

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

Resultats i Discussió

1. Efectes de la sobreexpressió d'hENT1 en un model de càncer de pàncreas humà

El nombre creixent d'anàlegs de nucleòsids utilitzat en el tractament de gran varietat de càncers, posa de manifest la necessitat d'aprofundir en el seu coneixement. Com ja s'ha esmentat abans, els anàlegs de nucleòsids duen a terme els seus efectes a través d'un procés que es pot dividir en tres etapes: captació, metabolització en el fàrmac actiu i acció farmacològica. L'alteració en qualssevol d'aquestes etapes pot induir resistència al tractament (Pastor-Anglada, 2006).

La majoria d'aquests agents terapèutics requereixen un sistema especialitzat de transport per ser introduïts a la cèl·lula. Aquest és el primer pas per poder exercir els seus efectes citotòxics i, per tant, deficiències en el seu transport poden provocar resistència al tractament. Per aquest motiu ens vàrem proposar com a objectiu d'aquest capítol l'anàlisi dels efectes provocats per la sobreexpressió d'un dels transportadors de nucleòsids, el transportador equilibratiu hENT1.

1.1. Caracterització basal del transport, l'ARNm d'hENT1 i la sensibilitat a gemcitabina

En primer lloc, vàrem caracteritzar tres línies cel·lulars derivades de càncer de pàncreas pels nivells de missatger del transportador hENT1 per PCR quantitativa en temps real, així com el seu nivell de transport equilibratiu (Fig. 17). El transport d'uridina sensible a NBTI (*es*) correlaciona amb els nivells relatius d'ARNm d'hENT1 que mostren les tres línies. A més a més, la sensibilitat a la gemcitabina, determinada per la IC_{50} (concentració que inhibeix un 50% la viabilitat cel·lular) segueix una relació inversa al transport d'hENT1. Així doncs, la línia més sensible a la gemcitabina és alhora la que té una captació d'uridina més elevada i a l'inrevés.

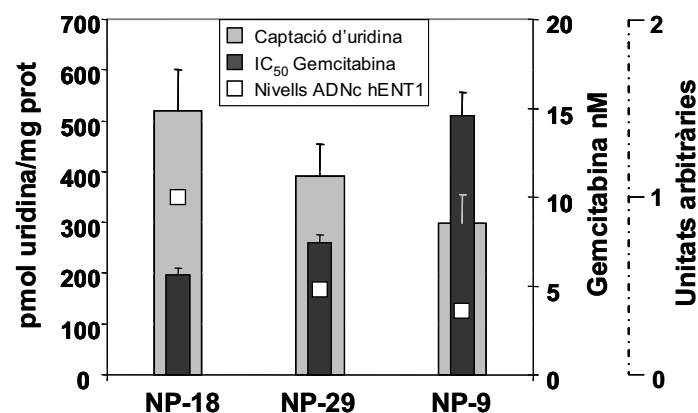


Fig.17 Caracterització de les línies cel·lulars pels nivells d'ARNm d'hENT1, captació d'uridina i sensibilitat a gemcitabina. Els valors de IC₅₀ de la gemcitabina es representen amb les barres negres, la captació d'uridina amb les barres grises i els nivells relatius d'ARNm d'hENT1 amb el quadrats blancs. Els resultats són la mitjana ± ES de quatre determinacions.

1.2. Efectivitat de la infecció amb Ad-hENT1

A partir d'aquests resultats vàrem escollir les línies cel·lulars NP-18 i NP-9 per tal de caracteritzar els efectes de la sobreexpressió del transportador hENT1, ja que aquestes presenten unes característiques oposades en quant a transport i sensibilitat a gemcitabina, mentre que NP-29 té un comportament intermedi. Per tal d'examinar l'eficiència de la infecció amb Ad-hENT1, les dues línies cel·lulars es van infectar amb dosis creixents d'adenovirus i 48h més tard es van determinar els nivells d'ARNm per PCR quantitativa en temps real. Tal i com s'observa a la Fig. 18, els nivells d'ARNm augmenten en les dues línies cel·lulars infectades amb Ad-hENT1 de manera dosi dependent, mentre que no s'observen canvis amb l'adenovirus control a les mateixes m.o.i.. Cal destacar que l'augment d'ARNm és molt més elevat a la línia NP-9, la línia cel·lular que presenta uns nivells basals més baixos.

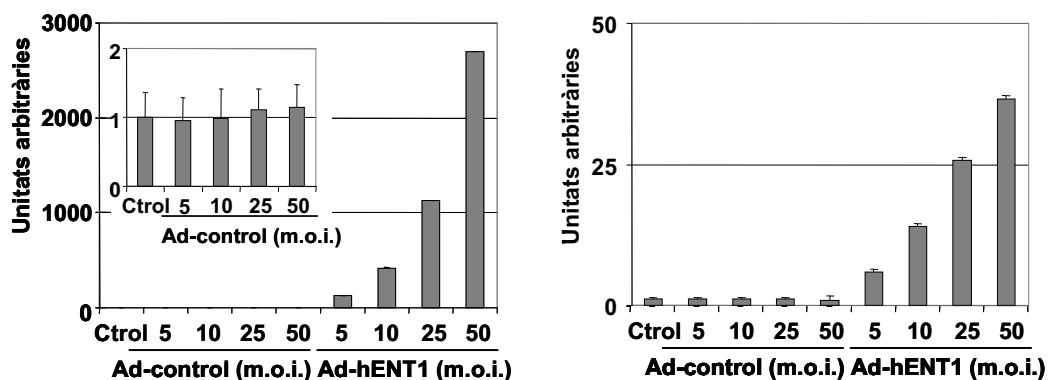


Fig. 18 Nivells d'ARNm determinats per PCR en temps real. A. NP-9. B. NP-18. Els valors de C_T obtinguts han estat normalitzats respecte al control endogen (GAPDH). Els nivells d'expressió es donen com unitats arbitràries, utilitzant la mitjana dels valors del control sense infectar com a valor de referència.

A més a més, l'augment en l'expressió es tradueix en un increment dels nivells de proteïna del transportador (Fig 19), tot i que, aquest augment no s'observa de forma tant clara com el d'ARNm.

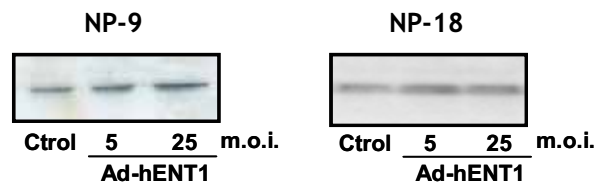


Fig. 19 Nivells de proteïna d'hENT1 determinats per western blot. Els cultius cel·lulars en NP-9 i NP-18 van ser infectats amb 5 i 25 m.o.i. d'Ad-hENT1.

Un cop determinada l'expressió del hENT1 ectòpic, vàrem analitzar la captació d'uridina per comprovar la funcionalitat del transportador. A les m.o.i. analitzades, el transport es augmenta a partir de 5 m.o.i. de manera dosi dependent, tal i com succeïa amb els nivells de missatger (Fig. 20). Per contra, a la línia NP-18 no vàrem observar increments significatius del transport, malgrat l'augment de missatger observat i el lleu augment de proteïna.

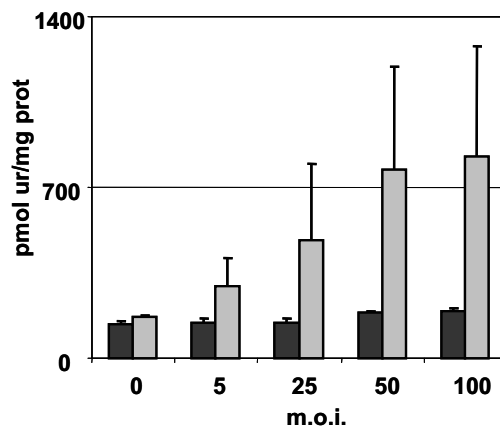


Fig. 20 Nivells de transport a la línia NP-9. 48 hores després de la infecció de les cèl·lules amb diferents m.o.i., es va mesurar la captació d'uridina $1\mu\text{M}$ durant 1 minut per avaluar el transport mitjançat per hENT1. Els resultats són la mitjana \pm ES de quatre mesures d'un experiment representatiu.

Per altra banda, cal destacar que l'augment de transport de forma dosi dependent també s'ha observat en una altra línia cel·lular de càncer de còlon (Caco-2) (Fig. 21), que té uns nivells de transport basal baixos, més similars als que presenten les cèl·lules NP-9.

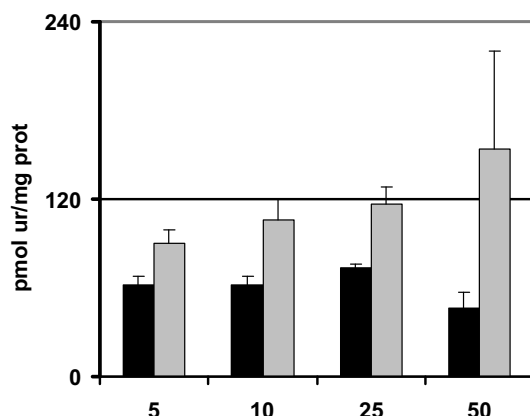


Fig. 21 Nivells de transport a la línia Caco-2. 48 hores després de la infecció de les cèl·lules amb diferents m.o.i., es va mesurar la captació d'uridina $1\mu\text{M}$ durant 1 minut per avaluar el transport mitjançat per hENT1. Els resultats són la mitjana \pm ES de quatre mesures d'un experiment representatiu.

Els febles augments de proteïna i transport en relació als nivells de missatger suggereixen l'existència d'una regulació ràpida i precisa a nivell post-transcripcional. Aquest fet seria indicatiu de que, malgrat el nombre d'alteracions que pateixen les cèl·lules tumorals, processos tant importants com el metabolisme energètic i de nucleòtids i la proliferació cel·lular estan sotmesos a un control més acurat evitant així alteracions que podrien ésser letals fins i tot per una cèl·lula tumoral.

1.3. Efectes de la infecció amb Ad-hENT1 sobre la sensibilitat a gemcitabina

Tenint en compte la correlació positiva observada entre el transport dependent de hENT1 i la sensibilitat a gemcitabina, el següent objectiu va ser l'anàlisi de la sensibilitat a aquest fàrmac en unes cèl·lules amb transport incrementat per sobreexpressió d'hENT1. Per realitzar els assajos de citotoxicitat vàrem escollir les dosis d'adenovirus més baixes a les quals s'observava increment en el transport 5 i 10 m.o.i.. Sorprenentment, l'augment del transport dependent d'hENT1 indueix quimioresistència a la gemcitabina tant a NP-9 com a NP-18 (Fig. 22). Cal destacar que la infecció amb 5 m.o.i. d'Ad-hENT1 per si sola produeix una disminució d'un 20% de la viabilitat cel·lular a la línia NP-9.

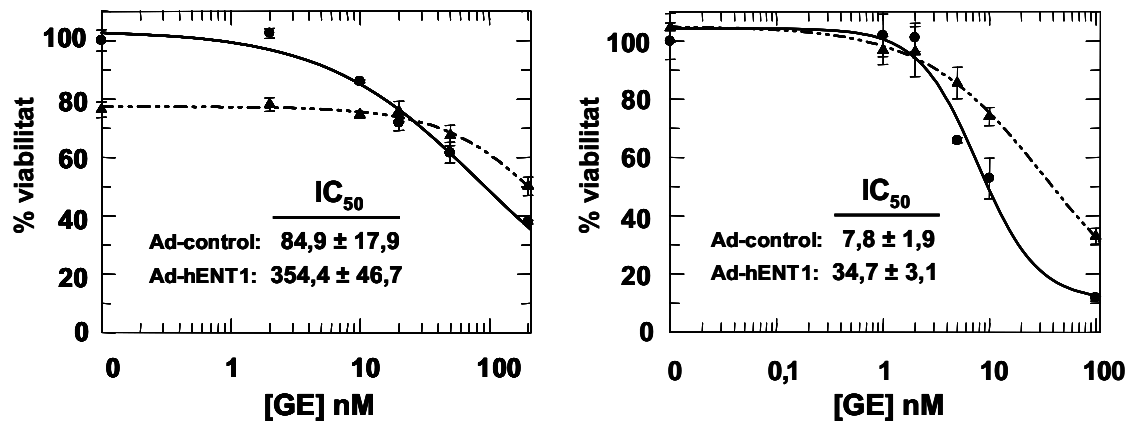


Fig. 22 Efectes de la infecció amb Ad-hENT1 en la sensibilitat a gemcitabina. Les cèl·lules es van infectar amb 5 m.o.i. i a les 48 hores de la infecció es van tractar amb dosis creixents de gemcitabina. 72 hores més tard es va mesurar la viabilitat del cultiu per comptatge de cèl·lules. Els resultats són la mitjana \pm ES (n=4).

1.4. Efectes de la sobreexpressió d'hENT1 en el cicle cel·lular i l'apoptosi

A partir d'aquests resultats, varem voler determinar els mecanismes responsables d'aquesta quimioresistència, ja que aquesta s'observa a les dues línies cel·lulars independentment de la capacitat de l'Ad-hENT1 per augmentar el transport *es*. Així doncs, en primer lloc, vàrem analitzar si la sobreexpressió d'hENT1 produïa canvis en el perfil de cicle de les dues línies. Mentre que a NP-18 no s'observen canvis en el perfil de cicle a cap de les dues dosis analitzades, a NP-9 s'observa una clara disminució del percentatge de cèl·lules a G₁ així com un increment concomitant de les cèl·lules a G₂ de manera dosi dependent. El percentatge de cèl·lules a G₂ varia des d'un valor inicial de 20.7% fins un 30.1% després de la infecció amb 5 m.o.i. (Fig. 23).

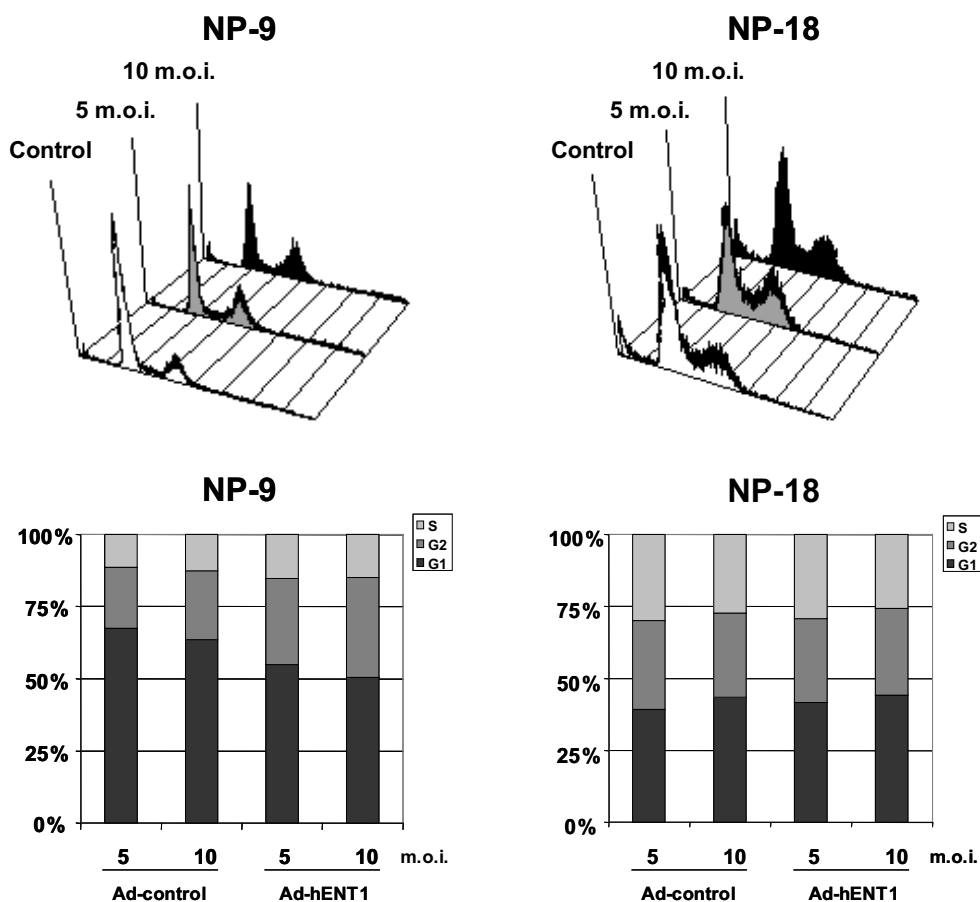


Fig. 23 Perfil de cycle cel·lular. Les cèl·lules es van infectar amb 5 m.o.i. i 10 m.o.i. i a les 48 hores de la infecció es van tenyir amb iodur de propidi i el perfil de cycle fa ser analitzat amb un citòmetre de flux.

Al mateix temps, es varen analitzar per western blot els nivells de proteïna de les ciclines E (transició G_1 -S) i B (de G_2) i es va observar un increment clar de la relació ciclina B/ciclina E, el que corrobora la parada a G_2 (Fig. 24 A). Aquestes alteracions en el perfil de cycle podrien explicar el descens de la viabilitat cel·lular en absència de gemcitabina que s'observa a les cèl·lules infectades amb tan sols 5 m.o.i.. Per altra banda, també es produeix un lleuger augment de la població de cèl·lules a la fase sub- G_1 amb 10 m.o.i. d'Ad-hENT1, el que podria suggerir una inducció d'apoptosi, però l'anàlisi de la proteïna PARP per western blot no mostra el fragment proteolitzat d'aquesta a cap de les m.o.i. assajades (Fig. 24 B).

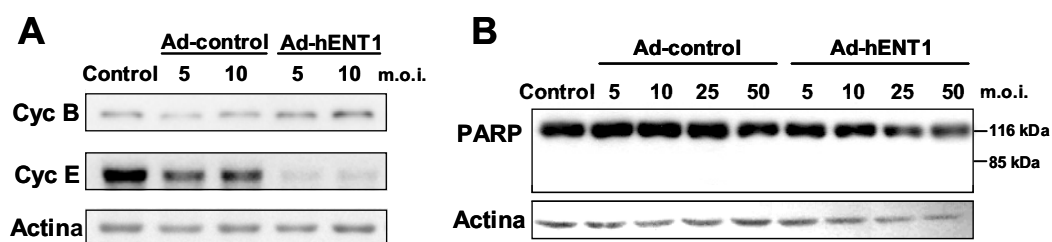


Fig. 24 Immunodetecció de ciclines i proteolització de PARP a NP-9. Les cèl·lules es van infectar a diferents m.o.i. i a les 48 hores de la infecció es va realitzar l'extracció de proteïnes.

Durant la fase de síntesi del cycle cel·lular es requereix una gran aportació de nucleòsids. De fet, en cèl·lules FAO derivades d'hepatoma de rata els transportadors de nucleòsids ENT2 i CNT2 s'indueixen a l'inici de la fase S per fer front a aquests requeriments (del Santo et al. 1998), mentre que els nivells d'ENT1 no presenten variacions en les diferents fases del cycle. La inducció adequada del tipus de transportador de nucleòsids pot ser que es vegi alterada a la línia NP-9 degut a l'increment de transport dependent d'hENT1. Així doncs, una activitat de transport sostinguda al final de la fase S i durant la fase G₂ del cycle cel·lular podria ser la responsable de la inducció de l'aturada del cycle cel·lular, per tal d'intentar restablir el patró d'expressió adequat de transportadors de nucleòsids així com els cúmuls intracel·lulars d'aquests. Aquesta aturada del cycle cel·lular, pot ser en part, la responsable de la resistència al tractament amb gemcitabina degut a la disminució del nombre potencial de cèl·lules que poden incorporar el fàrmac. Resultats previs obtinguts al grup, posen de manifest l'importància de la combinació de la gemcitabina en l'ordre correcte amb agents que modifiquen el perfil del cycle cel·lular. Així doncs, per tal d'aconseguir efectes citotòxics satisfactoris amb gemcitabina les cèl·lules han d'estar ciclant. (Casallo *et al.*, 2000).

1.5. Expressió d'enzims implicats en el metabolisme dels nucleòsids

En segon lloc, varem analitzar l'impacte de la sobreexpressió d'hENT1 sobre l'expressió d'algun dels enzims més importants implicats en el metabolisme dels àcids nucleics. Els nivells d'ARNm de la dCK i la subunitat R2 de la ribonucleòtid reductasa disminueixen de manera dosi dependent 48 hores després de la infecció a la línia NP-9, mentre que a la línia NP-18 aquests no es veuen alterats (Fig. 25).

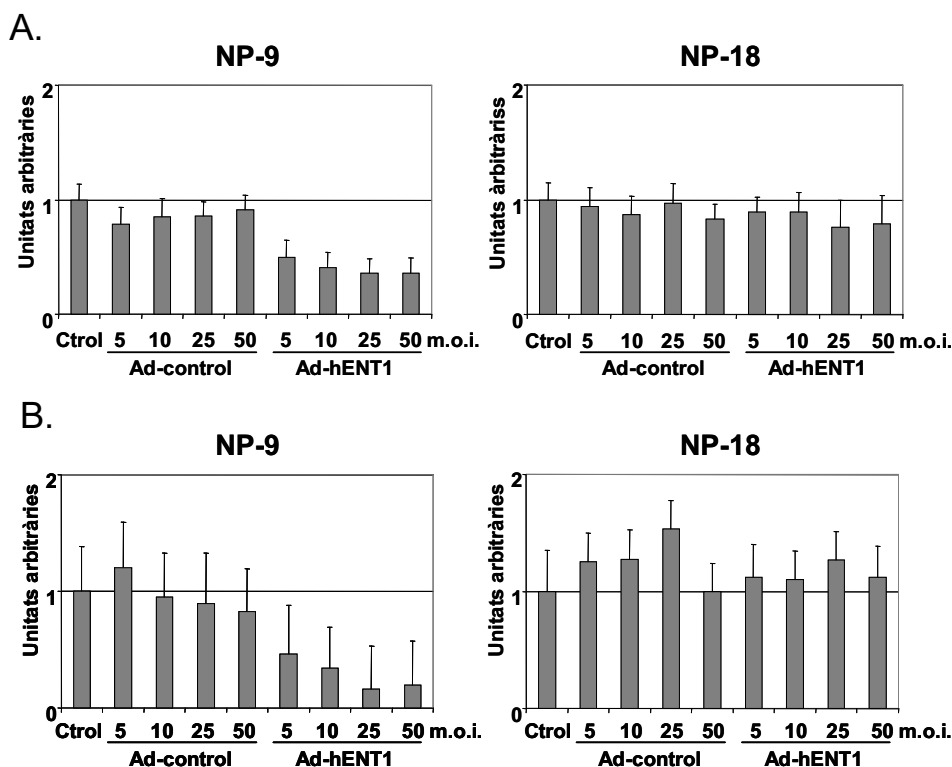


Fig. 25. Expressió de la dCK i de la subunitat R2 de la ribonucleòtid reductasa. A. dCK. B. R2. Les cèl·lules es van infectar a diferents m.o.i. i a les 48 hores de la infecció es va realitzar l'extracció d'ARN. Els valors de C_T obtinguts han estat normalitzats respecte al control endogen (GAPDH). Els nivells d'expressió es donen com unitats arbitràries, utilitzant la mitjana dels valors del control sense infectar com a control de referència.

La fosforilació inicial per la dCK dels nucleòsids i dels fàrmacs derivats d'aquests és el pas limitant en el seu metabolisme. S'ha descrit que la disminució dels nivells d'ARNm correlaciona amb la baixada d'activitat i que aquesta pot provocar resistència al tractament amb gemcitabina (Plunkett *et al.*, 1996; Galmarini *et al.*, 2004). Així doncs, la ràpida disminució dels nivells de dCK observats a la línia NP-9, permetrien una adaptació a l'excés d'activitat d'hENT1 per tal d'evitar un desbalancejament en els nivells de nucleòsids intracel·lulars. Per altra banda, l'activitat de la ribonucleòtid reductasa augmenta durant la fase S del cicle cel·lular per tal de fer front a les necessitats de nucleòsids de la cèl·lula durant la fase de síntesi (Soler *et al.*, 2003). La forma difosforilada de la gemcitabina és un potent inhibidor d'aquest enzim (Plunkett *et al.*, 1996), el que provoca una disminució dels nivells de deoxinucleòtids intracel·lulars afavorint així la incorporació de la gemcitabina a l'ADN. Així doncs, la disminució de la subunitat R2 de la ribonucleòtid reductasa com a conseqüència de la sobreexpressió d'hENT1 hauria d'afavorir la citotoxicitat del fàrmac. Però, en el cas de la línia

NP-9, la disminució de la incorporació de la gemcitabina a l'ADN deguda a l'aturada del cicle cel·lular se sumaria a la disminució de la seva activació per la dCK per tal de contribuir a la quimioresistència a gemcitabina. El que posa de manifest un altre cop l'elevada complexitat de la regulació de l'assequibilitat dels nucleòsids i del seu metabolisme. A més a més, hENT1 és un transportador bidireccional que permet la sortida dels nucleòsids i els seus anàlegs no fosforilats. Per tant, tots els canvis produïts a la cèl·lula per la sobreexpressió d'hENT1 podrien estar facilitant la sortida de la gemcitabina de l'interior de la cèl·lula induint així resistència al tractament. Recentment, ha estat publicat un treball on línies cel·lulars provinents de càncer de pàncreas resistents a la gemcitabina per exposició continuada al fàrmac presenten una expressió augmentada del transportador hENT1 i alteracions en la maquinària metabòlica enzimàtica (Nakano *et al.*, 2007). Aquests resultats, anirien en la mateixa línia que els obtinguts en el marc d'aquesta tesi, on un augment d'aquest transportador produeix alteracions en els enzims metabòlics i provoca quimioresistència al tractament amb aquest fàrmac.

1.6. Expressió de proteïnes de resistència a multidrogues: MDR1 i MRP5

Per últim, vàrem determinar els nivells d'expressió de dues proteïnes de resistència a multidrogues de la família dels transportadors ABC, implicades en l'extrusió de fàrmacs. La proteïna MRP5, que ha estat associada a resistència a gemcitabina (Davidson *et al.*, 2002) i pot transportar les formes fosforilades del 5-FU (Pratt *et al.*, 2005), no presenta cap canvi en els nivells d'ARNm a cap de les m.o.i. analitzades en ambdues línies cel·lulars (Fig. 26 A). Al igual que altres autors (Oguri *et al.*, 2006) no hem trobat cap relació entre l'expressió d'hENT1 i de MRP5, el que suggereix que aquests transportadors no es regulen de forma coordinada. Per altra banda, la glicoproteïna P (MDR1) ha estat àmpliament relacionada amb resistència a fàrmacs antitumorals com l'etopòsid i la vincristina entre altres; tot i que, aquest transportador no ha estat relacionat amb resistència a gemcitabina. Per contra, en diverses línies de càncer humà on s'ha sobreexpressat MDR1 mitjançant diversos mecanismes s'ha vist una sensibilitat augmentada a gemcitabina correlacionada amb un augment de la dCK. A la línia NP-18, no s'observen canvis en els nivells d'ARNm. La línia NP-9 presenta uns nivells basals no detectables de l'ARNm de MDR1, i a m.o.i. elevades aquests augmenten de forma significativa i dosi dependent. Cal destacar que a les m.o.i. a les que s'ha realitzat els assajos de citotoxicitat a gemcitabina els nivells d'ARNm de MDR1 no són detectables (Fig 26 B).

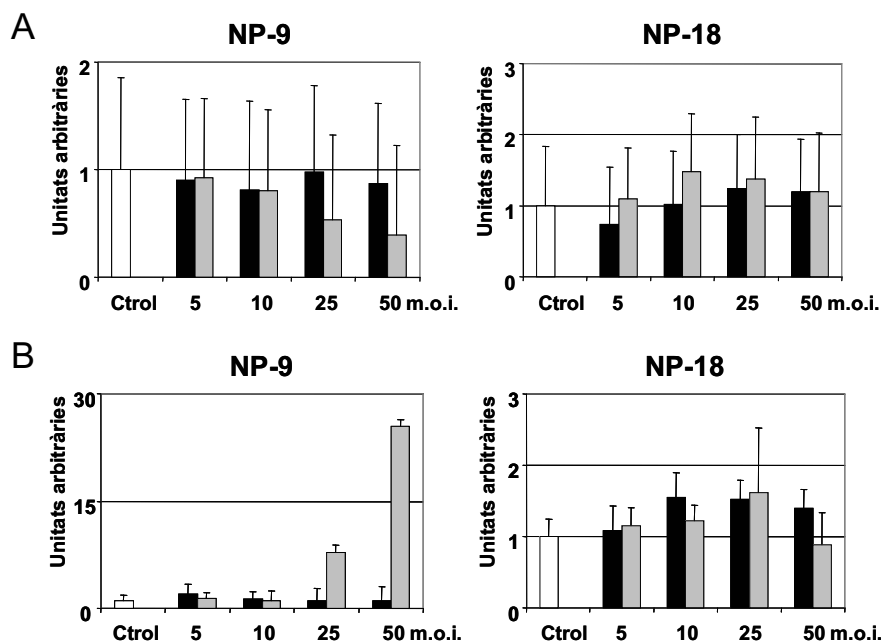


Fig. 26. Expressió de MRP5 i MDR1. A. MRP5. B. MDR1. Les cèl·lules es van infectar a diferents m.o.i. i a les 48 hores de la infecció es va realitzar l'extracció d'ARN. Els valors de C_T obtinguts han estat normalitzats respecte al control endogen (GAPDH). Els nivells d'expressió es donen com unitats arbitràries, utilitzant la mitjana dels valors del control sense infectar com a control de referència.

1.7. Efectes de la injecció intratumoral d'Ad-hENT1 en tumors subcutanis derivats de NP-9

Un cop analitzat l'efecte *in vitro* de la sobreexpressió d'hENT1, el següent objectiu fou determinar els seus efectes en un model *in vivo* de tumors subcutanis. Amb aquesta finalitat vàrem implantar la línia cel·lular NP-9, que presentava un augment del transport clar i un perfil d'alteracions que prèviament hem definit, en els dos flancs de ratolins femella atímics Balb/c nu/nu. Quan els tumors varen assolir un tamany de 90 mm³ es van realitzar tres cicles setmanals d'injecció intratumoral amb 1x10⁸ pfu/tumor i tractament amb 75 mg/Kg gemcitabina intraperitoneal 36 hores més tard. Tal i com s'observa en la figura 27 no vàrem observar canvis significatius en el volum tumoral mesurat dos cops per setmana durant tot l'experiment, ni en el pes final dels tumors respecte el grup Adctrol.

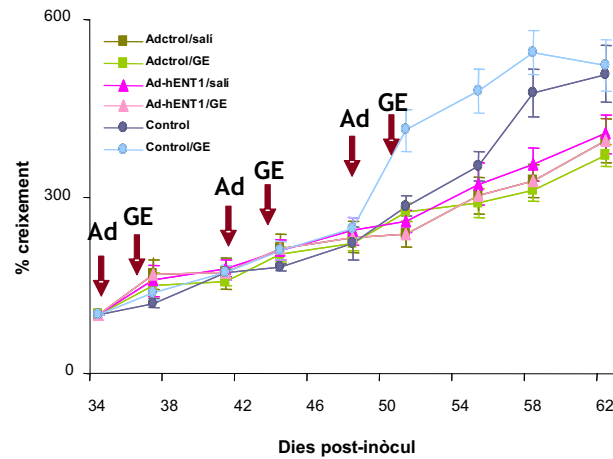


Fig. 27. Efecte del tractament combinat amb gemcitabina sobre el percentatge de creixement dels tumors NP-9. El percentatge de creixement es refereix a la mida dels tumors a l'inici del tractament. Amb color blau els tumors control, amb color verd els infectats amb Adctrol i amb rosa els tumors infectats amb Ad-hENT1. Les fletxes indiquen els temps als quals es va realitzar la injecció viral i l'administració de gemcitabina. *** $p < 0.005$ respecte el grup control ($n=11$).

Així doncs, arran d'aquests resultats vàrem decidir repetir l'assaig *in vivo* emprant dosis de virus i de gemcitabina més elevades (Fig. 28). En aquest cas la dosi de virus escollida fou de $2 \cdot 10^8$ pfu/tumor i la de fàrmac 150 mg/kg. El disseny de l'experiment i el patró de tractament fou el mateix que l'emprat en l'experiment anterior.

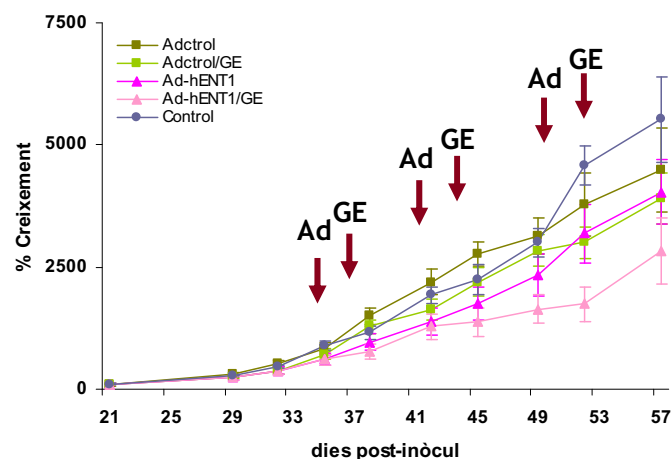


Fig. 28. Efecte del tractament combinat amb gemcitabina sobre el percentatge de creixement dels tumors NP-9. El percentatge de creixement es refereix a la mida dels tumors a l'inici del tractament. Amb color blau els tumors control, amb color verd els infectats amb Adctrol (en verd clar els GE) i amb rosa els tumors infectats amb Ad-hENT1 (en rosa clar els GE). Les fletxes indiquen els temps als quals es va realitzar la injecció viral i l'administració de gemcitabina. ($n=5-6$).

En aquest segon assaig *in vivo* s'observa una lleugera inhibició del creixement dels tumors infectats amb Ad-hENT1 respecte els infectats amb el virus control. Per altra banda, els efectes del tractament amb 150 mg/kg de gemcitabina s'observen als dos grups infectats. Sorprenentment, l'efecte de la gemcitabina en els tumors infectats amb Ad-hENT1 és superior al dels controls. En cap cas, s'observa una resistència al tractament tal i com succeeix en els assajos *in vitro*. Aquests resultats semblen suggerir que en un model tridimensional més similar a la situació real, la sobreexpressió d'hENT1 pot tenir efectes beneficiosos en combinació amb el tractament amb gemcitabina.

2. Generació i caracterització dels efectes de l'Ad-hCNT1 en models de càncer de pàncreas humà

Com ja s'ha esmentat anteriorment, la majoria d'agents utilitzats actualment en la teràpia antitumoral requereixen un sistema de transport especialitzat per entrar a la cèl·lula i poder exercir el seu efecte citotòxic. Així doncs, a partir dels resultats mostrats en el capítol anterior per la sobreexpressió de hCNT1 ens vàrem plantejar la generació d'un adenovirus que permetés la sobreexpressió d'un transportador de nucleòsids concentratiu. Aquests transportadors són d'alta afinitat i a diferència dels equilibratius, duen a terme únicament l'influx de substrats de forma sodi dependent amb la conseqüent acumulació intracel·lular i despesa energètica. A més, el transport d'alta afinitat de la gemcitabina ve mediat bàsicament pel transportador concentratiu de pirimidines hCNT1. La K_m aparent d'aquest per la gemcitabina és baixa i dins el rang de les concentracions farmacològiques que s'assoleixen durant la quimioteràpia (Lostao *et al.*, 2000). A més a més, en un model de rata d'hepatocarcinogènesi induïda es perd selectivament l'expressió del transportador rCNT1 (Dragan Y et al 2000). En concordança, en tumors ginecològics, la pèrdua de hCNT1 correlaciona amb subtipus histològics de mal pronòstic com el de cèrvix, d'endometri i d'ovari (Farre *et al.*, 2004).

Per tot això, l'objectiu d'aquest capítol fou la generació d'un vector adenoviral que ens permetés la introducció d'aquest transportador a les cèl·lules tumorals, així com la caracterització dels efectes de la seva sobreexpressió sobre models *in vitro* i *in vivo* de cèl·lules tumorals de pàncreas humà.

2.1. Generació de l'Ad-hCNT1

El procediment seguit per a la generació de l'adenovirus s'explica àmpliament en els materials i mètodes i a la figura 29 es mostra un esquema dels diferents passos seguits.

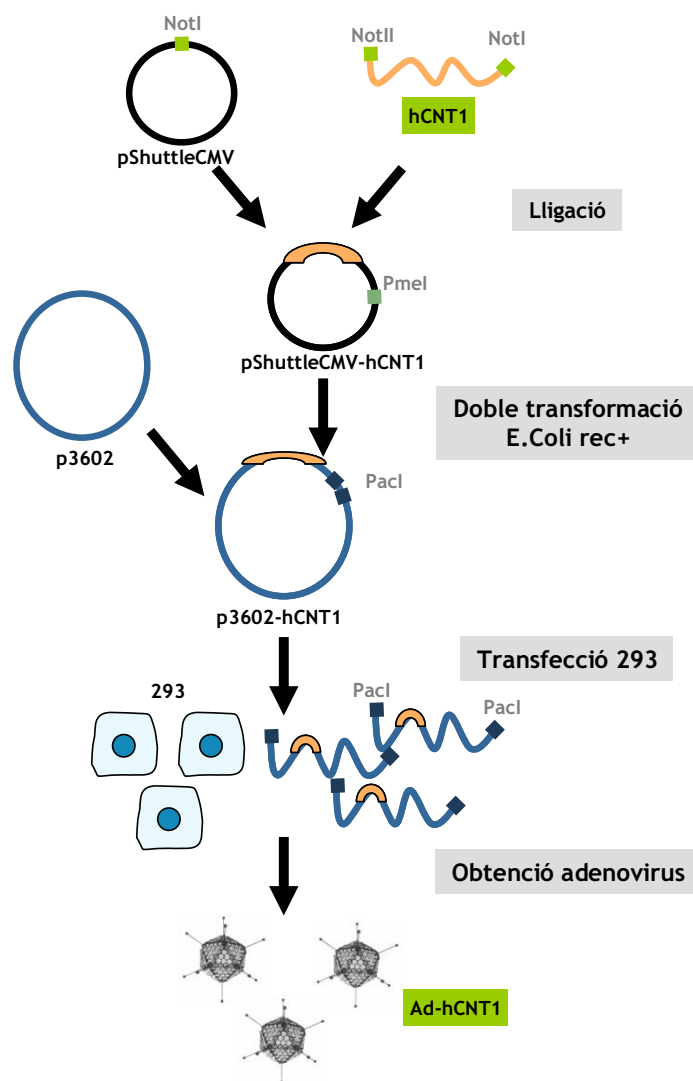


Fig. 29. Generació de l'Ad-hCNT1. Esquema del procés d'obtenció del vector adenoviral.

2.2. Efectivitat de la infecció amb Ad-hCNT1

Un cop generat l'adenovirus, vàrem determinar en primer lloc la funcionalitat de l'Ad-hCNT1 mitjançant l'anàlisi del transport sodi dependent en un panell de cèl·lules tumorals (Fig. 30). Aquests resultats, posen de manifest un augment en el transport de component concentrativa a totes les línies analitzades; a més, aquest respon clarament a la dosi de virus emprada.

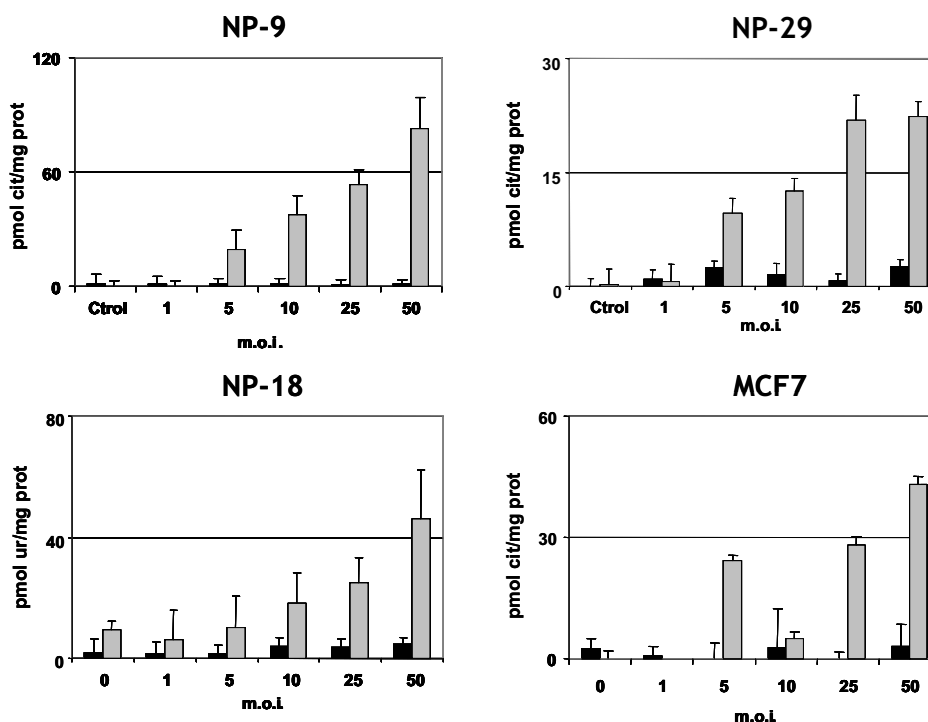


Fig. 30. Determinació del transport sodi dependent en línies infectades amb Ad-hCNT1. A les 48 hores de la infecció amb diferents m.o.i. es va mesurar la captació de citidina $1\mu\text{M}$ en presència o absència de sodi, i el transport sodi dependent es va calcular com la diferència d'aquests. Adctrol (negre) i Ad-hCNT1 (gris). Els resultats són la mitjana \pm ES de quatre mesures.

Un cop determinada la capacitat de l'adenovirus per augmentar el transport sodi dependent vàrem escollir les línies NP-9 i NP-29 com a models per a analitzar els efectes de la sobreexpressió d'aquest transportador. La línia NP-9 presenta uns nivells basals de hCNT1 gairebé indetectables, però reté la capacitat d'expressar la proteïna endògena, mentre que la línia NP-29 té nivells detectables de proteïna i de missatger en estat basal. A continuació, les dues línies cel·lulars es van infectar amb dosis creixents de l'Ad-hCNT1 i de l'adenovirus control, i 48 hores més tard es van determinar els nivells d'ARNm per PCR quantitativa a temps real. En ambdós casos, els nivells d'ARNm augmenten de forma dosi dependent (Fig. 31), essent aquests força elevats des de les dosis més baixes d'adenovirus.

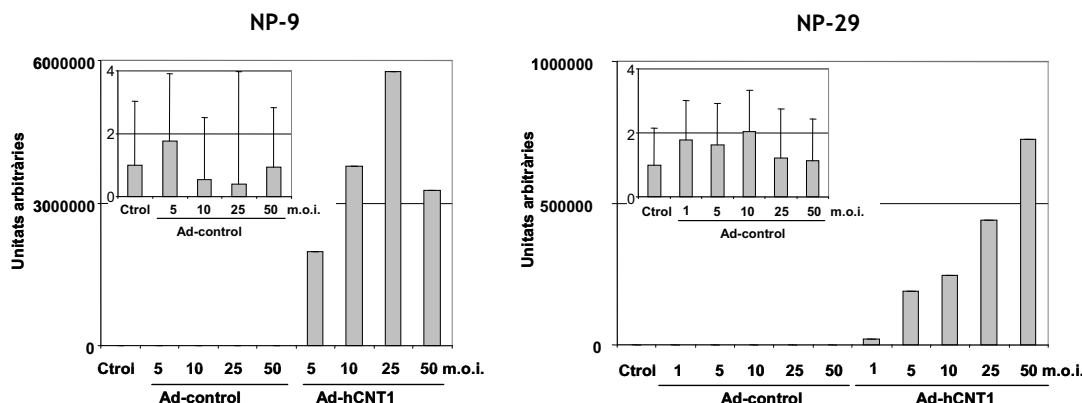


Fig. 31. Determinació dels nivells d'ARNm a les línies infectades amb Ad-hCNT1. A les 48 hores de la infecció amb diferents m.o.i. es va realitzar l'extracció de ARN. Els valors de C_T obtinguts han estat normalitzats respecte al control endogen (GAPDH). Els nivells d'expressió es donen com unitats arbitràries, utilitzant la mitjana dels valors del control sense infectar com a valor de referència

Aquest augment en els nivells de missatger es tradueix en un increment en els nivells de proteïna total del transportador (Fig. 32), tot i que els augments de proteïna assolits són més baixos i no es detecten de forma clara fins a les 72 hores post-infecció, el que ens podria estar indicant que malgrat l'elevada expressió constitutiva del transportador els nivells de proteïna estan sotmesos a un control post-transcripcional acurat.

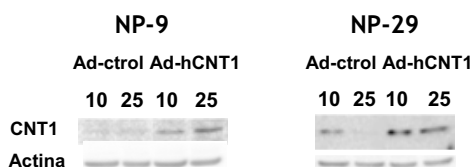


Fig. 32. Nivells de proteïna hCNT1 a les línies infectades amb Ad-hCNT1. Les cèl·lules es van infectar amb 10 i 25 m.o.i. i a les 72 hores es va realitzar l'extracció de proteïna.

2.3. Efecte de la sobreexpressió de hCNT1 sobre la morfologia i el cycle cel·lular

La infecció amb l'Ad-hCNT1 produeix canvis en la morfologia de les cèl·lules que sobreexpressen el transportador, canvis que, s'accentuen amb el temps i responen de forma clara a la dosi del virus (Fig. 33). Ambdues línies cel·lulars presenten un augment de mida respecte als cultius infectats amb l'adenovirus

control. A més, als cultius que sobreexpressen hCNT1 apareix una població de cèl·lules més arrodonides i d'aspecte refringent que sembla suggerir la presència de mecanismes de mort cel·lular. Aquests efectes es detecten unes 24 hores abans a la línia NP-29, que a la línia NP-9, fet que podria estar relacionat amb els nivells basals del transportador elevats que presenta aquesta línia.

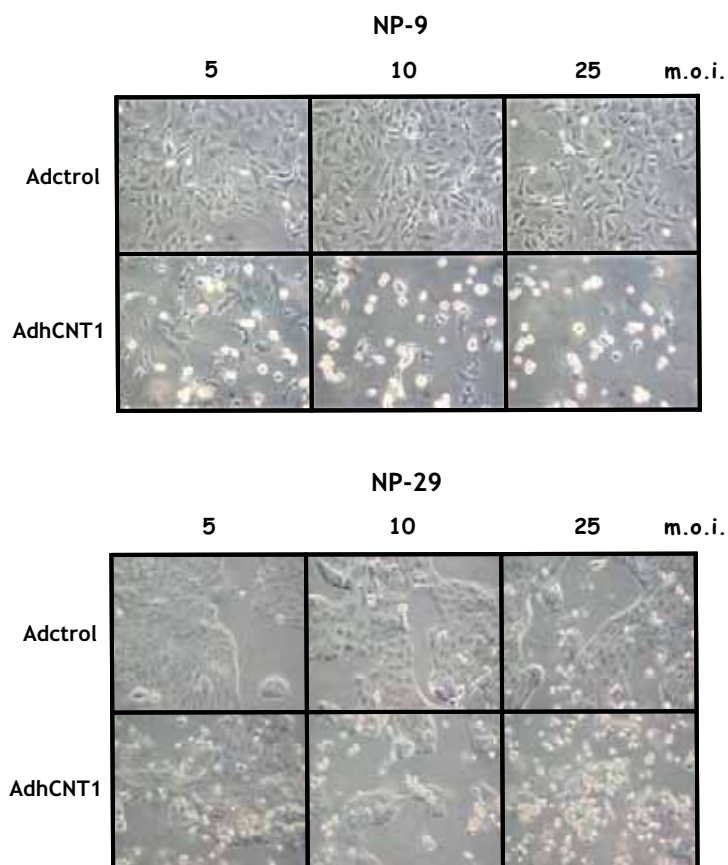


Fig. 33. Morfologia de les línies NP-9 i NP-29 després de la transferència de hCNT1. Les cèl·lules es van infectar amb 5, 10 i 25 m.o.i.. Fotomicrografies de contrast de fases (200x), NP-9 a les 96 hores i NP-29 a les 72 hores després de la transducció.

Arran d'aquests canvis en la morfologia de les cèl·lules decidírem analitzar el perfil del cicle cel·lular. Amb aquest objectiu, les cèl·lules es varen infectar amb diverses m.o.i. de l'Ad-hCNT1 i de l'adenovirus control i un cop transcorregudes 48 hores, es va realitzar un marcatge amb iodur de propidi. L'anàlisi per citometria de flux posa de manifest un augment significatiu del percentatge de cèl·lules a la fase S del cicle cel·lular, que respon a la dosi d'Ad-hCNT1 emprada (Fig. 34). A més, aquest ja s'observa, encara que en menor mesura, a les 24 hores de la infecció. A la línia NP-9, a les 48 hores post-infecció el percentatge de cèl·lules a S varia des del 36.6% fins al 76.0% (5 i 25 m.o.i. respectivament) essent el control només un 23.5%. A la línia NP-29, el percentatge de cèl·lules a la fase S

oscil·la entre el 42 i el 73% (5 i 25 m.o.i. respectivament), mentre que al control aquest percentatge és tan sols un 29%.

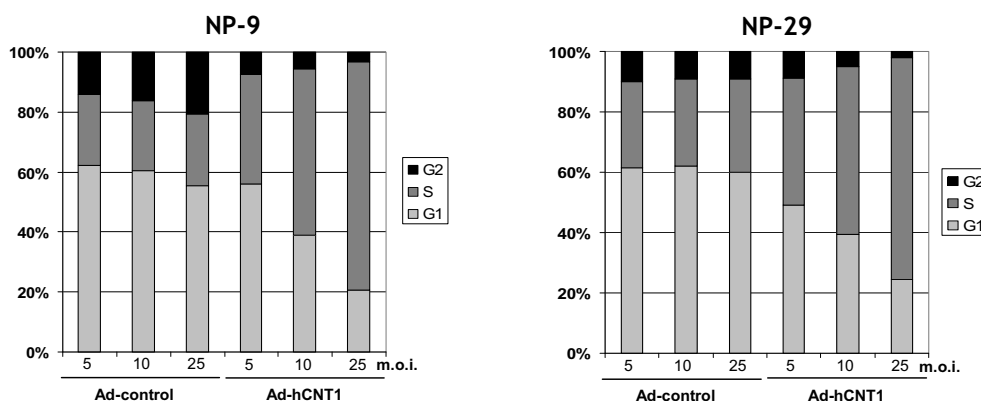


Fig. 34. Anàlisi del perfil de cycle a les línies NP-9 i NP-29 transduïdes amb Ad-hCNT1. Les cèl·lules es van infectar amb 5, 10 i 25 m.o.i. i 48 hores després es varen tenir amb iodur de propidi i analitzar al citòmetre de flux.

Aquests resultats es troben en concordança amb altres prèviament descrits. En cèl·lules d'hepatoma de rata (FAO) sincronitzades, s'observa un augment de l'expressió de rCNT1 durant la fase tardana de G₁, just abans de la síntesi de l'ADN, i aquest es manté durant la fase S (Valdes *et al.*, 2002). Aquest increment del transportador semblaria estar relacionat amb la necessitat extra de nucleòsids de la cèl·lula per fer front a la síntesi de l'ADN. En el nostre model, l'aturada de les cèl·lules a la fase S en resposta a la sobreexpressió de hCNT1 posa de manifest l'estreta relació d'aquest transportador amb la regulació del cycle cel·lular. Aquest augment de les cèl·lules en fase S es correspon a les dues línies amb una pujada de la ciclina E (Fig. 35). Aquesta ciclina està implicada en la transició G₁-S del cycle i els seus nivells presenten un pic a l'inici de la fase S que disminueix ràpidament.

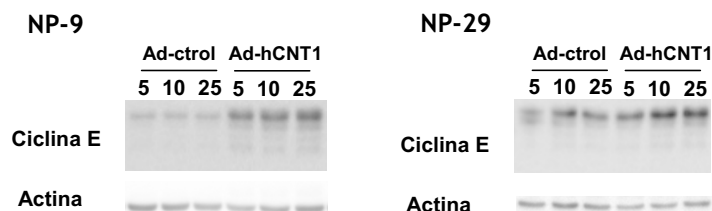


Fig. 35. Immunodetecció de ciclina E a les línies NP-9 i NP-29 transduïdes amb Ad-hCNT1. Les cèl·lules es van infectar amb 5, 10 i 25 m.o.i. i 48 hores després es va realitzar l'extracció de proteïna.

La fase S del cicle cel·lular es caracteritza per una completa i acurada duplicació de tot el genoma de la cèl·lula. En aquest sentit, la disponibilitat de dNTPs és un clar factor limitant per a la replicació del material genètic i la seva síntesi s'incrementa de forma espectacular a l'inici d'aquesta fase. Els dNTPs es poden obtenir per dues vies; mitjançant la síntesi *de novo* on la ribonucleòtid reductasa redueix els ribonucleòsids difosfat intracel·lulars a desoxiribonucleòtids difosfat, o bé, per la via de salvament que mitjançant una cascada de quinases, fosforila els desoxinucleòsids introduïts a la cèl·lula mitjançant els transportadors de nucleòsids.

La família dels E2F són factors de transcripció que juguen un rol clau en l'activació i la coordinació de la duplicació de l'ADN, l'aturada del cicle cel·lular i l'apoptosi. Dins de la família dels E2F, l'E2F-1 és el principal regulador de la transició a través de la fase S. E2F-1, a la fase S tardana induïx la síntesi de múltiples enzims necessaris per a l'obtenció i la síntesis dels dNTPs i de l'ADN, com poden ser la timidina quinasa, timidilat sintasa i la ribonucleòtid reductasa 2 (Harbour and Dean, 2001). Al mateix temps, també s'encarrega d'induir gens relacionats en la transició G1-S, incloent la ciclina E, la ciclina A i la Cdk2. En aquesta línia, s'ha suggerit la possibilitat de que el dTTP sigui un regulador alostèric d'E2F-1 mitjançant un retro-control que relaciona la quantitat d'E2F-1 amb les seves necessitats per a la síntesi de l'ADN (Harbour and Dean, 2001).

L'arrest de les cèl·lules a la fase S, junt amb l'augment sostingut de ciclina E que s'observa després de la infecció amb Ad-hCNT1, posaria de manifest una hiperactivació d'E2F-1 que podria ser deguda a un augment dels dNTPs intracel·lulars.

2.4. Efectes de la sobreexpressió de hCNT1 sobre la mort cel·lular

Com ja s'ha demostrat abans, la sobreexpressió del transportador concentratiu hCNT1 augmenta el transport de nucleòsids a l'interior de la cèl·lula. Però, cal tenir en compte que CNT1 és un transportador de pirimidines (uridina, timidina i citidina; K_m de 40-60 μ M, 6 μ M i 34 μ M respectivament) (Pastor-Anglada, 2006), el que pot produir clarament un desbalancejament dels cúmuls de dNTPs intracel·lulars. Existeixen diverses dades que posen de manifest la relació entre canvis en els nivells i la relació entre els dNTPs amb mort. Així doncs, el següent punt que vàrem analitzar fou la inducció d'apoptosi per unió a Annexina V.

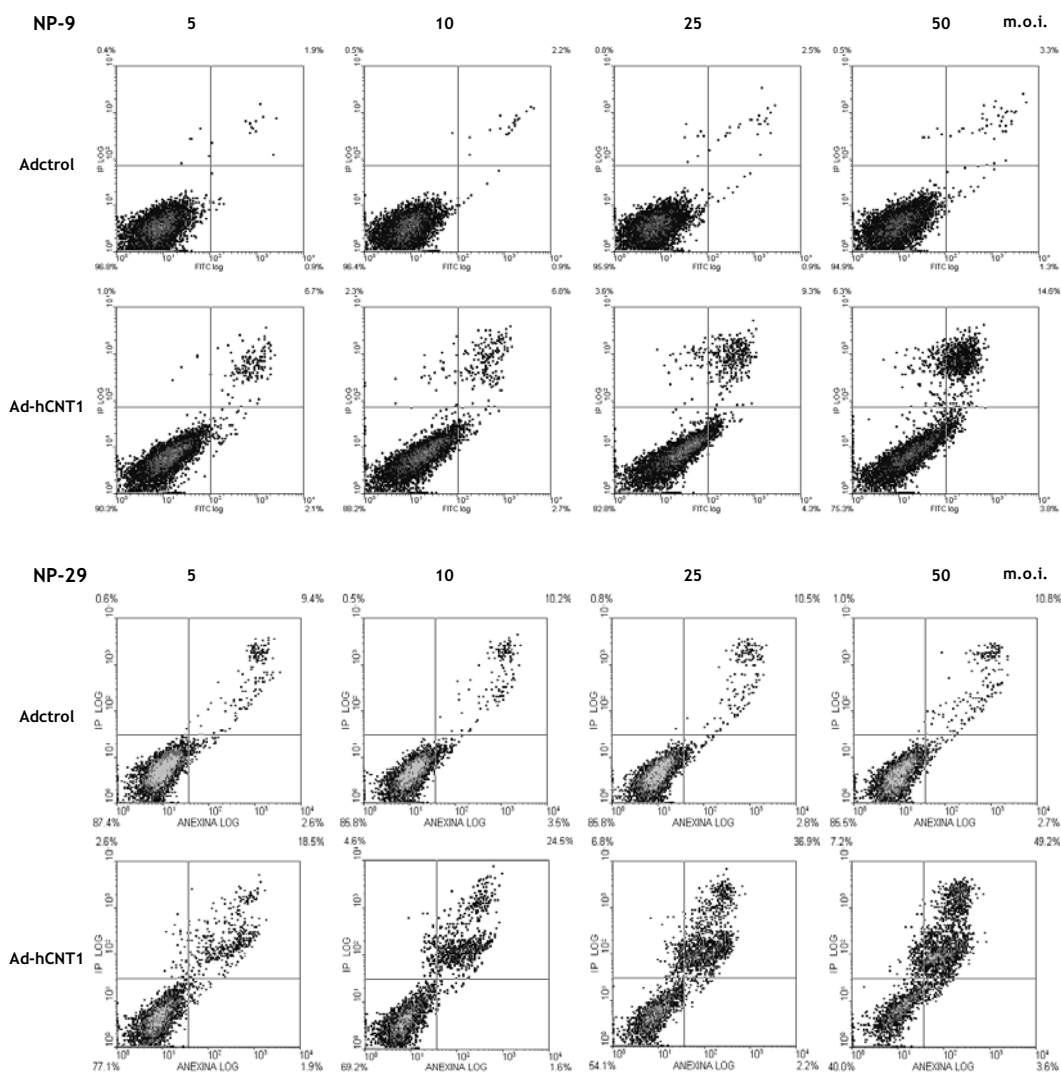


Fig 36. Detecció d'apoptosi per unió a annexina V. Les línies NP-9 i NP-29 es van infectar amb m.o.i. creixents i 96 i 72 hores post-infecció respectivament, es va realitzar la incubació amb annexina V marcada amb FITC. Es representa el diagrama del doble marcatge annexina i iodur de propidi (FITC log vs IP log)

Els resultats obtinguts (Fig 36) mostren que a cap de les dues línies analitzades s'observa marcatge amb annexina V sense entrada de iodur de propidi. De fet, en els dos casos les cèl·lules transduïdes amb hCNT1 passen directament al quadrant amb el doble marcatge annexina/iodur de propidi de forma dosi dependent. Això, corrobora el que es veu a l'anàlisi morfològic de les cèl·lules, on s'observa un augment de les cèl·lules refringents indicatiu de mort cel·lular. A més, cal destacar que en ambdós casos l'apoptosi tampoc es detecta a temps més curts; per tant, aquesta població de cèl·lules amb el doble marcatge no es correspon a una apoptosi tardana. Com a prova addicional d'apoptosi vàrem decidir analitzar la proteolització de PARP a les 48 i 72 hores post-infecció (Fig 37).

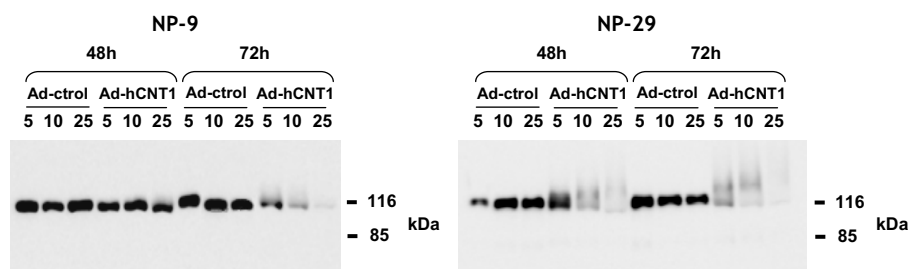


Fig. 37. Immunodetecció de PARP-1 a les línies NP-9 i NP-29 transduïdes amb Ad-hCNT1. Les cèl·lules es van infectar amb 5, 10 i 25 m.o.i. i 48 hores després es va realitzar l'extracció de proteïna.

També en aquest cas, a cap de les dues línies s'observa l'aparició de bandes proteolitzades després de la sobreexpressió de hCNT1. Sorprenentment, a les dues línies cel·lulars s'observa l'aparició de bandes superiors al pes molecular de PARP-1 amb aparença d'esborrall. Aquest fenomen s'aprecia clarament a la línia NP-29, on ja es detecta de forma clara a les 48 hores, mentre que a NP-9 no succeeix fins a les 72 hores. A més, l'aparició d'aquestes bandes segueix un patró dosi dependent.

La família de proteïnes PARP s'encarrega de la síntesi d'homopolímers d'ADP-ribose unitdes per enllaços glicosídics. El procés de formació d'aquests homopolímers inclou tres etapes: iniciació, elongació, ramificació i alliberament d'aquests. PARP-1 catalitza la transferència d'ADP-ribose des del NAD^+ a si mateixa i a diverses proteïnes nuclears. Aquesta capacitat intrínseca de PARP-1 per autoribosilar-se, explicaria l'aparició d'aquestes bandes superiors al pes molecular esperat, al mateix temps que desapareix la banda majoritària de 116 kDa. Aquest patró de bandes s'ha vist en experiments *in vitro* on s'incuben nuclis aïllats de fetge de rata amb temps i concentracions de NAD^+ creixents (Ogata *et al.*, 1981).

Una activació excessiva de PARP-1 provoca una disminució dels nivells citosòlics del seu substrat (NAD^+). Al seu torn, els esforços de la cèl·lula per sintetitzar-lo produeixen una reducció dràstica dels nivells d'ATP, provocant així la necrosi d'aquesta per una pèrdua d'energia (Ha and Snyder, 1999). En conseqüència, alguns estudis han demostrat que la inhibició de l'activitat de PARP és capaç de bloquejar la necrosi (Walisser and Thies, 1999; Filipovic *et al.*, 1999; Zong *et al.*, 2004).

La proteïna PARP-1 s'activa per dany a l'ADN i quan aquest no és molt important a la cèl·lula s'activen els mecanismes de reparació o en el seu defecte l'apoptosi. No obstant, quan el dany és molt extens, es produeix una hiperactivació de PARP que desemboca en necrosi (Ha and Snyder, 1999). Les concentracions intracel·lulars dels dNTPs estan finament regulades i alteracions en els nivells d'aquests tenen conseqüències genotòxiques com poden ser un augment de la mutagènesi, l'estimulació de recombinacions genètiques,

anormalitats cromosòmiques, fragmentació de l'ADN i mort cel·lular (revisat per (Kunz *et al.*, 1994 i recentment per Mathews, 2006). En aquest sentit, l'augment del transport provocat per la sobreexpressió de hCNT1 estaria alterant els nivells de dNTPs, no tant per un augment d'aquests, sinó per una descompensació de la relació existent entre ells. Cal tenir en compte que aquest transportador concentratiu permet únicament l'influx de pirimidines, el que estaria desbalancejant l'equilibri entre purines i pirimidines. Aquestes alteracions en els dNTPs intracel·lulars podrien ser les responsables de la hiperactivació de PARP-1 i de la inducció final de necrosi a les línies cel·lulars NP-9 i NP-29.

La inducció de necrosi pot ser clau en aquell tipus de tumors refractaris a la mort per apoptosi. A més, la necrosi per hiperactivació de PARP és una mort regulada (Zong *et al.*, 2004) i és selectiva de cèl·lules altament dependents de la glicòlisi aeròbica per a la producció de NAD⁺, com poden ser les cèl·lules tumorals. De totes maneres, cal tenir en compte que la necrosi indueix una ràpida resposta pro-inflamatòria. Aquesta pot servir d'ajuda per portar al tumor les cèl·lules citotòxiques del sistema immune, el que pot al mateix temps ajudar a la quimioteràpia. No obstant, aquesta resposta inflammatòria pot malmetre el teixit normal que l'envolta i induir la producció de citoquines com la HMGB1 (*high-mobility group box 1 protein*) i el HDGF (*hepatoma-derived growth factor*). Aquestes citoquines poden activar vies de senyalització que promouen el creixement i la migració cel·lular i, per tant, metàstasis associades (Lotze and Tracey, 2005; Zhou *et al.*, 2004). Així doncs, la necrosi no seria el mètode d'elecció per eliminar cèl·lules tumorals, però pot ésser de gran ajut en tumors amb alteracions en les seves vies apoptòtiques.

2.5. Efectes de la sobreexpressió de hCNT1 en un model *in vivo*

A partir dels efectes observats *in vitro* per la infecció amb l'Ad-hCNT1, varem decidir analitzar que succeïa en un model *in vivo*. Per això, varem inocular $6 \cdot 10^6$ cèl·lules de la línia NP-9 en ambdós flancs de ratolins atímics femella Balb/C nu/nu. Els tumors es van deixar créixer fins assolir un volum mig de 90 mm^3 , moment en el qual es van repartir en quatre grups i es va iniciar el tractament. El tractament va consistir en tres cicles d'injecció intratumoral de $1 \cdot 10^8$ pfu/tumor d'Ad-hCNT1 seguit 48 hores després, d'una administració intraperitoneal de 75 mg/kg de gemcitabina. El virus es va administrar en quatre injeccions de 5 μl intentant assolir el màxim volum possible del tumor. Els cicles es van realitzar un per setmana durant tres setmanes consecutives. Tal i com s'observa a la figura 38, l'Ad-hCNT1 provoca una reducció del creixement en els tumors respecte els infectats amb l'adenovirus control, però, el tractament amb gemcitabina no produeix cap variació.

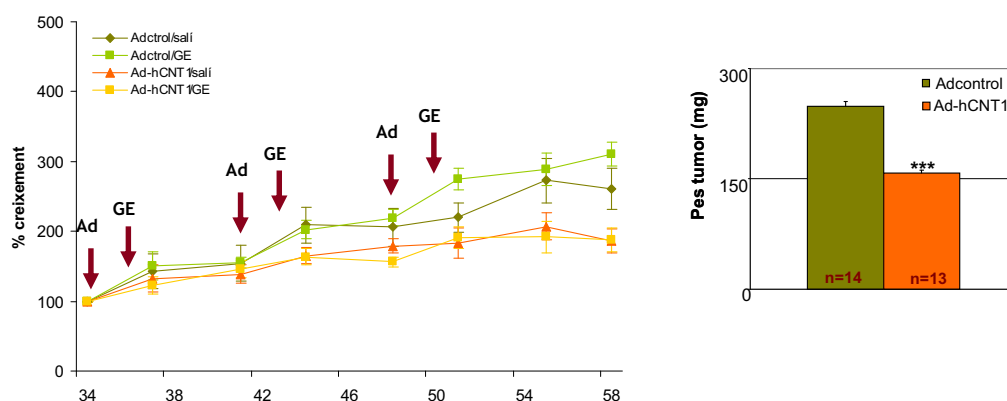


Fig. 38. Efecte del tractament amb Ad-hCNT1 combinat amb gemcitabina sobre el percentatge de creixement i el pes dels tumors NP-9. El percentatge de creixement es refereix a la mida dels tumors a l'inici del tractament. En color verd els tumors infectats amb Adctrol i amb color carbassa els tumors infectats amb Ad-hCNT1. Les fletxes denoten els moments on es va realitzar la injecció viral i l'administració de gemcitabina. $p < 0.005$ respecte el grup Adctrol.

El pes dels tumors corrobora el que s'observa a la gràfica de percentatge de creixement. Com que el tractament amb gemcitabina no féu efecte, aquests tumors es van considerar com els tractats amb salí augmentant així la n dels dos grup. Les diferències entre els dos grups és estadísticament significativa amb una $p < 0.005$, essent la mitja del grup Adctrol 248 mg i la del grup Ad-hCNT1 157 mg. A més, cal destacar, l'aspecte macroscòpic intern dels tumors que sobreexpressaven hCNT1 era necròtic. Aquests resultats anirien en la mateixa línia de les observacions *in vitro*, on s'apuntava la mort cel·lular per necrosi.

Per altra banda, per tal d'analitzar els efectes de la gemcitabina en tumors que sobreexpressen hCNT1 vàrem repetir l'assaig *in vivo* augmentant la dosi del fàrmac a 150 mg/kg i la dels adenovirus a $2 \cdot 10^8$ pfu/tumor (Fig. 39). El patró de tractament fou el mateix que l'emprat en l'experiment anterior.

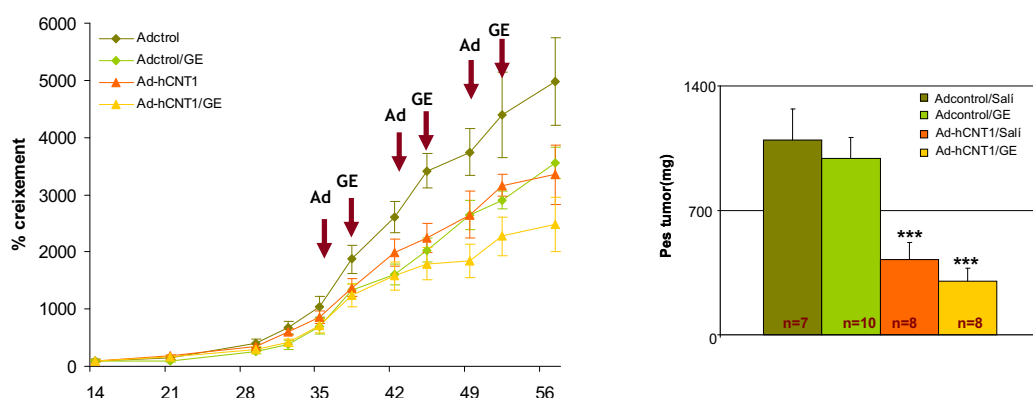


Fig. 39. Efecte del tractament amb Ad-hCNT1 combinat amb gemcitabina sobre el percentatge de creixement i el pes dels tumors NP-9 II. El percentatge de creixement es refereix a la mida dels tumors a dia 14. En color verd els tumors infectats amb Adctrol (en verd clar els GE) i amb color carbassa els tumors infectats amb Ad-hCNT1 (en carbassa clar els GE). Les fletxes denoten els moments on es va realitzar la injecció viral i l'administració de gemcitabina. $p < 0.005$ respecte el grup Adctrol.

En aquests segon experiment *in vivo* es corrobora l'efecte de l'Ad-hCNT1 sobre la inhibició del creixement dels tumors subcutanis de NP-9, que s'intueix a partir de la primera injecció i queda patent després de la segona. A més el pes final dels tumors confirma els resultats del seguiment i posa de manifest una disminució del creixement del 50%; essent el pes mig del grup Adctrol 1094 mg i el del grup Ad-hCNT1 422 mg. Per altra banda, els efectes del tractament amb gemcitabina s'observen en els dos grups i són de magnitud similar. No obstant, les diferències dels dos virus combinats amb gemcitabina respecte el seu control no són estadísticament significatives. La infecció amb Ad-hCNT1 no ha millorat els efectes del tractament amb gemcitabina. Això pot ser degut a que la administració del fàrmac 48 hores després de la infecció no és el temps òptim, degut a que les cèl·lules que han rebut l'adenovirus ja estan arrestades a la fase S. Per tant, caldria provar administracions de gemcitabina a temps més curts post-infecció. Resultats previs obtinguts al nostre grup demostren la importància temporal de la combinació de la gemcitabina amb proteïnes que alteren el perfil de cicle cel·lular. Aquests experiments mostren que la sobreexpressió de p53 (que arresta les cèl·lules a la fase G1) abans del tractament amb el fàrmac interfereix amb la gemcitabina provocant així, quimioresistència (Cascallo *et al.*, 2000).

3. Comunicació intercel·lular i sensibilitat a gemcitabina

Tot i els avenços assolits, l'elevada mortalitat associada a algun tipus de càncer, com el de pàncreas, continua essent un llast important. És per això que cal buscar noves fórmules per millorar i innovar els tractaments actuals. En aquesta línia, la potenciació dels efectes de la gemcitabina, fàrmac que fins al moment ha mostrat una major eficàcia en el tractament del càncer de pàncreas, pot representar un petit avenç. Una de les possibilitats per millorar l'eficàcia d'un tractament és l'anomenat efecte adjacent. Aquest ha estat demostrat en diversos sistemes de gens bioactivadors de pro-drogues i es basa en la difusió del fàrmac activat a cèl·lules adjacents on aquest no havia arribat. Un dels sistemes més estudiats i caracteritzat és el del ganciclovir i la timidina quinasa de l'herpes virus (HSV-tk). L'eficàcia d'aquest sistema, ha estat demostrada en tumors pancreàtics per diversos autors (Carrio *et al.*, 1999; DiMaio *et al.*, 1994; Ohashi *et al.*, 1998; Rosenfeld *et al.*, 1997; Cascante *et al.*, 2005). Malgrat s'ha proposat més d'un mecanisme per explicar aquest efecte, la contribució més important és el pas del ganciclovir activat a través de les unions de tipus gap. El ganciclovir és un anàleg de guanosina i la HSV-tk metabolitza el fàrmac a la seva forma monofosforilada, aleshores quinases cel·lulars s'encarreguen de di- i tri-fosforilar-lo. La gemcitabina, al igual que el ganciclovir, és una anàleg de nucleòsid que s'activa per fosforilació. Però, a diferència d'aquest, la seva metabolització la duen a terme quinases cel·lulars. La similitud entre ambdós fàrmacs suggereix la possibilitat de què la gemcitabina activada pugui passar d'una cèl·lula a l'altra a través de les unions gap.

Així doncs, amb aquestes premisses, l'objectiu d'aquest capítol fou la determinació de l'existència de l'efecte adjacent en cèl·lules tractades amb gemcitabina tant *in vitro* com *in vivo*.

3.1. Determinació de l'efecte adjacent en cèl·lules tractades amb gemcitabina

3.1.1. Co-cultius control

Per dur a terme aquest objectiu, en primer lloc vàrem haver de posar a punt un protocol per tal de poder determinar l'efecte adjacent en cèl·lules tractades amb gemcitabina. En el sistema ganciclovir/HSV-tk es barregen, en diferents proporcions, poblacions de cèl·lules que contenen la HSV-tk amb altres que no la contenen. Això permet observar que el percentatge de cèl·lules que es moren és més elevat que l'esperat si tenim en compte que el fàrmac només s'activa a les cèl·lules que contenen la HSV-tk. A diferència d'aquest, la gemcitabina s'activa per una quinasa endògena en cèl·lules humanes, la desoxicitidina quinasa. Això dificulta el disseny experimental, ja que no es poden barrejar poblacions cel·lulars que la contenen amb altres que no. Per tant, la primera aproximació fou

barrejar cèl·lules tractades amb cèl·lules no tractades. La línia escollida fou NP-18, que es caracteritza per tenir una elevada comunicació i mostra efecte adjacent amb el sistema ganciclovir/HSV-tk (Carrio *et al.*, 2001). Per aquests experiments es va escollir una concentració de gemcitabina elevada per tal d'assegurar que la mortalitat del 100% de cèl·lules tractades fos superior al 80% (60 nM). Les cèl·lules es sembraven en plaques i es tractaven amb gemcitabina o se'ls canviava el medi, i 24 hores més tard, al final del tractament es recollien, es co-cultivaven a les proporcions desitjades i es deixaven créixer 48 hores més. Tal i com es pot veure a la figura 40a, en aquests experiments no vàrem detectar efecte adjacent. Malgrat això, no podíem descartar que aquest resultat fos degut al fet que les cèl·lules tractades estiguessin massa afectades per tal d'adherir-se i formar les unions de tipus gap. Aleshores, ens vàrem plantejar un nou disseny experimental on les cèl·lules tractades no es manipulen. Aquest consisteix en sembrar el percentatge de cèl·lules a tractar i tot just s'adhereixen a la placa (entre 4 i 6 hores després) s'afegeix la gemcitabina; 24 hores més tard es retira el fàrmac, es sembra al damunt la resta de cèl·lules i es deixen créixer 72 hores més. Amb aquest nou protocol, vàrem aconseguir visualitzar un clar efecte adjacent a la línia NP-18 (Fig. 40b). En els co-cultius on només un 10% de les cèl·lules estan tractades la mortalitat és del 15%, amb el 20% de cèl·lules tractades és superior al 40% i en el de 30% aquesta augmenta fins al 70%.

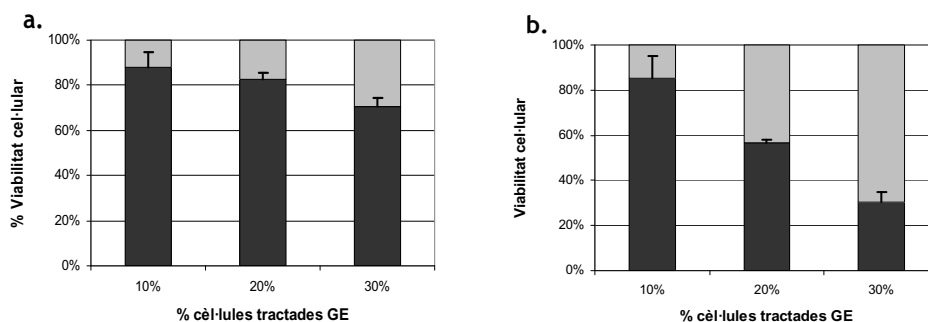


Fig. 40. Optimització dels co-cultius. La barra negra representa el percentatge de viabilitat i la gris el de mortalitat. Cada percentatge es calcula respecte al seu 100% que consisteix en co-cultius de cèl·lules no tractades. Els resultats són la mitjana ± ES de quatre mesures.

Un cop posat a punt el protocol vàrem voler analitzar la presència d'efecte adjacent en línies provinents de càncer de pàncreas amb diferents nivells de comunicació. Per això, vàrem escollir les línies BxPC3 i MIA PaCa-2 que presenten una comunicació intermèdia i baixa, respectivament. La comunicació d'aquestes línies ha estat caracteritzada en el marc de la tesi doctoral de la Laura Rodríguez del grup de la Dra C.Fillat. Breument, aquesta caracterització s'ha realitzat mitjançant la detecció de dos colorants (DI i calceïna) per FACS.

El DI tenyeix la membrana de les cèl·lules de forma permanent i la calceïna incolora es metabolitza a l'interior de la cèl·lula i passa d'una cèl·lula a l'altre a través de les unions gap. Així doncs, es posen en contacte dues poblacions de cèl·lules tractades cada una amb un sol colorant i si hi ha comunicació entre elles apareixerà una població amb el doble marcatge. Els experiments de co-cultius es varen realitzar igual que els anterior però emprant percentatges de cèl·lules més elevats per assegurar l'establiment de contactes. En aquest cas les línies són més resistents a la gemcitabina i la concentració emprada ha estat de 100 nM. A la figura 41 es mostra com a la línia de comunicació intermèdia BxPC3, s'observa efecte adjacent, essent el percentatge de mortalitat superior al percentatge de cèl·lules tractades en tots els casos. Si els percentatges de cèl·lules tractades són 25, 50 i 75%, la mortalitat és del 41, 64 i 80% respectivament. A la línia de baixa comunicació, el percentatge de mortalitat en cap cas supera el de cèl·lules tractades. A més, aquest es troba per sota de l'esperat, essent 20, 40 i 58%. El fet que els percentatges de mortalitat siguin inferiors als de cèl·lules tractades s'explica pel fet que la mortalitat en el 100% de cèl·lules tractades és del 80%. Si tenim en compte aquest nombre, el percentatge de cèl·lules mortes es correspon a les cèl·lules tractades. El que posa de manifest que la gemcitabina no ha arribat a les cèl·lules no tractades, o si més no, no en suficient quantitat per produir-ne la mort.

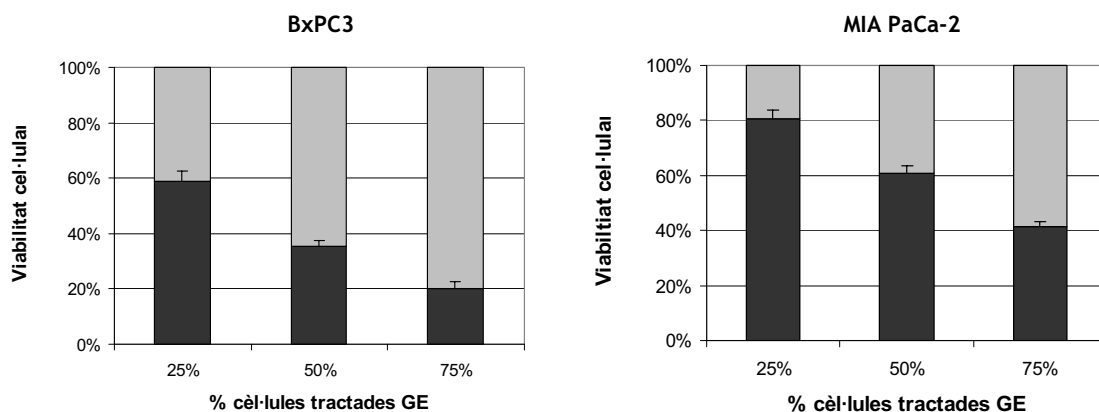


Fig. 41. Co-cultius a les línies BxPC3 i MIA PaCa-2. La barra negra representa el percentatge de viabilitat i la gris el de mortalitat. Cada percentatge es calcula respecte al seu 100% que consisteix en co-cultius de cèl·lules no tractades. Els resultats són la mitjana \pm ES de quatre mesures.

Els resultats obtinguts posen de manifest l'existència d'una relació entre el nivell de comunicació intercel·lular i l'efecte adjacent associat al tractament amb gemcitabina. Així doncs, vàrem voler analitzar la implicació de les unions gap en aquest efecte. Per això, vàrem escollir la línia NP-18, que com ja s'ha esmentat abans presenta una comunicació elevada i un efecte adjacent important amb el tractament amb gemcitabina, i la línia MIA PaCa-2, amb una pobre comunicació i un efecte adjacent inexistent. Les unions gap són agrupaments de canals intercel·lulars formats per dos hemicanals, un de cada cèl·lula, anomenats connexons que estan constituïts per 6 connexines. Fins al moment, s'han identificat 20 isoformes diferents en humans. Cada una mostra una expressió específica en funció del tipus cel·lular o del teixit, tot i que sovint s'expressa més d'una isoforma. De totes elles, la connexina 26 és una de les més expressades en pàncreas (Meda *et al.*, 1993) i ha demostrat la capacitat d'augmentar la toxicitat del ganciclovir entre cèl·lules que expressen la HSV-tk i cèl·lules que no l'expressen (Mesnil *et al.*, 1997; Carrio *et al.*, 2001). Per aquest motiu, decidírem analitzar la citotoxicitat de la gemcitabina en cocultius de NP-18 i MIA PaCa-2 transfectades de forma estable amb la Cx26. La línia NP-18 Cx26 havia mostrat, en un treball previ, un increment de l'efecte adjacent en el model HSV-tk respecte la NP-18 parental (Carrio *et al.*, 2001). Mentre que la MIA PaCa Cx26 no havia estat assajada prèviament.

3.1.2. Modulació de la sensibilitat a gemcitabina per sobreexpressió de Cx26

En primer lloc, vàrem realitzar corbes dosi-resposta per tal d'analitzar la sensibilitat de les quatre línies al fàrmac. A ambdues línies transfectades amb Cx26 es produeix un augment en la sensibilitat a gemcitabina. A més aquest, és del mateix ordre a les dues línies, quasi dues vegades més sensibles. Així, la línia NP-18 Cx26 és més sensible a la gemcitabina que la parental, fet que s'observa clarament a dosis baixes del fàrmac. La seva IC_{50} passa de 7.3 a 4.1 nM, 1.8 vegades més baixa (Fig. 42). Per altra banda, la línia MIA PaCa-2 Cx26 també presenta una sensibilitat augmentada al fàrmac, essent la seva IC_{50} 1.9 vegades inferior; 48.6 i 26.0 nM per la parental i la Cx26 respectivament (Fig. 42).

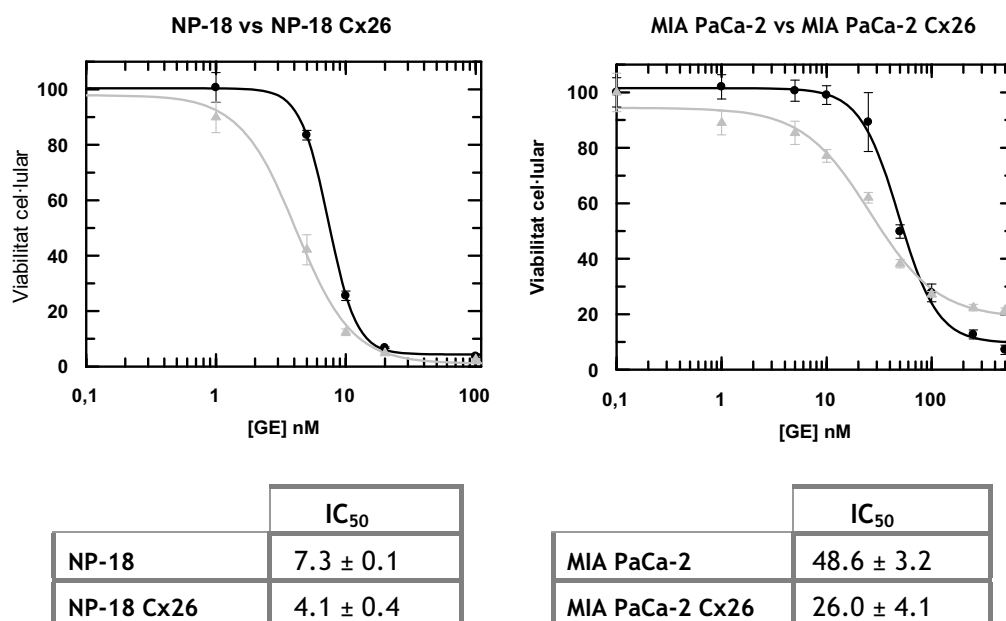


Fig. 42. Corbes dosi-resposta a gemcitabina de les línies NP-18, MIA PaCa-2 i les respectives transfectants estables de Cx26. En color negre la línia parental i en gris la Cx26. Les cèl·lules es van tractar amb dosis creixents de gemcitabina i 72 hores més tard es va mesurar la viabilitat cel·lular. Els resultats són la mitjana ± ES de quatre mesures.

Aquest resultat, pot indicar la implicació de les connexines i les unions gap en la sensibilitat al fàrmac. De totes maneres, en aquest tipus d'experiment totes les cèl·lules tenen accés al fàrmac i per tant el pas del fàrmac activat a través de les unions gap tindria menor importància que en situacions de difícil accés del fàrmac. Cal destacar que aquest increment en la sensibilitat s'aprecia d'una forma més clara a dosis baixes del fàrmac, el que aniria a favor de la potenciació dels efectes d'aquest a través de les unions gap.

3.1.3. Co-cultius amb cèl·lules transfectades amb Cx26

Un cop determinada la sensibilitat al fàrmac, vàrem realitzar els experiments de co-cultius per determinar si l'augment de connexines podia afectar a la capacitat d'induir la mort de les cèl·lules adjacents no tractades. Els assajos es varen realitzar seguint el protocol detallat abans. El que s'observa en ambdues línies cel·lulars és que l'expressió de la Cx26 indueix un augment de l'efecte adjacent (Taula 13). Així a la línia NP-18 Cx26 amb un 10% de cèl·lules tractades, l'augment de mort respecte el percentatge esperat és d'un 37.1 en front al 5.2% de la línia NP-18. Si el percentatge tractat és el 20% l'increment de la mortalitat és d'un 53.8% respecte al 24.2% de la línia parental. El que mostra una relació clara entre la capacitat de potenciar la toxicitat del fàrmac per efecte adjacent i la Cx26. Pel que fa a la línia MIA PaCa-2, la sobreexpressió de la Cx26 també

aconsegueix millorar la toxicitat de la gemcitabina. Aquesta passa d'una incapacitat per produir la mort de les cèl·lules adjacents, a un increment del 8.9% sobre la mort esperada amb un 25% de les cèl·lules tractades. Quan el percentatge de cèl·lules tractades augmenta fins al 50% la mortalitat s'incrementa un 5.6%.

	10% cèls GE	20% cèls GE		25% cèls GE	50% cèls GE
NP-18	5.2	24.2	MIA PaCa-2	-1.4	0.9
NP-18 Cx26	37.1	53.8	MIA PaCa-2 Cx26	8.9	5.6

Taula 13. Efecte adjacent a les línies parentals respecte les línies transfectades amb Cx26. Els valors representen el percentatge d'increment de la mortalitat respecte la que seria esperable. Aquest valor s'ha calculat segons la següent fórmula:

% de mortalitat al X% de cèl·lules tractades - X% de la mortalitat màxima (100%).

Els resultats són la mitjana ± ES de quatre mesures.

Els experiments de co-cultius amb ambdues línies cel·lulars posen de manifest la importància d'una bona comunicació intercel·lular per millorar l'efecte citotòxic del tractament amb gemcitabina. A més, aquesta citotoxicitat pot ésser potenciada mitjançant l'augment de la connexina 26. Curiosament, la potenciació és més gran quan partim d'una situació de comunicació intercel·lular elevada.

3.2. Potenciació dels efectes de la gemcitabina per sobreexpressió de Cx26 *in vivo*

Arran dels resultats obtinguts *in vitro*, ens vàrem plantejar com respondrien aquestes cèl·lules *in vivo*. En un model *in vivo*, les cèl·lules adopten un disposició tridimensional compacta que dificulta l'accessibilitat del fàrmac. Per aquests experiments, les línies escollides foren NP-18 i NP-18 Cx26 ambdues més sensibles a gemcitabina que les MIA PaCa-2 i amb una capacitat d'induir efecte adjacent superior. En primer lloc, vàrem voler analitzar la cinètica de creixement de les dues línies en un model subcutani, ja que tradicionalment s'ha relacionat la disminució dels nivells de connexines i/o d'unions gap amb el procés carcinogènic (revisat per Mesnil *et al.*, 2005). Per això, vàrem inocular $7 \cdot 10^6$ cèl·lules en ambdós flancs de ratolins atímics Balb/C nu/nu i el creixement es va monitoritzar 3 cops per setmana mitjançant la mesura de les dues dimensions del tumor. Com es pot observar a la figura 43 els tumors NP-18 Cx26 presenten un creixement clarament retardat respecte al de la línia parental. A més, l'èxit d'implantació dels tumors varia considerablement entre les dues línies. A la línia NP-18 el percentatge d'èxit fou del 90%, mentre que a la línia que sobreexpressa la Cx26 aquest es redueix fins al 65%. Aquesta observació aniria a favor del paper com a supressor tumoral clàssicament atribuït a les connexines.

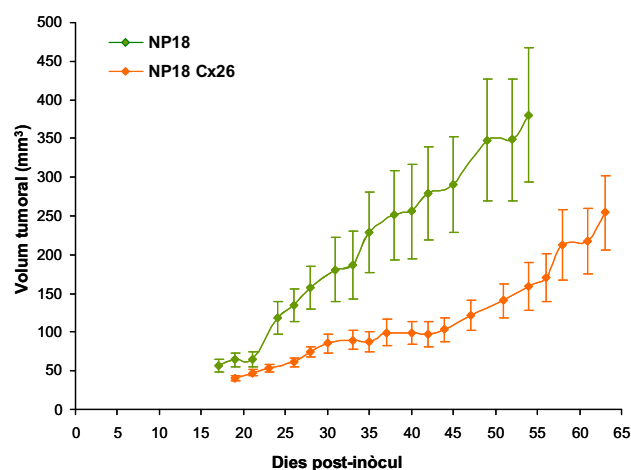


Fig. 43. Seguiment del creixement tumoral de les línies NP-18 i NP-18 Cx26. En color verd NP-18 i en carbassa la NP-18 Cx26. Les dades es mostren com a valors mitjos ($n = 8-10$) \pm S.E.M.

Un cop determinada la cinètica de creixement vàrem voler analitzar l'efecte del tractament amb gemcitabina sobre aquests tumors. Així, quan els tumors establerts, tal i com s'ha esmentat abans, van assolir un volum de 70 mm^3 es van tractar amb dues dosis setmanals de 160 mg/kg de gemcitabina intraperitoneal durant 5 setmanes consecutives. Els tumors NP-18 responen bé al tractament i el seu creixement s'inhibeix significativament. Així doncs, mentre que els tumors control tenen un volum final de 380.4 mm^3 , el dels tumors tractats és de 98.2 mm^3 (Fig. 44).

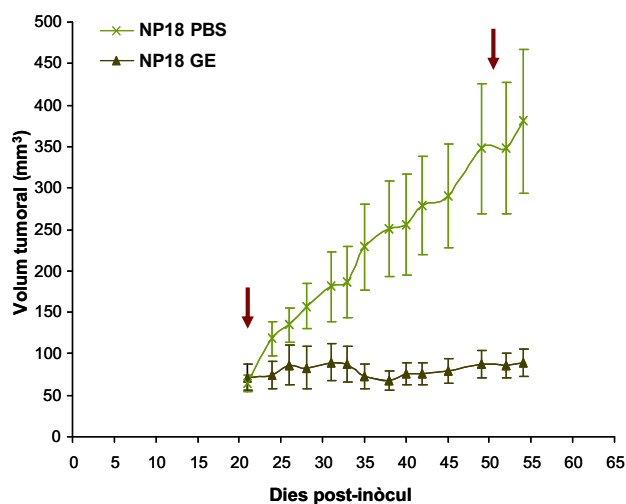


Fig. 44. Efecte del tractament amb gemcitabina sobre els tumors NP-18. En color verd clar els tumors control i en verd fosc els tractats amb gemcitabina. Les fletxes vermelles indiquen el moment d'inici i final del tractament. Les dades es mostren com a valors mitjos ($n = 8-10$) \pm S.E.M.

Els tumors NP-18 Cx26, responen molt bé al tractament amb el fàrmac. El seu creixement no tan sols es veu inhibit sinó que aquests regressionen (Fig. 45). La mida final d'aquests tumors tractats amb gemcitabina (35.2 mm^3) és la meitat que el volum inicial mentre que en els tumors NP-18 només s'aconsegueix establitzar el seu creixement, el seu volum final és 1.4 vegades l'inicial (98.2 mm^3).

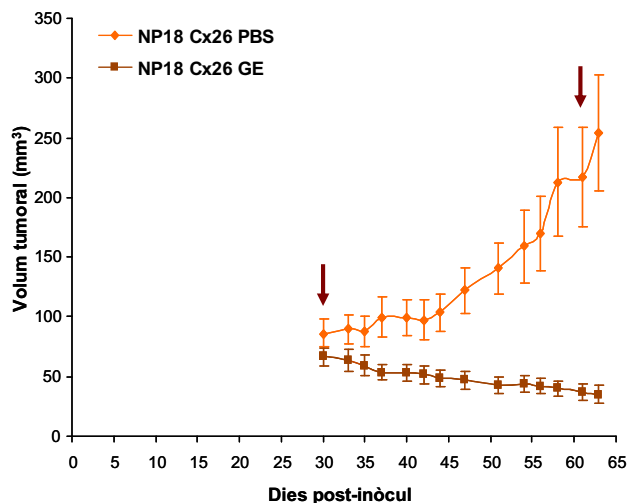


Fig. 45. Efecte del tractament amb gemcitabina sobre els tumors NP-18 Cx26. En color carbassa clar els tumors control i en carbassa fosc els tractats amb gemcitabina. Les fletxes vermelles indiquen el moment d'inici i final del tractament. Les dades es mostren com a valors mitjos ($n = 8-10$) \pm S.E.M.

Un cop extrets els tumors, es van fixar i es van fer talls histològics per tal d'analitzar els canvis en la seva morfologia i la presència de cèl·lules apoptòtiques pel mètode de TUNEL. La tinció amb hematoxilina-eosina posa de manifest un augment de volum d'algunes de les cèl·lules dels tumors tractats amb gemcitabina a ambdues línies, així com, la presència incrementada de teixit infiltrant (Fig. 46).

L'últim tractament amb gemcitabina es feu 48 hores abans del sacrifici, el que ens permet analitzar la presència d'apoptosi induïda per gemcitabina en els tumors tractats. La detecció d'apoptosi mitjançant la tècnica de TUNEL ens permeté visualitzar la presència d'apoptosi a tots els tumors tractats amb el fàrmac (Fig. 47). De totes maneres, aquesta sembla més elevada en els tumors de NP-18 Cx26 tractats amb gemcitabina que en els NP-18.

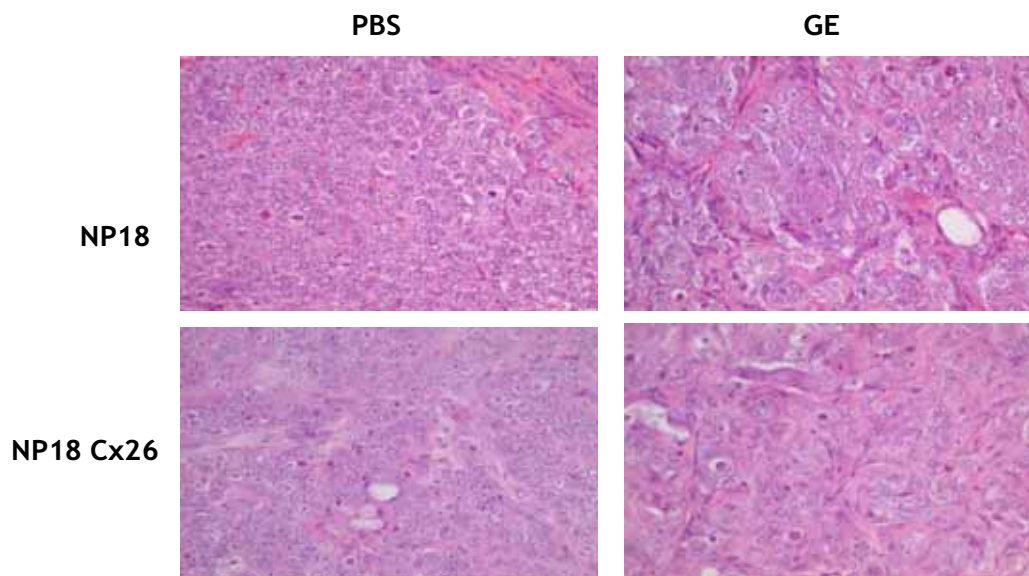


Fig. 46. Tinció hematoxilina-eosina dels tumor NP-18 i NP-18 Cx26 control i tractats. Es comparen tumors dels diferents grups mantinguts en parafina i obtinguts X dies després de la última dosi del fàrmac. Microfotografies 100x.

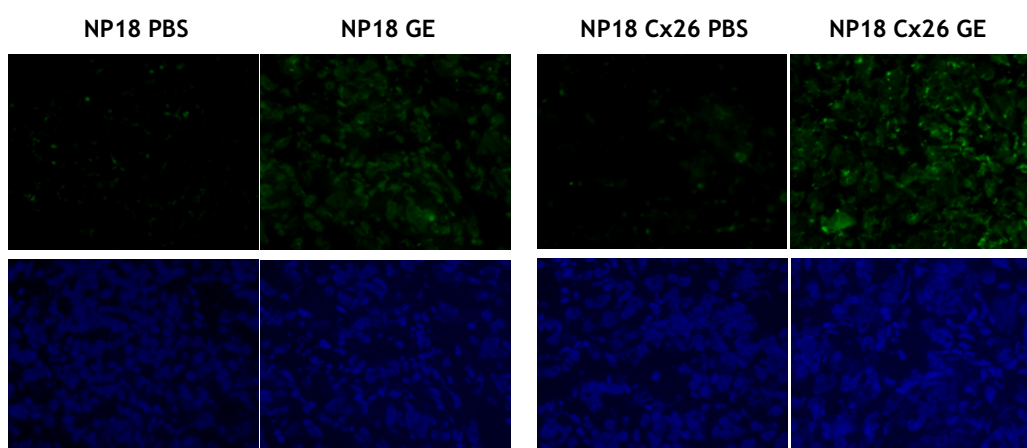


Fig. 47. Detecció d'apoptosi dels tumors NP-18 i NP-18 Cx26 control i tractats. L'anàlisi de la tinció TdT-terminal es va realitzar damunt de seccions d'OCT a dia 2 post-tractament. En verd la tinció de TUNEL i en blau la tinció dels nuclis amb DAPI. Microfotografies 100x.

El conjunt de resultats mostrats suggereix que la gemcitabina passa d'una cèl·lula a les seves veïnes a través de les unions gap, ja que els nivells de comunicació existent determinen la capacitat del fàrmac per matar les cèl·lules adjacents. Al mateix temps, aquest efecte adjacent es pot modular augmentant els nivells de Cx26. L'augment d'aquesta connexina produeix efecte adjacent quan aquesta es localitza a la membrana incrementant així, les unions gap (Carrió *et al.*, 2001). En aquest sentit, els tumors amb nivells més elevats d'unions gap responen d'una forma més eficient al tractament. A més, cal tenir en compte que, al igual que aquest efecte es produeix amb el ganciclovir i la gemcitabina, aquest també podria estar modulant l'eficàcia d'altres anàlegs de nucleòsids. Per tant, la modulació dels nivells d'unions gap podria afavorir el tractament amb anàlegs de nucleòsids, grup de fàrmacs àmpliament utilitzat en el tractament de molts tipus de tumors.

3.3. Augment del creixement tumoral *in vivo* per sobreexpressió de Cx26

No obstant, malgrat que en molts models *in vitro* i *in vivo* s'ha demostrat una correlació entre la pèrdua de connexines i la progressió tumoral, actualment aquesta relació s'ha mostrat més complexa (revisat per Mesnil *et al.*, 2005). Alguns autors han posat de manifest un increment de la Cx26 en càncer de pròstata entre les àrees benignes i les canceroses (Tate *et al.*, 2006) i un augment d'aquesta i de la Cx43 a les metàstasis de nòduls limfàtics de càncer de mama (Kanczuga-Koda *et al.*, 2006). L'expressió de la Cx43 també s'ha trobat augmentada en tumors de mama (Kanczuga-Koda *et al.*, 2003; Jamieson *et al.*, 1998). De totes maneres, l'escenari és realment complex ja que en alguns casos aquests augments han estat relacionats amb una localització citoplasmàtica de les connexines, que per tant no es correspondria amb la formació d'unions gap (Asamoto *et al.*, 1994; Sakamoto *et al.*, 1992; Krutovskikh *et al.*, 1994; Jamieson *et al.*, 1998).

En aquest sentit, la línia NP-31 transfectada establement amb Cx26 presenta nivells elevats de Cx26 respecte a la línia parental, però aquesta no es localitza correctament a la membrana cel·lular. Aquesta deslocalització fa que l'augment d'aquesta connexina no es tradueixi en un increment en l'efecte adjacent quan aquestes cèl·lules es tracten amb ganciclovir/HSV-tk (Carrió M *et al.*, 2001). Sorprenentment, l'inòcul subcutani d'aquesta línia cel·lular en ratolins atímics produeix un augment espectacular del creixement dels tumors respecte la línia parental (Fig 48).

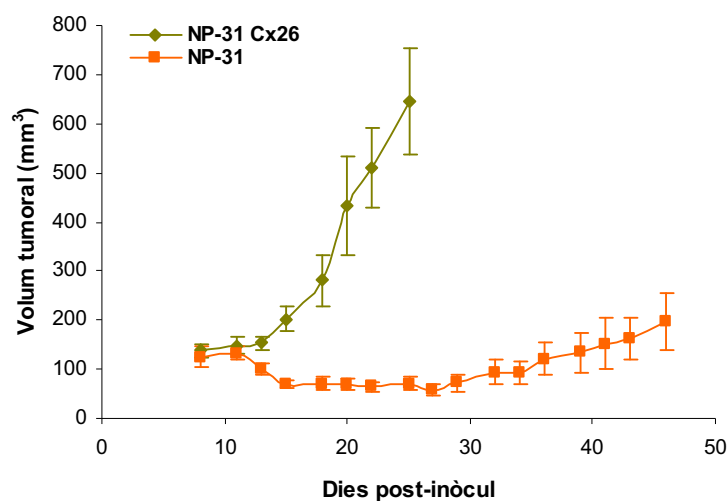


Fig. 48. Seguiment del creixement tumoral de les línies NP-31 i NP-31 Cx26. En color verd NP-31 Cx26 i en carbassa la NP-31. Les dades es mostren com a valors mitjos ($n = 5$) \pm S.E.M.

A més, aquest creixement accelerat va acompanyat d'una major irrigació d'aquests tumors. Per altra banda el tractament amb gemcitabina dels tumors establerts a partir de les dues línies cel·lulars produeix una inhibició del creixement tumoral molt similar en ambdós casos en ambdós casos (Fig 49).

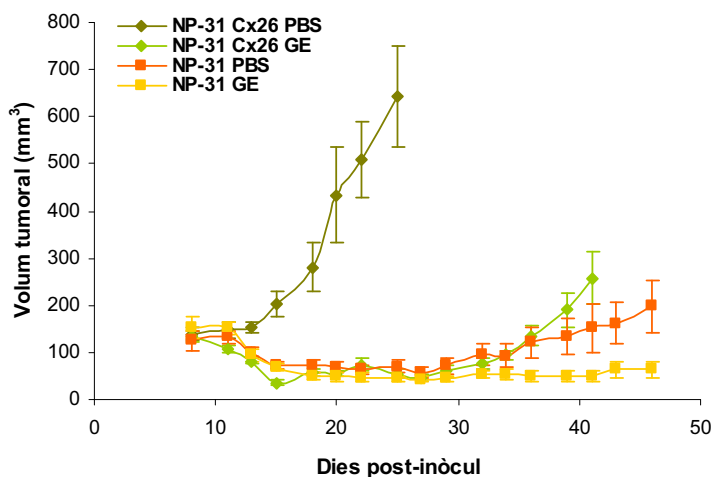


Fig 49 Efecte del tractament amb gemcitabina sobre els tumors NP-31 i NP-31 Cx26. En color verd els tumors NP-31 Cx26 (verd clar els tractats amb gemcitabina) i en color carbassa els NP-31 (carbassa clar els tractats amb gemcitabina). Les fletxes vermelles indiquen el moment d'inici i final del tractament. Les dades es mostren com a valors mitjos ($n = 5$) \pm S.E.M.

Un cop finalitzat el tractament, els tumors derivats de NP-31 Cx26 recuperen ràpidament el seu creixement exponencial. En aquesta línia l'eficàcia del tractament malgrat la seva cinètica de creixement i la ràpida recuperació del creixement exponencial al finalitzar el tractament segurament és deguda a l'elevada irrigació que presenten aquests tumors subcutanis.

Aquests resultats posen de manifest la necessitat d'aprofundir més en la relació de les connexines amb el procés carcinogènic per tal d'aconseguir que la sobreexpressió d'aquestes contribueixi a una millor resposta als tractaments amb agents citotòxics i no a l'aparició d'efectes adversos deguts molt probablement a la incapacitat de certes cèl·lules tumorals per a conduir la connexina sobreexpressada a la seva correcta localització.

4. Modulació de la potencia dels adenovirus replicatius per introducció del gen supressor

Tumors que es caracteritzen per una detecció tardana com els de pàncreas i ovari o d'altres com els de pulmó o cervell que degut a la seva naturalesa o ubicació són difícils de tractar o reseca, fan palesa la necessitat de trobar noves teràpies que ens permetin vèncer aquests obstacles. En aquest sentit, la viroteràpia i la teràpia gènica presenten una sèrie d'avantatges que la quimioteràpia no pot assolir. La quimioteràpia pot inhibir una diana activa però no pot detectar o reemplaçar la funció perduda d'una proteïna; a més, un fàrmac no pot amplificar-se a si mateix. Durant molts anys, la teràpia gènica contra el càncer s'ha basat en la reintroducció de gens supressors tumorals i gens bioactivadors de pro-drogues. El gen supressor més reintroduït en diferents tipus de càncer ha estat p53. La transferència de p53 induïx inhibició del creixement i apoptosi en una gran varietat de tumors (Liu *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1994; Mujoo *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 1997). Resultats previs del nostre grup han demostrat l'eficàcia de la transducció adenoviral de p53 en un model de càncer de pàncreas tant *in vitro* com *in vivo*, així com la potenciació d'aquests efectes al combinar-lo amb la gemcitabina (Casallo *et al.*, 2000; Casallo *et al.*, 2005). Malgrat això, els resultats clínics obtinguts han estat limitats bàsicament pels baixos nivells de transducció aconseguits p53.

No obstant, els efectes provocats per l'expressió de p53 en un adenovirus replicatiu no són fàcils de preveure, degut a les múltiples interaccions entre la biologia del virus i la funció de p53. p53 pot induir arrest del cicle cel·lular i apoptosi, en les cèl·lules infectades, la qual cosa havia portat a suggerir que aquesta proteïna limita la replicació viral (Bischoff *et al.*, 1996) tot i que aquesta limitació ha estat objecte de controvèrsia (Koch *et al.*, 2001; Royds *et al.*, 2006). L'apoptosi de les cèl·lules infectades afavoriria l'oncolisi de l'adenovirus i al seu torn la disseminació dels adenovirus cap a les cèl·lules veïnes. De totes maneres, una apoptosi a l'inici de la replicació viral amb els virions encara sense encapsidar, enlloc de potenciar, podria inhibir l'efecte del virus. Així doncs, per tal d'evitar una apoptosi prematura vàrem plantejar el disseny dels adenovirus amb l'expressió de p53 en la fase tardana del cicle adenoviral.

4.1. Anàlisi d'interferències entre un adenovirus replicatiu i la sobreexpressió de p53

Abans de generar el nou adenovirus, els primers experiments que vàrem realitzar estaven adreçats a analitzar el possible efecte de l'expressió de p53 sobre la citotoxicitat d'un adenovirus replicatiu. Aquests, consistiren en la infecció seqüencial amb 24 hores de diferència amb un adenovirus oncolític i un adenovirus defectiu que contenia el ADNc de p53 (Ad5CMV-p53). Els resultats

mostren que la infecció amb Ad5CMVp53 no afecta en cap cas la replicació de l'adenovirus oncolític, ja que els dos efectes es continuen produïnt independentment. Només a dosis altes de l'adenovirus replicatiu sembla que interfereixen, però no es pot descartar que això sigui degut a que la quantitat de l'adenovirus replicatiu sigui massa elevada i no es pot observar un efecte clar sobre la replicació; la causa seria doncs, l'entrada massiva de virus (Fig. 50).

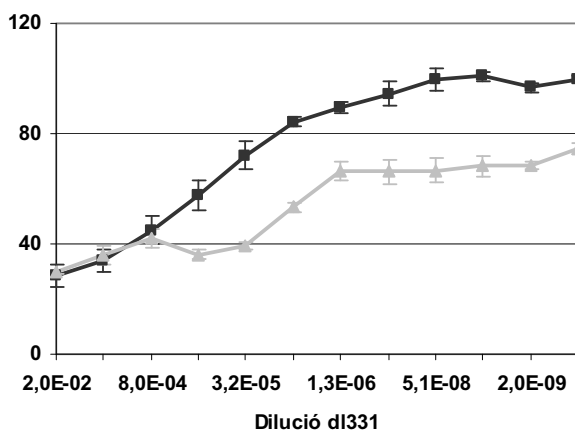


Fig. 50. Anàlisi d'interferències entre un adenovirus oncolític i l'expressió de p53. La línia NP-31 es va infectar amb dilucions seriades de l'adenovirus oncolític dl331 (negre) i 24 hores més tard es va infectar amb 25 m.o.i. de l'Ad5CMV-p53 (gris). La citotoxicitat dels adenovirus es va mesurar mitjançant la quantificació de proteïna amb el reactiu de BCA i el 100% es correspon a les cèl·lules sense infectar. Els resultats són la mitjana \pm ES de tres mesures.

4.2. Generació dels adenovirus replicatius armats amb p53 i tatp53

Arran d'aquests resultats preliminars, vàrem decidir construir dos adenovirus que continguessin el transgen de p53 sota el control del MLP (major late promoter). La seqüència del ADNc de p53 es va col·locar just al darrere de la proteïna de la fibra amb un acceptor d'*splicing* que permetés el processat amb la resta de proteïnes que es troben en aquesta unitat transcripcional. A la figura 51 es mostra un esquema del genoma de l'adenovirus.

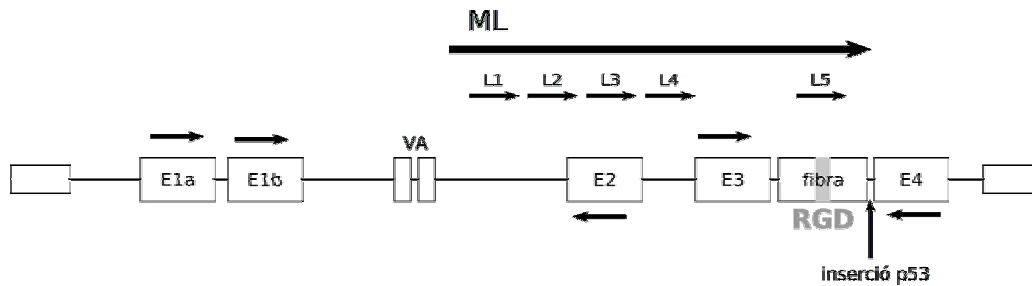


Fig. 51. Esquema del genoma adenoviral de l'Ad5. A la representació s'assenyala el lloc d'inserció de p53 i la unitat de transcripció *Major Late* on s'incorpora la proteïna.

Els dos adenovirus construïts contenen la seqüència de tres aminoàcids RGD inserida al HI loop de la proteïna de la fibra. Això els dirigeix a les integrines de la superfície de la cèl·lula com a receptor primari, fet que millora significativament la capacitat oncolítica de diferents adenovirus replicatius (Suzuki *et al.*, 2001; Taki *et al.*, 2005; Lamfers *et al.*, 2002). Les cèl·lules tumorals presenten nivells molt variables del receptor primari dels adenovirus (CAR) (Li *et al.*, 1999; Hemmi *et al.*, 1998), mentre que en diversos tipus de tumors les integrines s'expressen de forma elevada (Albelda *et al.*, 1990; Gladson and Cheresh, 1991; Hood *et al.*, 2002). Els adenovirus amb aquesta modificació sobrepassen la ineficient infecció a les cèl·lules que els manca aquest receptor, sense augmentar-ne l'hepatotoxicitat.

El segon adenovirus, a més, conté la seqüència de p53 precedida per un motiu de 8 aminoàcids de la proteïna Tat. La proteïna Tat pertany al grup de les proteïnes o pèptids translocadors. Alguns exemples d'aquestes proteïnes són la Tat del virus de la immunodeficiència humana (VIH) (Fawell *et al.*, 1994), l'antennapèdia de la *Drosophila* (Joliot *et al.*, 1991) i la VP22 del virus de l'herpes simplex (Elliott and O'Hare, 1997). La funció de transferència intercel·lular ha estat atribuïda a pèptids curts enriquits en residus bàsics que han estat anomenats dominis de transducció de proteïna (PTDs; *protein transduction domains*) (Beerens *et al.*, 2003; Leifert and Whitton, 2003). Aquests pèptids poden translocar-se a través de la membrana de les cèl·lules de mamífer i, per tant, poden ajudar a la internalització de proteïnes fusionades amb ells. Actualment, no existeixen proves directes que demostrin que aquests PTDs poden transportar proteïnes d'una cèl·lula a l'altra. De fet, molts estudis suggereixen que aquests estan limitats al transport unidireccional a través de la membrana de l'exterior a l'interior de la cèl·lula (Leifert *et al.*, 2002; Cashman *et al.*, 2003; Richard *et al.*, 2003). Així doncs, les proteïnes fusionades als PTDs entrarien a la cèl·lula per una sèrie de mecanismes que poden variar lleugerament en funció del PTD (Lundberg *et al.*, 2003). Pel PTD de Tat, s'ha proposat la seva internalització a través dels receptors dels proteoglicans d'heparan sulfat (Tyagi *et al.*, 2001), o bé a través de la via endocítica caveolar (Ferrari *et al.*, 2003) o per micropinososi dependent dels "rafts" lipídics (Wadia *et al.*, 2004). El que no s'ha pogut demostrar és la

capacitat de la proteïna fusionada per sortir de la cèl·lula; sembla que això només es produiria en proteïnes que normalment són secretades (Xia *et al.*, 2001).

Concretament, al nostre virus s'ha introduït un pèptid de 8 aminoàcids (Tat8), ja que, fins al moment és el mínim PTD descrit de Tat que permet la translocació de proteïnes fusionades. Tat8 ha demostrat una eficiència semblant al pèptid d'onze aminoàcids descrit amb anterioritat. Aquest PTD fusionat amb el gen de la HSV-tk millora la sensibilitat a ganciclovir en cèl·lules de càncer de pàncreas *in vitro* i *in vivo* (Cascante *et al.*, 2005).

El procés seguit per a l'obtenció dels adenovirus replicatius AdRGD-p53 i AdRGD-tatp53 es divideix en diferents passos (Fig. 52) que es troben descrits amb detall a l'apartat de materials i mètodes d'aquest treball.

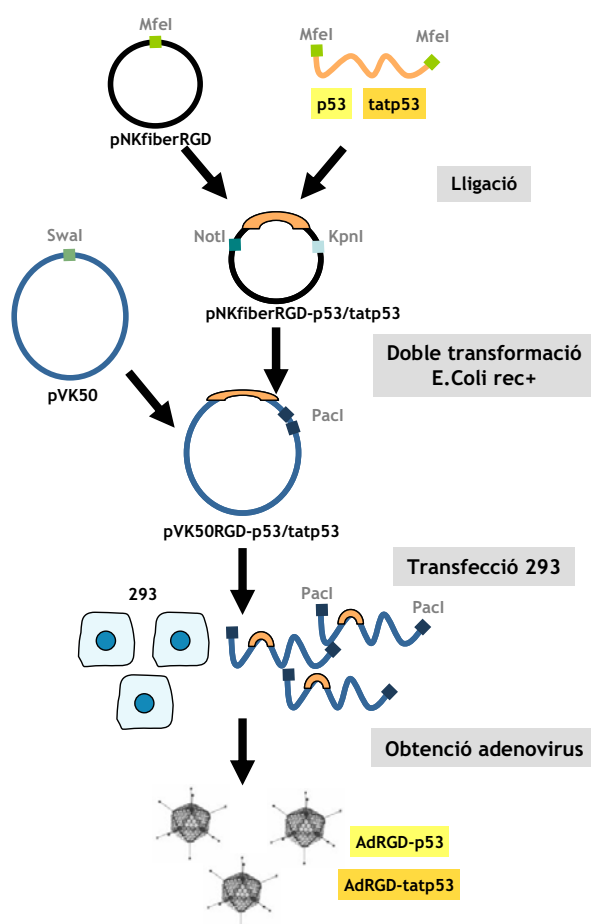


Fig. 52. Generació dels adenovirus AdRGD-p53 i AdRGD-tatp53. Esquema del procés seguit per obtenir el vector adenoviral

Un cop construïts els dos adenovirus vàrem comprovar l'expressió de la proteïna p53. En ambdós virus, l'expressió de p53 segueix el mateix patró que l'expressió de la proteïna de la fibra adenoviral (Fig. 53). A més, l'expressió de p53 assoleix uns nivells similars amb l'AdRGD-p53 i l'AdRGD-tatp53.

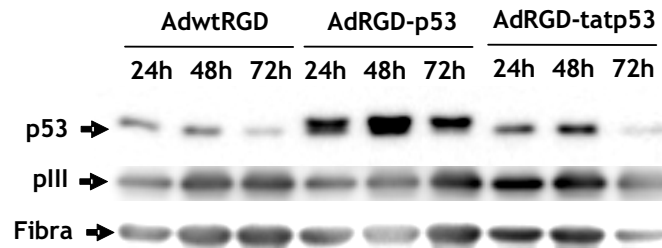


Fig. 53. Immunodetecció de p53 i les proteïnes de la càpsida viral hexó pIII i fibra. Les cèl·lules NP-29 es varen infectar amb 25 m.o.i. i 24, 48 i 72 hores més tard es realitzà l'extracció de proteïna.

4.3. Efecte citotòxic d'AdRGD-p53 i AdRGD-tatp53 respecte l'AdwtRGD

El següent pas fou l'anàlisi *in vitro* de la citotoxicitat dels dos adenovirus respecte el control AdwtRGD. Per això vàrem emprar tres línies, dues amb la proteïna p53 salvatge, NP-29 i A549, i una amb p53 mutada, NP-9. Els valors de IC_{50} posen de manifest una pèrdua de potència respecte el control, essent aquesta més acusada en el cas del AdRGD-tatp53 (Taula 14). En el cas de l'AdRGD-p53 aquesta pèrdua de potència oscil·la entre 1.25 i 1.58 vegades en funció de la línia cel·lular i no sembla estar afectada per la presència de la proteïna p53 salvatge endògena. Per altra banda, l'eficiència de l'AdRGD-tatp53 disminueix respecte el virus control i el p53, essent aquesta més variable en funció de la línia cel·lular escollida.

	NP-9	A549	NP-29
AdwtRGD	21.89 ± 2.27	0.78 ± 0.08	28.02 ± 3.62
AdRGD-p53	31.38 ± 4.49	0.98 ± 0.14	108.78 ± 7.63
Def. vs AdwtRGD	1.43	1.25	3.88
AdRGD-tatp53	104.28 ± 11.25	1.31 ± 0.12	225.15 ± 32.60
Def. vs AdwtRGD	4.76	1.76	8.03

Taula 14. Caracterització de l'efecte citopàtic. L'efecte citopàtic es va determinar als 6 dies a les A549 i als 10 dies post-infecció a les NP-9 i NP-29. Els valors de IC_{50} expressats com a partícules virals/cèl·lula necessàries per causar un 50% de mort cel·lular. La deficiència respecte l'AdwtRGD es defineix com la relació entre el valor IC_{50} de cada virus respecte l'AdwtRGD a la mateixa línia.

Els assajos de disseminació amb cristall violeta posen de manifest un altre cop la pèrdua de potència dels dos adenovirus que porten el transgèn p53 i tatp53 respecte el control (Fig. 54).

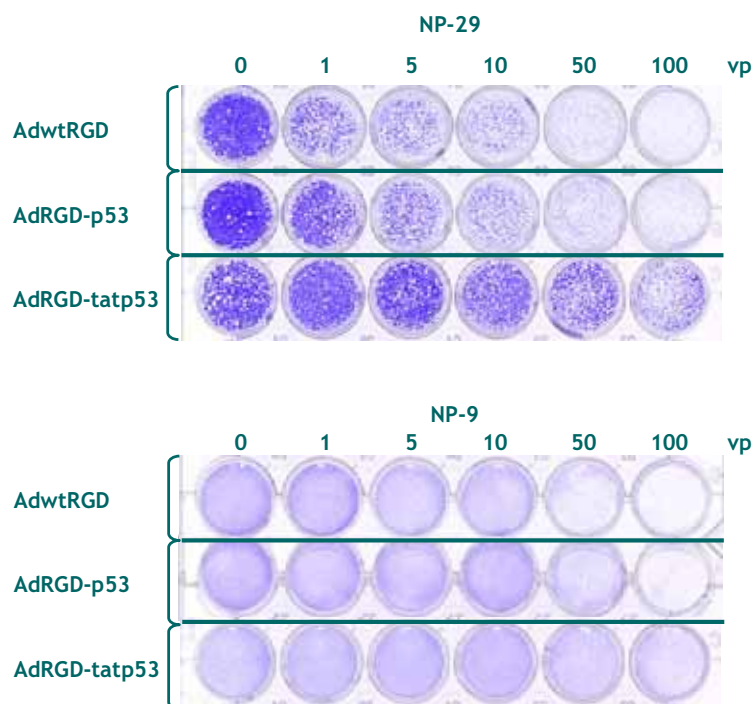


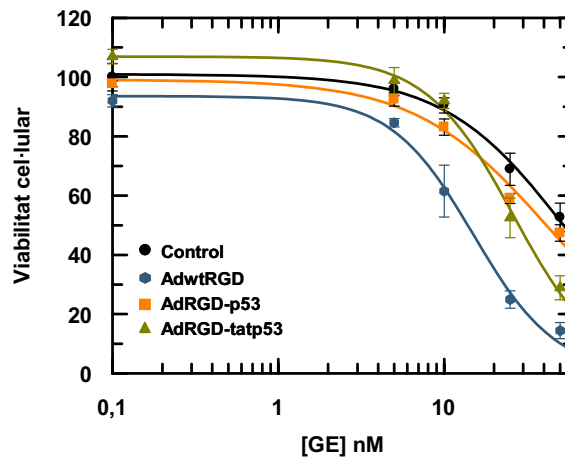
Fig. 54. Disseminació dels adenovirus. Les cel·lules NP-29 i NP-9 es van infectar a les partícules virals (vp) especificades i 17 i 12 dies post-infecció, respectivament, les cèl·lules es van tenyir amb cristall violeta.

4.4. Efecte citotòxic produït per la combinació d'AdRGD-p53, AdRGD-tatp53 i AdwtRGD amb gemcitabina

Els antecedents de potenciació de l'efecte de quimioteràpics per acció de p53 ens van dur a realitzar una combinació d'aquests adenovirus replicatius amb la gemcitabina per tal de potenciar-ne els efectes enfront de l'adenovirus control. Així doncs vàrem procedir a la combinació del fàrmac amb els adenovirus en l'ordre prèviament establert en treballs del grup (Cascalló M et al 2001). És a dir, en primer lloc es tracten les cèl·lules amb gemcitabina durant 24 hores, i al retirar el fàrmac les cèl·lules es transdueixen amb p53. Aquest ordre, permet que el dany cel·lular produït pel fàrmac sigui detectat per p53; per contra, l'ordre invers produeix un arrest de les cèl·lules a les fases G1 i G2 del cicle cel·lular implicant la incorporació del fàrmac a l'ADN, el que es tradueix en una quimioresistència aparent.

No obstant, els resultats obtinguts posen de manifest una altra vegada una major eficiència per part de l'adenovirus control en la inducció de la mort de les

cèl·lules tumorals *in vitro* (Fig. 55). La major sensibilització la trobem en l'adenovirus control, on la seva IC_{50} varia des de 50 nM fins a 15 nM, mentre que dels adenovirus que contenen p53 i tatp53 és 42 i 26, respectivament.



Control	AdwtRGD	AdRGD-p53	AdRGD-tatp53
51.67 ± 3.99	15.01 ± 1.55	41.96 ± 5.66	26.05 ± 1.92

Fig. 55. Corbes dosi-resposta a gemcitabina. Les cel·lules es van tractar amb dosis creixents de gemcitabina durant 24 hores i al retirar el fàrmac es van infectar amb 10 m.o.i. dels tres adenovirus. Tres dies més tard es va determinar la viabilitat per MTT. A la taula es mostren les IC_{50} gemcitabina (nM) de les quatre condicions. Els resultats són la mitjana ± ES de tres mesures.

Malgrat que, els tres virus són capaços de potenciar l'efecte de la gemcitabina. Els resultats de l'apartat anterior mostren una quimioresistència aparent al tractament amb el fàrmac quan els virus expressen p53 i tatp53 i aquesta, sembla més important en l'AdRGD-p53. La pèrdua de potència dels dos adenovirus, podria ser deguda a un problema en la combinació temporal d'aquests i la gemcitabina. Cal destacar que aquestes diferències no es corresponen a la diferent citotoxicitat dels tres virus, ja que, la dosi escollida (10 m.o.i.) i les condicions experimentals, tan sols indueixen la mort del 8% amb el virus control, del 2% amb l'AdRGD-p53 i del 0% amb l'AdRGD-tatp53 per si sols. Així doncs, encara que la seqüència de combinació *a priori* semblava que tan sols es veia afectada per l'ordre, potser que les hores que triga a expressar-se p53 després de l'acció del fàrmac siguin crucials. En aquest sentit, les dades prèvies s'havien obtingut amb un adenovirus defectiu que contenia el transgèn a la regió E1 que s'expressa de forma primerenca mentre que en aquest adenovirus l'expressió del transgen es troba sota el control del MLP i per tant, en la fase tardana. En aquest sentit, l'expressió de p53 a la regió E1, és ja elevada a les 24 hores; però, si ho fa en fase tardana, els nivells elevats no s'assoleixen fins a les 48 hores, tot i que aquests ja es detecten a les 24 hores.

4.5. Efecte antitumoral dels adenovirus armats amb p53 i tatp53 *in vivo* en combinació amb el tractament amb gemcitabina

A continuació vàrem analitzar els efectes d'aquests virus en un model *in vivo*. Així doncs, vàrem inocular $6 \cdot 10^6$ cèl·lules de la línia NP-9 als dos flancs de ratolins atímics femella Balb/C nu/nu. Quan els tumors varen assolir un tamany de 90 mm^3 els ratolins es van distribuir aleatoriament entre els 8 grups de tractament ($n=7-9$) i es van tractar amb una sola dosi de 100 mg/kg de gemcitabina. Al cap de 24 hores, els tres adenovirus es van injectar intratumoralment a raó de $1 \cdot 10^9$ partícules virals/tumor. Els virus diluïts en salí es van inocular a quatre punts del tumor amb punxades de $5 \mu\text{l}$.

Sorprenentment, els adenovirus inoculats intratumoralment presenten un comportament totalment diferent a l'observat *in vitro* (Fig. 56). A la dosi de virus emprada no s'observen diferències entre el creixement dels tumors control i els infectats amb AdwtRGD. Al mateix temps, l'AdRGD-tatp53 en algun punt sembla presentar una lleugera tendència a la baixa respecte el control, però aquestes diferències, en cap cas, són significatives. Per altra banda, l'adenovirus que conté el transgen de p53 sol, si que indueix una disminució estadísticament significativa del creixement dels tumors, ja sigui respecte el grup control (*) o respecte el virus control (#). A més, aquestes diferències també són significatives en el pes final dels tumors.

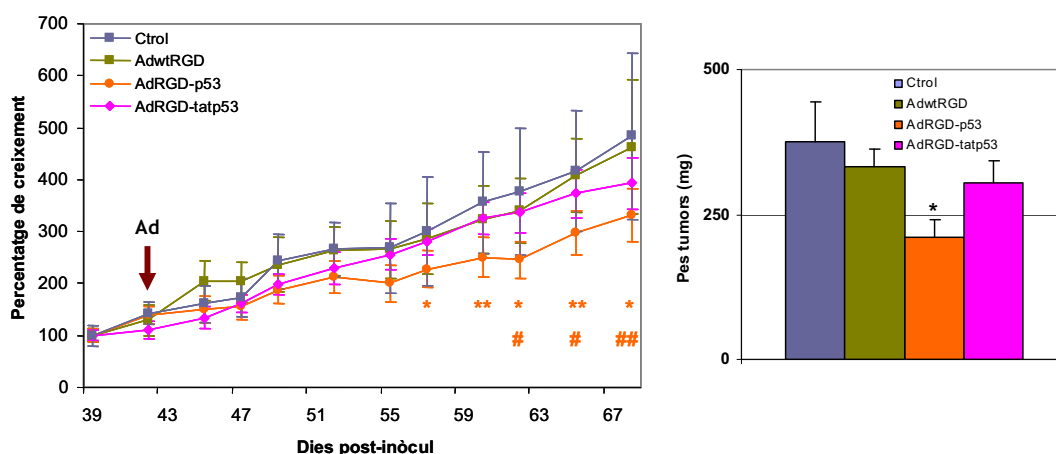


Fig. 56. Efectes sobre el creixement tumoral dels adenovirus. En color blau els tumors control, en verd els AdwtRGD, en carbassa els AdRGD-p53 i en rosa els AdRGD-tatp53. La fletxa vermella indica el punt d'injecció dels adenovirus. Les dades es mostren com a valors mitjans ($n = 7-9$) \pm S.E.M. Estadística respecte el grup control * i respecte el grup AdwtRGD #, essent $\#, * p < 0.05$.

No obstant, quan els adenovirus es combinen amb l'administració intraperitoneal de gemcitabina 24 hores abans de la injecció viral, aquestes diferències respecte el grup AdwtRGD desapareixen i només s'observen diferències significatives en el creixement dels tumors en el grup AdRGD-p53 respecte al de gemcitabina (Fig. 57). Aquestes diferències són màximes una setmana després de la injecció adenoviral i disminueixen al llarg del temps. Això pot ser degut a que a mesura que el virus replica i s'expandeix a través del tumor, els efectes de la gemcitabina es van perdent, ja sigui per mort de les cèl·lules tractades o bé per creixement de les cèl·lules tumorals sanes. Per tant, quan el virus que sobreexpressa p53 aconsegueix aquestes cèl·lules, ja no existeixen efectes del fàrmac per potenciar. Amb aquesta pauta de tractament no s'observen diferències significatives en el pes final dels tumors respecte el grup gemcitabina. Només s'observen diferències entre el grup corresponent a la combinació AdwtRGD + GE i el que ha estat tractat amb AdwtRGD amb una $p < 0.05$.

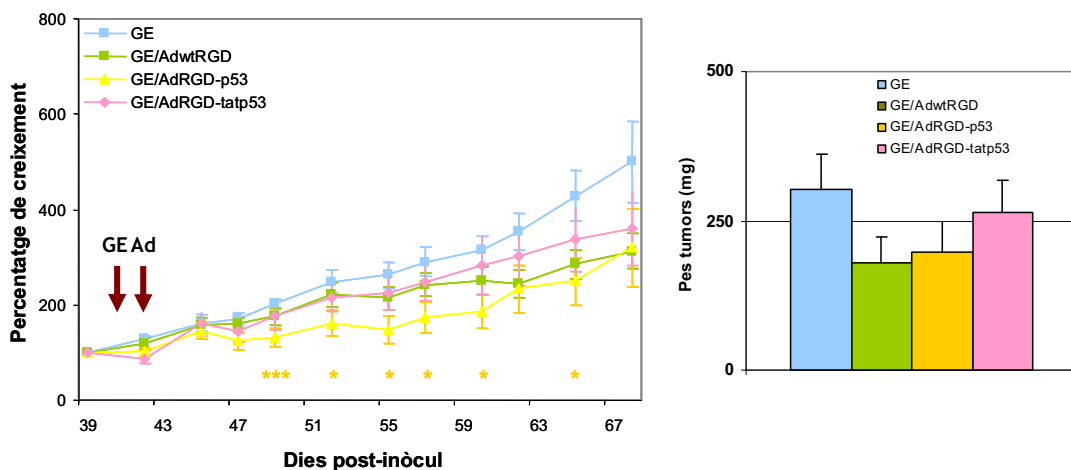


Fig. 57. Efectes sobre el creixement tumoral dels adenovirus combinats amb gemcitabina. En color blau els tumors control, en verd els AdwtRGD, en carbassa els AdRGD-p53 i en rosa els AdRGD-tatp53. Les fletxes vermelles indiquen els punts de tractament amb el fàrmac (GE) i d'injecció dels adenovirus (Ad). Les dades es mostren com a valors mitjans ($n = 7-9$) \pm S.E.M. Estadística respecte el grup control, essent * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

Per tal d'analitzar les causes d'aquest comportament, vàrem determinar l'apoptosi present en els tumors dels diferents grups mitjançant la tècnica de TUNEL. Aquesta tècnica, no diferencia bé entre apoptosi i necrosi, per tant en alguns tractaments podem veure la suma dels dos efectes. El que es pot observar en aquestes mostres, és que l'apoptosi present en els tumors infectats amb

AdRGD-p53 és superior a la de l'AdwtRGD i sobretot a la del AdRGD-tatp53 (Fig. 58). A més, la densitat de cèl·lules amb marcatge positiu de nuclis (DAPI), és més baixa en el tumors que sobreexpressen la p53 salvatge sense modificacions. Per altra banda, quan combinem els virus amb gemcitabina, les diferències entre l'AdwtRGD i l'AdRGD-p53 desapareixen. De fet, als tumors tractats amb gemcitabina ja s'observa un marcatge significatiu. Un altra vegada, les mostres que presenten un menor marcatge son les corresponents als tumors tractats amb l'AdRGD-tatp53.

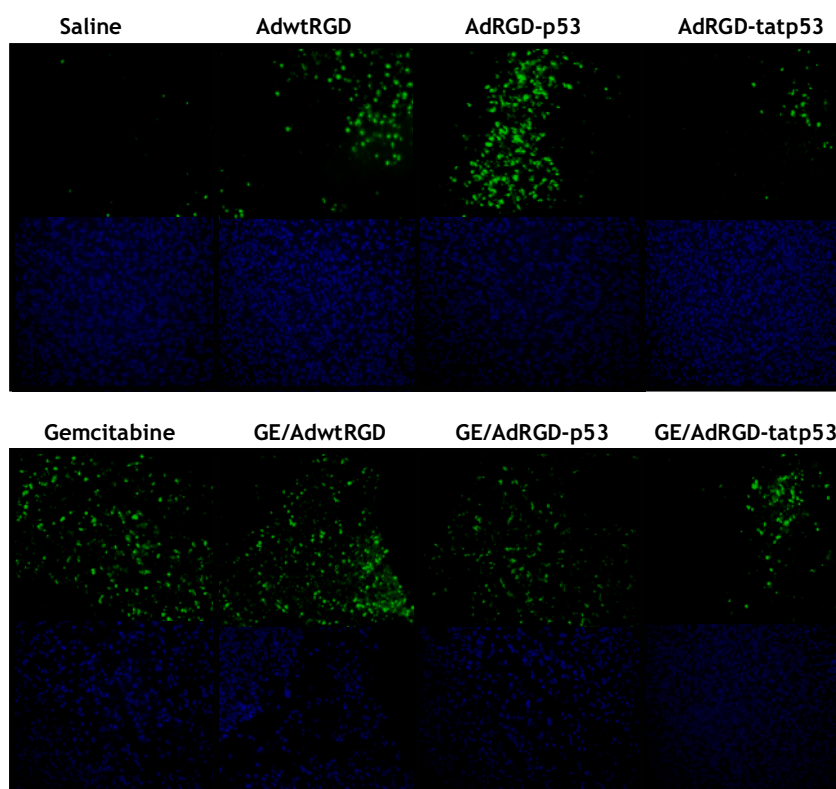


Fig. 58. Deteció d'apoptosi pel mètode de TUNEL. L'anàlisi de la tinció TdT-terminal es va realitzar damunt de seccions d'OCT. Al panell superior s'observen els tumors només infectats i al inferior els tumors tractats amb la combinació. En verd la tinció de TUNEL i en blau la tinció dels nuclis amb DAPI. Microfotografies 100x.

Arran d'aquests resultats inesperats que posen de manifest una major eficàcia dels nostres virus, varem decidir validar els resultats realitzant un altre experiment *in vivo*. Aquest cop però, la línia escollida fou A549, que a diferència de la NP-9 no presenta mutacions al gen p53 endogen. Per aquest experiment es van inocular $10 \cdot 10^6$ cèl·lules en els dos flancs de ratolins atímics femella Balb/C nu/nu. Quan els tumors van assolir un tamany de 70 mm^3 , es van distribuir

aleatòriament en els 8 grups de tractament (n=7-9) i es va procedir a iniciar el tractament. El patró de tractament escollit fou igual a l'emprat amb NP-9, excepte la dosi de gemcitabina que fou de 160 mg/kg. Els resultats obtinguts mostren que, al igual que en l'experiment amb NP-9, el grup que presenta una disminució del creixement tumoral més important i significativa respecte al grup control, és el tractat amb l'AdRGD-p53 (Fig. 59), tot i que, en aquest cas, les diferències amb el grup AdwtRGD no són estadísticament significatives. Per altra banda, al igual que a l'experiment anterior, sembla que la tendència de l'AdRGD-tatp53 torna a ser a la baixa respecte el virus control. Aquesta tendència és, en alguns punts, estadísticament significativa respecte al grup control. A més, el pes final dels tumors corrobora el que s'observa en la gràfica de seguiment del creixement. Així doncs, l'únic grup que mostra diferències significatives de pes respecte el grup control és l'infectat amb AdRGD-p53.

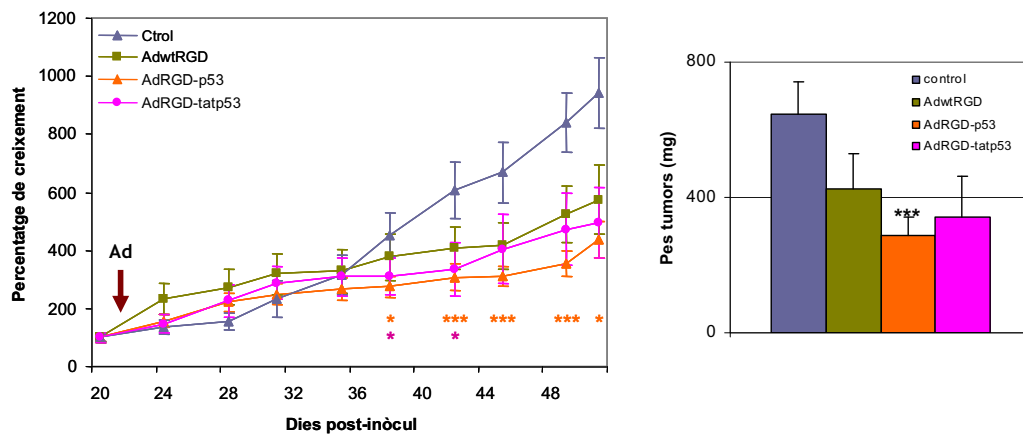


Fig. 59. Efectes sobre el creixement tumoral dels adenovirus. En color blau els tumors control, en verd els AdwtRGD, en carbassa els AdRGD-p53 i en rosa els AdRGD-tatp53. La fletxa vermella indica el punt d'injecció dels adenovirus. Les dades es mostren com a valors mitjans (n = 7-9) \pm S.E.M. Estadística respecte el grup control, essent * p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.005.

Aquest experiment *in vivo* torna a posar de manifest que la combinació amb gemcitabina eixuga les diferències inicials entre els tres adenovirus (Fig. 60). El comportament dels tres virus és molt similar i tots ells presenten en algun moment, diferències significatives respecte el grup gemcitabina, tot i que el virus que presenta una tendència d'inhibició del creixement menys elevada és l'adenovirus control. El pes final dels tumors corrobora la tendència observada amb el seguiment del creixement tumoral. Així doncs els tumors amb un pes

inferior són els de la combinació amb AdRGD-p53 ($p < 0.005$), seguits dels AdRGD-tatp53 ($p < 0.01$) i els AdwtRGD ($p < 0.05$).

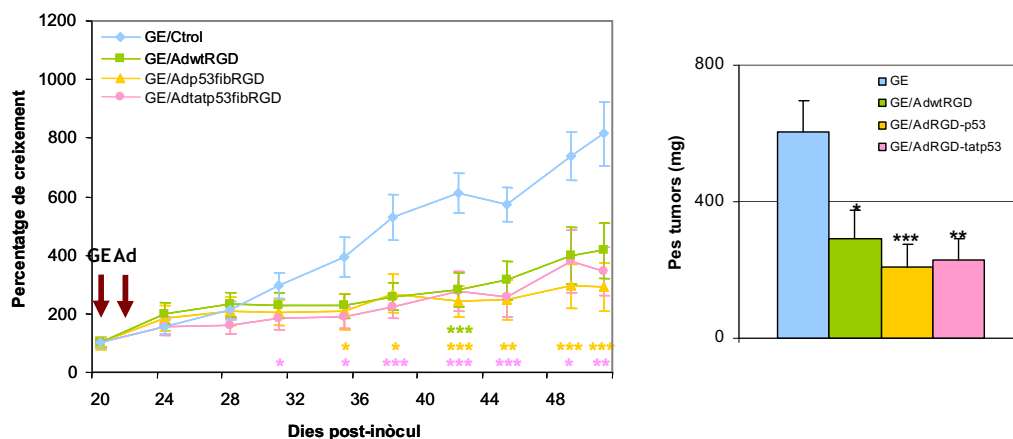


Fig. 60. Efectes sobre el creixement tumoral dels adenovirus combinats amb gemcitabina. En color blau els tumors control, en verd els AdwtRGD, en carbassa els AdRGD-p53 i en rosa els AdRGD-tatp53. Les fletxes vermelles indiquen els punts de tractament amb el fàrmac (GE) i d'injecció dels adenovirus (Ad). Les dades es mostren com a valors mitjans ($n = 7-9$) \pm S.E.M. Estadística respecte el grup control, essent * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

De la mateixa manera que amb les mostres de *l'in vivo* anterior vàrem determinar l'apoptosi pel mètode de TUNEL. I en aquest cas els resultats obtinguts són similars. Així doncs, l'apoptosi present en els tumors infectats amb AdRGD-p53 és major a la observada amb l'AdwtRGD i a la del AdRGD-tatp53 (Fig. 61). Alhora cal destacar que segons la tinció amb DAPI, els tumors infectats amb AdRGD-p53 presenten una densitat de nuclis més baixa. Per altra banda, quan combinem els virus amb gemcitabina, les diferències entre l'AdwtRGD i l'AdRGD-p53 desapareixen. De fet, als tumors tractats amb gemcitabina ja s'observa un marcatge significatiu. Als tumors que sobreexpressen la tatp53 no s'observa cap millora respecte als infectats amb el virus control.

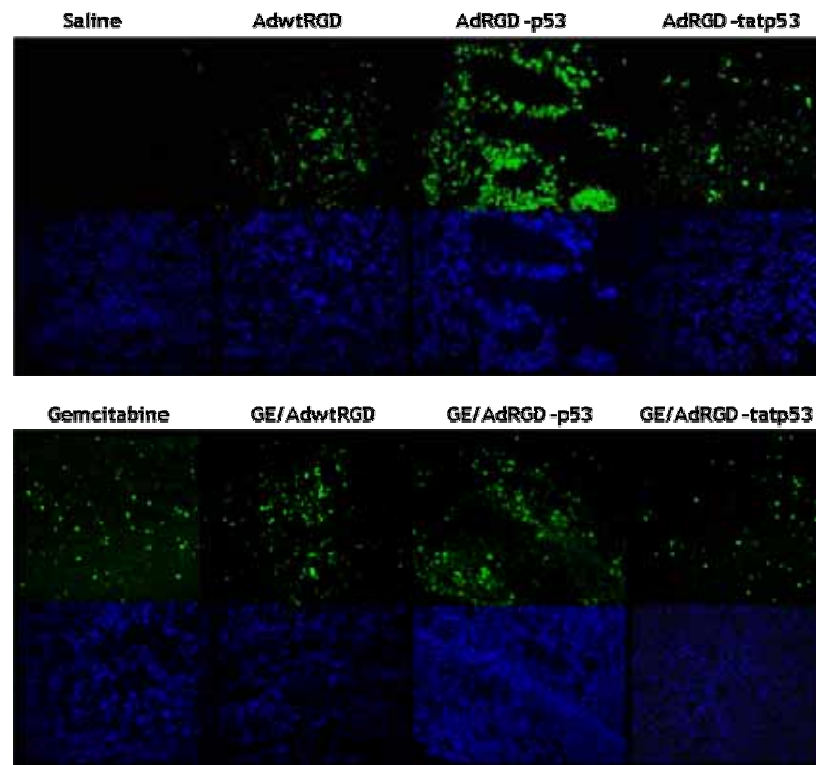


Fig. 61. Deteció d'apoptosi pel mètode de TUNEL. L'anàlisi de la tinció TdT-terminal es va realitzar damunt de seccions d'OCT. Al panell superior s'observen els tumors només infectats i al inferior els tumors tractats amb la combinació. En verd la tinció de TUNEL i en blau la tinció dels nuclis amb DAPI. Microfotografies 100x.

El conjunt de resultats obtinguts mostra que la introducció del transgen p53 amb una expressió en fase tardana pot col·laborar positivament amb la replicació viral *in vivo*. Així doncs, malgrat que els resultats obtinguts *in vitro*, no eren molt prometedors, l'anàlisi dels efectes en dos models *in vivo* mostren majors efectes antitumorals. Aquests resultats contradictòris poden explicar-se pel fet que en un model *in vitro* els virus no troben cap barrera per infectar les cèl·lules adjacents mentre que en un tumor podem trobar teixit connectiu i fibroblasts. Hem de considerar que en el nostre cas els fibroblasts són murins, però en els tumors humans aquests tipus cel·lulars s'han mostrat com una de les grans barreres a vèncer per tal de millorar l'eficàcia dels adenovirus oncolítics. Molts tipus de tumors humans, entre ells els de pàncreas, es caracteritzen per la presència de petits grups de cèl·lules tumorals rodejades per grans regions de fibroblasts i teixit connectiu associats al tumor. En aquest entorn, la disseminació del virus és realment limitada. Recentment, s'ha proposat l'expressió de proteases per digerir el teixit connectiu i solucionar el problema (Kim *et al.*, 2006). En aquest context, podria ser que la p53 li conferís al virus la capacitat de replicar i lisar eficientment aquests tipus cel·lulars, fet que afavoriria la seva disseminació i justificaria una major eficiència d'aquest respecte l'AdwtRGD. Els resultats

obtinguts amb la combinació dels virus i la gemcitabina anirien en la mateixa línia. El tractament amb gemcitabina provoca una clara desestructuració dels tumors (Cascallo *et al.*, 2005), i per tant, facilita l'accés dels virus a zones més àmplies. Així doncs, l'avantatge que l'expressió de la proteïna p53 li confereix al virus pot quedar molt limitada. Això explicaria el fet que una sola dosi del fàrmac a l'inici del tractament indueixi un efecte tant marcat en la inhibició del creixement dels tumors tractats amb gemcitabina i infectats 24 hores més tard. L'eficiència de la combinació entre la gemcitabina i la infecció viral ha estat prèviament descrita per Raki i col·laboradors treballant amb tumors establerts amb cèl·lules de càncer d'ovari. Aquest treball combina el tractament del fàrmac amb la infecció amb un adenovirus replicatiu condicional i posa de manifest la importància de l'ordre d'administració. Així doncs, ni l'administració conjunta, ni l'administració del fàrmac 24 hores després de la infecció produeixen millores en la supervivència dels animals mentre que si la gemcitabina s'administra 24 hores abans, la supervivència és del 60% enfront del 10% obtingut amb els tractaments individuals. Per altra banda, els resultats que obtenen *in vitro* varien en funció de la línia cel·lular usada i no semblen conclusius (Raki *et al.*, 2005).

La pèrdua d'eficiència de la tatp53 respecte la p53 observada als nostres experiments pot ser deguda a que la inserció d'aquests aminoàcids produeixi un canvi conformacional en la proteïna que interfereixi en les seves funcions o que n'acceleri la degradació. En aquest sentit, cal ressenyar que la proteïna tatp53 no pot ésser reconeguda per algun dels anticossos dirigits contra p53 (resultats no mostrats).

Des de l'inici d'aquest bloc experimental, han anat sorgint diversos articles d'adenovirus replicatius que contenen la p53. De totes maneres, només existeix un treball que introdueix la p53 en fase tardana. Aquesta es situa darrere de la fibra mitjançant una seqüència IRES, a més aquest adenovirus també presenta la proteïna ADP (*adenovirus death protein*) delecionada. Aquests autors demostren *in vitro* que la p53 expressada a la fase tardana millora la potència del virus sense interferir en la replicació i que p53 pot substituir la funció de l'ADP mitjançant la inducció d'apoptosi (Sauthoff *et al.*, 2002). Per contra, els nostres adenovirus contenen la p53 sota el control del MLP mitjançant una seqüència de *splicing* addicional. Aquestes són més eficients que l'ús de IRES i evita la deleció de gens de la fase tardana i la repetició de promotors. L'altre bloc de treballs, duts a terme pel mateix grup de recerca, es basa en la introducció de p53 a E3 en un adenovirus replicatiu condicional (Ad Δ 24). Aquests autors demostren que la p53 expressada a la fase primerenca pot millorar la potència de l'adenovirus *in vitro* (van Beusechem *et al.*, 2002) i *in vivo* en un model de glioma (Georger *et al.*, 2004). Per altra banda, amb una variant de p53 resistent a degradació veuen un increment de la potència respecte a l'anterior *in vitro* (van Beusechem *et al.*, 2005) i *in vivo* en un model de càncer de cèrvix (Heideman *et al.*, 2005). Finalment, el direccionament del virus amb la p53 salvatge cap al receptor EGFR en

millora la potència *in vitro* i *in vivo* en un model de neuroblastoma (Geoerger *et al.*, 2005).

Malgrat que als inicis de la teràpia gènica els resultats obtinguts amb la reintroducció de p53 foren esperançadors, aquests no han pogut ésser traslladats en una millora de la supervivència dels pacients. Això és bàsicament degut a la capacitat reduïda per administrar el gen terapèutic a les cèl·lules tumorals. Així doncs, l'ús d'adenovirus replicatius condicionals amb capacitat per sobrepassar les barreres tumorals intrínseques poden ser de gran utilitat. En aquesta línia, els adenovirus condicionals replicatius amb la p53 i la tatp53 en fase tardana ja han estat construïts i en breu s'iniciaran les proves per analitzar-ne la potència.

5. Establiment de models ortotòpics de càncer de pàncreas humà

Sovint, el pas limitant en la validació preclínica de noves teràpies contra el càncer és degut a la manca d'un model ideal que permeti aprofundir en el coneixement i el tractament d'aquest tipus de càncer. El càncer de pàncreas, degut a la seva característica de desenvolupament en un d'òrgan silent, és difícil de diagnosticar abans que iniciï la seva disseminació i la seva resposta a la quimioteràpia i a la radioteràpia és limitada.

El model emprat majoritàriament consisteix en la xenoimplantació subcutània de cèl·lules humanes d'origen tumoral en ratolins immunodeprimits. Aquest model permet realitzar un seguiment precís del creixement mitjançant la mesura de les dues dimensions del tumor, fet que permet determinar el volum tumoral i fer un seguiment acurat del creixement. Aquest tipus d'assaig permet realitzar un pas més enllà dels assajos *in vitro* i obtenir resultats en un model tridimensional més proper a la realitat que els cultius cel·lulars. De totes maneres, aquest procediment encara queda lluny de la realitat, ja que es tracta de cèl·lules que provenen d'un cultiu isogènic que ha estat mantingut durant diversos passatges. Per solucionar aquesta limitació, alguns autors implanten subcutàniament fragments provinents directament del tumor humà resecat (Hahn *et al.*, 1995; Rubio-Viqueira *et al.*, 2006). No obstant el manteniment de l'estructura i la diversitat cel·lular del tumor, aquest model tampoc reflecteix les interaccions amb l'entorn que es produeixen en el tumor humà. Una manera de solucionar aquesta mancança consisteix en la xenoimplantació ortotòpica. Aquesta es pot realitzar a partir de cèl·lules tumorals, a partir de fragments tumorals provinents de cèl·lules en cultiu o bé a partir de fragments del tumor provinents directament del pacient (Reyes *et al.*, 1996).

5.1. Establiment i estandarització de xenoimplants ortotòpics procedents de cèl·lules tumorals humanes

Aquests antecedents ens van dur a plantejar com a objectiu d'aquest bloc, l'establiment i estandarització de models que ens permetin analitzar de manera més precisa les interaccions del tumor amb l'hoste, així com l'eficàcia dels tractaments que prèviament s'hagin mostrat més eficients en models bidimensionals i en tumors subcutanis.

El primer objectiu fou l'estandarització de xenoimplants ortotòpics establerts a partir de tumors subcutanis de cèl·lules tumorals. Amb aquesta finalitat, vàrem inocular subcutàniament una suspensió de $5 \cdot 10^6$ cèl·lules de la línia NP-18, provinent d'una metàstasi hepàtica d'un adenocarcinoma de pàncreas humà i està àmpliament caracteritzada. Al cap d'unes 2-3 setmanes, quan els tumors adquireixen una mida entre 60 i 100 mm³ s'extirpen i es divideixen en fragments

cúbics de 10 mg. Tot aquest procés es duu a terme en condicions d'esterilitat i un cop obtinguts els fragments es dipositen en medi de cultiu suplementat amb penicil·lina, gentamicina i fungizona fins al moment de ser implantats (de 0 fins a 2 hores com a màxim). Aquests fragments s'implanten al pàncreas de ratolins atímics prèviament anestesiats amb ketamina/xilacina mitjançant una laparotomia subcostal esquerra que permet l'exposició del pàncreas i la melsa. El fragment es fixa al cos del pàncreas mitjançant un punt de sutura amb Prolene 5-0 i es reintrodueixen les vísceres a l'interior de la cavitat abdominal. El ratolí es rehidrata amb l'administració intraperitoneal de 500 µl de solució salina i es tanca la incisió mitjançant una grapa quirúrgica (Fig. 62a).

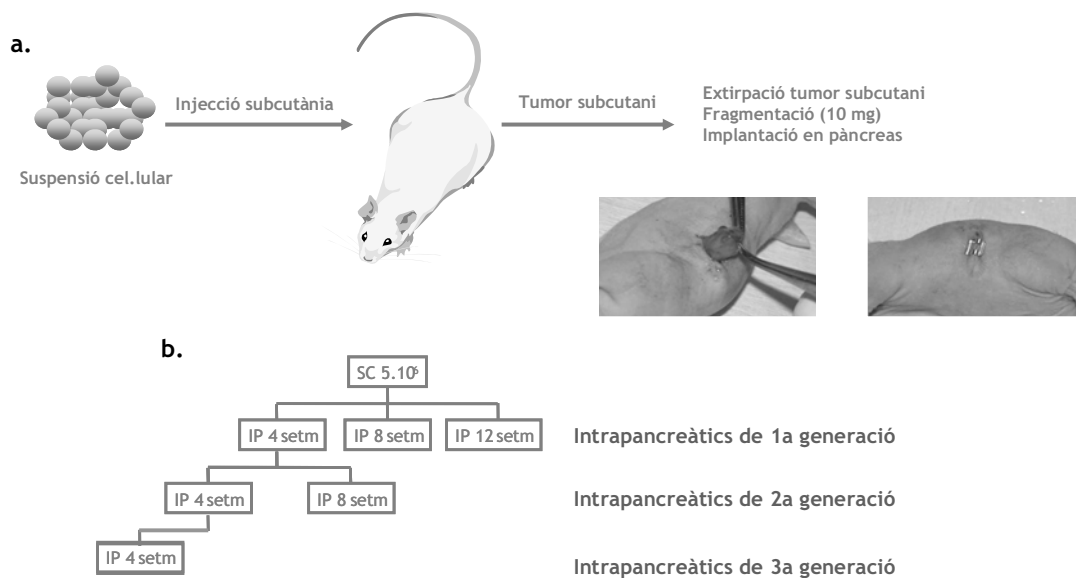


Fig. 62. Representació del procés d'implantació de tumors ortotòpics (a.) i esquema del protocol d'estandarització (b.).

Tal i com es troba esquematitzat a la figura 62b, aquests tumors van créixer durant 4 setmanes, moment en el qual es van extreure, es van tornar a dividir en fragments de 10 mg i es van reimplantar al pàncreas de nous ratolins. Aquest procés es va repetir fins a un cop més. A més, per a la primera i la segona generació es va permetre el creixement d'un subgrup de tumors fins a les 8 setmanes, allargant-se fins a 12 només en el cas de la primera generació per raons ètiques degut a la mida del tumors. Aquest protocol ens va permetre determinar la taxa de creixement dels tumors de les diverses generacions, així com el patró de disseminació, punts essencials per a la realització d'experiments posteriors *in vivo*. Es va posar de manifest una adaptació dels tumors al creixement en l'entorn del pàncreas, ja que el creixement d'aquests s'accelerava de forma considerable a mesura que els fragments es reimplantaven al pàncreas (Fig. 63b): els tumors intrapancreàtics que provenen directament dels tumors subcutanis presenten un creixement linial des de la setmana 4 fins a la 12 (Fig. 63a), mentre que, els que

provenen de les següents generacions es caracteritzen per un creixement accelerat. A la figura 58b s'observa l'augment del pes dels tumors a mesura que s'adapten a l'entorn, a més, aquestes diferències es fan més patents quan el pes dels tumors es mesura a les 8 setmanes. Essent el pes dels tumors intrapancreàtics procedents de la segona generació 1.5 vegades més grans que els generats a partir dels subcutanis, mentre que els que deriven de la primera generació tenen un augment de 1.2 vegades. Els tumors de tercera generació no es van poder mantenir fins a les 8 setmanes per raons ètiques degudes al tamany del tumor. Cal destacar que el percentatge d'èxit dels tumors implantats a partir dels subcutanis fou del 90%, mentre que aquest augmentà fins al 100% per la resta de generacions.

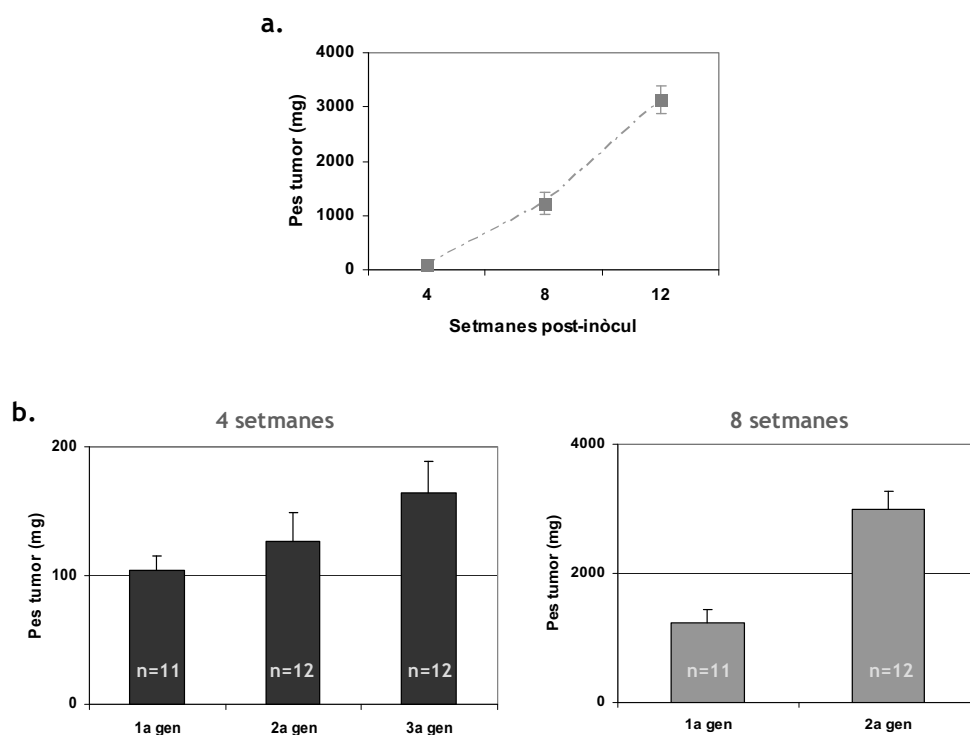


Fig. 63. Seguiment del creixement dels tumors intrapancreàtics provinents de la línia NP-18. a. Corba de creixement dels tumors que provenen directament dels subcutanis b. Pes dels tumors segons l'origen del tumor mesurat a les 4 setmanes (negre) i a les 8 setmanes (gris). Els resultats són la mitjana \pm SEM, el nombre d'animals s'indica a l'interior de cada barra.

La implantació ortotòpica descrita permet la interacció del tumor amb l'entorn, fet que proporciona un patró de metàstasi definit. Aquestes dependran de la capacitat migradora i angiogènica de la línia cel·lular que s'utilitzi, així com de la seva preferència tissular. Els tumors així obtinguts a partir de la línia NP-18 mostren a les 8 setmanes una disseminació peritoneal amb metàstasi clarament aparents al mesenteri i al retroperitoneu, així com al fetge i al diafragma (Fig. 64).

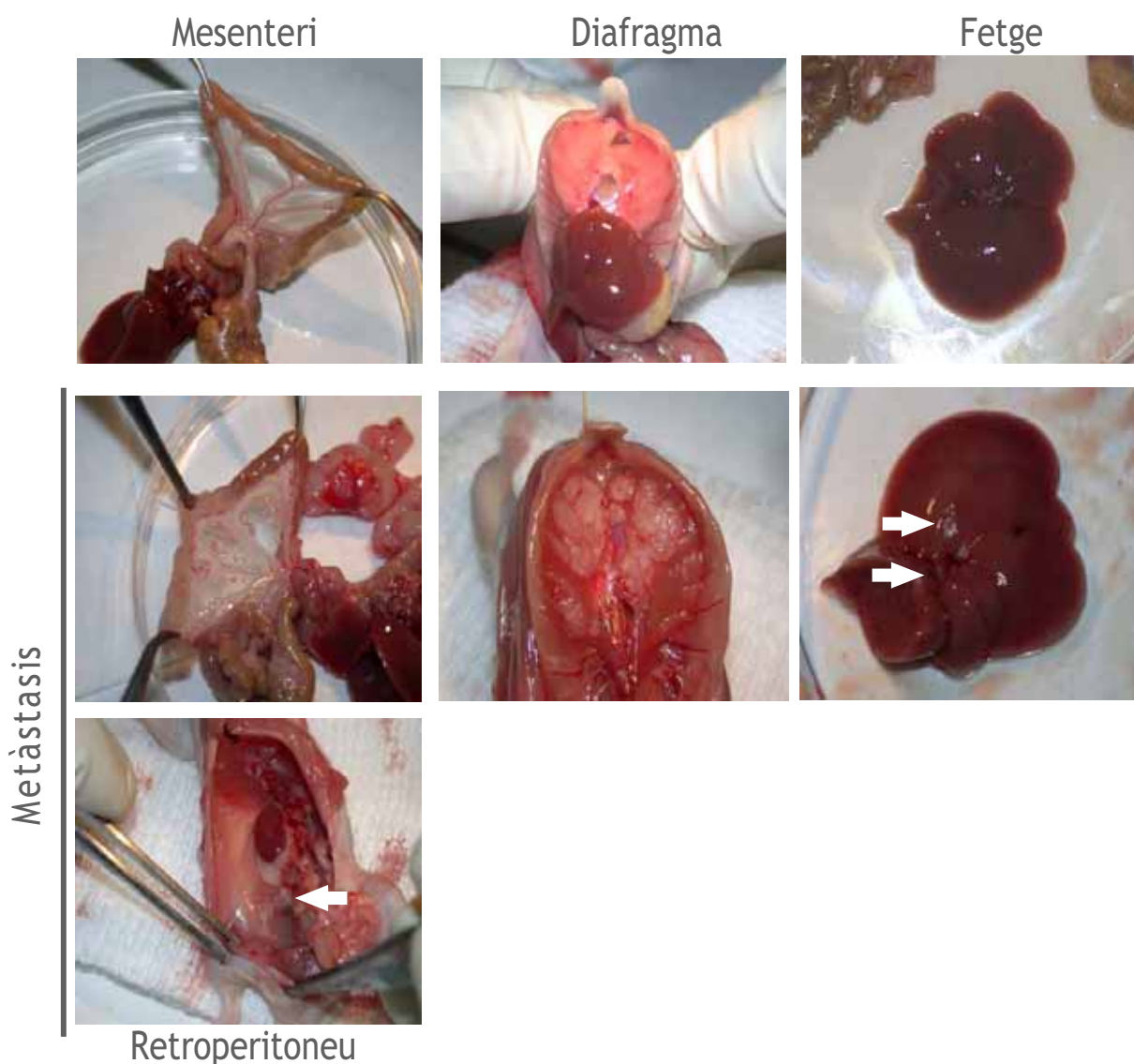


Fig. 65. Patró de metàstasis dels tumors intrapancreàtics de la línia NP-18. El panell superior mostra l'aspecte dels òrgans sans i l'inferior les metàstasis observades.

Arran d'aquests resultats, vàrem escollir els tumors establerts a partir dels tumors intrapancreàtics de segona generació per validar la resposta del model a un tractament conegut. Aquesta elecció vingué determinada per l'equilibri entre l'adaptació a l'entorn i la taxa de creixement mostrada. Així, aquests tumors estan adaptats a l'entorn i no mostren un creixement desmesurat que dificultaria la realització dels experiments. A més, també vàrem afegir la línia NP-9 com a model addicional. Els tumors de NP-9 intrapancreàtics de primera generació tot i tenir un pes mig a les 4 setmanes de 70 mg molt semblant al de NP-18, tenen una cinètica de creixement més lenta i la seva acceleració pel procés d'adaptació és

menor. Per altra banda, als temps analitzats, la línia NP-9 es caracteritza per un patró de disseminació peritoneal similar a la línia NP-18.

5.1.1. Validació de la resposta al tractament amb gemcitabina

Per dur a terme aquests assajos, els tumors intrapancreàtics procedents dels subcutanis es van extreure a les quatre setmanes, amb un pes mig aproximat de 70 mg per a les dues línies i es van dividir en fragments de 10 mg. Es van implantar 5 tumors per condició de la línia NP-18, prèviament estandaritzada, i 12 de la línia NP-9. La pauta de tractament consistí en dues dosis setmanals de 125 mg/kg de gemcitabina intraperitoneal a partir d'una setmana post-inòcul. Els tumors de NP-18 es van tractar durant 4 setmanes i es van sacrificar a les 5 setmanes post-implant mentre que el tractament dels tumors NP-9 fou de 5 setmanes i el sacrifici es realitzà a les 6 setmanes de la intervenció. El tractament amb el fàrmac produeix una disminució de la mida dels tumors en els dos models (Fig. 66), essent aquesta major a la línia NP-18, fet que concorda amb la major sensibilitat de la línia NP-18 en cultiu, ja que presenta una IC_{50} tres vegades inferior a la de NP-9.

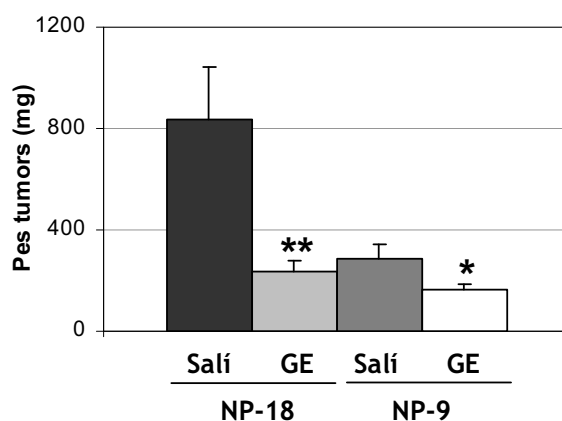


Fig. 66. Sensibilitat a gemcitabina dels tumors intrapancreàtics NP-9 i NP-18.

Pes final dels tumors tractats amb gemcitabina, a l'esquerra els NP-18 i a la dreta els NP-9. Els resultats són la mitjana ± SEM (n=5 a NP-18; n=12 a NP-9).

Cal destacar que, la inhibició del creixement s'acompanya d'una disminució en la disseminació metastàtica malgrat que no s'assoleix la total eliminació. Als tumors NP-9 tractats, no es detecta cap metastasi retroperitoneal ni hepàtica, i la incidència de les diafragmàtiques i mesentèriques disminueix significativament quan es compara amb el grup control. Als tumors NP-18, aquesta disminució es produeix més en el nombre que en la distribució, essent el diafragma l'únic amb absència en el moment del sacrifici.

Aquest model obtingut a partir de l'implant ortotòpic de fragments tumorals procedents de tumors subcutanis generats a partir de línies cel·lulars és fàcil d'estandaritzar i es caracteritza per una elevada reproductibilitat dels resultats. Aquestes característiques fan que sigui un bon model per a l'avaluació de diverses combinacions terapèutiques. A més, permet no tan sols la determinació dels efectes sobre la inhibició del creixement tumoral sinó que també proporciona una informació molt valuosa dels efectes sobre les metàstasis. Malgrat això, l'origen d'aquests tumors és isogènic i per tant, no representen bé la diversitat cel·lular dels tumors humans. Aquest fet en pot limitar l'extrapolació dels resultats als humans.

A partir d'aquests resultats previs ens vàrem plantejar l'establiment de tumors ortotòpics a partir de fragments tumorals procedents directament d'un tumor humà, per tal de superar la limitació del model anterior en quan a diversitat de la mostra. De totes maneres, l'elevat cost de manteniment d'aquest tipus d'assajos ens va portar a plantejar-nos la possibilitat d'aturar la propagació d'aquests models en els punts desitjats. Així doncs, en primer lloc vàrem voler determinar la viabilitat de tumors criopreservats en nitrogen líquid, per tal d'assegurar el manteniment dels models. En aquest sentit, fragments procedents dels experiments anteriors havien estat congelats amb medi de cultiu complementat amb un 20% de sèrum fetal boví i un 20% de l'agent crioprotector DMSO. 30 fragments així criopreservats varen ser descongelats ràpidament i rentats dos cops amb medi complementat amb penicil·lina, gentamicina i fungizona, per tal de retirar les restes de DMSO. Aquests fragments oscil·laven entre 5 i 10 mg, essent 13 de 5-6 mg, 3 de 7-8 i 14 de 9-10 mg. Els ratolins es varen sacrificar 12 setmanes després de l'implant i el percentatge d'èxit fou d'un 66%, posant de manifest la viabilitat dels fragments criopreservats i simplificant així el manteniment dels models.

5.2. Establiment de xenoimplants ortotòpics procedents de fragments quirúrgics d'adenocarcinomes de pàncreas humans

Per obtenir models de càncer de pàncreas humà més propers a la realitat clínica, durant un període d'un any i dos mesos, es van implantar 15 tumors procedents d'adenocarcinomes de pàncreas localment avançats obtinguts per resecció quirúrgica a l'Hospital Clínic de Barcelona. Un cop obtinguda la peça quirúrgica, la Dra. Rosa Miquel (metge anatomopatòleg de l'Hospital Clínic de Barcelona) escollia una zona adequada i n'extreia un fragment representatiu. Aquest era traslladat ràpidament, submergit en medi de cultiu complementat amb penicil·lina, gentamicina i fungizona, cap al servei d'experimentació animal del Parc Científic de Barcelona on es dividia en 5 fragments de 10 mg i s'implantava tal i com s'ha descrit prèviament, procurant sempre que fos mínim el temps transcorregut entre l'extirpació quirúrgica i la implantació al ratolí (mai superior a

3 hores). A més, una part representativa de cada tumor es va incloure en OCT i una altra en parafina. Les característiques dels pacients, així com una breu descripció de les característiques dels tumors es detallen a la taula 15.

	Gènere Edat	Tipus histològic del tumor primari humà	Mida (cm)	Grau de diferenciació
CP1	♀ 76	ADP Mucosecreció 40%	3.5	Moderadament diferenciat
CP2	♀ 50	ADP	2.5	Ben diferenciat
CP3	♀ 47	ADP Mucosecretor	3.3	Moderadament diferenciat
CP4	♂ 75	ADP	2	Pobrament diferenciat
CP5	♀ 80	ADP	2	Moderadament diferenciat
CP6	♀ 73	ADP	3	Moderada i pobrament diferenciat
CP7	♀ 78	ADP	2.1	Moderadament diferenciat
CP8	♀ 78	ADP	3.5	Moderadament diferenciat
CP9	♂ 78	ADP Mucosecreció focalitzada	3.5	Moderadament diferenciat
CP10	♂ 74	ADP	3	Ben diferenciat
CP11	♂ 71	ADP Mucosecreció focalitzada	4.5	Moderada i pobrament diferenciat
CP12	♂ 57	ADP	3	Moderadament diferenciat
CP13	♂ 84	ADP Mucosecreció focalitzada	3.5	Moderadament diferenciat
CP14	♂ 44	ADP	NA	NA
CP15	♂ 45	ADP	3	Moderadament diferenciat

Taula 15. Dades clinicopatològiques dels 15 adenocarcinomes de pàncreas implantats. ADP: Adenocarcinoma ductal pancreàtic. NA: no avaluable.

Breument, dels 15 pacients, 8 eren homes i 7 dones, amb una mediana d'edat de 74 anys i una mitja de 67.3, les edats oscil·laven entre els 44 i els 84 anys. La mida dels tumors variava entre 2 i 4.5 cm, amb una mitja i una mediana de 3. La mida del tumor CP14 no es va poder determinar ja que aquest pacient havia rebut quimioteràpia prèvia a la intervenció. L'anàlisi macroscòpic d'aquest no va poder determinar la presència clara de tumor degut a la substitució del teixit pancreàtic per fibroblasts, mentre que a l'anàlisi histològic posterior es va observar algun grup aïllat de cèl·lules neoplàsiques entre l'extens estroma. Histològicament, tots els tumors són adenocarcinomes ductals pancreàtics. La localització majoritària dels tumors era al cap del pàncreas (14 de 15) i la invasió ganglionar i dels òrgans proximals evidenciava un patró de disseminació variable entre els pacients.

Dels 15 tumors implantats inicialment, 11 han estat propagats satisfactòriament en ratolí. De totes maneres, el percentatge d'èxit de l'implant inicial originari del pacient ha estat variable, essent aquest del 100% només per a CP3 i CP9 (Fig. 67).

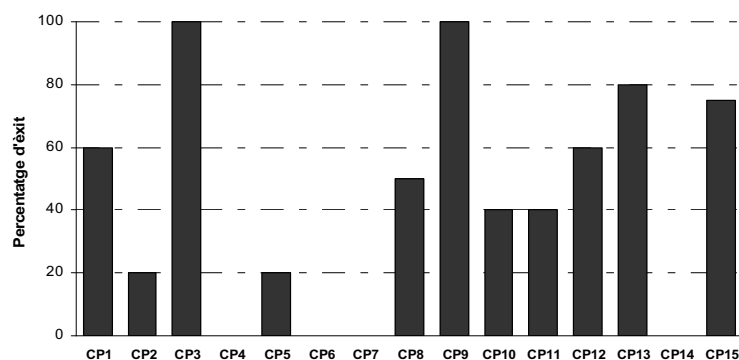


Fig. 67. Percentatge d'èxit dels xenoimplants ortotòpics de primera generació procedents de fragments de tumors d'adenocarcinoma ductal pancreàtic humà.

Dels quatre models que no han progressat, podem diferenciar entre CP6 i CP7, on no es va detectar creixement de la massa tumoral durant els 18 mesos posteriors a l'implant, i els casos de CP4 i CP14, que no es poden considerar estrictament com a casos no progressius. Els ratolins amb els tumors de CP4 varen morir entre 2 i 4 dies després de l'operació, sense que s'hagi pogut determinar la causa mentre que CP14 provenia d'un pacient que havia estat prèviament sotmès a quimio i radioteràpia i com ja s'ha esmentat, el nombre de cèl·lules neoplàsiques existents era realment limitat. Per tant podríem dir que l'èxit de la propagació fou de 11 dels 13 models. Cal destacar que el percentatge d'èxit obtingut en la incidència dels tumors ha anat augmentant en les subsegüents generacions. Aquest ha estat, a gairebé tots els models perpetuats, del 100% en la tercera generació i en cap cas inferior al 50%. La variabilitat obtinguda a la primera generació, així com l'increment en la taxa d'èxit són molt probablement el reflex de l'elevada desmoplàsia que caracteritza als tumors de càncer de

pàncreas humà. Aquesta, a mesura que es succeeixen les generacions, es va perdent i els tumors s'enriqueixen en cèl·lules tumorals sense perdre les seves característiques histològiques.

5.2.1. Característiques histològiques dels tumors

Existeix una bona correlació entre l'aspecte histològic del tumor del pacient i els perpetuats al pàncreas de ratolins atímics, fins i tot després de diverses generacions (Fig. 68). Tan sols algun tumor és histològicament menys diferenciat que el tumor primari humà, fet que podria ser degut a la selecció en el moment de fragmentar el tumor, d'una zona concreta que ja ho era.

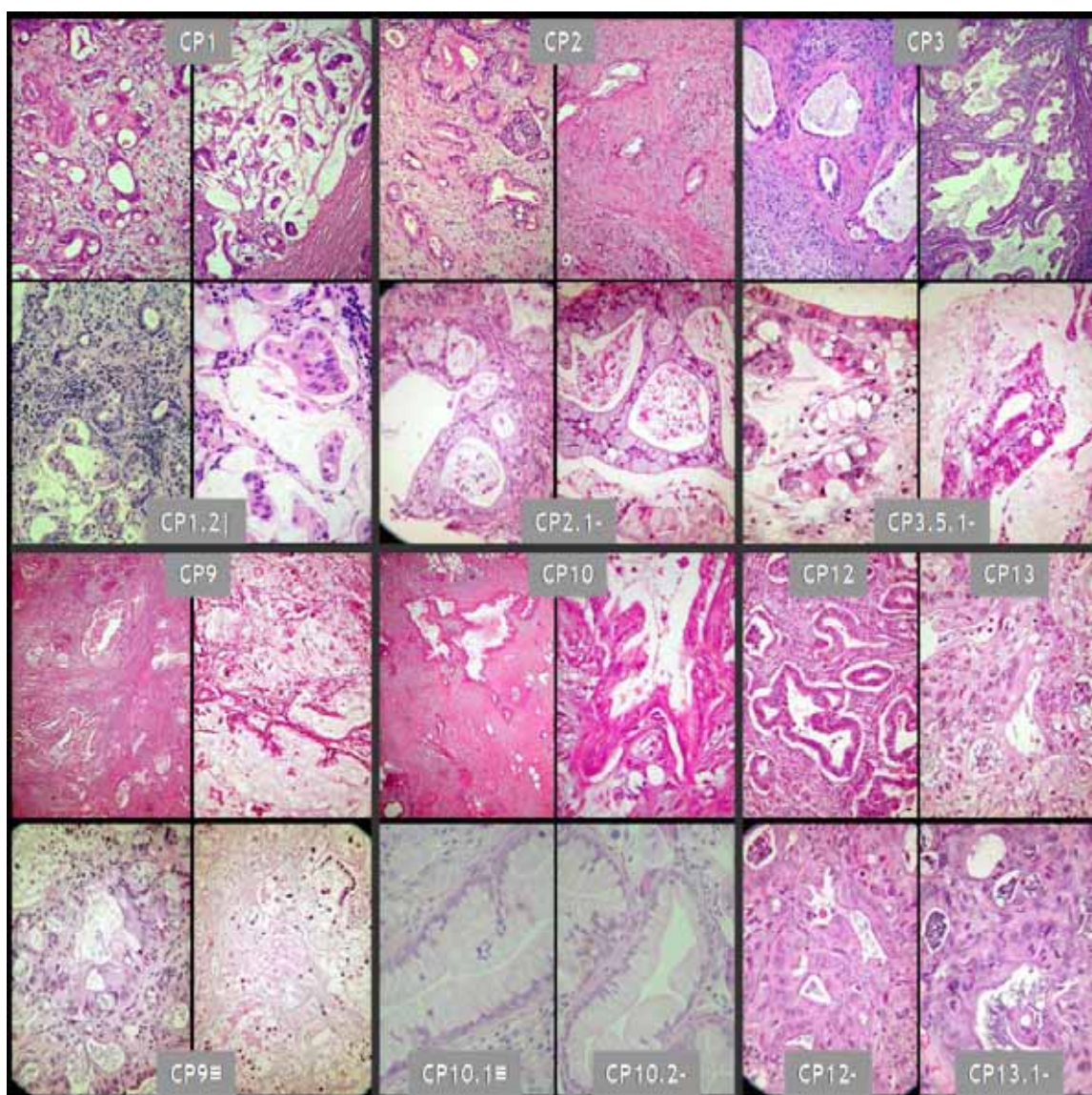


Fig. 68. Anàlisi comparatiu entre els tumors primaris i els de generacions següents. Tinció hematoxilina-eosina. Microfotografies.

Tumor primari humà			Tumor xenoimplantat	
	Grau de diferenciació	Patró histològic i de creixement	Grau de diferenciació	Patró histològic i de creixement
CP1	Moderadament diferenciat	Glàndules ben definides Patró cribiforme Grups de cèl·lules a les llacunes de mucina	Moderadament diferenciat	Glàndules ben definides Patró cribiforme Grups de cèl·lules a les llacunes de mucina
CP2	Ben diferenciat	Glàndules ben definides	Ben i moderadament diferenciat	Glàndules ben definides Patró cribiforme
CP3	Moderadament diferenciat	Glàndules ben definides i patró glandular irregular Dilatació d'un ducte mucinós cístic	Moderadament diferenciat	Glàndules ben definides i patró glandular irregular Mucoproducció
CP4	Pobrament diferenciat	Patró glandular complex Patró focal en cordó	NA	NA
CP5	Moderadament diferenciat	Glàndules ben definides Patró glandular cribiforme	NA	Creixement molt ràpid Necrosat
CP6	Moderada i pobrament diferenciat	Glàndules ben definides Patró focal cribiforme Nius sòlid petits i cordonats	ND	ND
CP7	Moderadament diferenciat	Glàndules ben definides Patró focal glandular complex	ND	ND
CP8	Moderadament diferenciat	Glàndules ben definides Patró focal glandular complex	ND	ND
CP9	Moderadament diferenciat	Glàndules ben definides Patró cribiforme Grups de cèl·lules a les llacunes de mucina	Moderadament diferenciar	Patró papil·lar i cribiforme Mucoproducció
CP10	Ben diferenciat	Glàndules ben definides	Ben i moderadament diferenciat	Glàndules ben definides Patró cribiforme
CP11	Moderada i pobrament diferenciat	Patró glandular complex Mucoproducció Patró papil·lar	ND	ND
CP12	Moderadament diferenciat	Glàndules ben definides i patró glandular irregular	Moderadament diferenciat	Glàndules ben definides i Patró glandular irregular
CP13	Moderadament diferenciat	Glàndules ben definides Patró cribiforme	Moderadament diferenciat	Glàndules ben definides Patró glandular irregular i Patró cribiforme
CP14	NA	Glàndules aïllades		
CP15	Moderadament diferenciat	Patró glandular irregular	Pobrament diferenciat	Nius sòlids petits

Taula 16. Comparació entre el grau de diferenciació i el patró histològic i de creixement entre els tumors primaris i els xenoimplants ortotòpics. NA: no avaluable. ND: no disponible.

El grau de diferenciació i el patró histològic i de creixement analitzats per la Dra. Miquel es detallen a la taula 16, on es compara el tumor primari amb els xenoinplants establerts al pàncreas del ratolí.

5.2.2. Cinètica de creixement i disseminació

Per altra banda també s'ha pogut observar una elevada variabilitat en el temps de decalatge entre el moment de l'implant i el de detecció per palpació del creixement del tumor, oscil·lant aquest entre pocs dies (CP5) i 9 mesos en funció del pacient d'origen (Taula 17). Tots els tumors que han crescut han estat propagats durant un mínim de dues generacions addicionals, fet que ens ha permès caracteritzar també aquests models a nivell histològic i determinar les seves taxes de creixement. El creixement dels tumors s'accelera progressivament a mesura que augmenten les generacions, fet que coincideix amb la disminució de la desmoplàsia associada a aquest tipus de tumors i el consegüent enriquiment d'aquests en cèl·lules neoplàsiques.

	Latència	Taxa de creixement
CP1	1,5	+
CP2	1,0	+
CP3	1,0	++
CP5	0,0	++++
CP8	8,5	+/-
CP9	1,2	+++
CP10	3,6	++
CP11	8,9	++
CP12	3,7	++
CP13	1,7	++
CP15	4,1	+++

Taula 17. Període de latència i taxa de creixement en la primera generació dels models ortotòpics generats. La taxa de creixement es calcula dividint el pes final del tumors pel temps que ha trigat a créixer, essent +/- molt lenta; + lenta, ++ mitja; +++ ràpida; ++++ molt ràpida.

L'anàlisi del patró de disseminació mostra un perfil similar entre els pacients dels quals s'ha pogut obtenir informació i els ratolins xenoinplantats (Taula 18). El patró de disseminació és específic del tumor i es manté estable a través de les tres generacions analitzades. Tots els ratolins presenten disseminació local i gairebé tots ells presenten disseminació hematològica, majoritàriament al fetge i, en alguns casos, pulmonar.

	Tumor primari humà					Tumor xenoimplantat	
	Estadiatge tumoral	Invasió ganglionar	Invasió perineural	Invasió vascular	Recurrència Metastàtica	Disseminació local	Disseminació hematològica
CP1	T3N0	0/32	0	0	NA	Peritoneal Gangli mesentèric	Pulmó Fetge
CP2	T2N1	14/32	1	1	NA	Peritoneal Gangli mesentèric Ovari cístic	
CP3	T2N1	6/13	1	1	Peritoneal ascites	Peritoneal ascites Gangli mesentèric	Fetge
CP4	T3N1	8/9	1	1	Pulmó	ND	ND
CP5	T3N1	1/15	1	0	Local i Peritoneal	Peritoneal Mesentèrica Gangli mesentèric	Pulmó Fetge
CP6	T2N1	11/18	1	1	NA	ND	ND
CP7	T3N1	1/11	1	0	Peritoneal	ND	ND
CP8	T2N0	0/10	1	0	Sense evidències de progressió	Local i Peritoneal Mesentèrica Gangli mesentèric	Fetge Gangli axil·lar
CP9	T2N1	6/15	0	1	Recaiguda local	Local i Peritoneal Mesentèrica Gangli mesentèric	Pulmó Fetge
CP10	T2N1	4/18	1	0	NA		
CP11	T2N1	2/15	1	1	Pulmó		
CP12	T2N0	0/17	0	0	Sense evidències de progressió	Peritoneal	
CP13	T1N1	2/21	1	0	NA	Local i Peritoneal Mesentèrica Gangli mesentèric ascites Ovari cístic	Fetge
CP14	T3N0	0/14	1	1	Fetge	ND	ND
CP15	T2N1	15/28	1	1	Sense evidències de progressió		Pulmó Fetge

Taula 18. Patró de metàstasis dels 15 adenocarcinomes de pàncreas humans i els seus corresponents xenoimplants. L'estadiatge es va determinar mitjançant la classificació TNM de tumors malignes (UICC 2002, 6 ed). NA no avaluable. ND: no disponible.

5.2.3. Expressió de marcadors

Per altra banda, també s'ha realitzat una caracterització d'aquests tumors per determinació de diferents marcadors representatius per *tissue array*. De tots ells s'ha analitzat l'expressió del marcador de proliferació Ki67, de les citoqueratines (CK) 7 i 20 i dels supressors tumorals p16, p27 i p53.

El marcador de proliferació Ki67 mostra una expressió variable entre els diferents casos i oscil·la entre el 5% de CP10 i el 70% de CP1. La correlació existent entre les diferents generacions de xenoimplants és superior al 0.93, el que demostra la robustesa del model. Aquesta correlació disminueix fins al 0.85 quan es compara el tumor primari amb les diferents generacions obtingudes. Per altra banda, algunes CKs presenten un patró d'expressió diferencial entre el teixit normal i el tumoral. La citoqueratina 7 s'expressa en les cèl·lules ductals pancreàtiques en el parènquima pancreàtic normal i en cèl·lules canceroses. La citoqueratina 20 és absent en el teixit pancreàtic normal i l'expressió elevada en tumors de pàncreas correlaciona amb una supervivència postoperatòria menor (Matros MD et al., 2006). A les nostres mostres, la CK7 s'expressa de forma homogènia al citoplasma de les cèl·lules a tots els tumors excepte a tres (CP1, CP3 i CP9), on el percentatge de cèl·lules positives mostra una certa variabilitat. La majoria dels casos (14 dels 15), tenien un percentatge d'expressió entre el 25 i el 50%, o bé superior al 50%. Únicament un cas presentava una expressió entre el 5 i el 25%. L'expressió d'aquesta es manté o s'incrementa en els tumors xenoimplantats. Per altra banda, la CK20 no s'expressa a 12 dels tumors humans i en els 3 restants el seu percentatge és superior al 25% i a més, aquest es manté als tumors xenoimplantats dels ratolins. En alguns dels tumors humans que eren negatius s'observa, a les següents generacions, un augment focal de l'expressió d'aquesta citoqueratina, però en cap cas el percentatge assoleix el 10%. La concordança entre l'expressió d'ambdues CKs en els tumors primaris i els xenoimplants és excel·lent als tumors analitzats.

L'expressió del gen supressor de tumors p16 no s'ha pogut detectar a cap dels tumors analitzats, el que no és d'estranyar si tenim en compte que la seva expressió desapareix en un 90% dels tumors de pàncreas. Mentre que l'expressió nuclear de p27 és elevada a 12 dels 15 pacients, i aquesta es manté als tumors de ratolí analitzats. Dels 15 tumors inicials, un és negatiu i dos mostren un 30% de positivitat que es manté en els xenoimplants. La proteïna p53 es troba altament expressada a 7 dels tumors, un és negatiu i la resta presenten una expressió reduïda. En els tumors secundaris s'observen resultats similars. L'expressió elevada de p53 és indicativa d'una mutació, ja que aquestes, li acostumen a conferir resistència a la degradació. La seqüenciació del gen dels tumors ha corroborat els resultats previs observats amb el *tissue array*. Així doncs, CP9, CP11 i CP13 presenten mutacions als exons 5-6 i CP12 a l'hexó 8. En concordança, els tumors amb baixa expressió CP1, CP3, CP10 i CP15 presenten el gen salvatge.

Finalment, els tumors també han estat caracteritzats per western blot a partir d'un homogenat tumoral per l'expressió de p16, p53 i DPC4 (Fig. 69). Els nivells

d'expressió de p16 i p53 es corresponen als prèviament establerts amb el *tissue array*, així doncs, p16 tan sols es detecta a CP2 i amb una intensitat molt feble. Per altra banda, en els nostres tumors l'expressió de DPC4 es perd a CP1, CP2, CP3, CP9, CP12 i CP15, 6 dels 11 tumors analitzats (54.5%). El percentatge de mostres que presenten alteracions a DPC4 es correspon amb les estadístiques prèvies on aquest es troba alterat en un 55% dels tumors de pàncreas, fet que correlaciona amb la supervivència dels pacients (Miyaki M et al 2003).

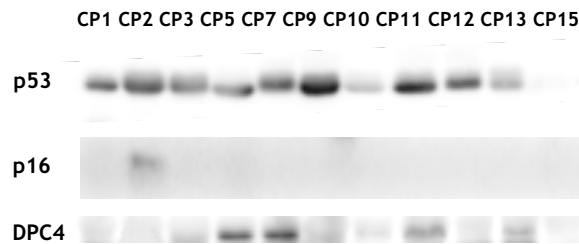


Fig. 69. Immunodetecció de p16, p53 i DPC4 als homogenats tumorals.

5.2.4. Validació per tractament amb gemcitabina de CP2, CP12 i CP15

Paral·lelament a la caracterització prèvia dels tumors, vàrem voler analitzar com responien 4 d'aquests models al tractament amb gemcitabina. Per dur a terme aquests assajos vàrem escollir CP2 amb la proteïna p53 salvatge, CP12 que presenta una mutació a l'exó 8 i CP15 que, malgrat tenir la proteïna p53 salvatge, hi ha dubtes sobre els seus nivells. CP15 es caracteritza per un creixement ràpid, mentre que el de CP2 és lent i el CP12 és intermedi. Als tres experiments, la dosi de gemcitabina escollida fou de 100 mg/kg i l'administració intraperitoneal. El tractament fou de dues dosis setmanals, excepte per CP15 que només en rebia una per setmana. En els tres casos la gemcitabina administrada intraperitonealment inhibeix el creixement tumoral (Fig. 70). En tots els casos s'ha realitzat el seguiment del creixement tumoral per palpació i la determinació del pes final dels tumors en el moment del sacrifici. La palpació dels tumors permet realitzar un seguiment acurat del creixement tumoral i per tant de l'efecte del tractament. Els tumors de CP2 tractats mostren un retard en el creixement respecte el control, però els tumors no remetent ni s'estabilitzen durant el període de tractament. Per altra banda, el tractament amb gemcitabina sí que és capaç d'aturar el creixement dels tumors CP12. A més, l'efecte de la gemcitabina es manté durant gairebé dues setmanes més després de retirar el fàrmac. En canvi, els tumors de CP15, tractats tan sols amb una sola dosi setmanal, només presenten un lleuger alentiment del creixement que fa que les diferències de pes dels tumors al final de l'experiment no siguin significatives. Cal destacar, que en els tres experiments, el nombre de metàstasis també disminueix de forma considerable i sovint aquestes no són detectables macroscòpicament.

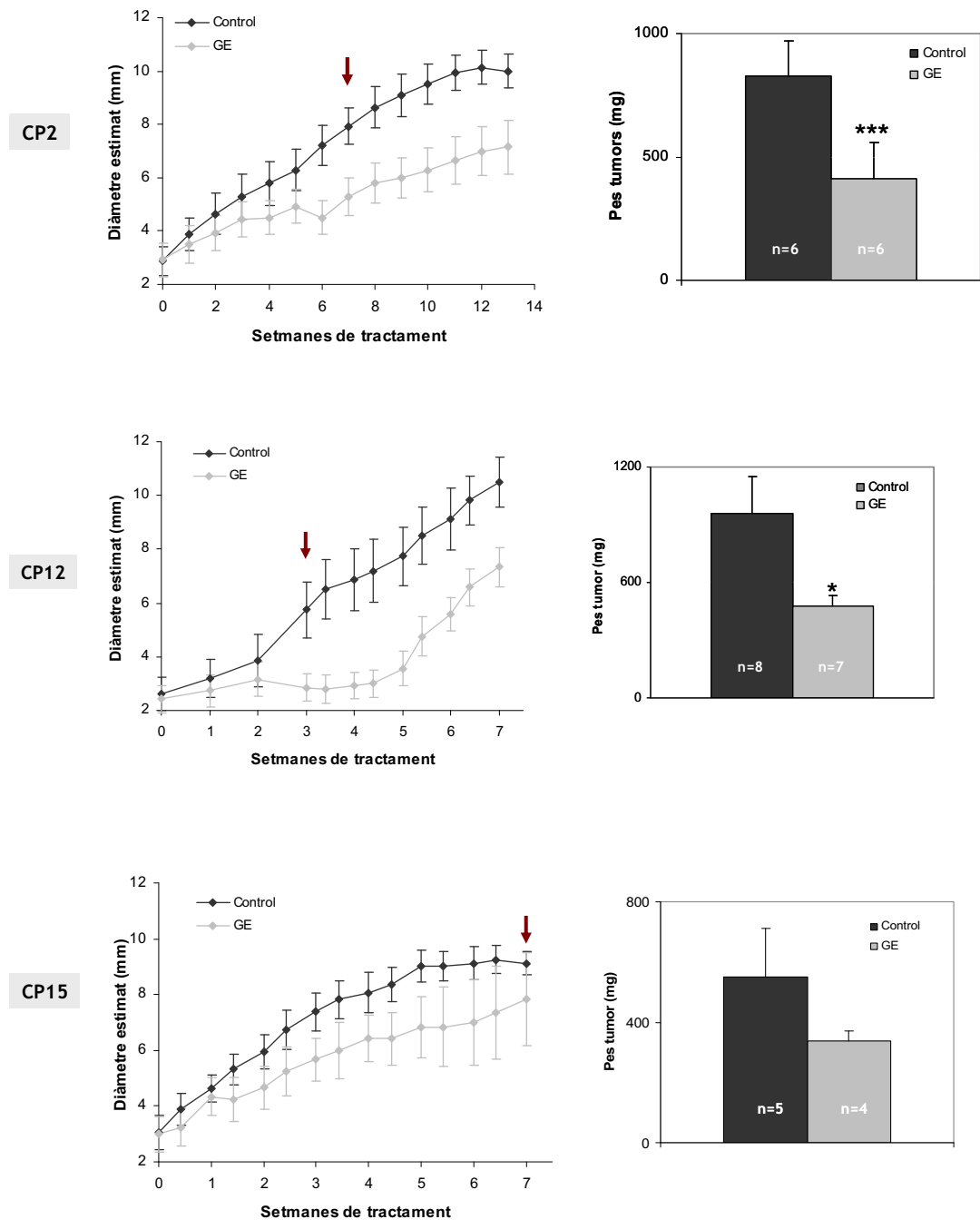


Fig. 70. Efecte del tractament amb gemcitabina en tumors CP2, CP12 i CP15. En negre els tumors control i en gris els tractats amb el fàrmac. A l'esquerra les gràfiques de seguiment per palpació des de l'inici del tractament, la fletxa indica el moment que s'atura el tractament. A la dreta el pes final dels tumors. El nombre d'animals de cada grup s'indica a l'interior de cada barra. * $p < 0.05$ i *** $p < 0.005$.

5.2.5. Establiment de noves línies cel·lulars

A partir de tots els tumors procedents de les diferents generacions s'ha intentat establir una línia cel·lular, fet que ens ha permès disposar d'un ampli ventall de noves línies cel·lulars derivades d'adenocarcinomes ductals pancreàtics. Per a l'establiment d'aquestes, es van assajar diversos protocols. Aquests consistien en la complementació del medi amb insulina i hidrocortisona, seleni per eliminar els radicals lliures d'oxigen i transferrina per disminuir la toxicitat del ferro, o bé el tractament previ del plàstic amb gelatina per afavorir l'adhesió de les cèl·lules. No obstant, al final, el més eficient fou el més senzill. Breument, es disgrega de forma mecànica amb l'ajuda d'un bisturí un fragment de tumor d'uns 30 mg i es plaqueja en un flascó amb DMEM-F12 complementat amb un 20% de sèrum fetal boví, penicil·lina-estreptomicina, gentamicina i fungizona. A partir d'aquest punt, les cèl·lules es controlen diàriament al microscopi i es realitza un canvi de medi un cop per setmana centrifugant el vell i replaquejant el sediment per evitar la pèrdua de fragments i cèl·lules viables que encara no s'hagin adherit. El cap d'un període de temps relativament breu que oscil·la entre alguns dies o 2-3 setmanes, en funció del tumor d'origen, s'observen cèl·lules adherides. Quan es considera que el nombre de cèl·lules adherides ha superat el llindar crític per a la seva perpetuació, o bé els fragments i restes del sobrenedant presenten un aspecte al microscopi no viable es retira el sobrenedant i es procedeix al canvi de medi per aspiració dos cops per setmana. A partir d'aquest punt, quan les cèl·lules arriben a un 70% de confluència es tripsinitzen i es plaquegen en un nou flascó. Per altra banda, si les cèl·lules no es divideixen o ho fan molt lentament s'aixequen del suport i es tornen a replaquejar per estimular-ne el creixement i evitar així que s'arrestin i es morin. Quan les cèl·lules es divideixen de forma regular i s'han replaquejat amb èxit uns 3 cops es disminueix el percentatge de sèrum fetal boví fins al 10%. Cal destacar que l'obtenció d'una línia sempre és més fàcil a partir dels tumors secundaris probablement perquè estan més enriquits en cèl·lules neoplàsiques. Així, dels 15 tumors humans, tan sols s'ha aconseguit establir una nova línia directament del fragment quirúrgic inicial, CP12. Mentre que, a partir dels tumors xenoimplantats s'ha obtingut un mínim d'una línia de gairebé tots els models que han progressat. El cas extrem és el de CP15, que ha permès l'establiment de línies a partir de gairebé tots els tumors implantats. Alhora, també s'ha aconseguit l'establiment de línies que provenen d'ascites i del tumor que les ha originat. Aquesta obtenció ha permès iniciar un estudi comparatiu molt interessant entre les cèl·lules d'ambdós orígens. A la taula 19 es llisten les línies cel·lulars establertes fins al moment i a la figura 71 les fotografies d'alguna d'aquestes línies.

CP1.2	CP2.1.1	CP3.3 asc	CP7	CP9.3	CP10.2	CP11	CP12pac	CP13	CP15.1
CP1.1.1		CP3.3.1 susp		CP.9.3.1			CP12	CP13.1	CP15.1 asc
								CP13.2	CP15.1c
								CP13.3	CP15.2d
									CP15.2d asc
									CP15.2b
									CP15.2.1
									CP15.2.1 asc
									CP15.2.1a
									CP15.2.1b
									CP15.2.2
									CP15.3.1

Taula 19. Línies cel·lulars establertes fins al moment. Els nombre indiquen el tumor d'origen i la generació a la que es corresponen mentre que les lletres diferencien el ratolí en aquells casos en els que s'ha obtingut més d'una línia cel·lular a partir d'aquella generació. Pac: directe de pacient. Asc: procedent d'ascites.

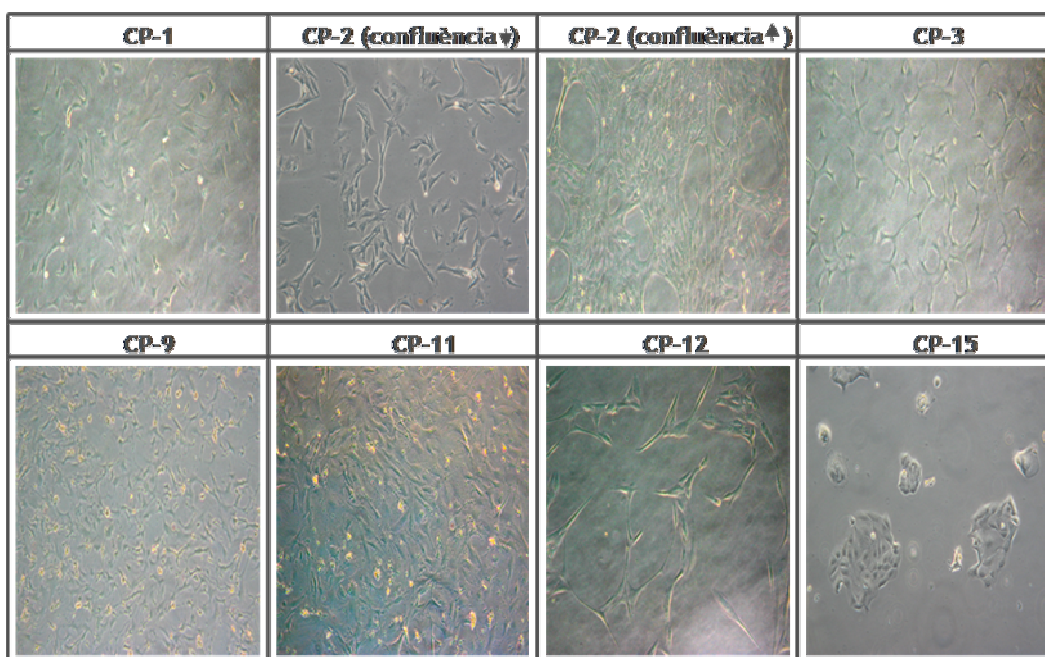


Fig. 71. Microfotografies d'algunes de les línies CP establertes. 100x

L'obtenció de models preclínic adequats és d'importància cabdal pel desenvolupament de nous fàrmacs i de noves estratègies. De totes maneres, sovint aquests models no són prou predictius dels efectes en humans. En aquest sentit, estratègies terapèutiques que havien mostrat uns resultats excel·lents en models murins han representat una gran decepció al ser traslladades als pacients. Una dosificació incorrecta pot ser una de les causes d'aquests resultats negatius, ja que sovint la dosi màxima tolerada en ratolins és de 4 a 5 vegades més elevada (Inaba *et al.*, 1988; revisat per Kerbel, 2003). Existeix un ampli ventall de possibilitats pel que es refereix a models de càncer de pàncreas, i tots ells utilitzats de forma adequada poden aportar una informació molt valuosa. Així doncs, els models subcutanis en un teixit ectòpic poden aportar informació rellevant sobre l'eficiència i la dosificació. Mentre que, els models ortotòpics permeten l'anàlisi de la disseminació metastàtica gràcies a la interacció amb l'entorn. En aquest sentit, hem realitzat un gran esforç per posar a punt diversos models ortotòpics procedents directament de fragments quirúrgics. L'establiment d'aquests models ortotòpics permet la perpetuació de diversos tumors amb trets clarament diferencials en quant a creixement, alteracions genètiques i patró metastàtic. Cal destacar que aquests trets característics es mantenen estables al llarg de les generacions analitzades. Aquest model ens està permetent estudiar els efectes de diferents estratègies terapèutiques que s'emmarquen dins la tesi doctoral de l'Anna Vidal. Al mateix temps, l'establiment de línies cel·lulars que se'n deriven facilita la realització, tenint en compte les limitacions, d'aproximacions terapèutiques *in vitro* prèvies a la realització dels assajos *in vivo* més complexos i costosos.

A més, a partir de les línies cel·lulars establertes s'estan realitzant transfectants estables de luciferasa que ens permetran la seva detecció mitjançant sistemes no invasius. L'inòcul d'aquestes línies per via sistèmica o injecció directa al pàncreas permetrà l'establiment de patrons metastàtics així com l'anàlisi dels efectes dels diferents tractaments sense necessitat de sacrificar l'animal.