg/ml (ver Fig. 16). n.t.: no tratado. PD: enfermedad progresiva; PR: respuesta parcial; SD: enfermedad estable. El índice mitótico tumoral fue el promedio de imágenes mitóticas contadas en 10 campos de alto poder no superpuestos y consecutivos (500 µm de diámetro).

Entre los 7 tumores que mostraron respuestas objetivas (Ak, Bk, Kg, Rd, Rka, Rkb, Tr), 6 mantuvieron una respuesta significativa a HSVtk/GCV cuando crecieron como esferoides, mientras que Kg la perdió. Cuando fueron cultivadas como monocapas subconfluentes, 6 de las 7 líneas tumorales (Rd exceptuada) mantuvieron la sensibilidad al sistema HSVtk/GCV (**Tabla 5**).

Un hallazgo notable fue la alta correlación entre la respuesta al gen suicida de los tumores *in vivo* con la de los respectivos esferoides producidos con las líneas celulares derivadas ($R^2=0,85$). Este resultado tiene mayor relevancia al no haberse hallado ninguna correlación cuando las mismas células fueron cultivadas como monocapas subconfluentes ($R^2=0,29$) (**Fig. 19**). Este resultado alienta la implementación de los esferoides como un modelo experimental más realista para optimizar y predecir la respuesta *in vivo* de los tumores respectivos a distintas estrategias terapéuticas.

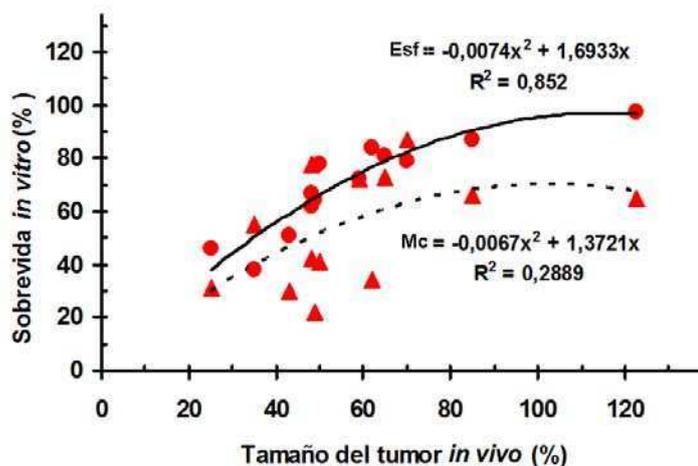


Figura 19: Sensibilidad al sistema de gen suicida *in vitro* vs. *in vivo*. Correlación de la sobrevida *in vitro* al gen suicida/GCV (1 µg/ml) en monocapas (▲) y esferoides (●) a los días 5 y 12 respectivamente (Fig. 16), y las respuestas de los tumores originales *in vivo* después de 5 tratamientos semanales (sólo se consideraron respuestas PR y SD, Tabla 5). Las curvas de tendencia fueron calculadas por regresión polinomial.

Además, los datos obtenidos sugieren que la resistencia multicelular al tratamiento con gen suicida detectada en los esferoides, también ocurrió en los tumores *in vivo*.

Una limitación de nuestro sistema de esferoides en cultivo en lo referido a emular el microambiente tumoral es el hecho de no contener células estromales tales como fibroblastos, células endoteliales, o células inmunes como macrófagos, asesinos naturales (NK), linfocitos T/B, etc. Aún cuando podemos suponer que las células estromales tendrían un papel clave en el resultado del tratamiento a largo plazo *in vivo*, en este caso particular parece que el tratamiento con HSVtk/GCV de los esferoides, principalmente compuestos por células tumorales policlonales, constituyó un modelo muy adecuado para imitar la situación *in vivo*. Así, tanto *in vivo* como *in vitro*, el sistema de gen suicida funcionó principalmente a través de su efecto directo sobre las células tumorales.

Además, los melanomas caninos presentaron normalmente baja infiltración de células inmunes. El incremento de la infiltración posterior al tratamiento con gen suicida respecto de las biopsias previas, no fue suficiente para quebrar la inmuno-tolerancia hacia autoantígenos y el microambiente tumoral inmunosupresor (Finocchiaro LME *et al.* 2008). Por lo tanto, la efectividad del efecto *bystander* no estaría limitada a la citotoxicidad de las células inmunes infiltradas, sino especialmente a la amplificación mitocondrial de la apoptosis/necrosis inducida por el gen suicida. Los radicales libres mitocondriales, difundiéndose o pasando a través de células adyacentes y produciendo daño oxidativo, lograrían que sólo unas pocas células expresando HSVtk sean capaces de iniciar la destrucción de una porción importante de los esferoides (Finocchiaro LME *et al.* 2004).

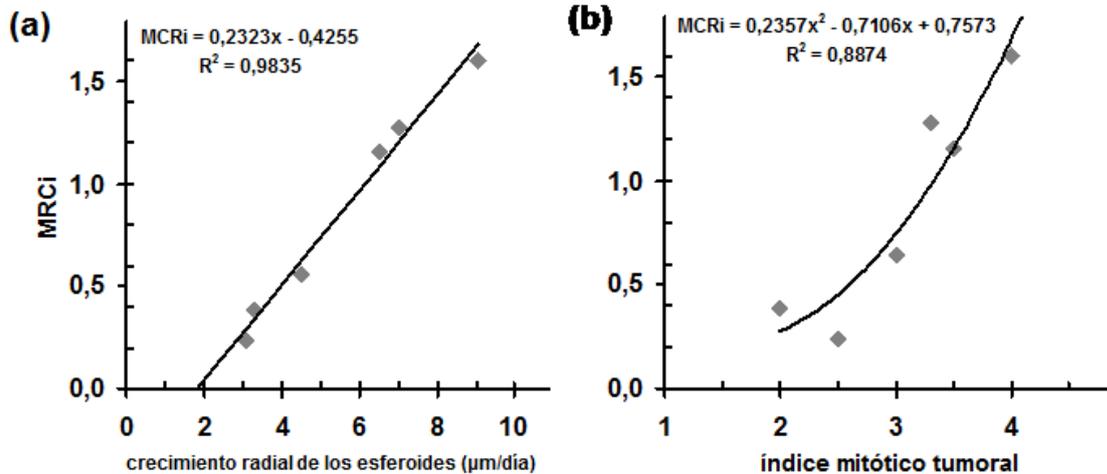


Figura 20: Correlación entre el MCRi y (a) la velocidad de crecimiento radial de los esferoides derivados, (b) los índices mitóticos de los tumores originales. Ver Tabla 5. Las curvas de tendencia fueron calculadas por regresión lineal (a) y polinomial (b). Los crecimientos radiales diarios de los esferoides (μm) fueron determinados como se describe en Materiales y Métodos: Bk, $7,0 \pm 1,0$; Btl, $3,0 \pm 0,2$; Cl, $3,3 \pm 0,1$; Kg, $6,5 \pm 0,7$; Rkb, $4,5 \pm 0,4$; Sc: $9,0 \pm 0,9$.

La resistencia de las células tumorales al gen suicida in vivo e in vitro se debería al recrecimiento

La región de los esferoides con replicación activa y por lo tanto sensible al sistema del gen suicida, se encuentra mayormente en las capas externas del esferoide, como monocapas en la superficie de una esfera (Casais CC *et al.* 2006 y Finocchiaro LME *et al.* 2004). Entonces se podría inferir que la correlación inversa entre los esferoides con MCR y la supervivencia de la monocapa se deba a una rápida repoblación por pasaje de células quiescentes a la fracción proliferativa, luego del tratamiento con gen suicida (Casais CC *et al.* 2006, Desoize B & Jardillier JC 2000 y Finocchiaro LME *et al.* 2004). Si este fuese el caso, el MCRi debería correlacionarse con el grado de crecimiento radial de los esferoides. De hecho esto se observa en la **Fig. 20a** donde se ve que el aumento radial diario de los esferoides (en fase lineal de crecimiento) es proporcional al MCRi, siguiendo una tendencia lineal ($R^2=0,98$). En contraposición, no se observó correlación de los tiempos de duplicación de las monocapas con el MCRi ($R^2=0,13$) ni con el crecimiento radial diario ($R^2=0,30$) (datos no mostrados). Es más, no se encontró ninguna correlación entre el MCRi y el grado de compactación de los esferoides, parámetro que podría afectar la expresión transitoria de los transgenes (Casais CC *et al.* 2006).

Este fenómeno, denominado “resistencia por re-crecimiento” ya fue demostrado en pacientes y también fue observado en esferoides (Desoize B & Jardillier JC 2000 y Brown JM & Giaccia AJ 1998). Luego de radioterapia o quimioterapia, una gran proporción de

las células externas en división celular, que tienen un acceso irrestricto a los nutrientes por estar en la periferia, mueren. Subsecuentemente, las células quiescentes que se encuentran cerca de la periferia logran un mejor acceso a los nutrientes. De este modo las células quiescentes retoman su ciclo celular, se dividen y así nuevas células ocupan los lugares que habían quedado vacantes en el tumor.

Como era de esperar, el MCRi también correlaciona con el índice mitótico de los tumores originales ($R^2=0,93$), hecho que apoya la teoría de una rápida repoblación por re-crecimiento tumoral como responsable de la MCR (**Fig. 20b**). Estos resultados, en concordancia con datos ya informados que muestran una alta correlación entre el índice mitótico y la malignidad de los tumores (Spangler WL & Kass PH 2006), podrían explicar la rápida progresión *in situ* de estos tumores tan agresivos observados en los pacientes (Finocchiaro LME & Glikin GC 2008).

Como se deduce de la **Fig. 20a, b**, la correlación entre los índices mitóticos de los tumores originales y el crecimiento radial de los esferoides derivados de estos ($R^2=0,95$, datos no mostrados) confirman la similitud en el comportamiento entre los tumores *in vivo* y sus modelos *in vitro*.

Durante nuestro estudio clínico veterinario, el paciente Kg mostró una respuesta parcial mientras que Btl, Cl y Sc presentaron una enfermedad estable durante las 5 semanas que duró el tratamiento. El tumor de Sc mostró una rápida progresión *in situ* antes de la terapia génica, el volumen aumentó 5 veces en sólo 5 semanas (12,0 ml a 63,7 ml). Durante las 5 semanas de tratamiento, el crecimiento tumoral cesó y subsecuentemente el tumor se redujo un 38%. Hubo poco cambio en el tamaño durante las 10 semanas siguientes, pero luego el tumor retomó su crecimiento (Finocchiaro LME & Glikin GC 2008).

Por otro lado, la resistencia al tratamiento observada en los tumores de Ll y Fk y en los cultivos derivados de los mismos, sugiere una resistencia de re-crecimiento, aún en las monocapas con rápido crecimiento. Esto fue demostrado por el índice mitótico (4,5) (**Tabla 5**) y el crecimiento extremadamente rápido de estos tumores amelanóticos tan malignos *in vivo*.

La resistencia por re-crecimiento al tratamiento con HSVtk/GCV fue confirmada por citometría de flujo

Para profundizar la comprensión de la respuesta celular al tratamiento con HSVtk/GCV, se ensayaron los efectos en el ciclo celular en monocapas casi confluentes de Sc por citometría de flujo (**Fig. 21**).

Los mecanismos involucrados en la muerte celular de las capas externas de los esferoides (como monocapas en la superficie del esferoide) son similares a los que se

observan en monocapas casi confluentes (Altamirano NA *et al.* 2007, Casais CC *et al.* 2006 y Finocchiaro LME *et al.* 2004).

Al igual que en las células no lipofectadas, las células lipofectadas con el gen de β -gal, insensibles a GCV 1 μ g/ml, presentaron típicos picos del ciclo celular G0/G1, S y G2/M. En cambio las células tratadas con HSVtk/GCV mostraron un patrón complejo donde la mayoría de las células se acumularon en las fases S y G2/M y sólo un tercio del total de las células (31,3%) en la región apoptótica hipodiploide sub- G1 (por degradación del DNA).

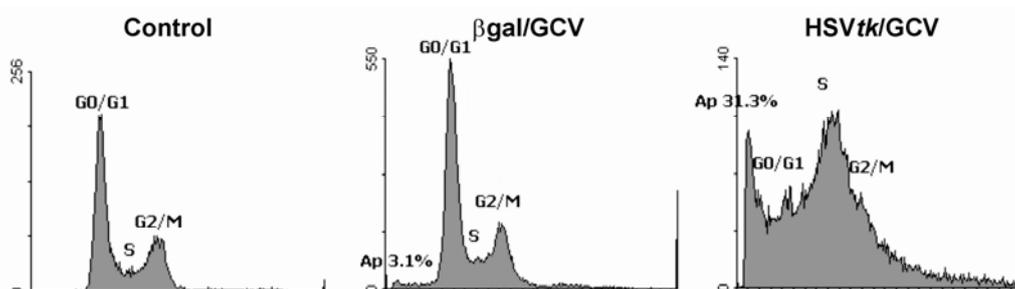


Figura 21: Análisis por citometría de flujo del efecto del gen suicida sobre el ciclo celular. Células Sc no tratadas o lipofectadas con β -gal o HSVtk creciendo en monocapas en alta densidad durante 48 h en ausencia (control) o presencia (β -gal y HSVtk) de GCV1 μ g/ml, fueron cosechadas fijadas y teñidas con yoduro de propidio. El contenido de DNA se analizó por citometría de flujo como se describe en Materiales y Métodos. Ap: Apoptosis.

Por lo tanto, la mayoría de las células del grupo tratado con HSVtk/GCV continuaron sintetizando activamente DNA, aumentando la fracción hiperdiploide de células que ciclan. Este hecho fue coherente con la rápida progresión de este tumor extremadamente agresivo en el paciente canino. Estos resultados apoyan fuertemente la teoría de resistencia por recrecimiento, incluso en monocapas de rápido crecimiento.

Respuesta a la transferencia génica no viral del gen interferón-beta canino

Como siguiente paso en la investigación decidimos estudiar el efecto de la transferencia del gen del interferón-beta canino (cIFN- β) en el mismo conjunto de líneas celulares (**Fig. 22**).

Los esferoides de melanoma presentaron respuestas variadas a la transferencia del gen interferón-beta canino

Creciendo como monocapas, 80% (12 de 15) de las líneas fueron sensibles al gen cIFN- β (Ak; Btl; Bte; Cl; Ds; Kg; Ll; Rd; Rka; Rkb; Sc y Tr), 6 de ellas (Ak; Btl; Rd; Rka; Rkb; Sc) con valores de supervivencia menores al 50%. Al crecer como esferoides, un 53% (8 de 15) de las líneas presentaron valores de sobrevida significativamente distintos a las células lipofectadas con el gen β -gal (Bk; Btl; Bte, Cl, Kg, Ll, Rka y Rkb) (**Fig. 22**). Luego se determinó la presencia del fenotipo de resistencia multicelular en los esferoides. Se obtuvo un patrón similar al encontrado para el gen suicida: 5 líneas presentaron sensibilidades similares en ambas configuraciones espaciales (Bk, Bte, Cl, Kg y Ll), 8 líneas mostraron el fenotipo de MCR (Ak, Btl, Ds, Rd, Rka, Rkb, Sc y Tr) y 2 fueron resistentes al gen en ambas configuraciones (Br y Fk) (**Fig. 22 a, b y c, respectivamente**). Es más, el número de líneas cuyos esferoides resultaron ser sensibles a los tratamientos fue el mismo para ambos tratamientos genéticos (8 de 15). Sin embargo las líneas celulares que fueron sensibles a alguno de los 2 tratamientos genéticos no fueron siempre las mismas (**Tabla 6**, valores en color). Sumando las líneas cuyos esferoides son sensibles a la transferencia de por lo menos 1 de los 2 genes el número de líneas sensibles aumenta a 12, o sea, el porcentaje de líneas sensibles pasa de un 53% a un 80%. Estos resultados alentaron la co-transferencia de los genes HSVtk y cIFN- β como una estrategia altamente efectiva para el tratamiento de pacientes veterinarios con sarcomas de tejido blando y osteosarcomas espontáneos caninos (Finocchiaro LME *et al.* 2011 y 2012).

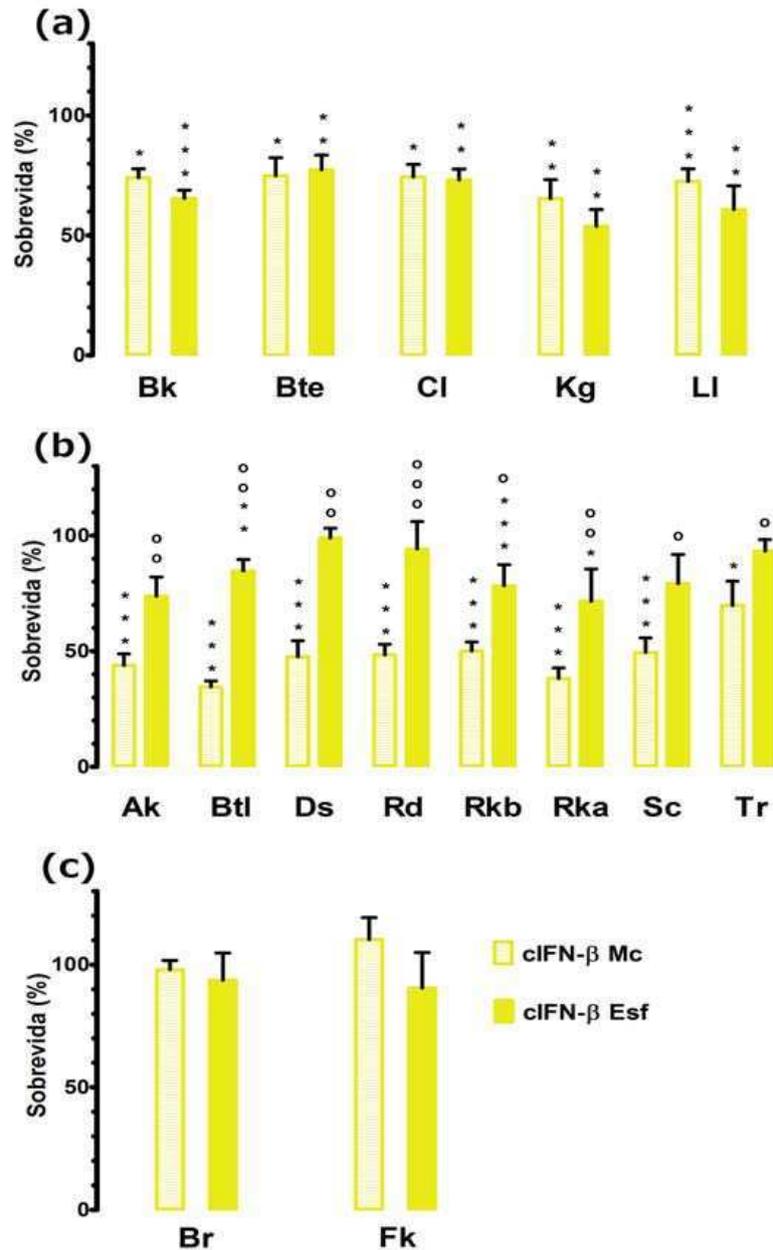


Figura 22: Sensibilidad a la lipofección del gen interferón-beta canino en células cultivadas como esferoides y monocapas. El ensayo se realizó como se indica en materiales y métodos. La sobrevivencia se determinó con el reactivo de MTS. Los resultados se expresan como porcentaje de sobrevivencia relativizado a células lipofectadas con el gen de la β -galactosidasa. $n = 4$. **(a)** Células que no presentaron MCR; **(b)** células que presentaron MCR; **(c)** monocapas no sensibles al gen cIFN- β . cIFN- β vs. β -gal: (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$. Esferoides vs. monocapas: (ooo) $p < 0,001$; (oo) $p < 0,01$; (o) $p < 0,05$. No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de sobrevivencia entre las células sin lipofectar y el control de lipofección β -gal salvo para las mc de Bk, Kg y Rkb.

Línea celular	Sobrevida (%)				Fenotipo MCR		Morfología Monocapas	Grado de compactación Esferoides
	Monocapas		Esferoides		cIFN β	HSVtk		
	cIFN β	HSVtk	cIFN β	HSVtk				
Ak	44 \pm 5	31 \pm 5	74 \pm 8	46 \pm 3	Si	No	Fibroblástica	+++
Bk	74 \pm 4	22 \pm 7	65 \pm 4	65 \pm 5	No	Si	Fibroblástica	+
Br	98 \pm 4	91 \pm 3	94 \pm 11	79 \pm 3	No	No	Epiteloides	+++
Bts	75 \pm 8	73 \pm 5	77 \pm 6	77 \pm 8	No	No	Fibroblástica	+++
Btl	35 \pm 3	72 \pm 7	85 \pm 5	92 \pm 7	Si	Si	Fibroblástica	+++
Cl	74 \pm 5	61 \pm 5	73 \pm 5	87 \pm 8	No	Si	Fibroblástica	+++
Ds	61 \pm 17	73 \pm 12	103 \pm 16	81 \pm 7	Si	No	Epiteloides	+++
Fk	110 \pm 9	98 \pm 5	91 \pm 15	107 \pm 5	No	No	Fibroblástica	+++
Kg	65 \pm 8	41 \pm 7	53 \pm 7	77 \pm 11	No	Si	Fibroblástica	++
LI	73 \pm 5	103 \pm 4	61 \pm 10	116 \pm 5	No	No	Fibroblástica	+++
Rd	48 \pm 5	82 \pm 5	94 \pm 12	65 \pm 6	Si	No	Fibroblástica	+++
Rka	38 \pm 5	35 \pm 5	72 \pm 14	51 \pm 2	Si	No	Fibroblástica	+
Rkb	50 \pm 4	44 \pm 4	78 \pm 9	67 \pm 7	Si	Si	Fibroblástica	+
Sc	50 \pm 6	34 \pm 7	79 \pm 13	93 \pm 3	Si	Si	Fibroblástica	++
Tr	70 \pm 11	55 \pm 5	93 \pm 5	55 \pm 17	Si	No	Fibroblástica	++

Tabla 6: Respuesta a la transferencia no viral del gen cIFN- β y al sistema gen suicida/1 μ g/ml GCV y las características morfológicas de monocapas y sus respectivos esferoides. Los porcentajes de sobrevida corresponden a los valores de la Fig. 17 y de la Fig. 22. La presencia o ausencia del fenotipo de resistencia multicelular (MCR) se determinó analizando las diferencias significativas entre las monocapas y sus respectivos esferoides de las mismas figuras.

Teniendo en cuenta la sensibilidad a ambos tratamientos genéticos, la morfología celular, el fenotipo de MCR y el patrón de expresión de los marcadores inmunohistoquímicos (**Tabla 3**) se eligieron 4 líneas para continuar con los estudios. Ellas son: Ak, Bk, Br y Rkb.

Hacia una poligenoterapia: respuesta a la co-transferencia génica no viral del gen interferón-beta canino y del sistema gen suicida/GCV

Como paso previo a la investigación clínica veterinaria que se llevó a cabo en nuestra unidad (Finocchiaro LME *et al.* 2011 y 2012), decidimos evaluar el efecto de la co-transferencia de ambos genes terapéuticos en la sobrevida de las monocapas y esferoides de las 4 líneas seleccionadas de melanoma espontáneo canino.

La co-transfección de ambos genes terapéuticos no modifica la respuesta de los esferoides a los genes por separado

Dado que, en los experimentos de co-transfección se utilizó 50% de cada plásmido y, que la presencia de un segundo gen compitiendo por la maquinaria transcripcional/traducciona l podría tener un significativo efecto inhibitorio sobre la expresión de ambos genes (Finocchiaro *et al.* 2004), ensayamos el efecto de la lipofección vs la co-lipofección de cada uno de los genes terapéuticos con el gen β -gal (**Fig. 23**, cIFN- β : barras amarillas vs. barras verdes; HSVtk/GCV: barras rojas vs. violetas). El gran efecto *bystander* de ambos genes (Finocchiaro *et al.* 2004 y Villaverde *et al.* enviado), permitió que en 3 de las 4 líneas testeadas (Ak, Bk y Br) no se encontraran diferencias significativas en citotoxicidad entre lipofección y co-lipofección de ambos genes en ninguna de las 2 configuraciones espaciales. Por otro lado, los porcentajes de supervivencia de los esferoides de Rkb co-transfectados con β -gal y HSVtk/GCV fueron significativamente mayores a los que expresan solamente 1 gen terapéutico (**Fig. 23**, **símbolos (*)**); sin embargo, siguen siendo significativamente distintos al control de β -gal/GCV.

Luego analizamos el efecto en la viabilidad celular de la co-lipofección de ambos genes terapéuticos. La co-lipofección de ambos genes disminuyó significativamente los porcentajes de supervivencia tanto de monocapas como de esferoides al comparar con el control de lipofección de β -gal/GCV, en las 4 líneas celulares evaluadas (**Fig. 23**, **barras naranjas, símbolos (*)**). Para poder evaluar si la co-lipofección de ambos genes fue más potente que la lipofección de cada gen por separado o cuál fue el gen cuyo efecto predominó se compararon estadísticamente los porcentajes de supervivencia de la co-lipofección de ambos genes terapéuticos (cIFN- β +HSVtk/GCV) y las co-lipofecciones controles (β -gal+cIFN- β y β -gal+HSVtk/GCV) (**Fig. 23**, **símbolo (+)**). Se consideró que la co-lipofección de ambos genes terapéuticos tuvo un efecto mayor que las co-lipofecciones control cuando los porcentajes de supervivencia de la co-lipofección con cIFN- β +HSVtk/GCV fueron significativamente menores a los porcentajes de supervivencia de los 2 controles. En los casos donde la co-lipofección de ambos genes terapéuticos no tuvo un mayor efecto que las co-lipofecciones control, el gen predominante fue aquel que no arrojó diferencias significativas al comparar con los valores de supervivencia de la co-lipofección de ambos genes terapéuticos (**Fig. 23**). En 3 de las 4 monocapas (Ak, Br y Rkb) prevaleció el efecto del gen cIFN- β sobre el del sistema HSVtk/GCV mientras que en Bk la co-lipofección de los genes terapéuticos produjo un efecto mayor que las co-lipofecciones controles en la monocapa. En los esferoides de Bk, Br y Rkb se perdieron las diferencias entre los controles y la co-lipofección de los genes terapéuticos mientras

que en los esferoides de Ak, que presentó una tasa de crecimiento mayor que sus monocapas, se invirtió la prevalencia: el sistema de HSV tk /GCV fue más efectivo que el gen de cIFN- β . También se documentó el efecto de las co-expresiones en los esferoides fotografiándolos antes de medir su viabilidad celular (**Fig. 24**).

No se observó presencia del fenotipo de MCR por la co-expresión de ambos genes terapéuticos en ninguna de las 4 líneas celulares (**Fig. 23 símbolo (o)**). Sin embargo los esferoides de Ak que co-expresan β -gal+cIFN- β presentaron el fenotipo de MCR pero no los que expresan solo cIFN- β (**Fig. 23, símbolos (o)**). En la línea celular de Br, la lipofección con HSV tk /GCV es más efectiva en esferoides que en monocapas. Este efecto se diluye en la co-lipofección β -gal+HSV tk /GCV cuya citotoxicidad es similar en monocapas y esferoides.

La cantidad de células con la que se forman los esferoides influye en la sobrevida celular

Datos preliminares de nuestro laboratorio, y la comparación de los resultados de las **Figs. 17 y 22** vs la **Fig. 23** mostraron que la citotoxicidad del gen suicida y del gen cIFN- β fue mayor cuanto menor era el inóculo inicial de células que formaron el esferoide. Estos resultados son coherentes con nuestros datos clínicos dónde encontramos una correlación inversa entre la respuesta *in vivo* al gen suicida y el tamaño tumoral (Finocchiaro et al., 2008 y Finocchiaro & Glikin 2008).

En Bk y Rkb los esferoides pequeños (formados por sembrado de 5000 células/pozo) pierden la resistencia multicelular que presentaron los provenientes de 20000 células/pozo y presentan valores de sobrevida al tratamiento con HSV tk /GCV menores que los calculados con esferoides de 20000 células: 58% vs. 72% (Bk) y 57% vs. 67% (Rkb). En el caso de Br las diferencias entre ambos tamaños son más pronunciadas, 63% vs 95%, respectivamente.

También se perdió el fenotipo de MCR en los esferoides pequeños de Br y Rkb que expresaron transitoriamente el gen cIFN- β , con valores de sobrevida de 46% y 50% vs. 94% y 78% en esferoides de 20000 células, respectivamente.

Estos resultados, en concordancia con datos arriba presentados (**Figs. 20 y 21**) sugieren que el tamaño es uno de los factores implicados en la resistencia multicelular por recrecimiento. En esferoides y tumores pequeños, el efecto *bystander* producido por el sistema del gen suicida o por la expresión transitoria del gen cIFN- β lograría destruir un alto porcentaje de células tumorales. En cambio, en esferoides y tumores grandes, este efecto, aunque destruya un gran número de células de zonas proliferativas y aledañas, no alcanzaría para eliminar un número suficiente de células de la capa quiescente como para evitar que estas vuelvan a proliferar y a repoblar la zona destruída por el

tratamiento. Al sembrar una mayor cantidad de células se está aumentando tanto el número de células modificadas genéticamente como también el número de células quiescentes (resistentes al tratamiento).

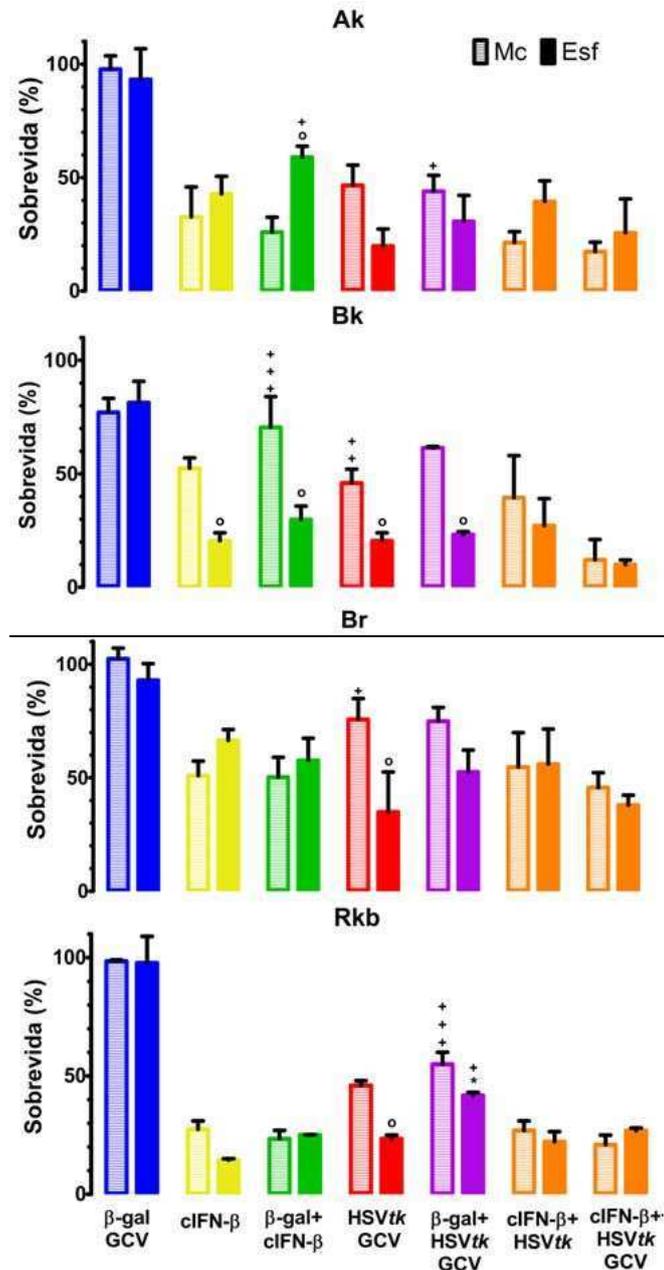


Figura 23: Efecto de la co-lipofección del gen cIFN- β con el sistema gen suicida en la viabilidad celular de monocapas y esferoides. Las células se trataron como se indica en materiales y métodos. Los esferoides de Ak fueron tratados con 0,5 μ g/ml de GCV. n = 3. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de 2 vías. cIFN- β vs. β -gal+cIFN- β o HSVtk/GCV vs. β -gal+HSVtk/GCV: (**) p<0,01. β -gal+cIFN- β vs cIFN- β +HSVtk/GCV o β -gal+HSVtk/GCV vs cIFN- β +HSVtk/GCV (+++) p<0,001; (++) p<0,01; (+) p<0,05. Mc vs Esf (o) p < 0,05; (oo) p < 0,01. Los porcentajes de sobrevivida de las mc y esf de HSVtk y β -gal+HSVtk sin el agregado de GCV no se muestran en la Fig. por fines prácticos, sin embargo no difieren significativamente de las mc y esf de β -gal/GCV.

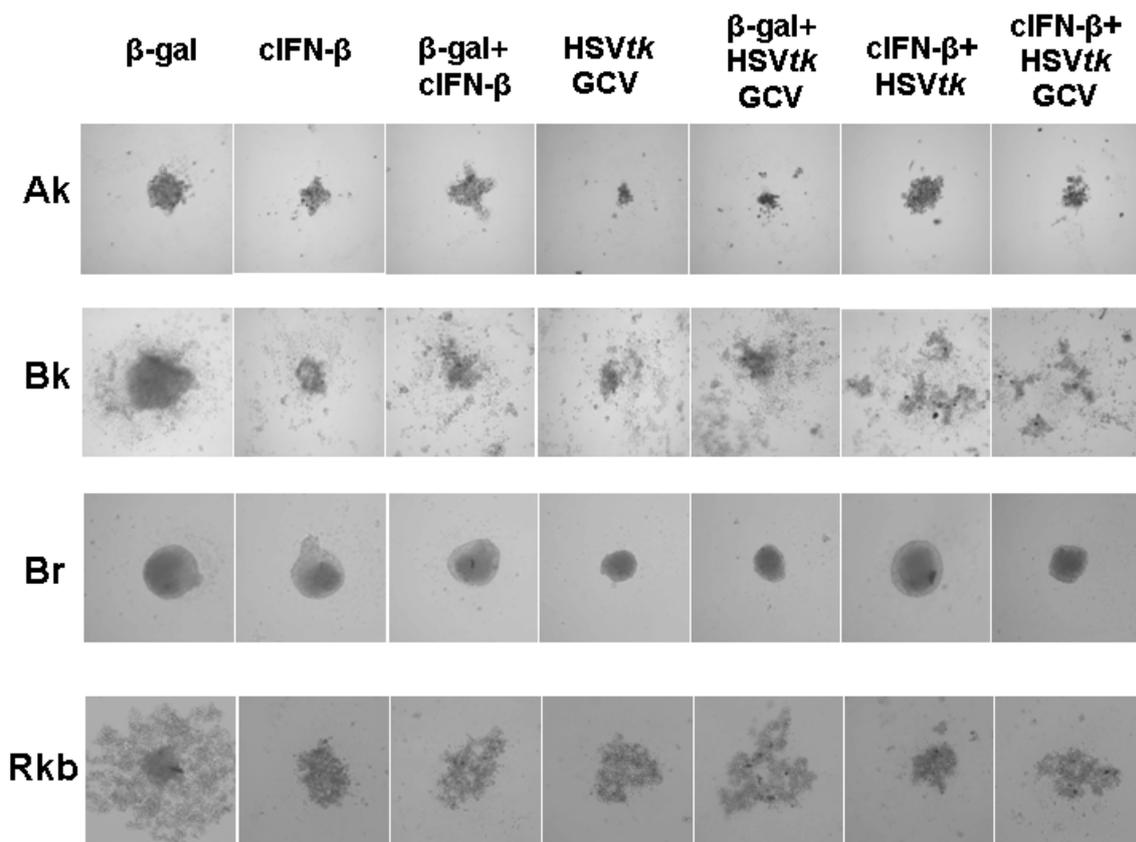


Figura 24: Fotografías de los esferoides de las líneas celulares derivadas de melanoma espontáneo canino co-lipofectadas con los genes de cIFN- β y el sistema gen suicida/GCV. Las fotos fueron tomadas el día 12 después del inicio de la formación de los esferoides bajo microscopio invertido con un aumento de 100x. A los esferoides de Ak se les agregó 0,5 μ g/ml de GCV en los casos indicados mientras que a los esferoides de Bk, Br y Rkb se les agregó 1 μ g/ml de GCV en las situaciones indicadas.

Hacia una geno-quimioterapia: respuesta al tratamiento combinado de bleomicina y lipofección del gen interferón- β canino o de gen suicida/GCV

La bleomicina es un antibiótico glicopeptídico con actividad antineoplásica debido a su actividad endonucleasa (Mir LM *et al.* 1996). Es de alto interés como tratamiento para el melanoma pues en la piel no se expresa una hidrolasa capaz de inactivar a la bleomicina (Jingyang C & Stubbe J 2005). Por ello se decidió evaluar, como paso previo a la investigación clínica veterinaria, el efecto citotóxico y los posibles mecanismos involucrados en la administración de bleomicina junto con el gen del interferón-beta o el sistema gen suicida/GCV. Los ensayos se realizaron sobre las 4 líneas ya mencionadas. La viabilidad se determinó con la técnica de APH y los esferoides se formaron de la misma manera que para la co-lipofección.

La co-incubación con bleomicina no afecta la expresión de la β -galactosidasa

Para evaluar la sensibilidad a la bleomicina decidimos incubar las células con el agente quimioterapéutico durante la transfección. Elegimos este abordaje ya que imita la situación del agregado local de ambos reactivos (bleomicina y *lipoplexes*) sobre el margen quirúrgico. Este procedimiento podría ser práctico para un protocolo clínico de terapia génica.

Se eligió una concentración de 3 $\mu\text{g/ml}$ (2,12 μM) similar a la concentración en sangre, correspondiente a una dilución 1/500 de la solución inyectable. Esta concentración se encuentra dentro del rango utilizado en distintos trabajos científicos (Poddevin B *et al.* 1991, Pron G *et al.* 1999, Tounekti O *et al.* 1993).

Debido a la actividad endonucleasa de la bleomicina decidimos evaluar si la droga era capaz de degradar el DNA plasmídico en los *lipoplexes*. Para ello se la incubó a 3 $\mu\text{g/ml}$ durante 15 minutos con los *lipoplexes*, se extrajo el DNA plasmídico con fenol-cloroformo y sembró en un gel de agarosa. En concordancia con los resultados del gel que no indicaron degradación del plásmido, la co-incubación con bleomicina tampoco afectó el porcentaje de expresión de la β -galactosidasa en ninguna de las 4 líneas celulares evaluadas (**Fig. 25**).

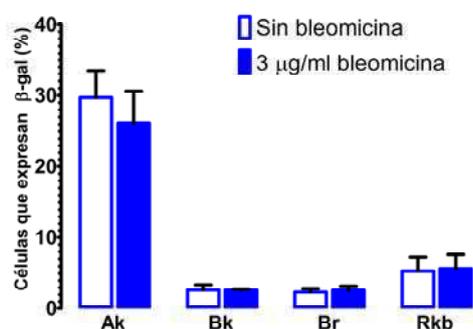


Figura 25: Expresión de β -galactosidasa en células co-incubadas con 3 $\mu\text{g/ml}$ de bleomicina. La lipofección y la determinación de la actividad β -galactosidasa se realizó como se indica en Materiales y Métodos. El porcentaje de expresión de β -galactosidasa se determinó contando la cantidad de células azules sobre el total de células en cámara de Neubauer. $n = 3$. El análisis estadístico se hizo con ANOVA de 1 vía.

Sensibilidad a la bleomicina de las líneas de melanoma espontáneo canino

Los valores de supervivencia se muestran en la **Fig. 26**. Tres de las 4 monocapas (Bk, Br y Rkb) fueron sensibles a la bleomicina sola pero solamente Bk mantuvo la sensibilidad al crecer como esferoide (**barras grises, símbolos (*)**). Mientras que la lipofección inespecífica ($\beta\text{gal/GCV}$) no afectó la supervivencia, esta disminuyó significativamente con el agregado de bleomicina en las 4 líneas celulares, en ambas configuraciones espaciales (**barras azules, símbolos (*)**). Al comparar el agregado de bleomicina en el

control sin lipofectar con la co-incubación con los *lipoplexes* se encontraron diferencias significativas en las monocapas de Ak, Br y Rkb y estas diferencias se mantuvieron al crecer como esferoides en Ak y Rkb (**barras grises vs. barras azules, símbolos (+)**). La alta sensibilidad de Bk a la incubación con bleomicina sola y la gran cantidad de efectos evaluados impidió ver diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de supervivencia entre el control sin lipofectar y la co-incubación con los *lipoplexes*. Esto se evidencia al observar las fotografías de los esferoides (**Fig. 27**), donde se ven diferencias entre el control y los *lipoplexes* cuando fueron incubados con bleomicina. Por otro lado, la co-lipofección de bleomicina con los genes terapéuticos (cIFN- β y HSVtk/GCV, **Fig. 26, barras amarillas y rojas respectivamente**) disminuyó significativamente los porcentajes de supervivencia en los casos donde la expresión transitoria de los genes terapéuticos mató un 50% de las células o más (monocapas de Bk, Br y Rkb y esferoides de Br que expresan cIFN- β , **símbolos (*)**). En cambio, en las líneas celulares con porcentajes de supervivencia menores al 50% el agregado de bleomicina no produjo una disminución significativa (ambos genes y ambas configuraciones espaciales de Ak, Bk y Rkb y en los esferoides de Br lipofectados con HSVtk/GCV).

Al evaluar la presencia del fenotipo de resistencia multicelular (MCR) de la co-incubación *lipoplexes/bleomicina*, no se encontraron diferencias significativas entre las 2 configuraciones espaciales, salvo en los esferoides de Br que expresan HSVtk (**Fig. 26, símbolos (o)**). Vale la pena aclarar que, aunque el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas debido a la gran cantidad de efectos evaluados, los porcentajes de supervivencia calculados para los esferoides de Br que expresan β -gal, cIFN- β y HSVtk más el agregado de GCV, fueron mayores que los calculados para las monocapas, con diferencias de 30% entre los porcentajes (**Fig. 26, barras azules y amarillas y rojas, rayado vs. lleno**).

La alta sensibilidad a la bleomicina no se debe a la expresión transitoria del gen de la β -galactosidasa ya que también se observó el mismo patrón de comportamiento a la bleomicina en ambas configuraciones de las 4 líneas celulares evaluadas que expresan ambos genes terapéuticos (**Fig. 26, barras azules vs. amarillas y rojas**) y el gen HSVtk sin el agregado de GCV (**Figs. 26 y 27**).

El aumento en la sensibilidad a la bleomicina no depende de la actividad transcripcional del plásmido

Para investigar un poco más el mecanismo que sensibiliza las células a la droga co-incubamos las células con bleomicina y los lípidos catiónicos que forman los *lipoplexes* (**Figs. 28 y 29**). En las 2 líneas celulares que resultaron ser más sensibles al agregado de bleomicina sola, Bk y Br, no se observaron diferencias significativas entre los *lipoplexes*

control y los lípidos catiónicos al crecer como monocapas y esferoides. En las otras 2 líneas celulares, Ak y Rkb, la respuesta fue distinta. En ambas configuraciones espaciales, los porcentajes de supervivencia de la co-incubación con los lípidos catiónicos solos fueron significativamente mayores a los de la co-incubación con los *lipoplexes* control (**Fig. 28, símbolos (*)**). Esta diferencia podría deberse a la actividad transcripcional del gen portado en el plásmido. Para evaluar esta posibilidad decidimos co-incubar a Ak y Rkb con *lipoplexes* formados por un oligonucleótido inespecífico sin actividad transcripcional, polydIdC. Las **Figuras 28 y 29** muestra que la sensibilidad del sistema *lipoplexes*/bleomicina es independiente de la actividad transcripcional del plásmido ya que se observó el mismo patrón de respuesta entre la co-incubación con *lipoplexes* con polydIdC y la co-incubación con los *lipoplexes* portadores del plásmido de β -gal.

Es interesante notar que, salvo para el caso de Br, el sistema *lipoplexes*/bleomicina logró contrarrestar el fenotipo de resistencia multicelular de los esferoides (**Fig. 28, símbolos (o)**). Esto podría deberse a la metodología utilizada, ya que la exposición a la droga se hizo con las células creciendo en monocapa. Dicho de otra manera, el mayor efecto de la bleomicina podría suceder en el momento de la incubación, sobre las células en monocapa, y por tanto los esferoides se formarían con células muy dañadas. Sin embargo, hay casos donde los esferoides se comportan de manera diferencial con respecto a sus monocapas. Por ejemplo, las monocapas de Br y Rkb fueron sensibles al agregado de bleomicina sola mientras que sus esferoides fueron resistentes. Ak presenta el mismo comportamiento cuando es co-incubada con los lípidos catiónicos solos. Por lo tanto, es muy probable que la pérdida del fenotipo de resistencia multicelular se deba a la gran efectividad del sistema *lipoplexes*/bleomicina en ambas configuraciones y no a un artificio de la metodología utilizada.

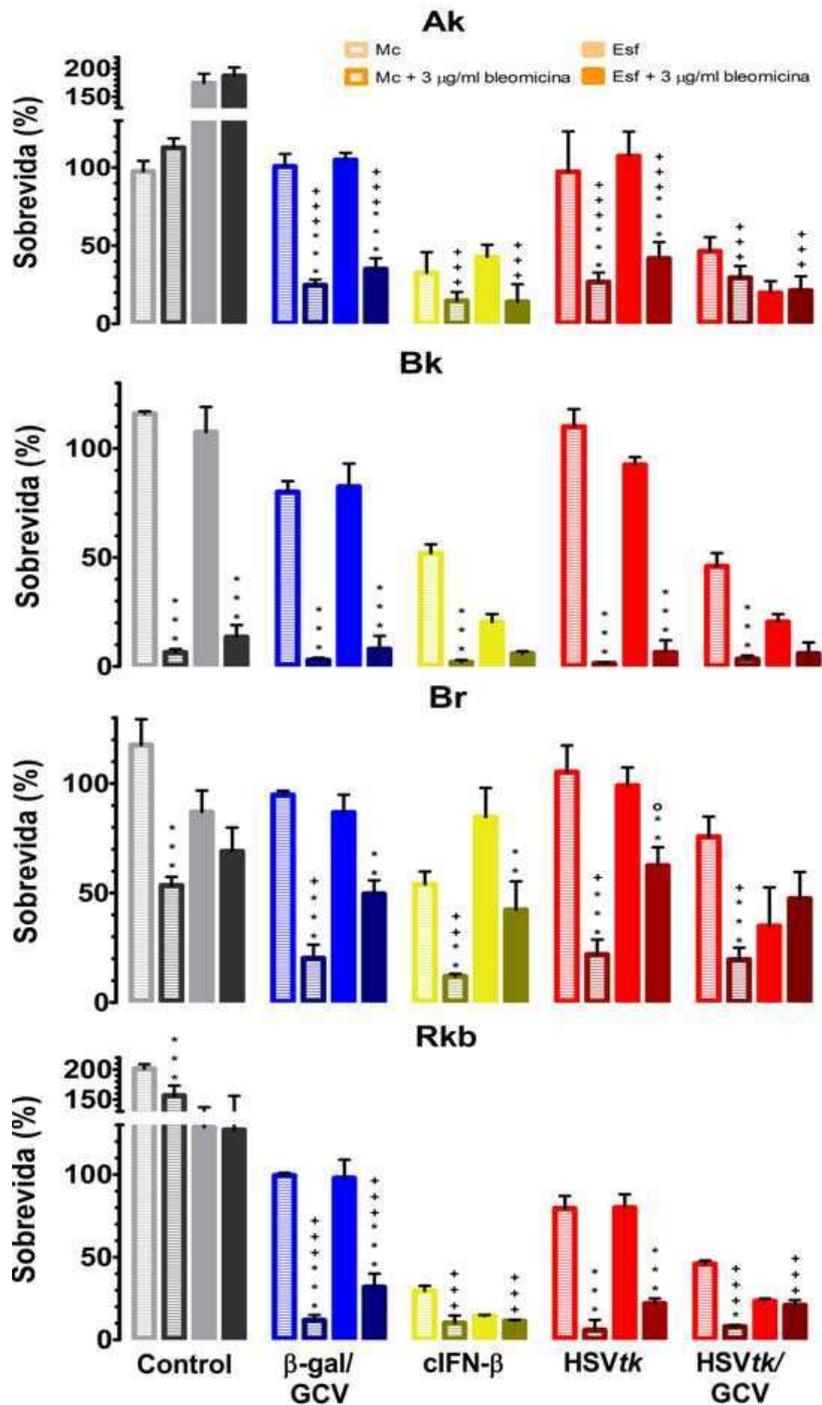


Figura 26: Efecto citotóxico de la co-incubación de bleomicina y lipoplexes en monocapas y sus respectivos esferoides. Las células se incubaron como se describe en materiales y métodos. Las columnas más oscuras corresponden al agregado de 3 μg/ml de bleomicina. n = 3. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de dos vías. Con bleomicina vs. sin bleomicina: (***) p<0,001; (**) p<0,01; (*) p <0,05. Esf con bleo vs. mc con bleo: (o) p<0,05. Control con bleomicina vs. lipofecciones con bleomicina: (+++) p<0,001; (++) p<0,01; (+) p<0,05. No se encontraron diferencias significativas de las co-incubaciones de bleomicina con los distintos lipoplexes entre sí.

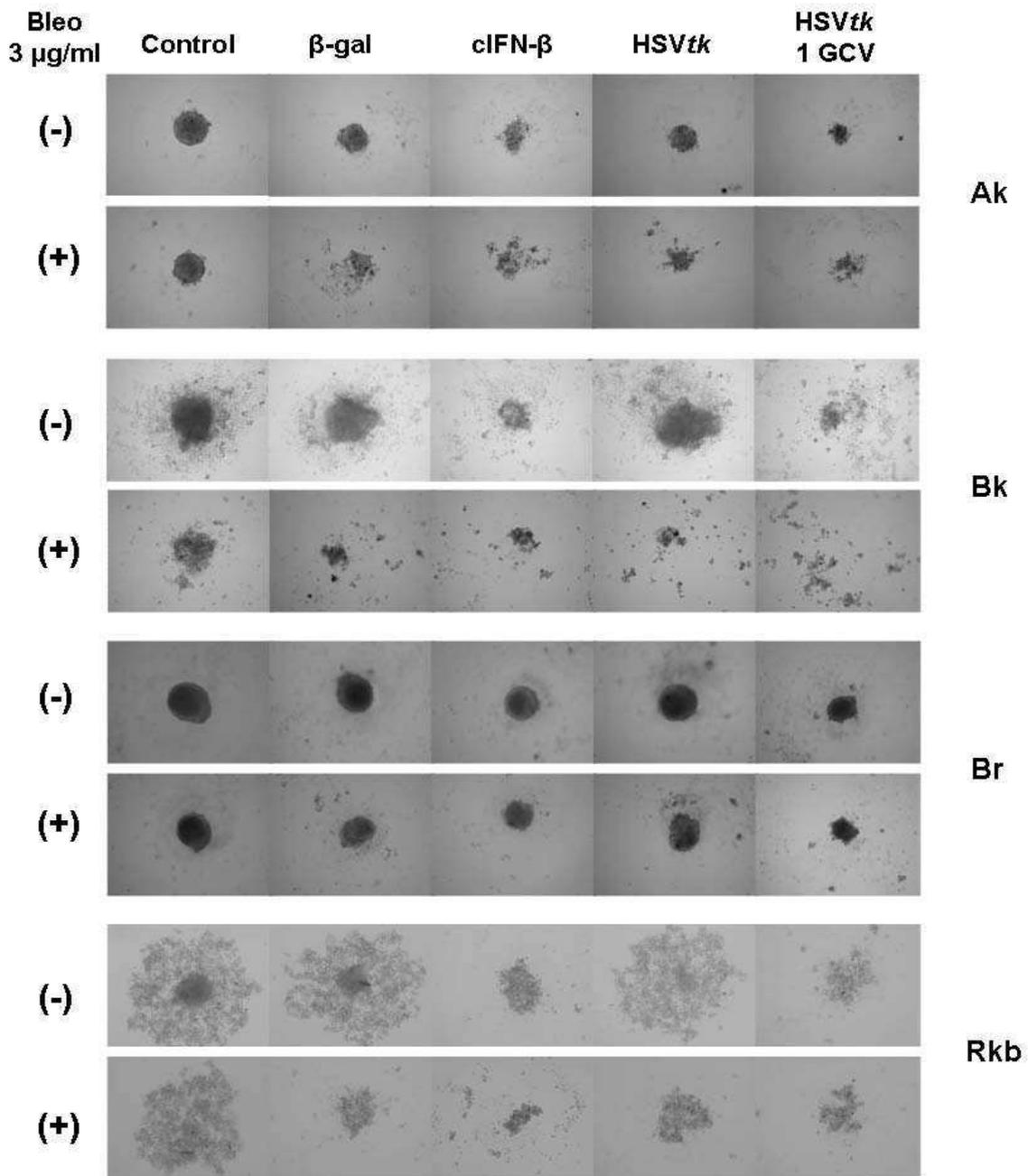


Figura 27: Fotografías de los esferoides co-incubados con 3 µg/ml de bleomicina. Los esferoides se corresponden con los datos de la figura 26. Los esferoides de Ak fueron incubados con 0,5 µg/ml de GCV. Las fotografías fueron tomadas en microscopio invertido con aumento 100X.

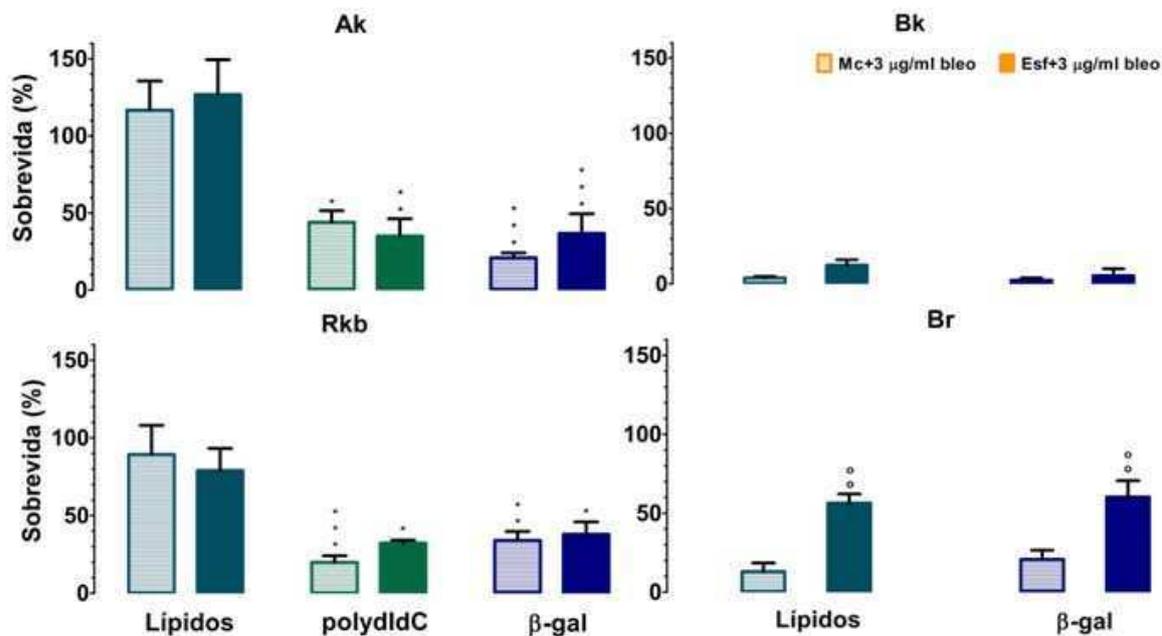


Figura 28: Efecto citotóxico de la co-incubación de bleomicina con lípidos catiónicos solos o lipoplexes - inespecíficos no codificantes (polydIdC). Las células se incubaron como se describe en materiales y métodos. $n = 3$. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de dos vías. Lípidos catiónicos vs. polydIdC o β -gal (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$. Esferoides vs. monocapas: (oo) $p < 0,01$. No se encontraron diferencias significativas entre las co-incubaciones de bleomicina con polydIdC y las co-incubaciones con β -gal.

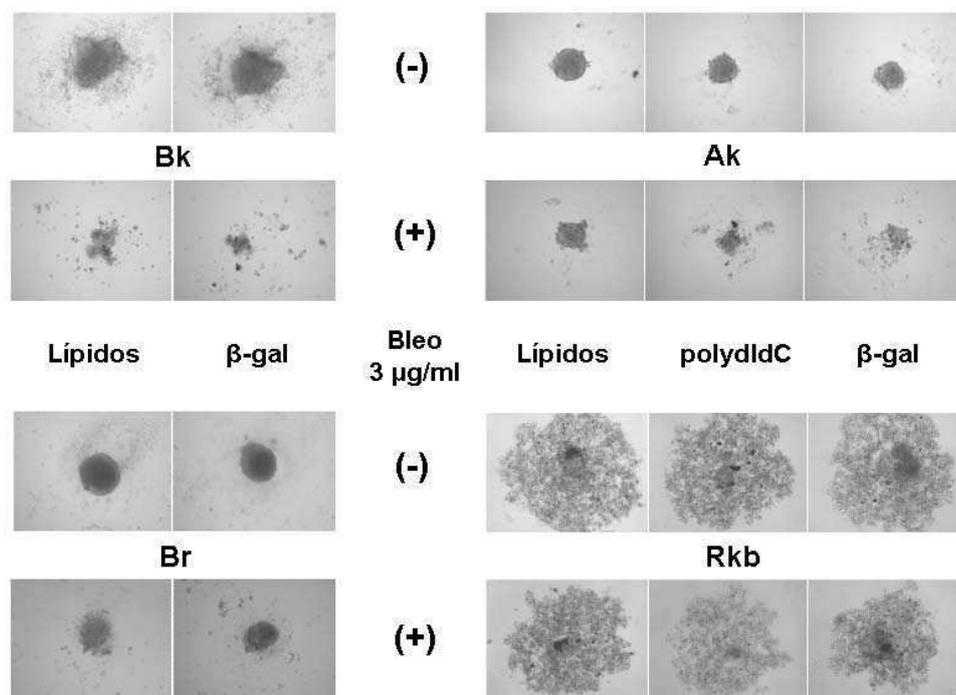


Figura 29: Fotografías de los esferoides derivados de la co-incubación de bleomicina con lípidos catiónicos solos o lipoplexes - genéricos no codificantes (polydIdC). Los esferoides se corresponden con los datos de la figura 29. Las fotografías fueron tomadas en microscopio invertido con aumento 100X.

La co-incubación con los lipoplexes aumenta la sensibilidad a bleomicina

Nuestros resultados indican que la lipofección sensibiliza las células a la bleomicina. Esta sensibilización fue más específica en Ak y Rkb cuya supervivencia al agregado de bleomicina con los lípidos catiónicos solos es significativamente mayor que la producida por co-incubación con bleomicina y *lipoplexes* en ambas configuraciones espaciales. El agregado de bleomicina con lípidos catiónicos solos o con *lipoplexes* no presentó diferencias en la sobrevivencia de monocapas y esferoides de Br mientras que Bk fue muy sensible al agregado de bleomicina sola (**Figs. 26-29**). Por lo tanto se decidió evaluar si la sensibilización encontrada en Ak y Rkb se ve reflejada en un desplazamiento hacia la izquierda de las curvas dosis-respuesta de bleomicina. Para ello se co-incubaron las células por 3 horas con distintas concentraciones de bleomicina en presencia o ausencia de los *lipoplexes* control (β -gal) (**Fig. 30**). Encontramos que efectivamente la co-incubación con bleomicina desplazó las concentraciones inhibitorias 50 (IC50) aproximadamente 10 veces en ambas monocapas (Ak: 20,5 μ g/ml vs. 2,53 μ g/ml y Rkb: 19,5 μ g/ml vs. 2,04 μ g/ml), más de 6 veces en los esferoides de Rkb (> 30 μ g/ml vs. 5,2 μ g/ml) y transformó en una curva dosis-respuesta a los esferoides resistentes de Ak (n.d. vs. 6,9 μ g/ml). Más aún, las diferencias en los porcentajes de sobrevivencia entre ambas curvas fueron significativas a partir de la concentración 1 μ g/ml en ambas monocapas y esferoides de Ak mientras que en los esferoides de Rkb solo se observaron diferencias significativas en las dosis de 3 μ g/ml y 10 μ g/ml (**Fig. 30, símbolos (*)**).

La disminución en los coeficientes de determinación de las curvas dosis respuesta cuando las células fueron cultivadas como esferoides (Ak: 0,96 vs. 0,78 y Rkb: 0,93 vs. 0,73) y el aumento de las IC50 (aproximadamente 2,5 veces más que sus respectivas monocapas) reflejan el comportamiento diferencial entre ambas configuraciones espaciales. Es interesante destacar que los cambios en el patrón de respuesta de los esferoides fueron muy similares entre ambas líneas celulares aunque son morfológicamente disímiles. Ak formó esferoides muy compactos con una geometría bien esferoidal mientras que los de Rkb fueron más laxos, con un esferoide central rodeado de un halo de células unidas entre sí (ver fotos de esferoides control, **Fig. 27**). Esto sugiere la existencia de un mecanismo de resistencia en común adquirido cuando las células crecen unidas entre sí en forma tridimensional, que sería independiente del grado de compactación adquirido.

A pesar de las diferencias en la sensibilidad al sistema *lipoplexes*/bleomicina entre las monocapas y sus respectivos esferoides ambas configuraciones fueron sensibles al sistema (**Fig. 26**). Por éstas y otras razones de factibilidad técnica, para estudiar el mecanismo por el cuál las células se sensibilizan a la bleomicina cuando son co-

incubadas con los *lipoplexes*, se comenzó el análisis del proceso en cultivos en monocapa.

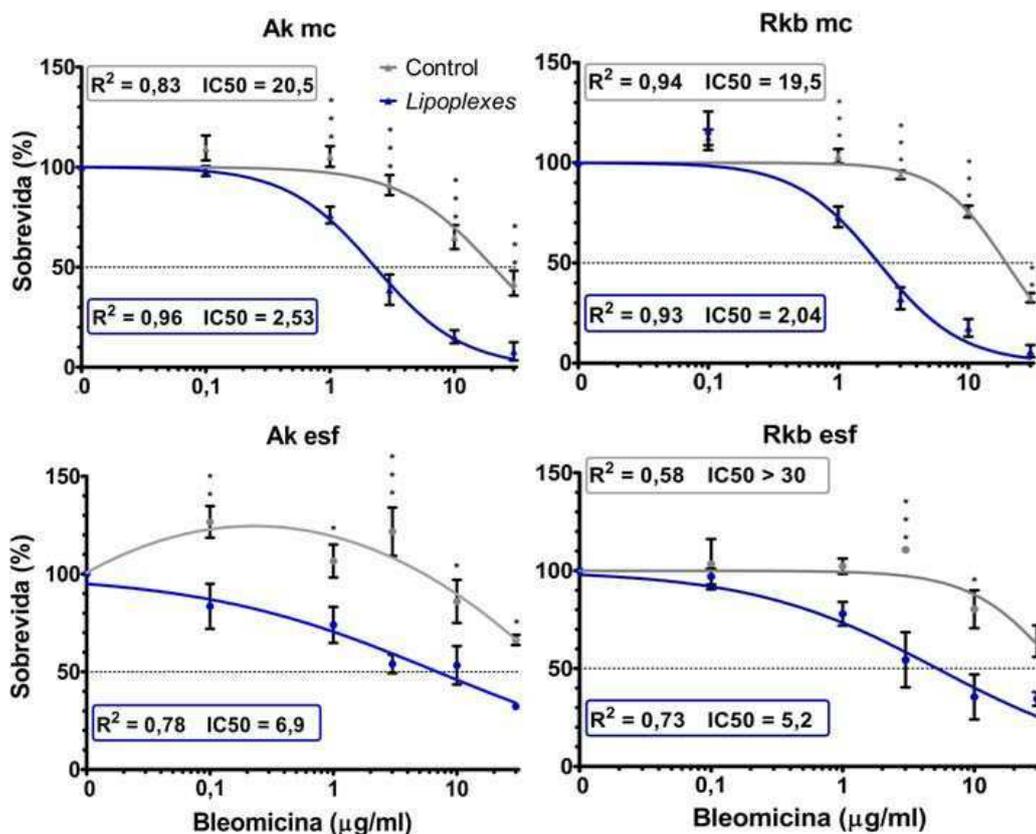


Figura 30: Curvas dosis-respuesta a la bleomicina en presencia o ausencia de *lipoplexes*. Las células se incubaron como se describe en materiales y métodos. $n = 3$. El análisis estadístico se realizó ajustando los datos de las curvas a una curva dosis-respuesta normalizada con pendiente de Hill variable. Las diferencias entre los porcentajes de supervivencia de las curvas se realizó con ANOVA de dos vías. (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$.

La sensibilidad a la bleomicina es dependiente de la concentración de lipoplexes

Como se expuso en la sección anterior, los *lipoplexes* están sensibilizando las células al efecto citotóxico de la bleomicina. Aunque ya se han descrito vectores que administren bleomicina al interior de la célula, como BleosomeTM y CG-HVJ-E (Lau KG *et al.* 2005 y Mima H *et al.* 2006, respectivamente) nuestro sistema es más práctico pues no necesita complejar los liposomas con la bleomicina sino simplemente agregar la bleomicina al mismo tiempo que los complejos lípidos/DNA. Dada la gran potencialidad de nuestro sistema *lipoplexes*/bleomicina decidimos estudiar que ocurre al co-incubar las células de Ak y Rkb con 3 µg/ml de bleomicina y diluciones de los *lipoplexes* usados previamente (0,1X; 0,2X; 0,5X; 0,75X y 1X). Como era previsible, la sensibilidad a la

bleomicina dependió de la cantidad de *lipoplexes* (**Fig. 31**). Ambas curvas correlacionaron con una curva dosis respuesta (Ak: $R^2 = 0,80$ y Rkb $R^2 = 0,74$) con concentraciones inhibitorias 50 (IC50) de 0,14X para Ak y 0,37X para Rkb. Como Rkb fue más sensible que Ak a la bleomicina era esperable que los porcentajes de sobrevida de Ak correlacionaran mejor que los de Rkb con las diluciones de los *lipoplexes*. Al comparar las IC50 se observó que Ak se sensibilizó a la bleomicina con menos cantidad de *lipoplexes* que Rkb. Estos resultados indicarían que en Ak el efecto de la bleomicina es más sensible a la presencia de *lipoplexes* que en Rkb.

La sensibilidad a la bleomicina es dependiente de la temperatura

Dado que la bleomicina es un péptido hidrofílico debido a su gran contenido de aminas (**Fig. 6**) el aumento observado en la citotoxicidad celular al co-incubarla con los *lipoplexes*, ya sean terapéuticos o no, podría deberse a que se ve favorecida la entrada de la bleomicina a la célula. Para determinar si la lipofección estaba favoreciendo su entrada se decidió estudiar el mecanismo de entrada de los *lipoplexes*. No fue posible estudiar directamente el ingreso de la bleomicina a la célula por carecer de bleomicina marcada con fluoróforo. El mecanismo de entrada de *lipoplexes* más estudiado es la endocitosis (Rejman J *et al.* 2004 y 2005 y Resina S *et al.* 2009). Por lo tanto, como primer paso se incubaron las células con las diluciones de *lipoplexes* a 8°C ya que permite separar entre la fusión lipídica de inter-membranas que puede ocurrir a bajas temperaturas y el ingreso dependiente de energía, como la endocitosis (Resina S *et al.* 2009). Los resultados se muestran en la **Fig. 31**. Los porcentajes de sobrevida a 8°C fueron siempre mayores a los encontrados a 37°C, volviéndose significativos a partir de 0,2X en Ak y a partir de 0,75X en Rkb. También se observó el grado de ajuste de los valores de sobrevida a 8°C a una curva dosis-respuesta. Consistentemente con la hipótesis de que los *lipoplexes* favorecen la entrada de bleomicina por un mecanismo dependiente de energía, se ve que el gráfico de Rkb no ajustó a una curva dosis-respuesta y, aunque los valores de sobrevida de Ak si ajustaron, el valor del coeficiente de determinación fue menor al calculado a 37°C (R^2 8°C = 0,48 vs. R^2 37°C = 0,8). Estos datos sugieren la intervención de un mecanismo de transporte activo para la incorporación de la droga al interior de las células durante la co-administración.

Es importante destacar que, aunque la eficiencia de expresión del gen de la β -galactosidasa disminuyó a medida que se diluyen los *lipoplexes*, el porcentaje de células que expresan el gen indicador no varió entre ambas temperaturas para todas las concentraciones de los *lipoplexes* (datos no mostrados). Por un lado, evidencia que la incubación a 8°C no modificó irreversiblemente el funcionamiento celular ya que las

células fueron capaces de expresar el gen indicador al volver a su temperatura fisiológica. Por otro lado, apoya los resultados de la **Fig. 28** donde se vio que la sensibilización a los efectos citotóxicos de bleomicina por parte de los *lipoplexes* es un fenómeno independiente de la actividad transcripcional. En un trabajo recientemente publicado por Marchini *et al.* (2011) se sugiere que la ruta de internalización independiente de temperatura cumple un rol importante en la eficiencia de transfección en *lipoplexes* compuestos por varios lípidos catiónicos. Más aún, encontraron que cuanto mayor es la eficiencia de expresión mayor es el aporte del mecanismo independiente de temperatura.

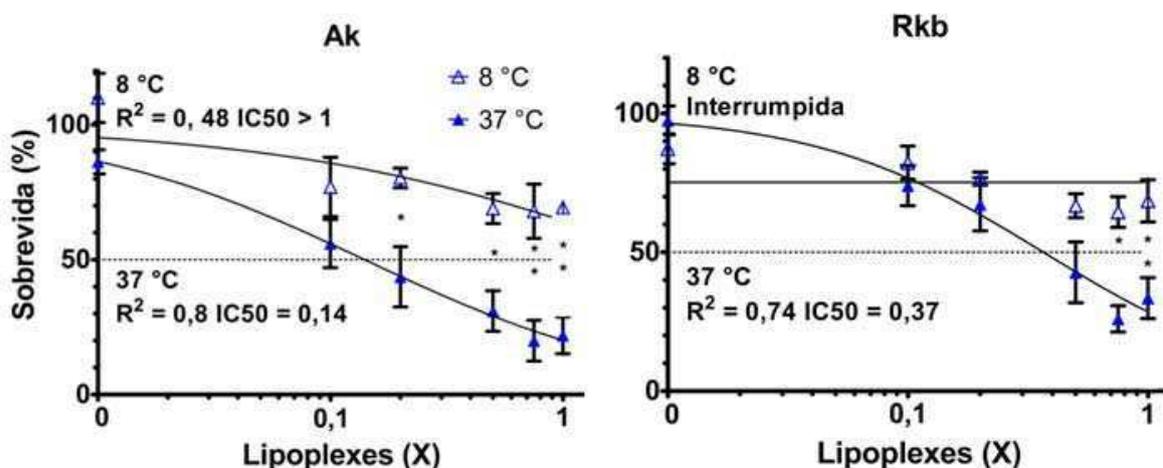


Figura 31: Curvas dosis-respuesta de diluciones de *lipoplexes* co-incubados con 3 µg/ml de bleomicina a 8°C o 37°C. Las células se incubaron como se indica en materiales y métodos. Los porcentajes de sobrevivencia se calcularon relativizando cada valor a su contraparte sin bleomicina. n = 4. El análisis estadístico se realizó ajustando los datos de las curvas a una curva dosis-respuesta normalizada con pendiente de Hill variable. Las diferencias entre los porcentajes de sobrevivencia de las curvas se realizó con ANOVA de dos vías. 8°C vs. 37°C: (**) p<0,01; (*) p<0,05.

La sensibilidad del sistema lipoplexes/bleomicina depende del potasio intracelular

Para comprender mejor que factores influyen en el efecto citotóxico del sistema *lipoplexes/bleomicina*, estudiamos el posible rol de la endocitosis en la sensibilidad a la bleomicina. No se usaron los inhibidores clásicos de endocitosis como la clorpromazina y la metil-β-ciclodextrina (Rejman J *et al.*, 2004) debido a sus acciones inespecíficas o a su mecanismo de acción, respectivamente. La clorpromazina se une a los receptores D2 de dopamina y a los receptores de histamina H1.

Ver: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=50006354&viewopt=PubChem>

Aunque la presencia de receptores dopaminérgicos en células de melanoma es un tema en controversia, se ha reportado que la dopamina, la L-dopa e inhibidores de la síntesis de L-dopa tienen efectos biológicos en células de melanoma murinas (Krummel TM *et al.* 1982). La histamina influye en la proliferación de células de melanoma humano, ya sea inhibiéndola o estimulándola, vía los receptores H1 y/o H2 (Darvas Z *et al.* 2003 y

Medina V *et al.* 2010). Por otro lado, metil- β -ciclodextrina inhibe la vía de endocitosis mediada por caveolina eliminando colesterol de la membrana celular (Rejman J *et al.*, 2004). Los lípidos catiónicos usados en este trabajo contienen derivados de colesterol por lo que no nos pareció adecuado utilizar dicha droga.

Dado que la formación de vacuolas rodeadas por clatrina depende del potasio intracelular (Larkin JM *et al.* 1983, Rejman J *et al.* 2004 y 2005), se incubaron las células en un medio sin potasio. Las células fueron incubadas con los *lipoplexes* con o sin bleomicina en presencia y ausencia de potasio durante distintos tiempos: 30, 60 y 90 min. En presencia de potasio ambas líneas fueron sensibles a los efectos citotóxicos de la bleomicina, Ak lo fue en los 3 tiempos evaluados mientras que Rkb a partir de los 60 min de co-incubación. En ausencia de potasio la co-incubación con bleomicina no disminuyó significativamente los porcentajes de sobrevivencia salvo en Ak luego de 90 min de co-incubación (**Fig. 32, símbolos (*)**). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la endocitosis mediada por clatrina cumple un rol importante en el efecto biológico del sistema *lipoplexes*/bleomicina.

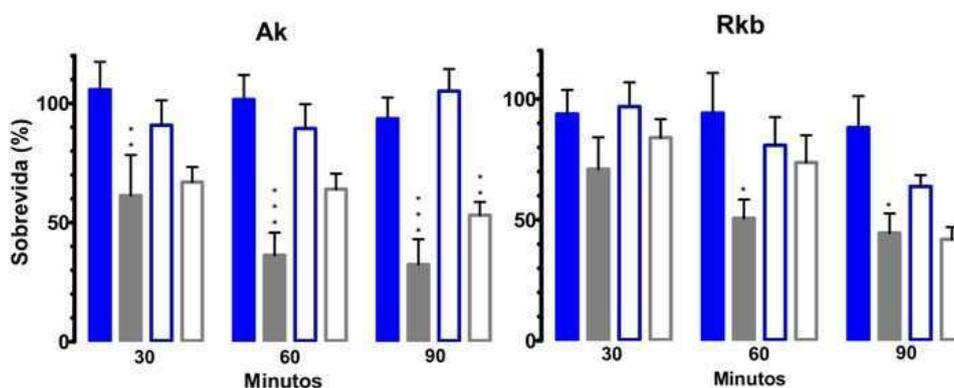


Figura 32: Efecto del potasio en la respuesta al sistema *lipoplexes*/bleomicina. Las células se incubaron como se indica en materiales y métodos. Los porcentajes de sobrevivencia corresponden a los cocientes de la abs de cada punto y la abs de las células incubadas solamente con el buffer con o sin potasio. n = 6. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de 2 vías. Sin bleomicina vs. 3µg/ml bleomicina: (***) p<0,001; (**) p<0,01. No se encontraron diferencias entre las co-incubaciones en presencia o ausencia de K⁺ sin el agregado de *lipoplexes*. ■+K⁺; ■+K⁺+3µg/ml bleomicina; □-K⁺ y □-K⁺+3µg/ml bleomicina.

El ingreso de los lipoplexes a la célula disminuye a bajas temperaturas

Para corroborar la hipótesis de que la incubación a bajas temperaturas disminuye la entrada de los *lipoplexes* a la célula se tiñó el DNA plasmídico con SYBR Green antes de agregar los lípidos catiónicos para poder observar las células bajo microscopio de epifluorescencia.

La tinción con SYBR Green es sensible a cambios en la cantidad de lipoplexes

Para evaluar si la tinción con SYBR Green logra una detección cuantitativa de lipoplexes se incubaron a las células con las diluciones de lipoplexes empleadas para realizar la curva dosis-respuesta de la **Fig. 31**. Consistente con los porcentajes de sobrevivencia de la **Fig. 31** se observó una disminución en la cantidad de puntos dentro de las células a medida que se diluyeron los lipoplexes, desapareciendo completamente en la dilución 0,1X. Esto indicó que la técnica desarrollada era capaz de detectar diferencias en las concentraciones de lipoplexes usadas en este estudio. Para comparar las distintas diluciones de lipoplexes se determinó el porcentaje de células que incorporaron lipoplexes a partir de la dilución 0,2X. El patrón de distribución fue distinto entre las 2 líneas celulares estudiadas (**Figs. 33-35**). Mientras que en Ak el porcentaje de células que incorporaron lipoplexes aumentó a medida que aumentó la concentración de los mismos, en Rkb la cantidad de células con lipoplexes aumentó al pasar de 0,2X a 0,5X pero se mantuvo constante a partir de dicha dilución (**Fig. 33**). La mayor sensibilidad a los cambios en la concentración de lipoplexes observada en Ak puede relacionarse con la menor IC50 calculada en Ak en la curva de lipoplexes (**Fig. 31**: Ak: IC50 = 0,14X y Rkb IC50 = 0,37X). A pesar de estas diferencias, en ambas líneas celulares se observó un fuerte aumento en la cantidad de células con puntillado a partir de la dilución 0,5X de lipoplexes (**Figs. 34 y 35: columnas 37°C**). Estos resultados se correlacionan con los valores de sobrevivencia de la **Fig. 31** donde el aumento más pronunciado en la sobrevivencia empieza a partir de la dilución 0,5X en ambas líneas.

Es interesante notar que no se observaron diferencias entre Ak y Rkb en el porcentaje de células con puntillado citoplasmático en la concentración estándar de lipoplexes 1X. Por lo tanto es muy probable que la mayor sensibilidad de Ak al sistema lipoplexes/bleomicina, que se evidencia por una menor IC50 y un mayor coeficiente de determinación en las curvas dosis-respuesta de los lipoplexes (**Fig. 31**), se deba a una mayor incorporación de los lipoplexes al núcleo en la línea celular Ak. Esto se evidencia por la gran expresión del gen indicador (**Fig. 25**: Ak (30 ± 4) % vs. Rkb: (5 ± 2) %), ya que se ha descrito al transporte nuclear como la barrera celular más fuerte para la expresión de DNA plasmídico (Khalil IA *et al.* 2006, Vaughan EE *et al.* 2006). También podría deberse a una falta de sensibilidad de la técnica elegida para detectar complejos de DNA/lípidos de pequeño tamaño.

La incubación a 8°C disminuye la cantidad de células que incorporan lipoplexes

Para determinar si la baja temperatura disminuye la incorporación de lipoplexes se incubaron a Ak y Rkb con las concentraciones de lipoplexes usadas previamente (0,2X;

0,5X; 0,75X y 1X) pero con los *lipoplexes* previamente teñidos con SYBR Green. La intensidad de fluorescencia fue siempre menor a 8°C, indicando una menor incorporación de los *lipoplexes* y del SYBR Green remanente a baja temperatura (**Figs. 34 y 35: columnas 8°C vs. 37°C**). Para poder cuantificar el efecto de la temperatura se determinó el porcentaje de células que incorporaron *lipoplexes* en cada situación. Los resultados se muestran en la **Fig. 33, columnas vacías**. Al incubar las células con la concentración estándar de *lipoplexes* (1X) no se observaron diferencias entre los porcentajes de células con puntillado citoplasmático entre ambas temperaturas en ninguna de las 2 líneas celulares indicando que el porcentaje de *lipoplexes* que entró por un mecanismo de transporte pasivo es elevado. Es posible que se deba a un proceso de difusión pasiva por atracción electrostática entre las cargas positivas de los lípidos catiónicos y a la carga neta negativa de la membrana plasmática. Esto también podría explicar el porqué se observa el mismo porcentaje de células con *lipoplexes* para una dilución de 0,2X en la línea celular Ak. A medida que se diluyeron los *lipoplexes* (a partir de la dilución 1X) empezaron a aparecer diferencias entre ambas temperaturas sugiriendo que cuando hay menos *lipoplexes* disponibles se favoreció un mecanismo de transporte activo. Estos resultados indicarían que el mecanismo más poderoso de entrada de *lipoplexes* al interior de las células es el dependiente de energía, ya que prevalece al diluir los *lipoplexes*.

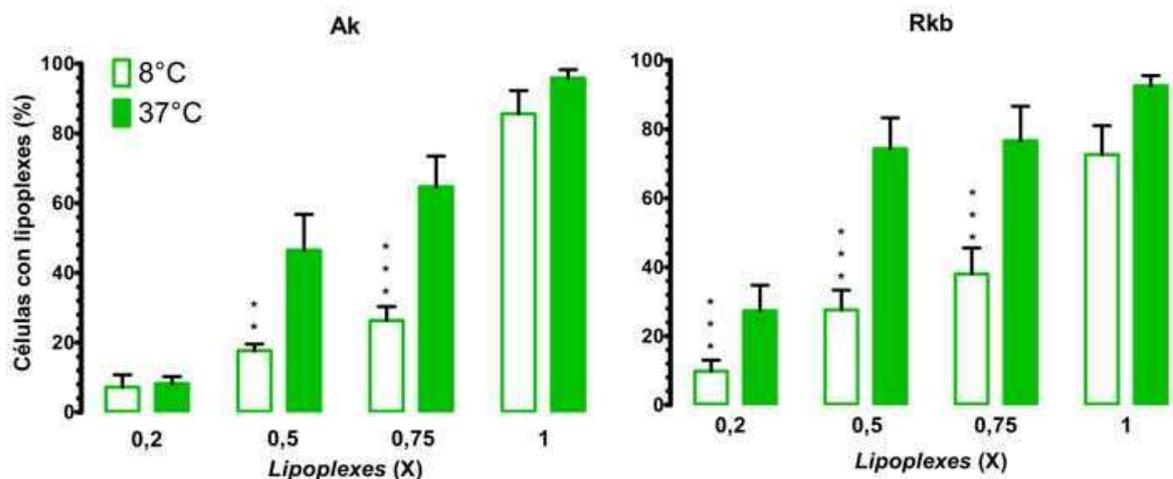


Figura 33: Efecto de la temperatura en la incorporación de *lipoplexes*. Las células se incubaron como se describe en materiales y métodos. Se sacaron 3 fotografías por condición de cada experimento (n = 3) y de ellas se calcularon los porcentajes de células que incorporaron *lipoplexes* con respecto al número de células totales. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de dos vías. 8°C vs. 37°C: (***) p < 0,001 y (**) p < 0,01.

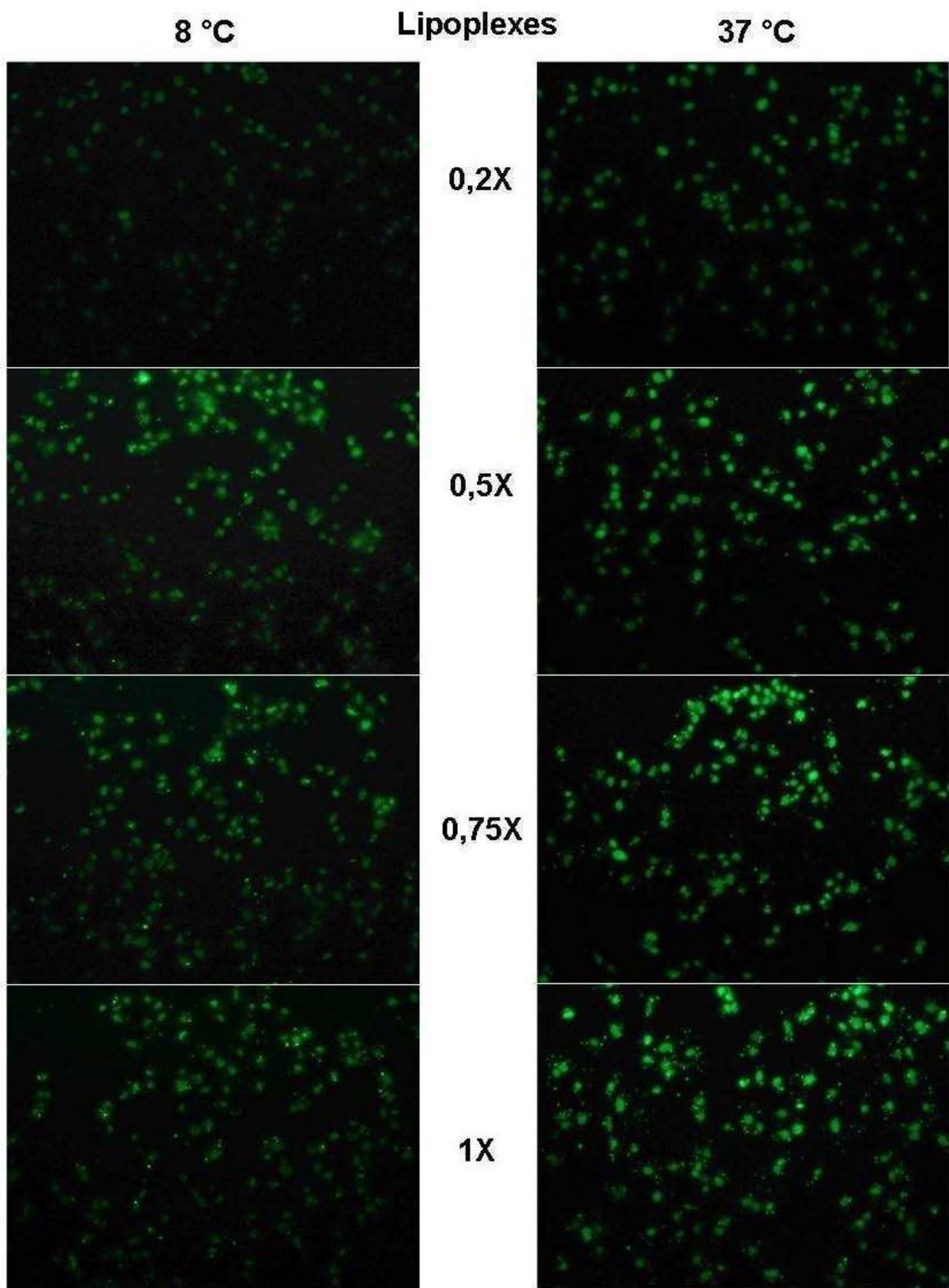


Figura 34: Fotografías de monocapas de Ak incubadas con las diluciones de los lipoplexes teñidos con SYBR Green. El ensayo se realizó como se indica en materiales y métodos. Las fotos se sacaron con aumento de 200X.

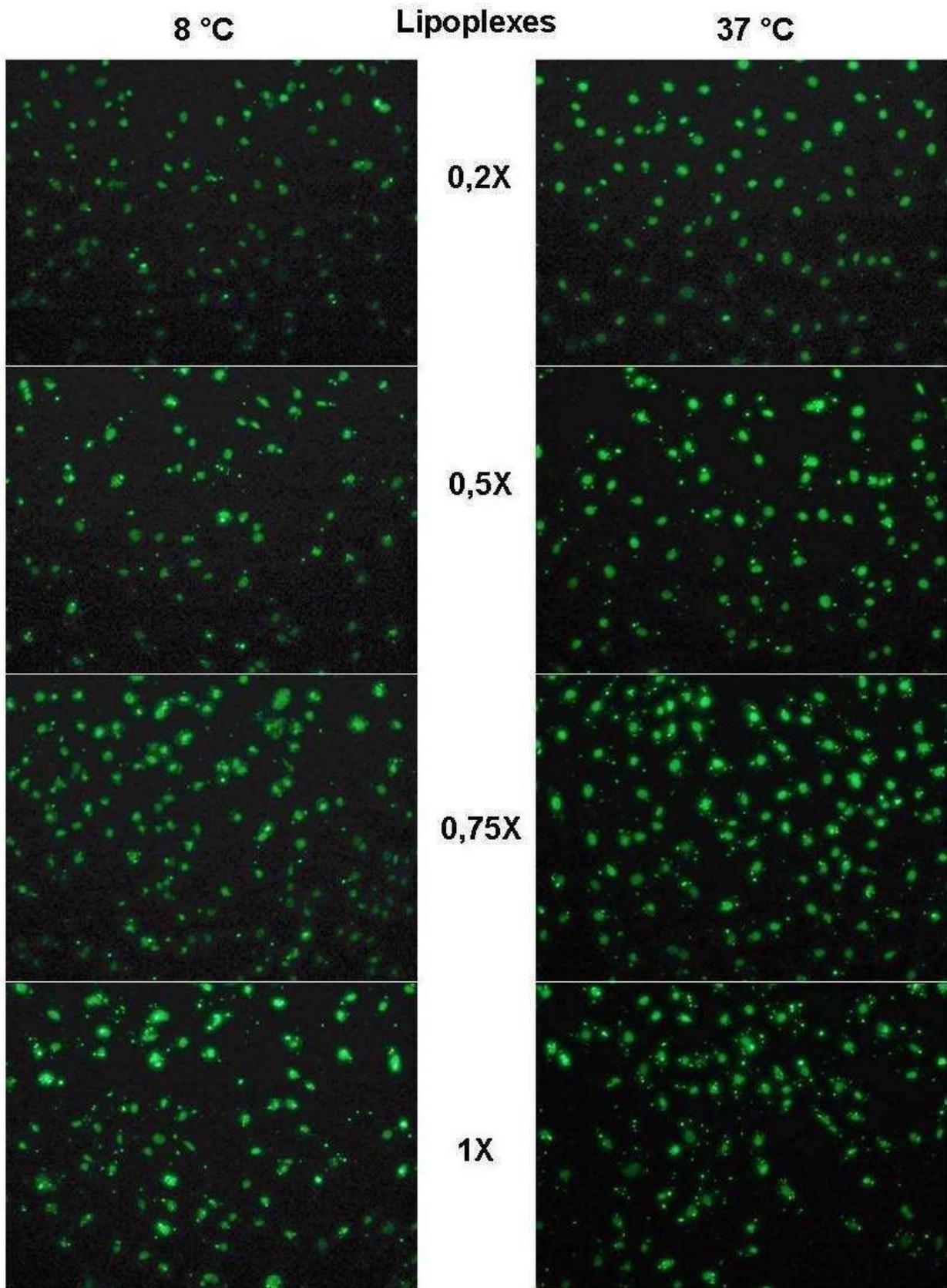


Figura 35: Fotografías de monocapas de Rkb incubadas con las diluciones de los lipoplexes teñidos con SYBR Green. El ensayo se realizó como se indica en materiales y métodos. Las fotos se sacaron con aumento de 200X.

En busca de nuevas terapias en nuevos modelos experimentales

Como se discutió en la Introducción, la falta de terapias que mejoren la calidad de vida de los enfermos de cáncer pone en cuestionamiento los modelos utilizados para la investigación y desarrollo de nuevas terapias. En la presente tesis se evaluaron los efectos de la transferencia génica no viral del sistema gen suicida HSV tk /GCV y del interferón-beta canino en monocapas y esferoides de líneas celulares derivadas de melanoma espontáneo canino. La comparación de ambos modelos celulares evidenció la existencia del fenómeno conocido como resistencia multicelular en los esferoides. Más aún, la correlación de la respuesta al sistema gen suicida de los esferoides con la respuesta al mismo tratamiento de nuestros pacientes caninos demostró el comportamiento predictivo del modelo de los esferoides multicelulares (**Fig. 19**). La capacidad predictiva del modelo de esferoides multicelulares y la presencia de resistencia multicelular reflejan las similitudes de los esferoides con los tumores *in vivo* y por tanto pone en evidencia la importancia de la implementación del modelo en el rastreo de drogas antineoplásicas.

El alto número de esferoides sensibles a alguno de los 2 genes (12 de 15) y la compatibilidad de la co-transferencia del sistema gen suicida y del gen cIFN β demostró la gran potencialidad del tratamiento combinado para tratar el melanoma espontáneo canino (**Fig. 17, Fig. 22, Fig. 23**). Estos resultados llevaron a la implementación de ambos genes terapéuticos en el protocolo clínico veterinario que se desarrolla en la Unidad de Transferencia Génica.

Una particularidad de este estudio es que se trabajó con líneas celulares establecidas en el laboratorio en vez de líneas celulares de origen comercial (**Tabla 3**). Dado que el cáncer, como cualquier enfermedad, es un proceso biológico también es un proceso dinámico, va cambiando con el tiempo. Desde este punto de vista evolutivo, al trabajar con líneas celulares que han sido establecidas hace muchos años se podría estar estudiando con células que han sido sometidas a procesos de selección distintos de los actuales y por tanto podrían tener características distintas de las células tumorales actuales. Esta práctica podría traer más errores al campo de investigación y desarrollo de nuevas terapias antineoplásicas y por tanto debería ser evitada siempre que fuese posible.

Un descubrimiento colateral e interesante fue la aparente dependencia del fenotipo de resistencia multicelular (MCR) al número de células con el que se forman los esferoides (**Fig. 17, Fig. 22, Fig. 23, Tabla 6**). En algunos casos, los esferoides “pequeños o únicos” perdieron el fenotipo de MCR presente en los esferoides “grandes o múltiples” (Bk y Rkb transfectados con HSV tk más el agregado de GCV y Rkb transfectado con cIFN β). En

esferoides y tumores pequeños, el efecto *bystander* producido por el sistema del gen suicida o por la expresión transitoria del gen *cIFN-β* lograría destruir un alto porcentaje de células tumorales (Culver KW *et al.* 1992 y Villaverde MS *et al.* 2012). En cambio, en esferoides y tumores grandes, este efecto, aunque destruya un gran número de células de zonas proliferativas y aledañas, no alcanzaría para eliminar un número suficiente de células de la capa quiescente como para evitar que estas vuelvan a proliferar y a repoblar la zona destruida por el tratamiento. Este hallazgo abre puertas para investigar cuál es el mayor número de células que contrarresta el fenotipo MCR. Estos resultados podrían ayudar a identificar tamaños tumorales sensibles de resistentes y así mejorar la terapéutica.

La gran heterogeneidad observada entre las 15 líneas celulares en lo que respecta a la morfología de sus monocapas y esferoides, marcación inmunocitoquímica y respuesta a los tratamientos génicos refleja la dificultad de encontrar una terapia única para tratar al melanoma canino. A medida que la enfermedad avanza las células somáticas se van desdiferenciando (pérdida de marcadores celulares) debido a la gran plasticidad de las células tumorales. Esta plasticidad hace que en muchos casos existan células resistentes a los tratamientos. En búsqueda de una terapia más potente se estudió la sensibilidad al tratamiento combinado de bleomicina y terapia génica. Los resultados demostraron que la incorporación de bleomicina al diseño experimental (la transferencia génica de gen suicida o *cIFNβ*) aumentó la citotoxicidad de la transferencia génica en aquellos casos donde la transferencia génica había logrado matar no más del 50% de las células (**Fig. 26**). Más aún, vimos que los *lipoplexes* sensibilizan a las células tumorales al efecto de la bleomicina favoreciendo su incorporación al interior de las células. Es la primera vez que se reporta esta ventaja o “bonus track” de la terapia génica no viral y por lo tanto podría constituir una nueva formulación farmacológica en donde los *lipoplexes* mejoran la acción de un antineoplásico favoreciendo su entrada al interior de la célula.

La novedosa estrategia terapéutica desarrollada basa su acción en características generales de las células tumorales. La acción del sistema gen suicida se basa en la duplicación celular (Oldfield EH *et al.* 1993), el efecto citotóxico de la transferencia génica del interferón beta ha sido reportado en líneas celulares de varios orígenes tumorales (Villaverde MS *et al.* 2012) y la bleomicina actúa como endonucleasa, clivando la doble cadena de DNA (Jingyang C & Stubbe J 2005, Mir LM *et al.* 1996). Dado que el melanoma canino es un modelo que se asemeja a uno de los cánceres más agresivos en humanos, el melanoma de cabeza y cuello, es muy posible que la nueva estrategia terapéutica, el sistema *lipoplexes*/bleomicina, resulte citotóxica en otro tipo de tumores. Por lo tanto, sería interesante probar la nueva formulación farmacológica en esferoides multicelulares derivados de otro tipo de tumores.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones del presente trabajo son:

- Las líneas derivadas de melanoma mucoso espontáneo canino presentan una gran heterogeneidad que se ve reflejada: (i) en la morfología de sus esferoides (**Fig. 15**), (ii) en la presencia/ausencia de marcadores inmuno-citoquímicos (**Tabla 3**) y (iii) en la variada respuesta a la transferencia no viral del sistema gen suicida HSV tk /GCV y del gen cFN- β de sus monocapas y esferoides (**Figs. 16-17 y 22, respectivamente**).
- Los cultivos de esferoides reflejan mejor que los cultivos en monocapa el comportamiento de las células tumorales a la transferencia no viral del sistema gen suicida HSV tk /GCV *in vivo* (**Fig. 19**).
- El fenotipo de resistencia multicelular (MCR) depende del número de células que componen el esferoide (**Figs. 17, 22-23**) y sería causado por una rápida repoblación de la zona necrosada por el pasaje de las células tumorales quiescentes (resistentes al tratamiento) a la fracción proliferativa (**Figs. 18, 20-21**).
- La eficacia de la transferencia no viral del gen cFN- β *in vitro*, revela el potencial de la estrategia para el tratamiento del melanoma mucoso espontáneo canino *in vivo* (**Fig. 22**).
- La co-lipofección de los genes terapéuticos HSV tk /GCV y cFN- β constituiría una estrategia terapéutica altamente efectiva para el tratamiento de tumores espontáneos caninos *in vivo* (**Figs. 23-24**).
- El efecto citotóxico del sistema *lipoplexes*/bleomicina es independiente de la actividad transcripcional del plásmido (**Figs. 28-29**), dependiente de la temperatura y de la cantidad de *lipoplexes* (**Fig. 31**).
- La incorporación de *lipoplexes* al interior dependería tanto de mecanismos de transporte pasivo como la fusión lipídica de membranas o activo dependiente de energía mientras que la incorporación de bleomicina dependería principalmente del transporte activo (**Figs. 31, 33-35**).
- Siendo el sistema *lipoplexes*/bleomicina muy efectivo para el melanoma mucoso espontáneo canino *in vitro* (**Fig. 26-30**), el agente quimioterapéutico constituiría un valioso adyuvante de la terapia génica para el control local del crecimiento tumoral *in vivo*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas AK *et al.*. "Inmunología celular y molecular". 5ta Ed. en español. 260-62. (2004).
2. Altamirano NA, Karara AL, Villaverde MS, Fiszman GL, Glikin GC & Finocchiaro LME. "Spontaneous canine melanoma derived spheroids display individual multicellular resistance patterns to suicide gene and chemotherapy". In Cancer Drug Resistance Research Perspectives, L.S. Torres (Ed.). Nova Science Publishers, Inc. (New York, U.S.A.), pp. 119-137. ISBN: 1-60021-572-6. (2007).
3. Araujo RP & McElwain DLS. "History of the Study of Solid Tumour Growth: The Contribution of Mathematical Modelling". *Bulletin of Mathematical Biology*. **66**: 1039–91. (2004). PMID: 15294418.
4. Bates RC, Edwards NS & Yates JD. "Spheroids and cell survival". *Critical Rev. Oncol Hematol*. **36**: 61-74. (2000). PMID: 11033297.
5. Bergman PJ, McKnight J, Novosad A, Charney S, Farrelly J, Craft D, Wulderk M, Jeffers Y, Sadelain M, Hohenhaus AE, Segal N, Gregor P, Engelhorn M, Riviere I, Houghton AN & Wolchok JD. "Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I trial." *Clin. Cancer Res*. **9**: 1284:90. (2003). PMID: 12684396.
6. Bradford MM. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Anal Biochem*. **72**: 248-54. (1976). PMID: 942051.
7. Breton M & Mir LM. "Microsecond and Nanosecond Electric Pulses in Cancer Treatments" *Bioelectromagnetics*. Epub ahead of print (2011). PMID: 21812011.
8. Brown JM & Giaccia AJ. "The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy". *Cancer Res*. **58**: 1408-16. (1998). PMID: 9537241.
9. Casais CC, Karara AL, Glikin GC & Finocchiaro LME. "Effects of Spatial Configuration on Tumor Cells Transgene Expression". *Gene Ther. Mol. Biol*. **10** (2006). PMID: 15107812.

10. Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH & Blaese RM. "In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors". *Science*. **256**: 1550-52. (1992). PMID: 1317968.
11. Dangles V, Lazar V, Validire P, Richon S, Wertheimer M, Laville V, Janneau JL, Barrois M, Bovin C, Poynard T, Vallancien G & Bellet D. "Gene expression profiles of bladder cancers: evidence for a striking effect of in vitro cell models on gene patterns". *Br J Cancer*. **86**: 1283-89. (2002). PMID: 11953886.
12. Darvas Z, Sakurai E, Schwelberger HG, Hegyesi H, Rivera E, Ohtsu H, Watanabe T, Pállinger E & Falus A. "Autonomous histamine metabolism in human melanoma cells". *Melanoma Res*. **13**: 239-46. (2003). PMID: 12777977.
13. Desoize B & Jardillier JC. "Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance?" *Crit Rev Oncol Hematol*. **36**: 193-207. (2000). PMID: 11033306.
14. Dow SW, Elmslie RE, Willson AP, Roche L, Gorman C & Potter TA. "In Vivo tumor transfection with superantigen plus cytokine genes induces tumor regression and prolongs survival in dogs with malignant melanoma." *J. Clin. Invest.* **101**: 2406-14. (1998). PMID: 9616212.
15. Felgner PL & Ringold GM. "Cationic liposome-mediated transfection". *Nature*. **337**: 387-388. (1989). PMID: 2463491.
16. Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M & Felgner PL. "Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations". *J Biol Chem* **269**: 2550-61. (1994). PMID: 8300583.
17. Finocchiaro LME, Bumashny VF, Karara AL, Fiszman GL, Casais CC & Glikin GC. "Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in multicellular tumor spheroids". *Cancer Gene Ther* **11**: 333-45. (2004). PMID: 15107812.
18. Finocchiaro LME, Fiszman GL, Karara AL & Glikin GC. "Suicide gene and cytokines combined non viral gene therapy for canine spontaneous melanoma". *Cancer Gene Ther*. **15**: 165-72. (2008). PMID: 18219342.
19. Finocchiaro LME & Glikin GC. "Cytokine-enhanced vaccine and suicide gene therapy as surgery adjuvant treatments for spontaneous canine melanoma". *Gene Ther*. **15**: 267-76. (2008). PMID: 18033308.

20. Finocchiaro LME, Villaverde MS, Gil-Cardeza ML, Riveros MD & Glikin GC. "Cytokine-enhanced vaccine and interferon- β plus suicide gene as combined therapy for spontaneous canine sarcomas". *Res. Vet. Sci.* **91**: 230-4. (2011). PMID: 21300385.
21. Finocchiaro LME, Spector A, Rossi UA, Gil-Cardeza ML, Suárez JL, Riveros MD, Villaverde MS & Glikin GC. "The Potential of Suicide plus Immune Gene Therapy for Treating Osteosarcoma: the Experience on Canine Veterinary Patients". *Sarcoma: Symptoms, Causes and Treatments*. E.J. Butler (Ed.). Nova Science Publishers, Inc. (New York, U.S.A.) ISBN: 978-1-62100-362-5. In press. (2012).
22. Freeman SM, Whartenby KA, Freeman JL, Abboud CN, Marrogi AJ. "In situ use of suicide genes for cancer therapy". *Semin Oncol.* **23**: 31-45. (1999). PMID: 8607030.
23. Freshney in Animal cell culture - A practical approach. IRL Press Limited (De.), Oxford. (1986).
24. Friedrich J, Eder W, Castaneda J, Doss M, Huber E, Ebner R & Kunz-Schughart LA. "A reliable tool to determine cell viability in complex 3-D culture: The Acid Phosphatase Assay". *J Biomol Screen.* **12**: 925-37. (2007). PMID: 17942785. Erratum in: *J Biomol Screen.* **12**:1115-9. (2007).
25. Friedrich J, Seidel C, Ebner R & Kunz-Schughart LA. "Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach". *Nat. protoc.* **4**: 309-24. (2009). PMID: 19214182.
26. Fujimura T, Okuyama R, Ohtani T, Ito Y, Haga T, Hashimoto A & Aiba S. "Perilesional treatment of metastatic melanoma with interferon- β ". *Clin. and Experim. Derm.* **34**: 793-99. (2009). PMID: 19438554.
27. Gao X & Huang L. "Cationic liposome-mediated gene transfer". *Gene Ther* **2**:710-22. (1995). PMID: 8750010.
28. Gil-Cardeza ML, Villaverde MS, Fiszman GL, Altamirano NA, Cwirenbaum RA, Glikin GC & Finocchiaro LM. "Suicide gene therapy on spontaneous canine melanoma: correlations between *in vivo* tumors and their derived multicell spheroids *in vitro*". *Gene Ther.* **17**: 26-36. (2010). PMID: 19741734.
29. Hamilton G. "Multicellular spheroids as *in vitro* tumor model". *Cancer Lett.* **131**:29-34 (1998). PMID: 9839617.
30. Hendrix MJ, Seftor EA, Chu YW, Seftor RE, Nagle RB, McDaniel KM, Leong SP, Yohem KH, Leibovitz AM, Meyskens FL Jr, *et al.* "Coexpression of vimentin and

- keratins by human melanoma tumor cells: correlation with invasive and metastatic potential". *J Natl Cancer Inst.* **84**: 165-74. (1992). PMID: 1371813.
31. Jingyang C & Stubbe J. "Bleomycins: towards better therapeutics". *Nature Rev Can.* **5**: 102-12. (2005). PMID: 15685195.
32. Khalil IA, Kogure K, Akita H & Harashima H. "Uptake Pathways and Subsequent Intracellular Trafficking in Nonviral Gene Delivery." *Pharmacol Rev* **58**:32–45. (2006). PMID: 16507881.
33. Kirkness EF, Bafna V, Halpern AL, Levy S, Remington K, Rusch DB, Delcher AL, Pop M, Wang W, Fraser CM, Venter JC. "The Dog Genome: Survey Sequencing and Comparative Analysis." *Science.* **301**: 1898-1903. (2003). PMID: 14512627.
34. Kirkwood JM *et al.* "High- and low dose interferon alfa-2b in high-risk melanoma: first analysis of intergroup trial E1690/S9111/C9190". *J Clin Oncol.* **18**: 2444-58. (2000). PMID: 10856105.
35. Krummel TM *et al.* "Effects of dopamine agonists and antagonists on murine melanoma: correlation with dopamine binding activity". *Cancer.* **49**: 1178-84. (1982). PMID: 7059943.
36. Larkin JM, Brown MS, Goldstein JL & Anderson RG. "Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts". *Cell.* **33(1)**: 273-85. (1983). PMID: 6147196.
37. Lau KG, Hattori Y, Chopra S, O'Toole EA, Storey A, Nagai T & Maitani Y. "Ultra-deformable liposomes containing bleomycin: *in vitro* stability and toxicity on human cutaneous keratinocyte cell lines". *Int J Pharm.* **300(1-2)**: 4-12. (2005). PMID: 15946810.
38. Marchini C, Pozzi D, Montani M, Alfonsi C, Amici A, Candeloro De Sanctis S, Digman MA, Sanchez S, Gratton E, Amenitsch H, Fabbretti A, Gualerzi CO & Caracciolo G. "Role of temperature-independent lipoplex–cell membrane interactions in the efficiency boost of multicomponent *lipoplexes*". *Can. Gene Ther.* **18**: 543-552. (2011). PMID: 21394110.
39. MacEwen EG, Patnaik AK, Harvey HJ, Hayes AA & Matus R. "Canine oral melanoma: comparison of surgery *versus* surgery plus *corynebacterium parvum*". *Cancer Invest.* **4**: 397-402. (1986). PMID: 3801954.

40. MacGregor GR & Caskey T. "Construction of plasmids that express E coli β -galactosidase in mammalian cells". *Nucleic Acids Res* **17**: 2365-65. (1989). PMID: 2495524.
41. Martin LA & Lemoine NR. "Direct cell killing by suicide genes". *Cancer Metastasis Rev.* **15**: 301-316. (1996). PMID: 9034593.
42. Medina V & Riviera ES. "Histamine receptors and cancer pharmacology". *Br J Pharmacol.* **161(4)**: 755-67. (2010). PMID: 20636392.
43. Mima H, Yamamoto S, Ito M, Tomoshige R, Tabata Y, Tamai K, Kaneda Y. "Targeted chemotherapy against intraperitoneally disseminated colon carcinoma using a cationized gelatin-conjugated HVJ envelope vector". *Mol Cancer Ther.* **5**: 1021-8 (2006). PMID: 16648574.
44. Mir LM, Tounekti O & Orłowski S. "Bleomycin: Revival of an Old Drug". *Gen. Pharmac.* **27**: 745-48. (1996). PMID: 8842674.
45. Mueller-Klieser W. "Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications". *Am J Physiol.* **273**: C1109-23. (1997). PMID: 9357753.
46. Oldfield EH, Ram Z, Culver KW, Blaese RM, DeVroom HL & Anderson WF. "Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir". *Hum Gene Ther.* **4**:39-69. (1993). PMID: 8384892.
47. Orłowski S, Belehradek Jr J, Paoletti C & Mir LM. "Transient Electroporation of cells in culture. Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs." *Biochem. Pharmacol.* **37(24)**: 4727-33. (1988). PMID: 2462423.
48. Poddevin B, Orłowski S, Belehradek Jr J & Mir LM. "Very high cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture." *Biochem. Pharmacol.* **42**: S62-75. (1991). PMID: 1722669.
49. Porrello A, Cardelli P & Spugnini EP. "Oncology of companion animals as a model for humans. An overview of tumor histotypes". *J Exp Clin Cancer Res.* **25 (1)**: 97-105. (2006). PMID: 16761625.
50. Pron G, Mahrouf N, Orłowski S, Tounekti O, Poddevin B, Belehradek J Jr & Mir LM. "Internalization of the bleomycin molecules responsible for bleomycin: A receptor – mediated endocytosis mechanism". *Biochemical Phar.* **75**: 46-56. (1999). PMID: 9920284.

51. Ramesh R, Marrogi AJ, Munshi A, Abboud CN & Freeman SM. "In vivo analysis of the "bystander effect": a cytokine cascade". *Exp Hematol.* **24**: 829-38. (1996). PMID: 8647234.
52. Ramos-Vara JA, Beissenherz ME, Miller MA, Johnson GC, Pace LW, Fard A & Kottler SJ. "Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases". *Vet Pathol.* **37**: 597-608. (2000). PMID: 11105949.
53. Rätty JK, Pikkarainen JT, Wirth T & Ylä-Herttuala S. "Gene Therapy: The first approved gene-based medicines, molecular mechanisms and clinical indications". *Current Mol. Pharm.* **1**: 13-23. (2008). PMID: 20021420.
54. Rejman J, Bragonzi A & Conese M. "Role of clathrin- and caveolea-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes". *Mol. Ther.* **12(3)**: 468-74. (2005). PMID: 15963763.
55. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS & Hoekstra D. "Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis". *Biochem. J.* **377**: 159–69. (2004). PMID: 14505488.
56. Resina S, Prevot P & Thierry AR. "Physico-Chemical Characteristics of *Lipoplexes* Influence Cell Uptake Mechanisms and Transfection Efficacy". *PLoS One.* **4(6)**: e6058. (2009). PMID: 19557145.
57. Santini MT & Rainaldi G. "Three-dimensional spheroid model in tumor biology". *Pathobiology* **67**: 148-57. (1999). PMID: 10394136.
58. Schmidt P, Kopecky C, Hombach A, Zigrino P, Mauch C & Abken H. "Eradication of melanomas by targeted elimination of a minor subset of tumor cells". *PNAS.* **108**: 2474-9. (2011). PMID: 21282657.
59. Slaton JW, Perrotte P, Inoue K, Dinney CP & Fidler IJ. "Interferon-alpha-mediated down-regulation of angiogenesis related genes and therapy of bladder cancer are dependent on optimization of biological dose and schedule". *Clin. Cancer Res.* **5**: 2726–34. (1999). PMID: 10537335.
60. Somasundaram R, Villanueva J & Herlyn M. "Will Engineered T Cells Expressing CD20 scFv Eradicate Melanoma?" *Mol. Ther.* **19**: 638:40. (2011). PMID: 21455210.

61. Spangler WL & Kass PH. "The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia". *Vet Pathol.* **43**: 136-49. (2006). PMID: 16537931.
62. Spugnini EP, Dragonetti E, Vincenzi B, Onori N, Citro G & Baldi A. "Pulse-mediated chemotherapy enhances local control and survival in a spontaneous canine model of primary mucosal melanoma". *Melanoma Res.***16**:23-7. (2006). PMID: 16432452.
63. Sutherland RM. "Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model". *Science* 1998; **240**: 177-84. PMID: 2451290.
64. Tounekti O, Pron G, Belehradek J Jr & Mir LM. "Bleomycin, an apoptosis-mimetic drug that induces two types of cell death depending on the number of molecules internalized". *Can. Res.* **53**: 5462-69. (1993). PMID: 7693342.
65. Vail DM & MacEwen EG. "Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer". *Cancer Invest.* **18(8)**: 78 1-92 (2000). PMID: 11107448.
66. Vaughan EE, DeGiulio JV & Dean DA. "Intracellular trafficking of plasmids for gene therapy: Mechanisms of cytoplasmic movement and nuclear import". *Curr Gene Therapy.* **6**: 671-81. (2006). PMID: 17168698.
67. Villaverde MS, Gil-Cardesa ML, Glikin GC & Finocchiaro LME. "Mechanisms involved in cell death and bystander effect induced by cationic lipid mediated interferon- β gene transfer to human tumor cells". Enviado.
68. Weiswald LB, Guinebretière JM, Richon S, Bellet D, Saubaméa B & Dangles-Marie V. "In situ protein expression in tumour spheres: development of an immunostaining protocol for confocal microscopy". *BMC Cancer.* **10**: 106 (2010). PMID: 20307308.
69. Zuhorn IS & Hoekstra D. "On the mechanism of cationic amphiphile-mediated transfection. To fuse or not to fuse: Is that the question?". *J. Membrane Biol.* **189**: 167-79. (2002). PMID: 12395282.