

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA



Programa de Doctorado

“BIOMEDICINA”

TESIS DOCTORAL

**“TERAPIA COMBINADA CON GENES SUICIDAS Y AGENTES
QUIMIOTERAPÉUTICOS COMO NUEVA ESTRATEGIA
ANTITUMORAL EN CANCER DE COLON”**

Memoria presentada por Dña. Blanca Cáceres Granados para optar al
grado de Doctor por la universidad de Granada

Granada, 15 de Septiembre de 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Blanca Cáceres Granados
D.L.: GR 729-2014
ISBN: 978-84-9028-889-4

La doctoranda Dña. **Blanca Cáceres Granados** y los directores de la tesis doctoral titulada “TERAPIA COMBINADA CON GENES SUICIDAS Y AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS COMO NUEVA ESTRATEGIA ANTITUMORAL EN CANCER DE COLON” garantizamos al firmar estas tesis doctoral, que el trabajo ha sido relizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, el la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 15 de septiembre de 2013

Doctoranda

Fdo. Dña. Blanca Cáceres Granados

Directores de la Tesis

Fdo. Dña. Antonia Aránega Jimenez

Fdo. Dña. Houria Boulaiz Tassi

Fdo. Dña. M^a Celia Vélez Fernández

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos:

A la Prof. Dña. Antonia Aránega Jiménez, por haberme permitido hacer esta tesis bajo su dirección, poniendo a mi disposición todo lo necesario para su realización, lo que me ha permitido introducirme en el apasionado mundo de la investigación.

A la Prof. Dña. Houría Boulaiz Tassi por haber confiado en mí cuando, un día, llegué a su despacho y le pedí trabajar con ella. Gracias por todo el apoyo y dedicación durante los años de realización de este trabajo. Gracias por darme la oportunidad para cumplir un sueño, vivir la ciencia desde lo microscópico.

A la Prof. Dña. Celia Vélez Fernández por el apoyo recibido durante la realización de este trabajo.

A la Prof. Dña Consolación Melguizo Alonso, al Prof. D Jose Carlos Prados Salazar, a la Prof. Dña Ana Rosa Rama Ballesteros, al Prof. Don Raúl Ortiz Quesada, Prof. D Fernando Rodríguez Serrano y al Prof. D Octavio Caba Pérez por todo el apoyo y las horas de laboratorio compartidas.

Al Dr. Jaime Lazuen Alcón por el trabajo realizado para este proyecto, por su comprensión y su dedicación.

A Mohamed Tassi, a Alicia González Segura, y a Rocío Márquez Crespo por la ayuda recibida para el desarrollo de este trabajo.

A todos los compañeros del laboratorio y en especial a Gloria, por todos los momentos vividos, por todas las dudas que me habéis resuelto, en definitiva, gracias por estar ahí para todo lo que he necesitado.

Al Servicio de Farmacia del Hospital Clínico de Granada por su ayuda.

A mi familia y amigos, gracias por el apoyo y vuestra confianza durante todos estos años.

A todos gracias.

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en el mundo. El tipo más frecuente es el cáncer colorrectal. La terapia génica es una estrategia prometedora para el tratamiento avanzado del cáncer y consiste en la introducción de material genético en el interior de un tejido u órgano con la intención de producir un efecto biológico que permita prevenir o tratar una enfermedad. Siguiendo el estudio en este campo, los objetivos que se plantearon en este proyecto fueron: construcción de vectores retrovirales de expresión inducible en células eucariotas que integraran correctamente los genes *gef* y *apoptina*, optimizar las condiciones adecuadas de transducción del vector inducible con el inserto *gef* y/o *apoptina* y valorar su expresión en células tumorales, analizar sus posibilidades como terapia génica antitumoral usando la línea DLD1 de carcinoma de colon, analizar los efectos de la expresión controlada de los genes *gef* y/o *apoptina* en las células tumorales, estudiar el mecanismo de acción de los citados genes y determinar el efecto potenciador que la terapia génica, pudiera ejercer sobre agentes antitumorales clásicamente usados en el tratamiento del cáncer de colon, así como seleccionar la terapia combinada que consiguiera el tratamiento más eficaz.

Trabajamos con la línea celular DLD1 de carcinoma colorrectal y para la construcción de los vectores se usó el sistema RevTet-On que incluye los vectores pRevTet-On y pRev-TRE, y la línea celular RetroPack PT67. El plásmido pRevTRE fue digerido con las endonucleasas de restricción BamH I y Hind III y sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se obtuvo una amplificación de 170 pb correspondiente al gen *gef* y 473 pb correspondientes al gen *apoptina*, que clonamos en el plásmido pRevTRE. El vector y el inserto se sometieron a una reacción de ligación de extremos cohesivos. El corte con las mismas enzimas de restricción, permitió la orientación adecuada de los insertos. Con los productos de ligación se transformaron bacterias *Escherichia Coli* competentes y, posteriormente, se procedió a la extracción de los plásmido. pRevTRE-*gef* y

pRevTRE-apoptina se transfectaron, mediante liposomas en las PT67. Se inició la selección con higromicina (0.4mg/ml) pasadas 6 horas de la transfección. Las células DLD1 fueron transfectadas con pRevTet-On, mediante liposomas, usando FuGENE™6 y seleccionadas con geneticina (1mg/ml). Una vez terminado el proceso de selección, las células, a las que llamamos DLD1/Tet-On, fueron infectadas con los retrovirus generados por las PT67-pRevTRE-gef y pRevTRE-apoptina. Para favorecer la infección el medio fue suplementado con polybrene (filtrado). Tras dos semanas de selección con higromicina (0.4mg/ml y 0.2mg/ml) conseguimos obtener las líneas celulares DLD1/Tet-On-gef y DLD1/Tet-On-apoptina. Sobre la línea DLD1/Tet-On-gef, se repitió el proceso para conseguir su infección con pRevTRE-apoptina, consiguiendo la línea DLD1/Tet-On-gef-apoptina. Provocamos la expresión de los genes *gef* y *apoptina* mediante doxiciclina. Mediante extracción de ARN y RT-PCR objetivamos la amplificación del fragmento de 170 pb correspondiente al gen *gef* y la del fragmento de 473 pb correspondiente al gen de la *apoptina*. Realizamos estudio de proliferación, detección de la apoptosis mediante tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio, estudio del ciclo célula y análisis ultraestructural. Para valorar el mecanismo de acción de ambos genes realizamos la medida del potencial de membrana mitocondrial, y estudiamos la expresión proteica de las caspasas 3, 9 y 8, así como el citocro c, bax y p53. Finalmente realizamos estudios para el cálculo de la IC₅₀ con 5 Fluorouracilo, Oxaliplatino e Irinotecán. En la línea control (DLD1) y en las líneas transducidas e inducidas. Posteriormente desarrollamos estudio de proliferación y de apoptosis en todas las líneas, tratadas, tanto con monoterapia como con politerapia, asociando varios fármacos.

A la vista de nuestros resultados concluimos lo siguiente: que la construcción basada en el sistema RevTet-On que incluye a los genes *gef* o *apoptina*, permite su transducción en células eucariotas y posibilita el control de su expresión mediante la inducción con doxiciclina, que la infección mediante estos vectores retrovirales permitió la obtención de las líneas estables DLD1/Tet-

on-gef, DLD1/Tet-On-apoptin y DLD1/Tet-On-gef-apoptina, que la co-expresión de *gef* y *apoptina* provoca una reducción significativa de la tasa de proliferación en la línea DLD1/Tet-On-gef-apoptina mayor que la que provocan *gef* o *apoptina* solos, que la co-expresión de *gef* y *apoptina* provoca modificaciones típicas de muerte celular programada o apoptosis y un aumento significativo de células en fase G2-M y fase S acompañada con una concomitante disminución de la fase G₁ en comparación con las células control y con las células que expresan los genes *gef* o *apoptina* por separado, que la co-expresión de los genes *gef* y *apoptina* provoca la activación de la apoptosis mediante la vía intrínseca e extrínseca, que la co-expresión de los genes *gef* y *apoptina* sensibiliza las células frente a los fármacos antitumorales usados en el tratamiento del cáncer de colon y que la combinación *gef-apoptina/5FU-OXA-IRI* muestra mejores resultados que una terapia únicamente con fármacos. Los resultados experimentales con los genes suicidas *gef* y *apoptina* abren la puerta a una nueva posibilidad terapéutica con el desarrollo de protocolos de terapia génica solos o en combinación con agentes citotóxicos.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. CÁNCER COLORRECTAL	4
1.1. ETIOLOGÍA Y PATOGENIA	4
<u>1.1.1. Factores genéticos</u>	5
<u>1.1.2. Factores ambientales</u>	7
1.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	8
1.3. DIAGNÓSTICO	9
<u>1.3.1. Exploraciones complementarias y pruebas diagnósticas</u>	9
<u>1.3.2. Marcadores tumorales</u>	10
<u>1.3.2.1. Antígeno carcinoembrionario</u>	11
<u>1.3.2.2. El antígeno carbohidrato 19-9</u>	11
<u>1.3.3. Factores de pronóstico auxiliares</u>	12
1.4. CRIBADO	12
1.5. ESTADIAJE	14
<u>1.5.1. Clasificación de Dukes</u>	14
<u>1.5.2. Sistema tumor/ganglios linfáticos/metástasis o TNM</u>	14
1.6 TRATAMIENTO	15
<u>1.6.1. Cirugía</u>	15
<u>1.6.2. Quimioterapia</u>	16
<u>1.6.2.1. 5 Fluorouracilo</u>	16
<u>1.6.2.2. Leucovorín</u>	17
<u>1.6.2.3. Irinotecán</u>	18
<u>1.6.2.4. Oxaliplatino</u>	19
<u>1.6.2.5. Capecitabina</u>	20
<u>1.6.2.6. Combinación de fármacos</u>	21
<u>1.6.3. Radioterapia</u>	22
<u>1.6.4. Anticuerpos monoclonales</u>	22
<u>1.6.5. Otras estrategias terapéuticas</u>	23
2. TERAPIA GÉNICA	24
2.1. DEFINICIÓN	24

2.2. ESTRATEGIAS DE TERAPIA GÉNICA	25
2.3 MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN GÉNICA	29
<u>2.3.1 Vectores virales</u>	29
2.3.1.1. <i>Retrovirus</i>	31
2.3.1.2. <i>Adenovirus</i>	34
2.3.1.3. <i>Adeno-asociados</i>	37
2.3.1.4. <i>Herpesvirus</i>	39
<u>2.3.2 Vectores no virales</u>	41
2.3.2.1. <i>Bombardeo de partículas</i>	42
2.3.2.2. <i>Inyección por aguja</i>	42
2.3.2.3. <i>Electroporación</i>	43
2.3.2.4. <i>Liposomas catiónicos</i>	44
2.3.2.5. <i>Polímeros</i>	46
2.3.2.6. <i>Sonoporación</i>	47
2.3.2.7. <i>Láser</i>	48
2.3.2.8. <i>Magnetofección</i>	48
2.3.2.9. <i>Hidroporación</i>	48
<u>2.3.3 Trasposones</u>	49
2.4 ESTRATEGIAS DE TERAPIA GÉNICA ANTITUMORAL	51
<u>2.4.1. Oncogenes y genes supresores de tumor</u>	51
<u>2.4.2. Inhibición de la angiogénesis</u>	54
<u>2.4.3 Vacunas</u>	56
<u>2.4.4. Sistemas asesino-suicidas condicionales</u>	57
a. <i>Sistema citosina desaminasa</i>	57
b. <i>Sistema Timidina quinasa del Virus Herpes Simplex (HSVtk)</i>	58
c. <i>Sistema de la enzima nitrorreductasa de E. Coli</i>	59
2.4.4.2. Sistema asesino-suicida de acción directa	60
a. Gen de la apoptina	60
b. <i>Gen gef</i>	64
3 TERAPIA COMBINADA	66

II. OBJETIVOS.....	72
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	75
1. LÍNEAS CELULARES.....	77
2. CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES.....	77
3. MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES.....	77
3.3.1 <i>Cambio de medio.....</i>	<i>77</i>
3.2 <i>Lavado de las células.....</i>	<i>78</i>
3.3 <i>División del cultivo celular.....</i>	<i>78</i>
4. CONGELACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES.....	78
5. DESCONGELACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES.....	79
6. CONTAJE CELULAR.....	79
7. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES RETROVIRALES DE EXPRESIÓN EN EUKARIOTAS CON LOS GENES <i>gefY/O apoptina.....</i>	80
8. TRANSFECCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS A LAS CÉLULAS.....	81
9. OBTENCIÓN DE LÍNEAS ESTABLES DLD1/TET-ON-GEF, DLD1/TET- ON-APOPTINA, DLD1/TET-ON-GEF-APOPTINA.....	82
10. INDUCCIÓN DE LAS LÍNEAS INFECTADAS.....	83
11. EXTRACCIÓN DE ARN DE CÉLULAS EUKARIOTAS.....	83
12. TRANSCRIPTASA REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).....	84
12.1 <i>Transcriptasa reversa.....</i>	<i>84</i>
12.2 <i>Reacción en cadena de la polimerasa.....</i>	<i>85</i>
12.3 <i>Preparación del gel de azarosa.....</i>	<i>87</i>
12.4 <i>Electroforesis.....</i>	<i>88</i>
13. ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN CELULAR.....	88
14. ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA (APOPTOSIS).....	89
15. ESTUDIO DEL CICLO CELULAR.....	90
16. ESTUDIO MORFOLÓGICO.....	91

16.1 Microscopía óptica.....	91
16.2 Microscopía electrónica de barrido.....	91
16.3 Microscopía electrónica de transmisión.....	91
17. ESTUDIO DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL MEDIANTE JC-1.....	92
18. WESTERN- BLOT.....	92
18.1 Extracción de proteínas.....	93
18.2 Preparación de geles de archilamida.....	93
18.3 Transferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa.....	95
18.4 Anticuerpos.....	96
19. AGENTES CITOTÓXICOS.....	97
19.1 Agentes citotóxicos empleados.....	97
19.2 Cálculo de la IC 50.....	97
19.3 Estudio de proliferación con fármacos.....	99
19.4 Estudio de apoptosis con fármacos.....	99
20. ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	100
IV. RESULTADOS.....	101
1. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES RETRO VIRALES DE EXPRESIÓN EN EUCARIOTAS CON LOS GENES <i>GEF</i> Y/O <i>APOPTINA</i>.....	103
2. OBTENCIÓN DE LAS LÍNEAS ESTABLES DLD1/TET-ON-GEF, DLD1/TET-ON-APOPTINA Y DLD1/TET-ON-GEF-APOPTINA.....	105
3.- DETERMINACIÓN MEDIANTE RT-PCR DE LA PRESENCIA DE LOS GENES <i>GEF</i> Y <i>APOPTINA</i> EN LAS CÉLULAS TRANSDUCIDAS.....	106
4- ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN LAS LÍNEAS DLD1/TET-ON-GEF, DLD1/TET-ON-APOPTINA Y DLD1/TET-ON-GEF-APOPTINA.....	107
4.1 EFECTO DE LA DOXICICLINA SOBRE LA	

PROLIFERACIÓN DE LA LÍNEA DLD1	107
4.2 EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES	
<i>gef</i> Y/O <i>apoptina</i> SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	108
5.- ANÁLISIS DEL EFECTO APOPTÓTICO	111
6. MODULACIÓN DEL CICLO CELULAR	103
7. CAMBIOS MORFOLÓGICOS	115
7.1 ESTUDIO CON MICROSCOPIA ÓPTICA	115
7.2 ESTUDIO CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	117
7.3 ESTUDIO CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO ...	119
8.- MODULACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	122
9.- ANÁLISIS DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE <i>gef</i> Y/O <i>apoptina</i> MEDIANTE WESTERN BLOT	123
9.1 P53	123
9.2 CASPASA 3	124
9.3 CASPASA 9	125
9.4 CASPASA 8	125
9.5 CITOCROMO- C	126
9. 6 BAX	127
10. TERAPIA COMBINADA: DLD1 TRANSDUCIDA CON <i>gef</i> Y/O <i>apoptina</i> Y FÁRMACOS CITOTÓXICOS	127
10.1 DETERMINACIÓN DE LA IC₅₀	127
10. 2 ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN: TERAPIA COMBINADA CON MONOTERAPIA FARMACOLÓGICA	128
<u>10.2.1 Terapia combinada con 5 fluorouracilo</u>	129
<u>10.2.2 Terapia combinada con oxaliplatino</u>	130
<u>10.2.3 Terapia combinada con irinotecán</u>	131
<u>10. 3 Análisis de la proliferación de la terapia combinada: genes <i>gef</i> y <i>apoptina</i>/ distintas combinaciones farmacológicas</u>	132

<u>10.3.1 5FU/oxaliplatino/irinotecán</u>	133
<u>10.3.2 Oxaliplatino/Irinotecán</u>	134
<u>10.3.3 5Flourouracilo/Irinotecan</u>	135
<u>10.3.4 5Flourouracilo/Oxaliplatino</u>	136
11.- ANÁLISIS DEL EFECTO APOPTÓTICO	
EN TERAPIA COMBINADA	139
11.1 CONTROL SIN TRATAMIENTO	139
11.2 TRATAMIENTO CON 5 FLUOROURACILO	139
11.3 TRATAMIENTO CON OXALIPLATINO	141
11.4 TRATAMIENTO CON IRINOTECÁN	142
11.5 TRATAMIENTO CON 5 FLUOROURACILO	
/OXALIPLATINO/IRINOTECÁN	143
11.6 TRATAMIENTO CON OXALIPLATINO/IRINOTECÁN	144
11.7 TRATAMIENTO CON 5FU/OXALIPLATINO	145
11.8 TERAPIA CON 5FU/IRINOTECÁN	146
V. DISCUSIÓN	150
VI. CONCLUSIONES	152
VII. BIBLIOGRAFÍA	156

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer se entiende como un proceso lógico y coordinado en el que una célula sufre cambios y adquiere capacidades especiales diferentes de las células normales. Según el consenso de la comunidad científica, el cáncer no es una sola enfermedad, sino un grupo heterogéneo de enfermedades con diferentes tipos de alteraciones genéticas y epigenéticas que culminan en una proliferación celular desmedida (Ogino y Goel. 2008). De esta forma, las células cancerosas no están sujetas a las restricciones normales de proliferación celular, impuestas por la biología celular y tisular.

El desarrollo del cáncer requiere la adquisición de seis propiedades fundamentales: insensibilidad a las señales anti-proliferativas, evasión de la apoptosis, potencial de replicación y proliferación ilimitado, mantenimiento de la vascularización y, en caso de malignidad, invasión de tejidos y metástasis (Rakoff-Nahoum, 2006). Estas alteraciones suelen ser consecuencia de la exposición a carcinógenos o a deficiencias en los procesos de reparación del ADN. Pueden ser alteraciones esporádicas o mutaciones en un gen que se encuentra en más de un individuo dentro del mismo grupo familiar. (Van Allen y cols., 2013; Jallepalli y Lengauer, 2001; Vogelstein y Kinzler, 1993)

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en el mundo. Según datos de la OMS, esta enfermedad provoca la muerte de unas 7.6 millones de personas cada año y se estima que para el 2030 la cifra aumente a 11.3 millones. La Sociedad Española de Oncología Médica augura para el año 2015 una incidencia global de cáncer para la población española de 222.069 personas (136.961 hombres y 85.108 mujeres), siendo el tipo más frecuente el cáncer colorrectal, por delante, en términos globales, del cáncer de pulmón y el de mama. La tasa de mortalidad española por cáncer en general es una de las más bajas de la UE con 153 defunciones por 100.000 habitantes (INE 7/2012). La supervivencia a

los 5 años en España será similar a la media europea siendo los tumores responsables del 41.9% de los años potenciales de vida perdidos (INE 7/2012).

1. CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer colorrectal es la segunda causa más común de muerte por cáncer en muchos países industrializados (Puglisi y cols., 2013; Manzano y Pérez-Segura, 2012; Fabrizi y cols., 2010). Es la segunda neoplasia más frecuente en ambos sexos, después del cáncer de pulmón en hombres y de mama en mujeres (Sameer, 2013; INE, marzo 2012; INE, julio 2012). En España, supone un problema de salud de primer orden dada su alta incidencia (31 casos / 100.000 habitantes en varones y 19,6 casos / 100.000 habitantes en mujeres) y morbimortalidad (Proceso Asistencial Integrado cáncer colorrectal, SAS 2011). En Andalucía, en el año 2009, la tasa de morbilidad por cáncer colorrectal fue de 70 casos por 100.000 habitantes. En 2008 supuso 3,6% de todas las defunciones (Proceso Asistencial Integrado cáncer colorrectal, SAS 2011). En Granada en el período de 2005 a 2009 se registraron 22.772 casos de cáncer (Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Andalucía, febrero 2013).

1.1. ETIOLOGÍA Y PATOGENIA

El desarrollo del cáncer colorrectal es un proceso complejo que implica múltiples vías moleculares (Manzano and Pérez-Segura, 2012). La mayor parte de los cánceres colorrectales derivan de pólipos intestinales. Se le llama pólipo a todo tumor que protruye de la pared a la luz intestinal. Desde el punto de vista histológico los pólipos se dividen en: adenomatosos (suponen el 67%), hiperplásicos (el 11%), y una miscelánea que incluye pólipos inflamatorios,

hamartomatosos, juveniles mucosos y otros no mucosos (suponen el 22% del total) (Farreras-rozman, 2012; Bacchiddu y cols., 2012; Rivero y cols., 2012). Sólo los pólipos adenomatosos son claramente premalignos y malignizan en un porcentaje bajo (1%) (Castaño Pinto y cols., 2011).

En la patogenia del cáncer colorrectal intervienen tanto factores genéticos como ambientales.

1.1.1. Factores genéticos:

Aproximadamente el 20% de los casos de cáncer colorrectal tienen agregación familiar con más de dos miembros de la familia de primer grado afectados, mientras que el 5-10% se producen en el contexto de un síndrome hereditario (Lynch y De la Chapelle, 2003).

El estudio del ADN obtenido de los pólipos adenomatosos, las lesiones displásicas y los pólipos con focos microscópicos de células tumorales (carcinoma in situ), ha puesto de manifiesto algunas alteraciones moleculares que suponen un proceso de múltiples etapas en la transformación de la mucosa sana del colon al carcinoma invasor, como se aprecia en la Figura 1. La inestabilidad de los microsatélite, secuencias pequeñas y repetidas de ADN, facilita la aparición del cáncer, al incrementar la frecuencia de mutaciones en determinados oncogenes y genes supresores de tumores. Según este esquema, se produce activación de los oncogenes como KRAS e inhibición de los genes supresores de tumores como APC, SMAD4 y P53, como se puede ver, esquemáticamente en la Figura 1 (Sameer 2013; Benson y cols., 2013; Fayed Sandouk y cols., 2013; Muzny y cols., 2012; Laurent-Puig y cols., 2010; Sameer y cols., 2010). La acumulación de las alteraciones en estos genes, independientemente del orden en que se adquieran, es responsable de la transformación neoplásica (Laurent-Puig y cols., 2010).

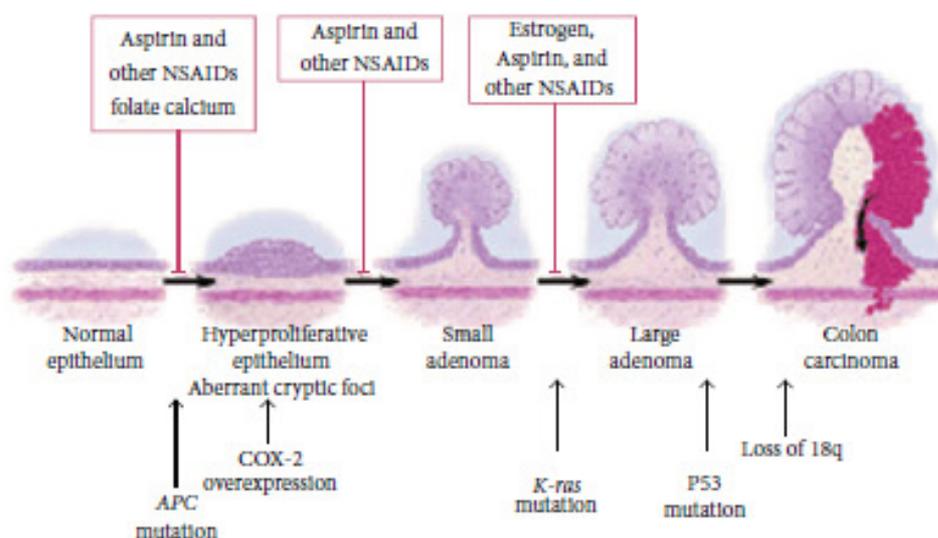


Figura 1: Esquema explicativo del desarrollo del cáncer colorrectal. Fuente (Fayez Sandouk y cols. 2013)

La localización de la mutación depende del tipo de carcinoma de colon. Así pues, en el caso de la poliposis adenomatosa familiar (PAF) se conoce la herencia dominante de la mutación de la línea germinal en el gen oncosupresor APC en el cromosoma 5 (Kinzler y cols., 1991).

En el caso del cáncer de colon hereditario sin poliposis (HNPCC), también llamado síndrome de Lynch, se han encontrado mutaciones germinativas en los genes MSH2 y MLH1, que comprenden más del 60% de los casos de HNCPP. Las mutaciones en los genes MSH6 y PMS2 son menos frecuentes (Manzano and Pérez-Segura, 2012; Farreras-Rozman, 2012; Diggs y cols., 2011; Peltomäki y Vasen, 2004). En la Tabla 1 se muestran los diferentes síndromes que predisponen al cáncer colorrectal y las mutaciones relacionadas con dichos síndromes.

Síndrome	Gen	Cromosoma	Mecanismo herencia	Neoplasia
Poliposis adenomatosa Familiar	APC	5q21	AD	Adenoma intestinal y cáncer colorrectal
Cáncer de colon sin poliposis	MSH2 MLH1 MSH6 PMS2	2p16 3p21.3 2p16 7p22	AD	Carcinoma de colon, endometrio, ovario, estómago, intestino delgado y uréter.
Poliposis juvenil	SMAD4	18q21	AD	Cánceres de vías gastrointestinales y páncreas.
Síndrome de Turcot	APC	5q	AD	Cáncer de colon y tumores cerebrales
Síndrome de Peutz-Jeghers	STK11	19p13	AD	Pólipos en intestino delgado y grueso y estómago. Rara la malignización. Tumores de ovario, mama, páncreas y endometrio.

Tabla 1: Síndromes de predisposición al cáncer colorrectal y genes vinculados. AD: Autosómico dominante.

1.1.2. Factores ambientales.

Los estudios epidemiológicos han demostrado que los factores ambientales, particularmente la dieta, juegan un papel importante en la susceptibilidad al cáncer de colon (Tuominen y cols., 2013). Se estima que la mayoría de los casos de cáncer de colon esporádico se pueden atribuir a la dieta (Ou y cols., 2013). El cáncer colorrectal esporádico tiene la misma etiología genética como FAP, pero las mutaciones en el gen APC son somáticamente adquiridas durante la vida de un individuo. Daños esporádicos en genes parecen jugar un papel importante en el desarrollo del 90% de los casos de cáncer de colon (Diggs y cols., 2011). El consumo de una dieta rica en carnes y baja en fibra aumenta la entrega de los residuos proteínicos, que promueven la fermentación proteolítica con la producción de compuestos amoniacales y ácidos grasos de cadena ramificada, con efecto inflamatorio, y pueden aumentar el riesgo de cáncer

de colon (Windey y cols., 2012; Waldecker y cols., 2008). Por otra parte, la ingestión de grasas animales hace aumentar la proporción de anaerobios en la flora intestinal lo que supone la transformación de los ácidos biliares normales en cancerígenos (Bernstein y cols., 2011). Es sabido que las personas obesas tienden a desarrollar resistencia a la insulina. Cuando ésta se eleva en sangre se origina una mayor concentración del factor de crecimiento tipo insulina I (IGF I), que, al parecer, estimula la proliferación de la mucosa intestinal (Othman y cols., 2013; Giovannucci, 2007). Está demostrado que el consumo de cantidades elevadas de alcohol y de tabaco suponen un aumento de la incidencia. (Nordenvall y cols., 2011).

Otros factores de riesgo son enfermedad inflamatoria intestinal, ureterosigmoidostomía y bacteriemia por *streptococcus bovis*.

Se han estudiado diversas sustancias que pudieran ser inhibidoras del cáncer de colon, tales como: fibras, vitamina A y D, ácido fólico, calcio, antioxidantes. Además, existen perspectivas prometedoras para algunas sustancias tales como fito-estrógenos (Lofano y cols., 2013).

1.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La clínica dependerá de la localización del tumor. Si afecta al colon proximal (ciego, colon ascendente y transversal), se puede producir un sangrado de manera intermitente que desencadene una anemia ferropénica microcítica e hipocrómica, que a su vez se manifieste como cansancio, disnea e incluso ágor. A nivel del colon transversal, el tumor puede estenotar la luz intestinal y produce dolor tipo cólico, alternancia de diarrea y estreñimiento y una obstrucción completa o una perforación. Si afecta al colon distal (colon descendente, sigma y

recto), los síntomas serían sangrado (rectorragia y hematoquecia), dolor a nivel rectal o tenemos, alteraciones del hábito intestinal, diarrea o mucosidad en las heces (Jiang y cols., 2013; Ristvedt y cols., 2013; Majumdar y cols., 1999). La localización más frecuente es a nivel rectal, le sigue en frecuencia colon sigmoide y ciego y el resto de casos se reparten en proporciones similares por el resto del colon (Hady y cols., 2013; Netter, 2003). El reconocimiento temprano de los síntomas es fundamental para poder realizar un diagnóstico precoz, aunque no siempre ocurre que sean reconocida adecuadamente la sintomatología, por este motivo se han llevado a cabo campañas para familiarizar a la población general y a subgrupos de pacientes, con la misma (Weller y cols., 2012; Richards, 2009)

1.3. DIAGNÓSTICO

La clínica dará la voz de alarma ante un posible proceso de cáncer colorrectal. Se realizará historia clínica y exploración completa (incluido tacto rectal). Es muy importante valorar los antecedentes personales y familiares, identificando el número de familiares afectos, el grado de parentesco y la edad en el momento del diagnóstico del cáncer colorrectal o cáncer relacionado (Esteva y cols., 2013).

1.3.1. Exploraciones complementarias y pruebas diagnósticas

Las primeras pruebas complementarias que hay que solicitar son hemograma, bioquímica, coagulación y colonoscopia. El estudio de sangre oculta en heces puede realizarse también desde las consultas de atención primaria. Sin embargo, tiene limitaciones ya que es negativo en aproximadamente un 50% de los pacientes con cáncer colorrectal demostrado, debido a que las hemorragias suelen ser intermitentes. En cualquier caso, si se tiene una prueba de sangre en

heces positiva el paciente debe someterse a un enema opaco, sigmoidoscopia o colonoscopia (de Wijkerslooth y cols., 2011; Barrett y McKenna, 2011; Walsh y Terdiman, 2003). La colonoscopia, es la prueba de elección ya que permite un examen completo del colon pudiendo identificar tumoraciones y descartar la presencia de lesiones sincrónicas, además de la posibilidad de obtener biopsias y la exéresis de algunas lesiones (Tiwari y cols., 2012; de Wijkerslooth y cols., 2011; Barrett y McKenna, 2011). Esta prueba posee una sensibilidad del 95% con ínfimos falsos positivos. Sus mayores inconvenientes son la incomodidad que genera en el paciente y la posibilidad de perforación de colon que ocurren el 0.1-0.3% (Regula y cols., 2006; Nelson y cols., 2002). Cuando el paciente no tolera o rechaza la colonoscopia, debe realizarse un estudio baritado del intestino, más sensible si se hace con doble contraste.

Una vez diagnosticado se debe realizar un estudio de extensión mediante la realización de TAC con contratase de tórax, abdomen y pelvis, salvo contraindicaciones. A partir de la información aportada por el TAC se decidirá si son necesarias otras pruebas para el estadiaje. Debe plantearse la realización de Resonancia Magnética a los pacientes con cáncer de recto, salvo contraindicaciones, para evaluar el riesgo de recurrencia local (de Wijkerslooth y cols., 2011). Si estuviera contraindicada, debe plantearse ecografía endorrectal. Debe solicitarse niveles del antígeno carcinoembrionario (CEA) (PAI, 2011).

1.3.2. Marcadores tumorales

Los marcadores tumorales son sustancias biológicas o bioquímicas que surgen como respuesta del organismo ante cierto tipo de tumores. Tienen varias aplicaciones en el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal ya que juegan un importante papel en la detección y el diagnóstico, la estadificación, determinación del pronóstico después de la terapia, la monitorización del

seguimiento y diagnóstico precoz de las recidivas (Bacolod and Barany, 2011; Pokorny y cols., 2000). Actualmente existen varios marcadores tumorales para el cáncer colorrectal, los más importantes son:

1.3.2.1. Antígeno carcinoembrionario

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es una proteína oncofetal que se encuentra elevada con frecuencia en el cáncer colorrectal, pero también en otros tumores como el cáncer de mama, páncreas, pulmón (Arrieta Rodríguez y cols., 2013; Bolocan y cols., 2012; Ilantzis y cols., 2002) También se eleva en enfermedades no cancerosas como son la hepatitis, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, pancreatitis, enfermedad inflamatoria intestinal o la artritis reumatoide. El consumo de tabaco también puede elevar sus niveles (Bolocan y cols., 2012). El rango de normalidad de sus niveles en sangre, depende del laboratorio, pero un nivel mayor de 5.5ng/ml, incluso en fumadores, es mayor de lo normal. El grado de elevación puede correlacionarse con el estadio del tumor, valores superiores a 20ng/ml pueden ser indicativos de enfermedad avanzada (Sturgeon y cols., 2008).

1.3.2.2. El antígeno carbohidrato 19-9

El antígeno carbohidrato 19-9 (CA 19.9) se emplea de forma complementaria al CEA. Es una mucina, que inicialmente se detectó en cáncer colorrectal pero también se ha identificado en el cáncer de páncreas, gástrico y de vías biliares. Al igual que el CEA también se eleva en enfermedades no cancerosas como enfermedades de la glándula tiroides, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal y en las pancreatitis. Los niveles normales en sangre están por debajo de 37u/ml (Bolocan y cols., 2012). En las etapas más

iniciales de la enfermedad su nivel suele ser normal, por lo que si aparece un nivel elevado en un paciente con diagnóstico reciente, implica que puede tener la enfermedad en estado avanzado (Bolocan y cols., 2012).

1.3.3. Factores de pronóstico auxiliares

Según Farreras-Rozman (2012) la supervivencia tras una resección quirúrgica radical es del 40% a los 5 años, siendo el estadio tumoral el principal factor que condiciona el pronóstico. Los parámetros que auguran mal pronóstico tras la resección quirúrgica son la diseminación del tumor a los ganglios linfáticos regionales, el número de ganglios regionales afectados, el tumor que atraviesa la pared intestinal, escasa diferenciación histológica, perforación, adherencia del tumor a órganos vecinos, invasión venosa, elevación preoperatoria de CEA, aneuploidía y supresión cromosómica específica (pérdida alélica en el cromosoma 18q) (Longo, 2012).

1.4. CRIBADO

El Consejo de la Unión Europea indicó, en 2003, una recomendación sobre la necesidad de instaurar programas de cribado en patologías como el cáncer de mama, cuello uterino y cáncer colorrectal, animando a los países miembros de la Unión Europea a ponerlos en marcha (Quirke y cols., 2011). Siguiendo el Proceso Asistencial Integrado de cáncer colorrectal andaluz, en su segunda edición de 2011, las recomendaciones de cribado basado en colonoscopia serían:

- Para: individuos con 2 o más familiares de primer grado (padres, hermanos e hijos) con una neoplasia colorrectal son tributarios de cribado cada 5 años a partir

de los 40 años de edad (o 10 años antes de la edad de diagnóstico del familiar afecto más joven, lo primero que ocurra).

- Para individuos con un familiar de primer grado afecto de neoplasia colorrectal, el cribado debe realizarse a partir de los 40 años. Si la edad de diagnóstico del familiar fue antes de los 60 años de edad debe realizarse cada 5 años y si fue igual o superior a 60 años el cribado se realizará cada 10 años.

- Para individuos con 2 o más familiares de segundo grado (abuelos, tíos y sobrinos), afectos, el cribado se iniciará a los 40 años, repitiéndolo cada 10 años. Si sólo existe un familiar en segundo grado afecto se seguirán las recomendaciones existentes en la comunidad para la población de su edad.

- En los individuos con síndrome de Lynch debe realizarse una colonoscopia cada 1-2 años a partir de los 20-25 años de edad, o 10 años antes de la edad de diagnóstico del familiar afecto más joven (lo primero que ocurra).

Además, estos individuos tienen un mayor riesgo de neoplasias extracolónicas por lo que el cribado de las mismas debe individualizarse en función de la predisposición familiar para una determinada neoplasia.

- Si los familiares son en tercer grado (bisabuelos y primos) se seguirán las recomendaciones existentes en la comunidad para la población de su edad.

- En el cribado de pacientes asintomáticos no hay consenso. La American Cancer Society propone realizar estudios anuales de detección de sangre oculta en heces y sigmoidoscopia flexible cada cinco años a partir de los 50 años o colonoscopia cada 10 años (Longo, 2012).

1.5. ESTADIAJE

La clasificación de Dukes (Cerullo y cols., 2012; Sales y Parc, 1994; Jass y Morson, 1987) y el sistema tumor/ganglios linfáticos/metástasis o TNM (Hu y cols., 2011) son los sistemas de estadificación más usados.

1.5.1. Clasificación de Dukes

La clasificación pronóstica de Dukes, a pesar de tener limitaciones como no tener en cuenta el número de ganglios linfáticos afectados ni los factores clínicos, sigue siendo el sistema que mejor predice la supervivencia de los pacientes (Cerullo y cols., 2012; Jass y Morson, 1987;).

– Dukes A: El tumor queda limitado a la pared sin invadirlo ni afectar a los ganglios linfáticos. El cáncer está limitado a la capa muscular, mucosa y submucosa

– Dukes B: El tumor invade la pared pero siguen sin afectarse los ganglios linfáticos. B1: El cáncer se extiende hacia dentro de la capa muscular pero no la atraviesa.

B2: El cáncer atraviesa la capa muscular pero no afecta a ganglios linfáticos.

– Dukes C: Afectación de los ganglios linfáticos.

C1: El cáncer se extiende hacia dentro de la capa muscular pero no la atraviesa, e invade ganglios linfáticos.

C2: El cáncer atraviesa la capa muscular e invade ganglios linfáticos.

– Dukes D: Presencia de metástasis en órganos: hígado, pulmón o huesos.

1.5.2. Sistema tumor/ganglios linfáticos/metástasis o TNM

El sistema TMN se basa en la extensión anatómica de cáncer. Es relativamente complejo y parece ser el más objetivo aunque no tiene en cuenta los factores pronósticos asociados al cáncer (Hu y cols., 2011).

T: Hace referencia a la extensión del tumor primario.

N: Indica la afectación de los ganglios linfáticos.

M: Presencia o ausencia de metástasis a distancia en el momento del diagnóstico.

1.6 TRATAMIENTO

La no existencia de un tratamiento único en el cáncer colorrectal demuestra la necesidad de encontrar nuevas vías de tratamiento. Actualmente los tratamientos aceptados son los que se describen a continuación.

1.6.1. Cirugía

El tratamiento quirúrgico sigue siendo la primera opción terapéutica. La extensión de la colectomía, dependerá de la localización del tumor y de la resección vasculolinfática necesaria para una actuación curativa. Por lo general se precisa dejar un margen de seguridad de al menos 5 centímetros en el cáncer de colon (Deo y cols., 2012; Roig y cols., 2003) En neoplasia de colon derecho, se realiza una hemicolectomía derecha y anastomosis ileocólica manual o mecánica. En el caso de neoplasia de colon transverso se efectúa una hemicolectomía derecha ampliada. En la neoplasia de colon izquierdo se realiza una hemicolectomía izquierda y anastomosis manual o mecánica. En neoplasia de colon sigmoideo se efectúa una sigmoidectomía de los vasos sigmoideos o mesentéricos inferiores respetando cólica izquierda. Y por último, en neoplasia de unión rectosigmoidea se realiza una resección anterior baja. En el caso del cáncer

de recto no complicado el margen de seguridad, en algunos casos, puede reducirse a 1 cm.

La Cirugía laparoscópica ha sido avalada por múltiples estudios como una alternativa segura y efectiva a la cirugía convencional abierta. Esta vía se asocia a una disminución de los requerimientos analgésicos en el postoperatorio inmediato y de la duración de la estancia hospitalaria. (Boutros y cols., 2013; Grailey y cols., 2013; Zanghì y cols., 2013; Jayne y cols., 2010; Prakash y cols., 2010; Martinel y cols., 2009)

1.6.2. Quimioterapia.

En un principio, el 5 fluorouracilo (5-FU) era la única quimioterapia citotóxica útil en el entorno adyuvante para los pacientes en estadio III. Ya en los noventa, se evidenció el beneficio de utilizar 5-FU en combinación con leucovorín, posteriormente se introducen las terapias combinadas añadiendo Oxaliplatino, Irinotecán o Capecitabina (André y cols., 2004; Van Cutsem y cols., 2001; Douillard y cols., 2000; de Gramont y cols., 2000). Se ha visto que la poli-quimioterapia produce mayor beneficio que la monoterapia en cáncer colorrectal y se realizan estudios para determinar las combinaciones que den mejores respuestas. El tratamiento adyuvante con quimioterapia estaría indicado para casos diferentes al estadio I, es decir a partir del estadio II (Cersosimo RJ, 2013; Oki et y cols., 2013).

1.6.2.1. 5 Fluorouracilo

El 5-FU (Figura 2) sigue siendo la base de la quimioterapia. Está indicado en el tratamiento paliativo de algunos tipos de cáncer, como el de colon, esófago, estómago, recto, mama, tracto biliar, estómago, cabeza y cuello, de cuello uterino,

de páncreas, de células renales, y carcinoide (Longley y cols., 2003). Es un antimetabolito de pirimidina, que bloquea la síntesis del ADN mediante la inhibición de la timidilato sintetasa (TS), siendo específico de la fase S del ciclo celular (Gomez-Monterrey y cols., 2013). El fármaco actúa como un antimetabolito, su actividad directa se basa en su analogía con el ácido nucleico uracilo, y por lo tanto afecta al rápido crecimiento de las células neoplásicas que aprovechan preferentemente la molécula del uracilo para la biosíntesis del ácido nucleico. Su eficacia radica además en que se une de forma irreversible (bloqueando) a la enzima timidilato sintetasa, esencial para la síntesis de nucleótidos de timina. La timina es una de las cuatro bases nitrogenadas que forman parte del ADN, y su carencia implica que el ADN no se pueda replicar, lo que inhibe la división celular, y por tanto, el crecimiento tumoral.

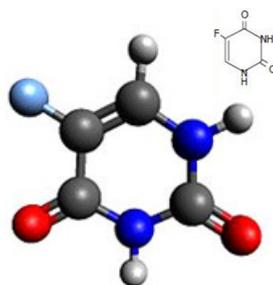


Figura 2: Molécula de 5FU

1.6.2.2. Leucovorín

El Leucovorín (folinato cálcico, Figura3) es un metabolito activo del ácido folínico y una coenzima esencial de la síntesis de ácido nucleico en la terapia citotóxica. Se utiliza como modulador bioquímico del 5-FU aumentando su citotoxicidad (Sempere y Jover, 2008; Grávalos y Pérez, 2003).

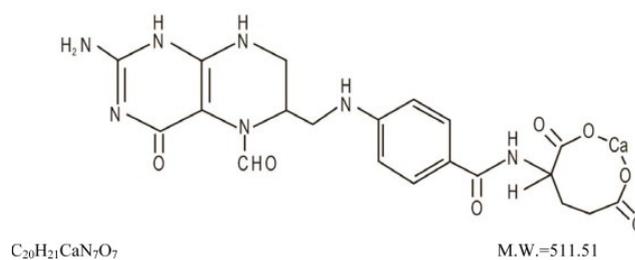


Figura 3: Molécula del Leucovorín

1.6.2.3. Irinotecán

El Irinotecán (Figura 4) es un derivado semisintético de la camptotecina. Es un agente antineoplásico que actúa como inhibidor específico de la ADN topoisomerasa I. El irinotecán es metabolizado en el hígado dando varios metabolitos. Uno de ellos es el SN-38. La inhibición de la ADN topoisomerasa I por el irinotecán o el SN-38 induce lesiones en las cadenas simples del ADN que bloquean la replicación del ADN y son responsables de la citotoxicidad (Hernández-Marqués y cols., 2012; Poujol y cols., 2013).

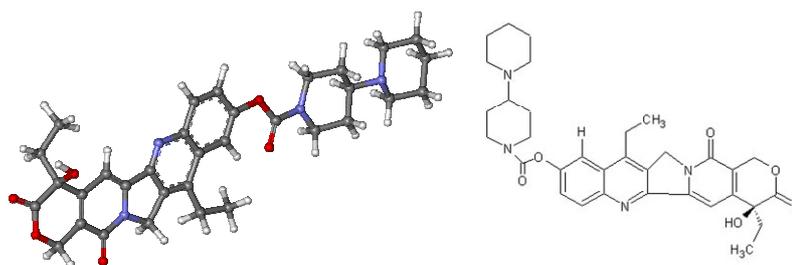


Figura 4: Molécula Irinotecán

1.6.2.4. Oxaliplatino

El Oxaliplatino (Figura 5), un agente a base de platino, ha demostrado una actividad antiproliferativa equivalente o superior a la de cisplatino en una amplia gama de modelos de tumores experimentales (Rathkopf y cols., 2009). El oxaliplatino es activo contra los tumores de colon con un índice terapéutico mejorado en comparación con cisplatino y carboplatino (análogos de platino). Esta especificidad del tumor por uno u otro fármaco podrían estar relacionados con diferencias existentes en la absorción (Boulikas y cols., 2007). El mecanismo de acción de este fármaco se basa en una biotransformación a un derivado hidratado que tiene capacidad de interactuar con el ADN formando puentes intra e intercatenarios que interrumpen la síntesis y la transcripción del ADN, produciéndose así su actividad citotóxica y antitumoral (Mas y cols., 2012). No es específico del ciclo celular, su mayor actividad es durante la fase de reposo celular. El oxaliplatino se diferencia de los otros análogos en 3 aspectos importantes: presenta una estructura química muy voluminosa y mayor citotoxicidad; es el único que tiene indicación en el tratamiento de cáncer colorrectal y tiene como efecto adverso dosis limitante una toxicidad en el sistema nervioso periférico, que puede manifestarse de forma aguda o crónica. La reacción adversa limitante es producida por la inactivación del canal de sodio tras la exposición al oxaliplatino (Boulikas y cols., 2007). La neurotoxicidad producida por oxaliplatino resulta de especial interés, ya que es un factor limitante en la terapia adyuvante del paciente (Mas y cols., 2012).

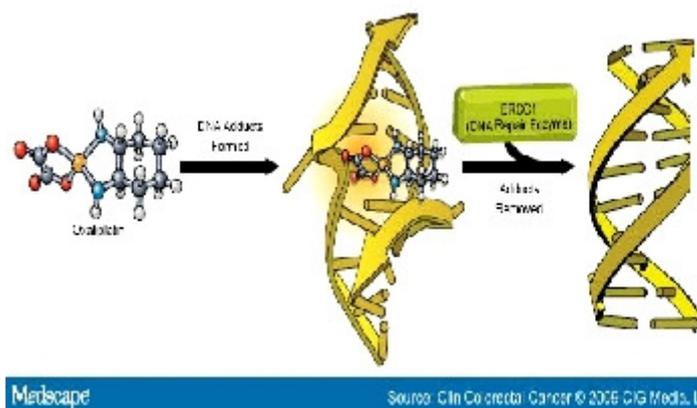


Figura 5: Esquema de la interacción del oxaliplatino con la cadena de DNA (Clin Colorectal Cancer © 2009 CIG Media, LP).

1.6.2.5. Capecitabina

La Capecitabina es el carbamato de fluoropirimida de administración vía oral. Se absorbe en el intestino con rapidez como molécula intacta. En la primera etapa, capecitabina se hidroliza en el hígado y se convierte en el producto intermedio 5'-desoxi-5-fluorocitidina (5'-DFCR). En la siguiente etapa, en el hígado y el tejido tumoral, se transforma en el segundo producto intermedio, que tampoco es citotóxica. La timidina-fosforilasa, que muestra una actividad significativamente mayor en el tejido tumoral que en el tejido normal, la convierte, finalmente en 5-FU en el tejido tumoral, lo que reduce al mínimo la exposición general al 5-FU (Calzas y cols., 2003).

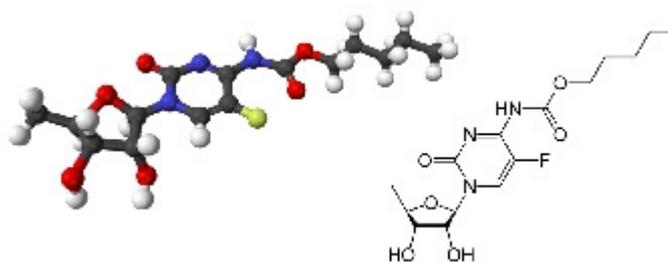


Figura 6: Molécula Capecitabina

1.6.2.6. Combinación de fármacos

El tratamiento quimioterapéutico del cáncer colorrectal ha sufrido una revolución en los últimos 5 a 10 años, con una variedad de nuevos fármacos y tratamientos, siendo posteriormente aprobados o bajo investigación. A nivel mundial, no existe un consenso sobre el tratamiento óptimo del cáncer colorrectal, sobre todo se ve en la enfermedad avanzada o metastásica (Boulikas y cols., 2007). Múltiples trabajos avalan el aumento de respuesta en los pacientes con tratamientos combinados de fármacos (Zdenkowski y cols., 2012; Ismaili, 2011; De Vita F, y cols., 2005). El 5-fluorouracilo se ha usado para tratar el cáncer colorrectal durante unos 50 años. En la década de los 80, los estudios mostraron que la adición de *leucovorina* (LV; también conocido como *ácido folínico*) mejoró la eficacia de 5-FU, sin aumentar su toxicidad, por lo tanto 5-FU/LV se convirtió en el tratamiento estándar para el cáncer colorrectal (DeLap, 1988). Sin embargo, actualmente es más probable que en la quimioterapia para el cáncer colorrectal se utilice 5-FU/LV en combinación con *irinotecán* o *oxaliplatino* (es decir FOLFIRI o FOLFOX) (Ismaili, 2011) o capecitabina en combinación con oxaliplatino (Hisatsune y cols., 2013). El régimen FOLIRI consta de leucovorin 400 mg/m^2 + irinotecán 180 mg/m^2 , seguido de 5-fluorouracilo 400 mg/m^2 en bolo y después 2400 mg/m^2 durante 46h en infusión, cada dos semanas (Schultheis y cols., 2013; Tsuji y cols., 2012). El régimen FOLFOX comprende,

oxaliplatino 85-100mg/m²+ leucovorín 400 mg/m²+ un bolo iv de 5-FU 400 mg/m² como dosis de ataque, luego, 5-FU 2400 mg/m² en infusión durante 48 horas cada dos semanas (Schultheis y cols., 2013; Rathkopf y cols., 2009). El régimen XELOX supone capecitabina oral 850-1000 mg/m² cada 12 horas + oxaliplatino 130 mg/m² durante 14 días (Morey y cols., 2011; Hisatsune y cols., 2013; Yoshida y cols., 2013).

Autor	Fármacos	PFS (meses)
de Gramont A, et al. 2000	5FU-LV	6.3
	FOLFOX	9
Douillard JY, et al. 2000	5FU-LV	4.3
	5FU-LV+IRI	7
Tournigand Cet al. 2004	FOLFOX	8
	FOLFIRI	8.5
Hurwitz H, et al. 2004	IFL	6.2
	IFL + bevacz	10.6

Tabla 2: Ensayos controlados aleatorios. Comparativa de tratamientos farmacológicos combinados. PFS= supervivencia libre de progresión (Zdenkowski N, et al.2012)

1.6.3. Radioterapia

En el caso del cáncer de recto tanto la quimioterapia como la radioterapia tienen un papel importante. El uso de radioterapia preoperatoria ha demostrado una disminución de la recurrencia local y un aumento de la supervivencia. (Van Gijn y cols., 2011)

1.6.4. Anticuerpos monoclonales.

El Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal que puede neutralizar factores de crecimiento del endotelial vascular (VEGF, en concreto el VEGF-A)

(Takahashi 2011). Asociado a quimioterapia, ha sido aprobado para su utilización en primera y segunda línea de tratamiento en el cáncer colorrectal metastásico (Wu y cols., 2013; Arnold y Stein 2013) Existen dos anticuerpos monoclonales dirigidos hacia el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), aprobados por la “Food and Drug Administration” (FDA): Cetuximab y Panitumumab. Están indicados para los pacientes sin mutación KRAS (Hubbard y cols., 2013; Martins y cols., 2013; Fornaro y cols., 2013; Poulin-Costello y cols., 2013).

1.6.5. Otras estrategias terapéuticas

Otros tratamientos se encuentran en evaluación en ensayos clínicos, tales como, inmunoterapia, vacunas frente al cáncer, terapia celulares, terapia dirigida (con el fin de aumentar la concentración de agentes antitumorales en el tejido maligno y reducirla en el tejido proximal), terapia nutricional suplementaria (Mishra y cols., 2013)

La terapia génica es útil para los cánceres que se asocian con alteraciones genéticas. Actualmente, son cada vez más las relaciones encontradas entre cáncer y modificaciones génicas. No hay duda de que la terapia de quimio-gen, es decir, la combinación de una transferencia génica y el tratamiento con quimioterapia, jugarán un importante papel en cánceres avanzados (Durai y cols., 2008). Los estudios realizados son múltiples en gran diversidad de tumores. Diversos estudios preclínicos, tanto in vitro como in vivo, se han llevado a cabo para el análisis del uso de la terapia génica en cáncer colorrectal utilizando diversos tipos de vectores, adenovirus (Hou y cols., 2007), retrovirales (Hiraoka y cols., 2007) o vectores no virales, como la inyección directa (Walther y cols., 2005). Se han desarrollado, igualmente, ensayos en fase I con nanopartículas que portan genes supresores de tumor, en diversos tipos de tumores incluido el carcinoma

colorrectal (Shanker y cols., 2011; Guan y cols., 2011). Estos ensayos han tenido un buen perfil de seguridad pero, en algunos casos, los niveles de genes transfectados son insuficientes, lo que genera la necesidad de desarrollar nuevas dianas terapéuticas, nuevos tratamientos y nuevos vectores, que sean, más altamente selectivos y con mayor potencial terapéutico (Touchefeu y cols., 2010).

Es de gran importancia buscar nuevas estrategias terapéuticas debido a que el cáncer colorrectal avanzado o recurrente, a pesar de haber conseguido aumentar la supervivencia de los pacientes, sigue siendo incurable con tratamientos convencionales (Berrio y cols., 2007). Se espera que la terapia génica abra la puerta al tratamiento de muchas enfermedades en el futuro (Kastelein, 2013).

2. TERAPIA GÉNICA

2.1. DEFINICIÓN

La terapia génica consiste en la introducción de material genético en el interior de un órgano o tejido con la intención de producir un efecto biológico que permita prevenir o tratar una enfermedad (Mazzolini y cols., 2005). Otra definición similar sería la introducción de ácidos nucleicos en las células con el propósito de alterar el curso de una condición médica o enfermedad (Mark y cols., 1997). Son varias las definiciones que se pueden encontrar en la literatura pero todas versan sobre estos mismos conceptos (Cavazzana-Calvo y cols., 2013; Vermami y cols., 2005). En la historia de la medicina fue clave el conocimiento de la asepsia, los antibióticos y las vacunas, para disminuir el número de casos de diversas enfermedades así como para conseguir un descenso de la mortalidad por las mismas. El avance en los conocimientos de las alteraciones genéticas como

causa de gran número de enfermedades y el desarrollo de técnicas que permiten detectar dichas alteraciones hacen pensar, como ya auguraba Anderson , que la terapia génica pueda constituir otro pilar fundamental en la medicina actual (Anderson, 1981. Anderson, 1998).

La terapia antitumoral convencional presenta dificultades, limitaciones, que justifican la necesidad de buscar nuevas posibilidades de tratamientos. Actualmente se plantea la posibilidad de utilizar de forma conjunta la acción de fármacos antitumorales y terapia génica. Esta idea intenta potenciar los efectos de dichos fármacos y plantea la posible sinergia al combinarlos con la terapia génica (Doloff y cols., 2010; Oh y cols., 2010; Kojima y cols., 2010).

2.2. ESTRATEGIAS DE TERAPIA GÉNICA

Para desarrollar la terapia génica son imprescindibles: un gen de interés, el “gen terapéutico”, una célula diana y un vector para transportarlo e introducirlo en la célula diana. En función de la estrategia básica para la introducción del gen terapéutico, la terapia génica se divide en: ex vivo e in vivo.

- Terapia génica ex vivo: En este caso, se extraen y se aíslan células de un órgano o tejido del paciente y se mantienen en condiciones de cultivo in vitro. Las células, que previamente han sido transfectadas por el gen de interés, se seleccionan y se expanden en cultivo para después ser introducidas de nuevo en el paciente. Mediante esta estrategia sólo las células afectadas se exponen a la transferencia del gen, consiguiendo una mayor eficiencia de transfección al poder exponer las células a una elevada concentración del vector (Mazzolini y cols., 2005; Boulaiz y cols., 2005; Torrades, 2001).

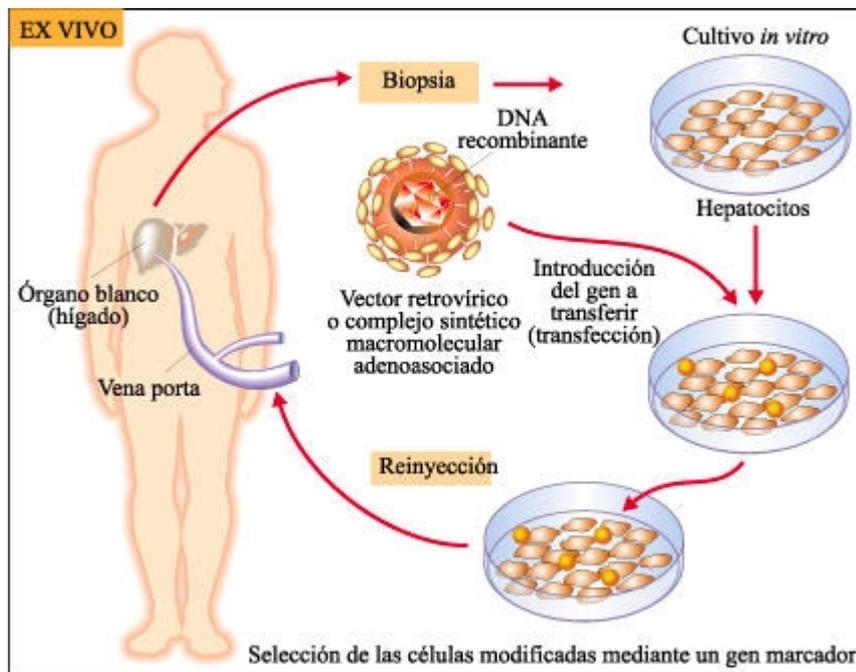


Figura 7: Esquema terapia génica ex vivo.

Fuente: <http://intro2res.blogspot.com.es/2012/10/actualidad-y-futuro-de-la-terapia-genica.html>

-Terapia génica in vivo: En este caso, la construcción génica de interés se transfiere directamente al paciente mediante diferentes vías, bien intravenosa o por inyección directa en el tejido afectado. Generalmente se recurre a la utilización de algún vector, preferiblemente vectores dirigidos para permitir la entrega selectiva del gen en un determinado órgano o tejido, evitando que las células sanas sean también trasfectadas con el gen terapéutico (Boulaiz y cols., 2005; Torrades, 2001; Bank, 1996).

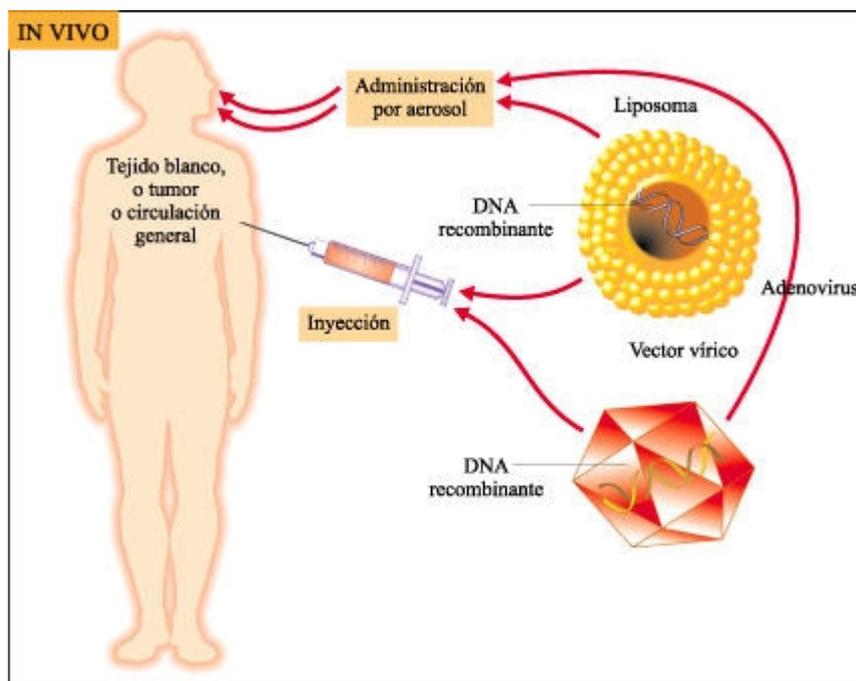


Figura 8: Esquema terapia génica in vivo.

Fuente: <http://intro2res.blogspot.com.es/2012/10/actualidad-y-futuro-de-la-terapia-genica.html>

En función de las células diana a las que se aplique la terapia génica podemos distinguir entre:

- Terapia génica germinal. Es aquella que modifica la dotación genética de las células implicadas en la formación de óvulos y espermatozoides o de las células precursoras de la línea germinal o de las células embrionarias en las primeras etapas del desarrollo. Es transmisible a la descendencia. Con este tipo de terapia génica se podrían corregir, de forma definitiva, las enfermedades congénitas. Aunque la transferencia génica a células germinales sería posible, su aplicación clínica queda absolutamente limitada ante la presencia de dificultades técnicas para garantizar la máxima seguridad y por barreras éticas (Boulaiz y cols., 2005; Sangro y cols., 2000).

-Terapia génica somática. Aquella por la cual se modifica la dotación genética de cualquiera de las células del organismo. La modificación genética no puede, por tanto, transmitirse a la descendencia y los efectos del cambio genético se circunscriben al individuo tratado (Boulaiz y cols., 2005).

La terapia génica puede tener diferentes objetivos como por ejemplo: 1) introducir genes endógenos o exógenos que aporten nuevas funciones con un efecto beneficioso para la célula diana, 2) restaurar una función biológica defectuosa 3) silenciar o inhibir determinados genes que dan lugar a proteínas con efectos nocivos para el organismo, 4) modificar la actividad de factores de transcripción mediante el bloqueo o la competición por sus dominios de unión a ácidos nucleicos, 5) introducir genes o moléculas que permitan el seguimiento de las células modificadas en el interior del organismo o 6) expresar proteínas antigénicas siendo utilizadas como procedimientos de vacunación génica (Mazzolini y cols., 2005; Alemany Bonastre y cols., 2005).

En términos generales, el éxito de la aplicación de la terapia génica depende de varios factores como la naturaleza de la enfermedad a tratar (enfermedad monogénica o multifactorial, herencia recesiva o dominante), el tipo de tejido (tejidos que se puedan extraer y cultivar *in vitro* frente a tejidos con mayor dificultad para ello), el método empleado para transferir los genes, el nivel de control de la expresión génica necesaria y las posibles reacciones inmunitarias contra el producto génico introducido (Boulaiz y cols., 2005). Así, las enfermedades monogénicas y de herencia recesiva serían mejores candidatas para la aplicación de terapia génica que las multifactoriales o de herencia dominante. Los genes con secuencias de pequeño tamaño encuentran vectores más adecuados para ser transportados que los de mayor tamaño. Y los tejidos como médula ósea, piel o hígado pueden cultivarse mejor *in vitro* que otros tipos de tejidos (Sen y cols., 2013; Prieto y González-Aseguinolaza, 2010, Mavilio y cols., 2006. Del Río

y cols., 2004). Un interesante estudio muestra la utilización de un plásmido portador del factor de crecimiento epidérmico humano en el tratamiento de úlceras por diabetes en ratones (Kim y Yoo, 2013).

2.3 MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN GÉNICA

Llamamos vectores a los sistemas que se utilizan como ayuda en el proceso de transferencia de un gen exógeno al interior de la célula. Facilitan la entrada y la biodisponibilidad del material genético de interés en el interior de las células para que pueda funcionar correctamente. Se clasifican en vectores virales y vectores no virales. Al ADN exógeno que queremos introducir en la célula diana, se le puede llamar “transgen”, y a la entrega de este “transgen” a la célula diana se le llama transducción o transfección (Vannucci y cols., 2013; Rozalén y cols., 2003).

2.3.1 Vectores virales

Los virus son complejos supramoleculares, contienen ADN o ARN envueltos por un cápside o envoltura proteica, con la capacidad para habitar tanto fuera de la célula, donde se multiplican, como dentro de ella parasitándola. El virus requiere de la maquinaria de su célula huésped, enzimas y ribosomas, para replicarse (Boulaiz y cols., 2005; Leningher y cols., 1995).

Para poder utilizar los virus como vectores, es necesario sustituir los genes virales necesarios para su replicación por el “gen terapéutico”. Así, el virus mantiene la capacidad de infectar las células pero no la de replicarse en ellas perdiendo su poder patógeno. Para poder obtener suficientes copias de este vector, han de ser producidos en líneas celulares empaquetadoras que aportan las

proteínas necesarias para su replicación (Figura 9) (Hakett y cols., 2007; .Boulaiz y cols., 2005).

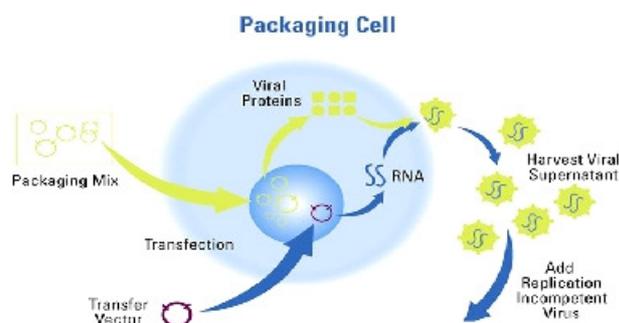


Figura 9: Ejemplo de células empaquetadoras con un vector lentiviral.

Fuente: (<http://www.thermoscientificbio.com/viral-packaging/trans-lentiviral-shrna-packaging-kits/>)

Para poder utilizar los virus como vectores, es necesario sustituir los genes virales necesarios para su replicación por el “gen terapéutico”. Así, el virus mantiene la capacidad de infectar las células pero no la de replicarse en ellas perdiendo su poder patógeno. Para poder obtener suficientes copias de este vector, han de ser producidos en líneas celulares empaquetadoras que aportan las proteínas necesarias para su replicación (Figura 9) (Hakett y cols., 2007; .Boulaiz y cols., 2005).

Los vectores virales presentan ventajas como la facilidad y la eficiencia para introducir el material genético en las células, el que se puedan integrar en gran número de sitios del genoma, y la experiencia y conocimiento que hay de ellos, ya que desde el primer ensayo en 1990, son muchos los estudios que se han realizado utilizando estos tipos de vectores (Hackett y cols., 2007; Boulaiz y cols., 2005). Aunque también presentan inconvenientes, como el riesgo de producir enfermedad, bien porque se produzca una transferencia errónea del virus nativo patógeno, o bien porque pueda activarse un oncogén debido a la posibilidad de

recombinación génica al insertarse un gen foráneo en el genoma del huésped. En este sentido cabe recordar los tres casos de leucemia que se desarrollaron durante un ensayo para tratar el síndrome de inmunodeficiencia severa combinada (X-SCID), uno de los cuales murió (Hacein-Bey-Albina y cols., 2008). Otro inconveniente se presenta cuando se precisa de inyección del vector directamente en el tumor, ya que muchos tumores son inaccesibles o están en situaciones de hipoxia que reduce la capacidad de los vectores virales para desarrollar su función (Wei y cols., 2008; Hakett y cols., 2007). Otro punto negativo en la utilización de este tipo de vectores es la respuesta del sistema inmunitario contra el vector o la proteína codificada por el gen terapéutico, en este sentido, recientemente se ha estudiado cómo las cápsides de los vectores adenovirales pueden inducir una respuesta de los linfocitos T citotóxicos que tiene como consecuencia la eliminación de las células transducidas, esta limitación ha llevado a los investigadores a la búsqueda de modificaciones en este tipo de vectores para mejorar su eficacia (Morse y cols., 2013; Li y cols., 2013; Nathawani y cols., 2011; Gabitzsch y cols., 2011; Seregin y Amalfitano, 2009).

2.3.1.1. *Retrovirus.*

Los retrovirus son virus constituidos por un genoma de aproximadamente 10.000 nucleótidos de longitud de ARN. Una vez infectada la célula, el ARN se convierte en una copia de ADN debido al ciclo vital del virus (formación de parvovirus), pudiendo así insertarse en el genoma de la célula huésped (Figura 10). Los retrovirus tienen dos regiones, una secuencia control, en los extremos del genoma retroviral, necesarias para las primeras fases del ciclo, y tres genes estructurales en la parte central: *gag*, que codifica una poliproteína que se corta dando tres o cuatro proteínas que constituyen el núcleo interior de la estructura de la partícula vírica, *pol*, que codifica la transcriptasa inversa, y el gen *env*, que

codifica una poliproteína para formar la cubierta vírica (Yi y cols., 2011; Boulaiz y cols., 2005). Los vectores retrovirales utilizados en terapia génica han perdido su capacidad de replicación al eliminar del virus las secuencias gag, pol y env que serán transfectadas a las células empaquetadoras. Además, en su lugar será insertado el gen terapéutico (Yi y cols., 2011; Maetzig y cols., 2011).

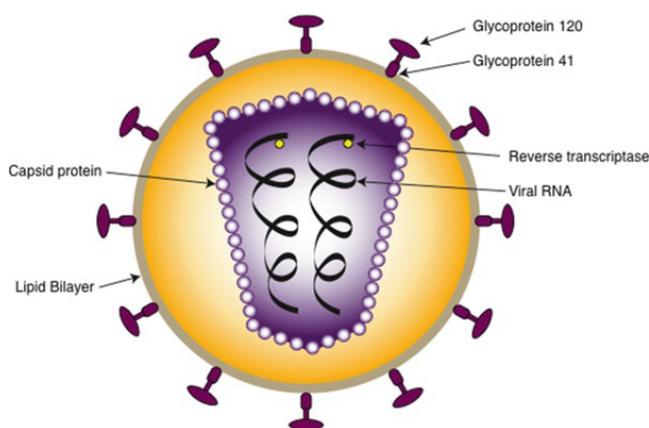


Figura 10: Estructura de un retrovirus. (Warnorck y cols., 2011)

El uso de vectores retrovirales consigue la integración del material genético de interés, de forma permanente, en la célula huésped (Figura 11 y Tabla 3). Este hecho supone una ventaja, ya que implica la posibilidad de una estabilidad y una expresión a largo plazo al poder pasar a las células hijas, pero también un motivo de preocupación ya que puede darse el caso de que la inserción no se produzca en el lugar correcto, desencadenando por ejemplo la activación de proto-oncogenes. Esto ha ocurrido en el tratamiento de las inmunodeficiencias primarias (Ginn y cols., 2010). Los esfuerzos se centran en conocer las zonas de inserción para poder mejorar los diseños de este tipo de vectores evitando sus efectos indeseables (Knigh y cols., 2013; Rengstl y cols., 2013; Biasco y cols., 2012; Wu y Dunbar, 2011; Howe SJ y cols., 2008). Otra desventaja de este tipo de

vectores es el no poder infectar las células que no se pueden dividir. Aunque hay virus, como el VIH, que sí lo pueden hacer (Yamashita y cols., 2004).

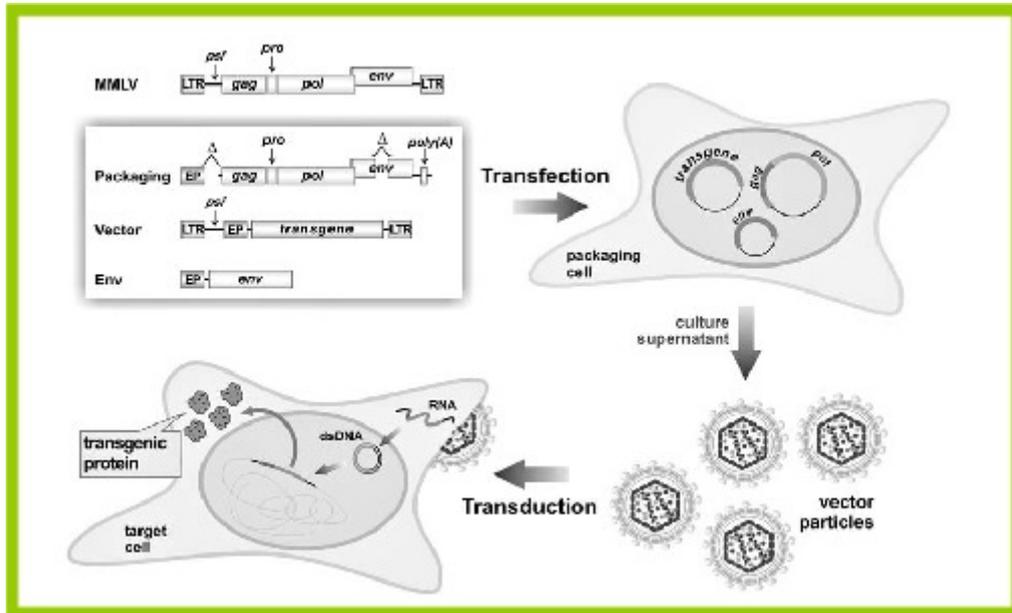


Figura 11: Ejemplo de Producción y transducción con un vector retroviral, modelo del virus de la leucemia murine Moloney (MMLV). Se eliminan gag, pol y parcialmente env. El transgén se sitúa bajo el control de un promotor eucariota separado (PE). Los vectores retrovirales se producen en las células empaquetadoras que les proporcionan todas las proteínas virales esenciales en trans. En el sobrenadante se recogen y con este sobrenadante se pueden transducir las células diana. La partícula del vector entra en la célula diana y el ARN se convierte en una doble cada de ADN gracias a la acción de la transcriptasa

Ventajas vectores retrovirales	Desventajas vectores retrovirales
Integración en el genoma de la célula huésped	Infecta solo células en división
Puede empaquetar hasta 8Kbp de ADN	Alto riesgo de mutación insercional
Fácil obtención mediante ingeniería genética	Baja estabilidad.
Pobre respuesta inmune	Integración aleatoria del genoma viral
Se pueden producir a altos títulos	

Tabla 3: Resumen beneficios e inconvenientes de la utilización de vectores retrovirales (Vannucci y cols., 2013; Rozalén y cols., 2007)

2.3.1.2. Adenovirus

Los adenovirus son una familia de virus con forma icosaédrica con 70-90 nm de diámetro y sin envoltura (Figura 12). El genoma viral lo constituye un ADN lineal de cadena doble de unos 36–38 kb. Tiene nueve unidades de transcripción importantes divididas en: tempranas (E1A, E1B, E2-E4) y tardías (L1-L5). La transcripción es secuencial, en la que los genes E1 codifican las proteínas que se expresan en primer lugar, imprescindibles para la infección adenoviral y esenciales para la replicación, a su vez, activan la transcripción de otros genes tempranos. La proteína E1 juega un papel esencial en la replicación viral. Los genes E3 codifican las proteínas principalmente implicadas en la modulación de la respuesta del huésped a la infección viral. Los genes E2 codifican la ADN polimerasa viral y la proteína pre-terminal. La región E4 codifica funciones que regulan la transcripción entre las fases primaria y secundaria del ciclo de vida vírico (Kaufmann y Nettelbeck 2012; Kamimura K y cols., 2011).

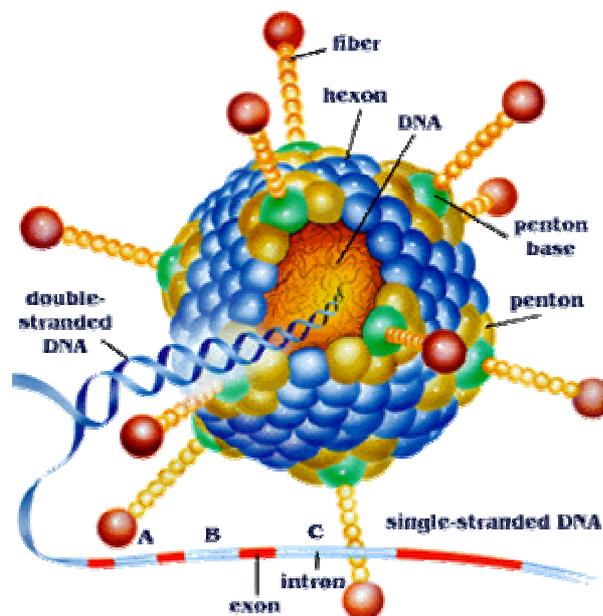


Figura 12: Estructura de una partícula adenoviral.

Fuente: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1993/illpres/genes-in-pieces.html

Están asociados a enfermedades de las vías respiratorias, amígdalas, intestino, enfermedades del tracto urinario y el hígado. Pueden dar lugar a infecciones asintomáticas, que pasen desapercibidas, pero pueden ser especialmente graves en individuos inmunodeprimidos (Arnberg, 2012). En la primera generación de vectores adenovirales (AdV vectores), la región E1A se eliminó, lo que suprime la competencia para la replicación. En este espacio se coloca el trans-gen. Para mejorar la seguridad de estos vectores, en la segunda generación, las regiones E2, E3, o E4 se eliminan o desactivan.

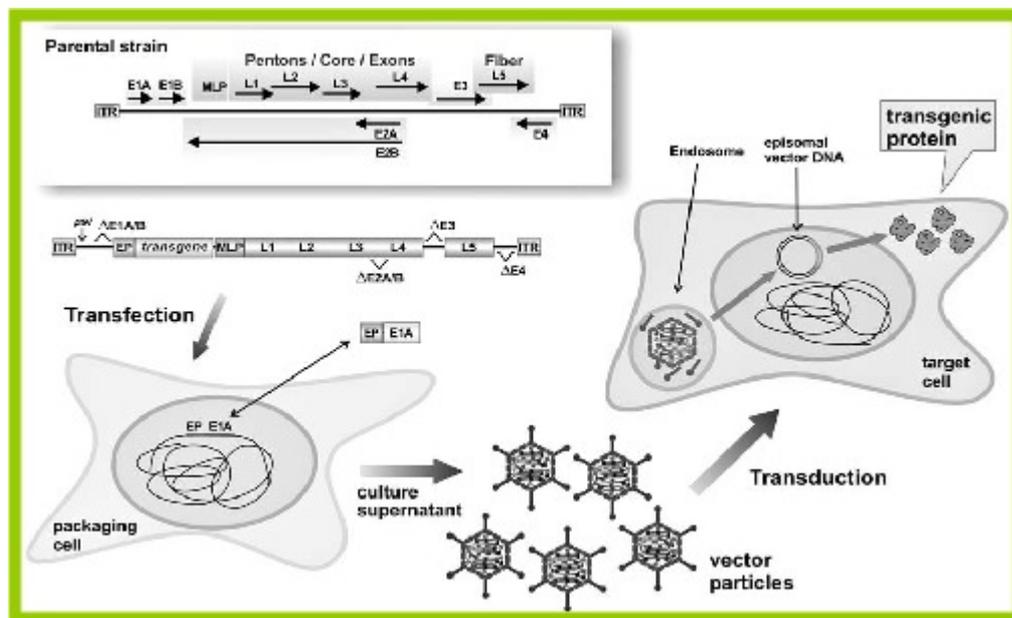


Figura 13: Ejemplo de vector adenoviral. Producción y transducción. La región E1A y otros genes reguladores se eliminan y son sustituidos por un promotor y el transgen (EP). Se mantienen la mayoría de los genes estructurales y sus MLP relativos (finales de los principales promotores). Las partículas virales son producidas en las células empaquetadoras que han sido transfectadas con el vector. Por otra parte E1A es proporcionado in trans o por co-transfección de un plásmido. Con las partículas virales del sobrenadante se pueden transducir las células diana. La expresión del transgen será transitoria. (Vannucci y cols., 2013)

La eficacia en la transferencia de genes de los vectores de segunda generación no fue diferente a los de la primera generación. Los autores auguran, que probablemente, las generaciones futuras de vectores llevarán aún más supresiones y, con ello, además de mejorar la seguridad, aumentará la capacidad de los vectores para transportar tamaños mayores de ácidos nucleicos (Limberis, 2012). Al perder los mecanismos de replicación los vectores son dependientes de la presencia de otras construcciones necesarias para su replicación. Son necesarias las células empaquetadoras (Figura 13). Podemos ver el proceso en la figura X (Vannucci y cols., 2013). Se han utilizado en estudios de próstata (Williams y cols., 2012; Sonpavde y cols., 2011; Barton y cols., 2011), pulmones (Stermán y cols., 2010; Guan y cols., 2009), hematología (Raus y cols., 2011), piel (Cun y cols., 2013; Tolcher y cols., 2006) sistema nervioso central (Muhammad y cols., 2012) y enfermedades cardiovasculares (Hinkel y cols., 2013) entre otras. Y se han estudiado para su utilización en vacunas (Arnberg, 2012).

Las ventajas y desventajas recogidas por los autores se muestran en la Tabla 4.

Ventajas vectores adenovirales	Desventajas vectores adenovirales
Se transducen tanto en células en reposo como en replicación	Alta inmunogenicidad
Son estables in vivo	Direccionabilidad difícil
Se pueden conseguir títulos altos	Difícil obtención
Pueden empaquetar hasta 30Kpb de ADN	No se integra en el genoma de la célula huésped
Se consiguen niveles altos de expresión del transgen	La expresión es transitoria

Tabla 4: Ventajas e inconvenientes del uso de adenovirus como vectores.

Fuente: Vannucci y cols., 2013; Adaptado de Limberis, 2012; Rozalén, 2003

2.3.1.3. Adeno-asociados.

Los virus adeno-asociados (AAV) forman parte de los parvovirus. Son pequeños virus, icosaédricos sin envoltura, con un genoma compuesto por una cadena sencilla de ADN de 4,7Kb. Requieren de un virus auxiliar (adenovirus, herpes simple, papilomavirus) para poder infectar y replicarse. En ausencia de un virus auxiliar, AAV se establece como una infección latente dentro de la célula, ya sea por integración específica en el genoma huésped (en el cromosoma 19) o por la persistencia en formas episomales (Bartel y cols., 2012. Dos Santos y Beyer, 2007). El genoma del AAV de tipo salvaje se compone de dos genes, el gen *rep*, que codifica cuatro proteínas de replicación, y el gen *rap*, que codifica tres proteínas de la cápside y una proteína activadora de montaje y está flanqueada a ambos lados por repeticiones terminales invertidas. En función de la cápside existen 8 serotipos (AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9). El virus puede estar latente en los organismos sin dar patología alguna (Grieger y Samulski, 2012). Precisamente el hecho de no ser patógeno per se, a pesar de las infecciones a largo plazo y su amplia gama de infectividad han hecho a este tipo de virus un candidato interesante para la transfección génica (Dos Santos y Beyer., 2007).

Para desarrollar los vectores con estos tipos de virus, se sustituyen los genes *rep* y *cap* por el promotor y el transgen (Figura 14).

Al igual que los adenovirus y los retrovirus requieren de las células empaquetadoras que habrán sido transfectadas por el plásmido que contiene el ADN del vector AAV y por otro que aporte los genes necesarios para la replicación (Vannuncci y cols., 2013; Boulaiz y cols., 2005).

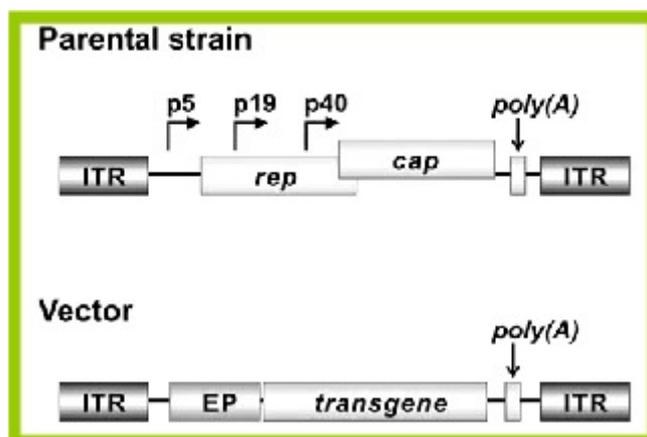


Figura 14: creación de un vector con un virus adeno-asociado. Rep y cap se sustituyen por el transgén y el promotor eucariota (EP) (Vannuncci y cols., 2013).

Las ventajas y las desventajas se expresan en la Tabla 5

Ventajas vectores adeno-asociados	Desventajas vectores adeno-asociad
Se transducen en células en reposo y en replicación	Poca longitud del transgen
Alto nivel de eficiencia	Dificiles de producir en gran cantidad
No son patógenos en humano	Necesita la coinfección de otros virus
Posible integración específica	Posible mutagénesis insercional
Poco inmunógenos	
Tropismo celular	

Tabla5: Ventajas e inconvenientes del uso de vectores adeno-asociados.Fuente: Adaptado de Flotte 2013; Dos Santos y Beyer, 2007

El hecho de que puedan permanecer tiempo como virus no patógenos en los organismo les confiere una característica importante ya que la inducción de respuesta inmune es baja, y podrían ser utilizados para investigar la modulación del sistema inmune, induciendo o evitando las respuestas específicas del antígeno,

dependiendo de las necesidades terapéuticas (Logan y Alexander, 2012). Sin embargo, esta ventaja, puede convertirse en desventaja, ya que en algunos casos pueden dar lugar a la vez una respuesta inmune celular y humoral, de forma que si el paciente alberga anticuerpos preexistentes contra AAV, aún siendo niveles muy bajos, pueden dificultar el éxito de la transducción. Estos eventos están siendo estudiados (Louis Jeune, 2013). Estudios en fase I y II en la retinosis pigmentaria se han llevado a cabo utilizando estos vectores (Colon y cols., 2013), también en enfermedades neuromusculares con afectación de la musculatura ventilatoria (Smith y cols., 2013), y en casos de hemofilia, entre otras patologías (Nathwani y cols., 2011).

2.3.1.4. *Herpesvirus*

Los vectores del virus del herpes se derivan principalmente de HSV Tipo-1. Es un virus de aproximadamente 180-200 nm de diámetro, grande, y neurotrópico. Su genoma está formado por una doble cadena lineal de ADN de aproximadamente 152 kb que comprende más de 80 genes son clasificados en esenciales y no esenciales en función de su necesidad para la replicación viral. El ADN está dividido en segmentos únicos largos y cortos flanqueados por secuencias repetidas invertidas. Entre el núcleo y la cápside está el tegumento, que contiene diferentes proteínas, con funciones estructurales y reguladoras (Vannucci y cols., 2013; Manservigi y cols., 2010).

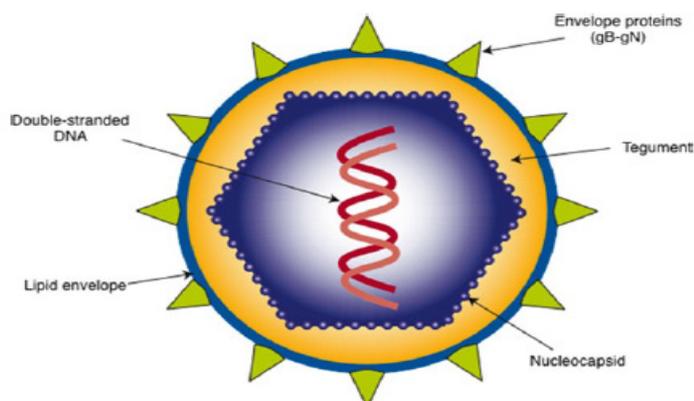


Figura 15: Representación de un herpesvirus. Fuente: Warnock y cols., 2011.

Una de las características más interesantes del HSV es su capacidad para permanecer latente en las células huésped después de la infección inicial y volver a reactivarse de forma espontánea. Esta característica los convierte en elementos muy valorados para la formación de vectores virales (Warnock y cols., 2011). Los vectores derivados de virus del herpes simple han podido ser usados en células del sistema nervioso (Nygardas y cols., 2013; Jerusalinsky y cols., 2012), para la destrucción selectiva de células cancerosas (Lee y cols., 2012. Peng y Bell, 2012), o para la infección específica de los tejidos u órganos específico (Marconi y cols., 2009).

Se han diseñado tres clases diferentes de vectores. Vectores atenuados competentes para la replicación, vectores recombinantes incompetente para la replicación y vectores defectuosos ayudante-dependientes conocidos como amplicones. Los terceros son los más seguros. Los vectores de replicación defectuosa funcionan de forma similar a los vectores adenovirales y retrovirales. Los genes implicados en la replicación se eliminan y el transgen ocupa su lugar.

El amplicón se construye con la utilización de plásmidos que contienen las señales necesarias para el embalaje y el transgen. Necesitan, como en la construcción del resto de vectores virales, la presencia de las células empaquetadoras (Warnock y cols., 2011; Marconi y cols., 2009).

Las ventajas y desventajas se resumen en la Tabla 6

Ventajas vectores VHS	Desventajas vectores VHS
Tropismo celular	Posible citotoxicidad
Pueden empaquetar ADN de gran tamaño (hasta 50 Kbp	El genoma vectorial no se integra en el genoma de la célula huésped
Tropismo por células neuronales y linfocitos B	Expresión transitoria del transgen
Se pueden alcanzar altos títulos	Riesgo de recombinación con VHS latentes en las células infectadas

Tabla 6: Ventajas e inconvenientes del uso de herpesvirus como vectores. Fuente: adaptado de Flotte, 2013; Vaccunni y cols.,2013; Manservigi y cols., 2010.

2.3.2 Vectores no virales

El desarrollo de tecnologías que permitan la utilización de vectores no virales tiene cada vez más importancia en la comunidad biomédica. Los inconvenientes de los vectores virales como problemas de toxicidad, desarrollo de respuestas inmunes, posibles inserciones erróneas así como una producción cara, han provocado la necesidad de desarrollar vectores sintéticos que permitan el diseño controlado de vehículos eficientes y biocompatibles (Schlenk y cols., 2013). La principal desventaja del uso de vectores no virales, en comparación con los virales, es la baja eficiencia de transfección (Schmidt-Wolf y Schmidt Wolf 2003).

2.3.2.1. Bombardeo de partículas.

La técnica del bombardeo de partículas, es también conocida como “pistola de genes”. El material de ADN estará sobre la superficie de partículas metálicas de oro o tungsteno formando pequeños “proyectiles” de un diámetro de 0,5 a 5 micras, que son impulsados mediante gas a presión (helio) lo que les permite atravesar las membranas celulares para introducirse en el interior de la célula. Fue utilizado en sus comienzos para la transferencia génica en vegetales (Uchida M y cols., 2009). En 1990, Yang y colaboradores estudiaron esta técnica consiguiendo expresión génica transitoria en hígado, piel y tejidos musculares de rata y posteriormente también en glándula mamaria y en cultivos primarios (Yang y cols., 1990). Estudios posteriores han continuado valorando las posibilidades de esta técnica en distintos tejidos, algunos ejemplos serían los estudios realizados en próstata (Zhang y cols., 2002), hígado (Kuriyama y cols., 2000), líneas celulares de mama y embrionarias (Uchida y cols., 2009), córnea (Bauer y cols., 2013), líneas celulares de miocardiocitos (Steele y cols., 2013) y cerebro (Dunaevsky, 2013). Recientemente se plantea la posibilidad de utilizar la “pistola génica” como técnica para la vacunación en las alergias tipo I (Steele y cols., 2013).

2.3.2.2. Inyección por aguja.

La inyección directa de ADN desnudo es el sistema de transferencia génica no viral más simple, supone la inyección de un plásmido con el ADN (pADN) en los tejidos locales o la circulación sistémica. El plásmido estará bajo control transcripcional de diversos elementos reguladores eucarióticos. El mayor problema se presenta para su aplicación a nivel de circulación sistémica, ya que el ADN desnudo puede ser degradado y fagocitado. Sin embargo, una inyección de gran volumen puede inducir la transferencia génica eficaz en los órganos internos (Schmidt-Wolf y Schmidt-Wolf, 2003). En 1990, se hicieron estudios en músculo

esquelético en ratones (Wolff y cols., 1990). Se ha probado en piel (Choate y Khavari, 1997), músculo cardíaco (Park y cols., 2001), hígado y otros tumores sólidos (Miyamoto y cols., 2012; Habib y cols., 1996).

2.3.2.3. *Electroporación.*

Consiste en generar poros en las membranas celulares de las células dianas mediante la utilización de impulsos eléctricos. Los poros permanecen en la membrana durante poco tiempo, de milisegundos a minutos, de esta forma se consigue una puerta transitoria de acceso al citosol y con ello la posibilidad de transferir el ADN de interés así como fármacos (Favard y cols., 2007; Cukjati y cols., 2007; Canatella y Prausnitz 2001). Neuman y sus colaboradores utilizaron esta técnica por primera vez para introducir el gen de la timidina quinasa en líneas celulares de ratón carentes de esta enzima (Neumann y cols., 1982). En 1996, se llevó a cabo un ensayo clínico en un grupo de seis pacientes, tres con melanoma maligno, dos con carcinoma de células basales y uno con adenocarcinoma metastásico, a todos se les aplicó la electroquimioterapia (TEC), la administración de los fármacos junto con pulsos eléctricos. Los resultados fueron esperanzadores (Heller y cols., 1996). Posteriormente la investigación en este campo continuó, en 2012, se publica la fase I de un ensayo para el tratamiento de pacientes con metástasis de melanoma cutáneo accesibles (Heller y cols., 2012). Se ha planteado la posibilidad de utilizarlo en vacunaciones, comprobando su eficacia en prácticamente todos los modelos animales probados y con un buen perfil de seguridad incluyendo la vacunación contra el cáncer (Fioretti y cols., 2013; Fu y cols., 2012 Van Drunen Littel y cols., 2010). Se ha investigado recientemente en modelos animales como posible camino hacia la vacuna de la malaria (Kumar y cols., 2013). Se formulan planes de tratamiento tanto a nivel experimental como clínico en los que se utiliza la electroquimioterapia tanto en terapia génica como en vacunación (Zupanic y cols., 2012). Uno de los problemas que puede plantear

la electroporación es el daño tisular que puede desencadenar la utilización de energía eléctrica en el proceso. Se busca, por tanto, la utilización de campos de una intensidad más baja para disminuir el daño del tejido y mantener una eficacia adecuada. La técnica ha sido probada también en músculo esquelético y en la enfermedad de Alzheimer (Li y cols., 2012). Se han realizado estudios in vivo en animales y en líneas celulares, para la transfección génica en hígado (Miyahara y cols., 2012), en corazón (Hargrave y cols., 2012), para corregir defectos óseos (Ferreira y cols., 2012) y en tratamientos de problemas pulmonares, como las contusiones (Heller y cols., 2012).

2.3.2.4. *Liposomas catiónicos*

Los liposomas son estructuras vesiculares formadas por una capa doble de fosfolípidos que contienen un espacio acuoso en su interior (Figura 16). Los lípidos pueden ser neutros o de carga positiva o negativa (Mazzolini y cols., 2005). Los liposomas compuestos por lípidos catiónicos son los que mejor funcionan en las terapias génicas. (Kamimura y cols., 2012). Presentan tres dominios estructurales: un grupo hidrófilo, una porción hidrófoba, y un engarce entre los dos dominios. El grupo hidrófilo exhibe una o más cargas positivas que interaccionan con el ADN cargado negativamente a través de atracciones electrostáticas que conducen a la formación de complejos que contienen ADN condensado (se les llama lipocomplejos) (Defu y cols., 2013; Mintzer y Simanek, 2009).

Fueron descritos en 1965 por Bangham y sus colaboradores (Bangham y cols., 1965). Se han desarrollado diferentes vectores variando el grupo catiónico. En un primer momento, se utilizaron con distintos compuestos DOTMA (N-[1 - (2,3-dioleiloxi) propil]-N, N, N-trimetilamonio), que forman pequeños liposomas unilamelares que interactúan espontáneamente con ADN para formar complejos

de lípido-ADN. De esta manera, han conseguido el cien por cien de atrapamiento del ADN, facilitado la fusión del complejo con la membrana plasmática de las células de cultivo o de los tejidos y facilitado la captación y expresión del ADN (Felgner y cols., 1987).

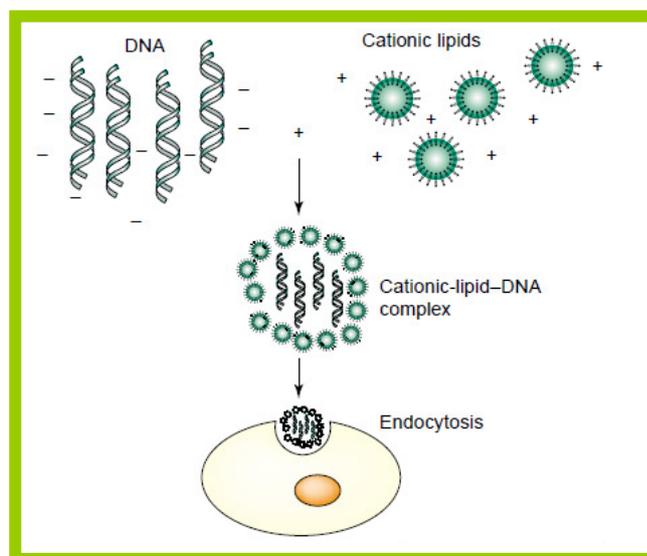


Figura 16: Lipocomplejos. Fuente: Schmidt-Wolf y Schmidt-Wolf, 2003

Otros tipos fueron los que utilizaron DOTAP (Stamatatos y cols., 1988) o DCChol (Gao y Huang, 1991). Se trata de buscar la formulación más eficaz y la comprensión de los mecanismos de acción (Iliina y cols., 2012). Se evidenció que la densidad y la naturaleza del grupo catiónico afecta a la transfección (Mintzer y Simanek, 2009). En los últimos años se han desarrollado formulaciones de lípidos catiónicos ionizables novedosos en conjunción con procedimientos sofisticados como por ejemplo su conjunción con los nanovehículos para la entrega de ARN en el silenciamiento de los genes diana en varias enfermedades (Zuhorn y cols., 2013). Se sigue investigando la utilización de nuevos lípidos en la formulación de las construcciones (Loizeau y cols., 2013).

Con respecto a su mecanismo de acción, los primeros trabajos sugirieron que los lipocomplejos entregan el material de interés en el citoplasma de forma directa por fusión con la membrana celular. Posteriormente se ha visto que también podía ser por endocitosis (Mintzer y Simanek 2009).

Los liposomas ofrecen varias ventajas: su síntesis es fácil y barata, ofrecen una protección al ADN para no ser degradado por las nucleasas, pueden transportar ADN de gran tamaño, tan largo como un cromosoma, pueden ser específicas de tejidos y son fáciles de manipular en el laboratorio (Kamimura y cols., 2012; Schmidt-Wolf y Schmidt-Wolf, 2003).

Se ha desarrollado un ensayo en fase I y II con allovectin-7 para pacientes con melanoma en fase III o IV que no responden a la primera línea de tratamiento. Es un plásmido ADN que contiene los genes del HLA-B7 y beta2-microglobulina en un complejo de liposomas con DMRI/DOPE. La Fase I y II de los ensayos ha mostrado una respuesta local y sistémica a estos tumores, con un excelente perfil de seguridad. La fase III será la que dictamine la eficacia del tratamiento en comparación a las terapias habituales. Se ha realizado con 390 pacientes en U.S y en Europa. El diseño de este estudio fue aceptado por la FDA bajo un protocolo especial de valoración. Los mecanismos de acción de allovectin serían aplicables a otro tipo de tumores accesibles y sólidos como mama, próstata cabeza y cuello (Kharkevitch y cols., 2011; Chowdhery y cols., 2011). También se han realizado estudios para el tratamiento de la fibrosis quística (McLchlan y cols., 2011; Griesenbach y cols., 2002).

2.3.2.5. Polímeros

Los polímeros catiónicos condensan el ADN en pequeñas partículas y lo previenen de la degradación. La penetración en la célula es por endocitosis. Son

fáciles de fabricar y flexibles para añadir modificaciones. Muy similares a los lípidos catiónicos (Kamimura y cols., 2011). Estas formaciones se llaman también policomplejos o nanopartículas (Schmidt-Wolf y Schmidt-Wolf, 2003). Aunque el término nanopartícula es más amplio ya que también pueden ser de oro, de sílice o de carbón (Mintzer y Simanek, 2009).

Han sido utilizados en terapia génica en varios tipos de cánceres como son cáncer de mama (Zhou y cols., 2012); cáncer de páncreas (Wang y cols., 2013), cáncer gástrico (Xin y cols., 2013), en el cáncer de cuello uterino (Zeng y cols., 2013), pero también en el párkinson (Huang y cols., 2013), Diabetes Mellitus (Rasouli y cols., 2013), y en la enfermedad inflamatoria intestinal, como vectores para entrega de fármacos (Beloqui y cols., 2013). Éstos son solo un pequeño ejemplo de los estudios que actualmente se realizan con respecto a este tema.

2.3.2.6. Sonoporación

Utiliza ultrasonidos que temporalmente permeabilizan la membrana celular para permitir la entrada del ADN. Permite restringir el efecto al área donde se aplica el ultrasonido. Se ha estudiado en córnea (Sonoda y cols., 2006), cerebro y sistema nervioso central (Thévenot y cols., 2012; Huang y cols., 2012; Manome y cols., 2005), páncreas (Chen y cols., 2006), hueso (Sheyn y cols., 2008), peritoneo (Guo y cols., 2007), riñón (Chen y cols., 2012; Hou y cols., 2005), hígado (Shen y cols., 2008), tejido embrionario, músculo, corazón y estructuras cardiovasculares (Leong-Poi, 2013; Ji y cols., 2012; Saliba y cols., 2012), ovario (Chang y cols., 2012), y hemofilia (Miao y cols., 2005).

2.3.2.7. Láser.

El láser genera poros efímero en la membrana celular a través de la cual pasa el ADN. La eficiencia dependerá del control del tamaño del foco en el que se aplique y de la frecuencia del láser usado. El índice de expresión del transgen es similar al conseguido con la electroporación (Kamimura y cols., 2012).

2.3.2.8. Magnetofección.

Utiliza campos magnéticos para promover la transfección. Emplea nanopartículas magnéticas fabricadas de óxido de hierro cubiertas por lípidos catiónicos o polímeros (Kamimura y cols., 2013; Chen y cols., 2013; Wang y cols., 2013)

2.3.2.9. Hidroporación.

Consiste en el empleo de una inyección intravenosa rápida de una gran cantidad de solución que contiene ADN plasmídico desnudo. Esta tecnología parece ser simple para la transfección eficiente en los hepatocitos (Nakamura y cols., 2013), pero desafortunadamente se han hecho sólo unos pocos ensayos para mejorarla (André y cols., 2006; Gao y cols., 2004).

En la Tabla 7 se hace un resumen de los métodos no virales de transfección.

Método	Característica para la entrega del gen	Ventajas	Desventajas
Lípidos catiónicos	Carga catiónica	Gran eficiencia in vitro y fácil preparación	Baja eficiencia in vivo, pueden provocar una respuesta inmune aguda
Polímeros catiónicos	Carga catiónica	Gran eficiencia in vitro, fácil preparación	Toxicidad celular, pobre eficiencia in vivo, puede provocar una respuesta inmune aguda
Sistema híbrido: Lípidos-polímeros	Carga catiónica	Alta efectividad in vitro	Baja actividad in vivo
Inyección por aguja	Mecánico	Simple	Baja eficiencia, expresión limitada a la zona de la inyección
Bombardeo de partículas	Presión	Buena eficiencia	Transferencia de genes limitada al área del blanco. Para su utilización en órganos internos requiere intervención quirúrgica
Electroporación	Pulsos eléctricos	Alta eficiencia	Daño tisular. Transferencia de genes limitada al área del blanco. Para su utilización en órganos internos requiere intervención quirúrgica
Sonoporación	Ultrasonidos	Especificidad de sitio	Baja eficiencia. Daño tisular
Láser	Láser	Especificidad de sitio	Baja eficiencia. Daño tisular
Magnetofección	Campo magnético	Especificidad de sitio	Baja eficiencia
Hidroporación	Presión hidrodinámica	Simple, alta eficiencia, especificidad de sitio	Necesita catéter de inserción

Tabla 7: Métodos de transfección no viral. Adaptado de Kamimura y cols., 2011

2.3.3 Trasposones

Los transposones son segmentos de ADN con la capacidad de moverse a lo largo del genoma, motivo por el cual, pueden ser utilizados como vectores de genes. Pueden usarse para realizar transgénesis de células somáticas y de línea germinal. Pueden beneficiarse de la mutagénesis insercional para conseguir la

pérdida de una función o para conseguir la ganancia de la misma. Existen 2 tipos: de clase I y de clase II (Figura 17). Los de clase I o retrotransposones se mueven en el genoma siendo transcritos a ARN y después en ADN por retrotranscriptasa. Los de clase II se mueven directamente de una posición a otra en el genoma usando una transposasa para copiar y pegarse en otro locus del mismo (Ivics, 2007).

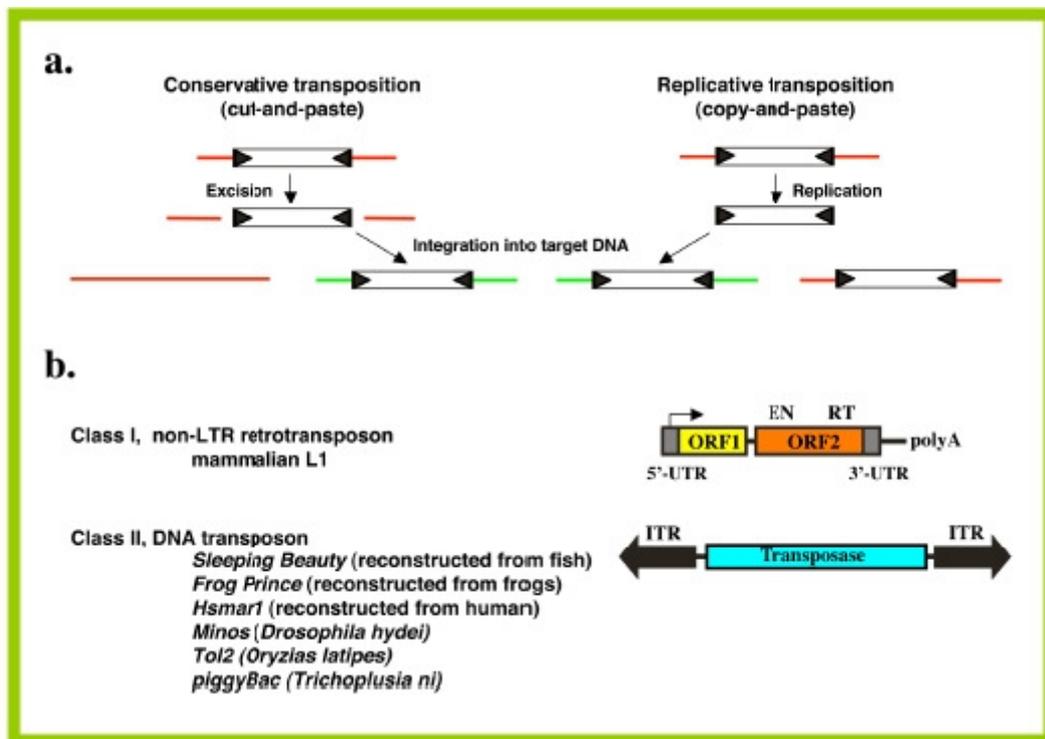


Figura 17: a.- Representación de los dos mecanismos principales de transposición. Durante la transposición conservadora el ADN donante se escinde (línea roja) y se integra el ADN objetivo (línea verde). La ligación de los extremos rotos del ADN reconstituye el locus del donante. La transposición replicativa implica la amplificación del elemento mediante la copia a través de la transcripción seguida por transcripción inversa. La nueva copia hecha se inserta en el genoma en otro lugar, pero el elemento donante no se mueve. b.- Estructuras y organización de los principales tipos de elementos de transposición. Clase I retrotransposón no LTR. El elemento consiste en una región 5' no traducida que tiene la actividad del promotor (flecha) que dirige la transcripción de los genes codificados por elemento. ORF1 codifica una proteína de unión al ácido nucleico. ORF2 codifica una endonucleasa (ES) y una transcriptasa inversa (RT). Clase II transposón ADN. El gen de la transposasa en el centro está flanqueado por repeticiones invertidas terminales (IRS, que se muestra como flechas negras). El IRS contiene los sitios de unión para la transposasa y secuencias que se requieren para la escisión mediada por transposasa. Fuente: Ivics, 2007.

A finales de los 90 se construyó, por mutagénesis, un trasposón de ADN activo a partir de la secuencia de un trasposón de la familia del Tc1 presente en el genoma del salmón, fue llamado “Trasposón Sleeping Beauty” (SB). Supuso una importante herramienta en la terapia génica, y para identificar genes en vertebrados (Horie y cols., 2003; Ivics, 1997). Están mostrando ser una promesa para su utilización en células madre hematopoyéticas y las células T humanas. Se está intentando optimizarlos (Sharma y cols., 2013; Huls y cols., 2013). Se han aplicado para transferencia de genes en la tirosinemia hereditaria tipo I (Pan y cols., 2012) o en enfermedades degenerativas de la retina (Johnen y cols., 2013). Posteriormente se creó el transposón “piggyBac” (PB) que se está utilizando cada vez más para los estudios genéticos con diferentes versiones modificadas que tienen aplicaciones de gran alcance (Lin y cols., 2013; Sharma y cols., 2012). La última generación de traspososnes SB y PB, representan actualmente algunos de los sistemas más atractivos para la modificación genética estable no viral de células primarias o células madre adultas en particular. Esto induce a pensar que pueda abrirse un camino hacia el uso de trasposones como importantes vectores no virales para el tratamiento de trastornos hereditarios, trabajando en la mejora de sus perfiles de seguridad (Di Matteo y cols., 2012).

2.4 ESTRATEGIAS DE TERAPIA GÉNICA ANTITUMORAL

Asumiendo todos los conocimientos de los que se dispone actualmente sobre los mecanismos por lo que las células normales se transforman en neoplásicas, se han podido desarrollar estrategias de intervención que intentan evitar que dicha transformación se produzca.

2.4.1. Oncogenes y genes supresores de tumor.

Un *protooncogen* es un gen celular normal pero con la capacidad de transformarse en un gen mutado que pueda ser un detonante para inducir al desarrollo del cáncer. La versión mutada del *protooncogen* se llama *oncogen*. Ejemplos de *oncogenes* son las proteínas kinasas, el gen Ras, oncogen c-Myc, N-Myc y c-erbB-2 (Riley y Desai, 2009; Bishop, 1991).

Los *genes supresores de tumores* están involucrados en los puntos de control celular, cuando están intactos y funcionan correctamente, previenen el paso de las células con el ADN dañado u otro daño celular a través del ciclo celular, de esta forma, estos genes, presentes en células normales, suprimen el fenotipo-maligno. Las células cancerosas parecen haber perdido la presencia de estos genes con capacidad supresora tumoral (Riley y cols., 2009; Wadhwa y cols., 2002). Son genes supresores de tumor el gen p 53, el gen del retinoblastoma RB, FUS1, el gen de la poliposis adenomatosa (APC), el gen de la proteína quinasa (DAPK), el gen tipo 1 del adenoma pleomórfico (PLAGL1), el gen PYCARD / ASC y la proteína de tumor 63 (TP63) (Yin y cols., 2013). Las estrategias anti tumorales básicamente se basan en, suprimir a los oncogenes o puede ser usada para codificar los genes supresores de tumor que estén mutados o ausentes en los diversos tipos de cáncer, para suprimir el crecimiento del tumor (Vachani y cols., 2012).

El término "inmunotoxina" se refiere clásicamente a moléculas híbridas que constan de una toxina ligada a un derivado del sistema inmune (un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo), con frecuencia ampliado para incluir otros ligandos diana-especificados (tales como las citoquinas). Este sistema tiene la capacidad de dirigirse, por la especificidad del anticuerpo, hacia las células cancerosas y no dañar a las células sanas (Shapira y Benhar, 2010). La inmunotoxina se une a un antígeno de superficie de una célula cancerosa, entra en la célula por endocitosis, y la mata (Pastan y cols., 2003). Entre las toxinas bacterianas que se utilizaron para la construcción de inmunotoxinas, las más

comunes son la toxina de la difteria (producida por *Corynebacterium diphtheria*) y la exotoxina A de la *Pseudomonas aeruginosa*. También se han utilizado toxinas derivadas de plantas en la preparación de inmunotoxinas, entre ellas, la ricina, saporina y proteína antiviral de hierba carmín (PAP). Todas estas toxinas son extremadamente potentes y ejercen su toxicidad por la inhibición enzimática de la maquinaria de síntesis de proteínas de las células eucariotas (Sapra_y Shor, 2013; Shapira y Benhar, 2010). Han mostrado una eficacia significativa en el tratamiento de cáncer de mama, el linfoma de no Hodgkin, la leucemia linfocítica crónica, y en la leucemia mieloide aguda (Von Mehren y cols., 2013). Terapias de anticuerpos anti-HER2, han sido valoradas en el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de pulmón y cáncer de próstata (Tang_y cols., 2012).

Los oligonucleótidos sintéticos antisentido son secuencias cortas de ácidos nucleicos, de tan solo 15 o 20 bases, diseñados para unirse a secuencias específicas de ADN o ARN, de tal forma que suponen un ARNm complementario al ARNm de interés. Esta técnica permite la inhibición altamente selectiva de la expresión de proteínas específicas. Tienen un gran potencial terapéutico para inhibir la expresión de oncogenes y de señales angiogénicas, por lo que suponen técnicas de gran utilidad en la terapia contra el cáncer y contra otras enfermedades de origen genético (Rudin y cols., 2001; Cunningham y cols., 2000). Se han realizado ensayos en fase I y II con un oligonucleótico (ISIS 5132) que específicamente regula a la baja la expresión de *c-raf*, en pacientes con cáncer de mama, ovario, pulmón, colon, rectal, riñón, hepático, linfoma y otros (Fidias y cols., 2009; Rudin y cols., 2001; McPhillips y cols., 2001; Cunningham y cols., 2000). Aunque en alguna ocasión sin la respuesta esperada en los estudios realizados por ejemplo en cáncer de ovario (Oza y cols., 2003), cáncer de próstata (Tolcher_y cols., 2002) o cáncer colorrectal metastásico (Cripps y cols., 2002). El factor de crecimiento transformante beta 2 (TGF- β 2) es un objetivo atractivo

porque regula los mecanismos clave de la carcinogénesis, en particular, la inmunosupresión y la metástasis, y se sobreexpresa frecuentemente en tumores malignos. Se ha desarrollado un oligonucleótido (Trabedersén) diseñado para la inhibición específica de la biosíntesis de TGF- β 2, estudiándose para su aplicación en pacientes con glioma de alto grado, con carcinoma de páncreas avanzado, metástasis de melanoma, o carcinoma colorrectal metastásico (Connolly y cols., 2012; Jaschinski y cols., 2011). En 2013 se publican estudios con un oligonucleótido antisentido (AEG35156), contra XIAP para el tratamiento en tumores sólidos, linfoma y leucemia mieloide aguda (LaCasse, 2013)

Los ribozimas son ARNs catalíticos, pueden actuar como una endorribonucleasa, hibridando sus “Secuencias Guía Internas” (IGS) con un sitio diana complementario en un ARNm sustrato. De esta forma, consiguen un péptido tóxico en forma de ARNm específico para, selectivamente, destruir las células diana. Estas ribozimas se han desarrollado para revisar transcripciones defectuosas que causan enfermedades genéticas, como el cáncer, pudiendo ser útiles como agentes anti-cáncer y también para reemplazar transcripciones virales (Meluzzi y cols., 2012; Kwon y cols., 2005). Se han desarrollado ribozimas que pueden sustituir el ARN p53 mutante, por una secuencia de ARN de tipo salvaje en distintas líneas celulares (Shin y cols., 2004). Nuevas construcciones de ribozimas se estudian en líneas de cáncer de ovario, cáncer de mama, colorrectal, gástrico y pulmón (WonWon y Lee, 2012). En 2013 se publican los resultados de un estudio realizado con una desoxirribozima en pacientes con carcinoma basocelular (Cho y cols., 2013).

2.4.2. Inhibición de la angiogénesis

La angiogénesis es la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes (Tahergorabi y Khazaei, 2012; Dass y cols., 2007). El

crecimiento del tumor y su supervivencia dependen de la formación de nuevos vasos sanguíneos que permitan el aporte de oxígeno y nutrientes. Por ello el crecimiento del tumor puede ser detenido mediante el bloqueo de la angiogénesis. En el proceso de neoformación vascular intervienen dos factores: los factores de crecimiento angiogénico y los inhibidores de la angiogénesis. Son factores angiogénico, el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante (TGF), y angiopoyetinas. Tres de los inhibidores del crecimiento de células endoteliales más populares son angiostatina, endostatina y trombospondina (Tahergorabi y Khazaei, 2012; Sakurai y Kudo, 2011; Wadhwa y cols., 2002). Una característica notable de endostatina y angiostatina es que tienen una dosis-respuesta bifásica, de forma que la actividad antitumoral óptima se obtendría dentro de un estrecho rango de concentración de proteína, por debajo y por encima de esta concentración, la actividad antitumoral disminuye. Esta situación no es exclusiva de endostatina y angiostatina. Otras proteínas que regulan la angiogénesis muestran curvas bifásicas similares, tales como IFN- α , rosiglitazona y trombospondina (Javaherian y cols., 2011).

La transferencia de genes para aumentar la expresión de proteínas endógenas antiangiogénicas es un enfoque alternativo que tiene el potencial de proporcionar estabilidad a largo plazo, por ejemplo, en pacientes con degeneración macular por neovascularización (Campochiaro, 2011). Estos tratamientos, que son, esencialmente citostático, y que necesitan su administración a largo plazo, con el fin de obtener efectos anti-tumorales prolongados, tiene una eficacia principalmente como una estrategia de intervención temprana (Persano y cols., 2007). Los nuevos tratamientos antiangiogénicos para gliomas malignos se ofrecen como agentes tóxicos, inhibidores del crecimiento (Rege y cols., 2005). Se han realizan estudios sobre la importancia de estos factores, así como sus

posibilidades terapéuticas en cáncer de páncreas (Tamburrino y cols., 2013). En el cáncer de pulmón se plantea el uso de agentes anti-angiogénicos multidirigidos como tratamiento de segunda y tercera línea (Majem y Pallarès, 2013). Se llevan a cabo ensayos clínicos en cáncer de próstata aunque aún no se ha aprobado ningún inhibidor angiogénico para su uso en esta patología (Martínez-Jabaloyas y cols., 2013). Otros ejemplos son los anticuerpos monoclonales, Bevacizumab, Cetuximab y Panitumumab, descritos en el apartado de tratamiento de cáncer colorrectal.

2.4.3 Vacunas

La utilización de vacunas contra el cáncer es un tema de gran actualidad. El concepto de vacuna ha ido evolucionando de tal forma que, ya, no sólo se buscan las vacunas preventivas, actualmente se intentan conseguir también vacunas terapéuticas que mejoren la inmunidad contra una enfermedad o un patógeno (Colomer, 2008)

Son varios los antígenos que están sobreexpresados o mutados en el cáncer que pueden tomarse como dianas inmunitarias, tales como, MUC1, CEA, antígenos sialil, hTERT, HER2n o p53 (Vachani y cols., 2012; Colomer, 2008). A lo largo de los últimos años se ha desarrollado el uso de partículas como adyuvantes inmunológicos para crear vacunas y aumentar los efectos de la quimioterapia contra el cáncer. Los vehículos utilizados han sido liposomas, nanopartículas poliméricas o virus oncolíticos, para algunos autores, los adenovirus oncolíticos (Ads), tienen muchas ventajas como agentes “viroterpéuticos” y se han empleado de forma segura en la clínica (Koido y cols., 2013; Seda, 2013). En el campo de la terapia con virus oncolítico, varios agentes han entrado en ensayos clínicos y los resultados han sido prometedores, dando lugar a la utilización de estos vectores como una nueva forma de terapia génica (Patel y cols., 2013). Como ejemplos concretos citar ensayos realizados en cáncer de pulmón (Beljanski y Hiscott

2012), o para el tratamiento de cáncer de próstata metastásico, por ejemplo, se ha creado un producto al que han llamado PROSTVAC-VF que comprende dos vectores virales recombinantes, cada uno de los transgenes codifican para PSA, y para tres moléculas coestimuladoras inmunes, TRICOM, (B7.1, ICAM-1 y LFA-3). Se obtuvieron beneficios clínicamente significativos, pero necesitan ser confirmados en un mayor estudio de fase III (Kantoff y cols., 2010).

2.4.4. Sistemas asesino-suicidas condicionales

La transfección y expresión de genes suicidas en la patología tumoral supone una atractiva estrategia en la terapia génica humana. Se llama *genes suicidas*, a los genes que codifican un producto de por sí tóxico o un producto enzimático capaz de convertir un pro-fármaco en un compuesto citotóxico, de tal forma que, la administración de la pro-droga tras la transfección provoca la producción de la droga tóxica en el tumor (Duarte y cols., 2012; Wadhwa y cols., 2002).

2.4.4.1. Sistemas asesino-suicidas con acción directa

Los sistemas más utilizados en cáncer de colon son el de la citosina desaminasa/5-fluorocitosina (CD/5FC) o el de la timidina quinasa del Virus Herpes Simple (HSVtk).

a. Sistema citosina desaminasa

Un gen suicida altamente estudiado es el gen de la citosina desaminasa, una enzima bacteriana, que, cuando se expresa en células de mamífero, puede convertir el compuesto 5 fluoro-citosina (5FC), no tóxico, en el metabolito citotóxico 5 fluoro-uracilo (5-FU). El 5-FU es convertido por enzimas celulares en 5FdUMP, un inhibidor irreversible de la timidilato sintasa (TS). La inhibición de

la TS bloquea la producción dTTP y evita síntesis de ADN (Stolworthy y cols, 2008).

Un hecho clave en la terapia de genes suicidas es el fenómeno conocido como el efecto de espectador, en el que las células vecinas no transfectadas pueden tener transferencia de los antimetabolitos. Un fuerte efecto espectador se ha asociado con la terapia CD/5FC, quizás porque el 5-FU es una molécula pequeña, sin carga. Otra ventaja de la combinación CD/5FC es que el 5-FU posee efectos radiosensibilizantes, aumentando la eficacia de los tratamientos in vivo (Stolworthy y cols, 2008).

b. Sistema Timidina quinasa del Virus Herpes Simplex (HSVtk)

El gen HSVtk codifica la enzima timidina quinasa (HSVtk) del virus del herpes simple tipo 1. El ganciclovir (GCV) se metaboliza pobremente por las células de mamíferos, por lo que, por lo general, no es tóxico. Sin embargo, después de la conversión a GCV-monofosfato por HSVtk, se metaboliza rápidamente por las quinatas endógenas a GCV-trifosfato que actúa como un potente inhibidor de la ADN polimerasa y compite con nucleósidos, bloqueando la replicación y provocando así la muerte celular. Su expresión, por tanto, en la célula tumoral confiere sensibilidad al fármaco antiherpético ganciclovir (Vachani y cols., 2011).

Recientes estudios consideran prometedora el uso de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT) controlados por virus del herpes simple timidina quinasa / ganciclovir (HSVtk/GCV) para el tratamiento del carcinoma de células renales, probado en modelos in vivo de ratón (Tian y cols., 2013). También el carcinoma hepatocelular ha sido objeto de estudio. Yu y sus colaboradores, usaron los virus del herpes simple timidina quinasa / ganciclovir

(HSVtk / GCV) y el inhibidor tisular de la metaloproteína 3 (TIMP3), mediante ultrasonidos se suministraron los genes, objetivando un aumento del número de células apoptóticas y la disminución de la densidad vascular de los tumores en ratones (Lu y cols., 2013). Hay estudios in vivo en cáncer de pulmón (Leinonen y cols., 2012).

c. Sistema de la enzima nitrorreductasa de E. Coli

La enzima nitrorreductasa (NTR, NfsB nitroreductasa de *Escherichia coli*) es una flavoproteína con una amplia especificidad de sustrato, provocando la reducción de compuestos nitroaromáticos y quinonas utilizando ya sea NADPH o NADH. Uno de sus sustratos es el pro-fármaco CB 1954 (5 - [aziridin-1-il] -2,4-dinitrobenzamida), que se convierte en un agente citotóxico provocando la sensibilización selectiva de las células que expresan NTR o tumores para el pro-fármaco. De este modo NTR/CB1954 tiene potencial para su uso en la terapia génica del cáncer (Bhaumik y cols., 2012; Christofferson y Wilkie, 2009).

CB 1964 es tóxico porque genera lazos cruzados (crosslinks) en el ADN, seguidos más tarde por una reacción no enzimática con tioesteres como el acetil CoA, causando apoptosis en células proliferantes y no proliferantes (Djeha y cols., 200; Knox y cols., 1993; Friedlos y cols., 1992).

Tras los estudios realizados in vitro e in vivo en tumores metastásicos colorrectales, carcinoma hepatocelular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de próstata, ovario, y líneas celulares de adipocitos, entre otros, (Searle y cols., 2004; Felmer y Clark, 2004; Djeha y cols., 2000), se han desarrollado ensayos clínicos con estas construcciones. En 2001, se realizó un ensayo en fase I con treinta pacientes con tumores predominantemente gastrointestinales tratados con CB 1954 administrado por vía intravenosa. Posteriormente, este mismo grupo llevó a cabo un ensayo de fase I que combinaba NTR mediada por adenovirus y CB 1954 en pacientes con tumores hepáticos primarios y secundarios (Chung-Faye y cols.,

2001). Se presentó en 2009 un ensayo clínico de fase I / II en el cáncer de próstata mediante inyección intraprostática directa de un vector de adenovirus de replicación defectuosa que codifica la nitrorreductasa (NTR) en relación con el pro-fármaco CB 1954. Un total de 19 pacientes recibieron el virus más el pro-fármaco y se observó una toxicidad mínima y un aumento en el tiempo para la progresión del PSA (antígeno prostático específico) del 10% en 6 de los 18 pacientes a los 6 meses.

2.4.4.2. Sistema asesino-suicida de acción directa:

a. Gen de la apoptina

La apoptina es una proteína codificada por el virus de la anemia del pollo (CVA). El CVA, es un miembro de la familia del *circovirus*, es muy pequeño, de 23 a 25 nanómetros, de ADN monocatenario, circular. Es extremadamente resistente, capaz de soportar desinfectantes comerciales, temperaturas de 131 grados F durante 30 minutos, difícil de eliminar cuando infecta un grupo de animales (Maddika y cols, 2006; Noteborn y Koch, 1995). El genoma del CVA codifica tres proteínas VP1 de 51,6 kDa, VP2 de 24,0 kDa y VP3 o Apoptina de 13,6 kDa (Noteborn y Koch, 1995). VP3 o Apoptina es una proteína pequeña de 121 aminoácidos, rica en prolina, serina y treonina (Tavassoli y cols., 2005).

La apoptina induce apoptosis en células tumorales, y en líneas celulares transformadas (Los y cols, 2009; Backendorf y cols., 2008; Alvisi y cols., 2006; Pietersen y Noteborn, 2000; Noteborn, 1999). Sin embargo, sólo, algunos estudios demuestran la capacidad de la apoptina para producir apoptosis también en líneas celulares normales (Tavassoli y cols, 2005; Guelen y cols, 2004).

Apoptina actúa induciendo apoptosis independientemente de p53 y, según varios autores, también independientemente de Bcl-2 y Bcl-XL, por lo tanto puede ser de

gran utilidad en el esfuerzo para lograr la eliminación específica y eficiente para la destrucción de células tumorales, que han pasado a ser resistentes a la inducción quimioterapéutica de la apoptosis, debido a la falta de p53 funcional y sobreexpresión de Bcl-2 y BCR-ABL (Oro y Jan, 2004; Noterborn 1999; Danen-Van Oorschot y cols., 1999). Sin embargo hay otros autores que ponen en duda la independencia de apoptina con respecto a la presencia o sobreexpresión de Bcl2 y Bcl-XL (Burek y cols., 2006; Maddika y cols., 2005), es una cuestión aún a debate (Li y cols., 2012; Li y cols., 2010).

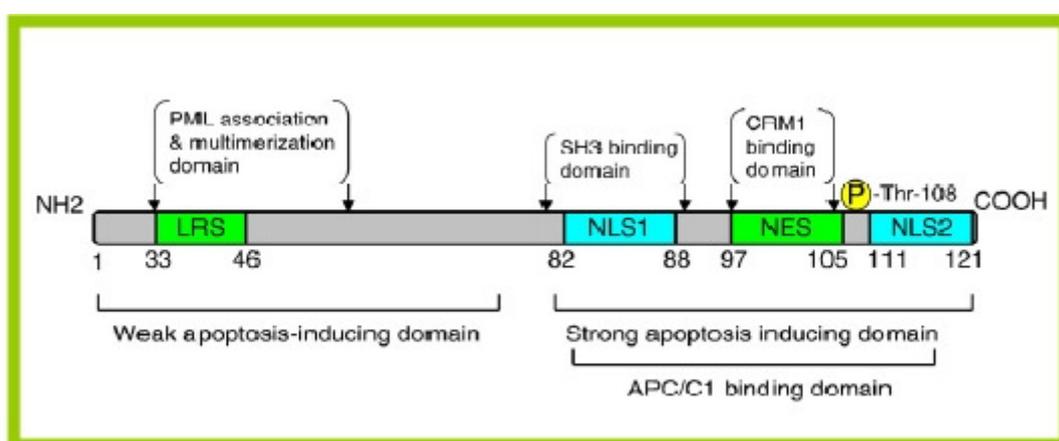


Figura 18: Estructura de la apoptina. Fuente: Los y cols, 2009

El mecanismo molecular por el que apoptina induce la apoptosis no se conoce todavía completamente. La muerte celular mediada por apoptina, parece independiente de los receptores de muerte celular, ya que, células deficientes en FADD y la caspasa-8, los principales reguladores de la vía extrínseca de apoptosis, siguen siendo sensibles a la apoptina. Por otra parte, el bloqueo de los receptores de muerte con CD95 no afecta a la muerte celular inducida por apoptina. Es probable que actúe a través de la vía mitocondrial. Se produce una pérdida de potencial de membrana mitocondrial, y la liberación de las proteínas

mitocondriales como el citocromo c y el factor inductor de apoptosis (Marek y cols., 2009; Maddika y cols., 2005). En este esquema es fundamental la presencia de la molécula Akt fosforilada, y en este sentido la proteína 70 (Hsc70) puede jugar un papel importante (Chen y cols., 2011). Células carentes de la Apaf-1, molécula crucial en la vía mitocondrial, serían resistentes a la acción de la Apoptina (Marek y cols., 2009; Burek y cols., 2006). La Apoptina en las células cancerígenas migra dentro del núcleo y finalmente produce la activación de la vía mitocondrial de una manera Nur 77 dependiente. El producto del Nur 77 es una proteína que pertenece a la familia de receptores nucleares, es un receptor esteroideo y puede provocar, directa o indirectamente, liberación del citocromo c (Marek y cols., 2009). La principal controversia, en cuanto a la función de bcl-2, se podría explicar con la participación de Nur77 que puede unirse a Bcl-2 y cambiar sus propiedades, de tal forma que pasaría de ser una molécula anti-apoptótica, a ser pro-apoptótica. En consecuencia, la expresión de diferentes niveles de Nur77 en diversos tipos de células podrían explicar los efectos opuestos de Bcl-2 en la apoptosis inducida por apoptina (Xiao y cols., 2010). El C-terminal de apoptina contiene una señal de localización nuclear (NLS), que reside entre los aminoácidos (aa) 70 a 121. El extremo N-terminal (aa 1-69) contiene una supuesta secuencia de exportación nuclear (NES), que se encuentra entre los aa 33 a 46 (Tavasollini y cols., 2005). Se determinó que la acumulación nuclear de la apoptina se podía ver reforzada por la fosforilación dentro de la región del NLS y, justo por encima, de la señal de exportación nuclear (NES), Thr-108. Hay estudios que indican que apoptina está presente también en el núcleo de las células no transformadas, aunque en niveles más bajos comparados con las células cancerígenas. (Figura 19)

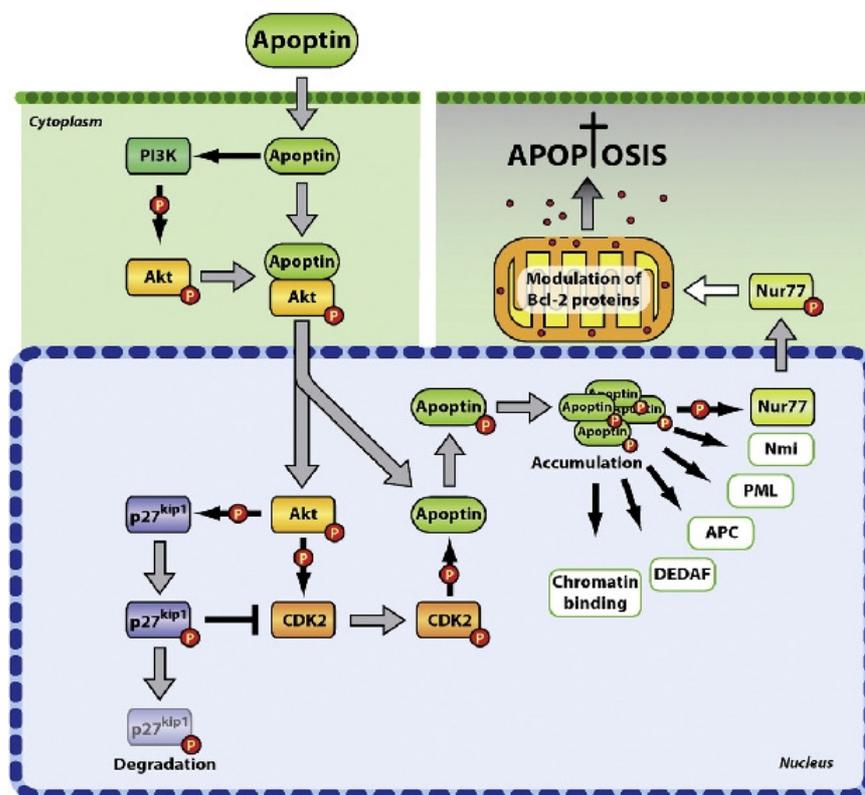


Figura 19: mecanismo acción apoptina en células tumorales. Fuente: (Los y cols, 2009)

En las células normales hay un mecanismo que induce a la exportación desde el núcleo celular para inhibir la apoptosis, estos procesos están inhibidos o, son mucho menos eficientes, en las células cancerígenas, lo que causa apoptosis (Maddika y cols., 2006).

Algunos estudios han objetivado la posibilidad de apoptina para bloquear el ciclo celular en G2- M e inducir a la condensación de la cromatina en las células cancerígenas (Teodoro y cols., 2004; He y cols., 2004).

En los últimos años se ha seguido investigando el mecanismo de acción de apoptina (Zhou y cols., 2012). Ha sido estudiada en cultivos de células humanas tumorigénicas, y /o transformadas, derivadas de melanoma, hepatocarcinoma

(Zhao y cols., 2013; Xiao y cols., 2006; Peng y cols., 2007), tumores cerebrales como el glioma (An y cols., 2013), cáncer nasofaríngeo (Fang y cols., 2012), cáncer gástrico (Liu y cols., 2012), leucemia (Lee y cols., 2012), carcinoma de colon (Zhou y cols., 2011), próstata (Zhang y cols., 2013; Liu y cols., 2006) de cáncer de pulmón (Lian y cols., 2007) de mama, linfoma, osteosarcoma, colangiocarcinoma, (Marek y cols., 2009; Noteborn, 1999). Se analizó el potencial antitumoral y mecanismo de acción simultánea de apoptina e IL- 18 en carcinoma pulmón en ratones. Se vio que el crecimiento o estabilización del tumor en ratones inmunizados con apoptina en conjugación con IL- 18 era significativamente inhibido comparado con el crecimiento del tumor en ratones inmunizados con vector vacío (EV) o sólo con apoptina. Los resultados llevaron a pensar, que la vacunación con apoptina e IL-18 puede ser una fuerte estrategia para la inmunoterapia en el cáncer (Lian y cols., 2007)

b. Gen gef

El gen *gef* es miembro de una familia de genes conocida como *genes killer*. Esta familia de genes está constituida por plásmidos que codifican para los genes *hok*, *flmA*, *srnB*, *pndA* y los genes cromosómicos *gef* y *relF* de la bacteria gram negativa, *Escherichia coli*. Todos estos genes codifican pequeñas y tóxicas proteínas de aproximadamente 50 aminoácidos homólogas funcional y estructuralmente (Poulsen y cols 1991, Gerdes y cols 1990). Estas proteínas provocan una caída del potencial de membrana, formando poros, lo que permite un flujo saliente de Mg^{2+} y entrante de moléculas periplásmicas (Davison, 2002), se induce la detención de la respiración celular y posteriormente, las células se someten a cambios morfológicos, hasta convertirse en las llamadas, células “fantasma”, que ya son células no viables (Boulaiz y cols., 2003; Klemm y cols., 1995). La proteína de *gef* fue detectada por anticuerpos anti péptido y se vio que es una proteína que se ancla en la membrana citoplasmática por su extremo N-

terminal con la parte C-terminal localizada en el periplasma, en una forma dimérica con, al menos, un enlace disulfuro. La porción periplásmica codifica el dominio tóxico responsable de la muerte celular, aunque la dimerización no es necesaria para la toxicidad (Poulson y cols, 1991). El mecanismo por el que actúa la proteína de *gef* no está claramente descrito. Se propone que interactúa con una proteína completa de la membrana, y por otra parte se propone que la proteína *gef* no tiene un receptor específico y que forma un oligómero que abre poros (Poulson, 1991).

Toda esta familia de genes, parece compartir una aparente regulación post-transcripcional de la expresión aunque por diferentes mecanismos (Poulsen y cols 1991, Gerdes y cols 1990).

Se han realizados experimentos transfectando el gen *gef* a células de cáncer de mama (MCF-7) en los que se han objetivado una disminución de la proliferación celular así como un aumento de la apoptosis (Boulaiz, 2003). Posteriormente se propone la posibilidad de que la inducción de *gef* a la apoptosis, en esta misma línea celular, sea regulada por p53, ya que se ha observado un incremento de la expresión de p53 en las células transfectadas con el gen *gef*. (Boulaiz, 2011). Se han llevado a cabo pruebas in vivo para el estudio de su efecto sobre melanoma. En un primer lugar se estudió la inhibición de la proliferación de las células de melanoma (B16-F10) in vitro, y posteriormente se estudio cómo decrecía el volumen de un tumor in vivo (en ratones), objetivando la vía mitocondrial como camino hacia la apoptosis (Prados J, 2010). Otros estudios, también con líneas celulares de melanoma (MS-36) observaron una disminución en la proliferación así como cambios morfológicos evidentes en las células transfectadas (Boulaiz y cols., 2008)

3 TERAPIA COMBINADA

La cirugía, la quimioterapia, la radioterapia y sus combinaciones son el tratamiento estándar para los pacientes con cáncer. Sin embargo, todas las terapias tienen limitaciones e inconvenientes. La invasión y la diseminación tumoral fuera de zonas accesibles, son una desventaja para la cirugía y la radioterapia. Hay tumores que desarrollan una rápida resistencia a los medicamentos empleados en su tratamiento y aunque, el propósito de estos tratamientos sea mejorar el pronóstico de la enfermedad y aumentar la supervivencia de los pacientes, en muchas ocasiones, son tratamientos que generan toxicidades considerables y efectos secundarios indeseables. Todas estas limitaciones de las terapias convencionales, hacen necesario investigaciones contra el cáncer que se esmeren en mejorar la eficacia de los agentes citotóxicos y reducir sus efectos adversos. En este contexto surge el concepto de terapia combinada y se estudia la posibilidad de utilizar, de forma conjunta, la acción de los fármacos antitumorales y la terapia génica, buscando acciones sinérgicas entre ambas estrategias (Prados y cols., 2012).

Se ha estudiado la acción combinada de la apoptina y radioterapia en el tratamiento del carcinoma hepatocelular, mejorando la eficacia de la radioterapia (Han y cols., 2011). Schoop y colaboradores analizaron la respuesta en líneas celulares de cáncer escamoso de cabeza y cuello, resistentes a radioterapia y sensibles a ella, la exposición concurrente a la irradiación y apoptina produjo la liberación del citocromo c mitocondrial y la escisión de la caspasa-3 en ambas, mientras que sólo la irradiación en las células resistentes no lo consiguió, concluyendo que el tratamiento de apoptina representa una forma efectiva para mejorar la radioterapia de los tumores que responden mal a la misma (Schoop y cols., 2010). En líneas celulares de carcinoma nasofaríngeo Fang y sus colaboradores, mostraron que la apoptina en combinación con la terapia

fotodinámica tiene un mejor efecto terapéutico que dichas terapias por separado (Fang y cols., 2012). También se ha podido comprobar el beneficio del uso de apoptina y quimioterapia, se vio el efecto terapéutico combinado con doxorubicina (ADM) y cisplatino (CDDP) sobre el carcinoma hepatocelular en ratones. Siete días después del tratamiento, el volumen medio del tumor en los ratones que recibieron la inyección del adenovirus, que contiene el gen de la apoptina, combinado con ADM y CDDP se redujo significativamente. No se observó ningún efecto adverso del tratamiento en el curso del experimento (Liu y cols., 2010). Apoptina combinada con dacarbazina reveló un efecto citotóxico sinérgico en el tratamiento del melanoma, tanto *in vitro*, como *in vivo*, en ratones (Jin y cols., 2011). El efecto de la combinación de la apoptina y paclitaxel ha sido valorado en líneas celulares de cáncer de próstata, osteosarcoma y cáncer de pulmón (Olijslagers y cols., 2007). En cáncer de próstata se vio igualmente un efecto mejorado de apoptina cuando se combina con inhibidores de la ceramidasa (Liu y cols., 2006).

El gen *gef* fue capaz de mejorar el efecto anti-tumoral de paclitaxel, docetaxel y doxorubicina en cáncer de mama. Las células de cáncer de mama humano MCF-7 transfectadas y no transfectadas con el gen se expusieron a diferentes concentraciones de los citados fármacos. La terapia combinada con *gef* / fármacos causó una disminución en la viabilidad celular. Sin embargo, sólo la combinación *gef*-doxorubicina indujo una mayor mejora en la actividad antitumoral en las células MCF-7. Estos resultados se confirmaron usando esferoides, y observando que la disminución del volumen con la terapia combinada fue mayor que la obtenida usando la terapia génica o la quimioterapia por separado. Esta estrategia combinada supuso un efecto sinérgico significativo, permitiendo así la utilización de bajas dosis de los fármacos para lograr el mismo efecto terapéutico (Prados y cols., 2010). Por otra parte, se evaluó la posibilidad de mejorar el efecto antitumoral del paclitaxel en células de cáncer de pulmón,

combinando el uso de este fármaco con el gen gef, usando la línea celular de cáncer de pulmón, A-549, tanto en cultivos celulares como con la formación de esferoides. Se observó que el uso de paclitaxel en la línea transfectada con el gen gef mejoró el efecto quimioterapéutico del medicamento. El gen gef, por tanto, además de tener un efecto citotóxico en las células de cáncer de pulmón, aumenta la inhibición del crecimiento celular cuando se utiliza con paclitaxel (Prados y cols., 2008). En el mismo sentido, se valoró el efecto citotóxico del gen gef en las células de carcinoma de colon (T-84) con el fin de mejorar el efecto antitumoral de los fármacos quimioterapéuticos utilizados como tratamiento de primera línea. Se encontró que el gen gef inducía una marcada disminución en la viabilidad celular en la línea T-84 y cuando su expresión se combinó con la de los fármacos de elección en el tratamiento del cáncer de colon (5-fluorouracilo, irinotecán y oxaliplatino), se observó un fuerte efecto sinérgico (Ortiz y cols., 2012).

Otro gen, el gen E, codifica una proteína de membrana con un dominio tóxico que conduce a una disminución en la tasa de crecimiento de las células tumorales. La terapia combinada del gen E con 5-FU, ácido fólico (FA) y CPT-11 o 5-FU/FA/Oxaliplatino indujo una inhibición significativa del crecimiento en células de cáncer de colon. Además, el gen E ha mejorado también el potencial de paclitaxel para inducir apoptosis en las células de cáncer de pulmón A-549 (Ortiz y cols., 2010). El efecto de la terapia combinada con el gen E, ha sido estudiado, igualmente, en la línea de cáncer de mama, MCF-7 y en esferoides, utilizando diferentes gradientes de concentraciones de los fármacos paclitaxel, docetaxel y doxorubicina. Se observó una mejora significativa de la inhibición de la proliferación cuando se asociaba la transfección del gen E y el uso concomitante de los fármacos citotóxicos en comparación con los tratamientos individuales (Rama y cols., 2011).

Ma y colaboradores encontraron una actividad antitumoral sinérgica en la combinación de plásmidos que expresan VEGF shRNA y cisplatino a dosis bajas sin toxicidad evidente. La eficacia antitumoral mejorada se asoció con una

disminución de la angiogénesis y el aumento de la inducción de la apoptosis (Ma y cols., 2010). Recientemente, se ha realizado un estudio clínico en fase II evaluando la combinación de cediranib (un inhibidor del VEGF) y fulvestrant (un antagonista de los receptores estrogénicos) en el cáncer de mama hormono-sensible, metastásico. Cediranib más fulvestrant pueden mostrar actividad clínica en esta población, pero cediranib 45 mg no fue lo suficientemente bien tolerado. Se plantea la posibilidad de continuar las investigaciones con dosis más bajas de quimioterapia (Hyams y cols., 2013). La integración de la terapia antiangiogénica con la quimioterapia se ha valorado también en el cáncer de células pequeñas de pulmón, con la formulación de nanopartículas para combinar inhibidores de VEGF y gemcitabina. Se evaluó el efecto antitumoral de la terapia de combinación tanto en modelos de xenoinjertos como con la administración sistémica. La terapia de combinación dio lugar a la inhibición del crecimiento del tumor, con poca toxicidad in vivo (Zhang y cols., 2013).

Kanazawa y colaboradores estudiaron in vitro e in vivo el tratamiento en la línea celular de cáncer laríngeo (HEP-2) y HeLa con un vector adenoviral que codifica la enzima timidina quinasa del virus del herpes simple tipo 1 (AAVtk / GCV), y 4 Gy de irradiación, observando que la irradiación aumentaba los efectos de AAVtk / GCV por cuatro veces en las células HeLa y 15 veces en las células HEP-2. Después de los experimentos in vitro, se evaluó la expresión de los transgenes y la actividad antitumoral de los vectores de AAV en combinación con rayos gamma en ratones desnudos inoculados con células HEP-2 por vía subcutánea. El sistema de AAVtk / GCV suprimió el crecimiento del tumor, y el uso de rayos gamma aumentó la actividad antitumoral por cinco veces (Kanazawa y cols., 2003).

El efecto de la terapia génica suicida en combinación con inmunoterapia antitumoral fue estudiado en un modelo de xenoinjerto de ratón en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Se observó que la apoptosis fue mayor en el grupo que recibió la terapia combinada, en comparación con el grupo tratado

sólo con HSVtk / GCV o sólo con IL-2 (Ambade y cols., 2010). En 2011 se publican los resultados de un estudio clínico de la Fase IB en el tratamiento del glioma maligno asociando cirugía, radioterapia, temozolomida y AdV-tk. Los pacientes con glioma maligno recibieron AdV-tk en 3×10^{10} , 1×10^{11} , o 3×10^{11} partículas de vector (VP) mediante inyección en el lecho del tumor en el momento de la cirugía, seguidos de 14 días de valaciclovir. La radiación se inició dentro de 9 días después de la inyección AdV-tk. La temozolomida se administró después de completar el tratamiento con valaciclovir. Fueron tratados trece pacientes y doce completaron la terapia. Actualmente la fase II del estudio esta en desarrollo (Chiocca y cols., 2011).

Se trataron líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), con un promotor (insulinoma-1, INSM1) con el que poder dirigir diferentes sistemas: levadura citosina desaminasa-uracilo fosforribosil transferasa (YCD-YUPRT) en combinación con el profármaco 5-fluorocitosina (5-FC) o *Escherichia coli* nitrorreductasa (NTR) junto con el profármaco bromomustard SN27686. Se encontró que la actividad del promotor de INSM1 cambiaba o aumentaba en las células de SCLC quimiorresistentes y xenoinjertos en comparación con variantes sensibles a la quimioterapia. Por otra parte, se observó que la combinación de la terapia INSM1, YCD-YUPRT/5-FC y la quimioterapia, así como la combinación de INSM1, YCD-YUPRT/5-FC y la terapia NTR/SN27686, fue superior a la respuesta de los agentes terapéuticos por separados en las células de SCLC quimiorresistentes (Michaelsen y cols., 2012).

Zaoui y sus colaboradores han diseñado un virus del sarampión (MV) oncolítico dirigido al factor de crecimiento epidérmico, EGFR, armado además con la enzima bifuncional citosina desaminasa / uracilo fosforribosiltransferasa (CD / UPRT). CD / UPRT convierte la 5-fluorocitosina (5-FC) en el quimioterapéutico 5-FU, un pilar en la quimioterapia del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC). En ratones portadores de xenoinjertos de

HNSCC, la administración intratumoral de MV-antiEGFR dio como resultado un retraso en el crecimiento del tumor y la prolongación de la supervivencia. Se concluye que la “quimioviroterapia” con EGFR y CD / UPRT MV es muy eficaz en entornos preclínicos, con implicaciones directas para la traslación a la Fase I de ensayos clínicos prevista de MV para el tratamiento locorregional del cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (Zaoui y cols., 2012).

II. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo de investigación han sido:

1. Construir vectores retrovirales de expresión inducible en células eucariotas que integren correctamente los genes *gef* y *apoptina* con el objetivo de *expresarlos de forma controlada en un modelo experimental "In vitro"*.
2. Optimizar las condiciones adecuadas de transducción del vector inducible con el inserto *gef* y/o *apoptina* y valorar su expresión en células tumorales con el objeto de *analizar sus posibilidades como terapia génica antitumoral* usando la línea DLD1 de carcinoma de colon.
3. Analizar los efectos de la expresión controlada de los genes *gef* y/o *apoptina* en las células tumorales valorando los cambios en sus características biológicas: *proliferación, morfología y ciclo celular*.
4. Estudiar el principal mecanismo de acción mediante el cual los genes *gef* y/o *apoptina* ejercen su actividad tumoral.
5. Determinar el efecto potenciador que la terapia génica, con los genes *gef* y/o *apoptina*, ejerce sobre agentes antitumorales clásicamente usados en el tratamiento del cáncer de colon, y seleccionar la terapia combinada *gef* y/o *apoptina*-citotóxicos más eficaz para el tratamiento de este tipo de tumor.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. LÍNEAS CELULARES

Los estudios han sido realizados con la línea DLD1 de carcinoma colorrectal que fue obtenida del Servicio de Inmunología del Hospital Virgen de las Nieves (Granada, España) La línea celular empaquetadora de vectores virales PT67 fue comprada a Clontech, Palo Alto, California, EEUU.

2. CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES

El cultivo de las células se realizó en frascos de cultivo (Falcon) de 260ml con 75cm² de superficie útil o de 50 ml de 25cm² de superficie útil, que se mantuvieron en estufa a 37°C, atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad. Todas las manipulaciones de las líneas se realizaron trabajando en campana de flujo laminar (Micro-V, Telstar, España), y utilizando materiales y soluciones estériles.

Las líneas celulares DLD1 y PT67 fueron cultivadas con medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Eagle modified Eagle Medium, Sigma, St. Louis, MO, EEUU) suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (FBS) (Sigma), 2% de L-glutamina, 2.7% de bicarbonato sódico, 1% de tampón HEPES, 40 mg/l de gentamicina y 500 mg/l de ampicilina.

3. MANTENIMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES

3.3.1 Cambio de medio

El medio de cultivo fue cambiado de acuerdo con su acidificación (color amarillo), siempre antes de que se alcanzase una coloración inadecuada.

3.2 Lavado de las células

Esta operación se realizó antes de la congelación, de la división del cultivo celular, antes de realizar experimentos y antes de algunos cambios de medio si se apreciaba algún resto en el medio de cultivo. Se añadieron unos 20ml de PBS estéril a las células y se centrifugan a 200g durante 5 minutos, posteriormente se retira el sobrenadante

3.3 División del cultivo celular

Antes de que los cultivos alcanzaran una saturación inadecuada, las células fueron divididas. Para ello, las células adheridas al frasco de cultivo fueron despegadas añadiendo una solución de PBS-EDTA al 0.04%, se incubaron durante 10 minutos a 37°C. Se golpeó suavemente, varias veces el falcon, para que las células se despegaran adecuadamente, ya que el EDTA secuestra el Ca⁺⁺, necesario para la adhesión celular. Las células despegadas en la solución de PBS-EDTA se volcaron en frascos de 25ml estériles, se añadió PBS para contrarrestar el efecto del EDTA y fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado, el botón celular resuspendido en nuevo medio de cultivo y finalmente se pasó a dos nuevos frascos de cultivo, de tal forma que el cultivo quedó duplicado.

4. CONGELACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES

Las células, una vez despegadas de la superficie de los frascos de cultivo como se ha descrito anteriormente, fueron centrifugadas en frascos de 25 ml

estériles a 1500 rpm durante 5 min. y fueron lavadas 2 veces con PBS. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en medio de congelación a razón de 0.5×10^6 células por ml. A continuación fueron dispensadas en criotubos e introducidas inmediatamente en congelador a -80°C donde permanecieron 24 h, siendo almacenadas después definitivamente en nitrógeno líquido.

Medio de congelación: suero fetal bovino (Sigma), inactivado en calor húmedo a 56° durante 30 minutos y dimetil sulfoxido (DMSO) al 10%.

5. DESCONGELACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares (en criotubos y almacenadas en nitrógeno líquido), fueron descongeladas en calor húmedo a 37°C . Tras ello, en la cabina de flujo laminar, las células se pasaron a un frasco de 25ml o de 15 ml estéril al que se añadió medio de cultivo siendo centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante, se lavó con PBS y el botón celular fue resuspendido en nuevo medio de cultivo y depositadas en un frasco de cultivo celular.

6. CONTAJE CELULAR

Tras despegar y centrifugar las células, como se ha descrito previamente, el pellet se resuspende en medio de cultivo. Para conocer la densidad del cultivo se precisó de la ayuda de una cámara de Neubauer o celdas de conteo. Se contarán las células que aparecen en cada cuadrante de la cámara, se dividirá ese número entre cuatro, se multiplica por 10.000 y por el factor de dilución de la muestra que tomemos para contar.

7. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES RETROVIRALES DE EXPRESIÓN EN EUKARIOTAS CON LOS GENES *gef* Y/O *apoptina*

Para la construcción de los vectores se usó el sistema “BD RevTet-On” que incluye los vectores pRevTet-On y pRev-TRE, y la línea celular RetroPack PT67, comprados a Clontech, Palo Alto, California, EEUU. El gen *apoptina* fue cedido por el Dr. Mahvash Tavassoli, del Instituto Rayne, King’s College, London, y el gen *gef* fue cedido por el Dr. J.L. Ramos, de la Estación experimental del Zaidín del CSIC, Granada, España.

El plásmido pRevTRE fue digerido con las endonucleasas de restricción BamH I y Hind III y sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (la preparación de los genes se explica más adelante). Posteriormente la banda obtenida fue purificada utilizando el Kit Gene-clean.

Mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que se describirá más adelante, y con la utilización de los primers adecuados (se exponen posteriormente), se obtuvo una amplificación de 170 pb correspondiente al gen *gef* y 473 pb correspondientes al gen *apoptina*, que clonamos en el plásmido pRevTRE. El vector y el inserto se sometieron a una reacción de ligación de extremos cohesivos. El corte con las mismas enzimas de restricción, permitió la orientación adecuada de los insertos. Para ello se mezclaron en un eppendorf los siguientes componentes: 6 µl del inserto, 6 µl del vector ambos digeridos y purificados, 1 µl de buffer de ligación (10x), 1 µl de la enzima ligasa (10 U/µl) (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) y, por último, 0.5 µl de agua. Se incubó 8-24 h a 15°C y se congeló a -20°C para su conservación y posterior transformación de las bacterias. La presencia de los insertos en el plásmido se determinó por RT-PCR, utilizando los primers para *gef* y *apoptina* adecuados (la técnica y los primers se describen más adelante). Con los productos de ligación se

transformaron bacterias *Escherichia Coli* competentes y, posteriormente, se procedió a la extracción de los plásmido, lo que nos permitió obtener las cantidades necesarias para las experiencias de transfección en la línea PT-67.

8. TRANSFECCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS A LAS CÉLULAS.

Las células empaquetadoras fueron sembradas en placas de 6 pocillos. Uno de los pocillos se dejó sin transfectar sirviéndonos de control. Cuando tuvieron una confluencia del 60%, las células fueron lavadas dos veces con DMEM e incubadas con 2ml de medio antes de la transfección con 10µg de pRevTRE-gef, que contenía el ADNc de *gef*. En otra placa se realizó el mismo proceso para la transfección con pRevTRE-apoptina. El método utilizado para la transfección fue por liposomas (Life Technology, Gibco BRL). Tras 6 horas de la transfección, se realizó un cambio de medio y se inició la selección de los clones con pRevTRE-gef y pRevTRE-apoptina mediante higromicina (0.4 mg/ml). La selección duró dos semanas. La segunda semana la dosis de higromicina se bajó a la mitad.

Las células DLD1 se sembraron igualmente en placas de 6 pocillos y cuando alcanzaron una confluencia del 60% fueron transfectadas con pRevTet-On, mediante liposomas, usando FuGENE™6 Transfection Reagent (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Los clones de pRev Tet-On fueron seleccionados añadiendo al medio geneticina (1mg/ml). Se mantuvieron con estas concentraciones de antibióticos una semana y después se redujo las dosis a la mitad y se trataron durante una semana más. A la línea celular obtenida la llamamos DLD1/Tet-On.

En ambos casos para mejorar la transfección, se añadió polybrene con una concentración final de 4µg/ml (filtrado, con filtros de 0.45 µm y sin nitrocelulosa).

En ambos casos, tras la selección, las colonias que quedaron en cada pocillo se dejaron crecer y posteriormente se recogieron, despegándolas con PBS-EDTA, se centrifugaron y se resuspendieron en medio de cultivo para pasarlas a un falcon de 25cm².. Posteriormente fueron nuevamente despegadas para poder ponerlas en un frasco de cultivo mayor y congelar.

9. OBTENCIÓN DE LÍNEAS ESTABLES DLD1/TET-ON-GEF, DLD1/TET-ON-APOPTINA, DLD1/TET-ON-GEF-APOPTINA.

Una vez que se tuvieron suficientes células empaquetadoras portadores de los genes *gef* o *apoptina*, se procedió a infectar a las células DLD1/Tet-On con los vectores retrovirales contenidos en el medio de cultivo de dichas células empaquetadoras.

Las células DLD1/Tet-On se sembraron en 2 placas de 6 pocillos, cuando alcanzaron una confluencia de un 60% aproximadamente, se les añadió un ml de medio de cultivo y otro ml del medio de cultivo recogido de los falcons de las células pT67-pRevTRE-gef, sin haber sido congelado antes, añadiéndole al medio polybrene con una concentración final de 4µg/ml (siempre previamente filtrado). Uno de los pocillos de la placa de 6, no fue infectado, de forma que se utilizó como control en la posterior selección con higromicina. La placa fue centrifugada durante 30 minutos a 1500 rpm. Pasadas de 4 a 6 horas se cambió el medio. El proceso se repitió de tres a seis veces para mejorar la infección. Tras dos días de la infección, se inició la selección, utilizando para ello higromicina (0.4mg/ml) durante una semana. Después se continuó una semana más con higromicina a mitad de dosis. Tras este tiempo se pudo observar que el pocillo control alcanzó el

máximo de confluencia y en el resto de pocillos sólo quedaban algunas colonias. Se pasó a medio de cultivo habitual y se dejaron crecer, para posteriormente despegarlas, y pasarlas, previo lavado, a un frasco de cultivo de 25cm. A las células las llamamos DLD1/Tet-On-gef. Posteriormente las células se congelaron en criotubos y parte de ellas se comenzaron a cultivar en frascos de cultivo de 75cm².

De la misma manera se realizó la infección para conseguir la línea DLD1/Tet-On-apoptina.

Para obtener la línea DLD1/Tet-On-gef-apoptina, se realizó siguiendo el mismo proceso pero haciendo la infección sobre la línea DLD1/Tet-On-gef, con el medio de cultivo de las células PT67-pRevTRE-apoptina.

10. INDUCCIÓN DE LAS LÍNEAS INFECTADAS

Para la inducción de los genes *gef* y *apoptina* se utilizó Doxiciiclina (Dox) (Sigma). Previamente realizamos un estudio de proliferación con dosis crecientes de Dox para determinar el nivel de tolerancia de la línea DLD1 salvaje al antibiótico. Con concentraciones crecientes desde 1 a 4.5 µg/ml. Como se explica en el apartado de resultados, no se objetivaron cambios en la proliferación. La dosis usada para la inducción de la expresión de los genes fue de 2µg/ml.

11. EXTRACCIÓN DE ARN DE CÉLULAS EUCARIOTAS.

Se obtuvo ARN total de las células DLD1, DLD1/Tet-On-gef, DLD1/Tet-On-apoptina y DLD1/Tet-On-gef-apoptina. El ARN en las células infectadas fue obtenido tras 24 horas de inducción con Dox. La extracción del ARN se realizó

mediante Micro RNA Isolation Kit (Promega, Madison, WI). La extracción de ARN se realizó a partir de cultivos de 10^5 - 10^6 células.

Las células se lavaron con PBS frío dos veces y posteriormente fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 10 min. y se recogió el pellet celular. Los pellet celulares se resuspendieron en 1 ml de PBS y se llevaron a un eppendorf en el cual se les añadió 300 μ l de solución de desnaturalización, 2.16 μ l de Naha 2 M, 60 ml de cloroformo, se mezclaron y se centrifugaron durante 5 min. (13-14000 rpm). Se transfirió la fase transparente (superior) a otro eppendorf estéril con cuidado para no arrastrar la interfase. Se le añadieron 300 μ l de isopropanol, se mezcló bien y se dejó reposar 30 min. a -20°C . Se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet con 600 μ l de la mezcla del etanol al 75% y DEPC H₂O al 25%. Se volvió a retirar el sobrenadante y se secó el pellet al vacío durante 5 min. Finalmente, se resuspendió el ARN en 50 μ l de agua bidestilada y se guardó a -20°C .

Un μ g de ARN fue chequeado mediante electroforesis a 80 V durante en un gel de agarosa al 1%. La visualización del ARN por transiluminador de ultravioletas (Bio-Rad) nos permitió comprobar que no se encontraba degradado. Su concentración fue estimada mediante espectrofotómetro.

12. TRANSCRIPTASA REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

12.1 Transcriptasa reversa...

Utilizando el ARN total obtenido previamente, se realizó la transcriptasa reversa mediante kit Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI). Cada tubo de reacción contenía un volumen total de 20 μ l compuestos de:

- ARN total (1 μ g).
- Tampón de transcriptasa reversa 10x (2 μ l).
- Proteína inhibidora de RNAsa (0,5 μ l).
- d NTP (mezcla 10mM) (2 μ l)
- oligo(dT) o Random primer (Random hexámeros) 1 μ l
- $MgCl_2$ (4 μ l).
- Enzima Transcriptasa reversa (AMV, Avian Myeloblastosis Virus reverse transcriptase) (1 μ l). (Añadiéndola al final).
- Agua hasta 20 μ l.

Los eppendorf fueron puestos en el termociclador con un programa con un primer paso de 42°C 15 minutos, un segundo paso de 95°C 5 minutos, tercer paso 3°C 5 minutos.

12.2 Reacción en cadena de la polimerasa.

El resultado de la transcriptasa reversa fue utilizado para realizar la reacción en cadena de la polimerasa, se utilizaron 5 μ l. Fue llevada a cabo con el kit GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI).

Cada tubo de reacción contenía:

- Resultado de la transcriptasa reversa (5 μ l).
- Primers 0.25 μ l de cada uno
- GoTaq Green Maxter Mix 12.5 μ l

- Agua libre de nucleasas hasta un volumen de 25 µl

Los primers utilizados para la determinación del gen *gef* fueron:

Gef 1: 5' gaagcagcataaggcgatg-3'
Gef 2: 5' ccgccgttgctcttactc 3'

Con temperatura 51°C ambos.

La preparación pasó al termociclador con el programa:

- 1.- 94°C: 5 minutos
- 2.- 94°C: 1 minuto
- 3.- 51°C: 1 minuto
- 4.- 72°C: 1 minuto
- 5.- 32 ciclos
- 6.- 72°C: 7 minutos
- 7.- 4°C: hasta retirada de la muestra del termociclador.

Los primers utilizados para determinar la presencia del gen *apoptina* fueron:

Apoptina 1: 5' gaacgctctccaagaagatac 3'
Apoptina 2: 5' attaccactactcccagccg 3'

Con temperaturas de 48° y 51°C.

La muestra pasó al termociclador con el programa:

- 1.- 94°C: 5 minutos
- 2.- 94°C: 1 minuto
- 3.- 48.9 °C: 1 minuto
- 4.- 72°C: 1 minuto
- 5.- 32 ciclos
- 6.- 72°C: 7 minutos
- 7.- 4°C: hasta retirada de la muestra del termociclador.

Previamente habíamos realizado una PCR con gradiente de temperatura para optimizar la temperatura para estos primers.

Los productos de la PCR fueron chequeados en gel de agarosa al 2% (como se describe a continuación) poniendo de manifiesto la amplificación del fragmento de 170 pb correspondiente al gen *gef* y la del fragmento de 473 pb correspondiente al gen de la *apoptina*.

Se realizó otra PCR con los primers de β actina, para corroborar la adecuada integridad de todas las muestras. Los primers de β actina humana fueron:

β actina 1: 5'atcatgtttgagaccttcaa 3'

β actina 2: 5'catctcttgctcgaagtcca 3'

Las muestras pasaron al termociclador con el programa:

- 1.- 94°C: 5 minutos
- 2.- 94°C: 0:35 minutos
- 3.- 45°C: 0:30 minutos
- 4.- 72°C: 0:35 minutos
- 5.- 25 ciclos
- 6.- 72°C: 7 minutos
- 7.- 4°C hasta retirada de la muestra del termociclador.

Los productos fueron chequeados en gel de agarosa al 2% (como se describe a continuación). La banda correspondiente a β -actina fue de 316 pb.

12.3 Preparación del gel de agarosa

Preparamos el gel de agarosa al 2% (para los genes *gef* y *apoptina*) y del 0.8% (para el plásmido). Para el gel al 2% se disolvieron 5 gr de agarosa, se añadieron 5 ml de TAE al 50x y se enrasó hasta 250ml con agua bidestilada. La agarosa se disolvió calentándola hasta la ebullición. Se dejó enfriar. Una vez se

hubo enfriado, se le añadieron 30 μ l de bromuro de etidio. Se mezcló suavemente y se vertió sobre un porta-geles con peine donde se dejó solidificar. Una vez solidificado se retiró el peine, dejando visibles los pocillos de carga. Para preparar el gel al 0.8% se disolvieron 2 gr de agarosa en 5ml de TAE al 50x, y se enrasó hasta 250ml con agua bidestilada. Igualmente la agarosa fue disuelta mediante ebullición y tras enfriar se añadieron 30 μ l de bromuro de etidio.

Por último se colocó el gel de agarosa en el interior del aparato de electroforesis que contenía ya la cantidad suficiente de buffer de electroforesis (1 x TAE) para cubrir el gel.

Tampón concentrado de electroforesis (50 x TAE): Tris-acetato 2 M y EDTA 0.05 M, pH 8. Para su utilización en la electroforesis se diluye 50 veces.

12.4 Electroforesis

Se colocó el gel de agarosa en el interior del aparato de electroforesis que contenía ya la cantidad suficiente de buffer de electroforesis (TAE 1x) para cubrir el gel. Se cargó el marcador de peso molecular (Hyperladder II), y nuestras muestras, cada una en un pocillo. Una vez realizada la carga de las muestras se inició la electroforesis con 50-100 V. Cuando el frente terminó de avanzar se paró el proceso de electroforesis, se retiró el gel de la cubeta y se analizó en el transiluminador de ultravioleta (Bio-Rad), que nos permitió visualizar las bandas de ADN y compararlas con el peso molecular.

13. ESTUDIO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Las células DLD1, DLD1/Tet-On-gef, DLD1/Tet-On-apoptina, y

DLD1/Tet-On-gef-apoptina (2.5×10^3) fueron cultivadas en placas de 6 pocillos bajo las condiciones descritas anteriormente. Tras 24 horas de cultivo se cambió el medio y se añadió 0.2 $\mu\text{g/ml}$, de Dox para inducir la expresión de los genes. Las células pertenecientes a los grupos control, DLD1, fueron tratadas con y sin Dox, de esta forma volvíamos a verificar que Dox no tuviese efecto en el crecimiento celular de nuestra línea control. El medio se cambió cada dos días hasta el final del experimento. El experimento se realizó por cuadruplicado. La curva de proliferación se obtuvo mediante la fijación de las placas en los días 0, 2, 4, 6, 8 y 10 del tratamiento. El proceso fue el siguiente:

1. Se fijaron las células con ácido tricloroacético al 10% frío y se incubó durante 30 min. a 4°C, lavándose a continuación con agua destilada y dejándolo secar.
2. Las células así fijadas se tiñeron, durante 20 min. con sulforrodamina (SRB) al 0,4% en ácido acético al 1%.
3. Posteriormente, se lavó el tapiz con ácido acético al 1% y se dejaron secar de nuevo las placas.
4. El colorante, fijado sobre las células, se solubilizó con una solución 10 mM Tris-base (pH 10.5) con agitación suave.
5. Alícuotas de 100 μl se transfirieron a placas de 96 pocillos y se leyeron en un colorímetro Titertek multiscan (Flow, Irvine, California) a 492 nm. La recta de calibrado para el ensayo con SRB se realizó para cada pase de células DLD1 antes de cada experimento de proliferación celular.

14. ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA (APOPTOSIS)

Se utilizó el kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (Pharmingen, San Diego, CA, EEUU) para la detección de apoptosis mediante citometría de flujo. Las células (1×10^6) DLD1, DLD1/Tet-On-gef, DLD1/Tet-On-apoptina, y DLD1/Tet-On-gef-apoptina se colocaron en frascos de cultivo de 75 cm^2 y se cultivaron toda la noche. Seguidamente se incubaron con Dox, a la concentración indicada previamente, durante 2 y 6 días. Las 4 líneas celulares fueron despegadas con PBS-EDTA, lavadas dos veces con PBS frío y centrifugadas a 500g durante 10 min. A continuación fueron resuspendidas en 100 μl de la solución de binding buffer (10 mM hepes, pH 7.1; 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1.8 mM CaCl_2), teñidas con anexina V (1 μl de anexina V-FITC (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 10 μl de binding buffer, 10 μl yoduro de propidio (PI) (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 79 μl H_2O e incubadas en oscuridad durante 15 min. a temperatura ambiente. Al cabo de ese tiempo, se les añadió 500 μl de la solución binding buffer y las células (10 000 por muestra) fueron inmediatamente procesadas con citometría de flujo (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU).

15. ESTUDIO DEL CICLO CELULAR.

Las células cultivadas en monocapa fueron despegadas, tras 2 y 6 días de inducción con Dox. Fueron lavadas dos veces con un tampón simple (100 mg glucosa; 100 ml PBS sin Ca^{2+} , Mg^{2+}) y fijadas con etanol frío al 70% durante una semana. A continuación, las células fueron centrifugadas para eliminar el etanol a 2500 rpm durante 5 minutos y lavadas una vez con un tampón simple. Se resuspendieron en una solución de Ioduro de Propidio (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IP, 0.5 mg/ml RNasa en tampón simple, pH 7.4) durante 30 min. en oscuridad. Los datos de 10 000 células por muestra fueron recogidos y analizados con el programa Cellfit de FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU).

16. ESTUDIO MORFOLÓGICO

16.1 Microscopía óptica.

Las células DLD1, DLD1/Tet-On-gef, DLD1/Tet-On-apoptina y DLD1/Tet-On-gef-apoptina fueron observadas mediante microscopio invertido de contraste de fase Nikon TM Phase Contrast-2, ELWD 0.3. Las células transducidas fueron observadas por microscopía óptica desde el inicio de la selección hasta posteriormente su inducción con Dox.

16.2 Microscopía electrónica de barrido.

Las células, fueron lavadas dos veces con PBS, y fueron sembradas en cristales cortados con un lápiz de punta de diamante, de 1cm de diámetro aproximadamente. Los cristales fueron esterilizados y cada cristal se colocó en un pocillo de placas de 24 pocillos, utilizando para ello pinzas esterilizadas previamente. Se sembraron 1.5×10^3 células sobre cada cristal. Después de 6 días de tratamiento con Dox fueron fijadas en una mezcla de glutaraldehído al 1.5% y paraformaldehído al 1% en tampón de cacodilato sódico (0.1 M), durante 24 horas a 4°C. Posteriormente se lavaron con el tampón, 3 cambios de 15 min. Las células fijadas y lavadas fueron llevadas al Servicio de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, donde se encargaron del procesamiento de las muestras. Una vez procesadas se observaron en Microscopio Electrónico de Barrido (Hitachi, S-510 y AURIGA de Carl Zeiss SMT).

16.3 Microscopía electrónica de transmisión

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos, 2.5×10^3 por pocillo. Tras 6 días de inducción con Dox se le hicieron dos lavados con PBS y se

fijaron con una mezcla de glutaraldehído al 1.5% y paraformaldehído al 1% en tampón de cacodilato sódico (0.05 M) durante 2 h a 4°C. Posteriormente se lavaron con el tampón (0.1 M), 3 cambios de 15 minutos. Las muestras fueron entregadas en el Servicio de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, donde se terminaron de procesar. Posteriormente se analizaron en Microscopio Electrónico de Transmisión (LEO 906E Zeiss).

17. ESTUDIO DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL MEDIANTE JC-1

Se usó la sonda *dual-emission potential-sensitive*, 5', 6', 6'-tetra-cloro-1, 1', 3, 3'-tetraetil-imidacarbocianina iodida (JC-1) para medir el potencial mitocondrial de membrana ($\Delta\psi_m$). JC-1 es un monómero verde fluorescente a bajo potencial de membrana, que forma agregados rojo fluorescentes promovido por un elevado potencial de membrana. La proporción de fluorescencia roja /verde de JC-1 depende únicamente del potencial de membrana e indica la despolarización de la misma. Las células fueron lavadas dos veces con PBS frío, incubadas con 2 mg/L de JC-1 a 37 °C durante 20 min. y analizadas por citometría de flujo (Becton Dickinson, San Jose, CA, EEUU) con unos valores de excitación y emisión de 485 y 535 nm, respectivamente.

18. WESTERN- BLOT.

El inmunoblotting o western-blot se realizó por modificación de la técnica descrita por Towbin y cols. (1979).

18.1 Extracción de proteínas

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos, y se realizó la extracción de proteínas pasadas 48 horas de inducción con Dox y con un 90% de confluencia.

La solución de extracción de proteínas se preparó en tres pasos: Se elaboró una primera solución con 100ml de agua bidestilada, 6,05g de TRIS y 0.4g de SDS, ajustando el pH a 6.8. De esta solución se tomaron 12.5 ml a los que se añadieron 2g de SDS, calentando en el baño a 37°C antes de añadir el SDS para favorecer la disolución de los solutos., 10ml de glicerol y 0.5mg de Azul de bromofenol llevándolo a un volumen total de 25ml con agua bidestilada. Esta solución se alicuota en volúmenes de 800 µl y se pudo guardar a -20°C. La preparación de la solución de extracción final consiste en tomar 800 µl de la segunda solución realizada (tomar una de las alícuotas), y añadirle 250 µl de 2-β-mercaptoetanol, llevándolo a un volumen total de 5ml añadiendo para ello agua bidestilada. Añadimos 100µl de esta solución a cada pocillo y removimos con la punta de la pipeta hasta que se formó un agregado viscoso que recogimos en eppendorf. Las muestras se pudieron almacenar a -20°C. Antes de usarlas para el estudio de las proteínas de interés, hubo que hervirlas a 96°C durante 10 minutos para facilitar la acción del SDS y se agitaron con vortex.

18.2 Preparación de geles de acrilamida.

Se prepararon dos geles, el inferior y el superior. Comenzamos preparando el inferior y mientras solidificaba preparamos el gel superior La cantidad de cada producto dependía de las características del gel que se buscara. En la siguiente tabla se indican las cantidades de cada componente para la preparación de dos geles.

Gel inferior	7.5 %	10%	12%	15%
Acrilamida 30%	2.3 ml	3.1 ml	3.7 ml	4.6 ml
Running buffer 4x	2.3 ml	2.3 ml	2.3 ml	2.3 ml
SDS 10%	90 μ l	90 μ l	90 μ l	90 μ l
Glicerol 50%	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml	0.9 ml
Agua	3.5 ml	2.7 ml	2.1 ml	1.2 ml
APS 10%	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED	10-25 μ l	10-25 μ l	10-25 μ l	10-25 μ l

Tabla 8: Componentes necesarios para la preparación de los geles inferiores de acrilamida para WB.

Gel superior	Para preparar dos geles
Acrilamida 30%	0.8 ml
Stacking buffer 4x	2ml
SDS 10%	80 μ l
Agua	5.12 ml
APS 10%	100 μ l
TEMED	20 μ l

Tabla 9: Componentes necesarios para la preparación de los geles superiores de acrilamida para WB

El APS y el TEMED deben añadirse siempre al final para evitar una solidificación antes de terminar de añadir todos los componentes de los geles.

Running buffer 4x: 18.5g TRIS disueltos en 80 ml de agua, ajustando pH a 8 y después completando hasta 100ml con agua.

Stacking buffer 4x: 6g de TRIS disueltos en 80 ml de agua, ajustando el pH a 6.8 y después enrasando a 100ml con agua.

En nuestro trabajo se realizaron los geles al 15%.

Una vez solidificados los geles se retiraron los peines que dejaban ver los pocillos en los que se podían cargar las muestras. Se cargaron 20 µl de muestra utilizando pipeta de precisión. Se reservó un pocillo para cargar el peso molecular (Precision Plus Protein Standards. Kaleidoscope. Bio-Rad). Se inició la electroforesis con un equipo de electroforesis vertical Mini-Protean II Slab Cell (Bio-Rad). Los geles fueron corridos a entre 60 y 100 V.

Tampón de electroforesis: 5x: 15 g de Tris, 72 g de glicina y 5 g de SDS, llevados a 1000ml con agua. Para pasarlo a 1x tomamos 200ml del tampón 5x y los llevamos con agua hasta 1000ml. PH 8.3

18.3 Transferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa.

Una vez que se corrió el gel, se cortó y se retiró el gel superior. Tras ello se retiró uno de los cristales y se colocó sobre la superficie del gel la nitrocelulosa, finalmente se retiró el otro cristal y se colocó sobre papel Whatman (Sigma SL), recortado según el tamaño del gel, creando el “sándwich” de transferencia: papel Whatman- gel-membrana de nitrocelulosa-papel Whatman, el cual se colocó en la cubeta de transferencia y se cubrió con tampón de transferencia. Se inició la transferencia a 20V durante 45 minutos. Terminada la transferencia las membranas fueron teñidas con rojo Ponceau para corroborar la eficacia de la misma. Posteriormente se lavaron hasta desteñirlas con PBS. Tras ello se procedió al bloqueo de las membranas de nitrocelulosa utilizando leches desnatada al 5% en PBS o TBS durante 1 hora en agitación, de esta forma se evitaron las uniones inespecíficas con las proteínas. Posteriormente se hicieron tres lavados de 5-10 minutos en agitación con leche al 5% y PBS o TBS dependiendo del anticuerpo a usar. Finalmente se pusieron los anticuerpos primarios. Las membranas se dejaron con estos anticuerpos en agitación durante la noche.

Tampón de transferencia: Tris 5,82 g, glicina 2,9 g, SDS 10% 937 ml enrasando con agua hasta 800ml. Se realizaron alícuotas de 200ml y antes de usarlo se añadieron 50 ml de Metanol. Los cálculos son para 4 geles (25 mM de Tris, 192 mM de glicina y 20% de metanol, pH 8.3).

18.4 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados fueron:

- p53 fosforilado, anticuerpo monoclonal IgG de ratón, 1:200 en leche al 5% en PBS (p-p53 (FP3.2): sc- 51690, Santa Cruz Biotechnology)
- Caspasa 8, anticuerpo monoclonal IgG de ratón, 1:200 en leche al 5% en PBS (caspase-8 (8CSP03): sc-56070, Santa Cruz Biotechnology).
- Caspasa 3, anticuerpo policlonal de conejo, 1:1000 en leche al 5% en TBS (Cell Signaling, 9662)
- Caspasa 9, anticuerpo monoclonal IgG de ratón, 1:100 en leche al 5% en PBS. (Caspase-9 p35 (A-): sc- 133109, Santa Cruz Biotechnology)
- Citocromo-c, anticuerpo monoclonal IgG de ratón 1:200 en leche al 5% en PBS (cytochrome c (7H8): sc- 13560, Santa Cruz Biotechnology)
- Bax, anticuerpo IgG policlonal de conejo 1:100 en leche al 5% en PBS (Bax (N-20): sc- 493, Santa Cruz Biotechnology)

Se realizaron tres lavados de 10 minutos en agitación con PBS o TBS (según el tipo de anticuerpo) y se puso el anticuerpo secundario correspondiente durante una hora en agitación. Tras ello se realizaron nuevamente tres lavados de 10 minutos en PBS o TBS y se pasó al revelado de las membranas y análisis con el programa Image Reader LAS- 4000.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: IgG anti ratón (A9044,

Sigma) e IgG anti conejo (A0545, Sigma).

Finalmente para valorar la integridad de todas las muestras se analizó la β -actina, con un anticuerpo monoclonal anti- β -actina (A2228, Sigma).

19. AGENTES CITOTÓXICOS

19.1 Agentes citotóxicos empleados.

Los estudios se llevaron a cabo con 5 Fluorouracilo, Oxaliplatino e Irinotecán. Los fármacos fueron cedidos por el Servicio de Farmacología del Hospital Clínico San Cecilio de Granada.

Todos los fármacos fueron llevados a una dilución de 1mg/ml y filtrados bajo cabina de flujo laminar (Micro-V, Telstar, España) con filtros estériles de 0.22 μ m (Millipore, Francia). 5FU se diluyó con DMSO, Oxaliplatino e Irinotecán con PBS:

19.2 Cálculo de la IC 50

Desarrollamos un estudio para la determinación de la concentración de cada fármaco, en cada línea celular, que consiguiera inhibir el 50% del crecimiento celular (IC 50).

Las células DLD1/Tet-On-gef, DLD1/Tet-On-apoptina y DLD1/Tet-On-gef-apoptina, se sembraron, 2.5×10^3 de cada línea celular por pocillo, en placas de 24 pocillos. Se sembró una placa como control para cada línea celular. Las concentraciones que se pusieron de cada fármaco fueron:

- Para 5FU: 0.83 μ M, 1.66 μ M, 2.49 μ M, 3.32 μ M, 4.15 μ M, 4.98 μ M, 5.81 μ M, 6.64 μ M, 7.47 μ M, 8.3 μ M, 9.13 μ M y 10 μ M.
- Para Oxaliplatino: 0.5 μ M, 1.36 μ M, 2.22 μ M, 3.08 μ M, 3.94 μ M, 4.8 μ M, 5.66 μ M, 6.52 μ M, 7.38 μ M, 8.24 μ M, 9.1 μ M y 10 μ M.
- Para Irinotecán: 0.5 μ M, 1.36 μ M, 2.22 μ M, 3.08 μ M, 3.94 μ M, 4.8 μ M, 5.66 μ M, 6.52 μ M, 7.38 μ M, 8.24 μ M, 9.1 μ M y 10 μ M

Después de 48 horas, tras su siembra, se realizó cambio de medio y se puso la primera dosis de fármaco, a las diferentes concentraciones referidas. A las 72 horas se volvió a hacer cambio de medio y se puso la segunda dosis de fármaco. Tras 6 días de tratamiento se fijaron las células con ácido tricloroacético al 10% frío y se incubaron durante 30 min a 4°C, lavándose a continuación con agua destilada y dejándolas secar. Posteriormente se tiñeron con SRB al 0.4% en ácido acético al 1% durante 20 minutos, tras ello se lavaron con ácido acético al 1% y se dejaron secar. Finalmente se solubilizó el colorante con solución 10mM Tris-base (pH 10.5) con agitación suave, y por último, se transfirieron de 100 μ l en 100 μ l a placas de 96 pocillos para poder ser leídas en un colorímetro Titertek multiscan (Flow, Irvine, California) a 492 nm.

Para corroborar, que en el caso del 5FU, el DMSO no interfiriera en nuestros resultados, se hizo un estudio, sembrando el mismo número de células, en las mismas condiciones y añadiendo a las medias concentraciones crecientes de DMSO, hasta la máxima utilizada en el experimento (necesaria para la dilución del fármaco). No se obtuvieron alteraciones en la proliferación de las células con las cantidades usadas de DMSO.

El método que seguimos para determinar la IC₅₀ fue interpolación lineal. Concretamente, se consideraron los dos datos entre los que quedaba el 50% de la

población celular. Otra posible forma de calcular la IC50 podría haber sido intentar determinar un ajuste por mínimos cuadrados que fuese una buena aproximación de nuestra nube de puntos y, de este modo, determinar la IC50. No optamos por esta opción porque comprobamos que cada una de nuestras nubes de puntos se ajustaba a diferentes líneas de regresión. En un futuro podríamos buscar el modelo matemático que explicara la relación entre las concentraciones de fármaco y la respuesta celular, encontrando así, la función matemática que asigna a cada concentración su respuesta celular.

19.3 Estudio de proliferación con fármacos.

Para realizar el estudio de proliferación celular durante 8 días de tratamiento con los fármacos indicados, se sembraron 2.5×10^3 en cada pocillo de placas de 24 y de 12 pocillos. Tras su siembra se dejaron 48 horas con el medio habitual (en las líneas transducidas con Dox), y tras ello se puso la primera dosis de los fármacos. Se usaron los fármacos en monoterapia, 5FU, Oxaliplatino e Irinotecán, y en politerapia asociando, 5FU/Oxaliplatino, 5FU/Irinotecán, Oxaliplatino/Irinotecán y 5FU/Oxaliplatino/Irinotecán. En el caso de las asociaciones, y siguiendo los consejos de la literatura consultada, Oxaliplatino se añadía al final. Se utilizaron como concentraciones la IC50, calculada previamente, para cada línea, de cada fármaco. El cambio de medio se realizó cada 72 horas y con ello se pusieron las siguientes dosis de fármaco. Las células fueron fijadas cada 48 horas, previamente se fijó una primera placa que correspondería al día 0 de la curva de proliferación. El protocolo de fijación, tinción con SRD y análisis de los datos fue el mismo descrito previamente.

19.4 Estudio de apoptosis con fármacos.

Se sembraron 2.5×10^3 por pocillo en placas de 12 pocillos. Se dejaron con

el medio habitual 48 horas (al igual que en el resto de estudios, las células transducidas se trataban con Dox) y tras ello se realizó cambio de medio y se puso el fármaco, con las concentraciones correspondientes a la IC50 de cada línea para cada fármaco. Tras 24 horas se recogieron las células y se procesaron, utilizando el kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (Pharmingen, San Diego, CA, EEUU) siguiendo el mismo protocolo explicado previamente. Las células se llevaron a analizar mediante citometría de flujo.

20. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa SPSS 7.5 (IMB, Chicago, IL, USA) para el análisis estadístico de los datos. Los datos fueron comparados usando el test de la T de Student. Los datos se expresaron con media +/- SD. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de P fue <0.05.

IV. RESULTADOS

1.- CONSTRUCCIÓN DE VECTORES RETROVIRALES DE EXPRESIÓN EN EUCARIOTAS CON LOS genes *gef* Y/O *apoptina*.

Para la construcción de los vectores se usó el sistema “BD RevTet-On” que incluye los vectores pRevTet-On y pRev-TRE, y la línea celular empaquetadora RetroPack PT-67 (Figura 1). Este sistema está basado en la expresión de un vector retroviral regulador (rtTA) controlado por tetraciclina o derivados. El plásmido pRev-TRE fue digerido con las endonucleasas de restricción BamH I y Hind III y sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. Posteriormente la banda obtenida fue purificada utilizando el Kit Gene-clean.

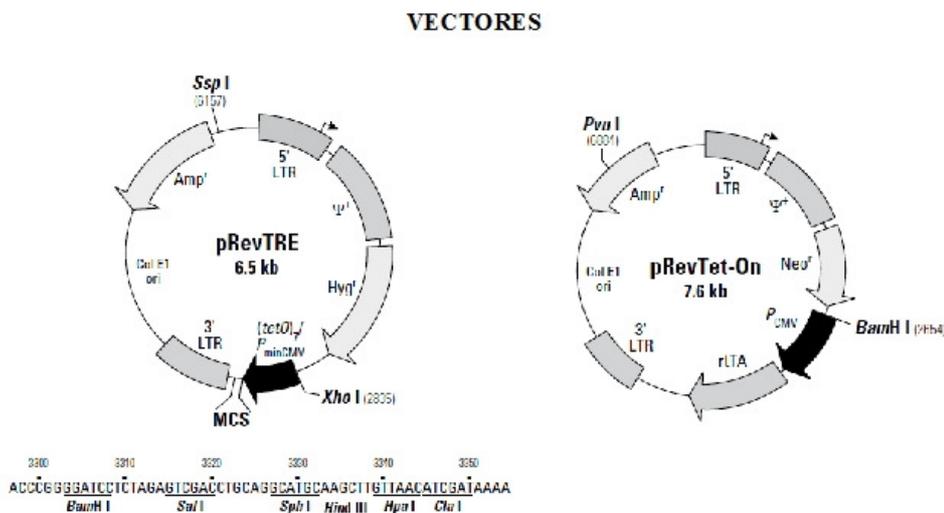


Figura 20: Vectores usados para la expresión de los genes *gef* y *apoptina*. El sistema Tet-On permite que rtTA se una al elemento de respuesta Tet (TRE), activando de este modo la transcripción en presencia de Dox. Cuando la Dox es retirada del medio de cultivo, la transcripción de la TRE “se apaga”. Fuente: Protocol No. PT3223-1 www.clontech.com Clontech Laboratories, Inc.

Mediante PCR y utilizando los primers diseñados para amplificar los genes *gef* y *apoptina* completos (ver Material y Métodos), obtuvimos un amplificado de 170 pb correspondiente al gen *gef* y 473 pb correspondiente al gen *apoptina*, que clonamos en el plásmido pRev-TRE. Los vectores y los insertos se sometieron a una reacción de ligación de extremos cohesivos, tras el corte con las mismas enzimas de restricción, lo que permitió la orientación adecuada del inserto. La presencia del inserto en el plásmido fue determinada por RT-PCR, utilizando los Primers Gef 1 y Gef 2 (ver Material y Métodos). Estas construcciones, pRevTRE-*gef* y pRevTRE-*apoptina*, fueron utilizadas para transformar bacterias *E. Coli* competentes, lo que nos permitió obtener las cantidades necesarias para las experiencias de transfección en la línea PT-67 (Figura 2).

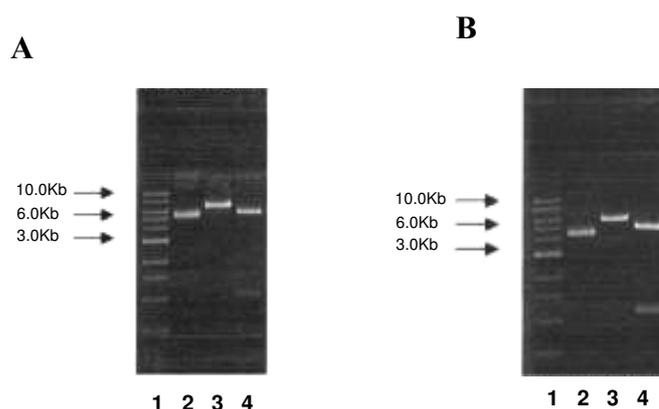


Figura 2 Determinación de la expresión de los genes *gef* (A) y *apoptina* (B) mediante PCR. A. 1. 1 kb DNA ladder (New england Biolabs). 2. pRevTRE-*gef*. 3. pRevTRE-*gef*/BamH I. 4. pRevTRE-*gef* / BamH I+Xho I. B. 1. 1 kb DNA ladder. 2. pRevTRE-*apoptina*. 3. pRevTRE-*gef*/BamH I. 4. pRevTRE-*apoptina* / BamH I+Xho I.

En estos plásmidos, los genes *gef* y *apoptina* están al lado de la secuencia TRE, que puede unirse a rTA que expresa el vector pRevTet-On. Por lo tanto, en combinación con el vector de regulación pRevTet-On, se puede inducir una

elevada expresión de ambos genes, en respuesta a diferentes concentraciones de tetraciclina o doxiciclina. Debido a su transferencia de genes mediada por retrovirus, los sistemas de expresión de la proteína Apoptina y Gef controlados por tetraciclina se pueden incorporar en células de mamíferos.

Los plásmidos pRevTRE-gef y pRevTRE-apoptina se transfectaron en la línea empaquetadora PT-67 mediante liposomas. La posterior selección mediante higromicina para pRevTRE-gef y pRevTRE-apoptina que permitió obtener, líneas celulares estables, PT67-TRE-gef y PT67-TRE-apoptina producen en el medio de cultivo los vectores retrovirales que contienen los genes *gef* y *apoptina*. Utilizando el método de formación de colonias, se encontró que el título más elevado de las poblaciones de retrovirus, sobre 6×10^5 CFU por ml, se puede obtener en el medio de cultivo de la línea PT-67 suplementado con 4 mg / ml de polibreno a las 24 h.

2. OBTENCIÓN DE LAS LÍNEAS ESTABLES DLD1/TET-ON-GEF, DLD1/TET-ON-APOPTINA Y DLD1/TET-ON-GEF-APOPTINA.

Las células DLD1 fueron transfectadas mediante liposomas con el plásmido pRevTet-On y seleccionadas por la resistencia a la geneticina (G418), obteniendo así la línea celular DLD1/Tet-On. A continuación, esta línea celular fue sometida a repetidas infecciones con los vectores retrovirales que contienen los genes *gef* o *apoptina* por separado o combinados, previamente producidos por la línea empaquetadora. A las 24 h de la transducción, las células fueron seleccionadas mediante higromicina a una concentración de 0.4 mg/ml. Esta dosis permitió eliminar las células no transfectadas con pRevTRE-gef y/o pRevTRE-apoptina obteniendo 3 líneas celulares estables en los que es posible inducir la expresión de *gef* y/o *apoptina* mediante doxiciclina.

3.- DETERMINACIÓN MEDIANTE RT-PCR DE LA PRESENCIA DE LOS GENES *gef* Y *apoptina* EN LAS CÉLULAS TRANSDUCIDAS.

Para confirmar la incorporación estable de los genes *gef* y *apoptina* en las líneas celulares DLD1/Tet-On-*gef*, DLD1/Tet-On-*apoptina* y DLD1/Tet-On-*gef*-*apoptina*, se obtuvo el ARN y se realizó RT-PCR como se describe en “Material y Métodos”. Como control negativo se utilizó el ARN de las células no transducidas y como controles positivos los plásmidos.

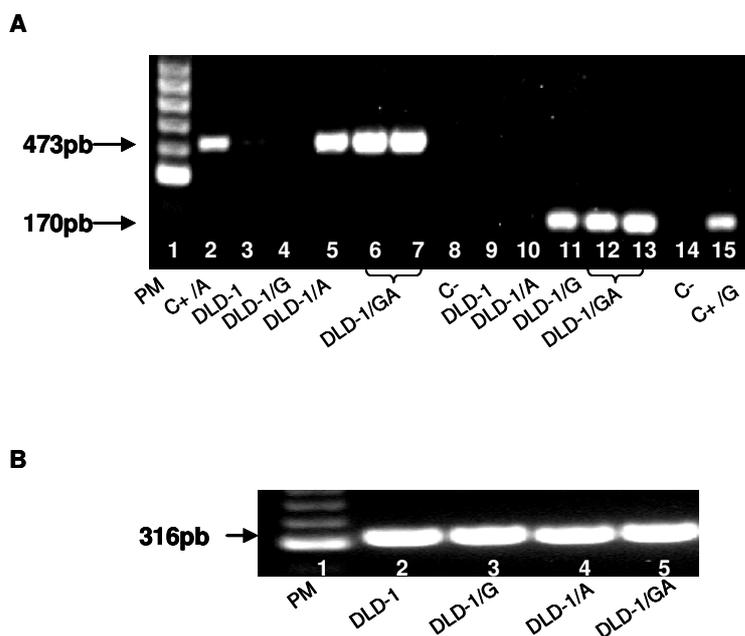


Figura 3. Determinación de la expresión de los genes *gef* y *apoptina* mediante RT-PCR. El ARN total asilado de las células DLD1 parentales, DLD1/Tet-On-*gef*, DLD1/Tet-On-*apoptina*, y DLD1/Tet-On-*gef*-*apoptina* fue transformado en cADN mediante transcriptasa inversa. (A) La amplificación por PCR de los mRNA de *gef* y *apoptina* y (B) mRNA de β -actina fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y visualizados con bromuro de etidio. (A) Carril 1.- hyperladder II; carril 2.- pRevTRE-*apoptina* (control +); carril 3.- DLD1; carril 4.- DLD1/Tet-On-*gef*; carril 5.- DLD1/Tet-On-*apoptina*; carriles 6 y 7.- DLD1/Tet-On-*gef*-*apoptina*; carril 8, pRevTRE vector vacío (control negativo); carril 9, DLD1; carril 10, DLD1/Tet-On-*apoptina*; carril 11.- DLD1/Tet-On-*gef*; carril 12 y 13.- DLD1/Tet-On-*gef*-*apoptina*; carril 14.- pRevTRE vector vacío (control negativo); carril 15.- pRevTRE-*gef* (control positivo). (B) Carril 1.- hyperladder II; carril 2.- DLD1; carril 3.- DLD1/Tet-On-*gef*; carril 4.- DLD1/Tet-On-*apoptina*; carril 5.- DLD1/Tet-On-*gef*-*apoptina*.

El chequeo en gel de agarosa al 2% de los productos de la RT-PCR puso de manifiesto la amplificación del fragmento de 170 pb correspondiente al gen *gef* y la del fragmento de 473 pb correspondiente al gen de la *apoptina* (Figura 3A).

Para corroborar la integridad de todas las muestras se realizó otra PCR con los primers de β actina. Todas las muestras mostraron el producto de esta amplificación y en la misma intensidad (Figura 3B).

4- ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN LAS LÍNEAS DLD1/TET-ON-GEF, DLD1/TET-ON-APOPTINA Y DLD1/TET-ON-GEF-APOPTINA.

Para analizar las modificaciones que provocan la expresión de los genes *gef* y *apoptina* y la combinación de los mismos, en el grado de proliferación de la línea DLD1 se realizó un estudio comparativo entre las líneas transducidas y la línea control sin transducir.

4.1 EFECTO DE LA DOXICICLINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LA LÍNEA DLD1

Dado que en la literatura las dosis de Dox que se utilizan varían de un estudio a otro, se realizó un análisis para determinar el nivel de tolerancia de la línea DLD1 salvaje a la Dox sin que se vieran alteradas sus características biológicas. Así pues, la línea control DLD1 fue tratada con concentraciones crecientes de Dox: 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 $\mu\text{g/ml}$ de medio.

Se cultivaron en placas de 12 pocillos con 2.5×10^3 células por pocillo. El experimento fue realizado por triplicado. Las placas se fijaron en los días 0, 2, 4, 6, 8 y 10. No se observaron diferencias en la curva de proliferación entre las células que no recibieron tratamiento con Dox y las que sí lo recibieron (Figura 4). Además, no hubo diferencias significativas entre las distintas concentraciones

usadas del antibiótico. Se eligió la concentración 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de medio de cultivo para realizar el resto de los experimentos.

Efecto del tratamiento con Doxiciclina sobre la línea control

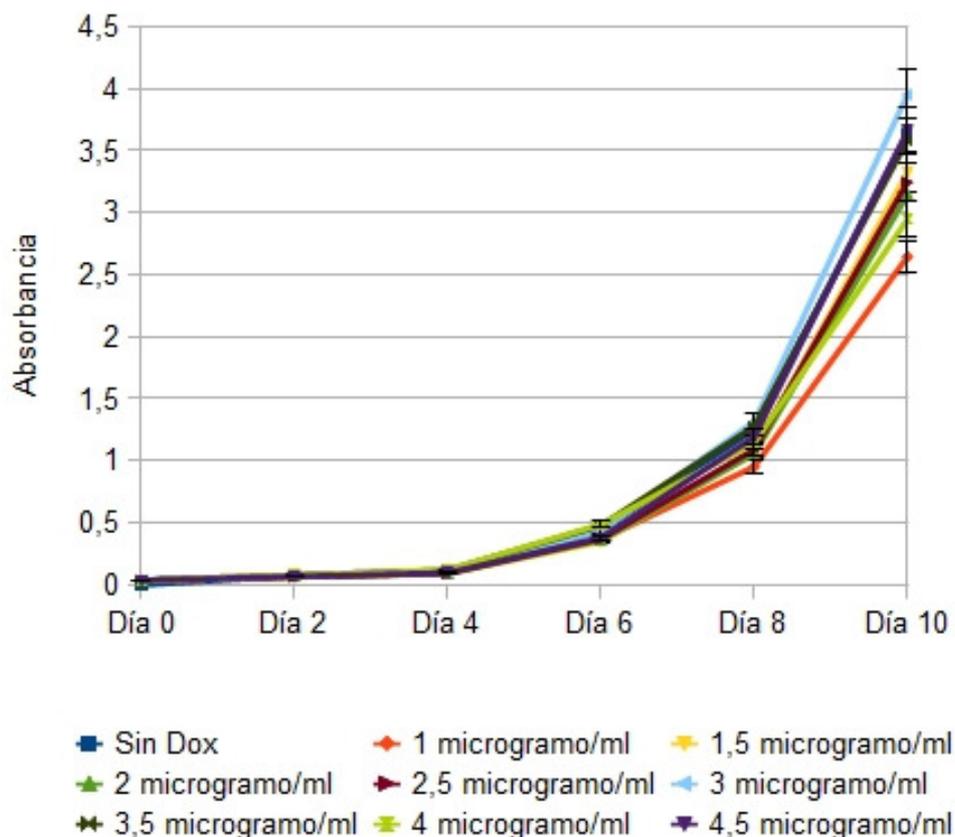


Figura 4: Efecto del tratamiento con Dox sobre la proliferación celular de la línea DLD1. Se utilizaron concentraciones crecientes de Dox, desde 1 – 4.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de medio. No se objetivaron diferencias significativas en la proliferación celular de la línea control con las dosis estudiadas.

4.2 EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *gef* Y/O *apoptina* SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Una vez verificada la no influencia de Dox en el crecimiento celular, se llevó a cabo el estudio de proliferación con las células DLD1, DLD1/Tet-On-*gef*,

DLD1/Tet-On-apoptina y DLD1/Tet-On-gef-apoptina. Se sembraron las células (2.5×10^3) en placas de 6 pocillos bajo las condiciones descritas anteriormente. Tras 24 horas se renovó el medio de cultivo. Este último fue suplementado únicamente en las líneas transducidas con $2 \mu\text{g}$ de Dox por cada ml de medio, y se renovó en todas las líneas en días alternos hasta el final del experimento. Este último fue realizado por cuádruplicado. Las células fueron fijadas en los días 0, 2, 4, 6, 8 y 10 del tratamiento. Fueron teñidas con sulforodamina B (SRB) como se describe en material y métodos. Con posterioridad se midió la intensidad del colorante en el colorímetro Titertek Multiscan (Flow, Irvine, California) a 492 nm. La recta de calibrado para el ensayo con SRB se realizó para cada pase de células DLD1 antes de cada experimento de proliferación. La curva de proliferación se muestra en la Figura 5.

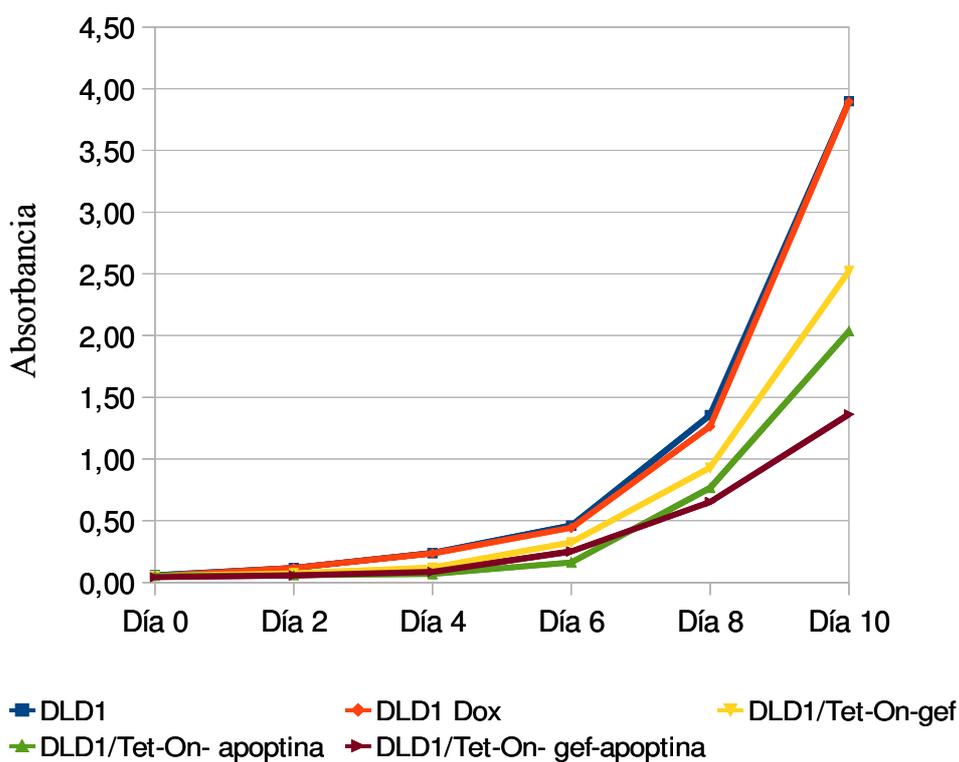


Figura 5: Determinación del efecto de la expresión de los genes *gef* y/o *apoptina* en la proliferación celular. Las células se cultivaron durante 10 días para determinar su tasa de crecimiento. Los valores representan la media \pm la desviación estándar de los cultivos por cuádruplicado.

En la curva que representa la tasa de inhibición del crecimiento celular (Figura 6) no se aprecian diferencias significativas entre las células DLD1 tratadas con Dox y las no tratadas. Se observó una inhibición del crecimiento del $36.86\%+0.81$ en las células DLD1/Tet-On-gef con respecto a las células control tras dos días de inducción con Dox y una inhibición del $50.19\%+1.25$, $29.53\%+0.7$, $31.44\%+0.78$, y $35.9\%+0.88$ tras 4, 6, 8 y 10 días de inducción con Dox ($P < 0.001$). En las células DLD1/Tet-On-apoptina tratadas con Dox se observó una inhibición del crecimiento del $50.41\%+1.3$, $71.4\%+1.78$, $64.7\%+1.61$, $43.46\%+1.08$, y $47.95\%+1.19$ tras 2, 4, 6, 8 y 10 días de incubación, respectivamente ($P < 0.001$). En las células transducidas con *gef* y *apoptina*, DLD1/Tet-On-gef-apoptina, se observó una inhibición del crecimiento del 51.3% tras dos días de incubación con Dox y del $64.1\%+1.6$, $45.45\%+1.13$, $51.9\%+1.29$, y $65.13\%+1.62$, respectivamente, tras 4, 6, 8 y 10 días de inducción con Dox. De los datos comentados se dedujo que hasta el día 6 de tratamiento con Dox, la inhibición de la proliferación en las células DLD1/Tet-On-gef-apoptina fue similar a la inhibición de la proliferación en las células que sólo expresan *apoptina*, sin diferencias estadísticamente significativas. Pero cuando se comparan la línea que expresa *gef* y *apoptina* con la que sólo expresa *gef*, se aprecia que la inhibición de la proliferación en DLD1/Tet-On-gef-apoptina fue mayor que en las células que sólo expresan el gen *gef*. Sin embargo, analizando la situación a los 10 días de incubación, los genes *gef* y *apoptina* causaron una inhibición de la proliferación del $35.9\%+0.89$ y el $47.95\%+1.19$, mientras que la acción conjunta de ambos genes causa una inhibición del $65.13\%+1.6$ ($P < 0.001$).

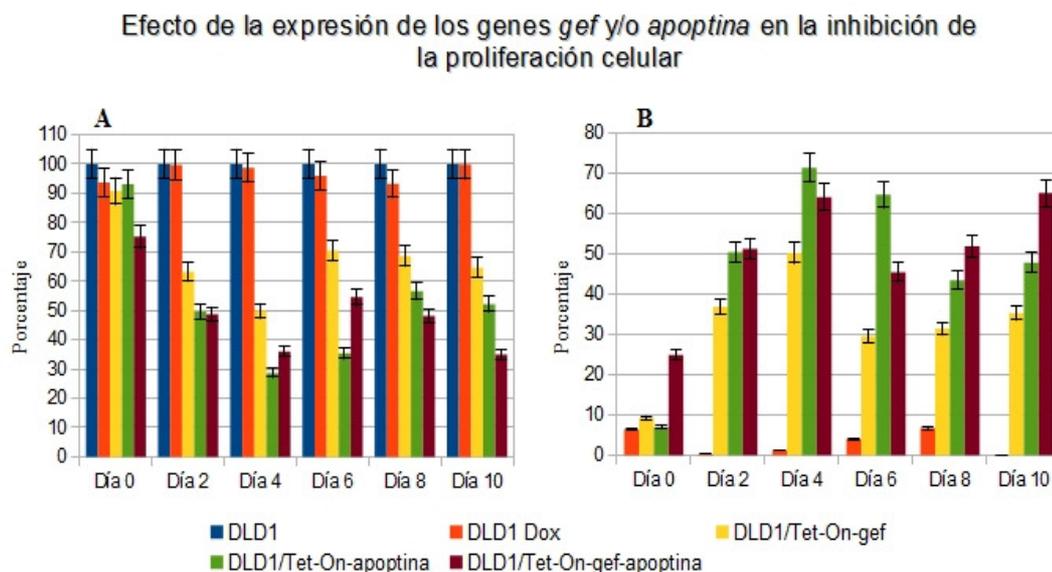


Figura 6: Determinación del efecto de la expresión de los genes *gef* y/o *apoptina* en la inhibición de la proliferación celular. (A) Análisis de % de proliferación de las cuatro líneas celulares. (B) Análisis de la inhibición del crecimiento celular con respecto a la línea control, expresado en porcentaje.

5. ANÁLISIS DEL EFECTO APOPTÓTICO

Para cuantificar el alcance de la apoptosis mediante citometría de flujo, se tiñeron las células simultáneamente con anexina V-FITC y con Ioduro de Propidio (IP). Las células viables son negativas para ambas tinciones, las células en apoptosis temprana estarán teñidas únicamente con anexina V-FITC, las células en apoptosis tardía estarán teñidas tanto con anexina V-FITC como con IP y las células necróticas sólo con IP.

En el cultivo de DLD1, el 85% de las células eran viables, el 2,11% estaban en apoptosis temprana, 2,76% estaban en apoptosis tardía o en las últimas etapas de la apoptosis, y un 10,12% eran necróticas ($P < 0.001$), tal y como se observa en la Figura 7. No se observaron diferencias entre las células DLD1 tratadas con Dox y las no tratadas durante la primera semana.

En el grupo DLD1/Tet-On-gef tratado con Dox durante 2 y 6 días, el 66.23% y 24.81% de las células eran viables, el 14.19 % y el 4.59% fueron apoptóticas, el 0.92% y el 37.18% estaban en apoptosis tardía o en las últimas etapas de la apoptosis, y el 18.66% y el 33.41% fueron necróticas, respectivamente. En el grupo DLD1/Tet-On-apoptina tratado con Dox durante 2 y 6 días, los porcentajes correspondientes son 35.7% y 23.35%, 6.8 % y 13.42%, 29.34% y 40.10%, y 28.16% y 23.36%, respectivamente ($P < 0.001$).

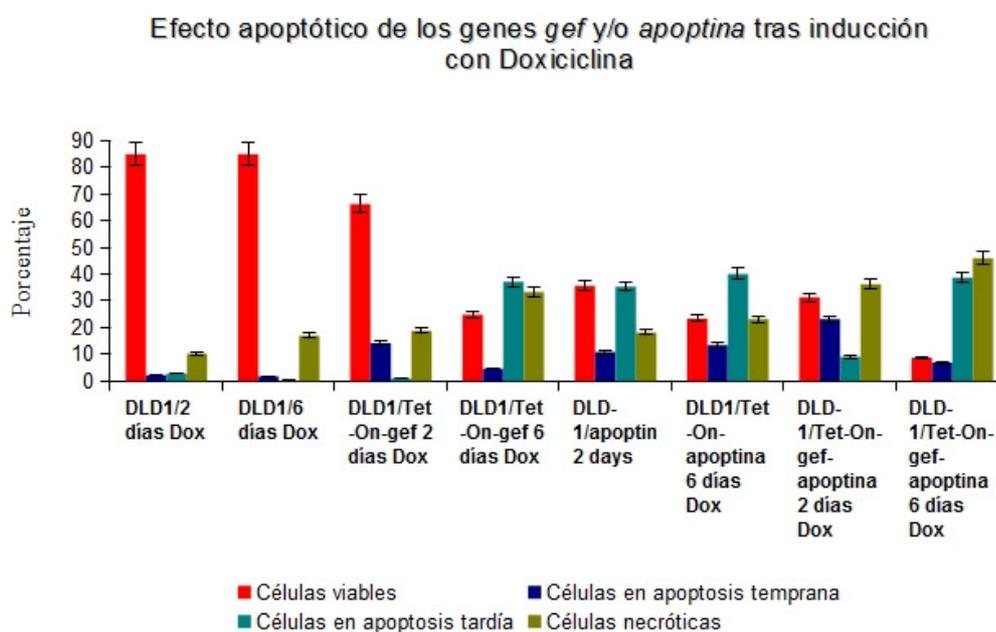


Figura 7: Cuantificación de la inducción de apoptosis en células DLD1 control y transducidas mediante análisis con citometría de flujo. Las células fueron teñidas con Anexina V y PI para evaluar la muerte celular por apoptosis después de ser tratadas con Dox durante 2 y 6 días. Los datos que se muestran pertenecen a 3 experimentos independientes. No hubo diferencias entre la línea control tratada con Dox y sin tratar. La viabilidad celular decayó en las células transducidas e inducidas con Dox, siendo máximo el efecto en la línea DLD1/Tet-On-gef-apoptina tras 6 días de inducción con Dox.

Finalmente, en las células DLD1/Tet-On-gef-apoptina tratadas con Dox durante 2 y 6 días, los porcentajes correspondientes son 31.77% y 8.69%, 23.07% y 6.76%, 8.96% y 38.61%, y 36.19% y 45.94%, respectivamente ($P < 0.001$).

6. MODULACIÓN DEL CICLO CELULAR

Como muestran las Figuras 8 y 9, el cultivo de células DLD1 contenía un 70.76% de células en G1-G0, un 19.23% de células de fase S y un 10.01% de células en G2-M.

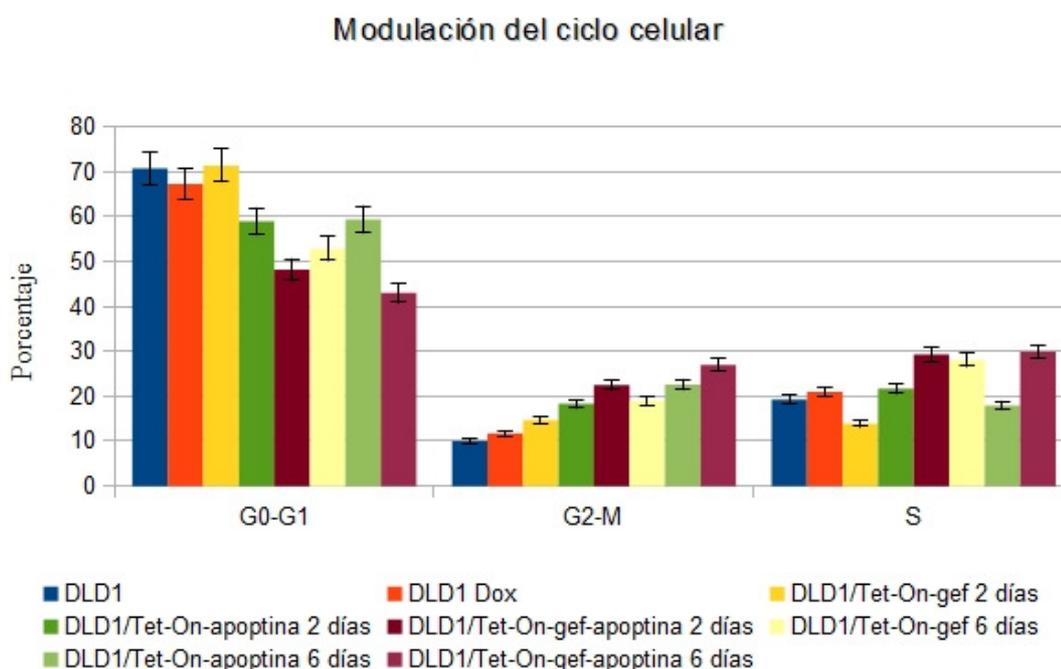


Figura 8: Estudio del ciclo celular. Se analizaron las diferentes fases del ciclo celular de las células DLD1, DLD1/Tet-On-gef, DLD1/Tet-On-apoptina, y DLD1/Tet-On-gef-apoptina tratadas con Dox durante 2 y 6 días. Tras 6 días de tratamiento, las células DLD1/Tet-On-gef-apoptina presentan una disminución de células en G1-G0 y un acumulo de células en fase G2-M y en fase S. Los datos que se muestran pertenecen a 3 experimentos independientes.

Las células DLD1 tratadas con Dox mostraron valores similares, 67.35%, 11.71%, 20.95%, de células en G1-G0, G2-M y S, respectivamente. Las células DLD1/Tet-On-gef mostraron una disminución de células en fase G1-G0- tras seis días de inducción con Dox (52.93%), un aumento de la fase G2-M (18.97%) y de la fase S (28,1%). Las células DLD1/Tet-On-apoptina tras dos días de inducción

con Dox mostraron modificaciones de ciclo similares a los que presenta la línea con el gen *gef*, 58.99%, 18.3%, 21.71% en fase G1-G0, G2-M y S, respectivamente. Tras seis días de inducción aumenta muy levemente la fase G1-G0 (59.41%), con acumulación en la fase G2-M (22.63%) y disminución en la fase S (17.96%).

Modificaciones en ciclo celular tras inducción con Doxiciclina

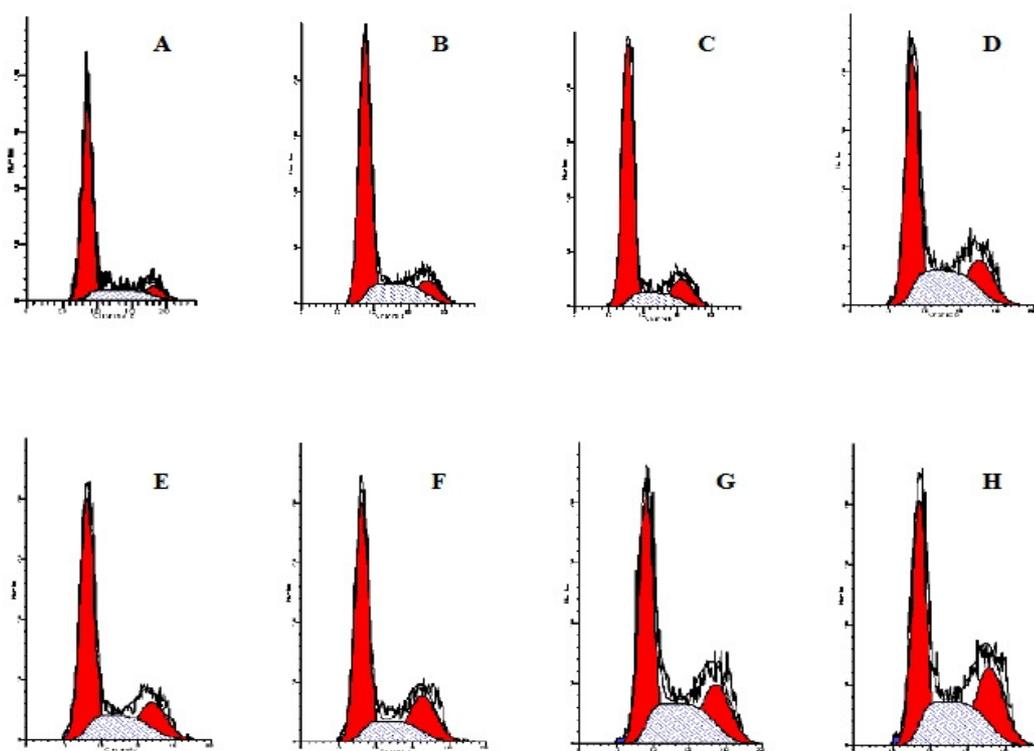


Figura 9: Estudio del ciclo celular. No se apreciaron diferencias significativas entre las líneas DLD1 control (A) y DLD1 tratada con Dox (B). Se analizaron los cambios en ciclo celular en las líneas DLD1/Tet-On-gef tras 2 (C) y 6 (D) días de inducción con Dox, DLD1/Tet-On-apoptina tras 2 días de inducción (E) y 6 días (F) y DLD1/Tet-On-gef-apoptina tras 2 días (G) y tras 6 días (H) de inducción. Se vio una disminución de la fase G1-G0 con respecto a la línea control y un aumento en las fases G2-M y S en las líneas transducidas e inducidas.

La co-expresión de los genes *gef* y *apoptina* mostró un aumento significativo de células en fase G2-M y fase S acompañada con una concomitante disminución de la fase G₁ en comparación con las células control y con las células que expresan los genes *gef* o *apoptina* por separado. Así pues después de 2 días de inducción con Dox, las células DLD1/Tet-On-*gef*-*apoptina* mostraron una disminución gradual de células en fase G1-G0 (48,19%) y una acumulación de células en fase S (29,28%) y en fase G2-M (22,53%). Después de 6 días de inducción, el incremento del número de células en fase S (29.94%), y en fase G2-M (27.01%) y la disminución de la población de células en fase G1 (43.04% G1-G0) fueron aún más acentuadas (Figuras 8 y 9).

7. CAMBIOS MORFOLÓGICOS

Los cambios morfológicos que presentaron las células transducidas e inducidas con Dox fueron estudiados tanto con microscopía óptica, como con microscopía de barrido y de transmisión.

7.1 ESTUDIO CON MICROSCOPIA ÓPTICA

Mediante esta técnica se analizó las modificaciones en la morfología de las líneas DLD1, DLD1/Tet-On-*gef*, DLD1/Tet-On-*apoptina* y DLD1/Tet-On-*gef*-*apoptina*. Este análisis nos permitió valorar también el posible efecto de la Dox sobre la morfología celular.

Nuestros resultados demostraron que todas las líneas se caracterizaron por presentar una morfología epitelial (Figura 10). Las colonias se desarrollaron concéntricamente a las células que iniciaron su formación. Este hallazgo fue condicionando en parte, por el hecho de que las células en división rara vez se separaron de la monocapa. Además, todas las líneas transducidas e inducidas con doxiciclina se caracterizaron por la presencia de un grupo celular más pequeño,

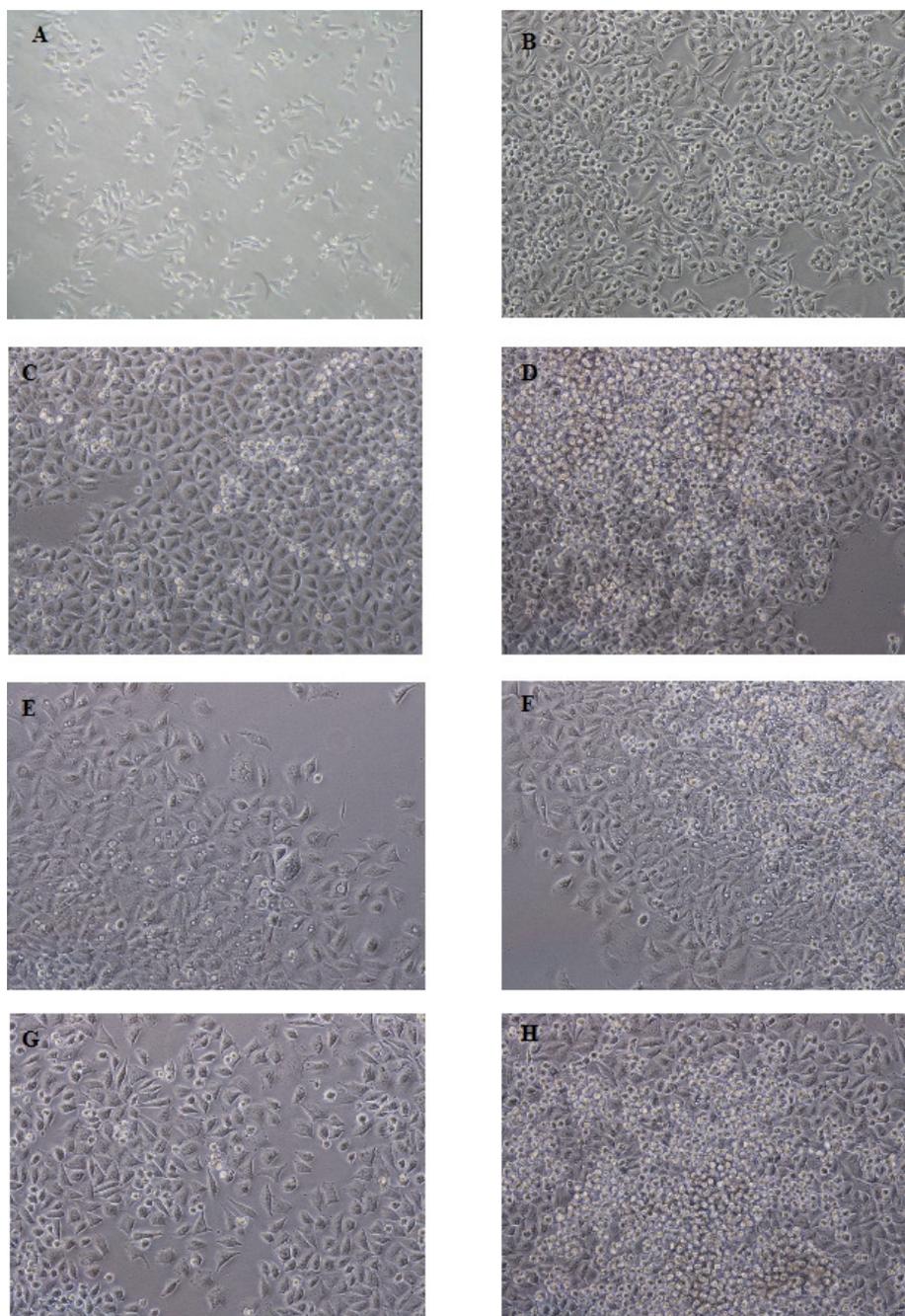


Figura 10: Estudio con microscopía óptica de las células transducidas e inducidas con Dox respecto a la línea control. No se observaron diferencias entre las células DLD1 (A) y las células tratadas con Dox (B). Sin embargo las líneas transducidas con *gef* y/o *apoptina* e inducidas con Dox se caracterizaron por la presencia de un grupo de células más pequeñas, redondeadas (más evidentes en D, F, H), menos adheridas al frasco de cultivo al compararlas con las células parenterales. (C y D) DLD1/Tet-On-gef inducida con Dox. (E y F) DLD1/Tet-On-apoptina. (G y H) DLD1/Tet-On-gef-apoptina.

redondeado, menos adherido al frasco de cultivo en comparación con las células parentales y con un citoplasma fragmentado, de tamaño variable. Los resultados del estudio permitieron también demostrar que la acción de Dox en la línea salvaje no induce modificaciones significativas en la morfología celular.

7.2 ESTUDIO CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Las células DLD1 infectadas con los genes *gef* y/o *apoptina* se analizaron con un microscopio electrónico de transmisión para profundizar en el estudio de la citotoxicidad de dichos genes. Mediante el análisis ultraestructural, hemos observado que las células control son grandes y poligonales, con bordes bien definidos y abundante citoplasma granular, con núcleos de tamaños variables (Figura 11 A). Las células tienen mitocondrias con crestas bien definidas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi así como ribosomas libres o asociados al retículo endoplasmático (Figura 11 B). Por otra parte, en las líneas que expresan *gef* y/o *apoptina*, se confirmó la presencia de células muertas por apoptosis (Figura 11 C-K). El núcleo de las células que expresa el gen *gef* y/o el gen *apoptina* presentan las características ultraestructurales de la apoptosis, incluyendo condensación de la cromatina, forma de media luna, marginación y formación de vesículas, tal y como se observa en las imágenes C, D, E, F, G, H, I, J y K de la Figura 11. En las células infectadas únicamente con el gen *gef*, se observaron grandes protuberancias en las mitocondrias en el día 2 del tratamiento con Dox. (Figura 11, C, D y E). En las células infectadas únicamente con el gen *apoptina*, se apreció la dilatación y destrucción del retículo endoplasmático (Figura 11, E, F y G). En las células transducidas con ambos genes, se observó la dilatación de la mitocondria y el retículo endoplasmático y la destrucción de aparato de Golgi (Figura 11 J), así como la presencia de células necróticas (Figura 11L), muchos restos celulares (Figura 11LL) y abundantes cuerpos apoptóticos (Figura 11M).

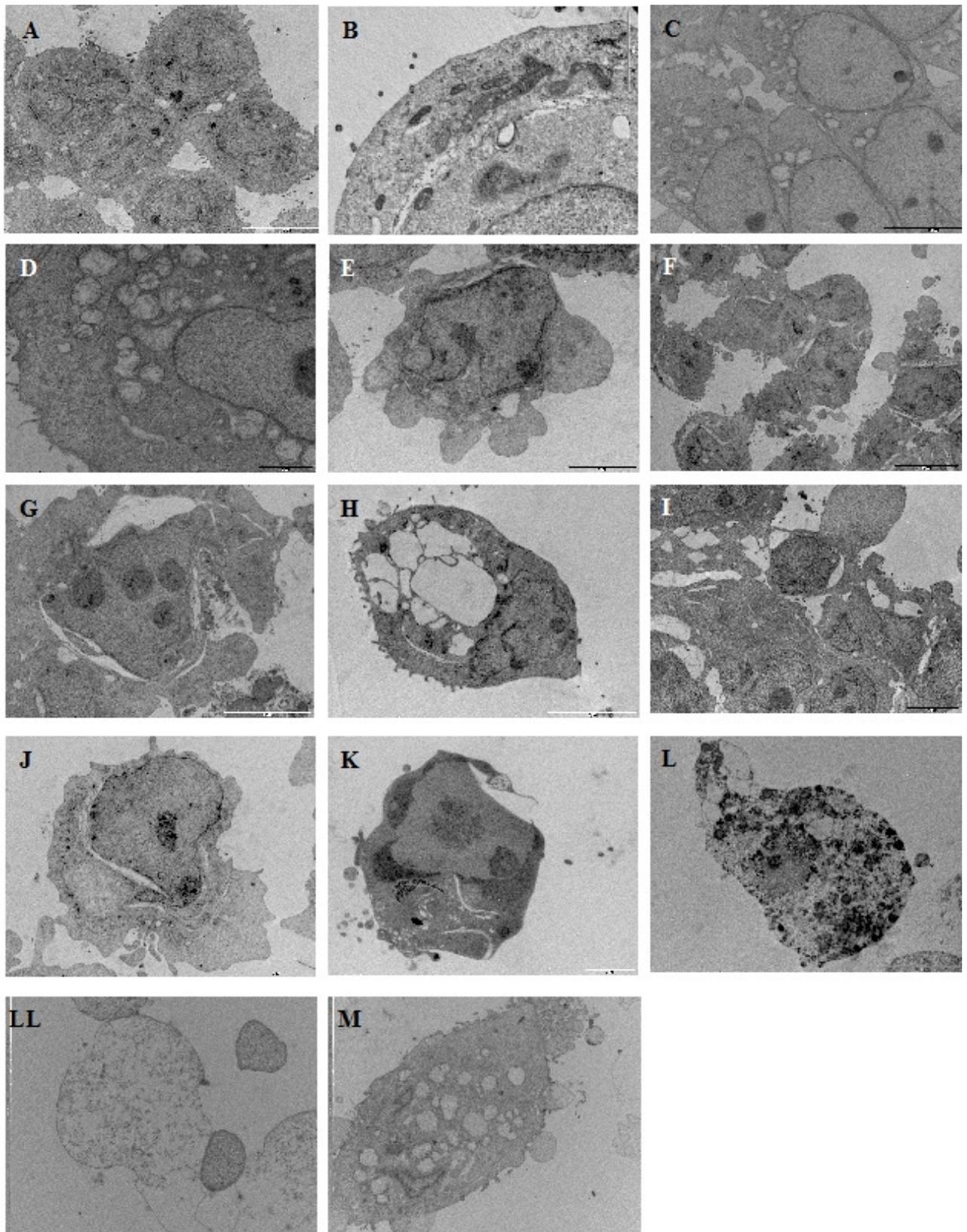


Figura 11: Microscopia de transmisión Morfología ultraestructural de las células DLD1, DLD1/Tet-On-gef, DLD1/Tet-On- apoptina, y DLD1/apoptina tratadas con Dox durante 2 días para inducir la expresión de *gef* y/o *apoptina*. La morfología típica de las células parentales DLD1 demostraron una complejión citoplasmática ligera (A y B). Células DLD1/Tet-On-gef que presentaron gránulos y condensación de la cromatina, formación de vesículas y pronunciadas protuberancias en las mitocondrias (C, D Y E). Célula DLD1/Tet-On-apoptina con membrana nuclear retorcida, retículo endoplasmático dilatado y sin estructura y formación de vesículas (F, G Y H). Células DLD1/Tet-On-gef-apoptina con mitocondrias dilatadas y retículo endoplasmático y aparato de Golgi desorganizados (Imágenes I, J y K). La masa de la cromatina compactada es muy densa y homogénea en textura. Se observaron tanto células necróticas (L) como células apoptóticas con formación de vesículas, restos celulares y abundantes cuerpos apoptóticos (LL y M).

7.3 ESTUDIO CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El análisis de las células DLD1 parentales adheridas a la superficie del frasco de cultivo demostró la presencia de formas fundamentalmente elongadas y/o más o menos poligonales con una superficie tapizada por múltiples prolongaciones microvellositarias (Figura 12 A y B).

La inducción de la expresión de los genes *gef* y/o *apoptina* en la línea DLD1, provocó severos cambios morfológicos. En efecto, en la mayoría de las células que expresan ambos genes se pudo observar un importante número de elementos celulares que permanecieron unidos al plástico sólo por delgadas prolongaciones citoplasmáticas, signo inicial del desprendimiento del sustrato (Figura 12 C y D). Sin embargo, la característica más llamativa fue la aparición de muchos “poros” (Figura 12 E, F G) en la membrana citoplasmática que no fueron detectados, en ningún momento, en las células DLD1 parentales ni en las transducidas únicamente con *apoptina* y en menor medida en la línea que expresa *gef* (Figura 12 H). Igualmente, También fue observada una pérdida importante de microvellosidades en general en las tres líneas transfectadas (Figura 12.bis 1 I y J), en comparación con la línea control (imágenes A y B, figura 11). En todas las líneas transducidas e inducidas se encontraron cuerpos apoptótico (Figura 12 K y L).

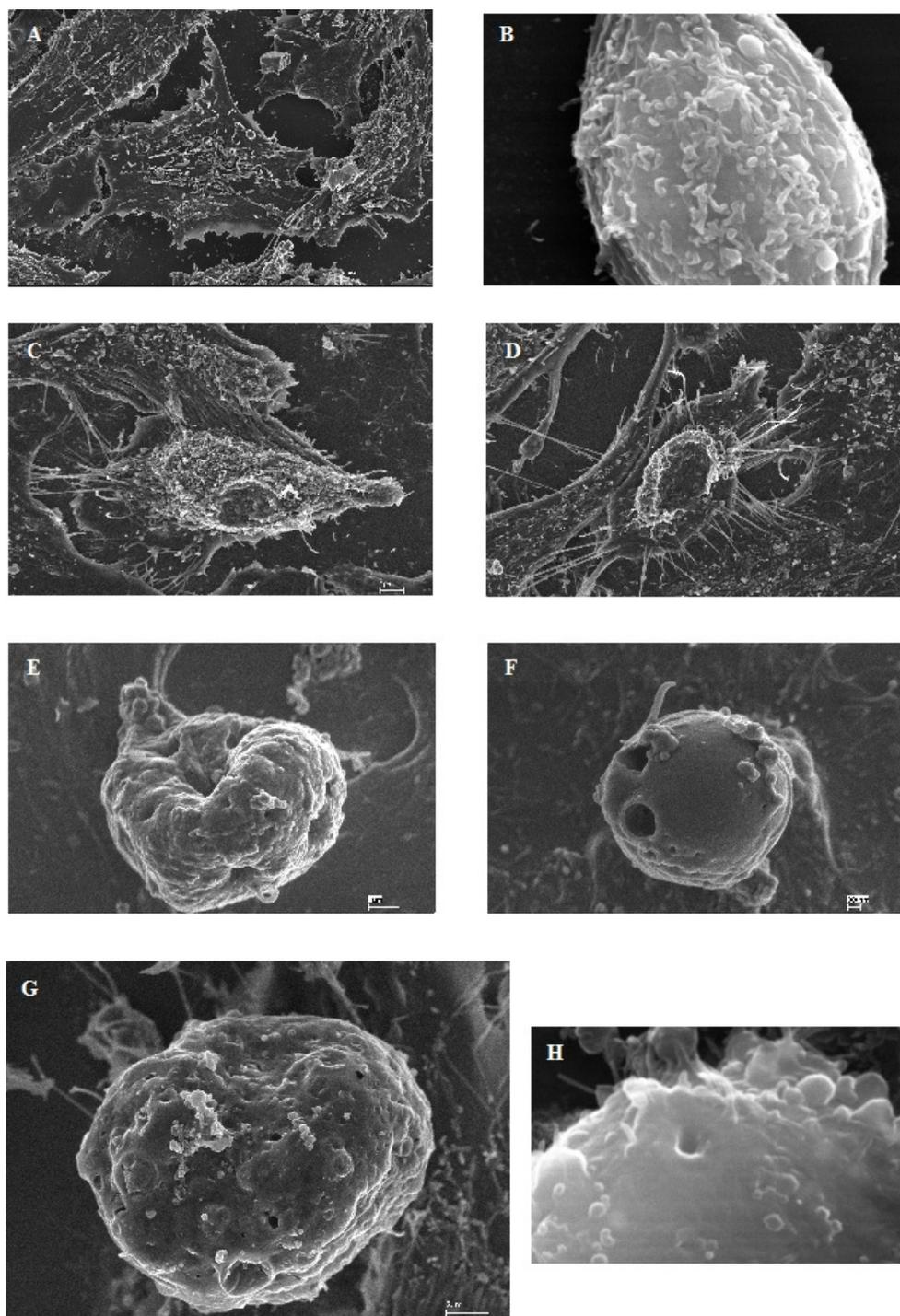


Figura 121: Estudio con microscopía de barrido. Línea DLD1 control, adherida a superficie de cultivo y con microvellosidades (A y B). Línea DLD1/Tet-On-gef-apoptina (C, D, E, F Y G), mostraron signos de comienzo de destrucción nuclear, así como la formación de poros superficiales de diferentes tamaños, los cuales se pudieron apreciar en menor medida en la línea DLD1/Tet-On-

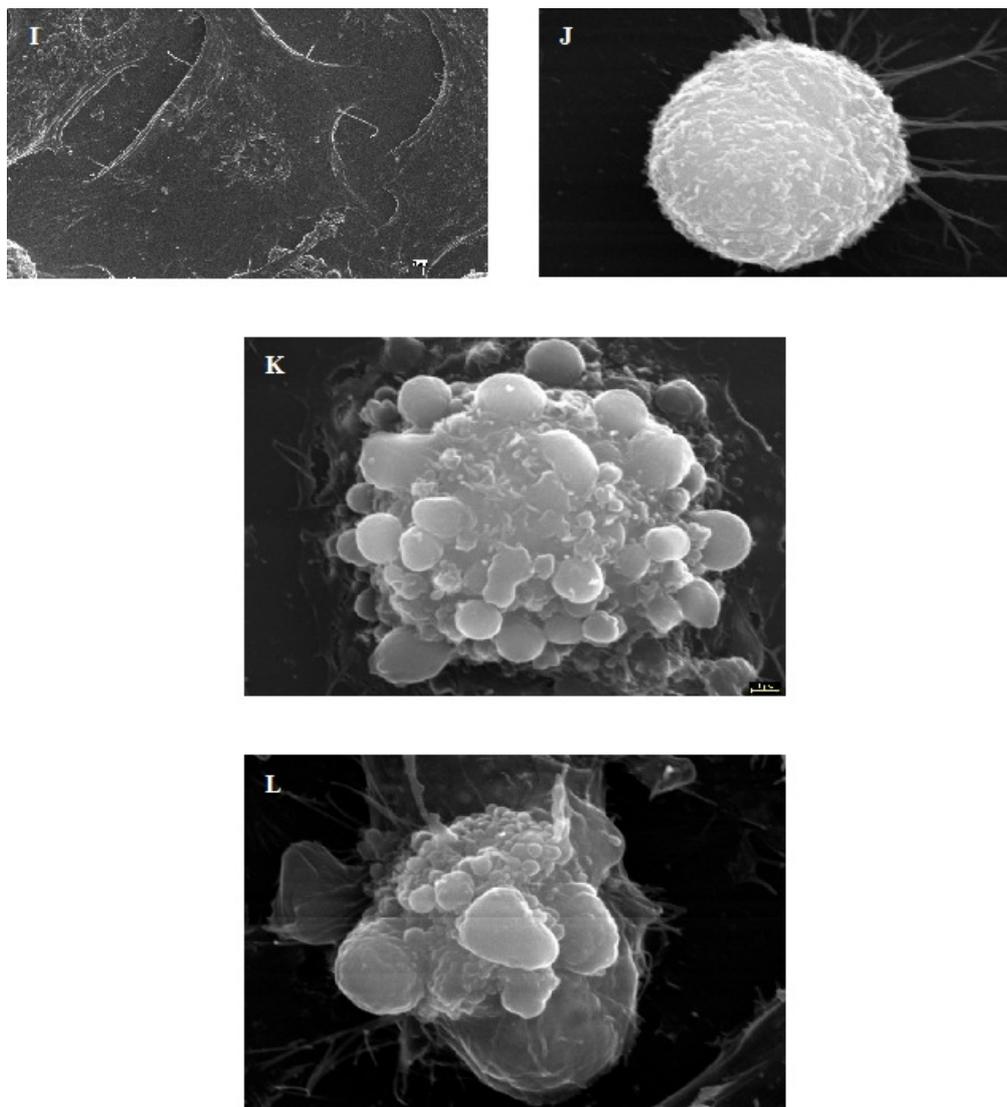


Figura 12bis: Estudio de Microscopía de barrido (continuación Figura 12). En todas las líneas transducidas e inducidas se apreció una disminución de las microvellosidades, aquí se muestra un ejemplo en DLD1/Tet-On-apoptina (I). Aparecieron elementos celulares que permanecieron unidos al plástico sólo por delgadas prolongaciones citoplasmáticas, signo inicial del desprendimiento del sustrato, se muestra ejemplo en DLD1/Tet-On-gef (J), pero este fenómeno apareció también en DLD1/Tet-On-apoptina y DLD1/Tet-On-gef-apoptina. Los cuerpos apoptóticos aparecieron en todas las líneas transducidas e inducidas, como se muestra en las imágenes correspondientes a la línea con el gen *apoptina* (K) y *gef* (L).

8. MODULACIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.

Se midió el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) mediante la sonda JC-1 con el objetivo de determinar si la apoptosis de las células DLD1 inducida por los genes *gef* y *apoptina*, solos o combinados, se lleva a cabo por la vía mitocondrial. La sonda se acumula específicamente en la mitocondria en cantidades que varían según el potencial de membrana. En las organelas con bajo potencial de membrana se acumula una pequeña cantidad de moléculas JC-1, por lo que emiten fluorescencia verde (485 excitación/535 emisión). A altas concentraciones (alto potencial de membrana), los monómeros de la sonda forman agregados y emiten una fluorescencia roja (535 excitación /590 emisión). Por tanto, la pérdida de potencial de membrana se traduce en un cambio de rojo a verde.

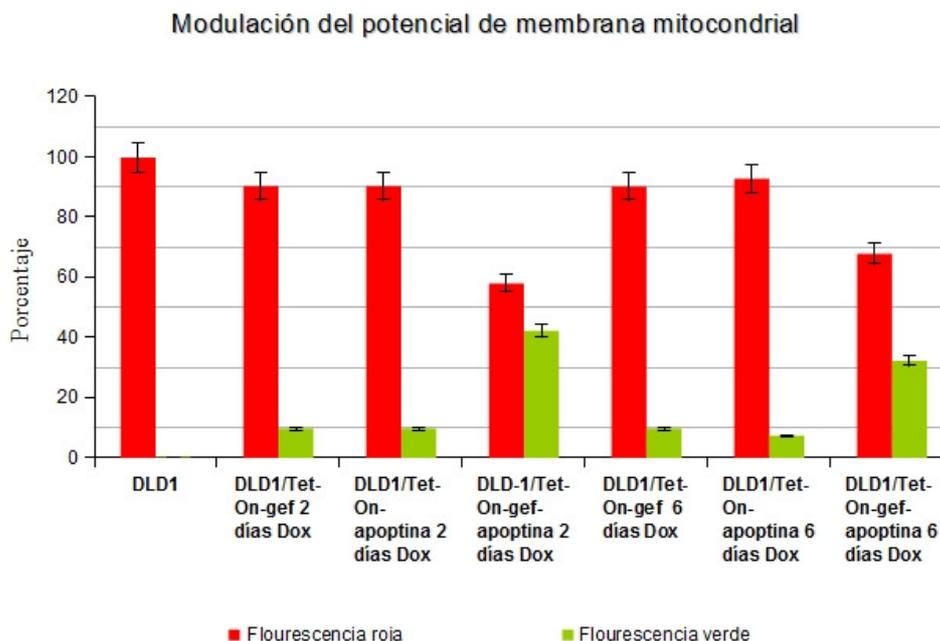


Figura 122: Análisis del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Las células tratadas con Dox durante 2 y 6 días, fueron teñidas con JC-1. La fluorescencia roja representa las mitocondrias que tienen la membrana intacta, mientras que la fluorescencia verde representa las mitocondrias que tienen una baja despolarización de la membrana.

Después de 2 y 6 días de tratamiento con Dox, las células transducidas con ambos genes suicidas mostraron una disminución del potencial de membrana mucho mayor que en el caso de las células que sólo expresan *gef* o *apoptina*, o las control, tal y como se observa en la Figura 13.

Este resultado sugiere que la co-expresión de *gef* y *apoptina* induce la apoptosis mediante un mecanismo dependiente de la mitocondria.

9. ANÁLISIS DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE *gef* Y/O *apoptina* MEDIANTE WESTERN BLOT

Para continuar el estudio que permita identificar el mecanismo por el cual los genes *gef* y/o *apoptina*, inducen apoptosis, se estudiaron las caspasas 3, 9 y 8, el citocromo c, bax y p53. La recogida de las proteínas se realizó tras 2 días de

inducción con Dox, tal y como se describe en material y métodos. El análisis de la intensidad de la señal fue realizado mediante el programa Quantity One. Los valores de cada banda fueron normalizados dividiéndolos por el valor de su β -actina, y fueron relativizados respecto a la muestra control a la que se le asignó el valor 1.

9.1 P53

Hemos analizado la expresión de p53 bajo su forma fosforilada (Pp53). Una vez normalizados los valores y comparados con el valor relativo del control (1), observamos un claro aumento de la expresión Pp53 en todas las líneas transducidas pero con distinto grado (Figura 14). Así pues, la banda correspondiente a DLD1/Tet-On-gef tuvo un valor de 1.55, DLD1/Tet-On-apoptina 1.42 y DLD1/Tet-On-gef-apoptina 1.72, lo cual indica que p53 fue fosforilado en mayor grado cuando *gef* y *apoptina* fueron expresados conjuntamente.

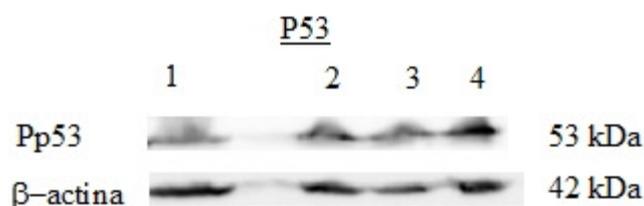


Figura 123: WB p53. 1.- DLD1, 2.- DLD1/Tet-On-gef, 3.- DLD1/Tet-On-apoptina, 4.- DLD1/Tet-On-gef-apoptina.

9.2 CASPASA 3

Se estudió la expresión de la pro-caspasa 3 y de su forma activada (Figura 15).

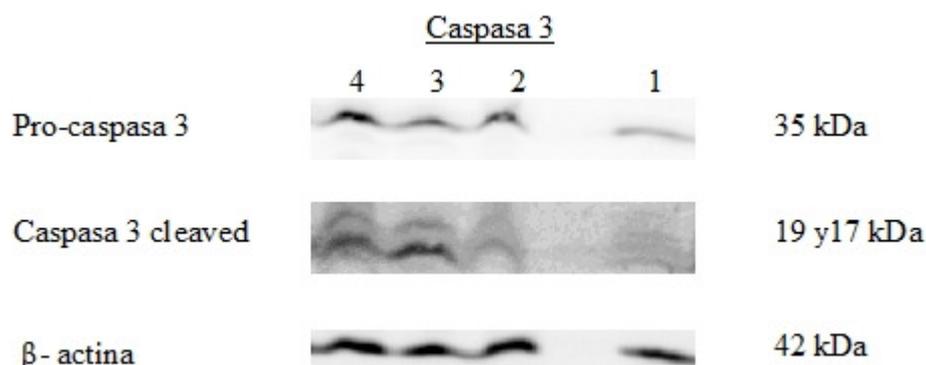


Figura 15: WB caspasa 3. 1.- DLD1, 2.- DLD1/Tet-On-gef-apoptina, 3.- DLD1/Tet-On-apoptina, 4.- DLD1/Tet-On-gef.

Los valores obtenidos para las líneas transducidas e inducidas con Dox para la pro-caspasa 3 fueron de 2.73 para DLD1/Tet-On-gef-apoptina, 2.25 para DLD1/Tet-On-apoptina y 3.66 para DLD1/Tet-On-gef. Para la forma activada de la caspasa 3 los valores fueron de 2, 2.89 y 2.15 respectivamente. La expresión de los genes, por tanto, ha provocado una activación, en términos generales, como mínimo del doble de la caspasa 3 con respecto a la línea control.

9.3 CASPASA 9

Los valores normalizados correspondientes a la expresión de la pro-caspasa 9 en las líneas DLD1/Tet-On-gef-apoptina, DLD1/Tet-On apoptina y DLD1/Tet-On-gef fueron de 1.32, 1.13, 1.32, respectivamente (Figura 16). Hay por tanto una expresión mayor en las líneas transducidas e inducidas con Dox. El análisis de la forma activada de la caspasa 9, utilizando un anticuerpo que detecta su ruptura, tal y como se describe en material y métodos, confirmó los resultados objetivando un mayor aumento de expresión con respecto a la línea control. Los

valores normalizados fueron de 4,31 para la línea que expresa ambos genes, 3,28 para la línea con el gen *apoptina* y 3,75 para la línea con el gen *gef*.

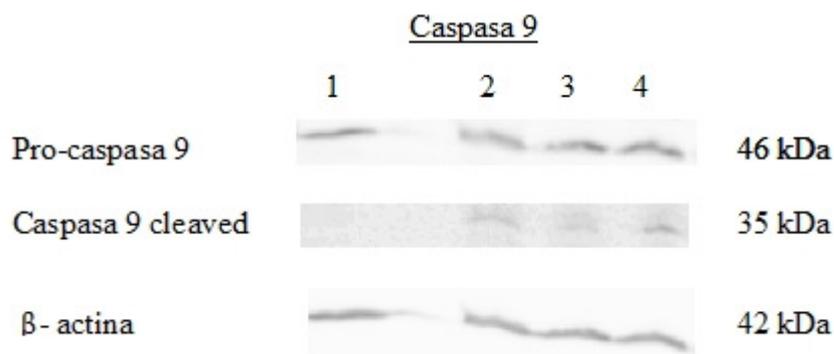


Figura 16: WB caspasa 9.- control DLD1, 2.- DLD1/Tet-On-*gef*-*apoptina*, 3.- DLD1/Tet-On-*apoptina*, 4.- DLD1/Tet-On-*gef*-*apoptina*.

9.4 CASPASA 8

Los valores normalizados correspondientes a la expresión de la caspasa 8 en las líneas DLD1/Tet-On-*gef*-*apoptina*, DLD1/Tet-On-*apoptina* y DLD1/Tet-On-*gef* fueron de 2.58, 1.81 y 1.66, respectivamente (Figura 17). Estos resultados indican que la caspasa 8 fue expresada en mayor grado en la línea infectada con los genes *gef* y *apoptina* conjuntamente.

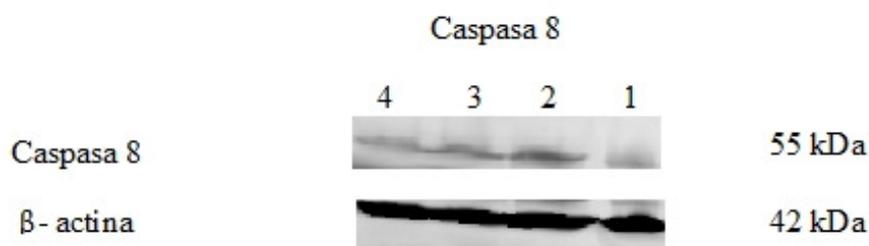


Figura 17: WB caspasa 8. 1.- DLD1, 2.- DLD1/Tet-On-*gef*-*apoptina* 3.-DLD1/Tet-On-*apoptina*, 4.- DLD1/Tet-On-*gef*.

9.5 CITOCROMO- C

La salida del citocromo c al citosol se manifestó en un aumento de la intensidad de las bandas en las líneas transducidas e inducidas respecto a la banda correspondiente a la línea control (Figura 18). Tomando como valor normalizado de la línea control el valor 1, los valores normalizados para el resto de las líneas fueron de, 2.4 para la línea sólo con *gef*, 3.41 para la línea sólo con *apoptina* y 2.38 para la línea con *gef* y *apoptina*

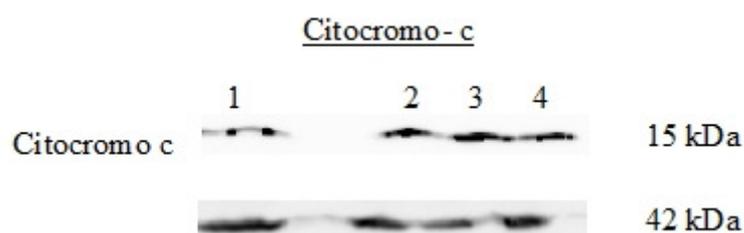


Figura 24: WB Citocromo- c. 1.- DLD1, 2.- DLD1/Tet-On-gef, 3.- DLD1/Tet-On-apoptina, 4.- DLD1/Tet-On-gef-apoptina

9. 6 BAX

La activación de Bax se manifestó en un aumento de la intensidad de las bandas en las líneas transducidas e inducidas respecto a la banda correspondiente a la línea control (Figura 19). Los valores normalizados y relativizados con respecto al control para las líneas DLD1/Tet-On-gef-apoptina, DLD1/Tet-On-apoptina y DLD1/Tet-On-gef fueron, 7.4, 7.11 y 6.74 respectivamente

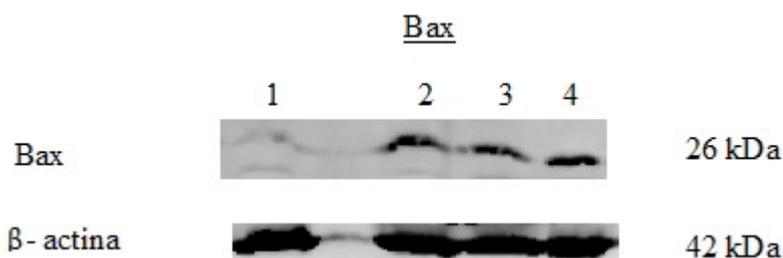


Figura 25: WB Bax. 1.- control DLD1, 2.- DLD1/Tet-On-gef, 3.- DLD1/Tet-On-apoptina, 4.- DLD1/Tet-On-gef-apoptina

Tras el análisis de los datos, es evidente que hay una activación de la apoptosis vía mitocondrial (aumento de expresión de Pp53, citocromo c, Bax y caspasa 9) pero observamos también una activación de la caspasa 8 que correspondería a la vía extrínseca de la apoptosis.

10. TERAPIA COMBINADA: DLD1 TRANSDUCIDA CON *gef* Y/O *apoptina* Y FÁRMACOS CITOTÓXICOS.

10.1 DETERMINACIÓN DE LA IC₅₀

Los fármacos utilizados fueron 5 fluorouracilo (5FU), oxaliplatino (OXA) e irinotecán (IRI). Las concentraciones que consiguen inhibir el 50% del crecimiento celular (IC₅₀) a los 6 días del tratamiento fueron, para los diferentes fármacos, y las distintas líneas celulares, las que se expresan en la siguiente tabla:

Línea	5FU	OXA	IRI
DLD1	5 +/- 0.25 μM	6,62 +/- 0.33 μM	2,67 +/- 0.13μM
DLD1/Tet-On-gef	2,31 +/- 0.15μM	2,38 +/- 0.12μM	2,09 +/- μM
DLD1/Tet-On-apoptina	2,22 +/- 0.12 μM	4,64 +/- 0.23μM	1,92 +/- 0.10μM
DLD1/Tet-On-gef-apoptina	1,98 +/- 0.09 μM	2,26 +/- 0.11μM	0,89 +/- 0.04μM

Tabla 10: Valor de la IC₅₀ para los fármacos 5FU, Oxaliplatino e Irinotecán en las diferentes líneas celulares.

Se apreció que la IC_{50} en todas las líneas transducidas con los genes e inducidas con Dox fue menor que en la línea control sin transducir. Comparando las líneas transducidas e inducidas con Dox se observó que la línea DLD1/Tet-On-gef-apoptina es la que consiguió la inhibición del crecimiento celular con menores concentraciones de fármacos. La IC_{50} para 5FU de la línea portadora de ambos genes supone un 39,6% de la IC_{50} del control, para oxaliplatino un 34,25% y para irinotecán un 33,68%, en todos los casos es menor a la mitad de la IC_{50} de la línea control.

Las células DLD1, así como las líneas DLD1 transducidas con los genes *gef* y/o *apoptina* fueron cultivadas con los fármacos 5FU, OXA, e IRI y con las combinaciones, 5FU + OXA, 5FU + IRI, OXA + IRI y 5FU+ OXA+ IRI con la dosis de la IC_{50} de cada línea.

10.2 ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN: TERAPIA COMBINADA CON MONOTERAPIA FARMACOLÓGICA

Para poder evaluar el efecto de la combinación de los genes y fármacos sobre el crecimiento celular, hemos realizado un análisis de la proliferación celular durante 8 días. Se analizaron los datos de proliferación de cada línea celular comparándolas en primer lugar, con la línea control DLD1 salvaje, pudiendo ver que todos los fármacos inducían una gran inhibición de la proliferación; y en segundo lugar, se comparó la proliferación de las distintas líneas con respecto a la línea **control tratada** para poder objetivar *el efecto, en sí, de la terapia combinada*.

En la realización de este experimento, se volvieron a confirmar los datos de proliferación obtenidos previamente, al estudiar el efecto de los genes *gef*, *apoptina* y la combinación de ambos, en comparación con la línea control. Se

ratificó, pues, el potente efecto antiproliferativo de la co-expresión de los genes *gef* y *apoptina* frente a su expresión por separado.

10.2.1 Terapia combinada con 5 fluorouracilo

A partir del cuarto día de tratamiento empezaron a notarse los efectos antitumorales del 5FU. Con este fármaco, se alcanzó un 91.78% de inhibición de la proliferación al octavo día del tratamiento en la línea DLD1 (Figura 20A).

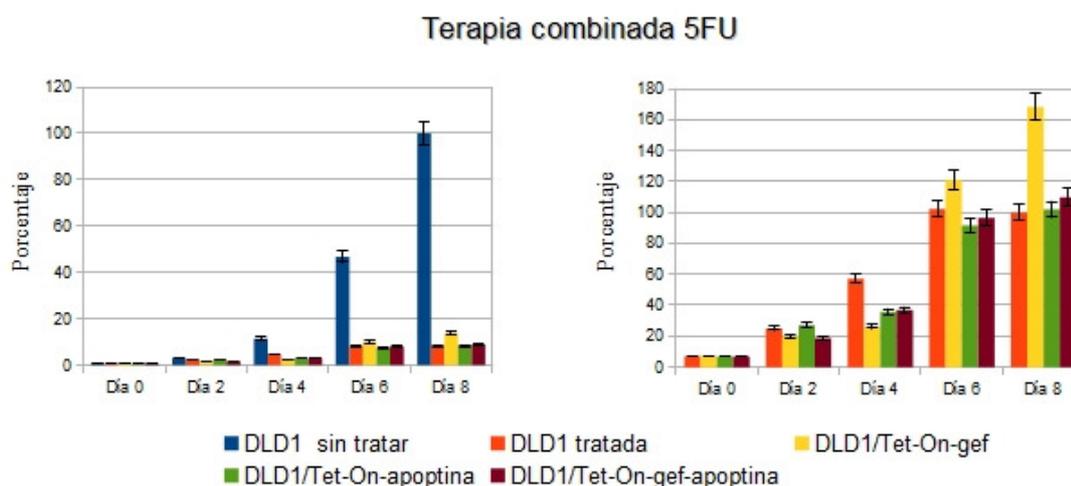


Figura 20: Terapia combinada con 5FU. **A:** Figura representativa de la inhibición del crecimiento celular de las líneas tratadas con 5FU respecto a la línea control sin tratar. **B:** Figura representativa de la inhibición del crecimiento celular de las líneas transducidas, inducidas con Dox y tratadas con 5FU, respecto a la línea control DLD1 tratada con 5FU.

Al comparar con respecto a la línea **control tratada con 5FU** (Figura 20B), observamos que en el segundo día del tratamiento, la co-expresión de los genes *gef* y *apoptina* al igual que la de *apoptina* sola tiene un efecto antiproliferativo claramente superior al fármaco solo y a la combinación *gef* / 5FU. Sin embargo, con el transcurso del tiempo esta diferencia desaparece, igualándose relativamente los resultados para la línea tratada con 5FU, *apoptina* / 5FU y *gef-apoptina* / 5FU

con solo un 2% y un 9% de aumento de la proliferación con respecto a la línea control tratada. Sin embargo, fue la línea tratada con *gef* / 5FU que presentó peores resultados, con un aumento del 68% de la proliferación con respecto a la línea control tratada.

10.2.2 Terapia combinada con oxaliplatino

A partir del segundo día del tratamiento, ya se apreciaron diferencias con respecto a la línea control sin tratar y en este caso también con respecto a la línea control tratada con OXA. Al octavo día del tratamiento la inhibición del crecimiento con respecto a la línea control fue del 67.34%, para la línea DLD1 salvaje (Figura 21A).

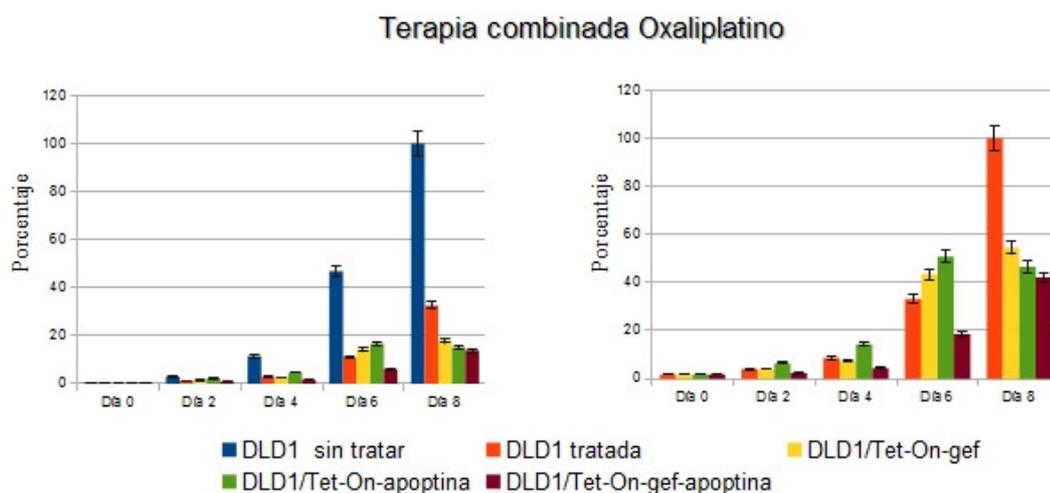


Figura 226: Terapia combinada con Oxaliplatino. **A:** Figura representativa de la inhibición del crecimiento celular de las líneas tratadas con oxaliplatino respecto a la línea control sin tratar. **B:** Figura representativa de la inhibición del crecimiento celular de las líneas transducidas, inducidas con Dox y tratadas con Oxaliplatino, respecto a la línea control DLD1 tratada con Oxaliplatino

Se mejoró el tratamiento cuando se asoció con la terapia combinada y esta mejoría fue mayor en la línea transducida con ambos genes. Con respecto a la línea control tratada, la línea Tet-On-gef-apoptina alcanzó un 57.89% de

inhibición de la proliferación al octavo día, mientras que la línea Tet-On-*gef* alcanzó un 45.46% y la línea Tet-On-*apoptina* un 53.54% (Figura 21B).

10.2.3 Terapia combinada con irinotecán

La línea DLD1 tratada con irinotecán con respecto a la línea control sin tratar sufrió una inhibición del crecimiento del 89.52% (Figura 22A). La inhibición global del crecimiento celular de las líneas transducidas con los genes respecto a la línea control sin tratamiento fue la más elevada con esta combinación en monoterapia

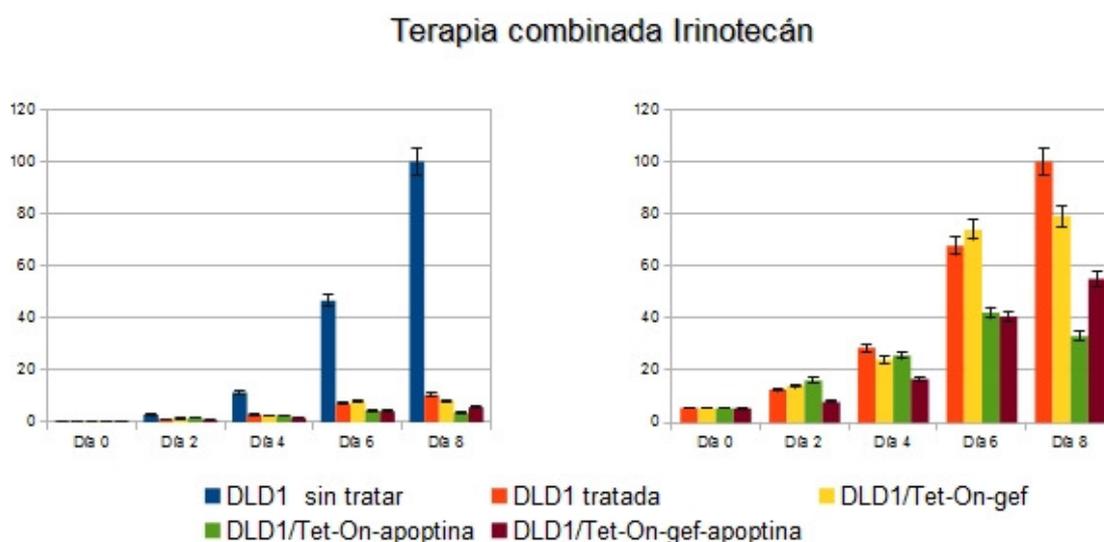


Figura 27: Terapia combinada con Irinotecán. **A:** Inhibición de la proliferación de las líneas tratadas con el fármaco con respecto a la línea control sin tratamiento. **B:** Efecto de la terapia combinada con *gef* y/o *apoptina* - IRI con respecto a la línea control tratada con IRI.

La inhibición de la proliferación con irinotecán y terapia combinada fue la que mejores resultados dio en monoterapia. Hemos objetivado una clara potenciación del efecto de IRI mediante la expresión de los genes *gef* y *apoptina*.

Así pues, mientras que, el efecto de estos genes por separado no empezó a notarse hasta el cuarto día del tratamiento, su efecto combinado se notó desde los dos días de tratamiento. Estos efectos duraron hasta el octavo día, siendo la línea de mejor respuesta, la infectada con *apoptina*, seguida por la que co-expresa *gef* y *apoptina* y por último la infectada con *gef*, con una inhibición del crecimiento, con respecto a la línea control tratada con el fármaco, del 66,98%, 44,90% y 20,92% respectivamente (Figura 22B).

10. 3 ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN DE LA TERAPIA COMBINADA: GENES *gef* Y *apoptina*/ DISTINTAS COMBINACIONES FARMACOLÓGICAS

De las cuatro combinaciones que se realizaron, la más efectiva fue 5FU/OXA/IRI, seguida de la combinación de OXA/IRI. La asociación de 5FU y OXA mejoró con respecto al tratamiento con OXA solamente, pero no con respecto al tratamiento con 5FU. En el caso de la combinación 5FU/IRI hubo mejoría con respecto al tratamiento sólo con IRI en la línea portadora de los dos genes pero no en el resto.

En términos generales, la co-expresión de los genes *gef* y *apoptina* sensibiliza las células frente a fármacos antitumorales usados en primera línea de tratamiento del cáncer de colon. La inhibición de la proliferación tumoral se ha producido con unas dosis IC_{50} hasta un 65,84%, 66,33% y 60.42% mas bajas en el caso de oxaliplatino, irinotecan y 5-flourouracilo respectivamente, en comparación con la línea control tratada.

10.3.1 5FU/oxaliplatino/irinotecán

Con el único uso de la combinación 5FU/OXA/IRI, se consiguió una inhibición del crecimiento con respecto a la línea control DLD1 sin tratar del 96,57%, al octavo día de tratamiento (Figura 23A).

Comparando con la línea DLD1 tratada con OXA, la proliferación de la línea portadora del gen *gef* fue un poco superior (103.6%), mientras que la línea portadora de *apoptina* se inhibió en un 33.33% y la línea con ambos genes en un 43.48%. El efecto como se aprecia en las gráficas se deja notar desde el día 2, más acentuada en la línea que co-expresa los genes *gef* y *apoptina* (Figura 23B).

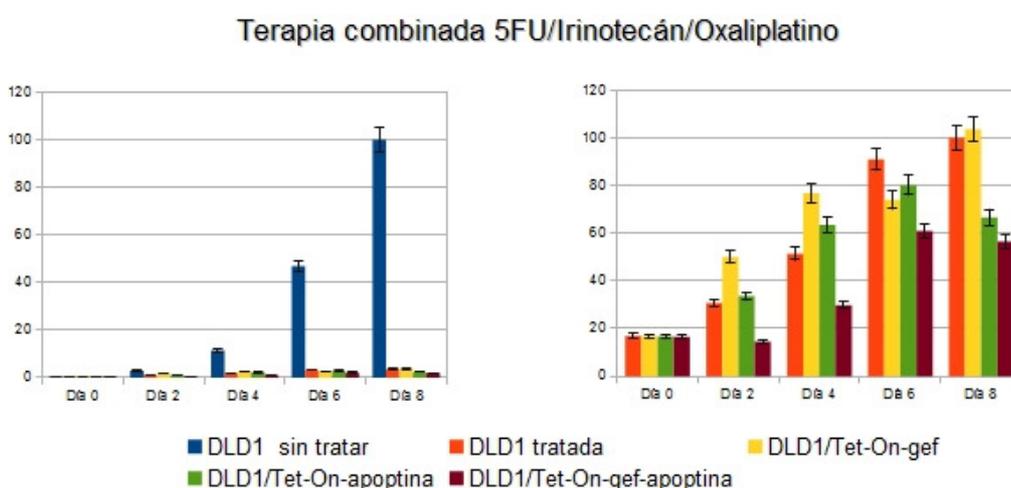


Figura 23: Terapia combinada con la triple terapia farmacológica 5FU/IRI/OXA. La respuesta al tratamiento de todas las líneas inducidas y la línea control tratada con respecto a la línea control no tratada se muestra en la figura **A**. La respuesta de las líneas inducidas con respecto a la línea control tratada con 5FU/IRI/OXA, se muestra en la figura **B**.

El

tratamiento con la combinación de estos tres fármacos en la línea con *gef* y *apoptina* inducidos, fue el más satisfactorio de todos los probados llegando a superar los 98 % de inhibición de la proliferación en comparación con la línea salvaje (Figura 23A). Estos resultados son muy satisfactorios teniendo en cuenta que las concentraciones de los fármacos usadas en la línea que co-expresa *gef* y *apoptina* fueron más del 60% inferior a las usadas en la línea control.

10.3.2 Oxaliplatino/Irinotecán

Para esta combinación la inhibición de la proliferación al octavo día con respecto a la línea control sin tratamiento fue del 93.53% en DLD1 tratada (Figura 24A).

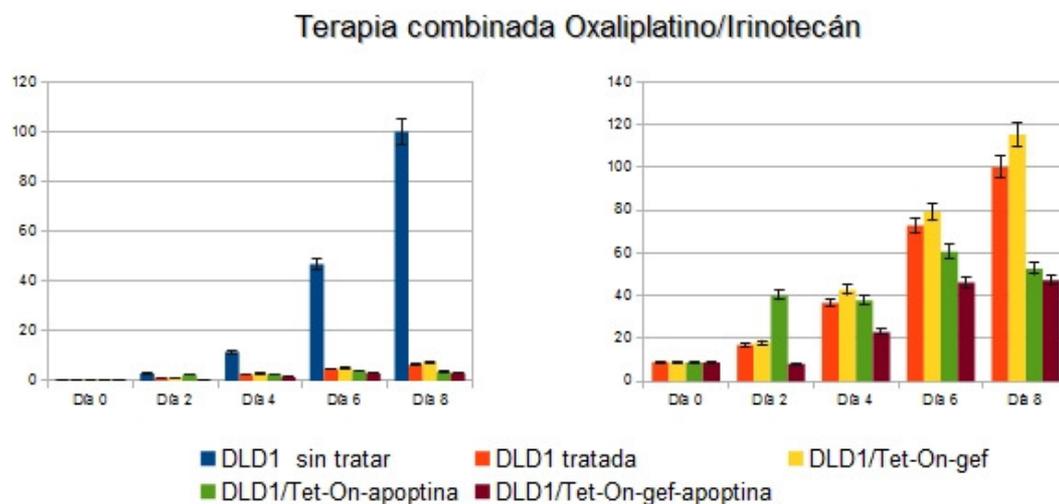


Figura 24: Terapia combinada con Oxaliplatino e Irinotecán. **A:** Comparación de las diferentes líneas tratadas con la línea control salvaje. **B:** Efecto de la asociación de *gef* y/o *apoptina* con la IC_{50} de OXA/IRI con respecto a la línea control tratada solo con los dos fármacos.

Nuestros resultados demuestran una clara potenciación del efecto antiproliferativo (Figura 24B) de los fármacos cuando se combinan con la *apoptina* llegando a alcanzar en el octavo día de tratamiento un 47.4% de inhibición de la proliferación. Además, este efecto mejora considerablemente con la acción de ambos genes (52.71%). La terapia mejoró, y en este caso, hubo un ligero aumento de la respuesta si lo comparamos con la monoterapia con oxaliplatino o con irinotecán.

Sin embargo, la combinación *gef*/OXA/IRI ha obtenido peores resultados.

10.3.3 5Flourouracilo/Irinotecan

Como comentamos al inicio, la combinación con estos dos fármacos, provocó una mayor inhibición de la proliferación que la monoterapia con irinotecán sólo en la línea *gef-apoptina*, alcanzando un 95.1% de inhibición del crecimiento con respecto a la línea control sin tratamiento, frente al 94.23% que se alcanzaba en el tratamiento con Irinotecán. Para la línea control no hubo mejoría, 86.66%, y tampoco para la línea con *gef*, con cifras muy similares al tratamiento con irinotecán, 91,52%. En la línea *apoptina* tampoco se aprecian mejores resultados que con la monoterapia, 93,68%. Aunque al comparar con la línea control tratada, podemos comprobar una vez más, la mejoría al asociar los fármacos con la terapia génica, mejoría que se incrementa aún más en la línea *gef-apoptina* (Figura 25A).

La inhibición de la proliferación respecto a la línea control tratada sería del 36,4% para la línea sólo con *gef*, 52,57% para la línea sólo con *apoptina* y 63,25% para la línea con *gef-apoptina* (Figura 25B).

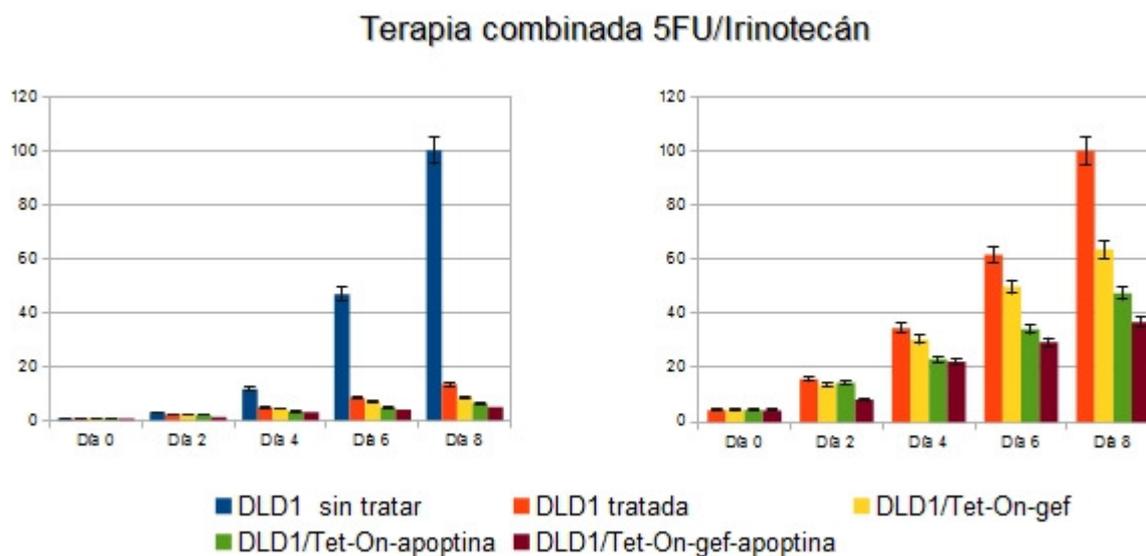


Figura 25: Terapia combinada 5FU/Irinotecán. Figura de la izquierda comparación con respecto a la línea control sin tratamiento. Figura de la derecha comparación de las líneas transducidas, inducidas y tratadas, con respecto a la línea control tratada.

10.3.4 5Flourouracilo/Oxaliplatino

La inhibición de la proliferación, en general, haciendo la comparación con la línea control sin tratar, es mayor que con el tratamiento sólo con oxaliplatino (salvo para la combinación con los genes *gef-apoptina*) pero no si se compara con el tratamiento con 5FU. Con respecto a la línea control sin tratamiento la inhibición fue del 81.16% para DLD1 tratada (Figura 26A).

Comparada con la línea control tratada, las cifras serían de un 37.4% para la línea que expresa el gen *gef*, 52.57% para la línea que expresa el gen de la *apoptina* y una no disminución del crecimiento en la línea con *gef-apoptina* en el octavo día de tratamiento, sin embargo, hasta el día 6 la línea con los genes *gef-apoptina* se comportó de forma muy similar a la línea portadora sólo del gen *gef* (Figura 26B).

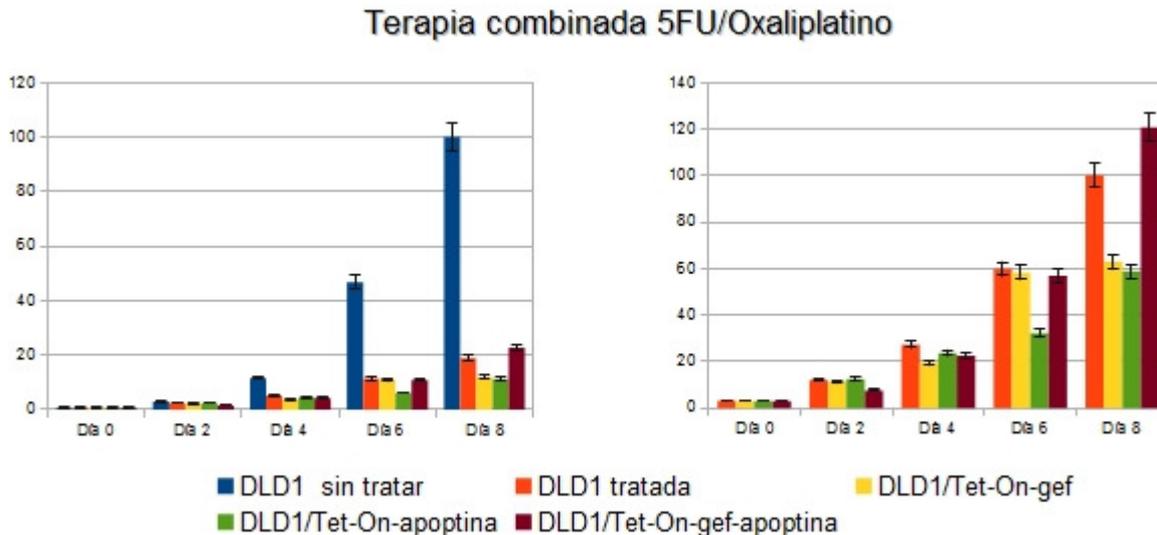


Figura 26: Terapia combinada 5FU/Oxaliplatino. **A:** Comparación con la línea control sin tratar. **B:** Comparación con la línea control tratada.

Analizados los datos, se pudo concluir que en monoterapia el fármaco que mayor respuesta consiguió fue irinotecán en las líneas DLD1/Tet-On-gef-apoptina ya que alcanzamos un 94.22% de inhibición de la proliferación con tan solo 0.89 μM en comparación con DLD1/Tet-On-apoptina que alcanzó un 96.59% de inhibición de la proliferación con 1.92 μM de IRI. El segundo mejor fármaco fue 5FU, aunque en este caso no hubo un incremento en la respuesta al asociarse a la acción de los genes suicidas. El peor fármaco, en términos globales, fue oxaliplatino, alcanzando la menor tasa de inhibición de la proliferación en todas las líneas (Figura 27).

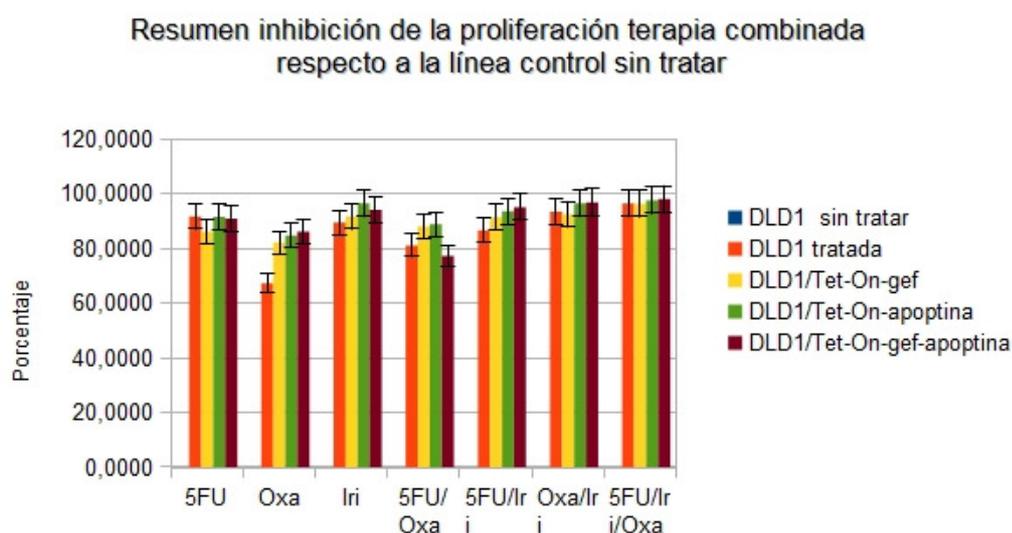


Figura 27: Inhibición de la proliferación de todas las líneas respecto a la línea control sin tratamiento. La línea control sin tratamiento, tiene una inhibición del 0% motivo por el cual se marca en la leyenda pero no se aprecia en la figura.

Del análisis de la terapia con varios fármacos se dedujo que, la combinación más efectiva, con mayor inhibición de la proliferación con respecto al control sin tratar fue la triple terapia con 5FU, OXA e IRI y, en concreto, la mejor respuesta se obtuvo al combinarla con la acción de los genes *gef* y *apoptina*. Esta terapia se seguiría de la combinación OXA/IRI, cuyo mejor

resultado también fue al asociarse el tratamiento farmacológico con la acción de ambos genes. La tercera mejor combinación en la terapia con varios fármacos sería la de 5FU e IRI en la línea con los genes *gef* y *apoptina* que sería la única combinación que mejora la respuesta con respecto al tratamiento sólo con IRI o sólo con 5FU (Figura 27).

11. ANÁLISIS DEL EFECTO APOPTÓTICO EN TERAPIA COMBINADA

11.1 CONTROL SIN TRATAMIENTO

Para cuantificar el alcance de la apoptosis mediante citometría de flujo, al igual que se comenta anteriormente, se tiñeron las células simultáneamente con anexina V-FITC y con Ioduro de Propidio (IP). La línea control presentó una viabilidad 99.8% y tan solo un 0.1% de necrosis y un 0.1% de apoptosis temprana (Figura 28).

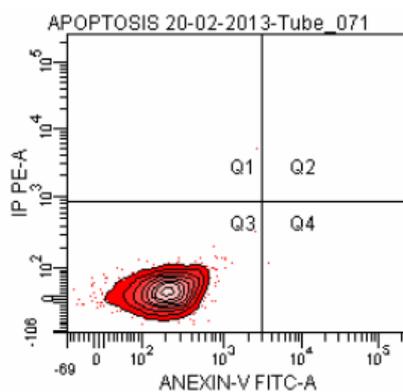


Figura 28: Estudio de apoptosis en la línea DLD1 salvaje: Q1: Células necróticas (0.1); Q2: Células apoptóticas tardías (0); Q3: Células Viables (99.8); Q4: Células apoptóticas tempranas (0.1)

11.2 TRATAMIENTO CON 5 FLUOROURACILO.

Las células fueron tratadas durante 24 horas con la IC_{50} de cada una de las cuatro líneas celulares (Figura 29).

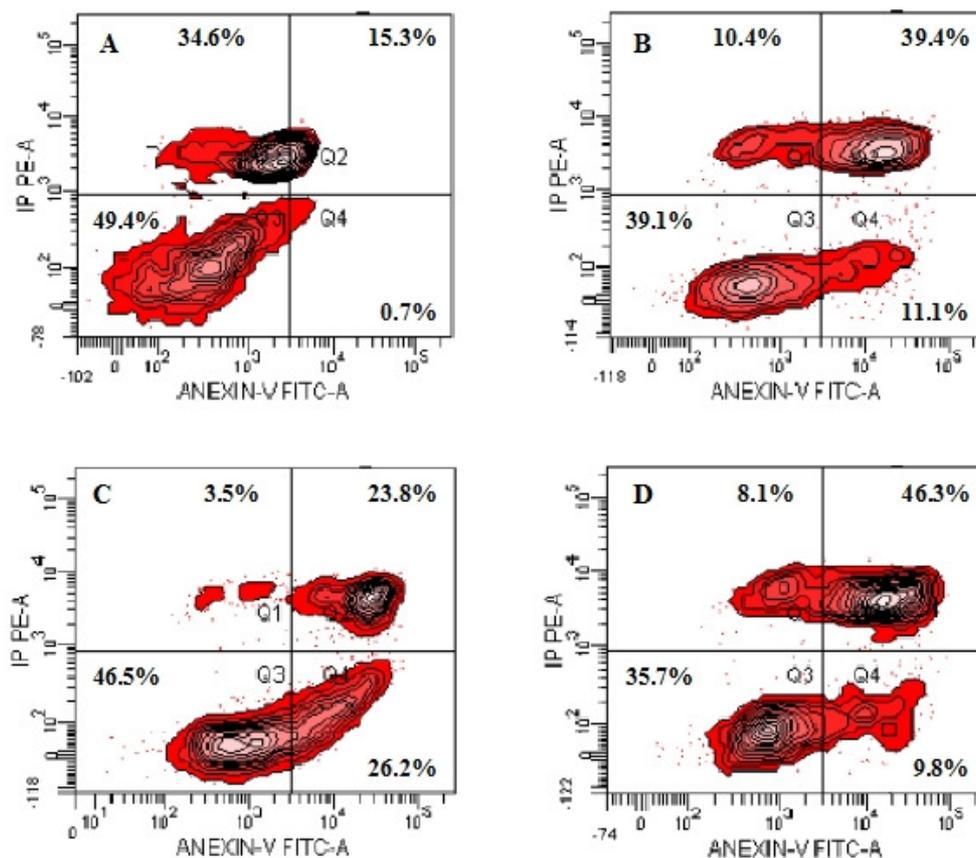


Figura 29: Estudio de apoptosis en terapia combinada con 5FU. (A) DLD1 tratada, (B) DLD1/Tet-On-gef, (C) DLD1/Tet-On-apoptina, (D) DLD1/Tet-On-gef-apoptina.

La línea control, DLD1, tratada con el fármaco mostró valores de viabilidad del 49.4%, tuvo un 0.7% de apoptosis temprana, un 15.3% de apoptosis tardía y un 34.6% de necrosis, en la línea control, aumenta la necrosis en comparación con las líneas transfectadas. La línea DLD1/Tet-On-gef, tras 24

horas de tratamiento mostró que el 39.1% de las células eran viables, el 11.1% estaban en apoptosis temprana, un 39.4% en apoptosis tardía y un 10.4% en necrosis. La línea DLD1/Tet-On-apoptina mostró un 46.5% de viabilidad celular (similar a la línea control), un 26.2% de las células estaban en apoptosis temprana, un 23.8% en apoptosis tardía y un 3.5% en necrosis. En la línea con ambos genes, DLD1/Tet-On-gef-apoptina, tras 24 horas de tratamiento eran viables el 35.7%, un 9.8% presentaban apoptosis temprana, un 46.3% apoptosis tardía y un 8.1% eran necróticas (Figura 29).

La similitud de la línea control con las líneas transfectadas concuerda con el estudio de proliferación realizado, ya que en el tratamiento con 5FU no se apreciaron diferencias entre líneas.

11.3 TRATAMIENTO CON OXALIPLATINO.

La línea control tuvo un 83.7% de viabilidad celular, un 1.4% de las células estaban en apoptosis temprana, un 1.1% en apoptosis tardía y un 13.8% en necrosis. La diferencia con respecto a las líneas transducidas, en este caso, fue más evidente. DLD1/Tet-On-gef un 51.2% de viabilidad, un 5.9% de apoptosis temprana, un 29.3% de apoptosis tardía y un 13.6% de necrosis. DLD1/Tet-On-apoptina, un 51.3% de viabilidad, un 18.7% de apoptosis temprana, un 27.1% de apoptosis tardía y un 2.9% de necrosis. DLD1/Tet-On-gef-apoptina presentó un 32.8% de viabilidad, un 4.6% de apoptosis temprana, un 58.8% de apoptosis tardía y un 3.8% de necrosis (Figura 30).

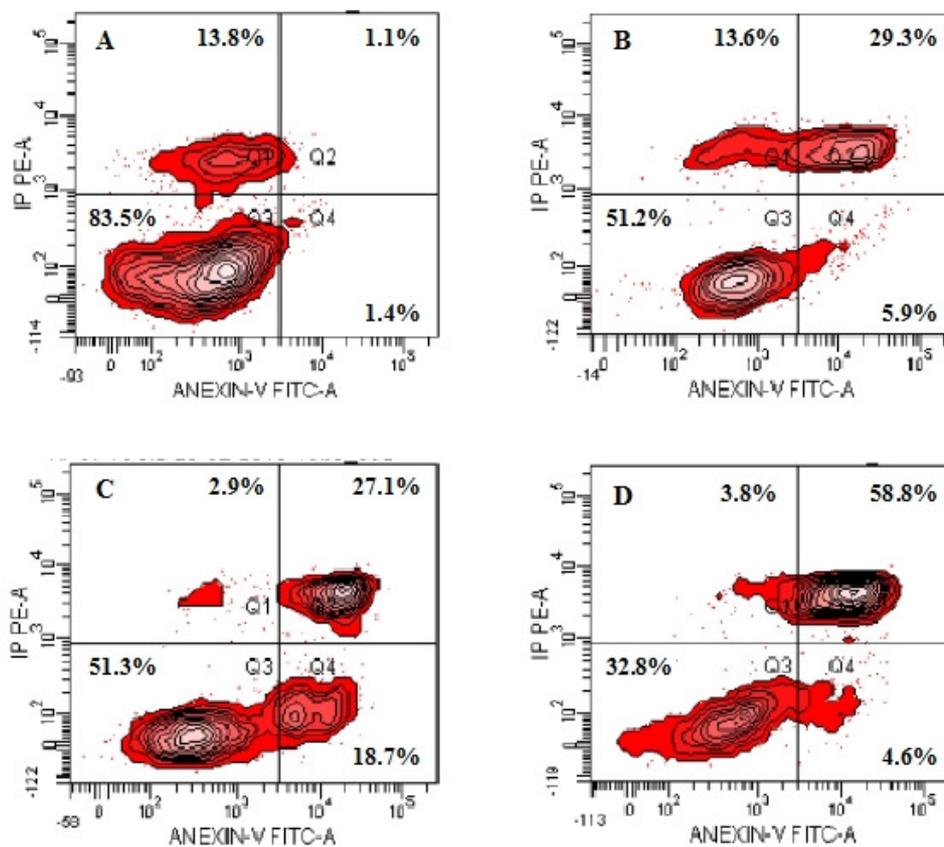


Figura 30: Estudio de apoptosis en terapia combinada con Oxaliplatino. (A) DLD1 tratada, (B) DLD1/Tet-On-gef, (C) DLD1/Tet-On-apoptina, (D) DLD1/Tet-On-gef-apoptina

Con este fármaco el estudio de proliferación objetivó evidente mejoría en la respuesta al tratamiento en las células transducidas con ambos genes.

11.4 TRATAMIENTO CON IRINOTECÁN.

En la línea control, los valores encontrados fueron del 56.6%, 1.7%, 4.4% y 32.3% de viabilidad, apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis, respectivamente.

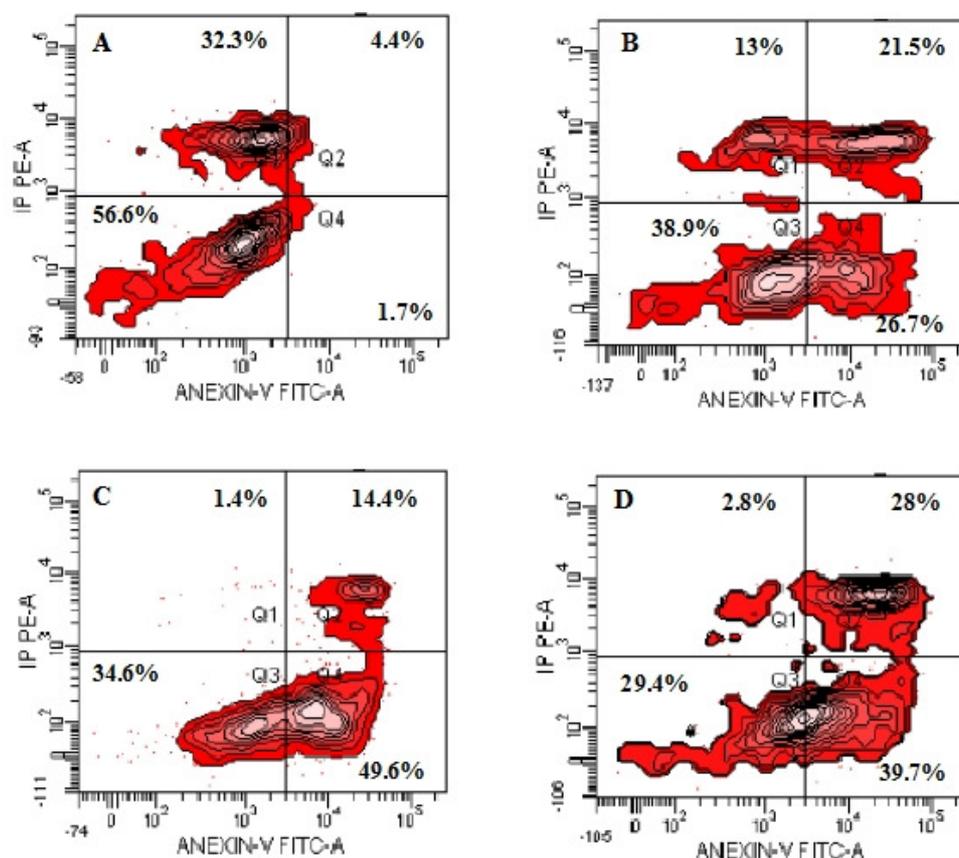


Figura 31: Estudio de apoptosis en terapia combinada con irinotecán. (A) DLD1 tratada, (B) DLD1/Tet-On-gef, (C) DLD1/Tet-On-apoptina, (D) DLD1/Tet-On-gef-apoptina.

La línea portadora de *gef* presentó un 38.9% de viabilidad, un 13.2 de apoptosis temprana, un 21.5% de apoptosis tardía y un 26.7% de necrosis. La línea transducida con *apoptina* presentó un 34.6% de viabilidad, un 49.6% de apoptosis temprana, un 14.4% de apoptosis tardía y un 1.4% de necrosis. La línea transducida con los dos genes presentó un 29.4%, 39.7, 28% y 2.8% de viabilidad, apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis respectivamente (Figura 31). Aunque finalmente al octavo día la línea portadora de *apoptina* tuvo mejor respuesta al tratamiento que la línea que contiene los dos genes, si se analizan pormenorizadamente los datos de proliferación, hasta el sexto día el crecimiento fue menor en la línea con ambos genes, por lo que se entiende que en las primeras

24 horas de tratamiento, la respuesta pudiese ser mejor en la línea con ambos genes.

11.5 TRATAMIENTO CON 5 FLUOROURACILO /OXALIPLATINO/ IRINOTECÁN.

El tratamiento con la triple terapia farmacológica asociado a terapia génica, vuelve a ser el tratamiento con mejores resultados (Figura 32). Así, incluso en la línea control tratada encontramos un 40.3% de viabilidad celular, un 0.8% de apoptosis temprana, un 9% de apoptosis tardía, y un 49.9% de necrosis. La línea portadora del gen *gef* presentó un 30.9% de viabilidad, un 15.6% de apoptosis temprana, un 50.8% de apoptosis tardía y un 2,7% de necrosis. La respuesta en la línea con *gef* y *apoptina* es similar a la que encontramos en la línea con *apoptina* en cuanto a viabilidad celular, 19% para *gef-apoptina* y 19.2% para la línea con *apoptina* sola, la necrosis también es similar 2.9% en la línea con ambos genes y 1.4% en la línea con *apoptina* sola, la apoptosis tardía en la línea portadora de *gef-apoptina*, es del 73.4% y en la línea con *apoptina* es del 62%, la apoptosis temprana aumenta en la línea sólo con *apoptina*, 17.3%, frente al 4.6% en la línea con ambos genes.

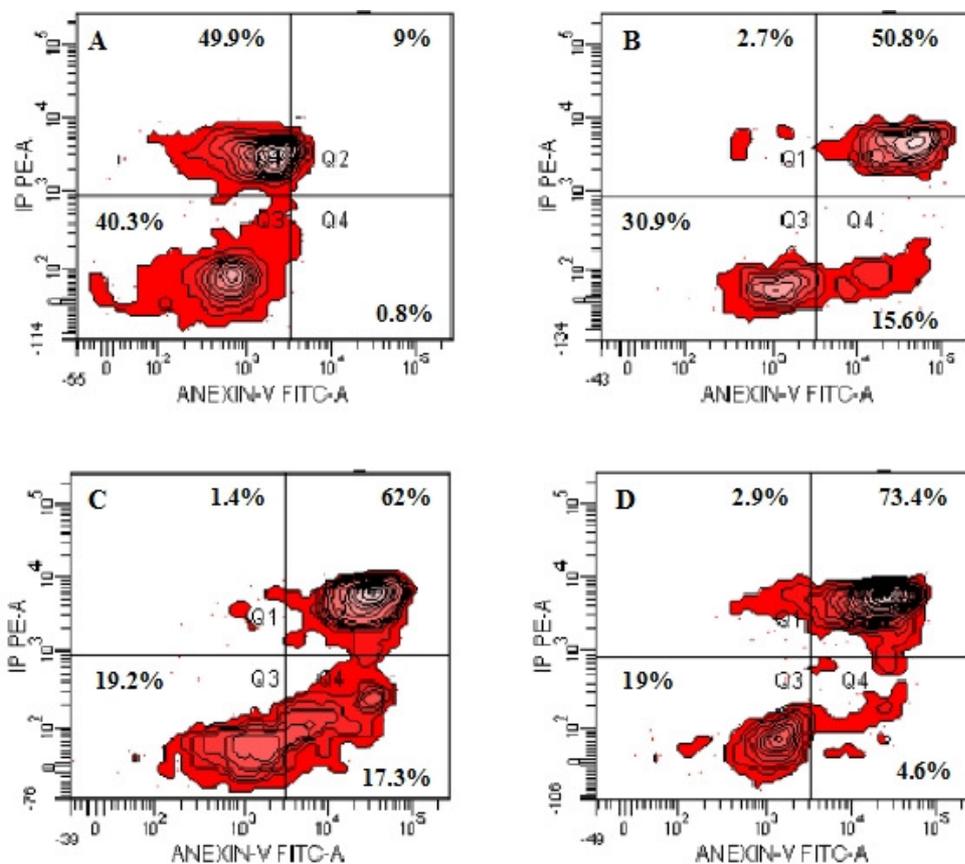


Figura 32: Estudio de apoptosis en terapia combinada con 5FU/Oxaliplatino/Irinotecán. (A) DLD1 tratada, (B) DLD1/Tet-On-gef, (C) DLD1/Tet-On-apoptina, (D) DLD1/Tet-On-gef-apoptina.

11.6 TRATAMIENTO CON OXALIPLATINO/IRINOTECÁN.

Para la línea control encontramos un 60.2% de viabilidad, un 3,2% de apoptosis temprana, un 15,9% de apoptosis tardía y un 20.7% de necrosis. La línea con *gef* presentó un 71.4% de viabilidad, un 9,1% de apoptosis temprana, un 15.7% de apoptosis tardía y un 3,9% de necrosis. En la línea con *apoptina* 47,6%, 31,7%, 19,3% y 1,4% viables, en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis, respectivamente. Para la línea con *gef-apoptina* hubo un 24,3%, 26,1%, 49% y

0,5% de viabilidad, apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis respectivamente (Figura 33).

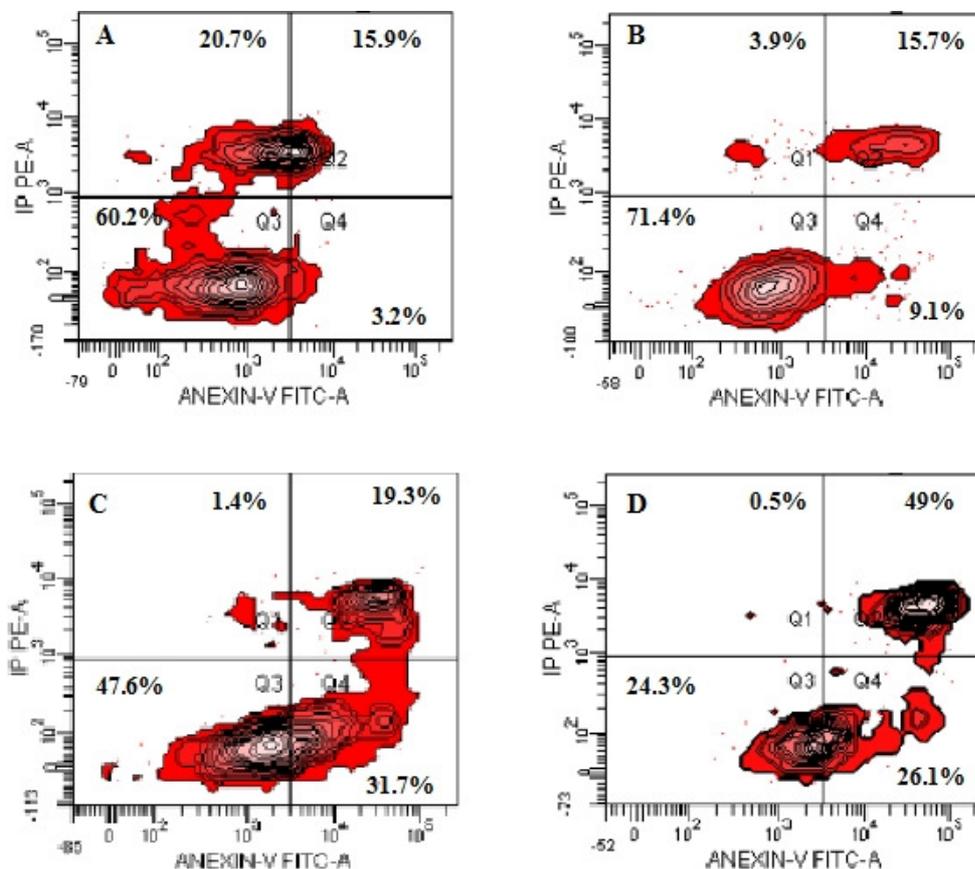


Figura 33: Estudio de apoptosis en terapia combinada con Oxaliplatino/Irinotecán. (A) DLD1 tratada, (B) DLD1/Tet-On-gef, (C) DLD1/Tet-On-apoptina, (D) DLD1/Tet-On-gef-apoptina.

11.7 TRATAMIENTO CON 5FU/OXALIPLATINO

La línea control presentó un 56.7%, 0.4%, 5.7% y 37.2% de células viables, en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis respectivamente. DLD1/Tet-On-gef se obtuvo un 41.9% de células viables, 41.9%, apoptosis tardía, 10.5% de apoptosis temprana y 5.7% de necrosis. DLD1/Tet-On-apoptina 40.7%, 23.2%, 34.7% y 1.4% de células viables, en apoptosis temprana, tardía y necrosis respectivamente. DLD1/Tet-On-gef-apoptina 32.8%, 3.8%, 59.2% y 4.1% de

células viables, en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis respectivamente (Figura 34).

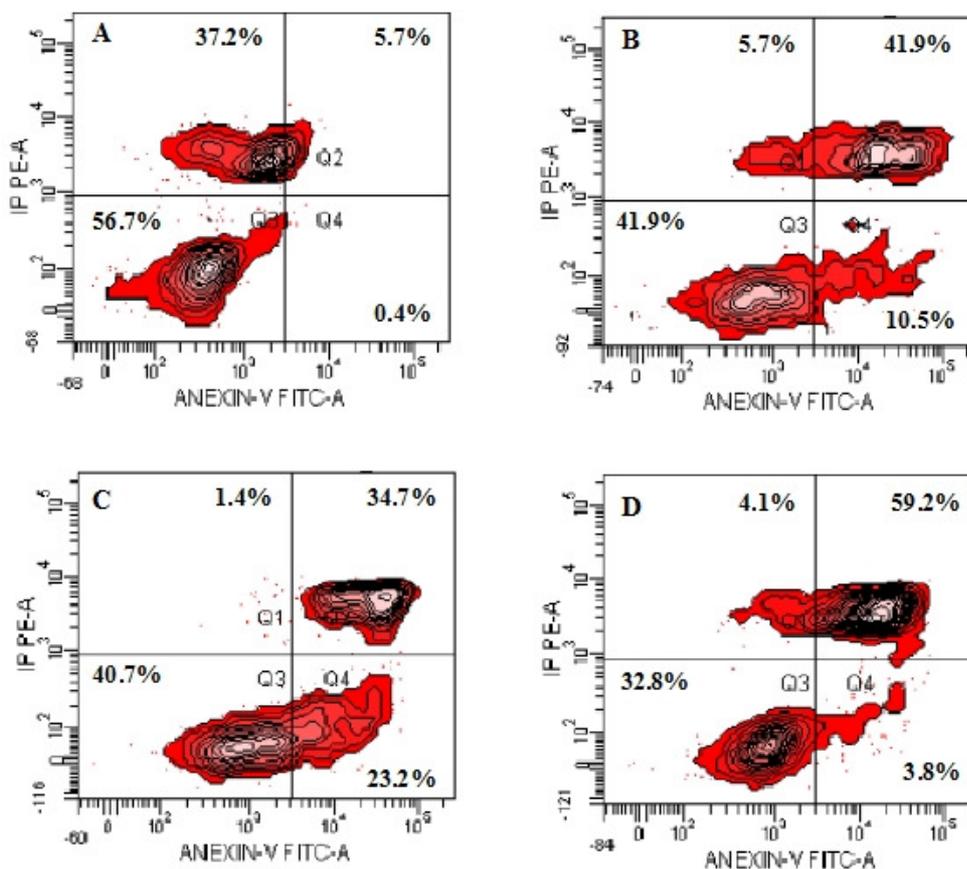


Figura 34: Estudio de apoptosis en terapia combinada con 5FU/Oxaliplatino. (A) DLD1 tratada, (B) DLD1/Tet-On-gef, (C) DLD1/Tet-On-apoptina, (D) DLD1/Tet-On-gef-apoptina.

11.8 TERAPIA CON 5FU/IRINOTECÁN

La viabilidad en la línea DLD1 fue del 53.4% (frente al 49.4% con 5FU), la apoptosis temprana del 1.3%, apoptosis tardía del 10.9% y necrosis 34.4%. DLD1/Tet-On-gef presentó mayor apoptosis tras 24 horas de tratamiento en terapia combinada que las monoterapias con 5FU o con irinotecán con una viabilidad del 24.3% (39,1% con 5FU y 38,9% con irinotecán), apoptosis

temprana 14.5%, apoptosis tardía 55.7% y un 5.4% de necrosis. DLD1/Te-On-apoptina, mostró aumento de apoptosis con respecto al tratamiento en monoterapia con 5FU, la viabilidad en este caso fue del 31.8%, apoptosis temprana 35.6%, apoptosis tardía 30.5% y necrosis 2.1%. DLD1/Tet-on-gef-apoptina mostró un 39.7% de viabilidad (35.7% en el tratamiento con 5FU), apoptosis temprana 40.2%, apoptosis tardía 19.2% y necrosis 1%.

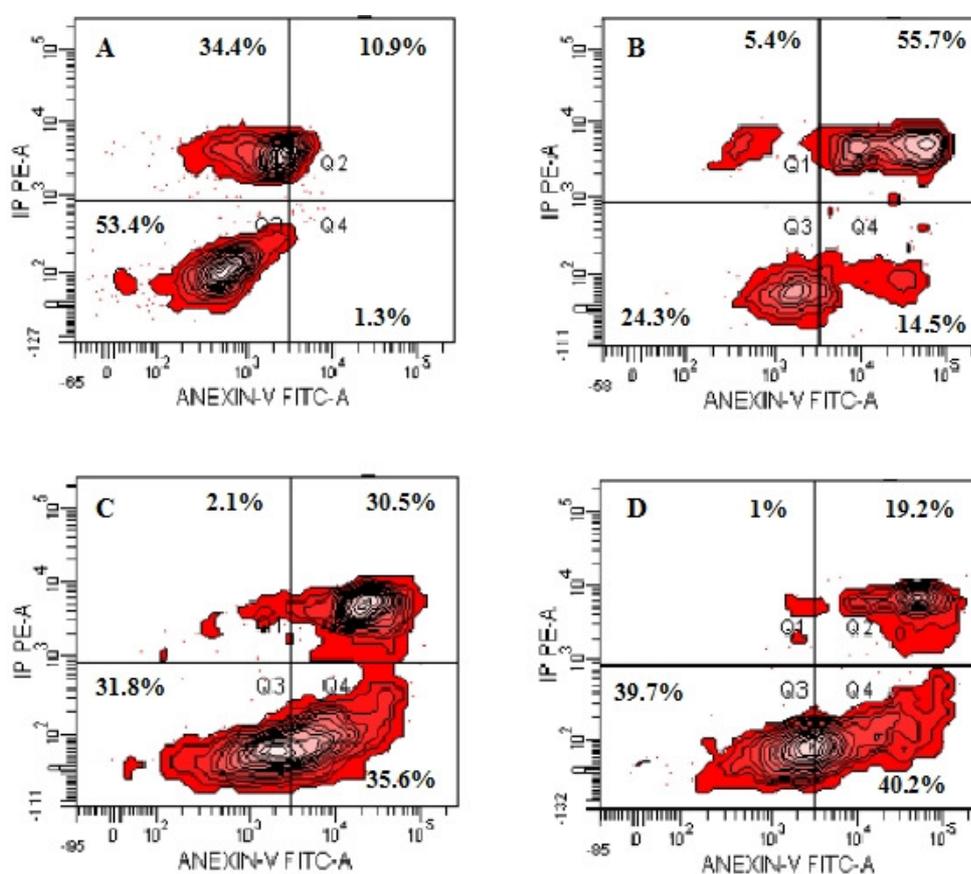


Figura 35: Estudio de apoptosis en terapia combinada con 5FU/Irinotecán. (A) DLD1 tratada, (B) DLD1/Tet-On-gef, (C) DLD1/Tet-On-gef-apoptina.

A continuación se muestra una gráfica resumen (Figura 36) de la viabilidad celular en las diferentes líneas y con los distintos tratamientos utilizados.

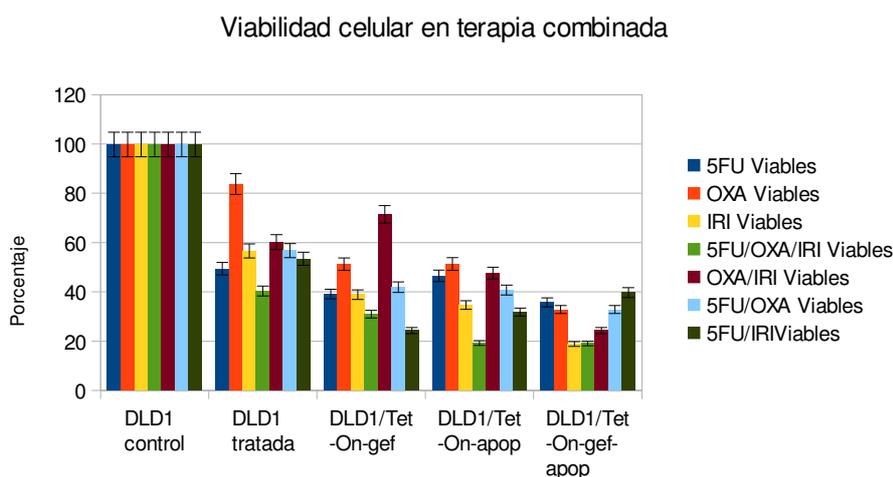


Figura 36: Comparación de la viabilidad celular tras 24 horas de tratamiento con los distintos fármacos y sus combinaciones en las distintas líneas celulares.

Una vez analizados todos los datos pudimos concluir que, tras 24 horas de tratamiento se ratifica que la mejor combinación es la triple terapia con 5 Fluorouracilo, oxaliplatino e irinotecán, en todas las líneas, mejorando la respuesta, con una disminución de la viabilidad mayor en las líneas DLD1/Tet-On-gef-apoptina y DLD1/Tet-On-apoptina. Con los fármacos en monoterapia también se pudo ratificar la mayor eficacia de irinotecán en todas las líneas salvo en DLD1 en la que la mejor respuesta en monoterapia se alcanza con 5FU. Estos datos concuerdan con los resultados de proliferación tras 8 días de tratamiento, expuestos en otros apartados. Oxaliplatino ofreció la peor respuesta, aunque, volvió a mejorar de manera significativa, cuando se asoció a terapia combinada. En politerapia, la menor viabilidad celular se consiguió en las células portadoras

de ambos genes, salvo para la combinación 5FU/IRI, en cuyo caso la menor viabilidad celular se alcanzó en la línea DLD1/Tet-On-gef.

V. DISCUSIÓN

El cáncer colorrectal es una causa importante de mortalidad, con una supervivencia a los 5 años de aproximadamente el 50% (Puglisi y cols., 2013). Células de carcinoma de colon a menudo resultan resistentes a las terapias convencionales, y hay una necesidad urgente de nuevos tratamientos alternativos (Shekhar, 2011). Uno de estos enfoques es la terapia génica, es decir, la entrega de material genético a las células de mamíferos con fines terapéuticos (Duarte y cols., 2012; Boulaiz y cols., 2008, 2005). La terapia génica basada en el uso de genes suicidas es una estrategia prometedora para el tratamiento del cáncer avanzado. Se basa en la entrega de genes cuyo producto es tóxico o puede conducir a la producción de un metabolito tóxico en conjunción con la administración de un profármaco (Chen y cols., 2012). La terapia génica con genes suicidas se puede dividir de acuerdo con su mecanismo de acción entre: terapia génica de acción indirecta o sistema prodroga/droga, basada en el uso de los genes que expresan enzimas que permiten la conversión de un compuesto no tóxico en un fármaco letal, y terapia génica de acción directa, que se basa sobre el uso de genes que expresan moléculas tóxicas que pueden comprometer la viabilidad de la célula al alterar su membrana.

Los sistemas prodroga/droga más investigados son: el gen de *la timidinkinasa* del virus herpes simplex (HSV-tk), que confiere a las células neoplásicas una sensibilidad al ganciclovir inhibiendo el crecimiento celular *in vivo* e *in vitro* (Qu y cols., 2013; Lafitte y cols., 2012; Finzi y cols., 2011), y el gen de la citosina desaminasa (CD) de *Escherichia coli*, la cual convierte el agente antifúngico no tóxico 5-fluorocitosina (5-FC) en 5-fluorouracilo (5-FU) (Lee y cols., 2013; Negroni y cols., 2007). Este sistema confiere una gran sensibilidad a las células transfectadas frente al antifúngico 5-fluorouracilo (5-FU), pero además induce un efecto tóxico muy significativo alrededor de las células tumorales (por ejemplo carcinoma hepatocelular) infectadas con él (Lampe y cols., 2013; Kuriyama y cols., 1999; Huber y cols., 1994). Este efecto es menos significativo en el mismo

tipo celular infectado con otros sistemas tales como el de la timidin kinasa del virus herpes simples (Kuriyama y cols., 1999). Sin embargo, estos sistemas tienen dos limitaciones principales, la necesidad de convertir un profármaco no tóxico en un metabolito tóxico y la limitada biodisponibilidad de la droga que activa el metabolito (Altaner 2008; Dachs et al, 2005). Estos inconvenientes se han detectado también en estudios pre-clínicos en un modelo de cáncer de páncreas *in vivo* (Fogar y cols., 2003). Es por ello que varios grupos están buscando alternativas a las terapias basadas en el uso de sistemas prodroga/droga.

Los genes suicidas que codifican proteínas tóxicas directamente en las células cancerosas se han propuesto como alternativa a los sistemas activadores de profármacos. A diferencia de los genes suicidas clásicos, que actúan mediante la interrupción de la síntesis de ADN y que solamente tienen como diana las células que se dividen rápidamente, estas nuevas toxinas también pueden destruir las células tumorales quiescentes. Los genes tóxicos de organismos no eucarióticos, tales como bacterias, plantas, virus y bacteriófagos se han utilizado con éxito para este propósito en experimentos de terapia génica del cáncer (Yang y cols., 2013; Showalter y cols., 2008; Zhao y cols., 2008; Agu y cols., 2007; Geden y cols., 2007; Sandvig y cols., 2005). Se estima que una sola molécula de la toxina de la difteria puede matar a las células diana (Yamaizumi y cols., 1978), y esta toxicidad ha sido utilizada por numerosos investigadores para erradicar las células cancerosas (Fiorentini y cols., 2013; Yang y cols., 2013; Amit y cols., 2012; Zheng y cols., 2003; Lee y cols., 2002). Un mecanismo de destrucción celular similar se ha observado en derivados de plantas de ricina y exotoxina de *pseudomonas*, que también han sido examinadas como productos eficaces contra el cáncer (Kawakami y cols., 2001; Martin y cols., 2000). La estreptolisina O, una toxina secretada por las bacterias del género *Streptococcus*, ha puesto en evidencia un efecto contra el cáncer *in vitro* e *in vivo* (Yang y cols., 2006; Bhakdi y cols., 1996). El gen *E* del fago $\phi X174$ indujo una intensa destrucción de células

de melanoma y cáncer de colon (Rama y cols., 2011; 2010; Ortiz y cols., 2009). La *apoptina*, una pequeña proteína codificada por el virus de la anemia del pollo, no tiene ningún efecto sobre las células normales, pero induce selectivamente la apoptosis en diversas células cancerosas, incluyendo el hepatoma, el osteosarcoma, el melanoma, y cánceres de colon, pulmón, mama, próstata, cuello uterino, y estómago, entre otros (Zhou y cols., 2012). Nuestro grupo informó del potencial antitumoral del gen *gef*, un miembro de una familia de genes que codifica genes suicidas en *E. coli*. La activación de esta proteína induce la detención de la respiración celular y la consecuente muerte de la bacteria, y se demostró que el gen *gef* puede inducir cambios morfológicos, la detención del ciclo celular y la apoptosis en células tumorales humanas (Boulaiz y cols., 2011; 2008; 2005; 2003; Prados y cols., 2010).

A pesar de los buenos resultados obtenidos en numerosos estudios *in vitro* e *in vivo*, la terapia génica con genes suicidas no ha logrado los resultados esperados en pacientes con cáncer. Sin embargo, estudios preclínicos recientes de modelos de cáncer indican que este tratamiento tiene un gran potencial cuando se aplica en combinación con otras modalidades terapéuticas. La terapia génica combinada mejora la eficacia terapéutica y supera las deficiencias de las terapias de genes individuales, y se ha convertido en una línea de investigación importante en el desarrollo de estrategias antitumorales (Liu y cols., 2011; Lee y cols., 2010). En la doble terapia con genes suicidas, las células cancerosas transfectadas con vectores que expresan dos genes suicidas de forma estable pueden generar sus productos, y mejoran su sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos (Kojima y cols., 2009). Así, varios autores han demostrado que la combinación de los sistemas tradicionales TK/GCV con CD/5-FC ofrece una mayor eficacia terapéutica en comparación con la terapia génica con un único gen suicida, permitiendo obtener mejores resultados mediante concentraciones inferiores de fármaco (Su y cols., 2013; Jia y cols., 2011; Boucher y cols., 2008). Algunos

autores llegaron a la conclusión de que tanto la utilización de la doble terapia génica como de estrategias basadas en el uso de un solo gen, representan un mecanismo fiable y seguro para la eliminación de las células tumorales y sugirieron que el desarrollo de la inmunidad de células T requiere una liberación rápida y adecuada de antígenos a través de la destrucción del tumor mediada por los sistemas TK y CD (Uckert y cols., 1998). Del mismo modo, otras combinaciones de sistemas suicidas de genes / profármaco, por ejemplo, CD / uracilo fosforribosiltransferasa (Adachi y cols., 2000), CD / citocromo P450 2B1 (Kammertoens y cols., 2000) y TK / conexina 43 (Cx43) (Chen y cols., 2012) fueron desarrollados. Sin embargo, la combinación de los sistemas anteriormente citados no ha superado los inconvenientes de la liberación de metabolitos tóxicos y la reducción de la biodisponibilidad (Wang y cols., 2009; Zhang y cols., 2009).

La acción combinada de dos genes suicidas de acción directa no se ha investigada hasta la actualidad. Debido a que la transfección de construcciones de ADNc que codifican toxinas con una acción antitumoral directa ofrece varias ventajas como 1) la no necesidad de la administración de un profármaco, eliminando las limitaciones de su biodisponibilidad y sus efectos adversos, así como 2) evitar el uso de dos aplicaciones consecutivas (vector y profármaco). Por esta razón, y en base a nuestra experiencia con la terapia génica basada en genes suicidas, hemos desarrollado una nueva estrategia de doble terapia génica con *gef* y *apoptina*, dos genes asesinos que no necesitan un profármaco para eliminar a las células tumorales. El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de esta combinación novedosa de los genes *gef* y *apoptina* en células de cáncer de colon humano. Hasta la fecha no se ha descrito en ningún trabajo una terapia génica basada sobre la co-expression de los genes *gef* y *apoptina*.

El principal desafío en la terapia génica antitumoral, es la entrega eficiente así como la adecuada expresión del gen terapéutico en los tumores de destino.

Aunque algunos logros se han hecho para mejorar la eficiencia de la transducción (Zhong y cols., 2001; Bai y cols., 2003), el mecanismo que regula la expresión de los genes suicidas aún no está completamente claro. Estudios recientes han demostrado que se requiere una dosis apropiada de la proteína terapéutica para lograr el éxito en el tratamiento de ciertas enfermedades, mientras que la producción excesiva de la proteína podría ser tóxica (Hillman y cols., 2004; Zabala y cols., 2004). Para garantizar la seguridad de los tratamientos, estudios recientes también han sugerido la necesidad de mantener las concentraciones de proteínas dentro de una dosis terapéutica. Este resultado requiere que la expresión del gen terapéutico sea estrictamente regulada tanto en su administración, como su inducción y expresión (Koponen y cols., 2003). Para alcanzar este objetivo, se han utilizado varios promotores inducibles para transfectar genes de una manera controlada. Los inductores de dichos promotores pueden ser varias sustancias incluyendo hormonas esteroides, oxígeno, metales pesados, y hasta estímulos físicos (por ejemplo, radiación) (Worthington y cols., 2004; Dalle y cols., 2000). Sin embargo, la mayoría de estos promotores no son adecuados para la aplicación clínica por diversas razones: En primer lugar, estos promotores son de genes de mamíferos, de modo que la regulación exógena del gen diana a través de tal promotor podría afectar a la transcripción de los genes endógenos de la célula huésped. En segundo lugar, los inductores de estos promotores son generalmente moléculas endógenas (por ejemplo, hormonas, oxígeno), cuyos niveles no pueden ser modulados significativamente y de forma segura. Otras limitaciones podrían incluir los potenciales de toxicidad o efectos secundarios del inductor (Zeng y cols., 2006). Por lo tanto, un sistema de regulación que ofrece un control estricto de la expresión del gen en respuesta a agentes inductores es valioso para la terapia génica antitumoral. El sistema de regulación basado en la tetraciclina ofrece la regulación sustancial de la expresión del gen diana en respuesta a la doxiciclina (Dox) que puede ser administrada repetidamente (Jiang y cols., 2012; Carlotti y cols., 2005). El sistema “Tet-on”, puede controlar la expresión del gen

terapéutico mediante doxiciclina. Además, al ser un vector retroviral, puede integrar el genoma de la célula huésped (Chtarto y cols., 2003). En efecto, la baja citotoxicidad de la tetraciclina, así como la de sus derivados, y su alta afinidad por el promotor TetR han permitido el uso de este antibiótico en concentraciones que no tienen efectos adversos apreciables en animales transgénicos (Shokolenko y cols., 2013; Ginhoux y cols., 2004; Gimenez y cols., 2004).

La correcta y eficaz expresión de los genes *gef* y *apoptina* en una célula eucariota depende en gran medida del vector seleccionado. Nosotros, por todo lo descrito anteriormente, hemos utilizado para infectar los genes *gef* y *apoptina* en la línea tumoral de carcinoma de colon DLD1, un vector retroviral basado en el sistema de expresión génica mediado por retrovirus “RevTet-On”. Este sistema fue utilizado en varios estudios similares al nuestro entre los que podemos destacar el trabajo de Wei y cols. (2001) quienes lograron transfectar con éxito *in vitro* el gen TRAIL en la línea NCI-N87 de carcinoma gástrico provocando así una expresión controlada de dicho gen e incrementando su efecto letal. Otro estudio, de Zeng y cols. (2006), quienes transfectaron el gen de la timidina quinasa del virus del herpes simple en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 y en un modelo de cáncer de mama humano implantado en ratones desnudos. La inhibición de la proliferación celular fue dosis dependiente alcanzando, *in vivo*, un 89% de la supresión del tumor. Estos datos demuestran que la terapia génica con genes suicidas basada en el uso de vectores retrovirales controlados mediante Dox es un método viable para el tratamiento de diferentes tipos de tumores.

LA DOBLE TERAPIA GÉNICA CON *gef* Y *apoptina* INHIBE EL CRECIMIENTO DE LA LÍNEA DLD1 TRANSDUCIDA:

Al analizar el patrón de crecimiento de las células DLD1 hemos observado que la combinación de la expresión génica de *gef* y *apoptina* en las células de cáncer de colon aumentó considerablemente la inhibición de la proliferación inducida tras el tratamiento con Dox en comparación con el uso de dichos genes solos. Por lo tanto, la co-expresión de *gef* y *apoptina* reduce sinérgicamente la viabilidad celular hasta un 65,13% después de 10 días de tratamiento con Dox, mientras que la expresión de los genes *gef* o *apoptina* por separado alcanzó una reducción del 35,9% y 47,95%, respectivamente. Esta potenciación del efecto citotóxico es similar a la descrita por el uso del gen CDglyTK (fruto de la fusión de los genes CD y TK), que codifica una enzima bifuncional que posee la actividad específica tanto de CD como de TK y se encontró que era más eficaz y segura, así como de amplio espectro, en comparación con el uso de dichos genes por separado (Luo y cols., 2010; Guowei y cols., 2006; Yang y cols., 2006; Wu y cols., 2005).

Sin embargo, aunque varios grupos han demostrado que la doble terapia génica basada sobre los sistemas suicida HSV-TK/GCV y CD/5-FC produce una citotoxicidad sinérgica *in vitro* y una excelente actividad antitumoral en modelos animales, incluyendo regresiones tumorales (Boucher y cols., 2006; Aghi y cols., 1998), la necesidad de profármacos sigue siendo un inconveniente de estas estrategias (Aghi y cols., 1998). Además, se ha descrito que la combinación de los sistemas mencionados anteriormente ejerce una actividad antitumoral antagonista (Moriuchi y cols., 2002). Hemos observado que la potenciación del efecto de los genes *gef* y *apoptina* sobre la inhibición del crecimiento celular se observa a partir del sexto día de tratamiento. Este hecho puede reflejar la necesidad de un periodo de latencia para que las proteínas Gef y Apoptina produzcan su efecto, mejorando

la tasa de muerte celular en las células de carcinoma de colon. Este requisito ha sido previamente descrito en las células procariotas, que necesitan una concentración crítica de la proteína Gef para provocar la muerte celular (Ronchel y cols., 1998).

LA DOBLE TERAPIA GÉNICA CON *gef* Y *apoptina* INDUCE MODULACIÓN DEL CICLO CELULAR Y APOPTOSIS EN LA LÍNEA CELULAR DLD1:

Los conocimientos sobre los mecanismos moleculares que controlan la proliferación celular se deben a la descripción del aparato cronológico del ciclo celular (Hunter y cols., 1994). Esta maquinaria molecular, que se aloja en el núcleo celular, controla la decisión de la célula de proliferar, entrar en un estado de quiescencia reversible o pasar a un estado de diferenciación postmitótica (Pardee, 1974). Antes del descubrimiento de estos mecanismos, muchos científicos creían que las proteínas de los oncogenes y los productos de los genes supresores de tumores podían darnos una completa y razonable explicación del control de la proliferación. Ahora, sabemos que estas proteínas, versiones erróneas que a menudo encontramos en las células cancerosas, no son más que jugadores periféricos, cuya función es canalizar sus señales hacia la maquinaria central productora de decisiones *-el reloj del ciclo celular-* que toman la última decisión sobre el destino de la célula.

La coordinación del ciclo celular se lleva a cabo principalmente mediante transiciones de las fases G1/S y G2/M por una serie de “puntos de control”. Se ha demostrado que las actividades de muchos factores de regulación de los “puntos de control” se pierden o son inactivados durante el proceso de tumorigenesis y que algunos de los agentes antitumorales pueden restaurar la regulación alterada de estos puntos (Agami y cols., 2002). Muchos agentes antitumorales pueden

arrestar y regular el ciclo celular (Tagle y cols., 2004; Tu y cols., 2004). Diferencias en el cariotipo y el contenido de ADN de células tumorales que han sido objeto de terapia génica antitumoral en relación a las líneas no tratadas, han sido descritas por diferentes autores (Su y cols., 2012; Luo y cols., 2012; Srivastava y cols., 2011; Boulaiz y cols., 2003). Sin embargo, estas modificaciones no ocurren en todos los casos, pueden ser distintas unas de otras y se han relacionado con el gen usado como herramienta de terapia génica. Asano y cols. (1996) observan que, en una línea de tumor del cerebro transfectada con el gen *topoisomerasa II* de *Drosophila*, no se producen diferencias en el ciclo celular en comparación con la línea parental, aún existiendo una disminución del crecimiento celular después de 24 h de inducción de la expresión del gen. Nuestros resultados, por el contrario, demuestran que la expresión de los genes *gef* o *apoptina* por separado en la línea DLD1 induce una clara disminución de la fase G₀/G₁ acompañada por un aumento en la fase S y G₂-M. Estos resultados son similares a los que hemos obtenido en las líneas de cáncer de mama y melanoma tratadas con el gen *gef* (Boulaiz y cols., 2003a; Boulaiz y cols., 2003b). Y también, a los obtenidos por Teodoro y cols. (2004) tras infectar la línea humana de carcinoma de pulmón H1299 con el gen de la *apoptina* obteniendo como consecuencia un bloqueo a nivel de la fase G₂/M del ciclo celular.

La co-expresión de los genes *gef* y *apoptina* mostró un aumento significativo de células en fase G₂-M y fase S acompañada con una concomitante disminución de la fase G₁ en comparación con las células control y con las células que expresan los genes *gef* o *apoptina* por separado. Estos resultados son consistentes con los hallazgos en cuatro líneas celulares de cáncer de colon, incluyendo DLD1, en el que los mecanismos de apoptosis fueron inducidos por la supresión de HER3 (Beji y cols., 2012); y sugieren que la co-expresión de los genes *gef* y *apoptina* está asociada con una aberración en el control del ciclo celular que se caracteriza por la prematura progresión de la fase G₁ a la fase S y G₂-M, produciéndose un bloqueo en el ciclo celular que las inhabilita para terminar una mitosis normal.

Es bien conocido que la *apoptina* puede inducir muerte celular programada en las células tumorales, incluyendo hepatoma, osteosarcoma, melanoma y carcinoma de colon, entre otros (Zhou y cols., 2012). Hasta la fecha, varios grupos de investigación han demostrado que más de 70 diferentes líneas celulares tumorales son sensibles a la apoptosis inducida por la *apoptina*, mientras que las líneas de células normales, en general, no se ven afectados (Argiris y cols., 2011). Por otra parte, Nuestro grupo de investigación demostró previamente que el gen *gef* induce la apoptosis en el cáncer de mama (Boulaiz y cols., 2011; 2003), de pulmón (Rama y cols., 2011) y de colon (Ortiz y cols., 2012). Con el fin de determinar si la acción combinada de los genes *gef* y *apoptina* induce citotoxicidad por apoptosis y/o otros mecanismos, células DLD1/Tet-On-*gef*-*apoptina* se tiñeron con anexina V y PI y se examinaron mediante citometría de flujo y microscopía confocal. Estos estudios demostraron que la citotoxicidad inducida por la expresión de los genes suicidas *gef* y *apoptina* se debe a dos mecanismos totalmente diferentes, por una parte a la muerte celular programada o apoptosis y por otra parte a la necrosis. Así pues, a las 48 h de tratamiento por Dox, hemos observado claramente en las células DLD1/Tet-On-*gef*-*apoptina* y DLD1/Tet-On-*gef*, apoptosis temprana. Mientras que en las células DLD1/Tet-On-*apoptina*, hemos observado una mayor proporción de células en apoptosis tardía. Sin embargo, la tasa más alta de muerte en la línea celular Tet-On-*gef*-*apoptina* se debe a la necrosis (36,19%). Después de seis días de la inducción, sólo 8,69% de las células eran viables en la línea que expresaba los dos genes, mientras que el resto de las células estaban muertas por apoptosis (45,94%) y por necrosis (45,37%). En las líneas DLD1/Tet-On-*gef* y DLD1/Tet-On-*apoptina* el 24,81% y 23,36% de las células fueron viables respectivamente. Además, la mayoría de las células estaban muertas por apoptosis (41,77% y 53,52%, respectivamente). Estos resultados indican que la co-expresión de *gef* y *apoptina* en células de cáncer de colon potencia los mecanismos de acción de los genes

cuando se expresan por separado, aumentando por lo tanto la muerte celular no solo mediante apoptosis si no también mediante necrosis.

LA DOBLE-TERAPIA GÉNICA CON *gef* Y *apoptina* INDUCE CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LA LÍNEA CELULAR DLD1 TRANSDUCIDA:

El análisis mediante microscopía óptica de la línea de carcinoma de colon DLD1 transducida con los genes *gef* y/o *apoptina* e inducida con Dox mostró, además de células pequeñas con una morfología epitelial, que fueron similares a las células parentales, células alteradas, más pequeñas que las células parentales y con una morfología redondeada u oval. El citoplasma de algunas de ellas, con un tamaño variable parecía en muchos casos fragmentado. Este grupo celular fue previamente descrito por Wei y cols. (1998), en la línea celular B16F10 del melanoma murino tratada con ganciclovir tras su transfección por el virus de herpes simples.

La muerte celular programada ha sido clasificada en base a criterios morfológicos en varias categorías (Kerr y cols., 1972). La categoría más ampliamente estudiado, la apoptosis, se caracteriza por células redondas, formación de ampollas en la membrana, el colapso del citoesqueleto, la condensación y la fragmentación citoplasmática, picnosis nuclear, condensación y/o fragmentación de la cromatina, y la formación de cuerpos apoptóticos unidos a la membrana que son fagocitados rápidamente y digeridos por los macrófagos o células vecinas (Inbal y cols., 2002). Es por ello que nosotros utilizamos microscopía electrónica de barrido y de transmisión para confirmar los hallazgos encontrados en microscopía óptica y para ver las modificaciones ultraestructurales que presentaban las células tras la inducción de los genes *gef* y *apoptina*.

Nuestros resultados mostraron que las células DLD1-gef-apoptina presentaban no solamente células con una morfología típicamente apoptótica sino también células necróticas. Esta observación es de mucho interés debido a que el desarrollo del cáncer de colon y la formación de metástasis están relacionados con la resistencia a la apoptosis (Lee y cols., 2010). De hecho, se han realizado estudios sobre la capacidad de genes tóxicos, tales como la *toxina A* de *Clostridium difficile*, para inducir apoptosis en este tumor por vía de la activación de los genes *p38* y *p53* (Kim y cols., 2005). La modulación de la apoptosis puede representar una nueva estrategia prometedora en el tratamiento del cáncer de colon, así Faber et al. (2009) utilizan pequeños RNAs de interferencia (siRNA) para silenciar la expresión de proteínas antiapoptóticas en esta enfermedad. Amplios estudios de terapia génica del cáncer basados en el uso de factores apoptóticos tales como *p53* (Vecil y cols., 2003), *Bax* (Ozawa y cols., 2005), *FasL* (Sudarshan y cols., 2005), y el factor de necrosis tumoral relacionado con el ligando inductor de apoptosis (Shi et al., 2005) se han llevado a cabo en modelos animales como por ejemplo ratones atímicos; sin embargo, estos sistemas tienen limitaciones intrínsecas como agentes terapéuticos contra el cáncer debido a la resistencia de las células cancerosas a la apoptosis. Por lo tanto, las moléculas antiapoptóticas, como *Bcl-2*, *Bcl-xL*, *c-FILP*, *c-IAP*, y *survivina*, se sobreexpresan frecuentemente en muchos tipos de células cancerosas y confieren resistencia a la muerte celular inducida por factores de apoptosis (Igney y cols., 2002). De ahí la importancia de la presencia de otro mecanismo de muerte celular, como por ejemplo la necrosis, para asegurar el efecto citotóxico que los genes *apoptina* y *gef* pueden tener en las células diana. En este contexto, Prewett y cols., (2002) informaron del aumento de la apoptosis y la necrosis en la línea celular DLD1 después del tratamiento combinado con el anticuerpo monoclonal IMC-C225 y el inhibidor de topoisomerasa I irinotecán (CPT-11) en comparación con el tratamiento con cualquiera de estos agentes por separado.

LA DOBLE-TERAPIA GÉNICA CON *gef* Y *apoptina* INDUCE APOPTOSIS EN LA LÍNEA CELULAR DLD1 TRANSDUCIDA MEDIANTE DOS VÍAS: LA EXTRÍNSECA Y LA INTRÍNSECA.

La apoptosis puede ocurrir a través de dos vías principales: la extrínseca (o por receptores transmembrana) y la intrínseca (o mitocondrial). La vía extrínseca requiere, como, de receptores trans-membrana a los que se llama “Death Receptors” (DR) y de ligandos que interaccionan con dichos receptores. Los receptores pertenecen a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). Incluye a Fas (CD95), TNFR-I y II, p75NTR, DR-3 y TRAIL (DR-4 y DR-5). Tienen un dominio intracelular (DD) y un dominio extracelular rico en cisteínas. A los dominios intracelulares se unen proteínas adaptadoras como son FADD, TRADD, RIP o RAIDD para formar el complejo de señalización que induce la muerte celular (death-inducing signalling complex, DISC). Una vez formado el complejo, se activan las caspasas iniciadoras, 8 y 10, y finalmente se da la activación de las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7, lo que genera la señal a las endonucleasas que culminará en la apoptosis celular (Meresman, 2011; Russo y cols., 2006). La vía de la muerte celular mitocondrial está mediada por las proteínas de la familia Bcl-2, que interrumpen el potencial de membrana mitocondrial y la liberación de factores apoptogénicos, tales como el citocromo c de la mitocondria, en el citosol (Meresman, 2011; Kim y cols., 2005). La familia de Bcl-2 consta de miembros que se pueden dividir según su actividad en dos grupos: proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-w, BAG y proteínas pro-apoptóticas como Bax, Bcl-xL, Bcl-xS, Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, y Blk.

La inducción de la muerte celular por los genes *gef* o *apoptina* se ha asociado con la vía intrínseca (Lee y cols., 2002; Prados y cols., 2010). Hemos analizado la integridad de la membrana mitocondrial como un posible mecanismo

de acción de la co-expresión de ambos genes contra células de carcinoma de colon. Nuestros estudios en células DLD1 que expresan tanto *gef* como *apoptina* mostraron una mayor alteración de la integridad de la membrana mitocondrial. Esta alteración ha sido superior a la observada después de la inducción de la expresión de los genes por separado, lo que sugiere que la apoptosis está mediada por la vía mitocondrial. Además, nuestros resultados a nivel ultraestructural apoyan estos hallazgos ya que, el análisis mediante microscopía electrónica de transmisión reveló que las células DLD1-*gef*-*apoptina* presentaban un turnover de mitocondrias dilatadas con crestas interrumpidas. Por otra parte, para asegurarnos de que los genes *gef* y *apoptina* inducen apoptosis únicamente mediante vía mitocondrial y así poder descartar la posible participación de otras moléculas que pertenecen a la vía extrínseca de apoptosis, hemos llevado a cabo un estudio mediante western-blot de las caspasas 3, 9 y 8, el citocromo c, bax y p53.

Nuestros resultados demuestran un evidente aumento de la expresión del p53, el citocromo c, Bax y las caspasas 9 y 3 después de 48h de la inducción de la expresión de los genes. Estos datos apoyan la hipótesis de que *gef* y *apoptina* siguen siendo capaces de activar el mecanismo de destrucción celular mediado por la lesión mitocondrial. Así pues, la activación de proteínas pro-apoptóticas produce la formación de poros en la membrana externa de la mitocondria y la disminución del potencial de la transmembrana mitocondrial que permite la liberación de proteínas del espacio intermembranal, como el citocromo-c, Smac/DIABLO, y serín-proteasa HtrA2/Omi. El citocromo-c se asocia con la molécula adaptadora Apaf-1 y con la procaspasa-9 para formar el apoptosoma. Éste último hidroliza la procaspasa-3 que se convierte en caspasa-3 activa y se encarga de desencadenar las últimas fases de la apoptosis (Meresman, 2011). Que la activación de las vías apoptóticas mediadas por caspasas es una estrategia para inducir la destrucción de células tumorales, lo confirman los experimentos de Jang y cols., 2008, que demuestran que la transfección de ANT1 induce apoptosis en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, inactivando NF- κ B e

incrementando la expresión de Bax. La inducción de poptosis de ANT1 fue acompañada por la interrupción del potencial de membrana mitocondrial, el lanzamiento del citocromo c y la activación de las caspasas 9 y 3. Otros genes suicidas, como *cry* (Zhang y cols., 2006) y *gef* (Prados y cols., 2008) sugieren la formación de poros y activación de la Proteína Kinasa A (PKA).

Sin embargo, hemos observado también una clara activación de la caspasa 8 cuando se expresan los genes *gef* y *apoptina* solos o combinados. Éste dato sugiere que la apoptosis mediada por la expresión de *gef* y *apoptina* en la línea DLD1 implica también moléculas de la vía extrínseca de la apoptosis. Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que tanto la vía extrínseca como la intrínseca, pueden converger en la activación de la caspasa-3. Varios autores han demostrado que el solapamiento y la integración de las dos vías ocurre a nivel de Bid, un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2. La caspasa-8 media la ruptura de Bid incrementando enormemente su actividad proapoptótica, que resulta en su translocación a la mitocondria donde promueve la liberación del citocromo c, la formación del apoptosoma y la activación de la caspasa-3. Así pues, la activación de la apoptosis se puede producir por la vía intrínseca, por la vía extrínseca o a través de ambas (Meresman, 2011; Russo y cols., 2006).

LA DOBLE-TERAPIA GÉNICA CON *gef* Y *apoptina* EN COMBINACIÓN CON FÁRMACOS MODIFICA EL PATRÓN DE PROLIFERACIÓN DE LA LÍNEA DLD1.

Es bien conocido que todas las terapias antitumorales estándar tienen limitaciones e inconvenientes. La invasión y la diseminación tumoral fuera de zonas accesibles son una desventaja para la cirugía y la radioterapia. Hay tumores que desarrollan una rápida resistencia a los medicamentos empleados en su tratamiento. Además, en muchas ocasiones, los tratamientos usados generan

toxicidades altas y efectos secundarios indeseados. Estas limitaciones de las terapias convencionales inducen a iniciar nuevas líneas de investigación contra el cáncer que se centren en mejorar la eficacia de los agentes citotóxicos ya existentes y reducir sus efectos adversos. En este contexto, surge la terapia combinada que tiene como objetivo buscar acciones sinérgicas entre los tratamientos antitumorales convencionales y la terapia génica (Prados y cols., 2012). En este planteamiento, la terapia génica actúa como adyuvante permitiendo una mayor eficacia del agente antitumoral y lo que es más importante poder reducir la concentración de la droga a utilizar en el paciente.

Existen varios estudios que demuestran la utilidad de la asociación de la terapia génica con los tratamientos convencionales. Así pues, Kanazawa y colaboradores estudiaron *in vitro* e *in vivo* el tratamiento con un vector adenoviral que codifica la enzima timidina quinasa del virus del herpes simple tipo 1 (AAVtk / GCV), y 4 Gy de irradiación en las líneas celulares de cáncer laríngeo (HEP-2) y HeLa, observando que la irradiación aumentaba los efectos de AAVtk / GCV cuatro veces en las células HeLa y 15 veces en las células HEP-2. Después de los experimentos *in vitro*, se evaluó la expresión de los transgenes y la actividad antitumoral de los vectores de AAV en combinación con rayos gamma en ratones desnudos inoculados con células HEP-2 por vía subcutánea. El sistema de AAVtk / GCV suprimió el crecimiento del tumor, y el uso de rayos gamma aumentó la actividad antitumoral cinco veces (Kanazawa y cols., 2003). Por otra parte, se ha evaluado positivamente la acción combinada de *apoptina* y radioterapia en el tratamiento del carcinoma hepatocelular (Han y cols., 2011). Schoop y colaboradores analizaron en líneas celulares de cáncer escamoso de cabeza y cuello resistentes (SQD9) y sensibles (SCC61) a radioterapia, el efecto de la combinación de la irradiación y la expresión de la *apoptina*. Han observado una liberación del citocromo c mitocondrial y la escisión de la caspasa-3 en ambas líneas celulares. Sin embargo, la línea SQD9 resistente a radioterapia no manifestó ningún cambio ante la exposición únicamente a la irradiación. Estos resultados

demuestran que el tratamiento de *apoptina* representa una forma efectiva para mejorar el efecto terapéutico de los tumores que responden mal a la radioterapia (Schoop y cols., 2010). En 2011 se publicaron los resultados de un estudio de la Fase IB en el tratamiento del glioma maligno asociando cirugía, radioterapia, temozolomida y AdV-tk. Los pacientes con glioma maligno recibieron AdV-tk en 3×10^{10} , 1×10^{11} , o 3×10^{11} partículas de vector (VP) a través de la inyección en el lecho del tumor en el momento de la cirugía, seguidos de 14 días de valaciclovir. La radiación se inició dentro de los nueve días después de la inyección AdV-tk. La temozolomida se administró después de completar el tratamiento valaciclovir. Fueron tratados trece pacientes y 12 completaron la terapia. Actualmente se está desarrollando la fase II del estudio (Chiocca y cols., 2011).

El efecto de la terapia génica suicida en combinación con inmunoterapia antitumoral fue estudiado en un modelo de xenoinjerto de ratón en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Se observó que la apoptosis fue mayor en el grupo que recibió la terapia de combinación, en comparación con el grupo tratado sólo con HSVtk / GCV o sólo con IL-2 (Ambade y cols., 2010). En líneas celulares de carcinoma nasofaríngeo, Fang y sus colaboradores, mostraron que la *apoptina* en combinación con terapia fotodinámica tiene un mejor efecto terapéutico que la terapia fotodinámica o la terapia con el gen de la *apoptina* por sí solos (Fang y cols., 2012).

También se ha podido comprobar el beneficio del uso combinado de diferentes genes suicidas y quimioterapia. Recientes estudios usando el virus del sarampión (MV) oncolítico dirigido al factor de crecimiento epidérmico, EGFR, que expresa la enzima bifuncional citosina desaminasa / uracilo fosforribosiltransferasa (CD / UPRT) han tenido resultados prometedores. La administración intratumoral de MV-antiEGFR en ratones portadores de xenoinjertos de HNSCC, dio como resultado un retraso en el crecimiento del

tumor y la prolongación de la supervivencia. Estos datos indican que la “quimioviroterapia” con EGFR y CD / UPRT MV es muy eficaz en entornos preclínicos, con implicaciones directas para la traslación a la Fase I de ensayos clínicos prevista de MV para el tratamiento locorregional del cáncer de células escamosas de cabeza y cuello (Zaoui y cols., 2012). Por otra parte, Liu y colaboradores analizaron el efecto terapéutico combinado de la *apoptina* con doxorubicina (ADM) y cisplatino (CDDP) sobre el carcinoma hepatocelular en ratones. El volumen medio del tumor en los ratones que recibieron la inyección del adenovirus, que contiene el gen de la *apoptina*, combinado con ADM y CDDP se redujo significativamente el séptimo día del tratamiento sin que se haya observado ningún efecto secundario (Liu y cols., 2010). La combinación de dacarbazina con Apoptina reveló un efecto citotóxico sinérgico en el tratamiento del melanoma, tanto *in vitro*, como *in vivo* (Jin y cols., 2011). El efecto de la combinación de Apoptina y paclitaxel ha sido valorado en líneas celulares de cáncer de próstata, osteosarcoma y cáncer de pulmón (Olijslagers y cols., 2007). En cáncer de próstata se vio igualmente un efecto mejorado de *apoptina* cuando se combina con inhibidores de la ceramidasa (Liu y cols., 2006). Otro gen suicida, el gen *gef* fue capaz de mejorar el efecto anti-tumoral de paclitaxel, docetaxel y doxorubicina en cáncer de mama. Las células de cáncer de mama humano MCF-7 transfectadas y no transfectadas con el gen fueron sometidas a diferentes concentraciones de paclitaxel, docetaxel y doxorubicina. La terapia combinada de gen *gef*/ fármacos causó una disminución en la viabilidad celular. Sin embargo, sólo la combinación *gef*-doxorubicina indujo una mayor mejora en la actividad antitumoral en las células MCF-7. Los resultados se confirmaron usando esferoides, y observando que la disminución del volumen con la terapia combinada fue mayor que la obtenida usando la terapia génica o la quimioterapia sola. Esta estrategia combinada supuso un efecto sinérgico significativo, permitiendo así la utilización de dosis menores del medicamento para lograr el mismo efecto terapéutico (Prados y cols., 2010). Se evaluó la posibilidad de mejorar el efecto antitumoral del

paclitaxel en células de cáncer de pulmón, combinando el uso de este fármaco con el gen *gef*, usando la línea celular de cáncer de pulmón, A-549, tanto en cultivos celulares como con la formación de esferoides de tumor multicelulares. Se observó que el uso de paclitaxel en la línea transfectada con el gen *gef* mejoró el efecto quimioterapéutico del medicamento. El gen *gef*, por tanto, tiene un efecto citotóxico en las células de cáncer de pulmón y además, aumenta la inhibición del crecimiento celular cuando se utiliza con paclitaxel (Prados y cols., 2008).

En nuestro estudio, nos hemos centrado en determinar la acción conjunta de fármacos antitumorales usados en primera línea de tratamiento del cáncer de colon, con los genes *gef* y *apoptina*, solos o combinados. Así pues, hemos utilizado el irinotecán, el 5-fluoruracilo y el oxaliplatino por ser de uso rutinario a nivel clínico. Se determinó la IC_{50} de dichos fármacos en las cuatro líneas celulares DLD1, DLD1/Tet-On-*apoptina*, DLD1/Tet-On-*gef* y DLD1/Tet-On-*gef-apoptina*. Nuestros resultados han demostrado que la expresión de los genes influye positivamente en la sensibilidad de las diferentes líneas celulares frente a los distintos fármacos. Así pues, mientras que la IC_{50} del OXA ha sido un 6,615 μM en la línea DLD1, en las líneas celulares DLD1/Tet-On-*apoptina*, DLD1/Tet-On-*gef* y DLD1/Tet-On-*gef-apoptina* ha sido un 4,644 μM , 2,376 μM , y 2,260 μM respectivamente. La IC_{50} del IRI a su vez se ha visto disminuida por la acción de los genes de 2,670 μM en la línea parental a 1,919 μM , 2,093 μM y 0,899 μM en las líneas DLD1/Tet-On-*apoptina*, DLD1/Tet-On-*gef* y DLD1/Tet-On-*gef-apoptina* respectivamente. La IC_{50} del 5-FU en la línea parental fue 5 μM mientras que en las líneas DLD1/Tet-On-*apoptina*, DLD1/Tet-On-*gef* y DLD1/Tet-On-*gef-apoptina* ha sido 2,223 μM , 2,314 μM y 1,979 μM respectivamente. Estos resultados indican claramente que la expresión de los genes *gef* y *apoptina* sensibiliza las células frente a dichos fármacos inhibiendo así la proliferación tumoral con unas dosis hasta un 65,84%, 66,33% y 60,42% más bajas en el caso de OXA, IRI y 5 FU respectivamente. Estas concentraciones

son mucho mas bajas que las utilizadas por otros autores como Ortiz y colaboradores (2012) que utilizaron 1, 10, 100 μM para OXA, 10, 100, 200 μM para IRI y 10, 50 100 μM para 5 FU en la línea T84 salvaje o transfectada con el gen *gef*.

Por otra parte, y utilizando las IC_{50} previamente calculadas, hemos analizado el efecto de los genes *gef* y *apoptina* sobre la proliferación celular de la línea DLD1 durante 8 dias y usando diferentes combinaciones con los fármacos previamente citados. Todo esto con el fin de determinar cual es la combinación de genes/fármacos que mejor efecto antitumoral tiene.

Cuando se valoró la modificación en la inhibición de la proliferación de la línea DLD1, sometida a terapia combinada en relación con la tratada sólo con los fármacos pudimos comprobar que en general: 1) la expresión de *gef* y *apoptina* tanto solos como combinados en las células tumorales provoca una potenciación relevante del efecto de los fármacos aumentando significativamente la reducción en su proliferación, 2) el efecto de la co-expresión de *gef* y *apoptina* se empieza a notar a partir del segundo día de exposición a los fármacos y se mantiene en la mayoría de los casos hasta el último día del experimento, 3) la co-expresión de *gef* y *apoptina* aún reduciendo más del 60% la concentración de los fármacos utilizados, ha logrado mejorar los resultados en cuanto a la inhibición de la proliferación se refiere.

Nuestros resultados demuestran que considerando únicamente los fármacos, la mayor respuesta antitumoral se produce tras la exposición de las células DLD1 a las dosis IC_{50} de 5 FU con un 91,78%, aunque en este caso no hay mayor efecto en la terapia combinada con los genes *gef* y *apoptina*.

En orden de mejoría de respuesta al tratamiento le seguiría irinotecán, consiguiendo un 89,52% de inhibición del crecimiento en comparación con la línea control sin tratar. Sin embargo, y contrariamente a lo observado con 5 FU, hemos objetivado una clara potenciación de su efecto mediante la expresión de los

genes *gef* y *apoptina*. Así pues, mientras que, el efecto de estos genes por separado no empezó a notarse hasta el cuarto día del tratamiento, su efecto combinado se notó desde los dos días de tratamiento. Estos efectos duraron hasta el octavo día, siendo la línea de mejor respuesta, la infectada con *apoptina*, seguida por la que co-expresa *gef* y *apoptina* y por último la infectada con *gef*, con una inhibición del crecimiento, con respecto a la línea control tratada con el fármaco, del 66,98%, 44,90% y 20,92% respectivamente.

El fármaco que menor efecto tiene es el oxaliplatino con 67,34% de inhibición del crecimiento en comparación con la línea control sin tratar. Se mejora el tratamiento cuando se asocia a la terapia combinada alcanzando un 45,46% con *gef*, 53,54% con *apoptina* y 57,89% cuando se combinan ambos genes con respecto a la línea tratada únicamente con oxaliplatino.

En la terapia combinada con varios fármacos, observamos que, de las cuatro combinaciones que hemos utilizado, la más efectiva fue 5FU/OXA/IRI. Esta combinación farmacológica de por sí induce una inhibición del crecimiento con respecto a la línea control sin tratar del 96,57%. Comparando con la línea control tratada, la proliferación DLD1/Tet-On-*gef* es muy similar a la línea control tratada mientras que la línea portadora de *apoptina* se inhibe en un 33,33% y la línea con ambos genes en un 43,48% llegando así a destruir prácticamente la totalidad de las células tumorales. Este efecto se deja notar a partir del segundo día, y está más acentuado en la línea *gef-apoptina*.

La asociación de 5Fu y oxaliplatino mejora con respecto al tratamiento con oxaliplatino solo pero no con respecto al tratamiento con 5FU. En el caso de la combinación 5FU/IRI hay mejoría con respecto al tratamiento sólo con irinotecán en la línea que expresa los dos genes pero no en el resto.

Por último, hemos realizado un estudio de apoptosis mediante anexina V con las diferentes líneas celulares expuestas a los tres fármacos antitumorales 5FU, OXA, IRI, con sus distintas combinaciones. Nuestros resultados demuestran

claramente que la expresión de los genes *gef* y *apoptina* aumenta significativamente la tasa de las células apoptóticas tanto tardías como tempranas. Además, la exposición al irinotecán y a la mezcla 5FU/OXA/IRI es la que ha inducido la menor tasa de viabilidad celular.

En el presente trabajo hemos analizado un nuevo sistema de doble terapia génica basado en la infección conjunta o por separado de dos genes, el gen *gef* de procariotas, que actúa de forma lesiva sobre las células a través de modificaciones en la membrana y el gen *apoptina*, del virus de la anemia del pollo, que induce selectivamente la apoptosis en diversas células cancerosas. Utilizando como modelo experimental la línea DLD1 derivada de carcinoma de colon humano, hemos conseguido *infectar satisfactoriamente estos genes* mediante un vector retroviral de inducción controlable, lo que nos ha permitido analizar los efectos de su expresión sobre las características biológicas de las células tumorales. La expresión combinada de los genes *gef* y *apoptina* inducida mediante doxiciclina en la línea DLD1 provoca un aumento significativo de las alteraciones morfológicas que indican la entrada de determinadas subpoblaciones celulares *en un proceso de muerte celular programada o apoptosis* así como *necrosis celular*. Además, se ha observado la presencia de *células con significativas alteraciones de la membrana celular y aparición de poros*, que sugieren una actuación de la proteína del gen *gef* de forma similar a lo que ocurre en procariotas. Además, la co-expresión de *gef* y *apoptina* en DLD1 provocó una significativa reducción de la tasa de proliferación en comparación con la línea parental y las infectadas con los genes por separado, que se acompaña de una notable *alteración de la proporción de células en cada una de las fases del ciclo celular*. Nuestros resultados demuestran por primera vez que la acción combinada de los genes *gef* y *apoptina* es mucho más citotóxica y tiene actividad antitumoral más intensa de la que tiene la expresión de dichos genes por separado.

Finalmente, el estudio de los efectos de la doble terapia génica con los genes *gef* y *apoptina* asociados con agentes citotóxicos de uso habitual en el tratamiento del cáncer de colon, muestra mejores resultados que una terapia únicamente con fármacos llegando a destruir aproximadamente el 100% de las células tumorales.

Concluimos, destacando la importancia que la investigación basada en la utilización de nuevos genes potencialmente lesivos para las células tumorales puede tener en el futuro inmediato de los nuevos tratamientos contra el cáncer. Los resultados obtenidos abren una nueva vía de investigación sobre las posibilidades que la doble terapia génica con *gef* y *apoptina* puede tener como terapia selectiva y en combinación con fármacos de este tipo de enfermedades. Serán los próximos estudios en el campo de la experimentación animal con tumores inducidos y la fase de experimentación clínica sobre pacientes con determinados tipos de cáncer, las que definitivamente determinarán las posibilidades de esta nueva vía terapéutica.

VI. CONCLUSIONES

1. La construcción basada en el sistema *RevTet-On* que incluye a los genes *gef* o *apoptina* como inserto, permite su transducción en células eucariotas y posibilita el control de su expresión mediante la inducción con doxicilina.
2. La infección mediante vectores retrovirales de los genes *gef* y/o *apoptina* ha permitido obtener tres líneas de cáncer de colon denominadas DLD1/Tet-On-*apoptina*, DLD1/Tet-On-*gef* y DLD1/Tet-On-*gef-apoptina*. La inducción de estas líneas permite la transcripción y la traducción de dichos genes, pudiendo ser detectados su mRNA y su proteína.
3. La co-expresión de *gef* y *apoptina* provoca una reducción significativa de la tasa de proliferación en la línea DLD1/Tet-On-*gef-apoptina* llegando a alcanzar el décimo día un 65.13%, mientras que por separado los genes *gef* y *apoptina* causaron una inhibición de la proliferación del 35.9% y el 47.95% respectivamente.
4. La co-expresión de *gef* y *apoptina* en DLD1 provoca modificaciones típicas de muerte celular programada o apoptosis, destacando ultraestructuralmente la aparición de cuerpos apoptóticos y la condensación de la cromatina. También hemos observado un aumento de muerte celular por necrosis.
5. La co-expresión de los genes *gef* y *apoptina* mostró un aumento significativo de células en fase G2-M y fase S acompañada con una concomitante disminución de la fase G₁ en comparación con las células control y con las células que expresan los genes *gef* o *apoptina* por separado.

6. La co-expresión de los genes *gef* y *apoptina* provoca la activación de la apoptosis mediante la vía intrínseca e extrínseca como demuestra la modulación del potencial de membrana mitocondrial y la expresión proteica de las caspasas 3, 9 y 8, el citocromo c, bax y p53.
7. La co-expresión de los genes *gef* y *apoptina* sensibiliza las células frente a fármacos antitumorales usados en primera línea de tratamiento del cáncer de colon. La inhibición de la proliferación tumoral se ha producido con unas dosis IC_{50} hasta un 65,84%, 66,33% y 60.42% mas bajas en el caso de oxaliplatino, irinotecan y 5-flourouracilo respectivamente, en comparación con la línea control tratada.
8. La combinación *gef-apoptina/5FU-OXA-IRI* muestra mejores resultados que una terapia únicamente con fármacos llegando a destruir aproximadamente el 100% de las células tumorales.
9. Los resultados experimentales con los genes suicidas *gef* y *apoptina* indican su eficacia y eficiencia como herramienta terapéutica para el desarrollo de protocolos de terapia génica que solos o en combinación con agentes citotóxicos pueden optimizar la respuesta de los pacientes con cáncer de colon.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi Y, Tamiya T, Ichikawa T, Terada K, Ono Y, Matsumoto K, y cols. Experimental gene therapy for brain tumors using adenovirus mediated transfer of cytosine deaminase gene and uracil phosphoribotransferase gene with 5-fluorocytosine. *Hum Gene Ther.* 2000;11:77–89.
- Agami R, Bernards R. Convergence of mitogenic and DNA damage signaling in the G1 phase of the cell cycle. *Cancer Lett.* 2002;177(2):111-8.
- Aghi M, Kramm CM, Chou T, Breakefield XO, Chiocca EA. Synergistic anticancer effects of ganciclovir/thymidine kinase and 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapies. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:370–80.
- Agu CA, Klein R, Lengler J, Schilcher F, Gregor W, Peterbauer T, y cols. Bacteriophage-encoded toxins: the lambda holin protein causes caspase-independent non-apoptotic cell death of eukaryotic cells. *Cell Microbiol.* 2007;9:1753–65.
- Ahmed KA, Davis BJ, Wilson TM, Wiseman GA, Federspiel MJ, Morris JC. Progress in gene therapy for prostate cancer. *Front Oncol.* 2012;2:172.
- Almarza E, Zhang F, Santilli G, Blundell MP, Howe SJ, Thornhill SI, y cols. Correction of SCID-X1 using an enhancerless Vav promoter. *Hum Gene Ther.* 2011;22(3):263-70.
- Altaner C. Prodrug cancer gene therapy. *Cancer Lett.* 2008;270:191–201.
- Alvisi G, Poon IK, Jans DA. Tumor-specific nuclear targeting: promises for anti-cancer therapy? *Drug Resist Updat.* 2006;9(1-2):40-50. Review.
- Ambade AV, Joshi GV, Mulherkar R. Effect of suicide gene therapy in combination with immunotherapy on antitumour immune response & tumour regression in a xenograft mouse model for head & neck squamous cell carcinoma. *Indian J Med Res.* 2010;132:415-22.
- Amit D, Hochberg A. Development of targeted therapy for a broad spectrum of cancers (pancreatic cancer, ovarian cancer, glioblastoma and HCC) mediated by a double promoter plasmid expressing diphtheria toxin under the control of H19 and IGF2-P4 regulatory sequences. *Int J Clin Exp Med.*

2012;5(4):296–305.

– Anderson WF, Blaese RM, Culver K. The ADA human gene therapy clinical protocol: Points to Consider response with clinical protocol. *Hum Gene Ther.* 1990;Fall;1(3):331-62.

– Anderson WF. Gene therapy. *JAMA.* 1981;246(23):2737-9.

– Anderson WF. Human gene therapy. *Nature.* 1998;392(6679 Suppl):25-30.

– André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Taberero J, Hickish T, y cols., Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 2004; 350:2343-2351

– Argiris K, Panethymitaki C, Tavassoli M. Naturally occurring, tumor-specific, therapeutic proteins. *Exp Biol Med (Maywood).* 2011;236(5):524-36.

– Arnold D, Stein A. New Developments in the Second-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: Potential Place in Therapy. *Drugs.* 2013;73(9):883-91.

– Arrieta Rodriguez OG, Villarreal-Garza C, Martínez-Barrera L, Morales M, Dorantes-Gallareta Y, Peña-Curiel O, y cols. Usefulness of Serum Carcinoembryonic Antigen (CEA) in evaluating response to chemotherapy in patients with advanced non small-cell lung cancer: a prospective cohort study. *BMC Cancer.* 2013;13(1):254.

– Asano T, Zwelling LA, An T, McWatters A, Herzog CE, Mayes J, y cols. Effect of transfection of a *Drosophila* topoisomerase II gene into a human brain tumour cell line intrinsically resistant to etoposide. *Br J Cancer.* 1996;73(11):1373-80.

– Astrin SM. Are there molecular targets for therapy of colon cancer? *Oncology (Williston Park)* 1991;5(10):127-32; disc. 132, 135, 139.

– Bacchiddu S, Álvarez-Urturri AC, Bessa Caserras X. Pólipos colorrectales. Publicado en FMC.2012; 19 :472-80 - vol.19 núm 08

- Backendorf C, Visser AE, de Boer AG, Zimmerman R, Visser M, Voskamp P, y cols. Apoptin: therapeutic potential of an early sensor of carcinogenic transformation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2008;48:143-69. Review.
- Bacolod MD, Barany F. Molecular profiling of colon tumors: the search for clinically relevant biomarkers of progression, prognosis, therapeutics, and predisposition. *Ann Surg Oncol*. 2011;18(13):3694-700.
- Bai Y, Soda Y, Izawa K, Tanabe T, Kang X, Tojo A y cols. Effective transduction and stable transgene expression in human blood cells by a third-generation lentiviral vector. *Gene Ther*. 2003;10(17):1446-57.
- Baum C. Gene therapy for SCID-X1: focus on clinical data. *Mol Ther*. 2011;19(12):2103-4.
- Beji A, Horst D, Engel J, Kirchner T, Ullrich A. Toward the Prognostic Significance and Therapeutic Potential of HER3 Receptor Tyrosine Kinase in Human Colon Cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18:956–68.
- Benson AB 3rd, Bekaii-Saab T, Chan E, Chen YJ, Choti MA, Cooper HS, y cols. Localized Colon Cancer, Version 3.2013. featured updates to the NCCN Guidelines. *J Natl Compr Canc Netw*. 2013;11(5):519-28.
- Berkhout B, Sanders RW. Gene therapy as a vaccine for HIV-1. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12(10):1315-21.
- Bernstein C, Holubec H, Bhattacharyya AK, Nguyen H, Payne CM, Zaitlin B, y cols. Carcinogenicity of deoxycholate, a secondary bile acid. *Arch Toxicol* 2011;85:863–71.
- Berrio F, De AR, Sant M, Rosso S, Bielska-Lasota M, Coebergh JW, y cols. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-1999: results of the EURO CARE-4 study. *Lancet Oncol* 2007; 8:773-883.
- Bhakdi S, Bayley H, Valeva A, Walev I, Walker B, Kehoe M, y cols. Staphylococcal α -toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin:

prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch Microbiol.* 1996;165:73–9.

– Bhaumik S, Sekar TV, Depuy J, Klimash J, Paulmurugan R. Noninvasive optical imaging of nitroreductase gene-directed enzyme prodrug therapy system in living animals. *Gene Ther.* 2012;19(3):295-302.

– Blancas-Galicia L, Escamilla-Quiroz C, Yamazaki-Nakashimada, MA. Síndrome De Wiskott-Aldrich; revisión actualizada. *Rev Alegria Mex.* 2011; 58:213-8-vol.58 núm 04.

– Bolocan A, Ion D, Ciocan DN, Paduraru DN. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer. *Chirurgia (Bucur).* 2012;107(5):555-63.

– Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Panina P, y cols. Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA-immunodeficient patients. *Science.* 1995;270(5235):470-5.

– Borlongan CV. Recent preclinical evidence advancing cell therapy for Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* 2012;237(1):142-6.

– Boucher PD, Im MM, Freytag SO, Shewach DS. A novel mechanism of synergistic cytotoxicity with 5-fluorocytosine and ganciclovir in double suicide gene therapy. *Cancer Res.* 2006;66(6):3230–7.

– Boulaiz H, Alvarez PJ, Prados J, Marchal J, Melguizo C, Carrillo E. *gef* gene expression in MCF-7 breast cancer cells is associated with a better prognosis and induction of apoptosis by p53-mediated signaling pathway. *Int J Mol Sci.* 2011;12(11):7445–58.

– Boulaiz H, Marchal JA, Prados J, Melguizo C, Aránega A. Non-viral and viral vectors for gene therapy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2005 ;51(1):3-22.

– Boulaiz H, Prados J, Marchal JA, García AM, Alvarez L, Melguizo C, y cols. Transfection of MS-36 melanoma cells with *gef* gene inhibits proliferation and induces modulation of the cell cycle. *Cancer Sci.* 2003;94(6):564–8.

– Boulaiz H, Prados J, Melguizo C, García AM, Marchal JA, Ramos JL, y cols. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human breast cancer by transfection of *gef* gene. *Br J Cancer.* 2003;89(1):192–8.

- Boulaiz H, Prados J, Melguizo C, Marchal JA, Carrillo E, Peran M, y cols. Tumour malignancy loss and cell differentiation are associated with induction of gef gene in human melanoma cells. *Br J Dermatol.* 2008;159(2):370-8.
- Boulikas T, Pantos A, Bellis E, Christofis P. Designing platinum compounds in cancer: structures and mechanisms Review Article *Cancer Therapy* 2007; 5:537-583.
- Boutros M, Hippalgaonkar N, Silva E, Allende D, Wexner SD, Berho M. Laparoscopic Resection of Rectal Cancer Results in Higher Lymph Node Yield and Better Short-term Outcomes Than Open Surgery: A Large Single-Center Comparative Study. *Dis Colon Rectum.* 2013;56(6):679-88.
- Burek M, Maddika S, Burek CJ, Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Los M. Apoptin-induced cell death is modulated by Bcl-2 family members and is Apaf-1 dependent. *Oncogene.* 2006;25(15):2213-22.
- Burnett JR, Hooper AJ. Alipogene tiparvovec, an adeno-associated virus encoding the Ser(447)X variant of the human lipoprotein lipase gene for the treatment of patients with lipoprotein lipase deficiency. *Curr Opin Mol Ther.* 2009;11(6):681-91.
- Campochiaro PA. Gene transfer for neovascular age-related macular degeneration. *Hum Gene Ther.* 2011;22(5):523-9.
- Candotti F, Shaw KL, Muul L, Carbonaro D, Sokolic R, Choi C, y cols. Gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immune deficiency: clinical comparison of retroviral vectors and treatment plans. *Blood.* 2012;120(18):3635-46.
- Carlotti F, Zaldumbide A, Martin P, Boulukos KE, Hoeben RC, Pognonec P. Development of an inducible suicide gene system based on human caspase 8. *Cancer Gene Ther.* 2005;12(7):627-39.
- Cavazzana-Calvo M, Fischer A. Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet? *J Clin Invest.* 2007;117(6):1456-65.
- Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F, y cols.

Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature*. 2010;467(7313):318-22.

– Cersosimo RJ. Management of advanced colorectal cancer, part 1. *Am J Health Syst Pharm*. 2013;70(5):395-406.

– Cerullo G, Cassini D, Baldazzi G. Application of Petersen Index score for Dukes'B colorectal cancer in a population of 103 consecutive resected patients. *Updates Surg*. 2012;64(2):95-9.

– Chang S, Guo J, Sun J, Zhu S, Yan Y, Zhu Y, y cols. Targeted microbubbles for ultrasound mediated gene transfection and apoptosis induction in ovarian cancer cells. *Ultrason Sonochem*. 2013;20(1):171-9.

– Chen JX, Ma Q, Wu H, Zhou A, Chen X, Peng YM, y cols. Enhancing effect of ultrasound-mediated microbubble destruction on gene delivery into rat kidney via different administration routes. *Asian Pac J Trop Med*. 2012;5(7):561-5.

– Chen K, Luo Z, Zheng SJ. Gallus Heat shock cognate protein 70, a novel binding partner of Apoptin. *Virology*. 2011;8:324.

– Chen S, Chen J, Ma G, Xi W, Xu Q, Xu W, Yin G. Clinical Therapeutic Effect and Biological Monitoring of p53 Gene in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Am J Clin Oncol*. 2011.

– Chen S, Ding JH, Bekeredjian R, Yang BZ, Shohet RV, Johnston SA, y cols. Efficient gene delivery to pancreatic islets with ultrasonic microbubble destruction technology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(22):8469-74.

– Chen Y, Wang G, Kong D, Zhang Z, Yang K, Liu R, y cols. In vitro and in vivo double-enhanced suicide gene therapy mediated by generation 5 polyamidoamine dendrimers for PC-3 cell line. *World J Surg Oncol*. 2012;10:3.

– Chiocca EA, Aguilar LK, Bell SD, Kaur B, Hardcastle J, Cavaliere R, y cols. Phase IB study of gene-mediated cytotoxic immunotherapy adjuvant to up-front surgery and intensive timing radiation for malignant glioma. *J Clin Oncol*. 2011;29(27):3611-9.

- Cho EA, Moloney FJ, Cai H, Au-Yeung A, China C, Scolyer RA, y cols. Safety and tolerability of an intratumorally injected DNzyme, Dz13, in patients with nodular basal-cell carcinoma: a phase 1 first-in-human trial (DISCOVER). *Lancet*. 2013 May 25;381(9880):1835-43.
- Choate KA, Khavari PA. Direct cutaneous gene delivery in a human genetic skin disease. *Hum Gene Ther*. 1997;8(14):1659-65.
- Chtarto A, Bender HU, Hanemann CO, Kemp T, Lehtonen E, Levivier M y cols. Tetracycline-inducible transgene expresión mediated by a single AAVvector. *Gene Ther*. 2003;10(1): 84–94.
- Chuah MK, Nair N, VandenDriessche T. Recent progress in gene therapy for hemophilia. *Hum Gene Ther*. 2012;23(6):557-65.
- Chung-Faye G, Palmer D, Anderson D, Clark J, Downes M, Baddeley J y cols. Virus-directed, enzyme prodrug therapy with nitroimidazole reductase: a phase I and pharmacokinetic study of its prodrug, CB1954. *Clin Cancer Res*. 2001 Sep;7(9):2662-8.
- Cohen ZR, Duvdevani R, Nass D, Hadani M, Ram Z. Intraarterial delivery of genetic vectors for the treatment of malignant brain tumors. *Isr Med Assoc J*. 2001;3(2):117-20.
- Connolly EC, Freimuth J, Akhurst RJ. Complexities of TGF- β targeted cancer therapy. *Int J Biol Sci*. 2012;8(7):964-78.
- Coune PG, Schneider BL, Aebischer P. Parkinson's disease: gene therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(4):a009431.
- Cripps MC, Figueredo AT, Oza AM, Taylor MJ, Fields AL, Holmlund JT. Phase II randomized study of ISIS 3521 and ISIS 5132 in patients with locally advanced or metastatic colorectal cancer: a National Cancer Institute of Canada clinical trials group study. *Clin Cancer Res*. 2002 Jul;8(7):2188-92
- Cunningham CC, Holmlund JT, Schiller JH, Geary RS, Kwoh TJ, Dorr A. A phase I trial of c-Raf kinase antisense oligonucleotide ISIS 5132 administered as a continuous intravenous infusion in patients with advanced cancer. *Clin*

Cancer Res. 2000;6(5):1626-31.

– Dachs GU, Tupper J, Tozer GM. From bench to bedside for gene-directed enzyme prodrug therapy of cancer. *Anticancer Drugs*. 2005;16:349–59.

– Dalle B, Payen E, Beuzard Y. Modulation of transduced erythropoietin expression by iron. *Exp Hematol* 2000;28(7): 760–764.

– Danen-Van Oorschot AA, van der Eb AJ, Noteborn MH. BCL-2 stimulates Apoptin-induced apoptosis. *Adv Exp Med Biol*. 1999;457:245-9. Review.

– Dass CR, Tran TM, Choong PF. Angiogenesis inhibitors and the need for anti-angiogenic therapeutics. *J Dent Res*. 2007;86(10):927-36.

– David AL, Waddington SN. Candidate diseases for prenatal gene therapy. *Methods Mol Biol*. 2012;891:9-39.

– de Gramont A, Figier A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, y cols. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2000;18(16):2938-47.

– De Vita F, Orditura M, Matano E. A phase II study of biweekly oxaliplatin plus infusional 5-fluorouracil and folinic acid (FOLFOX-4) as first-line treatment of advanced gastric cancer patients. *Br J Cancer* 2005;92:1644-1649.

– de Wijkerslooth TR, Bossuyt PM, Dekker E. Strategies in screening for colon carcinoma. *Neth J Med*. 2011;69(3):112-9.

– Deeks SG, Wagner B, Anton PA, Mitsuyasu RT, Scadden DT, Huang C, y cols. A phase II randomized study of HIV-specific T-cell gene therapy in subjects with undetectable plasma viremia on combination antiretroviral therapy. *Mol Ther*. 2002;5(6):788-97.

– DeLap RJ. The effect of leucovorin on the therapeutic index of fluorouracil in cancer patients. *Yale J Biol Med*. 1988;61(1):23-34.

– Deo SV, Kapali AS, Gupta M, Shukla NK. A review of controversies in the management of colorectal cancers. *Indian J Surg*. 2012;74(3):221-7.

– Di Matteo M, Belay E, Chuah MK, Vandendriessche T. Recent

developments in transposon-mediated gene therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12(7):841-58.

– Diggs DL, Huderson AC, Harris KL, Myers JN, Banks LD, Rekhadevi PV, y cols. Polycyclic aromatic hydrocarbons and digestive tract cancers: a perspective. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2011;29(4):324-57.

– Djeha AH, Hulme A, Dexter MT, Mountain A, Young LS, Searle PF. Expression of *Escherichia coli* B nitroreductase in established human tumor xenografts in mice results in potent antitumoral and bystander effects upon systemic administration of the prodrug CB1954. *Cancer Gene Ther.* 2000;7(5):721-31.

– Dong A, Rivella S, Breda L. Gene therapy for hemoglobinopathies: progress and challenges. *Transl Res.* 2013;161(4):293-306.

– Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, y cols. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet.* 2000;355(9209):1041-7. Erratum in: *Lancet* 2000;355(9212):1372.

– Duarte S, Carle G, Faneca H, de Lima MC, Pierrefite-Carle V. Suicide gene therapy in cancer: where do we stand now? *Cancer Lett.* 2012;324(2):160–70.

– Duffy MJ. CA 19-9 as a marker for gastrointestinal cancers: a review. *Ann Clin Biochem.* 1998;35 (Pt 3):364-70.

– Durai R, Yang SY, Seifalian AM, Winslet MC. Principles and applications of gene therapy in colon cancer. *J Gastrointest Liver Dis.* 2008;17(1):59-67. Review.

– Electrophoresis of thymidine kinase activity synthesized by cells transformed by herpes simplex virus. *Virology.* 1972;49(3):683-9.

– Essand M, Loskog AS. Genetically engineered T cells for the treatment of cancer. *J Intern Med.* 2013;273(2):166-81.

- Esteva M, Leiva A, Ramos M, Pita-Fernández S, González-Luján L, Casamiñjana M y cols. Deccire Group. Factors related with symptom duration until diagnosis and treatment of symptomatic colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2013;13:87.
- Faber C, Kirchner T, Hlubek F. The impact of microRNAs on colorectal cancer. *Virchows Arch*. 2009;454:359–67.
- Fabrizi E, di Martino S, Pelacchi F, Ricci-Vitiani L. Therapeutic implications of colon cancer stem cells. *World J Gastroenterol*. 2010;16(31):3871–3877.
- Fan Y, Luo Y, Chen X, Li Q, Sun X. Generation of human β -thalassemia induced pluripotent stem cells from amniotic fluid cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *J Reprod Dev*. 2012;58(4):404-9.
- Fang X, Wu P, Li J, Qi L, Tang Y, Jiang W, y cols. Combination of apoptin with photodynamic therapy induces nasopharyngeal carcinoma cell death in vitro and in vivo. *Oncol Rep*. 2012;28(6):2077-82.
- -Farreras- Rozman. *Medicina Interna*. Ed. Elsevier. 2012.
- Favard C, Dean DS, Rols MP. Electrotransfer as a non viral method of gene delivery. *Curr Gene Ther*. 2007;7(1):67-77.
- Ferrari G, Rossini S, Nobili N, Maggioni D, Garofalo A, Giavazzi R, y cols. Transfer of the ADA gene into human ADA-deficiente T lymphocytes reconstitutes specific immune functions. *Blood*. 1992; 80:1120-1124.
- Fidas P, Pennell NA, Boral AL, Shapiro GI, Skarin AT, Eder JP Jr, Phase I study of the c-raf-1 antisense oligonucleotide ISIS 5132 in combination with carboplatin and paclitaxel in patients with previously untreated, advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2009;4(9):1156-62.
- Finzi L, Kraemer A, Capron C, Noullet S, Goere D, Penna C, y cols. Improved retroviral suicide gene transfer in colon cancer cell lines after cell synchronization with methotrexate. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011;30:92..
- Fiorentini G, Banfi R, Dentico P, Moriconi S, Turrisi G, Pelagotti F, y

cols. Clinical Experience of Treatment of Metastatic Melanoma and Solid Tumours Adopting a Derivative of Diphtheria Toxin: Cross-reacting Material 197. *In Vivo*. 2013;27(2):197–202.

– Fogar P, Greco E, Basso D, Habeler W, Navaglia F, Zambon CF, y cols. Suicide gene therapy with HSV-TK in pancreatic cancer has no effect in vivo in a mouse model. *Eur J Surg Oncol*. 2003;29(9):721–30.

– Fornaro L, Lonardi S, Masi G, Loupakis F, Bergamo F, Salvatore L, y cols. FOLFOXIRI in combination with panitumumab as first-line treatment in quadruple wild-type (KRAS, NRAS, HRAS, BRAF) metastatic colorectal cancer patients: a phase II trial by the Gruppo Oncologico Nord Ovest (GONO). *Ann Oncol*. 2013;24(8):2062-7.

– Foster H, Popplewell L, Dickson G. Genetic therapeutic approaches for Duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther*. 2012; 23(7):676-87.

– Friedlos F, Quinn J, Knox RJ, Roberts JJ. The properties of total adducts and interstrand crosslinks in the DNA of cells treated with CB 1954. Exceptional frequency and stability of the crosslink. *Biochem Pharmacol*. 1992;17;43(6):1249-54.

– Friedmann T, Roblin R. Gene Therapy for human genetic disease? *Science*. 1972;175(4025):949-55.

– Gaspar HB, Parsley KL, Howe S, King D, Gilmour KC, Sinclair J, y cols. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet*. 2004;364(9452):2181-7.

– Geden SE, Gardner RA, Fabbrini MS, Ohashi M, Phanstiel I, Teter K. Lipopolyamine treatment increases the efficacy of intoxication with saporin and an anticancer saporin conjugate. *Febs J*. 2007;274:4825–36.

– Gimenez E, Lavado A, Giraldo P, Cozar P, Jeffery G, Montoliu L. A transgenic mouse model with inducible Tyrosinase gene expression using the tetracycline (Tet-On) system allows regulated rescue of abnormal chiasmatic projections found in albinism. *Pigment Cell Res*. 2004;17(4):363–70.

- Ginhoux F, Turbant S, Gross DA, Poupiot J, Marais T, Lone Y y cols. HLA-A*0201-restricted cytolytic responses to the rtTA transactivator dominant and cryptic epitopes compromise transgene expression induced by the tetracycline on system. *Mol Ther.* 2004;10(2):279–289.
- Giovannucci E. Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007;86 (3), pp. ps836–ps842.
- Gomez-Monterrey I, Campiglia P, Scognamiglio I, Vanacore D, Dicitore A, Lombardi A, y cols. DTNQ-Pro, a Mimetic Dipeptide, Sensitizes Human Colon Cancer Cells to 5-Fluorouracil Treatment. *J Amino Acids.* 2013;2013:509056.
- Goñi Murillo MC, Galindo Vergara C, Goñi Murillo A. Actualización en Medicina de Familia. *Talasemias Semergen.* 2008; 34(3):138-42
- Grailey K, Markar SR, Karthikesalingam A, Aboud R, Ziprin P, Faiz O. Laparoscopic versus open colorectal resection in the elderly population. *Surg Endosc.* 2013;27(1):19-30.
- Grove JI, Lovering AL, Guise C, Race PR, Wrighton CJ, White SA. Generation of Escherichia coli nitroreductase mutants conferring improved cell sensitization to the prodrug CB1954. *Cancer Res.* 2003 Sep 1;63(17):5532-7.
- Guan YS, Liu Y, He Q, Li X, Yang L, Hu Y, La Z. 53 gene therapy in combination with transcatheter arterial chemoembolization for HCC: one-year follow-up. *World J Gastroenterol.* 2011;17(16):2143-9.
- Guelen L, Paterson H, Gäken J, Meyers M, Farzaneh F, Tavassoli M. TAT-apoptin is efficiently delivered and induces apoptosis in cancer cells. *Oncogene.* 2004;23(5):1153-65.
- Guo H, Leung JC, Chan LY, Tsang AW, Lam MF, Lan HY, y cols. Ultrasound-contrast agent mediated naked gene delivery in the peritoneal cavity of adult rat. *Gene Ther.* 2007;14(24):1712-20.
- Guowei C, Qinghua Z, Lunxu L, Hong B, Yanping W, wen Z, y cols. Experimental study on the transcriptional targeting gene therapy of double suicide

gene driven by KDR promoter in lung cancer. *Sci Technol Rev.* 2006;24:28–31.

– Habib NA, Ding SF, el-Masry R, Mitry RR, Honda K, Michail NE, y cols. Preliminary report: the short-term effects of direct p53 DNA injection in primary hepatocellular carcinomas. *Cancer Detect Prev.* 1996;20(2):103-7.

– Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, y cols. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest.* 2008;118(9):3132-42.

– Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, Picard C, Wang GP, Berry CC, y cols. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *Engl J Med.* 2010;363(4):355-64.

– Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, y cols. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med.* 2002; 346(16):1185-93.

– Hady HR, Sołdatow M, Lukaszewicz J, Luba M, Pierko J, Myśliwiec P, y cols. Surgical treatment of malignant and benign colorectal neoplasms based on authors' clinical data. *Adv Clin Exp Med.* 2013;22(2):219-27.

– Han SX, Zhu Q, Ma JL, Lv Y, Zhao J, Huang C, y cols. Apoptin sensitizes radiation-induced cell death via classic mitochondrial, caspase and p53-dependent signaling in HepG2 cells. *Mol Med Rep.* 2011;4(1):59-63.

– Hargrave B, Downey H, Strange R Jr, Murray L, Cinnamond C, Lundberg C, y cols. Electroporation-mediated gene transfer directly to the swine heart. *Gene Ther.* 2013 Feb;20(2):151-7.

– He XJ, Shang ST, Liu YJ, Zhang Q, Wang SW. Apoptin induces G2-M arrest in cancer cells. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2004;36(3):263-7.

– Heller R, Jaroszeski MJ, Glass LF, Messina JL, Rapaport DP, DeConti RC, y cols. Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy. *Cancer.* 1996;77(5):964-71.

– Heller R, Shirley S, Guo S, Donate A, Heller L. Electroporation based gene

therapy--from the bench to the bedside. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2011;2011:736-8.

–Hernández-Marqués C, Lassaletta-Atienza A, Ruiz Hernández A, Blumenfeld Olivares JA, Arce Abaitua B, Cormenzana Carpio M, y cols. Irinotecan plus temozolomide in refractory or relapsed pediatric solid tumors. *An Pediatr (Barc).* 2013;79(2):68-74.

–Hickey P, Stacy M. AAV2-neurturin (CERE-120) for Parkinson's disease. *Expert Opin Biol Ther.* 2013;13(1):137-45.

–High KA. The gene therapy journey for hemophilia: are we there yet? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012;2012:375-81.

–Hillman GG, Slos P, Wang Y, Wright JL, Lauer A, De Meyer M y cols. Tumor irradiation followed by intratumoral cytokine gene therapy for murine renal adenocarcinoma. *Cancer Gene Ther.* 2004;11:61–72.

–Hiraoka K, Kimura T, Logg CR, Tai CK, Haga K, Lawson GW, Kasahara N. Therapeutic efficacy of replication-competent retrovirus vector-mediated suicide gene therapy in a multifocal colorectal cancer metastasis model. *Cancer Res.* 2007; 67(11):5345-53.

–Hisatsune Y, Nakano H, Mihara Y, Tobe N, Ishibashi K, Shimamura T, y cols. A patient who showed a pathologically complete response after undergoing treatment with XELOX plus bevacizumab for synchronous liver metastasis of grade H2 from sigmoid colon cancer. *J Gastrointest Oncol.* 2013;4(2):E5-E10.

–Ho EA, Osooly M, Strutt D, Masin D, Yang Y, Yan H, Bally M. Characterization of long-circulating cationic nanoparticle formulations consisting of a two-stage PEGylation step for the delivery of siRNA in a breast cancer tumor model. *J Pharm Sci.* 2013;102(1):227-36.

–Horie K, Yusa K, Yae K, Odajima J, Fischer SE, Keng VW. Characterization of Sleeping Beauty transposition and its application to genetic screening in mice. *Mol Cell Biol.* 2003;23(24):9189-207.

–Hou S, Kou G, Fan X, Wang H, Qian W, Zhang D, y cols. radication of

hepatoma and colon cancer in mice with Flt3L gene therapy in combination with 5-FU. *Cancer Immunol Immunother.* 2007; 56(10):1605-13.

– Hu H, Krasinskas A, Willis J. Perspectives on current tumor-node-metastasis (TNM) staging of cancers of the colon and rectum. *Semin Oncol.* 2011;38(4):500-10.

– Huang Q, Deng J, Xie Z, Wang F, Chen S, Lei B, y cols. Effective gene transfer into central nervous system following ultrasound-microbubbles-induced opening of the blood-brain barrier. *Ultrasound Med Biol.* 2012;38(7):1234-43.

– Hubbard JM, Alberts SR. Alternate dosing of cetuximab for patients with metastatic colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res.* 2013;6(2):47-55.

– Huber BE, Austin EA, Richards CA, Davis ST, Good SS. Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91: 8302–6.

– Hughes J, Alusi G, Wang Y. Gene therapy and nasopharyngeal carcinoma. *Rhinology.* 2012;50(2):115-21. Review.

– Huls MH, Figliola MJ, Dawson MJ, Olivares S, Kebriaei P, Shpall EJ. Clinical application of Sleeping Beauty and artificial antigen presenting cells to genetically modify T cells from peripheral and umbilical cord blood. *J Vis Exp.* 2013; 1;(72):e50070.

– Humeau LM, Binder GK, Lu X, Slepshkin V, Merling R, Echeagaray P, y cols. Efficient lentiviral vector-mediated control of HIV-1 replication in CD4 lymphocytes from diverse HIV+ infected patients grouped according to CD4 count and viral load. *Mol Ther.* 2004;9(6):902-13.

– Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell.* 1994;79(4):573-82.

– Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W y cols. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J*

Med 2004; 350:2335–2342.

– Huston MW, van Til NP, Visser TP, Arshad S, Brugman MH, Cattoglio C, y cols. Correction of murine SCID-X1 by lentiviral gene therapy using a codon-optimized IL2RG gene and minimal pretransplant conditioning. *Mol Ther.* 201; 19(10):1867-77.

– Hyams DM, Chan A, de Oliveira C, Snyder R, Vinholes J, Audeh MW, y cols. Cediranib in combination with fulvestrant in hormone-sensitive metastatic breast cancer: a randomized Phase II study. *Invest New Drugs.* 2013;31(5):1345-54.

– Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2:277-88.

– Ilantzis C, DeMarte L, Screaton RA, Stanners CP: Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. *Neoplasia.* 2002;4(2):151-63.

– Inbal B, Bialik S, Sabanay I, Shani G, Kimchi A. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol.* 2002;157(3):455-68.

– Ismaili N. Treatment of colorectal liver metastases. *World Journal of Surgical Oncology* 2011;9:154.

– Itzhaki O, Levy D, Zikich D, Treves AJ, Markel G, Schachter J, Besser MJ. Adoptive T-cell transfer in melanoma. *Immunotherapy.* 2013; 5(1):79-90. Review.

– Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvák Z. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell.* 1997;14;91(4):501-10.

– Jallepalli PV, Lengauer C. Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat Rev Cancer.* 2001;1(2):109-17.

– Jang JY, Choi Y, Jeon YK, Aung KC, Kim CW. Over-expression of

adenine nucleotide translocase 1 (ANT1) induces apoptosis and tumor regression in vivo. *BMC Cancer*. 2008;8:160. doi: 10.1186/1471-2407-8-160.

– Jaschinski F, Rothhammer T, Jachimczak P, Seitz C, Schneider A, Schlingensiepen KH. The antisense oligonucleotide trabedersen (AP 12009) for the targeted inhibition of TGF- β 2. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011 Dec;12(12):2203-13.

– Jass JR, Morson BC. Reporting colorectal cancer. *J Clin Pathol*. 1987;40(9):1016-23.

– Jayne DG, Thorpe HC, Copeland J, Quirke P, Brown JM, Guillou PJ. Five-year follow-up of the Medical Research Council CLASICC trial of laparoscopically assisted versus open surgery for colorectal cancer. *Br J Surg*. 2010;97(11):1638-45.

– Jensen LB, Ramos JL, Kaneva Z, Molin S. A substrate-dependent biological containment system for *Pseudomonas putida* based on the *Escherichia coli* *gef* gene. *Appl Environ Microbiol*. 1993;59(11):3713-7.

– Ji J, Ji SY, Yang JA, He X, Yang XH, Ling WP, y cols. Ultrasound-targeted transfection of tissue-type plasminogen activator gene carried by albumin nanoparticles to dog myocardium to prevent thrombosis after heart mechanical valve replacement. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:2911-9.

– Jia W, Mei L, Wang Y, Liu L, Che G. Double suicide genes selectively kill human umbilical vein endothelial cells. *Virology*. 2011; 8(1):74.

– Jiang BC, Yu DB, Wang LJ, Dong FL, Kaleri HA, Wang XG, Ally N, Li J, Liu HL. Doxycycline-regulated growth hormone gene expression system for swine. *Genet Mol Res*. 2012;11(3):2946-57.

– Jiang X, Wang Y, Wang H, Geng M, Liu YL. Typical symptoms of colorectal cancer and its influence in timely diagnosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2013;93(4):275-9.

– Jin JL, Gong J, Yin TJ, Lu YJ, Xia JJ, Xie YY, y cols. PTD4-apoptin protein and dacarbazine show a synergistic antitumor effect on B16-F1 melanoma

in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol.* 2011;654(1):17-25.

– Johnen S, Izsvák Z, Stöcker M, Harmening N, Salz AK, Walter P. Sleeping Beauty transposon-mediated transfection of retinal and iris pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;18;53(8):4787-96.

– Kagawa S, Ohtani S, Tanaka N, Fujiwara T. A case of advanced non-small lung cancer responding to tumor suppressor p53 gene therapy. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2004; 31(11):1788-90.

– Kammertoens T, Gelbmann W, Karle P, Alton K, Saller R, Salmons B, y cols. Combined chemotherapy of murine mammary tumors by local activation of the prodrugs ifosfamide and 5-fluorocytosine. *Cancer Gene Ther.* 2000;7:629–36.

– Kanazawa T, Mizukami H, Okada T, Hanazono Y, Kume A, Nishino H, y cols. Suicide gene therapy using AAV-HSVtk/ganciclovir in combination with irradiation results in regression of human head and neck cancer xenografts in nude mice. *Gene Ther.* 2003;10(1):51-8.

– Kastelein JJ, Ross CJ, Hayden MR. From mutation identification to therapy: Discovery and origins of the first approved gene therapy in the Western world. *Hum Gene Ther.* 2013;24(5):472-8.

– Kawakami K, Kawakami M, Joshi B, Puri R. Interleukin-13 receptor-targeted cancer therapy in an immunodeficient animal model of human head and neck cancer. *Cancer Res.* 2001;61:6194–200.

– Keeble JA, Gilmore AP. Apoptosis commitment – translating survival signals into decisions on mitochondria. *Cell Res.* 2007;17:976–84.

– Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.

– Kim H, Kokkotou E, Na X, Rhee SH, Moyer MP, Pothoulakis C, y cols. Clostridium difficile Toxin A-induced colonocyte apoptosis involves p53-dependent p21(WAF1/CIP1) induction via p38 mitogen-activated protein kinase. *Gastroenterol.* 2005;29:1875–88.

- Kinzler KW., Nilbert MC, Su LK y cols. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science*. 1991; vol. 253, no. 5020, pp. 661–665.
- Knox RJ, Friedlos F, Boland MP. The bioactivation of CB 1954 and its use as a prodrug in antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Cancer Metastasis Rev*. 1993;12(2):195-212.
- Koido S, Homma S, Okamoto M, Namiki Y, Takakura K, Uchiyama K, y cols. Fusions between dendritic cells and whole tumor cells as anticancer vaccines. *Oncoimmunology*. 2013 May 1;2(5):e24437.
- Kojima Y, Honda K, Hamada H, Kobayashi N. Oncolytic gene therapy combined with double suicide genes for human bile duct cancer in nude mouse models. *J Surg Res*. 2009;157(1):e63–70.
- Konieczny P, Swiderski K, Chamberlain JS. Gene and cell-mediated therapies for muscular dystrophy. *Muscle Nerve*. 2013; 47(5):649-63.
- Koponen JK, Kankkonen H, Kannasto J, Wirth T, Hillen W, Bujard H y cols. Doxycycline-regulated lentiviral vector system with a novel reverse transactivator rtTA2S-M2 shows a tight control of gene expression in vitro and in vivo. *Gene Therapy* 2003;10(6):459–66.
- Kuriyama S, Mitoro A, Yamazaki M, Tsujinoue H, Nakatani T, Akahane Y, y cols. *Scandinavian University Press*, 10: 1033-1041, 1999.
- Kwon BS, Jung HS, Song MS, Cho KS, Kim SC, Kimm K, Jeong JS, Kim IH, Lee SW. Specific regression of human cancer cells by ribozyme-mediated targeted replacement of tumor-specific transcript. *Mol Ther*. 2005 Nov;12(5):824-34.
- LaCasse EC. Pulling the plug on a cancer cell by eliminating XIAP with AEG35156. *Cancer Lett*. 2013 May 28;332(2):215-24.
- Lafitte M, Rousseau B, Moranvillier I, Taillepierre M, Peuchant E, Guyonnet-Dupérat V, y cols. In vivo gene transfer targeting in pancreatic adenocarcinoma with cell surface antigens. *Mol Cancer*. 2012;11:81.
- Lagisetty KH, Morgan RA. Cancer therapy with genetically-modified T

cells for the treatment of melanoma. *J Gene Med.* 2012;14(6):400-4. Review.

–Lampe J, Bossow S, Weiland T, Smirnow I, Lehmann R, Neubert W, Bitzer M, Lauer UM. An armed oncolytic measles vaccine virus eliminates human hepatoma cells independently of apoptosis. *Gene Ther.* 2013 May 30. doi: 10.1038/gt.2013.28.

–Laurent-Puig P, Agostini J, Maley K. Colorectal oncogenesis. *Bull Cancer.* 2010;97(11):1311-21.

–Lee EJ, Jameson JL. Cell-specific Cre-mediated activation of the diphtheria toxin gene in pituitary tumor cells: potential for cytotoxic gene therapy. *Hum Gene Ther.* 2002;13:533–42.

–Lee HJ, Doo SW, Kim DH, Cha YJ, Kim JH, Song YS, y cols. Cytosine deaminase-expressing human neural stem cells inhibit tumor growth in prostate cancer-bearing mice. *Cancer Lett.* 2013;S0304-3835(13)00094-3.

–Lee MS, Sun FC, Huang CH, Lien YY, Feng SH, Lai GH, y cols. Efficient production of an engineered apoptin from chicken anemia virus in a recombinant *E. coli* for tumor therapeutic applications. *BMC Biotechnol.* 2012;12:27.

–Lee SW, Lee YL, Lee YJ, Park SY, Kim IS, Choi TH, y cols. Enhanced antitumor effects by combination gene therapy using MDR1 gene shRNA and HSV1-tk in a xenograft mouse model. *Cancer Lett.* 2010;291(1):83–9.

–Leinonen HM, Ruotsalainen AK, Määttä AM, Laitinen HM, Kuosmanen SM, Kansanen E, Oxidative stress-regulated lentiviral TK/GCV gene therapy for lung cancer treatment. *Cancer Res.* 2012;1;72(23):6227-35.

–Li C, Li L, Keates AC. Targeting cancer gene therapy with magnetic nanoparticles. *Oncotarget.* 2012; 3(4):365-70.

–Li J, Wang H, Ma Z, Fan W, Li Y, Han B, y cols. TAT-Apoptin induces apoptosis in the human bladder cancer EJ cell line and regulates Bax, Bcl-2, caspase-3 and survivin expression. *Exp Ther Med.* 2012;3(6):1033-1038.

–Li X, Burnight ER, Cooney AL, Malani N, Brady T, Sander JD. piggyBac transposase tools for genome engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

2013;18;110(25):E2279-87

– Li X, Liu Y, Wen Z, Li C, Lu H, Tian M, y cols. Potent anti-tumor effects of a dual specific oncolytic adenovirus expressing apoptin in vitro and in vivo. *Mol Cancer*. 2010;9:10.

– Li Y, Wang J, Satterle A, Wu Q, Wang J, Liu F. Gene transfer to skeletal muscle by site-specific delivery of electroporation and ultrasound. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;424(2):203-7.

– Liu L, Wu W, Zhu G, Liu L, Guan G, Li X, y cols. Therapeutic efficacy of an hTERT promoter-driven oncolytic adenovirus that expresses apoptin in gastric carcinoma. *Int J Mol Med*. 2012;30(4):747-54.

– Liu Q, Luo YS, Geng L, Wang W, Lai Z, Li F. Therapeutic effect of adenovirus-mediated apoptin gene transfer combined with ADM and CDDP on hepatocellular carcinoma in mice. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2010;30(3):538-40.

– Liu T, Ye L, He Y, Chen X, Peng J, Zhang X, y cols. Combination gene therapy using VEGF-shRNA and fusion suicide gene yCDglyTK inhibits gastric carcinoma growth. *Exp Mol Pathol*. 2011;91(3):745–52.

– Liu X, Elojeimy S, El-Zawahry AM, Holman DH, Bielawska A, Bielawski J, y cols. Modulation of ceramide metabolism enhances viral protein apoptin's cytotoxicity in prostate cancer. *Mol Ther*. 2006;14(5):637-46.

– Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res*. 1991;51(12):3075-9.

– Lofano K, Principi M, Scavo MP, Pricci M, Ierardi E, Di Leo A. Dietary lifestyle and colorectal cancer onset, recurrence, and survival: myth or reality? *J Gastrointest Cancer*. 2013;44(1):1-11.

– Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanism of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(5):330-338).

– Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. *Harrison: principios de medicina interna*. Ed. McGraw Hill; 2012.

- Los M, Panigrahi S, Rashedi I, Mandal S, Stetefeld J, Essmann F, y cols. Apoptin, a tumor-selective killer. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(8):1335-42.
- Lu L, Luo ST, Shi HS, Li M, Zhang HL, He SS, y cols. AAV2-mediated gene transfer of VEGF-Trap with potent suppression of primary breast tumor growth and spontaneous pulmonary metastases by long-term expression. *Oncol Rep*. 2012; 28(4):1332-8.
- Luo XR, Li JS, Niu Y, Miao L. Adenovirus-mediated double suicide gene selectively kills gastric cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(3):781-4.
- Luo XR, Li JS, Niu Y, Miao L. Targeted killing effects of double CD and TK suicide genes controlled by survivin promoter on gastric cancer cell. *Mol Biol Rep*. 2010;38(2):1201–7.
- Lynch HT, de la Chapelle A, Hereditary colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2003; 348, 10: 919–932.
- Ma JT, Han CB, Zhao JZ, Jing W, Zhou Y, Huang LT, Zou HW. Synergistic cytotoxic effects of recombinant human adenovirus p53 and radiation at various time points in A549 lung adenocarcinoma cells. *Oncol Lett*. 2012;4(3):529-533.
- Ma YP, Yang Y, Zhang S, Chen X, Zhang N, Wang W, y cols. Efficient inhibition of lung cancer in murine model by plasmid-encoding VEGF short hairpin RNA in combination with low-dose DDP. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;25;29:56.
- Maddika S, Booy EP, Johar D, Gibson SB, Ghavami S, Los M. Cancer-specific toxicity of apoptin is independent of death receptors but involves the loss of mitochondrial membrane potential and the release of mitochondrial cell-death mediators by a Nur77-dependent pathway. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 19):4485-93.
- Maddika S, Mendoza FJ, Hauff K, Zamzow CR, Paranjothy T, Los M. Cancer-selective therapy of the future: apoptin and its mechanism of action. *Cancer Biol Ther*. 2006;5(1):10-9.
- Majumdar SR, Fletcher RH, Evans AT. How does colorectal cancer

present? Symptoms, duration, and clues to location. *Am J Gastroenterol.* 1999;94(10):3039-45.

– Manome Y, Nakayama N, Nakayama K, Furuhashi H. Insonation facilitates plasmid DNA transfection into the central nervous system and microbubbles enhance the effect. *Ultrasound Med Biol.* 2005;31(5):693-702.

– Manzano A, Pérez-Segura P. Colorectal cancer chemoprevention: is this the future of colorectal cancer prevention? *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:327341.

– Martín V, Cortes ML, de Felipe P, Farsetti A, Calcaterra NB, Izquierdo M. Cancer gene therapy by thyroid hormone-mediated expression of toxin genes. *Cancer Res.* 2000;60:3218–24.

– Martínek L, Dostálík J, Gunka I, Gunková P, Vávra P. Comparison of oncological outcomes between laparoscopic and open procedures in non-metastazing colonic carcinomas. *Rozhl Chir.* 2009 Dec;88(12):725-9.

– Martínez-Jabaloyas JM, March-Villalba JA, Navarro-García MM, Dasi F. Anti-angiogenic therapies in prostate cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2013;13(1):1-5.

– Martins-Filho PR, Kameo SY, Mascarenhas-Oliveira AC, Vieira NF, de Santana Peixoto AL. Panitumumab-induced acneiform rash in a patient with metastatic colon adenocarcinoma. *Indian J Dermatol.* 2013;58(2):164.

– Mas Morey P, Cholvi Llovell M, Nigorra Caro M, Nicolás Picó J, Vilanova Boltó M. Oxaliplatin-associated neurotoxicity in clinical practice. *Farma Hos* 2012; 36(5):336-342.

– McGarrity GJ, Hoyah G, Winemiller A, Andre K, Stein D, Blick G, Greenberg RN, Kinder C, Zolopa A, Binder-Scholl G, Tebas P, June CH, Humeau LM, Rebello T. Patient monitoring and follow-up in lentiviral clinical trials. *J Gene Med.* 2013;15(2):78-82.

– McPhillips F, Mullen P, Monia BP, Ritchie AA, Dorr FA, Smyth JF, Langdon SP. Association of c-Raf expression with survival and its targeting with

antisense oligonucleotides in ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2001 Nov 30;85(11):1753-8.

– Meluzzi D, Olson KE, Dolan GF, Arya G, Müller UF. Computational prediction of efficient splice sites for trans-splicing ribozymes. *RNA*. 2012 Mar;18(3):590-602.

– Meresman, 2011; de parte de apoptosis introducción Blanca

– Miao CH, Brayman AA, Loeb KR, Ye P, Zhou L, Mourad P, y cols. Ultrasound enhances gene delivery of human factor IX plasmid. *Hum Gene Ther*. 2005;16(7):893-905.

– Michaelsen SR, Christensen CL, Sehested M, Cramer F, Poulsen TT, Patterson AV, y cols. Single agent- and combination treatment with two targeted suicide gene therapy systems is effective in chemoresistant small cell lung cancer cells. *J Gene Med*. 2012;14(7):445-58.

– Mishra J, Drummond J, Quazi SH, Karanki SS, Shaw JJ, Chen B, y cols. Prospective of colon cancer treatments and scope for combinatorial approach to enhanced cancer cell apoptosis. *Oncol Hematol* 2013; 86:232-50.

– Miyahara T, Umeda Y, Yoshikawa S, Matsuno Y, Iwata H, Takemura H. Selective blockade of apoptosis by in vivo electroporation-mediated gene transfer combined with portal infusion of plasmid DNA attenuates liver cirrhosis. *Minerva Chir*. 2012;67(3):249-55.

– Moriuchi S, Wolfe D, Tamura M, Yoshimine T, Miura F, Cohen JB, y cols. Double suicide gene therapy using a replication defective herpes simplex virus vector reveals reciprocal interference in a malignant glioma model. *Gene Ther*. 2002;9:584–91.

– Munyon W, Buchsbaum R, Paoletti E, Mann J, Kraiselburd E, Davis D. The Aarhus statement: improving design and reporting of studies on early cancer diagnosis. *Br J Cancer*. 2012;106(7):1262-7.

– Munyon W, Kraiselburd E, Davis D, Zeigel R, Buchsbaum R, Paoletti E. Biochemical transformation of L-cells with ultraviolet-irradiated herpes simplex

virus. *Fed Proc.* 1972;31(6):1669-73.

– Murphy AM, Rabkin SD. Current status of gene therapy for brain tumors. *Transl Res.* 2013;161(4):339-54.

– Nande R, Greco A, Gossman MS, Lopez JP, Claudio L, Salvatore M, y cols. Microbubble-Assisted p53, RB, and p130 Gene Transfer in Combination with Radiation Therapy in Prostate Cancer. *Curr Gene Ther.* 2013;13(3):163-74.

– Negre O, Fusil F, Colomb C, Roth S, Gillet-Legrand B, Henri A, Beuzard Y, Bushman F, Leboulch P, Payen E. Correction of murine β -thalassemia after minimal lentiviral gene transfer and homeostatic in vivo erythroid expansion. *Blood.* 2011; May 19;117(20):5321-31.

– Negroni L, Samson M, Guignon JM, Rossi B, Pierrefite-Carle V, Baudoin C. Treatment of colon cancer cells using the cytosine deaminase/5-fluorocytosine suicide system induces apoptosis, modulation of the proteome, and Hsp90beta phosphorylation. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(10):2747–56.

– Nelson DB, McQuaid KR, Bond JH, Lieberman DA, Weiss DG, Johnston TK. Procedural success and complications of large-scale screening colonoscopy. *Gastrointest Endosc.* 2002;55(3):307-14.

– Nemunaitis J, Nemunaitis J. Head and neck cancer: response to p53-based therapeutics. *Head Neck.* 2011;33(1):131-4.

– Nemunaitis J, Nemunaitis J. Potential of Advexin: a p53 gene-replacement therapy in Li-Fraumeni syndrome. *Future Oncol.* 2008;4(6):759-68.

– Netter F. *Medicina Interna.* Ed. Masson. 1ªed. 2003.

– Nobre RJ, Almeida LP. Gene therapy for Parkinson's and Alzheimer's diseases: from the bench to clinical trials. *Curr Pharm Des.* 2011;17(31):3434-45.

– Nordenvall C, Nilsson PJ, Ye W, Nyrén O. Smoking, snus use and risk of right- and left-sided colon, rectal and anal cancer: a 37-year follow-up study. *Int J Cancer.* 2011;128(1):157-65.

– Noteborn MH, Koch G. Chicken anaemia virus infection: molecular basis of pathogenicity. *Avian Pathol.* 1995;24(1):11-31.

- Noteborn MH. Apoptin-induced apoptosis: a review. *Apoptosis*. 1999;4(5):317-9.
- Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn*. 2008 Jan;10(1):13-27.
- Oki E, Emi Y, Akagi Y, Tokunaga S, Sadanaga N, Tanaka T, y cols. Kyushu Study Group of Clinical Cancer. Phase II trial of alternating mFOLFOX6 and FOLFIRI regimens in the first-line treatment for unresectable or metastatic colorectal cancer (KSCC0701). *Oncology*. 2013;84(4):233-9.
- Olijslagers SJ, Zhang YH, Backendorf C, Noteborn MH. Additive cytotoxic effect of apoptin and chemotherapeutic agents paclitaxel and etoposide on human tumour cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2007;100(2):127-31.
- Oro C, Jans DA. The tumour specific pro-apoptotic factor apoptin (Vp3) from chicken anaemia virus. *Curr Drug Targets*. 2004;5(2):179-90. Review.
- Ortiz R, Prados J, Melguizo C, Rama AR, Alvarez PJ, Rodríguez-Serrano F, y cols. Gef gene therapy enhances the therapeutic efficacy of cytotoxics in colon cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2012;66(7):563–7.
- Ortiz R, Prados J, Melguizo C, Rama AR, Segura A, Rodríguez-Serrano F, y cols. *J Mol Med (Berl)*. 2009;87(9):899–911.
- Ortiz R, Prados J, Melguizo C, Rama AR, Segura A, Rodríguez-Serrano F, y cols. *J Mol Med (Berl)*. The cytotoxic activity of the phage E protein suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo. 2009;87(9):899–911.
- Othman EM, Leyh A, Stopper H. Insulin mediated DNA damage in mammalian colon cells and human lymphocytes in vitro. *Mutat Res*. 2013;745-746:34-9.
- Ou J, Carbonero F, Zoetendal EG, Delany JP, Wang M, Newton K, y cols. Diet, microbiota, and microbial metabolites in colon cancer risk in rural Africans and African Americans. *Am J Clin Nutr*. 2013 Jul;98(1):111-20.
- Oza AM, Elit L, Swenerton K, Faught W, Ghatage P, Carey M. Phase II study of CGP 69846A (ISIS 5132) in recurrent epithelial ovarian cancer: an NCIC

clinical trials group study (NCIC IND.116). *Gynecol Oncol.* 2003;89(1):129-33.

– Ozawa T, Hu JL, Hu LJ, Kong EL, Bollen AW, Lamborn KR, y cols. Functionality of hypoxia-induced BAX expression in a human glioblastoma xenograft model. *Cancer Gene Ther.* 2005;12:449–55.

– Pan XJ, Ma ZZ, Zhang QJ, Fan L, Li QH. Sleeping Beauty transposon system is a reliable gene delivery tool for hereditary tyrosinaemia type 1 disease gene therapy: size of the foreign gene decides the timing of stable integration into the host chromosomes. *J Int Med Res.* 2012;40(5):1850-9.

– Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71(4):1286-90.

– Park SW, Gwon HC, Jeong JO, Byun J, Kang HS, You JR, y cols. Intracardiac echocardiographic guidance and monitoring during percutaneous endomyocardial gene injection in porcine heart. *Hum Gene Ther.* 2001;12(8):893-903.

– Pastan I, Hassan R, FitzGerald DJ, Kreitman RJ. Immunotoxin treatment of cancer. *Annu Rev Med.* 2007;58:221-37.

– Patel MR, Kratzke RA. Oncolytic virus therapy for cancer: the first wave of translational clinical trials. *Transl Res.* 2013 Apr;161(4):355-64.

– Patel P, Young JG, Mautner V, Ashdown D, Bonney S, Pineda RG. A phase I/II clinical trial in localized prostate cancer of an adenovirus expressing nitroreductase with CB1954 [correction of CB1984]. Published online 2009 April 14.

– Payen E, Colomb C, Negre O, Beuzard Y, Hehir K, Leboulch P. Lentivirus vectors in β -thalassemia. *Methods Enzymol.* 2012;507:109-24.

– Payen E, Leboulch P. Advances in stem cell transplantation and gene therapy in the β -hemoglobinopathies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012;2012:276-83.

– Peltomäki P, Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition—update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Disease*

Markers. 2004;vol. 20, no. 4-5, pp. 269–276.

– Persano L, Crescenzi M, Indraccolo S. Anti-angiogenic gene therapy of cancer: current status and future prospects. *Mol Aspects Med.* 2007;28(1):87-114.

– Pietersen A, Noteborn HM. Apoptin. *Adv Exp Med Biol.* 2000;465:153-61. Review.

– Pokorny RM, Hunt L, Galandiuk S. What's new with tumor markers for colorectal cancer? *Dig Surg.* 2000;17(3):209-15.

– Poujol S, Pinguet F, Malosse F, Astre C, Ychou M, Culine S, Bressolle F. Sensitive HPLC-fluorescence method for irinotecan and four major metabolites in human plasma and saliva: application to pharmacokinetic studies. *Clin Chem.* 2003 Nov;49(11):1900-8.

– Poulin-Costello M, Azoulay L, Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Wolf M. An analysis of the treatment effect of panitumumab on overall survival from a phase 3, randomized, controlled, multicenter trial (20020408) in patients with chemotherapy refractory metastatic colorectal cancer. *Target Oncol.* 2013;8(2):127-36.

– Prados J, Alvarez PJ, Melguizo C, Rodriguez-Serrano F, Carrillo E, Boulaiz H, y cols. How is gene transfection able to improve current chemotherapy? The role of combined therapy in cancer treatment. *Curr Med Chem.* 2012;19(12):1870-88. Review.

– Prados J, Melguizo C, Boulaiz H, Marchal JA, Aránega A. Cancer gene therapy: strategies and clinical trials. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2005;51(1):23–36.

– Prados J, Melguizo C, Ortiz R, Boulaiz H, Carrillo E, Segura A, y cols. Regression of established subcutaneous B16-F10 murine melanoma tumors after gef gene therapy associated with the mitochondrial apoptotic pathway. *Exp Dermatol.* 2010;19(4):363–71.

– Prados J, Melguizo C, Rama A, Ortiz R, Boulaiz H, Rodriguez-Serrano F, y cols. Combined therapy using suicide gef gene and paclitaxel enhances growth

inhibition of multicellular tumour spheroids of A-549 human lung cancer cells. *Int J Oncol.* 2008;33(1):121-7.

– Prados J, Melguizo C, Rama AR, Ortiz R, Segura A, Boulaiz H, y cols. Gef gene therapy enhances the therapeutic efficacy of doxorubicin to combat growth of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;66(1):69–78.

– Prakash K, Varma D, Rajan M, Kamlesh NP, Zacharias P, Ganesh Narayanan R, Philip M. Laparoscopic colonic resection for rectosigmoid colonic tumours: a retrospective analysis and comparison with open resection. *Indian J Surg.* 2010;72(4):318-22.

– Prausnitz MR, Mikszta JA, Cormier M, Andrianov AK. Microneedle-based vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2009;333:369-93.

– Prewett MC, Hooper AT, Bassi R, Ellis LM, Waksal HW, Hicklin DJ. Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(5):994–1003.

– Puglisi MA, Tesori V, Lattanzi W, Gasbarrini GB, Gasbarrini A. Colon cancer stem cells: Controversies and perspectives. *World J Gastroenterol.* 2013;19(20):2997-3006.

– Puntel M, A K M GM, Farrokhi C, Vanderveen N, Paran C, Appelhans A, y cols. Safety profile, efficacy, and biodistribution of a bicistronic high-capacity adenovirus vector encoding a combined immunostimulation and cytotoxic gene therapy as a prelude to a phase I clinical trial for glioblastoma. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;268(3):318-30.

– Qu L, Wang Y, Gong L, Zhu J, Gong R, Si J. Suicide gene therapy for hepatocellular carcinoma cells by survivin promoter-driven expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Oncol Rep.* 2013;29(4):1435–40.

– Quirke P, Risio M, Lambert R, von Karsa L, Vieth M. Quality assurance in pathology in colorectal cancer screening and diagnosis—European

recommendations. *Virchows Arch.* 2011; 458(1): 1–19.

– Raja JV, Rachchh MA, Gokani RH. Recent advances in gene therapy for thalassemia. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012; 4(3):194-201.

– Rama AR, Prados J, Melguizo C, Burgos M, Alvarez PJ, Rodríguez-Serrano F. y cols. Synergistic antitumoral effect of combination E gene therapy and Doxorubicin in MCF-7 breast cancer cells. *Biomed Pharmacother.* 2011;65: 260–70.

– Rama AR, Prados J, Melguizo C, Ortiz R, Alvarez P, Rodríguez-Serrano F, y cols. E phage gene transfection enhances sensitivity of lung and colon cancer cells to chemotherapeutic agents. *Int J Oncol.* 2010;37:1503–14.

– Rama AR, Prados J, Melguizo C, Ortiz R, Alvarez P, Rodríguez-Serrano F, y cols. E phage gene transfection enhances sensitivity of lung and colon cancer cells to chemotherapeutic agents. *Int J Oncol.* 2010;37:1503–14.

– Rathkopf D, Dickson MA, Feldman DR, Carvajal RD, Shah MA, Wu N, y cols. A Phase I Study of Flavopiridol Administered with Oxaliplatin and Fluorouracil/Leucovorin (FOLFOX) in Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 2009;15(23):7405-11.

– Rätty JK, Pikkarainen JT, Wirth T, Ylä-Herttuala S. Gene therapy: the first approved gene-based medicines, molecular mechanisms and clinical indications. *Curr Mol Pharmacol.* 2008;1(1):13-23.

– Regula J, Rupinski M, Kraszewska E, Polkowski M, Pachlewski J, Orłowska J, y cols. Colonoscopy in colorectal-cancer screening for detection of advanced neoplasia. *N Engl J Med.* 2006;355(18):1863-72.

– Richards MA. The National Awareness and Early Diagnosis Initiative in England: assembling the evidence. *Br J Cancer.* 2009;101 Suppl 2:S1-4.

– Riley LB, Desai DC. The molecular basis of cancer and the development of targeted therapy. *Surg Clin North Am.* 2009;89(1):1-15.

– Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, y cols. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of

complementary DNA. *Science*. 1989 Sep 8;245(4922):1066-73. Erratum in: *Science* 1989 Sep 29;245(4925):1437.

– Ristvedt SL, Pruitt SL, Trinkaus KM. Appraisal of emerging symptoms of colorectal cancer: associations with dispositional, demographic, and tumor characteristics. *J Behav Med*. 2013 May 28.

– Rivero M, Castro B, Fernández Gil PL. Pólipos y poliposis cólica. Publicado en *Medicine*. 2012; 11:431-6 - vol.11 núm 07.

– Roig JV, Solana A, Alós R. Tratamiento quirúrgico y resultados del cáncer de colon. Publicado en *Cir Esp*. 2003;73:20-4. - vol.73 núm 01.

– Ronchel MC, Molina L, Witte A, Lutbiz W, Molin S, Ramos JL, y cols. Characterization of cell lysis in *Pseudomonas putida* induced upon expression of heterologous killing genes. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64:4904–11.

– Rossi JJ, June CH, Kohn DB. Genetic therapies against HIV. *Nat Biotechnol*. 2007; Dec;25(12):1444-54.

– Rudin CM, Holmlund J, Fleming GF, Mani S, Stadler WM, Schumm P. Phase I Trial of ISIS 5132, an antisense oligonucleotide inhibitor of c-raf-1, administered by 24-hour weekly infusion to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*. 2001;7(5):1214-20.

– Russo A, Terrasi M, Agnese V, Santini D, Bazan V. Apoptosis: a relevant tool for anticancer therapy. *Ann Oncol*. 2006;17 Suppl 7:vii115-23.

– Sakurai T, Kudo M. Signaling pathways governing tumor angiogenesis. *Oncology*. 2011;81 Suppl. 1:24-9.

– Sales JP, Parc R. Did the stage of diagnosis and the surgical management of colonic cancers change over the last ten years? Apropos of 303 patients. *Ann Chir*. 1994;48(7):591-5.

– Saliba Y, Mougnot N, Jacquet A, Atassi F, Hatem S, Farès N, y cols. A new method of ultrasonic nonviral gene delivery to the adult myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;53(6):801-8.

– Sameer AS, Chowdri NA, Syeed N, Banday MZ, Shah ZA, Siddiqi MA.

SMAD4--molecular gladiator of the TGF-beta signaling is trampled upon by mutational insufficiency in colorectal carcinoma of Kashmiri population: an analysis with relation to KRAS proto-oncogene. *BMC Cancer*. 2010;10:300.

– Sameer AS. Colorectal cancer: molecular mutations and polymorphisms. *Front Oncol*. 2013;3:114.

– Sandouk F, Al Jerf F, Bassel MHD, Halabi A Precancerous Lesions in Colorectal Cancer. *Cancer Res*.1991;51(12):3075-9.

– Sandouk F, Al Jerf F, Al-Halabi MH. Precancerous Lesions in Colorectal Cancer. *Gastroenterol Res Pract*. 2013;2013:457901.

– Sandvig K, van Deurs B. Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins. *Gene Ther*. 2005;12(11):865–72.

– Sapra P, Shor B. Monoclonal antibody-based therapies in cancer: advances and challenges. *Pharmacol Ther*. 2013;138(3):452-69.

– Schlachetzki F, Zhang Y, Boado RJ, Pardridge WM. Gene therapy of the brain: the trans-vascular approach. *Neurology*. 2004;62(8):1275-81.

– Scholler J, Brady TL, Binder-Scholl G, Hwang WT, Plesa G, Hege KM, y cols. Decade-long safety and function of retroviral-modified chime. *Sci Transl Med*. 2012; 4(132):132ra53.

– Schönig K, Bujard H, Gossen M. The power of reversibility regulating gene activities via tetracycline-controlled transcription. *Methods Enzymol*. 2010;477:429–53.

– Schoop RA, Verdegaal EM, Baatenburg de Jong RJ, Noteborn MH. Apoptin enhances radiation-induced cell death in poorly responding head and neck squamous cell carcinoma cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010;106(2):130-4.

– Schultheis B, Folprecht G, Kuhlmann J, Ehrenberg R, Hacker UT, Köhne CH, y cols. Regorafenib in combination with FOLFOX or FOLFIRI as first- or second-line treatment of colorectal cancer: results of a multicenter, phase Ib study. *Ann Oncol*. 2013;24(6):1560-7.

- Schwarzwaelder K, Howe SJ, Schmidt M, Brugman MH, Deichmann A, Glimm H, y cols. Gammaretrovirus-mediated correction of SCID-X1 is associated with skewed vector integration site distribution in vivo. *J Clin Invest.* 2007;117(8):2241-9.
- Searle PF, Chen MJ, Hu L, Race PR, Lovering AL, Grove JI. y cols. Nitroreductase: a prodrug-activating enzyme for cancer gene therapy. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004;31(11):811-6.
- Senzer N, Nemunaitis J. A review of contusugene ladenovec (Advexin) p53 therapy. *Curr Opin Mol Ther.* 2009; 11(1):54-61.
- Serda RE. Particle platforms for cancer immunotherapy. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:1683-96.
- Shanker M, Jin J, Branch CD, Miyamoto S, Grimm EA, Roth JA, Ramesh R. Tumor suppressor gene-based nanotherapy: from test tube to the clinic. *J Drug Deliv.* 2011;2011:465845.
- Sharma N, Cai Y, Bak RO, Jakobsen MR, Schröder LD, Mikkelsen JG. Efficient sleeping beauty DNA transposition from DNA minicircles. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2013;26;2:e74.
- Sharma N, Hollensen AK, Bak RO, Staunstrup NH, Schröder LD, Mikkelsen JG. The impact of cHS4 insulators on DNA transposon vector mobilization and silencing in retinal pigment epithelium cells. *PLoS One.* 2012;7(10):e48421
- Shekhar MP. Drug resistance. Challenges to effective therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011;11:613–23.
- Shen ZP, Brayman AA, Chen L, Miao CH. Ultrasound with microbubbles enhances gene expression of plasmid DNA in the liver via intraportal delivery. *Gene Ther.* 2008;15(16):1147-55.
- Sheyn D, Kimelman-Bleich N, Pelled G, Zilberman Y, Gazit D, Gazit Z. Ultrasound-based nonviral gene delivery induces bone formation in vivo. *Gene Ther.* 2008;15(4):257-66.

- Shi HS, Yang LP, Wei W, Su XQ, Li XP, Li M, y cols. Systemically administered liposome-encapsulated Ad-PEDF potentiates the anti-cancer effects in mouse lung metastasis melanoma. *J Transl Med.* 2013 Apr 3;11:86.
- Shi J, Zheng D, Liu Y, Sham MH, Tam P, Farzaneh F, y cols. Overexpression of soluble TRAIL induces apoptosis in human lung adenocarcinoma and inhibits growth of tumor xenografts in nude mice. *Cancer Res.* 2005;65:1687-92.
- Shin KS, Sullenger BA, Lee SW. Ribozyme-mediated induction of apoptosis in human cancer cells by targeted repair of mutant p53 RNA. *Mol Ther.* 2004 Aug;10(2):365-72.
- Showalter SL, Huang YH, Witkiewicz A, Costantino CL, Yeo CJ, Green JJ, y cols. Nanoparticulate delivery of diphtheria toxin DNA effectively kills Mesothelin expressing pancreatic cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2008;7:1584–90.
- Sonoda S, Tachibana K, Uchino E, Okubo A, Yamamoto M, Sakoda K, y cols. Gene transfer to corneal epithelium and keratocytes mediated by ultrasound with microbubbles. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(2):558-64.
- Srivastava D, Joshi G, Somasundaram K, Mulherkar R. Mode of cell death associated with adenovirus-mediated suicide gene therapy in HNSCC tumor model. *Anticancer Res.* 2011 Nov;31(11):3851-7.
- Stolworthy TS, Korkegian AM, Willmon CL, Ardiani A, Cundiff J, Stoddard B y cols. Yeast cytosine deaminase mutants with increased thermostability impart sensitivity to 5-fluorocytosine. *J Mol Biol.* 2008;28;377(3):854-69.
- Stopeck AT, Jones A, Hersh EM, Thompson JA, Finucane DM, Gutheil JC, Gonzalez R. Phase II study of direct intralesional gene transfer of allovectin-7, an HLA-B7/beta2-microglobulin DNA-liposome complex, in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2001;7(8):2285-91.
- Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, Lilja H, Brünner N, Chan DW y

cols. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clin Chem*. 2008;54(12):e11-79.

– Su GQ, Su G, Huang ZH. Adenovirus-mediated tissue-targeted expression of the CDglyTk gene for the treatment of breast cancer. *Mol Med Rep*. 2012;6(2):321–9.

– Sudarshan S, Holman DH, Hyer ML, Voelkel-Johnson C, Dong JY, Norris JS. In vitro efficacy of Fas ligand gene therapy for the treatment of bladder cancer. *Cancer Gene Ther*. 2005;12:12-8.

– Sun Y, Chen X, Xiao D. Tetracycline-inducible expression systems: new strategies and practices in the transgenic mouse modeling. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2007;39(4):235–46.

– Tahergorabi Z, Khazaei M. Imbalance of angiogenesis in diabetic complications: the mechanisms. *Int J Prev Med*. 2012;3(12):827-38.

– Takahashi S. Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors and their inhibitors for antiangiogenic tumor therapy. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(12):1785-8. Review.

– Tamburrino A, Piro G, Carbone C, Tortora G, Melisi D. Mechanisms of resistance to chemotherapeutic and anti-angiogenic drugs as novel targets for pancreatic cancer therapy. *Front Pharmacol*. 2013;30:4:56.

– Tang Q, Ding Q, Lin L, Zhang ZZ, Dai Z, Zhan JB. Development of antibody drugs targeting against HER2 for cancer therapy. *Yao Xue Xue Bao*. 2012;47(10):1297-305.

– Tang Y, Jackson M, Qian K, Phillips MI. Hypoxia inducible double plasmid system for myocardial ischemia gene therapy. *Hipertensión*. 2002;39(2):695–698.

– Tavassoli M, Guelen L, Luxon BA, Gäken J. Apoptin: specific killer of tumor cells? *Apoptosis*. 2005;10(4):717-24.

– Tebas P, Stein D, Binder-Scholl G, Mukherjee R, Brady T, Rebello T, y

cols. Antiviral effects of autologous CD4 T cells genetically modified with a conditionally replicating lentiviral vector expressing long antisense to HIV. *Blood*. 2013;121(9):1524-33.

– Teodoro JG, Heilman DW, Parker AE, Green MR. The viral protein Apoptin associates with the anaphase-promoting complex to induce G2/M arrest and apoptosis in the absence of p53. *Genes Dev*. 2004;18:1952-57.

– Thévenot E, Jordão JF, O'Reilly MA, Markham K, Ying-Qi L, Foust K, y cols. Targeted delivery of scAAV9 to the brain using MRI-guided focused ultrasound. *Hum Gene Ther*. 2012;23(11):1144-55.

– Tian D, Sun Y, Yang Y, Lei M, Ding N, Han R. Human telomerase reverse-transcriptase promoter-controlled and herpes simplex virus thymidine kinase-armed adenoviruses for renal cell carcinoma treatment. *Onco Targets Ther*. 2013;18;6:419-26.

– Tolcher AW, Reyno L, Venner PM, Ernst SD, Moore M, Geary RS. A randomized phase II and pharmacokinetic study of the antisense oligonucleotides ISIS 3521 and ISIS 5132 in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2002 Aug;8(8):2530-5.

– Touchefeu Y, Harrington KJ, Galmiche JP, Vassaux G. Review article: gene therapy, recent developments and future prospects in gastrointestinal oncology. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010; 32(8):953-68. Review.

– Tournigand C, André T, Achille E y cols. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: A randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004; 22:229– 237.

– Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(9):4350-4.

– Tsuji Y, Satoh T, Tsuji A, Muro K, Yoshida M, Nishina T, y cols. First-line sunitinib plus FOLFIRI in Japanese patients with unresectable/metastatic colorectal cancer: a phase II study. *Cancer Sci*. 2012;103(8):1502-7.

- Tuominen I, Al-Rabadi L, Stavarakis D, Karagiannides I, Pothoulakis C, Bugni JM. Diet-induced obesity promotes colon tumor development in azoxymethane-treated mice. *PLoS One*. 2013;8(4):e60939.
- Uckert W, Kammertons T, Haack K, Qin Z, Gebert J, Schendel D.J. y cols. Double suicide gene (cytosine deaminase and herpes simplex virus thymidine kinase) but not single gene transfer allows reliable elimination of tumor cells in vivo. *Hum Gene Ther*. 1998;9(6):855–65.
- Upton B, Chu Q, Li BD. Li-Fraumeni syndrome: the genetics and treatment considerations for the sarcoma and associated neoplasms. *Surg Oncol Clin N Am*. 2009;18(1):145-56, ix.
- Vachani A, Moon E, Wakeam E, Haas AR, Sterman DH, Albelda SM. Gene therapy for lung neoplasms. *Clin Chest Med*. 2011;32(4):865-85.
- Van Allen EM, Wagle N, Levy Ma. Clinical Analysis and Interpretation of Cancer Genome Data. *J Clin Oncol*. 2013; 31(15):1825-33.
- Van Cutsem E, Twelves C, Cassidy J, Allman D, Bajetta E, Boyer M, y cols. Xeloda Colorectal Cancer Study Group.. Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. *J Clin Oncol*. 2001;19(21):4097-106.
- van der Loo JC, Swaney WP, Grassman E, Terwilliger A, Higashimoto T, Schambach A, y cols. Critical Variables affecting clinical-grade production of the self-inactivating gamma-retroviral vector for the treatment of X-linked severe combined immunodeficiency. *Gene Ther*. 2012; 19(8):872-6.
- van Drunen Littel-van den Hurk S, Hannaman D. Electroporation for DNA immunization: clinical application. *Expert Rev Vaccines*. 2010;9(5):503-17.
- van Gijn W, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Kranenbarg EM, Putter H, Wiggers T, y cols. Dutch Colorectal Cancer Group. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *Lancet Oncol*. 2011;12(6):575-82.

- Vecil GG, Lang FF. Clinical trials of adenoviruses in brain tumors: a review of Ad-p53 and oncolytic adenoviruses. *J Neurooncol.* 2003;65:237–46.
- Verhaart IE, Aartsma-Rus A. Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol.* 2012;25(5):588-96.
- Viola JR, Rafael DF, Wagner E, Besch R, Ogris M. Gene therapy for advanced melanoma: selective targeting and therapeutic nucleic acids. *J Drug Deliv.* 2013;2013:897348.
- Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993;9(4):138-41.
- von Mehren M, Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy for cancer. *Annu Rev Med.* 2003;54:343-69.
- Wadhwa PD, Zielske SP, Roth JC, Ballas CB, Bowman JE, Gerson SL. Cancer gene therapy: scientific basis. *Annu Rev Med.* 2002;53:437-52.
- Waldecker M, Kautenburger T, Daumann H, Busch C, Schrenk D. Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *J Nutr Biochem* 2008;19:587–93.
- Walsh CE, Batt KM. Hemophilia clinical gene therapy brief review. *Transl Res.* 2013; 161(4): 307-12. Review.
- Walther W, Stein U, Fichtner I, Kobelt D, Aumann J, Arlt F, Schlag PM. onviral jet-injection gene transfer for efficient in vivo cytosine deaminase suicide gene therapy of colon carcinoma. *Mol Ther.* 2005; Dec;12(6):1176-84.
- Wang GP, Levine BL, Binder GK, Berry CC, Malani N, McGarrity G, y cols. Analysis of lentiviral vector integration in HIV+ study subjects receiving autologous infusions of gene modified CD4+ T cells. *Mol Ther.* 2009; 17(5):844-50.
- Wang Z, Lu B, Wang T, De W, Shu Y. Effect of recombinant adenovirus-p53 on growth and chemosensitivity of human lung adenocarcinoma cell lines. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.* 2006; 9(2):127-31.
- Wang ZX, Bian HB, Yang JS, De W, Ji XH. Adenovirus-mediated suicide

gene therapy under the control of Cox-2 promoter for colorectal cancer. *Cancer Biol Ther.* 2009;8(15):1480–8.

– Watanabe T, Komuro Y, Kiyomatsu T, Kanazawa T, Kazama Y, Tanaka J, y cols. Prediction of sensitivity of rectal cancer cells in response to preoperative radiotherapy by DNA microarray analysis of gene expression profiles. *Cancer Res.* 2006;66:3370–4.

– Wei SJ, Chao Y, Hung YM, Lin WC, Yang DM, Shih YL, y cols. S- and G2-phase cell cycle arrests and apoptosis induced by ganciclovir in murine melanoma cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase. *Exp Cell Res.* 1998;241(1):66-75.

– Wei XC, Wang XJ, Chen K, Zhang L, Liang Y, Lin XL. Killing effect of TNF-related apoptosis inducing ligand regulated by tetracycline on gastric cancer cell line NCI-N87. *World J Gastroenterol.* 2001;7(4):559-62.

– Weller D, Vedsted P, Rubin G, Walter FM, Emery J, Scott S, Campbell C, Andersen RS, Hamilton W, Olesen F, Rose P, Nafees S, van Rijswijk E, Hiom S, Muth C, Beyer M, Neal RD.

– Wilson JM. Gendicine: the first commercial gene therapy product. *Hum Gene Ther.* 2005;16(9):1014-5.

– Windey K, De Preter V, Verbeke K. Relevance of protein fermentation to gut health. *Mol Nutr Food Res* 2012;56:184–96.

– Wolf JK, Bodurka DC, Gano JB, Deavers M, Ramondetta L, Ramirez PT, y cols. A phase I study of Adp53 (INGN 201; ADVEXIN) for patients with platinum- and paclitaxel-resistant epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2004; Aug;94(2):442-8.

– Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, y cols. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 1990;247(4949 Pt 1):1465-8.

– Won YS, Lee SW. Cancer-specific induction of adenoviral E1A expression by group I intron-based trans-splicing ribozyme. *J Microbiol*

Biotechnol. 2012 Mar;22(3):431-5.

– Worthington J, McCarthy HO, Barrett E, Adams C, Robson T, Hirst DG. Use of the radiation-inducible WAF1 promoter to drive iNOS gene therapy as a novel anti-cancer treatment. *J Gene Med.* 2004; 6(6): 673–680.

– Wu DH, Liu L, Chen LH. Antitumor effects and radiosensitization of cytosine deaminase and thymidine kinase fusion suicide gene on colorectal carcinoma cells. *World J Gastroenterol.* 2005;11:3051–5.

– Wu Q, Shi Y, Chen L, Xiao X, Dai G. Effect and safety of bevacizumab-containing chemotherapy treatment in Chinese patients with metastatic colorectal cancer. *Onco Targets Ther.* 2013;6:485-90.

– Xie YS, Zhang YH, Liu SP, Liu SQ, Peng CW, Wu L, y cols. Synergistic gastric cancer inhibition by chemogenetherapy with recombinant human adenovirus p53 and epirubicin: an in vitro and in vivo study. *Oncol Rep.* 2010; 24(6):1613-20.

– Yamaizumi M, Mekada E, Uchida T, Okada Y. One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell.* 1978;15:245–50.

– Yang WS, Park SO, Yoon AR, Yoo JY, Kim MK, Yun CO, y cols. Suicide cancer gene therapy using pore-forming toxin, streptolysin O. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(6):1610–9.

– Yang WY, Huang ZH, Lin LJ, Li Z, Yu JL, Song HJ, y cols. Kinase domain insert containing receptor promoter controlled suicide gene system selectively kills human umbilical vein endothelial cells. *World J Gastroenterol.* 2006;12:5331–5.

– Yang X, Kessler E, Su LJ, Thorburn A, Frankel AE, Li Y, y cols. Diphtheria toxin-epidermal growth factor fusion protein DAB389EGF for the treatment of bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2013;19(1):148–57.

– Yang ZX, Wang D, Wang G, Zhang QH, Liu JM, Peng P, y cols. Clinical study of recombinant adenovirus-p53 combined with fractionated stereotactic

radiotherapy for hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010; 136(4):625-30.

– Yin F, Liu X, Li D, Wang Q, Zhang W, Li L. Tumor suppressor genes associated with drug resistance in ovarian cancer (Review). *Oncol Rep.* 2013;30(1):3-10.

– Ylä-Herttua S. Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Molecular Therapy.* 2012;20 10, 1831–1832.

– Yoo GH, Moon J, Leblanc M, Lonardo F, Urba S, Kim H, y cols. A phase 2 trial of surgery with perioperative INGN 201 (Ad5CMV-p53) gene therapy followed by chemoradiotherapy for advanced, resectable squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx, hypopharynx, and larynx: report of the Southwest Oncology Group. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009;135(9):869-74.

– Yoshida Y, Hoshino S, Aisu N, Naito M, Miyake T, Tanimura S, y cols. Pilot study of the early start of chemotherapy after resection of primary colorectal cancer with distant metastases (Pearl Star 01). *World J Surg Oncol.* 2013;11:39.

– Yu M, Chen W, Zhang J. p53 gene therapy for pulmonary metastasis tumor from hepatocellular carcinoma. *Anticancer Drugs.* 2010;21(9):882-4.

– Zabala M, Wang L, Hernandez-Alcoceba R, Hillen W, Qian C, Prieto J y cols. Optimization of the Tet-On system to regulate interleukin 12 expression in the liver for the treatment of hepatic tumors. *Cancer Res* 2004;64(8):2799–2804.

– Zanghì A, Cavallaro A, Piccolo G, Fisichella R, Di Vita M, Spartà D, y cols. Dissemination metastasis after laparoscopic colorectal surgery versus conventional open surgery for colorectal cancer: a metanalysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(9):1174-84. Review.

– Zaoui K, Bossow S, Grossardt C, Leber MF, Springfield C, Plinkert PK, y cols. Chemovirotherapy for head and neck squamous cell carcinoma with EGFR-targeted and CD/UPRT-armed oncolytic measles virus. *Cancer Gene Ther.* 2012;19(3):181-91.

- Zdenkowski N, Chen S, Van der Westhuizen A, Ackland S. Curative Strategies for Liver Metastases from Colorectal Cancer: A Review. *The Oncology* 2012;17:201-211.
- Zdenkowski N, Chen S, Van der Westhuizen A, y cols. Curative Strategies for Liver Metastases from Colorectal Cancer: A Review. *The Oncology* 2012; 17:201-211
- Zeng L, Yang S, Wu C, Ye L, Lu Y. Effective transduction of primary mouse blood- and bone marrow-derived monocytes/macrophages by HIV-based defective lentiviral vectors. *J Virol Methods*. 2006;134(1-2):66-73.
- Zeng ZJ, Li ZB, Luo SQ, Hu WX. Retrovirus-mediated tk gene therapy of implanted human breast cancer in nude mice under the regulation of Tet-On. *Cancer Gene Ther*. 2006;13(3):290-7.
- Zhang G, Liu T, Chen YH, Chen Y, Xu M, Peng J, y cols. Tissue specific cytotoxicity of colon cancer cells mediated by nanoparticle-delivered suicide gene in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. 2009;15(1):201–7.
- Zhang M, Wang J, Li C, Hu N, Wang K, Ji H, y cols. Potent growth-inhibitory effect of a dual cancer-specific oncolytic adenovirus expressing apoptin on prostate carcinoma. *Int J Oncol*. 2013;42(3):1052-60.
- Zhang X, Candas M, Griko NB, Taussig R, Bulla LA Jr. Mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(26):9897-902
- Zhang Y, Schwerbrock NM, Rogers AB, Kim WY, Huang L. Codelivery of VEGF siRNA and Gemcitabine Monophosphate in a Single Nanoparticle Formulation for Effective Treatment of NSCLC. *Mol Ther*. 2013;21(8):1559-69.
- Zhao J, Han SX, Ma JL, Ying X, Liu P, Li J, y cols. The role of CDK1 in apoptin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep*. 2013;30(1):253-9.
- Zhao JM, Wen ZJ, Li Q, Wang Y, Wu H, Xu J. y cols. A promising cancer

gene therapy agent based on the matrix protein of vesicular stomatitis virus. *Faseb J.* 2008;22:4272–80.

– Zheng JY, Chen D, Chan J, Yu D, Ko E, Pang S. Regression of prostate cancer xenografts by a lentiviral vector specifically expressing diphtheria toxin A. *Cancer Gene Ther.* 2003;10:764–70.

– Zhong L, Jayandharan GR, Aslanidi GV, Zolotukhin S, Herzog RW, Srivastava A. Development of Novel Recombinant AAV Vectors and Strategies for the Potential Gene Therapy of Hemophilia. *J Genet Syndr Gene Ther.* 2012;S1.

– Zhong Q, Kolls JK, Schwarzenberger P. Retrovirus molecular conjugates. A novel, high transduction efficiency, potentially safety-improved, gene transfer system. *J Biol Chem.* 2001;276(27): 24601-7.

– Zhou S, Zhang M, Wang J. Tumor-targeted delivery of TAT-Apoptin fusion gene using *Escherichia coli* Nissle 1917 to colorectal cancer. *Med Hypotheses.* 2011;76(4):533-4.

– Zhou S, Zhang M, Zhang J, Shen H, Tangsakara E, Wang J. Mechanisms of Apoptin-induced cell death. *Med Oncol.* 2012;29(4):2985–91.

– Zuccato C, Breda L, Salvatori F, Breveglieri G, Gardenghi S, Bianchi N, et al. A combined approach for β -thalassemia based on gene therapy-mediated adult hemoglobin (HbA) production and fetal hemoglobin (HbF) induction. *Ann Hematol.* 2012;91(8):1201-13.

– Zupanic A, Kos B, Miklavcic D. Treatment planning of electroporation-based medical interventions: electrochemotherapy, gene electrotransfer and irreversible electroporation. *Phys Med Biol.* 2012;57(17):5425-40.

