

Programa de Doctorat de Biomedicina
Facultat de Biologia
Bienni 2001-2003

Modulació de la sensibilitat a la gemcitabina mitjançant estratègies de teràpia gènica en càncer de pàncreas humà.

Memòria presentada per
Sandra Pérez Torras

Per optar al grau de
Doctor

Tesi doctoral sota la direcció de la **Dra. Adela Mazo Sánchez**
al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona

La directora

L'autora

Adela Mazo

Sandra Pérez

Barcelona, Maig 2007

**La ciència sempre s'equivoca.
Mai resol un problema sense crear-ne 10 de nous.**

George Bernard Shaw

Tot i el que pugui semblar, aquesta part de la tesi no és ni molt menys la més fàcil d'escriure. En primer lloc començaré per una frase genèrica com a prevenció ja que, tot i que espero no oblidar-me de ningú, aquest no és un dels millors moments pel meu esgotat caparró.

Moltes gràcies a tots (i sou molts) els que m'heu ajudat a arribar fins aquí.

Si començo per ordre cronològic la primera persona a la que li haig de donar les gràcies és a la responsable de que jo comencés aquesta tesi, l'Adela. Gràcies per donar-me aquesta oportunitat, però sobretot per haver esdevingut molt més que una "jefa" i demostrar-me dia a dia la teva qualitat humana. La segona persona que vaig conèixer al laboratori fou el Manel, el Papà Manel. Sempre recordaré el meu primer dia al laboratori, tot i que de fet quasi no hi vaig ser, ja que tan bon punt vaig entrar per la porta el Manel m'estava esperant per anar corrents a Farmàcia, els que el coneixeu ja sabeu que ell sempre corre. El Manel fou el meu primer mestre, un bon mestre, i tot i que ja fa molts anys que va deixar el laboratori, encara continuo col·laborant i aprenent amb ell. D'aquella època, no puc, ni vull, oblidar a la Sarah amb qui vaig passar molts bons moments dins i fora del laboratori. En aquells moments aparegué pel laboratori la Valerie, la meva nena francesa, amb qui vam compartir riures, balls,... i no fa gaire amb va sorprendre amb una agradable visita sorpresa. Amb el Quim també vam passar bons moments sobretot amb les nostres competicions de Pinball durant el meu primer agost al laboratori en el que vaig aprendre que a l'agost els experiments no surten. El Xema que amb la incorporació de la meva generació va deixar de ser el petit. La Sam que va entrar al mateix temps que jo. Tampoc em puc oblidar de la gent que em vaig trobar en aquells moments al departament, el Mario, la Sandra Arias, les cançons de l'Emili... Al cap d'un temps s'incorporà al grup la Neus amb qui vaig compartir bons moments. La veritat és que des d'aquells inicis ja ha passat bastant temps i sobretot uns quants companys, però sobretot companyes de laboratori. No puc deixar de fer un esment especial a l'omnipresent Carmen, a l'Anna i a la Nerea que es van incorporar al mateix temps que la Rita i la Laura i van inaugurar l'època de les nenes de TEC, ja que des d'aleshores al laboratori només som nenes tot i els esforços de l'Adela per evitar-ho. La Rita i la Laura ja no hi són, però la Nita amb la seva alegria i la Tonguen amb el seu humor especial i tolerància a la invasió de poiata han resistit i s'han convertit en les petites "vetes". Tampoc em puc oblidar de l'Ani que va estar uns mesos al laboratori. Finalment, les noves incorporacions, la Glòria i la Thira que junt amb la Nita i la Tonguen i sobretot el senyor gall, s'han encarregat d'ajudar-me a resistir aquests últims mesos. Moltes gràcies per fer-me riure i riure'm les gràcies.

Fins al moment només he parlat de la gent meu laboratori, però la veritat és que aquesta ha estat una tesi de col·laboracions, de grans col·laboracions. I en aquest sentit, el laboratori del Marçal s'ha convertit en la meva segona llar.

Gràcies per acollir-me tan bé al laboratori, però sobretot a totes les activitats de lleure externes je, je. Ja fa uns anys, quan el grup encara residia a Químiques el Jose em va introduir al món dels transportadors amb les seves exhaustives explicacions i teories. La majoria de gent d'aquella època ja no hi és la Sonia, la Ivette, l'Elena, però la Miriam encara resisteix i, això és d'agrair ja que s'ha convertit en la meva companya de cursos i vacances i en una de les persones que més m'ha ajudat a resistir fins al final, gràcies. Però en aquest anar i venir de gent que caracteritza als laboratoris, amb la marxa del Jose, aparegué el Pedro amb el seu parlar de Granada un xic difícil d'entendre. Amb el temps he après a entendre'l, o això crec, però sobretot he rigut molt i ha sigut el millor guia de Granada que he tingut, por cierto, esas clases de sevillanas están a medias. Bé, gràcies a tots els rsteros, Sergi, Isabel, Ekaitz, Laia, Montse, Itziar, Andrea, Dani, Lorena, (uf espero no deixar-me ningú) per acollir-me i fer-me riure, amb vosaltres tot ha estat més fàcil. En definitiva gràcies Marçal per deixar-me campar al meu aire pel teu laboratori i per ser com ets (i això és bo) i al Javi pels bons moments compartits.

En aquest recorregut per les meves col·laboracions cal destacar també el grup de la Cristina on he compartit molts dies i algun que altre congrés amb la Meri, l'Anna, la Laura, la Nuria, el Jon i el Dani. Gràcies per ajudar-me i posar-m'ho tot tan fàcil en el meu recorregut pel món de les connexines.

El grup del Ramón on ara resideix el Manel, amb la Neus,... responsables de la meva introducció al món dels adenovirus replicatius. Gràcies per compartir i explicar tots els vostres coneixements, és un plaer.

Per últim agrair a tota la gent del clínic, Vanessa, Cristina, Rosa, Pere, Joan, Salvador, ... haver fet possible la darrera col·laboració d'aquesta tesi.

Com ja sabeu, malgrat el que de vegades pugui semblar, una tesi no només és treballar i en aquest sentit vull agrair a tota la gent que des de fora m'ha ajudat a acabar aquesta tesi. El Mario, la Carmen i el Pepito que tot i que ens vam conèixer al laboratori han esdevingut uns bons amics amb qui compartim sessions de cinema, sopar i algun que altre tauró. L'Elvira i l'Alfredo totalment aliens a aquest món i que s'encarreguen de recordar-nos que hi ha una altre manera de viure. Sobretot l'Elvira, Alfredo no te ofendas, però és que ja fa molts anys des que un bon dia es va acostar a la cua de reprografia i va dir sou del T2, han passat molts anys, però ella sempre ha estat allà. El Toni i la Laura, que han fugit d'aquest món i amb els que hem compartit molts bons moments.

Un cop fora del laboratori em queda fer un esment molt especial a la meva família a qui agraeixo que sempre estiguin allà i sobretot tots els riures que compartim, que no són pocs, en les nostres trobades. Als meus avis, sobretot a la

iaia Marcelina que ja fa molts anys em va ensenyar que no deixi per demà el que pugui fer avui. I per sobre de tot als meus pares, Mario i Anna, que clarament són els responsables de tot en última instància, je, je, així que les reclamacions ja sabeu on dirigir-les. Bé, bromes a part, gràcies per ajudar-me a arribar fins aquí, per la vostra paciència, per no fer-me fora de casa, tot i que ja tinc una edat, però, sobretot per ser com sou, no us puc imaginar d'una altra manera.

I ara sí, sembla que això ja s'acaba. No, no m'oblido de tu. Gràcies Jon per la teva paciència, ajuda i sobretot per tots els bons moments. Sense tu el camí recorregut per arribar al final d'aquesta tesi hauria estat més difícil.



I no oblideu que qualsevol dia pot sortir el sol.

Introducció	1
1. El Pàncreas	3
2. Càncer de Pàncreas	5
2.1. Model de progressió de les neoplàsies pancreàtiques	6
2.2. Genètica molecular del PDAC	9
3. Tractament del càncer de pàncreas	15
4. Transportadors de nucleòsids	16
4.1. Transportadors equilibratius	17
4.2. Transportadors concentratius	19
4.3. Distribució tissular dels transportadors de nucleòsids	21
4.4. Regulació dels transportadors de nucleòsids	22
5. Paper farmacològic dels transportadors de nucleòsids	22
5.1. Fàrmacs anàlegs de nucleòsids	23
5.2. Paper dels transportadors de nucleòsids en la sensibilitat a anàlegs	26
5.3. Metabolisme dels anàlegs de nucleòsids	32
5.4. Mecanismes de resistència a anàlegs de nucleòsids	34
6. Comunicació intercel·lular	37
6.1. Unions de tipus Gap	37
6.2. Connexines	37
6.3. Connexines i progressió tumoral	38
6.4. Unions i efecte adjacent	39
7. Teràpia gènica	41
7.1. Compensació de les mutacions	43
7.2. Quimioteràpia molecular	43
7.3. Immunopotenciació genètica	44
7.4. Modulació genètica de la resistència/sensibilitat	44
7.5. Inhibició de l'angiogènesi	45
7.6. Teràpia oncolítica o viroteràpia	45
8. Agents adenovirals per a la viroteràpia oncolítica	46
8.1. Característiques generals dels adenovirus	47
8.2. Adenovirus replicatius condicionals	49
8.3. Direccionament dels adenovirus	50
9. Models preclínics de càncer de pàncreas	51
9.1. Models murins manipulats genèticament	52
9.2. Models murins establerts a partir de cèl·lules o teixit humà	53
Objectius	57
Materials i Mètodes	61
1. Línies cel·lulars	61
1.1. Cultiu de les línies cel·lulars	63
2. Tractaments amb agents quimioterapèutics	64
3. Anàlisi de la citotoxicitat:	64
3.1. Corbes dosi-resposta	64
4. Tècniques de citometria de flux	65
4.1. Anàlisi del perfil de cicle cel·lular	66
4.2. Quantificació de cèl·lules apoptòtiques: incorporació d'annexina V	67
5. Tècniques relacionades amb la manipulació d'ADN	68
5.1. Aïllament d'ADN plasmídic	68
5.2. Midipreparació d'ADN plasmídic	68
5.3. Anàlisi d'ADN en gels d'agarosa	68

5.4. Seqüenciació	69
6. Tècniques relacionades amb la manipulació d'ARN	69
6.1. Extracció d'ARN total a partir de cultius cel·lulars	69
6.2. Qualitat de l'ARN: valoració espectrofotomètrica d'àcids nucleics ..	70
6.3. Retrotranscripció: Síntesi d'ADNc	71
6.4. PCR en temps real	72
7. Tècniques relacionades amb la manipulació de bacteris	74
7.1. Preparació de cèl·lules competents	74
7.2. Transformació per xoc tèrmic.....	75
7.3. Transformació per electroporació.....	75
8. Tècniques relacionades amb la manipulació d'adenovirus	76
8.1. Generació dels adenovirus.....	75
8.2. Amplificació dels adenovirus	79
8.3. Purificació dels estocs virals	80
8.4. Titulació dels estocs virals	80
8.5. Transducció de cèl·lules en monocapa amb adenovirus.....	81
9. Tècniques relacionades amb la manipulació de proteïnes	81
9.1. Extracció de proteïnes a partir de cultius cel·lulars	81
9.2. Determinació de la concentració de la proteïna total	82
9.3. Anàlisi de proteïnes mitjançant western blot	82
10. Mesures de transport de nucleòsids.....	85
10.1. Preparació dels medis de transport	85
10.2. Assaig de transport	86
10.3. Valoració de proteïnes.....	86
10.4. Càlculs.....	87
11. Tècniques relacionades amb la manipulació de ratolins atímics.....	87
11.1. Animals	87
11.2. Mesura i seguiment del creixement tumoral	88
11.3. Implantació de fragments tumorals al pàncreas de ratolins atímics	90
11.4. Seguiment del creixement tumoral.....	890
11.5. Tractament dels animals	890
11.6. Obtenció dels tumors subcutanis.....	90
12. Tècniques histològiques	90
12.1. Inclusió en blocs de parafina	90
12.2. Obtenció de talls histològics.....	91
12.3. Tinció hematoxilina-eosina de mostres parafinades	91
12.4. Tinció tricròmica de Masson	92
12.5. Determinació de l'apoptosi en talls histològics.....	92
Resultats i Discussió.....	95
1. Efectes de la sobreexpressió d'hENT1 en un model de càncer de pàncreas humà.....	97
1.1. Caracterització basal del transport, l'ARNm d'hENT1 i la sensibilitat a gemcitabina	97
1.2. Efectivitat de la infecció amb Ad-hENT1.....	98
1.3. Efectes de la infecció amb Ad-hENT1 sobre la sensibilitat a gemcitabina.....	101
1.4. Efectes de la sobreexpressió d'hENT1 en el cicle cel·lular i l'apoptosi	102
1.5. Expressió d'enzims implicats en el metabolisme dels nucleòsids ...	104

1.6. Expressió de proteïnes de resistència a multidrogués: MDR1 i MRP5	106
1.7. Efectes de la injecció intratumoral d'Ad-hCNT1 en tumors subcutanis derivats de NP-9	107
2. Generació i caracterització dels efectes de l'Ad-hCNT1 en models de càncer de pàncreas humà	110
2.1. Generació de l'Ad-hCNT1	110
2.2. Efectivitat de la infecció amb Ad-hCNT1.....	111
2.3. Efecte de la sobreexpressió de hCNT1 sobre la morfologia i el cicle cel·lular	113
2.4. Efectes de la sobreexpressió de hCNT1 sobre la mort cel·lular.....	116
2.5. Efectes de la sobreexpressió de hCNT1 en un model <i>in vivo</i>	119
3. Comunicació intercel·lular i sensibilitat a gemcitabina	124
3.1. Determinació de l'efecte adjacent en cèl·lules tractades amb gemcitabina.....	124
3.2. Potenciació dels efectes de la gemcitabina per sobreexpressió de Cx26 <i>in vivo</i>	129
3.3. Augment del creixement tumoral <i>in vivo</i> per sobreexpressió de Cx26	130
4. Modulació de la potencia dels adenovirus replicatius per introducció del gen supressor	136
4.1. Anàlisi d'interferències entre un adenovirus replicatiu i la sobreexpressió de p53	136
4.2. Generació dels adenovirus replicatius armats amb p53 i tatp53	137
4.3. Efecte citotòxic d'AdRGD-p53 i AdRGD-tatp53 respecte l'AdwtRGD	137
4.4. Efecte citotòxic produït per la combinació d'AdRGD-p53, AdRGD-tatp53 i AdwtRGD amb gemcitabina	138
4.5. Efecte antitumoral dels adenovirus armats amb p53 i tatp53 <i>in vivo</i> en combinació amb el tractament amb gemcitabina	142
5. Establiment de models ortotòpics de càncer de pàncreas humà	152
5.1. Establiment i estandarització de xenoimplants ortotòpics procedents de cèl·lules tumorals humanes	152
5.2. Establiment de xenoimplants ortotòpics procedents de fragments quirúrgics d'adenocarcinomes de pàncreas humans	157
Conclusions	170
Bibliografia	174