

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**Esferoides multicelulares como modelo
tumoral *in vitro* para el estudio de la expresión
de transgenes y la terapia génica**

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

Cecilia Carolina Casais

Directora de Tesis: Dra. Liliana M. E. Finocchiaro

Consejero de Estudios: Dr. Gerardo C. Glikin

Instituto de Oncología "Angel H. Roffo"
Facultad de Medicina - Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2006

Esferoides multicelulares como modelo tumoral *in vitro* para el estudio de la expresión de transgenes y la terapia génica

Esferoides multicelulares como modelo tumoral *in vitro* para el estudio de la expresión de transgenes y la terapia génica

El cultivo celular tridimensional en esferoides es un modelo mucho más realista que el cultivo en monocapas para estudiar el comportamiento de los tumores y su respuesta a distintas terapias.

Los esferoides expresaron transgenes lipofectados en forma transitoria y dirigidos por el promotor CMVie (promotor inmediato-temprano del Cito Megalo Virus) (plásmido pCMV β) con mayor eficiencia que las monocapas, y dicha expresión persistió durante más de 75 días, siendo en dicho momento similar a la de monocapas no repicadas de 8 días. Este aumento en la expresión se revirtió cuando las células formaron monocapas, y no fue debido a la integración de los vectores, que persistieron como episomas. El agregado de las secuencias EBNA-1 y *oriP* del virus Epstein-Barr al pCMV β aumentó la expresión del transgén en células humanas HEp-2. El promotor CMVie produjo los mayores niveles de expresión en todas las líneas celulares evaluadas. Su delección parcial (325 bp del extremo 5') prácticamente anuló su actividad, la que fue parcialmente restaurada por el agregado de cortas secuencias consenso.

Los esferoides resultaron menos sensibles al sistema gen suicida/prodroga HSVtk/GCV que las monocapas correspondientes, y presentaron un menor efecto *bystander*. Este fenómeno no fue consecuencia de una baja penetración del GCV sino que involucró otros mecanismos. Sin embargo, los esferoides transfectados con HSVtk fueron significativamente más sensibles al GCV que sus controles transfectados con β gal, lo que sustenta el uso de esta estrategia *in vivo*.

Palabras clave: esferoides multicelulares tumorales, terapia génica, vectores no virales, lipofección, expresión de transgenes, persistencia de expresión, sistema HSVtk/GCV.

Multicellular spheroids as an *in vitro* tumor model to study transgene expression and gene therapy

The three-dimensional cell culture in spheroids is a much more realistic model than monolayer cultures to study tumor behavior and its responsiveness to different therapies.

Spheroids expressed transiently lipofected CMVie (immediate-early Cito Megalo Virus promoter)-directed transgenes much more efficiently than monolayers, and this expression lasted for more than 75 days, being at this moment similar to non-replated monolayer expression at 8 days. This enhancement in expression was reverted when cells formed monolayers, and was not due to integration of vectors, which persisted as episomes. The addition of EBNA-1 and *oriP* sequences from Epstein-Barr virus increased transgene expression in human HEp-2 cells. The CMVie promoter produced the higher expression levels in all cell lines tested. Its partial deletion (325 bp from the 5' edge) abolished most of its activity, which was partially restored by the addition of short consensus sequences.

Spheroids resulted less sensitive to the suicide gene/prodrug HSVtk/GCV system than the corresponding monolayers, and they showed a lower bystander effect. This phenomenon was not a consequence of a low GCV penetration but involved another mechanisms. However, HSVtk-transfected spheroids were significantly more sensitive to GCV than their β gal-transfected controls, a fact that supports the utilization of this approach *in vivo*.

Keywords: multicellular tumor spheroids, gene therapy, non-viral vectors, lipofection, transgene expression, persistence of expression, HSVtk/GCV system.

ABREVIATURAS

Ad5 E4: región E4 de Adenovirus 5

BrdU: bromodeoxiuridina

β gal: β -galactosidasa

/ β : células transfectadas con β gal

CMVie: promotor inmediato-temprano del Cito Megalo virus

/E: esferoides

EBV: virus Epstein-Barr

EBNA-1: antígeno nuclear 1 del virus Epstein-Barr

GCV: ganciclovir

GCV/1d: ganciclovir agregado al día 1 post-transfección

GCV/8d: ganciclovir agregado al día 8 post-transfección

hGM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano

hIL-2: interleuquina 2 humana

HSVtk: timidina quinasa del virus herpes simplex

/M: monocapas

MCR: resistencia multicelular

MDR: resistencia múltiple a drogas

ori P: origen de replicación del virus Epstein-Barr

SV40e: promotor temprano del virus 40 de simio

/tk: células transfectadas con HSVtk

B16: línea celular de melanoma murino

LM3: línea celular de adenocarcinoma mamario murino

LM05e: línea celular de adenocarcinoma mamario murino

HEp-2: línea celular de carcinoma escamoso humano de laringe

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Oncología "Angel H. Roffo", por brindarme la posibilidad de realizar mi Tesis Doctoral en sus instalaciones.

A los Dres. Liliana Finocchiaro y Gerardo Glikin, por darme un lugar en la Unidad de Transferencia Genética.

A Liliana, mi directora de Tesis, por su constante dirección y discusión de resultados, por su paciencia, por toda su ayuda y por confiar en que todo este trabajo podía llegar a término, aunque llevara más tiempo que lo previsto.

A Armando Karara, por guiarme y enseñarme muchas cosas durante los primeros años, y por su amistad que fue creciendo con el tiempo.

A Viviana Bumashny, por su importante labor con esferoides en nuestro laboratorio.

A mis compañeros de la UTG, a todos los que están y los que estuvieron, por su afecto, por su ayuda y por aguantarme todos los días. En especial a Yanina Powazniak y a María Doris Riveros por ayudarme a sonicar miles de muestras, y a Ana Bihary y Gabriela Sobrido por la preparación del material.

A toda la gente del Area Investigación del Instituto Roffo que me dio una mano en más de una ocasión, especialmente a la Dra. Elisa Bal, a Alejandro Adam y a Martín Krasnapolski por su asistencia con el microscopio y con las computadoras.

A los Dres. Gabriel Fiszman y Alejandro Urtreger por facilitarme las células transfectadas establemente.

A la gente del INGEBI (laboratorios de los Dres. Fernando Bravo y Mariano Levin) que me ayudó con los Southern Blots.

A Claudia Jordán, Cristina Giuffre y toda la gente del grupo de los jueves, por ayudarme a superar las dificultades y a encontrar la mejor manera de seguir adelante.

A mis padres, por priorizar mi formación, siempre y ante cualquier circunstancia.

A Abril, por recordarme siempre que no estoy sola.

A toda mi gente

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

Esferoideos multicelulares como modelo tumoral <i>in vitro</i>	1
Características generales de los esferoides	2
<i>Similitud morfológica con los tumores de los que derivan</i>	2
<i>Características de crecimiento similares a las de los tumores in vivo</i>	2
<i>La resistencia multicelular como fenómeno exclusivo de las estructuras tridimensionales</i>	3
<i>Respuesta diferencial de los esferoides a factores de crecimiento, citoquinas y hormonas</i>	5
<i>Alto grado de diferenciación celular en esferoides</i>	6
<i>Adhesión celular diferencial en esferoides y en monocapas</i>	6
<i>Los esferoides presentan necrosis central y apoptosis</i>	7
<i>La difusión de macromoléculas no se ve mayormente restringida en esferoides</i>	8
Técnicas de cultivo de esferoides	8
Principales aplicaciones de los esferoides	9
<i>Obtención de tejidos artificiales</i>	9
<i>Obtención de cuerpos embrionarios (embryoid bodies) a partir de células troncales</i> ..	10
<i>Los estudios en esferoides han permitido profundizar el conocimiento de la biología tumoral</i>	10
<i>Los esferoides son modelos muy apropiados para las terapias antineoplásicas</i>	11
La terapia génica del cáncer	13
Estrategias para la terapia génica del cáncer	13
<i>El sistema HSVtk /GCV es la estrategia suicida más utilizada</i>	14
Ensayos clínicos de terapia génica	16
Vectores y sistemas de transferencia genética	17
<i>Los liposomas catiónicos son vehículos eficientes, sencillos y seguros</i>	18
Los vectores persistentes	20
<i>Los vectores derivados del virus Epstein-Barr aumentan los niveles y la duración de la expresión de transgenes</i>	20
<i>La región E4 de Adenovirus otorga persistencia a la expresión de transgenes</i>	22
Esferoideos en terapia génica	24
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Líneas celulares	26
Cultivos	26
Crecimiento de esferoides	26
Crecimiento de tumores <i>in vivo</i>	27

Determinación de la síntesis de ADN	27
Inmunohistoquímica de bromodeoxiuridina (BrdU)	27
Determinación de proteínas	28
Ensayos de viabilidad celular	28
Plásmidos	28
Preparación de liposomas y lipofección <i>in vitro</i>	31
Tinción con X-Gal	32
Cuantificación de la actividad β -galactosidasa	32
Ensayo ELISA para hGM-CSF	33
Análisis por <i>Southern Blot</i>	33
Ensayos de sensibilidad al GCV	33
Ensayos de efecto <i>bystander</i>	34
Análisis por <i>Western Blot</i>	34
Análisis estadístico	35

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Morfología y cinética de crecimiento de los esferoides	36
<i>Esferoides de distintas líneas celulares presentaron morfologías particulares</i>	36
<i>Los esferoides crecieron en forma similar a los tumores in vivo</i>	36
<i>Los patrones de crecimiento de los esferoides fueron característicos de cada</i> <i>línea celular</i>	37
<i>Las células de las capas más externas fueron las que proliferaron activamente</i>	40
Aumento de los niveles y persistencia de expresión de transgenes en esferoides	42
Los esferoides mostraron una expresión del transgén alta y persistente	42
<i>La actividad βgal total se correlacionó con la actividad específica y con el grado</i> <i>de compactación de los esferoides</i>	44
<i>Las células βgal+ se distribuyeron en regiones definidas en los esferoides</i>	46
La composición del cassette de expresión fue un determinante clave en los niveles de expresión del transgén	46
<i>La inserción de las secuencias virales EBNA-1/oriP aumentó la expresión de βgal</i> <i>a largo plazo a partir de CMVie en células humanas</i>	46
<i>Una mayor producción de EBNA-1 no aumentó la expresión de βgal</i>	48
<i>La cotransfección con el gen AdE4 incrementó la expresión de βgal en esferoides</i>	49
<i>La eficiencia de lipofección de los distintos plásmidos se correlacionó parcialmente</i> <i>con la actividad βgal</i>	50
<i>El promotor CMVie completo produjo la máxima expresión del transgén</i> <i>en esferoides</i>	50
La persistencia de la expresión se debió a la expresión génica sostenida.....	54
El efecto de la configuración espacial del cultivo sobre la expresión de transgenes fue reversible	57

La expresión del transgén a largo plazo ocurrió independientemente de la integración del vector en el genoma celular	59
<i>Los vectores se mantuvieron en forma episomal</i>	59
<i>El efecto de la configuración tridimensional sobre la expresión de transgenes integrados fue opuesto al observado en la expresión transitoria de los mismos</i>	59
Respuesta al sistema gen suicida/prodroga HSVtk/GCV en esferoides	62
<i>A pesar de la eficiente expresión de transgenes, los esferoides resultaron más resistentes al sistema HSVtk/GCV.....</i>	62
<i>El efecto bystander in vitro fue menor en esferoides</i>	63
<i>El agregado de GCV a los 8 días post-transfección no modificó la sensibilidad de los esferoides LM05e pero disminuyó la de LM3</i>	64
<i>El agregado de GCV durante la transfección eliminó más del 40% de las células en esferoides transfectados con HSVtk</i>	66
<i>El tratamiento con el sistema HSVtk/GCV disminuyó el tamaño de los esferoides</i>	68
<i>El efecto bystander requirió contacto físico entre células y proliferación celular</i>	71
<i>Los mediadores apoptóticos resultaron diferencialmente regulados en monocapas y esferoides</i>	71
Los esferoides tumorales serían óptimos modelos para el estudio de la expresión y terapia génica	74
CONCLUSIONES	78
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

INTRODUCCIÓN

ESFEROIDES MULTICELULARES COMO MODELO TUMORAL *IN VITRO*

Durante muchos años se han investigado los mecanismos del crecimiento maligno y la respuesta de las células tumorales a diversas terapias utilizando como modelo líneas celulares tumorales estables creciendo en monocapa. Sin embargo, el crecimiento bidimensional de las células tumorales, donde todas están igualmente expuestas a oxígeno y nutrientes, no representa completamente las características de los tumores sólidos tridimensionales, en los que la distribución no uniforme de oxígeno y nutrientes, así como otros tipos de estrés físico y químico, resultan en una significativa heterogeneidad celular, desarrollándose daño celular e incluso necrosis en aquellas zonas donde el suministro de oxígeno y nutrientes es bajo [1]. Esta gran variación ambiental en las diferentes zonas del tumor posiblemente ha generado subpoblaciones de células con distintas propiedades funcionales y de crecimiento, así como diferentes respuestas a las diversas modalidades terapéuticas. Pequeños nódulos tumorales o microrregiones de tumores grandes pueden ser considerados nichos microambientales con gradientes de metabolitos críticos como oxígeno, glucosa, lactato, iones H^+ , otros nutrientes, hormonas y factores de crecimiento [2].

Los esferoides constituyen un modelo de cultivo tridimensional *in vitro* de células que crecen agrupadas en suspensión. Los primeros trabajos en este campo se centraron en la morfogénesis, utilizando cultivos esféricos de células embrionarias y tumorales. Pero el espectro de la investigación con agregados celulares fue ampliado por Sutherland y colaboradores alrededor de 1970, quienes inauguraron los esferoides multicelulares tumorales como modelo *in vitro* para estudios sistemáticos de la respuesta tumoral a diversas terapias [3]. Este modelo, de complejidad intermedia entre los cultivos en monocapa y los tumores *in vivo*, recrea más estrechamente que otros las áreas pobremente oxigenadas y necróticas de los tumores y permite estudiar muchas de las diferencias en la respuesta a la radio y quimioterapia observada entre las células creciendo en monocapa y los tumores *in vivo* [4]. Tal vez el hallazgo más importante en este área haya sido el descubrimiento de un tipo de resistencia a diversas terapias, exclusivo de las estructuras tridimensionales, llamada *resistencia multicelular* (MCR), presente tanto en esferoides como en tumores *in vivo* [5].

Los estudios orientados hacia la terapia antineoplásica pasaron a ser el principal campo de investigación con esferoides, aunque dichas investigaciones dieron lugar a varios estudios sobre mecanismos biológicos básicos, como la regulación de la proliferación, la muerte celular, la invasión, la angiogénesis o la respuesta inmune [6].

En un trabajo muy interesante realizado por Dangles y colaboradores [7], se cuantificó la expresión de 28 genes claves en el desarrollo y progresión tumorales en tres tumores de vejiga y sus líneas celulares derivadas, cultivadas en suspensión, en monocapas y en esferoides. Los resultados mostraron diferencias cuantitativas entre los tres modelos experimentales de entre 2 y 63 veces en la expresión de 24 de los 28 genes evaluados, demostrando que el modelo de cultivo influye muy significativamente en las características de las células.

Características generales de los esferoides

Similitud morfológica con los tumores de los que derivan

Los esferoides tumorales pueden ser formados a partir de un número ilimitado de líneas celulares y tejidos. El curso temporal de la formación de esferoides puede variar entre una línea y otra, así como el tamaño, la forma y el grado de compactación de los mismos. Así, determinadas líneas celulares forman esferoides muy compactos y generalmente redondeados en los cuales no pueden distinguirse los límites intercelulares, mientras que otras forman agregados más laxos y de forma irregular, en los cuales se ven claramente células individuales. Es sumamente interesante notar la alta similitud que suele existir entre los esferoides y los tumores sólidos *in vivo* que los originan [1].

Características de crecimiento similares a las de los tumores sólidos in vivo

Además de la morfología, los esferoides también se asemejan a los tumores sólidos *in vivo* en su dinámica de crecimiento. Los cultivos en monocapa crecen exponencialmente, mientras que los tumores sólidos y los esferoides tumorales se caracterizan por una fase exponencial temprana seguida de un período de crecimiento más lento. La primera fase es independiente de factores externos, mientras que la segunda depende del tamaño del tumor y de las restricciones nutricionales impuestas a las células que se localizan en el interior del tumor [1].

Para demostrar la importante similitud entre el crecimiento de los tumores sólidos y el crecimiento de los esferoides tumorales se han aplicado varios modelos matemáticos. Por ejemplo, se han descrito curvas de crecimiento con tres fases sucesivas (geométrica, lineal y *plateau*), donde la fase geométrica corresponde a la

agregación y proliferación de esferoides pequeños, y las fases lineal y *plateau* representan respectivamente el desarrollo de una región interna no proliferativa y la formación de un centro necrótico en los esferoides [8]. La aplicación de éste y otros modelos al crecimiento de tumores sólidos y de cultivos en esferoides y en monocapas ha permitido concluir que los esferoides tumorales representan un modelo mucho más realista para los tumores sólidos *in vivo* que los cultivos en monocapas.

En los tumores, las células en proliferación están usualmente localizadas a unas pocas capas celulares de distancia de los vasos sanguíneos, mientras que las células quiescentes y necróticas se ubican a distancias progresivas de los vasos. La distancia entre los vasos y las áreas necróticas, medida en varios tumores humanos y de roedor, varía entre 50 y 250 μm . Notablemente, esta distancia es aproximadamente la misma que se observa en esferoides desde la periferia hasta la zona de necrosis, y depende del tipo celular y de su tasa metabólica, del grado de empaquetamiento celular y de las concentraciones de sustratos en el medio de cultivo. Para la mayoría de las células humanas creciendo bajo condiciones óptimas de oxígeno y nutrientes, el grosor de las capas de células viables que rodean a los centros necróticos en los esferoides es de 100 a 220 μm , con volúmenes extracelulares del 35 al 55%, valores similares a los encontrados en tumores *in vivo* [2].

A través de estas pequeñas distancias, de alrededor de 10 a 20 diámetros celulares, pueden desarrollarse diferencias significativas en el microambiente celular. Generalmente, la mayor parte de las células proliferativas se encuentran en las 3 a 5 capas más externas. Las células quiescentes se ubican más internamente e incluyen una importante proporción de células que son viables y replicativas cuando se las saca de este entorno. Estas células pueden ser reclutadas para repoblar el compartimiento proliferativo [6].

La resistencia multicelular como fenómeno exclusivo de las estructuras tridimensionales

La investigación de la resistencia al tratamiento del cáncer se centró durante más de 20 años en la resistencia múltiple a drogas (MDR). La MDR involucra la sobreexpresión del gen *mdr1*, que codifica para una glicoproteína de membrana: la glicoproteína P (Pgp), que aparentemente funciona como una bomba dependiente de ATP (adenosín trifosfato) que expulsa drogas hidrofóbicas. La expresión de Pgp en tumores se asocia a menudo con mal pronóstico y baja respuesta a la quimioterapia. Una gran cantidad de drogas antineoplásicas han sido identificadas como “sustratos”

de esta bomba [9]. A pesar de haberse trabajado mucho sobre el tema, aún no ha surgido un método útil para revertir la MDR que sea adecuado para el uso clínico, aunque varios compuestos han entrado en ensayos clínicos. Una posible explicación para esta falla es que el modelo experimental utilizado no fue el apropiado. Muchos de los estudios fueron realizados *in vitro* con células a las que se les indujo resistencia mediante una larga exposición a concentraciones crecientes de una droga. Los índices de resistencia de estas sublíneas celulares fueron de entre 10 y 1000, mientras que un índice mayor o igual a 2 *in vivo* es suficiente para provocar el fracaso de la quimioterapia.

Cuando las células tumorales crecen en esferoides, exhiben un fenómeno conocido como *resistencia multicelular* (MCR), y los tumores *in vivo* parecen presentar las mismas características.

En cuanto las células han establecido contacto con su microambiente (células homólogas y heterólogas y matriz extracelular), se hacen menos sensibles a las drogas antineoplásicas. Entonces, para obtener el mismo nivel de inhibición del crecimiento celular observado *in vitro* en cultivos en monocapa, la concentración de la droga debe ser incrementada en un factor que es altamente variable dependiendo de la droga evaluada. Esta resistencia, dependiente del contacto, desaparece al disgregar los contactos celulares.

En presencia de MCR, la cual comienza menos de 24 horas después de iniciar el cultivo en esferoides, las células pueden volverse resistentes a la mayoría de las drogas antitumorales, a la inmunoterapia y a diversas clases de radioterapia [5].

Los mecanismos involucrados en la MCR no han sido aún elucidados completamente. Una de las razones para ello es que existen varios mecanismos de resistencia y sólo puede observarse el resultado final de la suma de todos ellos.

Los mecanismos de la MCR pueden ser divididos en dos clases: la resistencia por contacto (similar a la observada en monocapas confluentes), y la resistencia relacionada con la estructura heterogénea de los agregados tridimensionales. Es posible considerar la posibilidad de un mecanismo en dos etapas: primero la resistencia por contacto, y luego la debida a la estructura tridimensional. Los mecanismos involucrados incluyen:

- inhibición de la apoptosis por contacto entre células o entre célula y matriz;
- alta proporción de células quiescentes;
- modulación de la expresión de proteínas, incluyendo topoisomerasas y enzimas de reparación del ADN;
- potenciales problemas de permeabilidad; y

- presencia de un centro hipóxico y/o necrótico [5].

Un ejemplo de la importancia de la adhesión celular en la MCR lo constituyen las células de carcinoma mamario murino EMT-6, que han sido seleccionadas por su resistencia a varios agentes alquilantes *in vivo*. Al cultivar estas células *in vitro*, se observó una correlación entre el grado de compactación de los esferoides y su grado de resistencia. El aumento en la adhesión intercelular se asoció también con una menor fracción proliferativa en las células y con una capacidad mucho menor de detenerse en la fase G2/M del ciclo celular luego de la exposición a la droga [10].

Algunas evidencias permiten diferenciar claramente la MCR de la MDR. En primer lugar, se ha observado que un aumento en la densidad celular induce una disminución en la expresión del gen *mdr1* y en la concentración de glicoproteína P [11]. Por otro lado, se han encontrado niveles equivalentes de ARNm para *mdr1* en células cultivadas en esferoides y en monocapas [12].

Se requiere una nueva clase de drogas terapéuticas para revertir la MCR. Algunos compuestos capaces de interrumpir la comunicación y la unión entre las células tumorales y su microambiente parecen ser capaces de superar la MCR y, sorprendentemente, inhibir la metástasis.

La hialuronidasa, una enzima que hidroliza ácido hialurónico, disminuye la adhesión a la matriz extracelular y restaura la sensibilidad de las células a las drogas antineoplásicas. Naturalmente, la hialuronidasa sólo modula la resistencia relacionada con la adhesión celular. Esta enzima ya ha sido utilizada en pacientes como suplemento de la quimioterapia [10,13].

Otras moléculas utilizadas para revertir la adhesión celular y modular la MCR, también llamadas *quimiosensibilizadores*, son: verapamil, ciclosporina A, anticuerpos monoclonales dirigidos contra moléculas que median la adhesión celular y moléculas que imitan secuencias de unión de proteínas de adhesión o de sus receptores [13,14].

Respuesta diferencial de los esferoides a factores de crecimiento, citoquinas y hormonas

Varios estudios han demostrado importantes diferencias en la respuesta a factores de crecimiento, citoquinas y hormonas en esferoides comparados con sus respectivas monocapas. En un trabajo, se observó que una concentración muy baja de EGF (factor de crecimiento epidérmico) estimuló el crecimiento de esferoides de la línea celular A431, mientras que la misma concentración de EGF inhibió el crecimiento

de estas células en monocapa; aunque se observó una cantidad mucho menor de receptores para EGF en esferoides que en monocapas [15]. También se han observado diferencias en la expresión de TGF- α y TGF- β (factores de crecimiento tumoral - α y - β , respectivamente) en esferoides de distintas líneas celulares, con respecto a sus monocapas [16].

En base a estos resultados, se puede concluir que los estudios *in vitro* que buscan determinar el rol de factores de crecimiento en tumores deberían realizarse en cultivos en esferoides en lugar de monocapas [16].

Alto grado de diferenciación celular en esferoides

Se ha encontrado evidencia de una alta diferenciación en esferoides de células normales y tumorales, en cuanto a criterios morfológicos, bioquímicos e inmunológicos.

En esferoides, la expresión de antígenos fetales es cualitativa y cuantitativamente diferente a la de monocapas. Por ejemplo, los esferoides de algunas líneas de adenocarcinoma de colon se diferencian para desarrollar estructuras pseudoglandulares que poseen características de los tumores *in vivo*, en las que la expresión de antígeno carcinoembrionario (CEA) es ocho veces mayor que en las mismas células cultivadas en monocapas [17].

Por otra parte, se ha observado morfogénesis glandular en células aisladas de glándula traqueal humana, cultivadas en geles tridimensionales de colágeno [18].

Adhesión celular diferencial en esferoides y en monocapas

En los esferoides, las células se mantienen unidas por microproyecciones de la membrana celular, por moléculas de adhesión, por matriz extracelular y por una variedad de uniones intercelulares (uniones estrechas, adherentes, en hendidura o *gap* y desmosomas).

Varios estudios apoyan que los esferoides constituyen un modelo más adecuado que las monocapas para el estudio de la adhesión celular. Por ejemplo, se ha observado que la cantidad de matriz extracelular en esferoides de glioma, osteosarcoma y melanoma es mucho mayor que en monocapas de las mismas células, y que su composición y organización se asemeja mucho a la de la matriz extracelular de los tumores *in vivo*. Lo mismo ocurre con el patrón de expresión de integrinas, el cual puede ser modulado por el microambiente y los contactos

intercelulares en los esferoides. También se han encontrado diferentes patrones de expresión en esferoides y en monocapas de cadherinas y otras moléculas de adhesión intercelular [16].

En los últimos años, se ha afirmado el concepto de que existe una estrecha relación entre la supervivencia de varios tipos celulares y la adhesión celular, la cual incluye contactos célula-célula y célula-matriz extracelular. En base a estudios realizados en esferoides, se ha avanzado significativamente al reconocer que la señalización intercelular puede regular la supervivencia. Durante mucho tiempo se ha creído que el crecimiento independiente de anclaje es fundamental para la progresión tumoral. La acumulación de evidencia experimental indica ahora que la adhesión intercelular puede proveer señales compensatorias que promuevan la viabilidad celular, y esta supervivencia aberrante podría contribuir al crecimiento neoplásico, así como al desarrollo de resistencia multicelular [18].

Otra variable relacionada con la supervivencia celular en relación a la adhesión es la forma celular alterada en esferoides. Esta forma alterada puede estimular transducciones mecanoquímicas desde la membrana celular, a través del citoesqueleto y la matriz nuclear, a la cromatina, afectando entonces el empaquetamiento del ADN y las interacciones entre ADN y enzimas [19].

Los esferoides presentan necrosis central y apoptosis

Con pocas excepciones, los esferoides se caracterizan por la emergencia de una desintegración celular en su región central, la cual es usualmente llamada necrosis. Al crecer el esferoide, el diámetro de dicha necrosis se expande a una velocidad similar a la del aumento del volumen del esferoide, lo cual resulta en un grosor relativamente constante de la capa de células viables a medida que el diámetro del esferoide aumenta.

El inicio y la expansión de la necrosis central en esferoides se ha caracterizado como una compleja interacción de varios mecanismos biológicos. En la mayoría de los casos, la necrosis no es una consecuencia directa de la hipoxia o anoxia ni de la depleción de nutrientes, tal como ha sido el dogma durante varios años. Por el contrario, los esferoides pueden ser clasificados en tres grupos: (i) esferoides en los que la hipoxia y la necrosis emergen simultáneamente, (ii) esferoides en los que la hipoxia comienza antes que la necrosis, y (iii) esferoides en los que la necrosis comienza antes que la hipoxia [20].

Por otro lado, se ha informado en varios trabajos que los esferoides pueden contener células apoptóticas. Por ejemplo, en esferoides de células V79 las células apoptóticas se observan en forma dispersa en eventos singulares o en pequeños grupos, se acumulan con frecuencia creciente en el centro del esferoide, y eventualmente se unen para formar un área central de destrucción celular que puede ser considerada una necrosis secundaria [6].

La difusión de macromoléculas no se ve mayormente restringida en esferoides

La aplicación de moléculas terapéuticas (por ejemplo drogas quimioterapéuticas) a tumores sólidos se enfrenta muy a menudo con problemas que conciernen a su difusión en el contexto de un tejido organizado. Aún si la vía de administración es local y no sistémica, el transporte de una macromolécula terapéutica dentro de un tumor sólido se enfrenta con la barrera que representa el movimiento en el espacio intersticial. Debido a espacios intersticiales amplios y a la falta de drenaje linfático, la presión intersticial es generalmente más alta dentro del tumor que en el tejido normal circundante, por lo tanto el movimiento del solvente tiende a transportar moléculas hacia afuera, y una macromolécula en la periferia del tumor debe superar esta convección para penetrar en el tumor por difusión.

Sin embargo, los esferoides tumorales son en general relativamente pequeños comparados con los tumores, y bajo estas condiciones la presión intersticial probablemente iguala a la de los tejidos normales. Por lo tanto, los esferoides representan un modelo óptimo para investigar efectos de macromoléculas en estructuras tridimensionales en las que la presión intersticial es despreciable, por ejemplo tumores pequeños y micrometástasis [21].

Técnicas de cultivo de esferoides

A continuación se describen brevemente las técnicas más utilizadas para obtener y cultivar esferoides. También pueden utilizarse combinaciones de estas técnicas.

- Técnica *liquid-overlay*: Es la más sencilla y la más utilizada. Se colocan suspensiones unicelulares de células tumorales, provenientes de monocapas tripsinizadas o de tumores disgregados, en placas cubiertas con una superficie no adherente, siendo la más usada una fina capa de agar o agarosa. Las células no

se adhieren a un sustrato sino que crecen en suspensión por encima del mismo. En general, al término de uno a tres días se forman pequeñas colonias de células agregadas. Cuando estos agregados se hacen compactos y redondeados, se los coloca en otra placa no adherente, descartando las células que no formaron esferoides, y se los mantiene en cultivo cambiando el medio regularmente.

- Método del frasco *spinner*: Células tripsinizadas provenientes de monocapas en crecimiento son colocadas en frascos spinner. La agitación inhibe la adhesión de las células al frasco, y con el tiempo las células forman agregados que posteriormente se transforman en esferoides. Los esferoides son colectados cuando alcanzan el tamaño requerido.
- Sistema de rotación giratoria: Las células provenientes de monocapas tripsinizadas se colocan en frascos Erlenmeyer de vidrio o de plástico no adherente con una cantidad controlada de medio de cultivo. Los frascos son luego incubados en un agitador rotatorio, determinando la velocidad de rotación óptima. Los esferoides son colectados cuando alcanzan el tamaño requerido [1].

Por otro lado, existen también unas pocas líneas celulares que forman esferoides espontáneamente en cultivo [18].

Principales aplicaciones de los esferoides

Obtención de tejidos artificiales

Aunque durante años se ha utilizado la técnica de cultivo de tejidos y órganos en forma de explantos, se han generado recientemente tejidos bioartificiales *in vitro* a partir de células individuales provenientes de material primario o de líneas celulares. Estos cultivos tridimensionales fueron obtenidos explotando la agregación celular espontánea y generando conglomerados celulares más o menos esféricos, o bien cultivando las células sobre sustratos artificiales que inducen la diferenciación celular.

Durante los últimos años se han obtenido, con mayor o menor éxito, tejidos artificiales de hígado, páncreas, glándula pineal, glándula tiroides, cerebro, corazón y piel [6].

Obtención de cuerpos embrionarios (embryoid bodies) a partir de células troncales

Los *embryoid bodies* son cultivos tridimensionales derivados de células troncales embrionarias pluri o totipotentes que han retenido su capacidad para la determinación del linaje. El campo en el que más se han desarrollado es el de la hematopoyesis, y se considera que se está cerca de generar sangre artificial. También se ha investigado la vasculogénesis utilizando este tipo de modelo [6].

Los estudios en esferoides han permitido profundizar el conocimiento de la biología tumoral

En los últimos años se han realizado en esferoides numerosos estudios sobre invasión y metástasis, la mayoría de ellos dirigidos hacia la inhibición de dichos procesos mediante la interferencia con los mecanismos que involucran. Tales mecanismos se relacionan con el gen supresor tumoral p16, varias moléculas de adhesión, receptores de factores de crecimiento, conexinas y uniones *gap*, inhibidores de metaloproteasas y varios constituyentes de la matriz extracelular [20].

Uno de los ensayos clásicos para estudiar la invasión *in vitro* es el cocultivo de esferoides tumorales con fragmentos de corazón de embrión de pollo. Otro modelo más moderno es el de agregados de cerebro de feto de rata como blanco para la invasión por esferoides de células de glioma [22].

En cuanto a la angiogénesis, debe reconocerse que los esferoides no han podido ser vascularizados *in vitro*, ya que parecen ser resistentes a la invasión por células endoteliales en cocultivos [23]. Sin embargo, Zwi y colaboradores [24] han desarrollado una técnica para la implantación de esferoides en la cavidad peritoneal, donde resultan vascularizados y de donde pueden ser recuperados para cuantificar la vascularización. Los estudios de implantación de esferoides han incrementado sustancialmente el conocimiento de la angiogénesis tumoral [20].

Los esferoides son modelos muy apropiados para las terapias antineoplásicas

Quimioterapia: Por un lado, el descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas oncológicas requiere sistemas de *screening* rápidos y sencillos que optimicen la selección de las moléculas más activas, a partir de un gran número de drogas potenciales, para introducirlas en ensayos preclínicos, y los cultivos tridimensionales son muy apropiados para este fin [25]. Por otro lado, los esferoides representan excelentes modelos para estudiar la resistencia a agentes antitumorales, ya que ayudan a discriminar las formas de resistencia intrínsecas y adquiridas, lo cual debería ser la base de nuevos enfoques para superar la falta de quimiosensibilidad [10].

Inmunoterapia: Sólo hubo unos pocos trabajos recientes sobre la utilización de esferoides en este campo. En un interesante estudio realizado por Borgstrom y colaboradores [26], se implantaron esferoides en ratones *nude* para su vascularización, y utilizando microscopía intravital se pudo observar la interacción entre los leucocitos y la nueva microvasculatura tumoral formada.

Radioterapia: Los estudios relacionados con la radioterapia dominaron el campo de la investigación con esferoides en los años '70 y '80. Posteriormente hubo una disminución en la cantidad de trabajos en el área. Sin embargo, varios grupos continúan investigando en el tema, y se siguen generando resultados muy interesantes. Un ejemplo es el trabajo de Stuschke y colaboradores [27], quienes mostraron que el grado de diferenciación es un determinante importante en la radiosensibilidad de varios tipos de esferoides de origen humano. Por otro lado, la interacción entre células viables y células muertas o moribundas en una estructura tridimensional puede aumentar la radiosensibilidad [28].

Tratamientos con anticuerpos: Varios grupos han investigado durante mucho tiempo las características de adhesión y penetración de anticuerpos en esferoides, que podrían aplicarse a la terapia del cáncer. Varios de estos estudios han utilizado anticuerpos marcados radiactivamente, con el intento adicional de sentar una base para los futuros tratamientos de inmunorradioterapia *in vivo*. Por ejemplo, se han utilizado ampliamente anticuerpos marcados con ^{125}I y ^{131}I para evaluar su potencial terapéutico en esferoides de distintos tipos histológicos [21].

Macromoléculas que interfieren con la adhesión: Con el objetivo de influir sobre el crecimiento, diferenciación y potencial invasivo de las células tumorales en cultivos tridimensionales, varios estudios con esferoides han utilizado componentes de la matriz extracelular o anticuerpos no marcados dirigidos contra estructuras de la

superficie celular involucradas en la adhesión célula-célula o célula-matriz extracelular [21].

Inmunotoxinas: Los conjugados citotóxicos selectivos de tumor (inmunotoxinas) son producidos por la unión química o genética de toxinas bacterianas, toxinas vegetales, drogas y otros compuestos tóxicos, a moléculas vehículo (anticuerpos, *ligandos*, factores de crecimiento) que se unen a antígenos o a receptores de la superficie celular. Varios estudios con esferoides muestran que la eficacia de las inmunotoxinas en estructuras tridimensionales está muy influenciada por la cantidad de antígenos o receptores expresados por las células tumorales, y por la afinidad de la interacción inmunotoxina-célula. Las respuestas obtenidas han sido muy heterogéneas [21].

LA TERAPIA GENICA DEL CANCER

El cáncer es una enfermedad genética en la que las células evidencian mutaciones en genes relacionados con el control del crecimiento y la apoptosis, y poseen alteraciones funcionales que apoyan su capacidad de invadir y hacer metástasis. La interacción de las células tumorales con su microambiente, que incluye matriz extracelular, células del sistema inmune y células necesarias para la inducción de angiogénesis, es un componente crítico del crecimiento tumoral. Entonces, existen muchos blancos potenciales en los que la introducción de nuevos genes y la inactivación de genes activos o defectuosos puede limitar o eliminar el crecimiento del tumor. A medida que crece el entendimiento de la biología tumoral y de las interacciones tumor-huésped, el número de blancos posibles se incrementa. Sin embargo, algunos de estos blancos no son inactivados tan fácilmente como lo predice la teoría, y la aplicación de una terapia génica completamente segura y eficiente ha resultado ser una tarea muy compleja.

En la terapia génica del cáncer hay tres temas recurrentes. El primero es el diseño de estrategias para matar o enlentecer el crecimiento de las células tumorales. El segundo es el desarrollo de vectores y sistemas de transferencia genética que sean seguros, eficientes y, en la medida de lo posible, direccionados. El tercer tema es la traducción de estudios preclínicos a protocolos clínicos y ensayos para evaluar la seguridad y eficacia de la terapia [29].

Estrategias para la terapia génica del cáncer

El éxito en el desarrollo de estrategias para la terapia génica del cáncer está estrechamente relacionado con el entendimiento de la biología del cáncer humano.

Las principales estrategias dirigidas a las células tumorales son:

- la introducción de genes supresores tumorales (por ejemplo: p53 y Rb) que pueden estar inactivados en ciertos tumores;
- la expresión de oncogenes dominantes negativos y versiones dominantes negativas de otros genes promotores del crecimiento;
- la inducción de apoptosis, ya sea directamente o en combinación con otras modalidades como la radioterapia y la quimioterapia;
- el uso de virus que se replican solamente en células tumorales, conocidos como virus oncolíticos;

- la introducción de genes suicidas que expresan enzimas que convierten prodrogas no tóxicas en drogas citotóxicas activas; y
- la sensibilización de células tumorales a tratamientos como la radioterapia y la quimioterapia.

Por otra parte, existen varias estrategias dirigidas al huésped, como por ejemplo:

- la inhibición de la angiogénesis por expresión constitutiva de inhibidores o por bloqueo de factores pro-angiogénicos;
- la introducción de genes que confieren resistencia a drogas quimioterapéuticas en tejidos normales como médula ósea;
- la introducción de citoquinas en células inmunes efectoras o la exposición de dichas células a antígenos clonados para amplificar la respuesta inmune; y
- el desarrollo de vacunas antitumorales basadas en la modificación de las mismas células tumorales mediante citoquinas que estimulan al sistema inmune [29].

El sistema HSVtk/GCV es la estrategia suicida más utilizada

Se piensa que muchas alteraciones oncogénicas presentes en los tumores ejercen acciones complementarias que contribuyen al fenotipo maligno, invasión y metástasis. Ciertas terapias génicas del cáncer llevan implícita la presunción de que debe haber alguna propiedad de las células neoplásicas que las distinga lo suficiente de las células normales para permitir eliminarlas sin toxicidad para su contraparte normal. La terapia con genes suicidas constituye otra alternativa. En lugar de manipular positiva o negativamente funciones celulares existentes, las células tumorales son modificadas genéticamente para que expresen un gen que las sensibiliza a drogas que de otra manera serían inocuas [30].

Uno de los sistemas de gen suicida más usado, es el que codifica para la enzima timidina kinasa (*tk*) del virus herpes simplex (HSV). Dicha enzima confiere sensibilidad a la prodroga de baja toxicidad ganciclovir (GCV), que es monofosforilada por la HSVtk y luego fosforilada por las kinasas de mamífero, convirtiéndose en un trifosfato tóxico análogo de guanósina que interrumpe la síntesis del ADN funcionando como un terminador de cadena, lo cual resulta en la muerte celular. Por lo tanto, toda célula que exprese la HSVtk será eliminada por esta droga.

El efecto bystander es fundamental en la eficacia del sistema HSVtk/GCV

Varios estudios han demostrado que el GCV es tóxico incluso para células tumorales adyacentes que no expresan el gen de la HSVtk. Este efecto denominado *bystander* (citotoxicidad del entorno), posee una importancia fundamental en el tratamiento terapéutico [31].

Los mecanismos mediadores del efecto *bystander* no han sido totalmente elucidados. Algunos de ellos son: (i) la transferencia del GCV fosforilado (tóxico) a las células adyacentes que no expresan HSVtk, a través de *gap junctions* o de vesículas apoptóticas liberadas por las células que expresan HSVtk, (ii) la endocitosis de los remanentes tóxicos de las células apoptóticas, (iii) la destrucción de la vasculatura tumoral, y (iv) la respuesta inmune aumentada contra el tumor [32,33]. El efecto bystander es entonces un complejo proceso biológico que involucra varios mecanismos, que pueden no ser los mismos *in vitro* que *in vivo*.

Algunos estudios han mostrado que células deficientes en uniones *gap* generan un efecto bystander débil y que la transfección del gen de la conexina en estas células restaura dicho efecto [34]. Sin embargo, esto es sólo una parte del mecanismo que ocurre *in vivo*. El efecto bystander *in vivo* se basa en tres procesos que causan la regresión del tumor: la quimiosensibilización de las células tumorales al GCV, la necrosis tumoral hemorrágica por ruptura de la vasculatura tumoral y consiguiente depleción de nutrientes, y la inmunidad antitumoral [35].

La respuesta inmune puede ser dividida en dos partes: temprana y tardía. En primer lugar, la liberación de citoquinas (IL-2, IL-4, GM-CSF) altera el microambiente tumoral, volviéndolo inmunoestimulador; y esto da lugar a la segunda fase: el desarrollo de una respuesta inmune antitumoral, que dura varias semanas [36].

El sistema HSVtk/GCV presenta numerosas ventajas

Este sistema está siendo utilizado en varios protocolos clínicos debido a las siguientes ventajas:

- Debido al efecto bystander, sólo se necesita modificar una fracción de la masa tumoral con el gen de la HSVtk para causar regresión tumoral. En ciertos modelos tumorales ocurre una completa regresión cuando sólo un 10% de las células o de la masa tumoral expresan el gen suicida y el animal es tratado con GCV.
- La HSVtk es casi 1000 veces más eficiente en monofosforilar GCV que la tk celular. Así, el GCV es virtualmente no tóxico para células no transfectadas a

concentraciones terapéuticas de la droga (1-10 μM), aunque el uso de la droga por tiempo prolongado puede producir neutropenia.

- Una vez fosforilado, el GCV pierde su capacidad para cruzar la membrana celular, y así su vida media dentro de la célula es 6 veces mayor (18 a 24 hs) que la del GCV no fosforilado. Este aumento en la vida media incrementa su efectividad.
- No se requiere una expresión prolongada del transgén pues las células que lo expresan mueren luego de una corta exposición al GCV, ya que a las 6 hs se inicia la apoptosis que ocurre durante varios días.
- Puede ser utilizado como vacuna tumoral, ya que el GCV no es inmunosupresor y la masa tumoral destruida puede estimular una respuesta inmune antitumoral. Además se demostró que las células tratadas con HSVtk/GCV son antigénicas, en algunos casos más antigénicas que las células tumorales irradiadas.
- El sistema HSVtk/GCV también puede aumentar la sensibilidad de las células tumorales a la quimioterapia y a la radioterapia. Tumores resistentes a la quimioterapia y a la radiación son sensibles al GCV cuando están modificados con el gen de la HSVtk. [31,32,35,37]

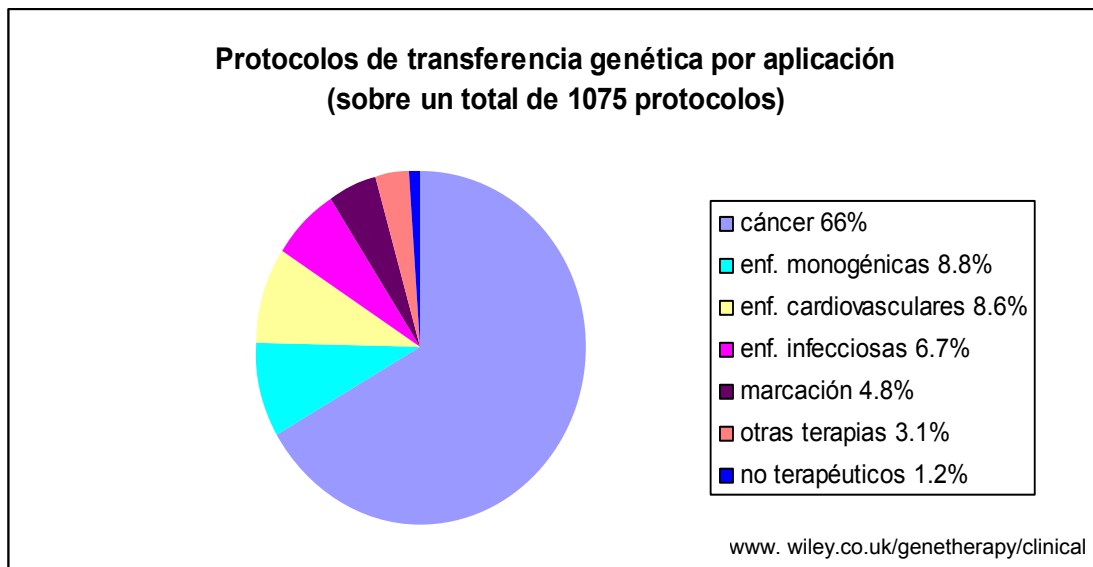
Por otra parte, la combinación de este sistema suicida y vacunas antitumorales produce sinergia entre ambas terapias. El sistema HSVtk/GCV puede proveer un evento necesario para el éxito de la inmunoterapia: un microambiente tumoral inmunoestimulador que expresa moléculas inmunorreguladoras necesarias para que se desarrolle la respuesta inmune cuando las células efectoras presentes en la circulación entren al tumor [36].

El sistema HSVtk/GCV está siendo utilizado en varios ensayos clínicos, con distintos tipos de vectores e incluso con células productoras de HSVtk, especialmente en cáncer de ovario, tumores cerebrales y mesotelioma pleural [35].

Ensayos clínicos de terapia génica

La mayor parte (más del 60%) de los ensayos clínicos de terapia génica han sido dirigidos al cáncer (ver figura).

Con respecto a los tipos de cáncer tratados, más de la mitad se han centrado en cinco tipos de tumores: melanoma, cáncer de próstata y de ovario, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, y leucemia, seguidos por los cánceres de pulmón y de mama.



Vectores y sistemas de transferencia genética

La búsqueda de formas de introducir genes en células tumorales dio lugar a muchos avances en el desarrollo de vectores virales y no virales.

Varios virus que infectan humanos, especialmente retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados, han sido modificados para generar vectores de expresión eficientes, que pueden integrarse al ADN genómico o bien persistir como elementos extracromosómicos. Algunos vectores virales menos utilizados se basan en virus herpes, SV40, vaccinia y otros [29]. La principal ventaja de los vectores virales es su capacidad para infectar un alto porcentaje de las células blanco. Sin embargo, existen varios problemas que limitan su aplicación: (i) riesgo de mutagénesis insercional por la posible integración del vector al ADN del huésped, (ii) posibles eventos de recombinación que produzcan virus infecciosos capaces de replicarse *in vivo*, (iii) reconocimiento y destrucción de las células transfectadas por células T, (iv) dificultades en la reproducibilidad de la producción, concentración y almacenamiento de los vectores con altos títulos para el uso clínico, (v) inactivación de los vectores por el complemento, e (vi) inmunogenicidad de los vectores, la cual resulta en una menor efectividad en aplicaciones repetidas [38].

Por otro lado, los vectores plasmídicos, aunque deben ser introducidos en las células mediante metodologías específicas, presentan varias ventajas comparados con los vectores virales: (i) no son potencialmente infecciosos, (ii) pueden alcanzar niveles de expresión similares a los de los vectores virales, (iii) no son inmunogénicos (lo cual permite múltiples aplicaciones), (iv) no son tóxicos inclusive al ser introducidos

de manera intravenosa, (v) tienen una muy baja probabilidad de inserción, y (vi) son muy estables a largo plazo.

En cuanto a los sistemas de transferencia genética no virales, existen varias metodologías:

- Inyección directa de ADN: Es la administración de ADN desnudo y superenrollado en tejidos. Se utiliza principalmente en vacunas a ADN y preferencialmente en músculo.
- Transferencia genética mediada por partículas: Se recubren partículas metálicas con el ADN a transferir, y estas partículas son introducidas en los tejidos mediante un "cañón génico" (*gene gun*), que las acelera. Su principal aplicación es la misma que el ADN desnudo.
- Transferencia de ADN precipitado con fosfato de calcio: Es un método eficiente para transfectar células en cultivo, pero *in vivo* ha sido reemplazado por otras técnicas de eficiencia superior.
- Conjugados ADN/ligando: El ADN plasmídico, cargado negativamente, puede formar complejos con policationes (por ejemplo poli-lisina) que son introducidos en las células. Estos complejos pueden ser modificados uniéndoles *ligandos* que se unan a receptores celulares específicos [38].
- Lipofección: Entre los vehículos más prometedores se encuentran los liposomas catiónicos (ver sección siguiente).

Por último, se ha desarrollado ampliamente la terapia con polinucleótidos, ya sea por tratamiento directo de las células mediante administración sistémica o transportados en liposomas. Diferentes estrategias emplean ARN antisentido, ribozimas o ARN de interferencia [29].

Los liposomas catiónicos son vehículos eficientes, sencillos y seguros

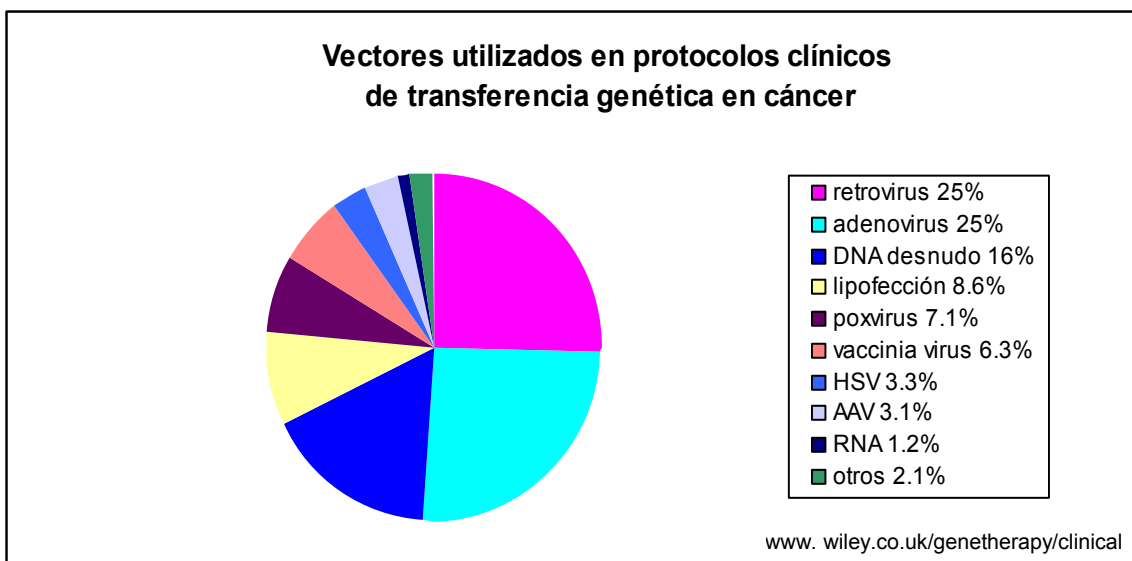
Los lípidos policationicos se asocian espontáneamente con el ADN plasmídico por interacción de cargas para formar estructuras llamadas *lipoplex*, en las cuales el ADN está protegido de la degradación. Estos complejos tienen alta afinidad por las membranas celulares, cargadas negativamente, debido a un exceso de cargas positivas. La endocitosis de estos compuestos seguida de la ruptura de la membrana del endosoma parece ser el principal mecanismo de la transferencia genética [39, 40].

Los lípidos catiónicos que se utilizan para formar liposomas constan generalmente de cuatro dominios funcionales: una cabeza polar cargada positivamente, un espaciador de longitud variable, un conector y una cola hidrofóbica.

Su diversidad estructural es amplia, aunque en general se trata de derivados del colesterol, lipopolisina y algunos surfactantes de doble cadena. Los liposomas catiónicos normalmente contienen un lípido catiónico y un lípido neutro (co-lípido), que brinda estabilidad a los liposomas. La razón por la cual existe tan amplia diversidad en las formulaciones es que la eficiencia de estos vehículos varía mucho *in vitro* e *in vivo*, según los tipos celulares y los tejidos blanco, y según la vía de administración, por lo tanto es crucial la elección del lípido adecuado para cada experimento o tratamiento. El grupo polar catiónico es crítico para la toxicidad y la eficiencia de transfección de estos lípidos. Por otra parte, la relación entre ADN y liposomas determina el tamaño de los complejos, lo cual es muy importante para una transfección exitosa: los liposomas con diámetros mayores a 200 nm no son endocitados eficientemente [40].

Aunque estos vectores comenzaron con bajas eficiencias de transferencia y expresión, han mejorado sensiblemente en los últimos años (en algunos casos hasta 100.000 veces). Son químicamente definidos, pueden ser preparados en grandes cantidades y su control de calidad resulta sencillo, y por lo tanto económico. Otra ventaja de este sistema sobre otros métodos es la amplia variedad de células huésped, su limitada toxicidad en animales o humanos, su fácil uso y un mejor estándar de bioseguridad que los vectores virales. Pueden ser administrados en forma intravenosa y pueden transferir genes a muchos tipos de tejidos [41].

A la fecha ya existen más de cien formulaciones con lípidos catiónicos y constantemente surgen nuevas variantes que intentan mejorar a las ya existentes. Algunas de éstas se utilizan en ensayos clínicos en terapia génica [41].



Los vectores persistentes

Los vectores derivados del virus Epstein-Barr aumentan los niveles y la duración de la expresión de transgenes

El virus Epstein-Barr (EBV) es un virus del tipo Herpes que posee un genoma de ADN de cadena doble de 172 kb. Este virus infecta preferentemente linfocitos B humanos, aunque ha sido detectado también en varios tejidos, y se establece por sí mismo en el núcleo en estado latente en forma de plásmido circular, multicopia (5 a 50 copias en líneas linfoblastoideas) y de replicación extracromosómica. El establecimiento del episoma requiere de dos componentes virales: el origen de replicación bidireccional *oriP* y el gen viral *EBNA-1* (antígeno nuclear 1 del virus Epstein-Barr). Estos dos componentes, de aproximadamente 2 kb cada uno, son suficientes para conferir replicación y retención nuclear a las secuencias de ADN unidas.

OriP consta de dos regiones no contiguas. La región *dyad symmetry* (DS) estimula la iniciación eficiente de la replicación cuando EBNA-1 está unido a ella. La familia de repeticiones (FR), una serie de aprox. 20 copias en tándem de una secuencia de unión a dímeros de EBNA-1, incrementa la replicación y también media la retención nuclear. El EBNA-1 es una proteína que contiene un dominio hélice-girohélice de unión directa al ADN. El mecanismo de retención nuclear requiere la unión de EBNA-1 a la región FR en el plásmido y a componentes del cromosoma, mediando la asociación física del plásmido con los cromosomas. Dicho mecanismo de retención es imperfecto y resulta en una lenta pérdida del vector a través del tiempo. Los vectores EBV tienen tasas de retención de 92-98% por generación celular en ausencia de selección, las cuales son muy superiores a las altas tasas de pérdida de los plásmidos que carecen de elementos de replicación y retención [42,43].

Una característica muy importante de estos vectores es que no son integrativos. La integración de un episoma terapéutico en la cromatina del huésped es indeseable por dos razones importantes: dicha integración podría inactivar cualquier gen residente en el vector, y por otra parte tiene una considerable posibilidad de activar o inactivar *loci* génicos importantes en el huésped, trayendo consecuencias deletéreas [43].

Otra característica de *oriP* en presencia de EBNA-1 es la función de transactivación. La región FR de *oriP* puede, unida a EBNA-1, aumentar la transcripción a partir de promotores cercanos. Esta función depende de la línea celular

utilizada y del promotor que dirige al gen de interés. El mecanismo por el cual ocurre dicha activación transcripcional se halla aún en estudio [44].

En las primeras publicaciones sobre el tema se menciona la incapacidad de los vectores derivados de EBV para replicarse en células de ratón y de hámster [45]. Sin embargo, se observó que en varias líneas celulares de roedor la activación transcripcional sí ocurre [46]. De todos modos, algunos autores continúan discutiendo la replicación de los vectores EBV en algunos tipos de células de roedor [47,48].

Por otra parte, aunque la oncogenicidad del EBV está prácticamente circunscripta a EBNA-2, y se ha informado durante mucho tiempo que EBNA-1 no posee actividad transformadora, algunos experimentos *in vivo* aún crean dudas acerca de la inocuidad de EBNA-1 [44].

En resumen, los vectores que contienen las secuencias *oriP* y EBNA-1 de EBV presentan las siguientes ventajas: [49,50]

- se comportan como plásmidos de replicación extracromosomal con un número de copias definido, sin interferir con la función celular;
- pueden ser mantenidos eficientemente como episomas en células humanas en cultivo, incluso células T;
- no pueden producir partículas infectivas;
- mantienen su localización nuclear, lo que les confiere parte de las ventajas de los minicromosomas artificiales;
- expresan eficientemente genes heterólogos;
- dicha expresión puede ser regulada tanto a nivel transcripcional como por control del número de copias;
- son no integrativos y;
- al ser vehiculizados en asociación con lípidos catiónicos (como *lipoplexes*), se minimizan las respuestas inmunes potenciales que aparecen asociadas a la terapia génica con vectores virales.

Los vectores derivados de EBV han sido utilizados en terapia génica

A continuación se citan algunos ejemplos de la utilización de esta clase de vectores en terapia génica:

- Un vector EBV portador del gen defectuoso en la fibrosis quística produjo expresión génica durante al menos dos meses en células epiteliales humanas transformadas en cultivo [50].

- El uso de un vector EBV mejoró notablemente la eficacia terapéutica del gen del G-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos) en ratones: la administración de este vector aumentó la cantidad de glóbulos blancos en circulación durante al menos dos meses, luego de una sola inyección intravenosa [51].
- La inyección intramuscular en ratones de un plásmido EBV portador del gen de la distrofina resultó en un aumento significativo en la cantidad de fibras musculares que expresaban distrofina, comparando con vectores convencionales [52].
- Se utilizaron vectores EBV en linfomas B humanos, como modelo para la inmunoterapia del cáncer. Los vectores expresaron de manera estable y eficiente genes de citoquinas durante varias semanas, en células en cultivo y luego de la inyección de células transfectadas en ratones *nude* [53].

La región E4 de Adenovirus otorga persistencia a la expresión de transgenes

En la búsqueda de vectores adenovirales de nueva generación, se encontró que la región E4 de Adenovirus (Ad E4) resultaba necesaria para la expresión sostenida de un gen de interés dirigida por los promotores CMV (Cito Megalo Virus) ó RSV (Rous Sarcoma Virus), tanto en células en cultivo como *in vivo*. Algunas de las proteínas codificadas por Ad E4 estarían directamente involucradas en la activación transcripcional de transgenes heterólogos, actuando tanto en *cis* como en *trans*, y algunos resultados sugieren que el ORF 3 (marco de lectura 3) sería el principal responsable de dicho efecto [54,55].

Yew y colaboradores [54] observaron en un trabajo notables incrementos en la duración de la expresión del gen de la CAT (cloranfelicol acetil transferasa) dirigido por el promotor CMVie, en los pulmones de ratones Balb/c, al co-administrar dicho gen mediante lipofección con un vector adenoviral portador del gen Ad E4. La expresión del transgén se extendió por más de 10 semanas.

Por otro lado, Lusky y colaboradores [55] obtuvieron resultados similares al expresar el gen del CFTR (regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística humana) a partir de distintos vectores adenovirales con promotores CMV ó RSV (Rous Sarcoma Virus), tanto *in vitro* como en pulmones e hígado de ratones de distintas cepas. La coexpresión de Ad E4 extendió la expresión del gen del CFTR por más de 120 días.

El futuro inmediato de la terapia génica del cáncer sugeriría un éxito creciente en su uso como terapia adyuvante para el control local de muchos tumores. Aunque tal vez no siempre sea capaz de efectuar curas definitivas, la terapia génica puede ser muy útil en el creciente mejoramiento de las herramientas actualmente utilizadas en el tratamiento del cáncer [29].

ESFEROIDES EN TERAPIA GENICA

A pesar de la amplia utilización de los esferoides multicelulares como modelo para casi todas las clases de terapias antineoplásicas, hasta la fecha se han publicado muy pocos trabajos orientados a la terapia génica que utilicen este modelo.

La mayor parte de ellos apunta al estudio de virus oncolíticos replicativos, ya que el análisis de la distribución y replicación de los virus necesita de una prolongada viabilidad celular *in vitro* [56]. Por ejemplo, en un estudio con Adenovirus en esferoides de tumores cerebrales, se observó que mientras que los virus no replicativos infectaban sólo las capas más externas de los esferoides, los replicativos generaban una expresión de los transgenes considerablemente aumentada y distribuida en todo el esferoide [57]. En otro trabajo, se demostró que los virus adeno-asociados penetran más eficientemente esferoides de gliomas que los adenovirus [58].

En otros trabajos se ha estudiado:

- La inhibición del crecimiento tumoral mediada por la transducción del gen p53 con vectores retrovirales en esferoides de líneas tumorales de pulmón, demostrando que los retrovirus pueden penetrar masas tridimensionales y ejercer potenciales efectos terapéuticos [59].
- La reducción del potencial invasivo de esferoides de glioma por disminución de la cantidad de receptores de uPA (activador de plasminógeno tipo uroquinasa) mediada por la transfección de un ARN antisentido para dicho gen [60].
- La citotoxicidad del ácido indol-3-acético (IAA) en esferoides de una línea celular de carcinoma de cabeza y cuello transfectados con el gen de la peroxidasa de rábano picante (sistema gen suicida/prodroga) [61].
- El mayor efecto citotóxico en esferoides tumorales (versus monocapas de las mismas células) logrado por la transducción del gen del NIS (*sodium iodide symporter*), una proteína de membrana que ingresa iones yoduro [62].

En el presente trabajo, se estudiarán los esferoides de distintas líneas celulares tumorales como modelo *in vitro* para la terapia génica del cáncer, en cuanto a:

- su patrón de expresión de transgenes introducidos mediante lipofección; y
- su sensibilidad al sistema gen suicida/prodroga HSVtk/GCV.

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo son:

- 1) Realizar un estudio comparativo de las características de crecimiento y morfología general de las líneas celulares a estudiar, cultivadas en monocapas y en esferoides.
- 2) Desarrollar un sistema de transferencia genética que permita una expresión eficiente y sostenida de los genes de interés:
 - a) Construir vectores portadores de secuencias de origen viral (EBNA-1 y *oriP* de EBV, E4 de Ad5) que aumentarían la persistencia de la expresión, y evaluar su desempeño en monocapas y en esferoides.
 - b) Realizar un análisis por delección/sustitución de las secuencias promotoras y enhancers del CMV_{ie}, para localizar las regiones que permitan un máximo de eficiencia y persistencia en los niveles de expresión del transgén.
- 3) Estudiar la eficiencia y persistencia de la expresión de transgenes en esferoides, respecto a cultivos en monocapa. Evaluar la relación entre persistencia de expresión y:
 - eficiencia de transfección
 - niveles de expresión inicial de los genes transferidos
- 4) Estudiar la eficiencia del sistema del gen suicida/prodroga HSV θ k/GCV en esferoides, para explorar sus posibilidades terapéuticas en el tratamiento de tumores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares derivadas de los adenocarcinomas mamarios murinos espontáneos de Balb/c M05 (LM05e), M3 (LM3) y M38 (LM38) [63,64] y del melanoma murino de C57 B16-F10 (B16) (ATCC#CRL-6475); y la línea HEp-2 de carcinoma escamoso de laringe humano (ATCC# CCL-23).

Cultivos

Las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO₂ con medio IMDM/F12 (Hyclone, Logan, UT) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Invitrogen, Carlsbad, CA), HEPES 10 mM (Sigma, St Louis, MO) (pH 7.4) y antibióticos. Las líneas celulares se mantuvieron realizando repiques seriados mediante tripsinización (tripsina 0.25% y EDTA 0.02% en PBS) de monocapas subconfluentes.

Los esferoides multicelulares fueron preparados utilizando la técnica de *liquid overlay* [1,64]. Brevemente, se fundió agar para cultivo celular (Sigma), se lo diluyó al 1.5% con medio de cultivo sin suero y se lo colocó en los pocillos de las placas de cultivo para impedir la adhesión celular. Luego se sembraron las células provenientes de monocapas tripsinizadas (2-3 x10⁵ células/ml) por encima del agar solidificado.

Crecimiento de los esferoides

El tamaño de los esferoides en crecimiento fue estimado durante un período de 75 días utilizando una cámara de Neubauer bajo un microscopio invertido de contraste de fase. El diámetro de los esferoides fue registrado como promedio de dos diámetros. El volumen fue calculado mediante la fórmula $AxB^2/2$, donde A es el diámetro menor y B es el diámetro mayor del tumor.

Los resultados fueron expresados como la media (de un mínimo de 20 esferoides medidos) ± s.e.m. (error estándar de la media) (n=4 ensayos independientes).

Crecimiento de tumores in vivo

Se inyectaron subcutáneamente células de las líneas LM3 y LM05e en ratones Balb/c y de la línea B16 en ratones C57. A los tiempos indicados, los tumores fueron medidos y su volumen fue calculado como se describió para esferoides.

Determinaciones de síntesis de ADN

La síntesis de ADN fue evaluada en células cultivadas en esferoides en placas de 96 pocillos (5×10^4 células/pocillo) por incorporación de ^3H -timidina (New England Nuclear, Boston, MA; 1 Ci/mmol) [64]. Se agregó ^3H -timidina a los cultivos (0.3 $\mu\text{Ci/pocillo}$) a los 8, 15, 30, 45 y 60 días y se incubó durante 72 horas. Las células fueron recogidas sobre filtros de fibra de vidrio con un *harvester* multipocillo (Nunc, Rochester, NY), y se midió la radiactividad con un contador de centelleo β .

Inmunohistoquímica de bromodeoxiuridina (BrdU)

Para evaluar la incorporación de BrdU, esferoides de 1 ó 4 días fueron incubados durante 4 ó 1 días, respectivamente, en medio conteniendo BrdU 40 μM , uridina 5 μM y 5-fluorodeoxiuridina 0.4 μM [65]. Luego del período de incubación, se retiró el medio y los esferoides fueron lavados con PBS y resuspendidos en Bouin durante 20 minutos. Luego de 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno, el *pellet* fue resuspendido en agar de bajo punto de fusión al 2% en PBS, deshidratado en etanol, embebido en parafina y seccionado. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina y fotografiadas, o tratadas como se describe a continuación.

Las secciones fueron rehidratadas y sumergidas en PBS varias veces, incubadas durante 15 minutos en HCl 0.1 N/Triton X-100 y digeridas mediante el procedimiento endonucleasa/exonucleasa para generar en el DNA regiones de simple cadena para exponer la BrdU incorporada al anticuerpo [66]. Las secciones fueron luego tratadas con Tris-HCl 1 M (pH 7.5) para bloquear el formaldehído, con Triton X-100 0.2% en PBS y finalmente con H_2O_2 para bloquear la actividad peroxidasa endógena, previo a la aplicación del anticuerpo primario.

La inmunohistoquímica fue realizada según métodos estándar utilizando un anticuerpo monoclonal anti-BrdU (cedido por el Dr. T Ternynck, Instituto Pasteur, París, Francia), a 12.5 $\mu\text{g/ml}$, y un segundo anticuerpo biotilado. El producto fue visualizado con una solución del sustrato 3,3'-diaminobenzidina y H_2O_2 .

Determinación de proteínas

Las muestras fueron resuspendidas en NaOH 0.1 N, y en el caso de esferoides, sonicadas durante 5 segundos para disgregarlos totalmente. Las concentraciones de proteína fueron determinadas utilizando el método de Bradford [67].

Ensayos de viabilidad celular

Las células fueron cultivadas en esferoides durante períodos de 4, 8, 15, 30, 45, 60 y 75 días. La viabilidad celular se cuantificó utilizando el ensayo colorimétrico MTS (Cell Titer 96[®] Aqueous Nonradioactive MTS Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI). La sal de tetrazolio MTS, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboxi-metoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, es convertida por deshidrogenasas en células metabólicamente activas en un colorante formazan, cuya absorbancia a 490 nm se asume proporcional al número de células viables. Los ensayos se realizaron por triplicado de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Para aumentar la penetrabilidad de los esferoides, se agregó EGTA 2.5 mM [ácido etilen glicol-bis (β -aminoetiléter) N,N,N',N'-tetraacético] (Sigma) durante el revelado con MTS.

Plásmidos

En la figura se esquematizan todos los plásmidos utilizados en este trabajo.

pCMV β [68] y pCH110 [69] son plásmidos comerciales (Clontech, Mountain View, CA) portadores del gen *lacZ* de *E. Coli* bajo los promotores CMVie y SV40e respectivamente.

Un fragmento *Eco RI* con la secuencia *oriP* y el gen EBNA-1 (bajo su propio promotor) del virus Epstein-Barr humano proveniente del plásmido p205MTCAT [45] fue clonado en el sitio *Eco RI* del pCMV β , originando pEBCMV β .

Un fragmento *Sal I* – *Bst YI* con la secuencia *oriP* y el gen EBNA-1 (sin promotor) del virus Epstein-Barr humano proveniente del plásmido pREP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) fue clonado junto con un fragmento *Sal I* - *Bam HI* que contenía el promotor CMVie del plásmido pRc/CMV (Invitrogen), obteniendo pEB2CMV β . En este plásmido, EBNA-1 está bajo promotor CMVie.

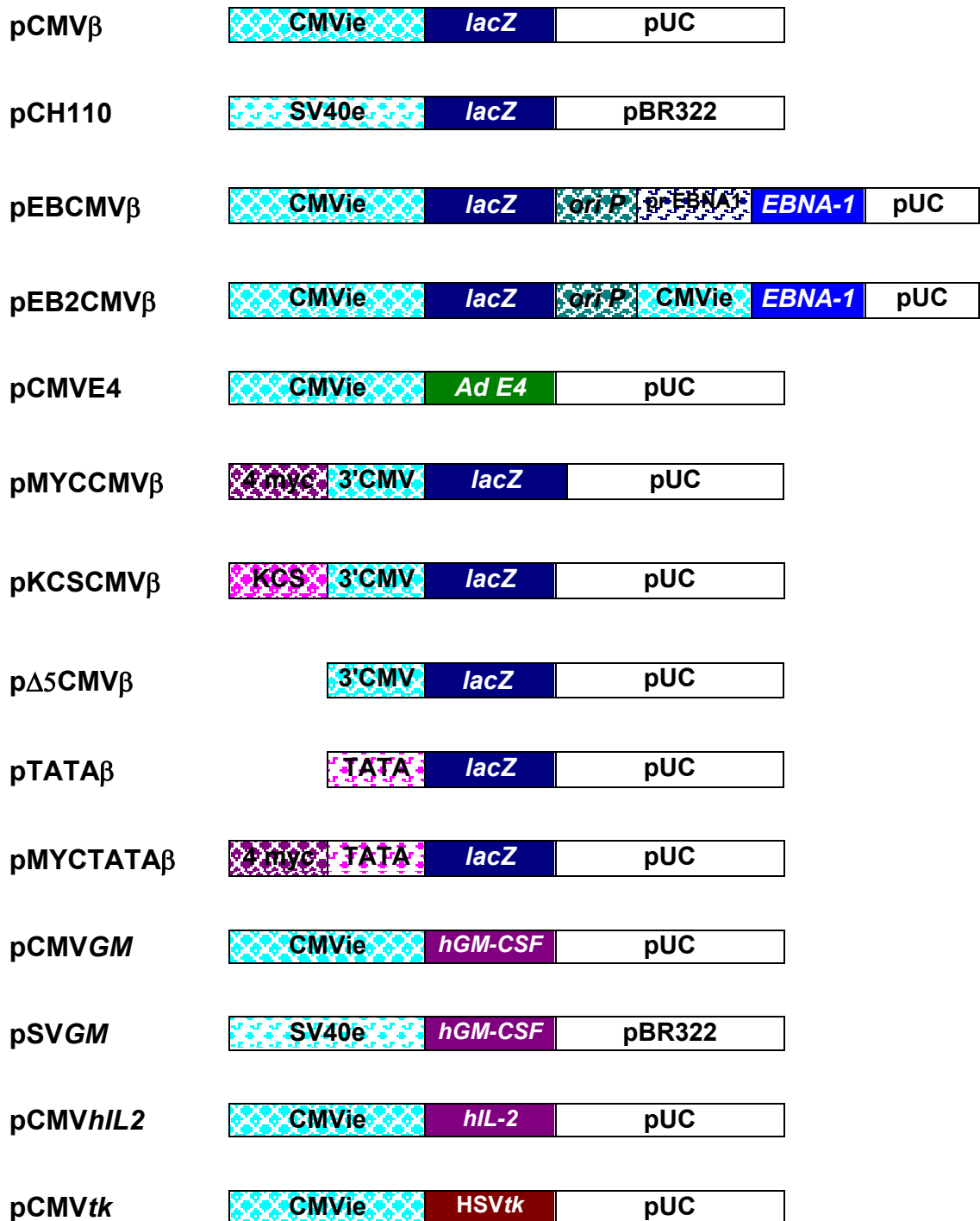
pCMVE4 fue generado reemplazando en pCMV β el gen *lacZ* por el gen E4 del virus Ad5. Un fragmento *Not I* – *Not I* conteniendo el gen *lacZ* fue eliminado de pCMV β y reemplazado por un sitio múltiple de clonado adecuado, en el que se insertó un fragmento *Eco RI* conteniendo el gen E4.

Se creó además una serie de construcciones que contienen diferentes fragmentos del promotor CMVie río arriba del gen reporter β gal. Luego de eliminar en el promotor CMVie el fragmento *Eco RI* – *Nco I* (325 pb), se reemplazó dicho fragmento por oligonucleótidos portadores de (i) 4 copias de la secuencia consenso de unión a [70](subrayadas):5'AATTCCCACCCACGTGGTGCCTCCCACCCACGTGGTGCCTCCCC
CACGTGGTGCCTCCCACCCACGTGGTGCCTC-3', ó (ii) una copia de la secuencia consenso de kinasa (KCS) [71] (subrayada): 5'-AATTCAGGGAAGGCGGAGTCCAAC-3', originando pMYCCMV β y pKCSCMV β , respectivamente. (iii) Mediante fill-in y religación de los sitios *Eco RI* – *Nco I* se obtuvo p Δ 5'CMV β . Por otro lado, el promotor CMVie completo fue eliminado en pCMV β (entre los sitios *Eco RI* y *Sac I*) y reemplazado por (iv) un oligonucleótido conteniendo las secuencias TATA-BOX y Sp1-CS2 del CMVie, obteniendo pTATA β . (v) Por inserción en pTATA β del oligonucleótido con las 4 copias de la secuencia consenso myc-max río arriba de las secuencias TATA-BOX y Sp1-CS2, se obtuvo pMYCTATA β .

pCMVGM fue generado reemplazando en pCMV β el gen *lacZ* por el gen hGM-CSF. Un fragmento *Not I* – *Not I* conteniendo el gen *lacZ* fue eliminado de pCMV β y reemplazado por un sitio múltiple de clonado adecuado, en el que se insertó un fragmento *Xho I* - *Hind III* conteniendo el gen hGM-CSF. De manera similar, se reemplazó en pCH110 el gen *lacZ* (fragmento *Kpn I* - *Bam HI*) por el gen hGM-CSF a través de un sitio múltiple de clonado intermediario, creando pSVGM. pCMVhIL-2 fue generado de manera análoga al pCMVGM.

pCMV₀ fue obtenido a partir de pCMV β eliminando el gen *lacZ* por digestión con *Not I* y posterior religación. Un fragmento *Pvu II* conteniendo el gen *HSVtk* fue clonado río abajo del promotor CMVie luego de una adaptación adecuada en el sitio *Not I* de pCMV₀, obteniendo pCMVtk.

Los plásmidos fueron amplificados en *E. coli* DH5 α (Invitrogen) cultivadas en medio LB con ampicilina 100 μ g/ml y purificados por cromatografía de intercambio iónico (Qiagen, Valencia, CA).



Representación esquemática de todas las construcciones usadas.

CMVie: promotor inmediato-temprano del Cito Megalo Virus humano. **lacZ:** gen *lacZ* de *E. Coli* (codifica para la enzima β-galactosidasa). **pUC:** esqueleto de la serie de plásmidos pUC, que contiene el gen *amp^R* y un origen de replicación procariota. **SV40e:** promotor temprano del virus SV40. **pBR322:** esqueleto del plásmido pBR322, que contiene el gen *amp^R* y un origen de replicación procariota. **oriP:** origen de replicación eucariota del virus Epstein-Barr. **EBNA-1:** gen del antígeno nuclear 1 de virus Epstein-Barr. **prEBNA-1:** promotor del EBNA-1. **AdE4:** región E4 de Adenovirus. **4 myc:** oligodeoxinucleótido que contiene 4 copias de la secuencia consenso de unión a myc-max. **3'CMV:** región 3' del promotor CMVie (fragmento *Nco I* - *Sac I*). **KCS:** oligodeoxinucleótido que contiene la secuencia consenso KCS. **TATA:** oligodeoxinucleótido que contiene las secuencias TATA-BOX y Sp1-CS2 de CMVie. **hGM-CSF:** gen del factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos humano. **HSVtk:** gen de la timidina kinasa del virus Herpes Simplex.

Preparación de liposomas y lipofección in vitro

Luego de evaluar una variedad de *lipoplexes* formados por diferentes lípidos catiónicos y colípidos neutros, y distintas variables como las relaciones lípido catiónico:colípido y DNA:liposomas, el tiempo de transfección, el grado de confluencia de las monocapas de células, la cantidad de lipoplex por área de cultivo y la presencia o ausencia de suero, se eligieron los lípidos y las condiciones óptimas de transfección para cada línea celular, en cuanto a alta eficiencia y baja citotoxicidad, que se detallan a continuación.

Los lípidos DC-Chol (3 β [N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamil colesterol] y DMRIE (bromuro de 1,2-dimiristil oxipropil-3-dimetil-hidroxiethylamonio) fueron sintetizados y provistos por BioSidus S. A. (Buenos Aires, Argentina). El lípido DOPE (1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidil etanolamina) fue provisto por Sigma. Los liposomas fueron preparados con relaciones molares lípido/colípido 1:1 (DMRIE:DOPE) ó 3:2 (DC-Chol:DOPE) por sonicación [72,40]. Las relaciones DNA-lípido y las mezclas de lípidos óptimas fueron determinadas para cada línea celular: las células LM05e y HEp-2 fueron transfectadas con una mezcla 3:1 de DC-Chol:DOPE y DMRIE:DOPE a 1:4 μg DNA:nmol lípido, y las células LM3 y B16 fueron transfectadas con una mezcla equimolar de DC-Chol:DOPE y DMRIE:DOPE a 1:6 μg DNA: nmol lípido.

Los *lipoplexes* (0.5 μg DNA/cm²) fueron preparados en *buffer* Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 0.1 M (pH 7.3) y agregados a células cultivadas a una densidad de 3x10⁴ cells/cm² (aprox. 30% de confluencia), en medio libre de suero (OptiMEM, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). En las cotransfecciones, se utilizó 0.25 μg DNA/cm² de cada plásmido. Luego de 6-8 horas, se retiró la mezcla de transfección y se agregó medio con suero. 12-18 horas después, las células lipofectadas fueron tripsinizadas y parte de ellas fueron sembradas sobre agar solidificado para formar esferoides (2-3 x 10⁵ células/ml) mientras que las células restantes fueron cultivadas en monocapas en placas normales (2-3 x 10⁴ cells/cm²). Las células fueron incubadas en condiciones normales de cultivo (descriptas previamente). Dos veces por semana, se renovó el medio de cultivo en forma total (monocapas) o parcial (esferoides).

Para expresión estable, se transfectaron células LM3 y LM38 con hIL2 contenida en el plásmido pRc/CMV (Invitrogen). 48 horas después las células fueron seleccionadas con medio con geneticina 500-700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Gibco-BRL). Se aislaron clones y se evaluó su expresión de hIL2 mediante un ensayo ELISA, como

se describe para hGM-CSF, escogiendo los de mayor expresión (Dr. G. Fiszman, comunicación personal).

De manera similar, se transfectaron células LM3 con un plásmido de selección portador del gen de la β -galactosidasa de *E. Coli*, y se seleccionaron con geneticina. La actividad β gal de los clones fue evaluada por tinción con X-Gal (ver sección siguiente) y se eligió un clon que mostró un 100% de tinción (Dr. A. Urtreger, comunicación personal).

Tinción con X-Gal

Para medir la eficiencia de la transferencia genética, las células lipofectadas fueron tripsinizadas, fijadas en suspensión con formaldehído 2% y glutaraldehído 0.2% en PBS, teñidas con 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal, Sigma) según el método estándar [64] y contadas.

El mismo procedimiento de fijación y tinción se realizó sobre esferoides en suspensión, que luego fueron fotografiados utilizando un microscopio invertido de contraste de fase.

Cuantificación de la actividad β -galactosidasa

Para la expresión genética cuantitativa, se colectaron esferoides y monocapas tripsinizadas, los cuales fueron lavados con PBS y divididos en dos fracciones.

Una fracción de cada muestra fue resuspendida en solución hipotónica (HEPES 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, PMSF 1 mM y DTT 1mM) y sonicada durante 5 segundos, y se midió la actividad β gal con ortonitrofenil-1- β -D-galactopiranosido (ONPG, Sigma) [64], utilizando como estándar β -galactosidasa de *E. coli* purificada (ICN, Costa Mesa, CA).

La fracción restante de cada muestra fue resuspendida en NaOH 0.1 N y se midió la proteína total mediante el método de Bradford [67]. La actividad β gal específica fue expresada como mU β gal/mg proteína, como media \pm s.e.m. de determinaciones por triplicado.

Ensayo ELISA para hGM-CSF

El hGM-CSF recombinante secretado al medio de cultivo fue medido por ELISA. En breve, los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos sensibilizadas durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo monoclonal anti-hGM-CSF (R&D, Minneapolis, MN) a 0.4 µg/pocillo. Las placas fueron luego bloqueadas a temperatura ambiente con BSA 2% en PBS durante 2 horas.

Las muestras de hGM-CSF y los estándares (hGM-CSF recombinante purificado, R&D) fueron sembrados e incubados durante la noche a 4°C. Luego se incubó sucesivamente con un anticuerpo policlonal anti-hGM-CSF biotinilado (20 ng/pocillo) (R&D), con estreptavidina-peroxidasa (Sigma) y con un sustrato colorimétrico (OPD, dihidrocloruro de o-fenilendiamina, Gibco BRL). La absorbancia fue medida a 490 nm. La proteína total de las células correspondientes se midió con el método de Bradford [67], y los niveles de hGM-CSF fueron expresados como ng/mg proteína/día, como media ± e.s.m de determinaciones por triplicado.

Análisis por Southern Blot

Se lipofectaron células con los plásmidos pCMVβ o pEBCMVβ, y las mismas fueron cultivadas en esferoides durante un período de 40 días. Los DNAs genómico y episomal fueron extraídos según métodos estándar [73,74]. Se digirieron porciones de DNA (8 a 15 µg) con *Hind III*, y los fragmentos fueron separados en un gel de agarosa 0.8% y transferidos según métodos estándar para Southern Blot a membranas de nylon cargadas positivamente (GeneScreen, NEN, Boston, MA). La hibridización se realizó con una sonda marcada con ³²P correspondiente al fragmento *Eco RV - Sac I* (825 pb) del gen *lacZ* contenido en todos los plásmidos βgal utilizados.

Ensayos de sensibilidad al GCV

Para evaluar la citotoxicidad del GCV, 5 x 10³ células (monocapas) o 2.10⁴ células (esferoides), lipofectadas con pCMVβ o pCMVtk fueron cultivadas en medio con suero en placas de 96 pocillos. A las 24 horas ó 7 días post-transfección, según se indica en cada caso, se retiró el medio de cultivo y se lo reemplazó por medio conteniendo diferentes concentraciones (0.1 a 1000 µg/ml) de GCV (sintetizado y provisto por Biosidus S.A.). Para aumentar la penetrabilidad de los esferoides, en el

momento de agregar el GCV se realizó una incubación de 3 horas con EGTA 2.5 mM, y luego se restituyó el calcio agregando CaCl_2 3 mM.

Luego de 5 días (monocapas) ó 7-10 días (esferoides), se cuantificó la viabilidad celular con el método MTS (descrito anteriormente).

El porcentaje de sobrevida se calculó como la razón de las absorbancias entre células incubadas en presencia y en ausencia de GCV. La sensibilidad celular al GCV, expresada como la concentración de GCV que inhibió la sobrevida celular en un 50% (IC_{50}), fue estimada a partir de curvas dosis-respuesta.

En los experimentos en que se indica, se agregó GCV 10 $\mu\text{g/ml}$ en la mezcla de transfección.

Ensayos de efecto bystander

Se mezclaron células lipofectadas con pCMVtk con sus respectivos controles lipofectados con pCMV β en proporciones de 0, 25, 50, 75 y 100%. Las mezclas fueron sembradas como monocapas en placas de 96 pocillos a 2.5×10^4 , 5×10^4 y 1×10^5 células/ml, que representan 10^4 , 2×10^4 y 4×10^4 células/cm², respectivamente. Para esferoides, se sembraron 2×10^5 células/ml. Se agregó GCV y se realizó el ensayo tal como se describió anteriormente.

Análisis por Western Blot

Las células cultivadas en monocapas o en esferoides fueron cosechadas, lavadas con PBS y mantenidas a -70°C como *pellets*. Se prepararon lisados celulares (25 μg de proteína en buffer de lisis NP-40 frío), los cuales fueron sonicados y clarificados por centrifugación, separados por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, y transferidos a membranas Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA). Las membranas fueron incubadas en una solución de Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM, Tween-20 0.05% y leche en polvo descremada 5% durante 12 horas y luego hibridizadas con un anticuerpo policlonal de ratón anti-Bax ó anti-Bcl-xL (BD Biosciences, Lexington, KY), ó anticuerpo anti-actina (Sigma) a una concentración de 0.25, 0.25 and 1.5 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente en TBS-T (Tris). Se utilizó como segundo anticuerpo IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa (Sigma) (dilución 1:1000) durante 1 hora. Las bandas fueron reveladas mediante el sistema de detección ECL (Amersham, Upsala, Sweden) respetando las instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como media \pm error estándar de la media (n: número de experimentos correspondiente a ensayos independientes). Las diferencias entre grupos fueron determinadas por análisis de la varianza (ANOVA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

MORFOLOGÍA Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LOS ESFEROIDES

Esferoides de distintas líneas celulares presentaron morfologías particulares

Las células de las líneas LM3, LM05e, LM38 (adenocarcinomas mamarios murinos), B16 (melanoma murino) y HEp-2 (carcinoma escamoso humano de laringe) formaron rápidamente esferoides cuando fueron sembradas sobre agar sólido (ver Figs. 3, 4, 6 y 12). Mientras que LM05e y LM3 formaron esferoides en los que las células estaban íntimamente asociadas entre sí y estrechamente empaquetadas, LM38 y HEp-2 presentaron agregados celulares más laxos en los que las células pudieron individualizarse claramente. B16 formó inicialmente agregados laxos, que se hicieron más compactos a partir del día 15.

Los esferoides crecieron en forma similar a los tumores in vivo

Hemos comparado el crecimiento en volumen de los tumores LM3, LM05e (en ratones Balb/c) y B16 (en ratones C57) con el de sus respectivos esferoides *in vitro* (Fig. 1 a-b).

Aunque el tamaño de los esferoides es mucho menor que el de los tumores, se observó una notable correlación entre el crecimiento de ambos. En el caso de LM3, ambas curvas, de forma claramente exponencial, resultaron muy similares hasta el día 7, y a partir de ese momento los esferoides crecieron más rápidamente que los tumores. Las curvas de crecimiento de esferoides y tumores B16 mostraron pendientes notablemente similares. La línea LM05e evidenció un crecimiento muy lento, que fue mayor en tumores que en esferoides.

Esta correlación directa entre el crecimiento de tumores y esferoides no se extendió a sus respectivos cultivos en monocapa, ya que en esta condición los tiempos de duplicación de las tres líneas celulares fueron similares: 17.4 ± 1.0 hs (LM3), 19.1 ± 1.1 hs (LM05e) y 18.0 ± 1.2 hs (B16).

Los patrones de crecimiento de los esferoides fueron característicos de cada línea celular

El crecimiento en diámetro de los esferoides obtenidos a partir de las líneas tumorales LM05e, LM3, HEP-2 y B16 fue evaluado durante un período de 75 días (**Fig. 1 c**).

Aunque puede generalizarse que todos los esferoides mostraron una primera fase de crecimiento seguida de una meseta, se observaron importantes diferencias entre las cuatro líneas celulares estudiadas. Los esferoides LM3 y HEP-2 mostraron un crecimiento extensivo, aumentando sus diámetros aproximadamente 2.5 veces desde el día 4 al día 40, en el cual alcanzaron una meseta que se extendió hasta el día 75. Los esferoides B16 crecieron moderadamente, mostrando una primera fase de crecimiento rápido, en la cual incrementaron su diámetro 1.5 veces desde el día 4 al día 15, y estableciendo luego una meseta hasta el día 75. Esta disminución en la velocidad de crecimiento en diámetro se correlaciona con el aumento en la compactación observado en estos esferoides hacia el día 15. Los esferoides compactos LM05e, con un diámetro inicial significativamente menor a los de las otras tres líneas celulares (los cuales fueron similares entre sí), sólo mostraron un leve incremento de 1.3 veces en su diámetro desde el día 4 al día 20, y luego una meseta hasta el día 75.

La cantidad de proteína total, medida a distintos tiempos durante un período de 75 días, fue notablemente mayor en los esferoides HEP-2 que en las otras tres líneas celulares (**Fig. 1 d**). Considerando que el diámetro de los esferoides HEP-2 es similar al de los esferoides LM3, la mayor cantidad de proteína observada en HEP-2 podría deberse a un mayor número de esferoides.

La proteína total se mantuvo relativamente constante a través del tiempo en los esferoides HEP-2, LM3 y B16, lo cual sugiere un balance entre las tasas de crecimiento y de muerte. Por otra parte, la proteína total de LM05e decreció gradualmente con el tiempo, llegando a los 75 días al 50% del valor inicial. Considerando que el tamaño de los esferoides de LM05e no disminuyó, esta caída en la proteína podría deberse a la muerte de algunos esferoides pequeños.

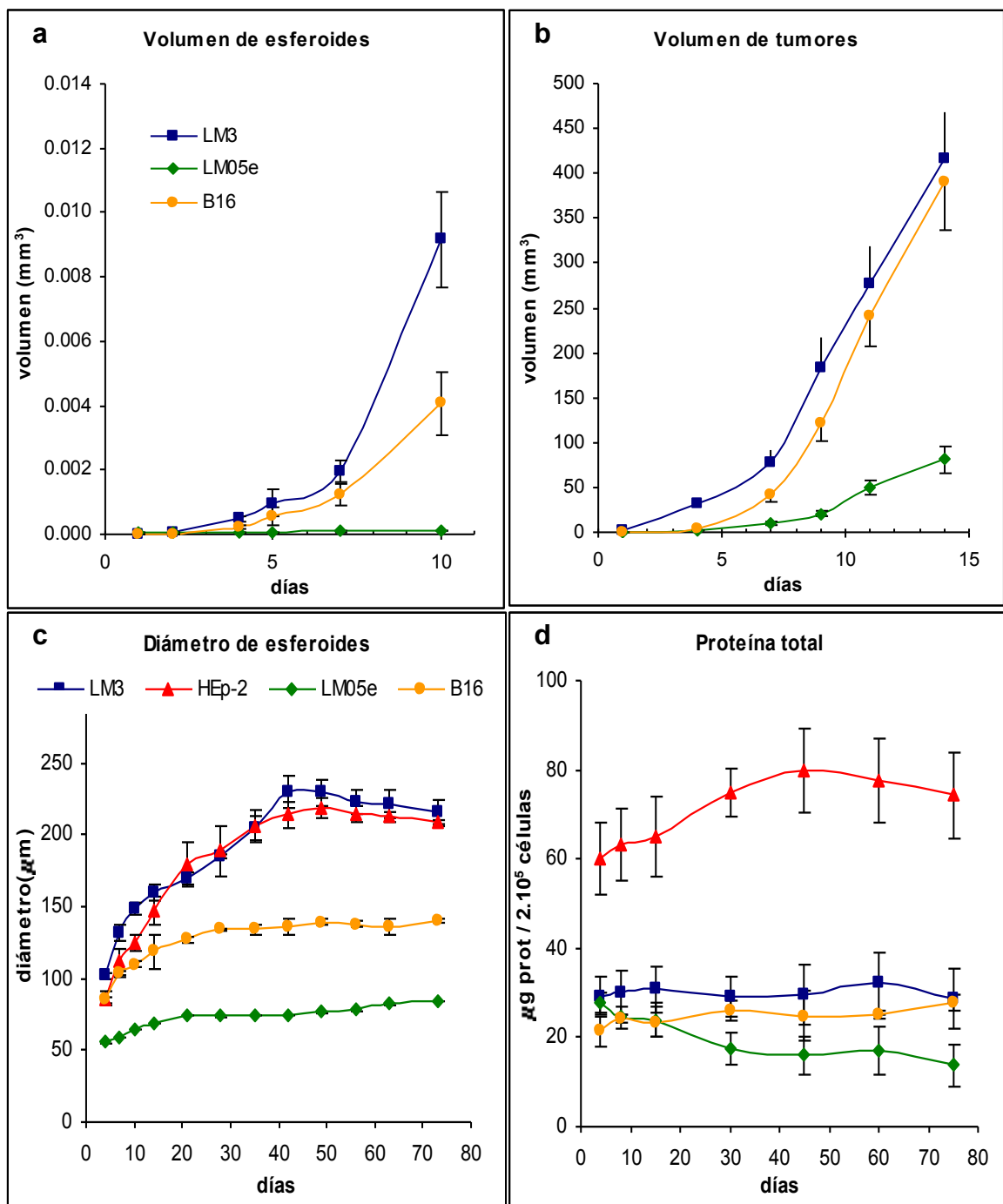


FIGURA 1: Crecimiento de esferoides y de tumores.

(a) Curvas de crecimiento de esferoides. Se graficó el volumen promedio de los esferoides en función del tiempo, calculado sobre 20 mediciones en 4 ensayos independientes.

(b) Curvas de crecimiento de tumores *in vivo* en ratones Balb/c inyectados con células LM3 ó LM05e, o en ratones C57 inyectados con células B16. Los resultados fueron expresados como media \pm s.e.m. (n=5 animales por grupo), y son representativos de 3 experimentos independientes.

(c) Diámetro de esferoides. El diámetro promedio de los esferoides fue calculado sobre 20 mediciones. Resultados expresados como media \pm s.e.m. de 4 ensayos independientes.

LM3, B16 y HEp-2 vs. LM05e: $p < 0.01$.

B16 vs. LM3 y HEp-2: $p < 0.01$.

(d) Proteína total de esferoides. Cada valor representa media \pm s.e.m. de 9 ensayos independientes.

LM3, B16 y LM05e vs. HEp-2: $p < 0.05$.

Los esferoides incorporaron menos ^3H -timidina que una cantidad equivalente de las correspondientes células en monocapa [64]. La tasa de incorporación de ^3H -timidina en los esferoides se correlacionó con el aumento en diámetro durante la fase de crecimiento (**Fig. 2.1**). Mientras que los esferoides LM05e siempre tuvieron una muy baja tasa de incorporación de ^3H -timidina, tanto LM3 como HEP-2 mostraron una alta tasa inicial en el día 8, seguida de una baja tasa estacionaria hasta el día 60. Los esferoides B16 tuvieron una tasa de incorporación intermedia que, como en LM05e, no varió significativamente con el transcurso del tiempo.

Puede observarse que los esferoides de HEP-2 incorporaron el doble de ^3H -timidina que los de LM3, aunque ambos tienen diámetros similares. Esta mayor incorporación de ^3H -timidina, al igual que la mayor cantidad de proteína total, estaría reflejando un mayor número de esferoides HEP-2.

Por otro lado, la actividad metabólica, medida por MTS a distintos tiempos en esferoides cultivados durante un período de 75 días, se mantuvo constante en algunas líneas celulares y decayó en otras (**Fig. 2.2**).

Mientras que los esferoides HEP-2 y B16 mostraron una tasa metabólica constante durante todo el período evaluado, los esferoides LM3 y LM05e tuvieron actividades iniciales similares a HEP-2 y B16, que luego decayeron muy rápidamente con el tiempo, siendo los valores del día 75, 21% (LM3) y 4% (LM05e) de los del día 4.

Tomando en cuenta los demás parámetros de crecimiento evaluados, la caída observada en LM3 y LM05e es más pronunciada que lo esperado. Tratándose de esferoides de naturaleza compacta, podría ocurrir que con el tiempo estos esferoides (i) se hicieran cada vez menos penetrables por moléculas como las sales de tetrazolio, y/o (ii) aumentaran la MDR (resistencia a múltiple a drogas), mecanismo por el cual dichas moléculas serían bombeadas hacia afuera de las células. Cualquiera de estas posibilidades llevaría a una subestimación de la actividad metabólica.

Se intentó revertir este inconveniente mediante el agregado de EGTA 2.5 mM durante el revelado con MTS, ya que dicha sustancia contribuye a aumentar la penetrabilidad de los esferoides por quelación de los iones calcio que intervienen en las uniones intercelulares y en la adhesión célula-matriz. Este tratamiento no modificó significativamente las lecturas, lo que apoyaría la hipótesis de un aumento en la MDR en detrimento de una disminución en la penetrabilidad de los esferoides.

Las células de las capas externas fueron las que proliferaron activamente

Los perfiles de incorporación de BrdU, evaluados por inmunohistoquímica, mostraron el estado proliferativo de las células a distintas profundidades en los esferoides [75] (**Fig. 2.3 a-h**).

La incorporación de BrdU durante 5 días en esferoides LM3, HEp-2 y B16 de 1 día mostraron una tinción nuclear intensa distribuida en todo el esferoide. Por otro lado, con pulsos cortos de BrdU (de 1 día) en esferoides de 5 días, se observó una importante fracción de células no proliferativas o quiescentes. La parte replicativa de los esferoides se encontró mayoritariamente en las capas externas. Estos resultados sugieren que en esta configuración espacial las células parecen proliferar como monocapas en la superficie de una esfera.

Por otro lado, sólo se observaron unas pocas células teñidas en los esferoides compactos LM05e, luego de 5 días de exposición a BrdU. Esto sugiere una mayor fracción de células quiescentes, lo cual se correlaciona con la baja incorporación de ³H-timidina y la baja tasa de crecimiento de estos esferoides.

En la **Fig. 2.3 (i-l)** se muestran secciones histológicas de esferoides de 5 días teñidas con hematoxilina-eosina, en las que pueden observarse células en buen estado a través de todo el esferoide, sin áreas necróticas visibles. La distribución homogénea de la cromatina y los nucleolos visibles sugieren una considerable actividad celular.

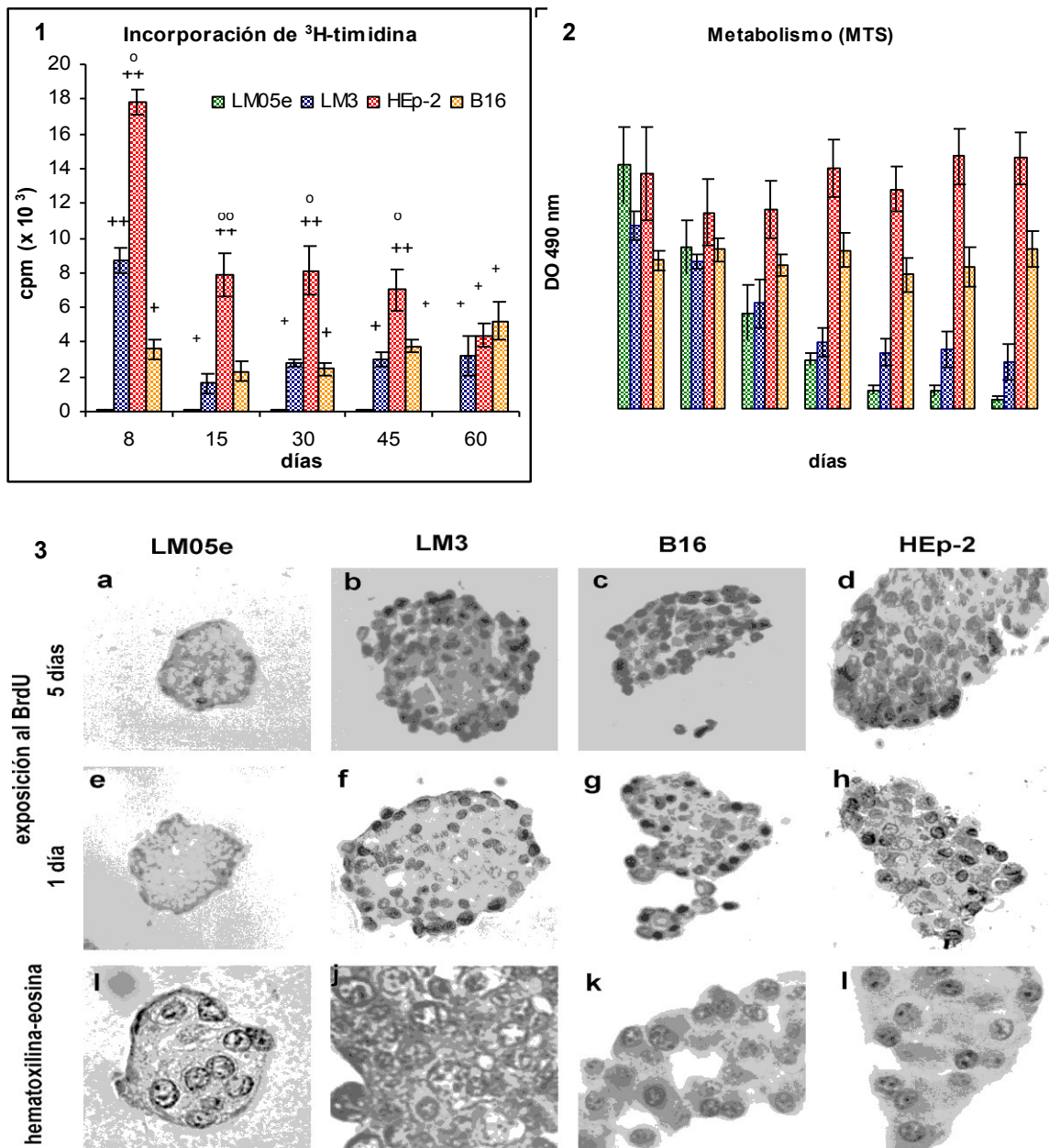


FIGURA 2: Proliferación en esferoides

(1) Incorporación de ³H-timidina al ADN de esferoides. Los esferoides fueron pulsados por 72 hs con ³H-timidina y cosechados a los tiempos indicados como se describe en M & M. Cada punto representa la media \pm s.e.m. de 4 determinaciones.

+ $p < 0.05$ y ++ $p < 0.01$: con respecto a LM05e. $^{\circ}$ $p < 0.05$ y $^{\circ\circ}$ $p < 0.01$: con respecto a LM3.

(2) Viabilidad celular. Medida con el ensayo MTS y expresada como DO a 490 nm, luego de corregir por el fondo. Cada valor representa media \pm s.e.m. de 4 ensayos independientes.

LM3, respecto al día 4: $p < 0.05$ (día 15); $p < 0.001$ (días 30-60)

LM05e, respecto al día 4: $p < 0.05$ (día 15); $p < 0.01$ (días 30-60)

días	LM05e		LM3		B16	
	vs HEP-2	vs LM05e	vs HEP-2	vs LM05e	vs HEP-2	vs LM05e
4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	$p < 0.05$
8	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
15	$p < 0.05$	n.s.	$p < 0.05$	n.s.	n.s.	n.s.
30	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.05$	$p < 0.001$
45	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.05$	$p < 0.01$
60	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.05$	$p < 0.01$
75	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.01$	$p < 0.001$

(3) Incorporación de BrdU y secciones coloreadas con H&E. Esferoides cultivados durante 1 día (a-d) ó 5 días (e-h) fueron incubados con BrdU durante 5 días (a-d) ó 1 día (e-h), como se describe en M & M.

(i-l) Secciones de esferoides teñidas con hematoxilina-eosina.

Las fotografías se realizaron utilizando un microscopio invertido de contraste de fase.

AUMENTO DE LOS NIVELES Y PERSISTENCIA DE LA EXPRESIÓN DE TRANSGENES EN ESFEROIDES

En un estudio previo, hemos demostrado que la expresión de un transgén dirigida por el promotor CMVie en esferoides LM05e, LM3 y B16 es considerablemente más alta que la de sus respectivas monocapas [64]. Para abordar este tema con mayor detalle, hemos comparado en primer lugar el patrón temporal de la expresión de β -galactosidasa en células LM05e, LM3 y HEP-2 cultivadas en monocapas (/M) o en esferoides (/E).

Antes del desarrollo de los cultivos duraderos de esferoides multicelulares, generalmente no era posible mantener células viables en cultivo durante más de dos semanas sin división celular activa, y la expresión de transgenes se diluía rápidamente con el tiempo. Por otro lado, el hecho de repicar las monocapas suprime la expresión del transgén, la que en las líneas celulares estudiadas disminuyó entre 10 y 100 veces luego de dos repiques. Por lo tanto, se trabajó con monocapas que se mantuvieron considerablemente quiescentes luego de llegar a confluencia, mostrando una cinética de crecimiento similar a la de los esferoides: la proteína total de las monocapas LM05e, LM3 y HEP-2 aumentó solamente un 40, 50 y 70% respectivamente entre los días 8 y 15. Una importante ventaja de los esferoides es que pudieron ser conservados viables sin repicar durante más de 75 días, mientras que las monocapas sin repicar comenzaron a despegarse y a morir a partir de los 15 días.

Los esferoides mostraron una expresión del transgén alta y persistente

El promotor CMVie produjo un alto nivel de actividad del gen indicador en células cultivadas en esferoides, en comparación con las mismas células en monocapas, mostrando patrones específicos para cada línea celular (**Fig. 3 a-c**).

En LM05e/E, la actividad β gal tuvo los niveles más altos, con un máximo en el día 8 post-lipofección, seguido de una caída continua que llegó al 10% de la actividad máxima a los 75 días. LM3/E mostraron un patrón similar, con el máximo de actividad β gal entre los días 4 y 8, un 40% menor que LM05e/E. Luego una caída relativamente rápida seguida de una caída suave llevaron la actividad a un 8% del máximo a los 75 días. Por otro lado, HEP-2/E presentaron una actividad constante durante los primeros 30 días, seguida de una suave caída que llegó al 37% del máximo a los 75 días. Es

importante notar que aunque los niveles de expresión iniciales en HEp-2/E fueron sólo un 10% de los de LM05e/E y un 20% de los de LM3/E, su caída más lenta en el tiempo determinó que a los 75 días la expresión de HEp-2/E fuera similar a la de LM3/E y cerca de un 40% de la de LM05e/E.

Aunque la actividad β gal en esferoides decreció a través del tiempo, es muy importante destacar que la expresión a los 75 días no sólo fue detectable sino que fue similar a la de monocapas a los 4-8 días en todas las líneas evaluadas.

Al día 4, la actividad β gal específica dirigida por pCMV β resultó 8 veces (LM05e), 6 veces (LM3) y 3 veces (HEp-2) mayor en esferoides que en las monocapas correspondientes. Además, la expresión de β gal fue más duradera en esferoides que en monocapas: a los 15 días, la actividad β gal en esferoides fue 109% (LM05e), 63% (LM3) y 117% (HEp-2) de la del día 4, mientras que en monocapas la actividad β gal relativa al día 4 fue 34, 21 y 45%, respectivamente. Tomadas en conjunto, estas diferencias en niveles y persistencia de expresión determinaron que, a los 15 días, la actividad β gal fuera 26 veces (LM05e), 14 veces (LM3) y 7 veces (HEp-2) mayor en esferoides que en las correspondientes monocapas. Tal como ocurrió en esferoides, la máxima actividad β gal en monocapas de células HEp-2 fue más baja que las de LM05e y LM3 (32 y 24% respectivamente).

El efecto de la configuración espacial resultó menos dramático cuando la β gal fue dirigida por el promotor SV40e (pCH110), cuyos niveles de expresión en esferoides fueron de alrededor del 10% del pCMV β (**Fig. 3 a-c**). La expresión de β gal en esferoides fue relativamente constante a través del tiempo en LM05e y HEp-2, cayendo un 30% a los 15 días en LM3.

En monocapas, las diferencias en la expresión dirigida por pCH110 y pCMV β fueron menores. pCH110 mostró a los 4 días post-lipofección un 26% de la actividad de pCMV β en LM05e/M, 10% en LM3/M y 13% en HEp-2/M. La actividad β gal dirigida por SV40e fue máxima en LM05e/M y LM3/M a los 4 días, seguida de una disminución del 50% a los 8 días, cuando se alcanzó una meseta, mientras que en HEp-2/M se mantuvo constante desde el día 4 al día 15.

Tanto en esferoides LM05e como LM3, la actividad β gal dirigida por SV40e fue significativamente más alta que en sus respectivas monocapas, pero en HEp-2 esta diferencia fue leve.

La menor expresión de β gal en monocapas con los dos plásmidos evaluados probablemente se debió a: (i) disminución en el porcentaje de células transfectadas

por dilución del transgén durante la replicación de la población celular, y/o (ii) pérdida del transgén por digestión por nucleasas o localización en compartimientos no nucleares.

En términos generales, las células cultivadas en esferoides expresaron niveles de β gal significativamente mayores que las mismas células cultivadas en monocapas en todas las condiciones ensayadas, sugiriendo que la configuración tridimensional aumentó fuertemente la expresión del transgén.

La actividad β gal total se correlacionó con la actividad específica y con el grado de compactación de los esferoides

La actividad β gal total (mU) en esferoides mostró un patrón similar a la actividad β gal específica (mU/mg proteína) (**Fig. 3 d**). La actividad β gal máxima dirigida por el promotor CMVie fue similar en LM05e/E y LM3/E (aprox. 23 y 17 mU respectivamente) y mucho menor en HEp-2/E (aprox. 6 mU), que mostró valores estacionarios desde el día 4 hasta el día 45, seguido de una suave caída al 50% a los 75 días. Sin embargo, los niveles de actividad total en las tres líneas celulares evaluadas convergieron a partir del día 45. Es importante notar que los valores relativos de actividad β gal específica máxima (mU/mg proteína) entre líneas celulares se mantuvieron cuando se expresó como actividad β gal total (mU), demostrando que se trata de variaciones reales en la expresión del transgén y no de un artificio debido a las diferencias en los niveles de proteína.

Entonces, se podría suponer que la alta expresión en LM05e/E es una consecuencia de su baja tasa de crecimiento, debido a una baja cinética de pérdida del plásmido y/o a la alta disponibilidad de la maquinaria celular de transcripción/traducción en células quiescentes. Sin embargo, aunque LM3/E tiene un patrón de crecimiento similar a HEp-2/E, los niveles de expresión máximos en LM3/E son aproximadamente 6 veces más altos que los de HEp-2 y sólo un 40% menores que los de LM05e, lo cual sugiere que una alta tasa de expresión no está en correlación directa con una baja cinética de crecimiento. Por otro lado, teniendo en cuenta que los esferoides de LM05e y LM3 son claramente más compactos que los de HEp-2, se podría sugerir que la alta expresión se correlaciona con el grado de compactación. De hecho, los esferoides de B16 y LM38, que inicialmente son poco compactos, muestran bajos niveles de expresión iniciales (datos no mostrados).

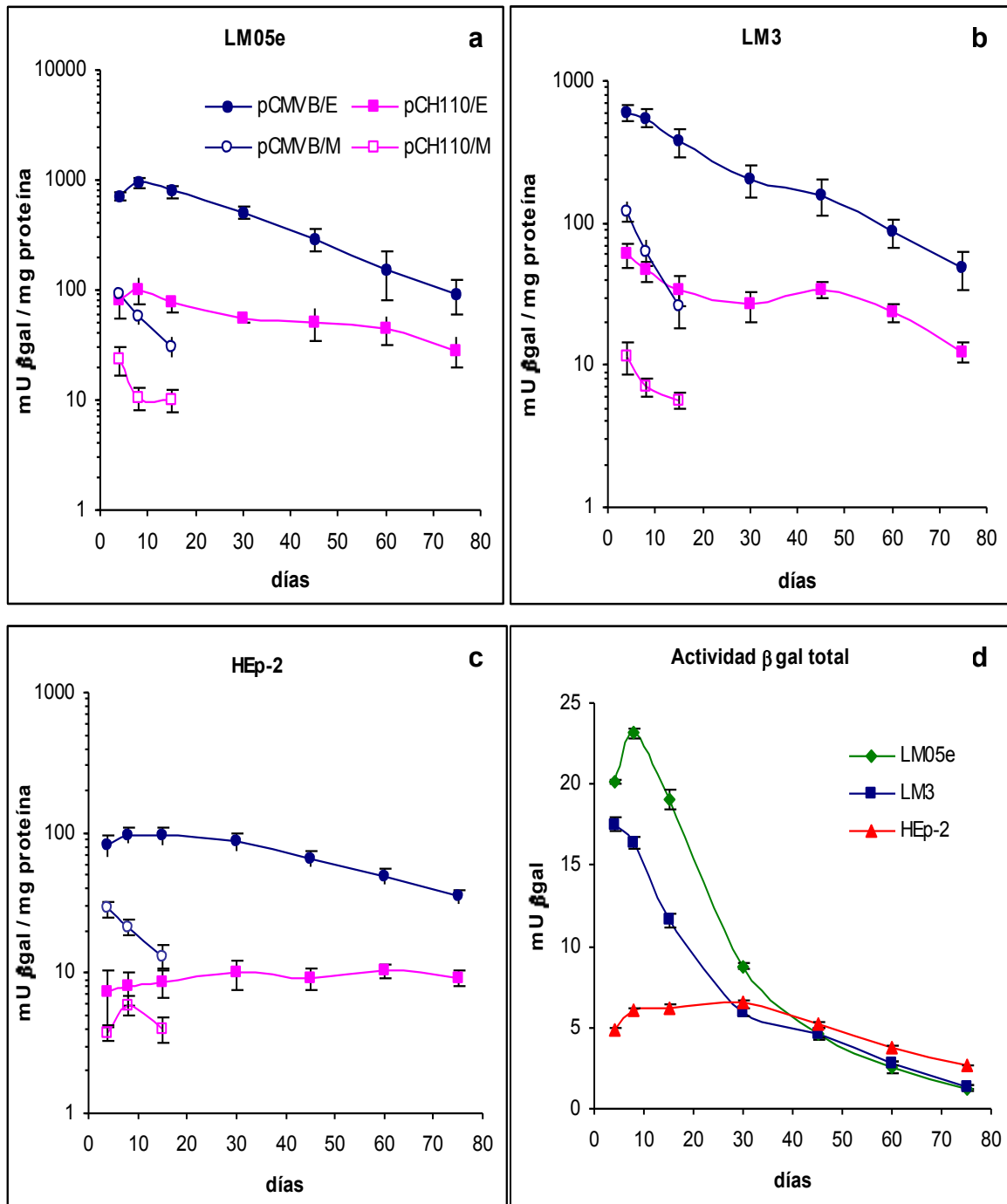


FIGURA 3: Efecto de la configuración del cultivo sobre la expresión de βgal.

(a-c) Las células en cultivo fueron lipofectadas con los plásmidos pCMVβ ó pCH110. 24 horas más tarde, parte de las células fue sembrada en placas cubiertas con agar como esferoides (E), mientras que la otra parte fue cultivada en monocapas (M). A cada tiempo, las células fueron homogeneizadas y se midió la actividad βgal específica como se describe en M & M. Resultados expresados como mU/mg proteína ± s.e.m de (n) ensayos independientes luego de corregir el fondo (pCMVβ: n=14; pCH110: n=6).

pCMVβ vs pCH110 en esferoides: $p < 0.01$ en las 3 líneas celulares.

pCMVβ: E vs M: $p < 0.01$ en las 3 líneas celulares.

pCH110: E vs M: $p < 0.01$ en LM05e y LM3 entre los días 8 y 15.

(d) Actividad βgal total en esferoides. Expresada como mU ± s.e.m de 14 ensayos independientes, luego de corregir por el fondo.

LM05e y LM3 vs HEp-2: $p < 0.01$ hasta 15 días post-lipofección.

Las células β gal⁺ se distribuyeron en regiones definidas en los esferoides

La cantidad y distribución espacial de las células β gal⁺ en los esferoides a distintos tiempos post-lipofección con pCMV β fue observada por tinción de los esferoides con X-Gal (**Fig. 4**).

El número de células teñidas, agrupadas en regiones definidas en todo el esferoide, aumentó durante los primeros 15 días post-lipofección, y luego mostró una rápida disminución del día 15 al 30, seguida de una lenta caída del día 30 al 75.

La composición del cassette de expresión fue un determinante clave en los niveles de expresión del transgén

Debido a que la expresión genética persistente es necesaria para algunas aplicaciones de la terapia génica, hemos estudiado el efecto de algunos elementos y factores que prolongarían la expresión del transgén.

La inserción de las secuencias virales *oriP/EBNA-1* aumentó la expresión de β gal a largo plazo a partir de CMV_{ie} en células humanas

Se construyó pEBCMV β , un vector basado en el virus Epstein-Barr (EBV), que contiene el origen de replicación latente de EBV para persistencia episomal, *oriP* (de aprox. 2000 pb) y un factor de iniciación de la replicación, EBNA-1 (EBV-encoded nuclear antigen 1). Por unión al elemento *oriP* del ADN viral en el genoma del virus Epstein-Barr, EBNA-1 permite que los plásmidos persistan como episomas de múltiple copia que se unen a los cromosomas durante la mitosis, e intensifica la transcripción en estos episomas [45,49,51].

Como se esperaba, el plásmido pEBCMV β portador de un cassette *oriP/EBNA-1* mostró patrones de expresión de β gal muy diferentes en células de roedor y humanas (**Fig. 5 a-c**).

En células humanas HEp-2, al equipar al plásmido con EBNA-1/*oriP*, hubo un aumento significativo en la expresión tanto en monocapas como en esferoides desde el día 4 al 15. En HEp-2/E, la actividad β gal aumentó 2 veces desde el día 4 al 15 post-lipofección; y luego alcanzó un estado estacionario hasta el día 30, en el que comenzó una lenta caída hasta el día 75 (de aprox. un 70%).

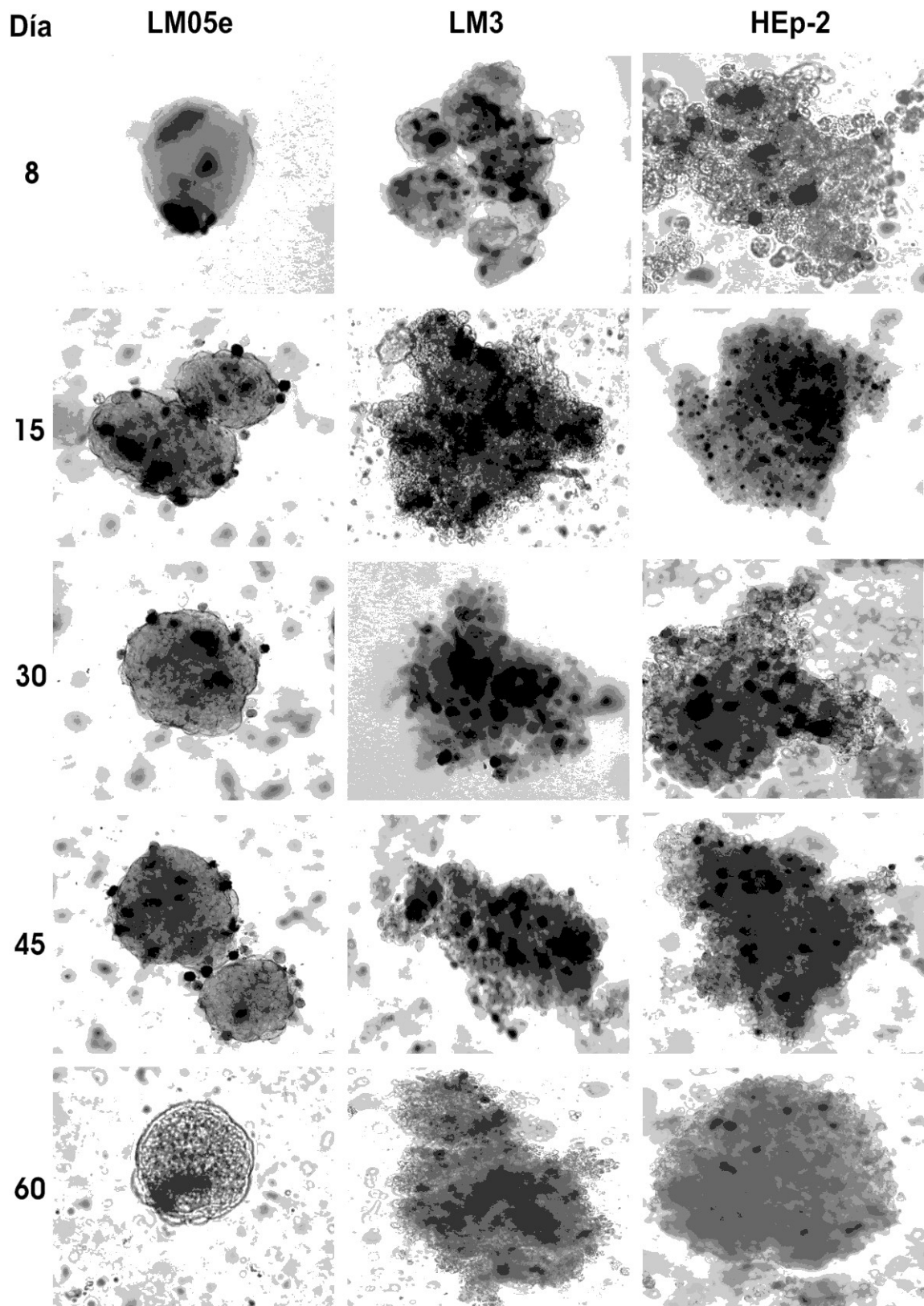


FIGURA 4: Distribución de la expresión de β gal en esferoides.

Micrografías representativas de esferoides LM05e, LM3 y HEp-2 teñidos con X-Gal a los 8, 15, 30, 45 y 60 días post-lipofección con pCMV β . Las células fueron transfectadas, cosechadas 24 hs más tarde y sembradas en placas cubiertas con agar como esferoides. A cada tiempo, los especímenes fueron fijados en suspensión y teñidos con X-Gal, como se describe en M & M. Las áreas azules en los esferoides indican actividad β gal.

Contrariamente, en esferoides de células murinas LM3 y LM05e, la adición en *cis* de las secuencias EBNA-1/*oriP* (pEBCMV β) no sólo no modificó la expresión de β gal del pCMV β en LM3/E sino que resultó en una disminución de un 32% con respecto al pCMV β en LM05e/E, probablemente porque la expresión del gen EBNA-1 empleó una fracción importante de la maquinaria celular del esferoide involucrada en la expresión génica y/o porque los plásmidos más grandes poseen una menor eficiencia de lipofección (ver **Fig. 5d**). Luego de los niveles iniciales de los días 4 a 15, la actividad β gal disminuyó rápidamente (aprox. un 90%) entre los días 15 y 75 en LM05e/E y LM3/E, debido a que los genomas murinos no poseen elementos que permitan la replicación y posterior segregación de los plásmidos EBV a las células hijas en la división celular [45,51]. A pesar de las diferencias observadas entre pCMV β y pEBCMV β en esferoides a tiempos cortos post-lipofección, en las tres líneas evaluadas los valores tendieron a converger hacia el día 75.

Por otro lado, en monocapas la actividad β gal a partir del pEBCMV β decayó aprox. un 50% desde el día 4 al día 15 en células LM05e y LM3, mientras que aumentó un 20% en células HEp-2.

Tal como fue el caso con pCMV β , pEBCMV β también mostró un notable incremento de la actividad específica en esferoides con respecto a monocapas (tomadas al día 8): aprox. 7 veces en LM05e, 5 veces en LM3 y 4 veces en HEp-2.

Una mayor producción de EBNA-1 no aumentó la expresión de β gal

Kaneda y colaboradores [49] informaron que el reemplazo del promotor del EBNA-1 por el promotor CMVie, más fuerte, resultó en un incremento de 20 veces en la expresión de EBNA-1. Entonces, para investigar si una mayor cantidad de EBNA-1 podría inducir una mayor intensificación de la expresión del transgén, se construyó pEB2CMV β , un plásmido similar al pEBCMV β pero con el EBNA-1 bajo promotor CMVie.

Sin embargo, esta construcción resultó en una expresión de β gal menos eficiente que la generada por pEBCMV β en las tres líneas celulares evaluadas (Fig. 5 a-c), lo cual sugiere que (i) la cantidad de esta proteína reguladora producida por su propio promotor fue suficiente para generar una máxima actividad β gal dirigida por CMVie; (ii) una cantidad excesiva de EBNA-1 unido a *oriP* podría inhibir la retención nuclear y/o la migración del plásmido, presumiblemente a causa de la formación de grandes complejos que no pueden pasar a través del poro nuclear; y (iii) la presencia

de este segundo gen dirigido por CMVie pudo tener un significativo efecto inhibitorio sobre la expresión de β gal, probablemente debido a la competencia entre ambos genes por la maquinaria transcripcional/traducciona.

Se observó un efecto similar en la expresión de β gal dirigida por pCMV β , cuando éste fue cotransfectado con un segundo plásmido portador del gen del hGM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano) bajo promotor CMVie (pCMVGM). La coexpresión de hGM-CSF bajo promotor CMVie causó una dramática inhibición de la actividad β gal (aprox. 90% de inhibición en LM05e/E y LM3/E [día 8] y 70% en HEp-2/E [día 15]). Esto excedió la esperada disminución en los niveles de expresión debida a que en los experimentos de cotransfección se utilizó 50% de cada plásmido.

Sin embargo, la expresión de β gal dirigida por pEB2CMV β en esferoides y en monocapas fue más alta que la producida por la cotransfección con pCMV β +pCMVGM. En esferoides, estas diferencias fueron de aproximadamente 6 veces en LM05e, 2 veces en LM3 y 3 veces en HEp-2 (tomadas al día 8), y a partir de los 45 días los valores tendieron a converger. En monocapas este efecto fue más débil: la expresión de β gal dirigida por pEB2CMV β fue aproximadamente 2 veces (LM05e), 3 veces (LM3) y 1.5 veces (HEp-2) mayor que la dirigida por pCMV β +pCMVGM (tomadas al día 8).

La cotransfección con el gen Ad E4 incrementó la expresión de β gal sólo en esferoides

Se ha informado que la región E4 de Adenovirus (Ad E4) otorga persistencia a la expresión de un transgén dirigida por el promotor CMVie [54,55].

Al cotransfectar pCMV β con pCMVE4 (un plásmido análogo a pCMV β portador del gen Ad E4), se observó a los 8 días en esferoides de las líneas LM05e y LM3 una actividad β gal 2.4 y 2.8 veces mayor, respectivamente, que la producida por la cotransfección pCMV β +pCMVGM (**Fig. 5 a-c**). (Se toma como referencia esta cotransfección debido a que en las cotransfecciones se utilizó la mitad de plásmido que en las transfecciones simples). Esta diferencia desapareció a partir del día 15.

Notablemente, la presencia de la región E4 no aumentó la expresión de β gal en monocapas en ninguna de las tres líneas celulares evaluadas. Por lo tanto, la activación transcripcional observada parece ocurrir sólo en esferoides. Una explicación

posible sería la diferencia en el tipo y cantidad de factores presentes en células cultivadas en dos y tres dimensiones.

En síntesis, la adición del gen E4 produjo un leve aunque significativo aumento en la expresión de β gal, exclusivamente en esferoides de las líneas LM05e y LM3.

La eficiencia de lipofección de los distintos plásmidos se correlacionó parcialmente con la actividad β gal

Por otra parte, en cada línea celular la eficiencia de lipofección, medida como porcentaje de células teñidas con X-Gal a las 24 horas post-transfección, se correlacionó parcialmente con la actividad β gal específica medida por el método ONPG (**Fig. 5 d**).

Mientras que pCMV β (7.1 kb) mostró las eficiencias más altas, los plásmidos pEBCMV β (10.3 kb) y pEB2CMV β (10.8 kb), aproximadamente un 50% más grandes, tuvieron eficiencias del 55-60% de la de pCMV β .

La eficiencia de transfección relativa de dichas construcciones en las distintas líneas celulares fue aproximadamente la misma, siendo LM05e la más eficiente, seguida por HEP-2 y LM3 (alrededor del 30% de LM05e). Es interesante notar que mientras que las células LM3 y HEP-2 mostraron eficiencias de lipofección similares, la expresión de β gal total y específica, significativamente más alta en LM3/E con respecto a HEP-2/E, podría estar relacionada con el grado de compactación de los esferoides.

El promotor CMVie completo produjo la máxima expresión del transgén en esferoides

El control de la expresión de un transgén es un proceso complejo, dependiente en parte de la disponibilidad y/o actividad de los factores celulares y secuencias cercanas necesarios para el funcionamiento del promotor. Como el efecto de la configuración espacial sobre la expresión del transgén fue mucho más evidente cuando la β -galactosidasa fue expresada a partir de pCMV β , hemos decidido investigar las propiedades del promotor CMVie mediante la delección y sustitución parcial de diferentes fragmentos de este promotor.

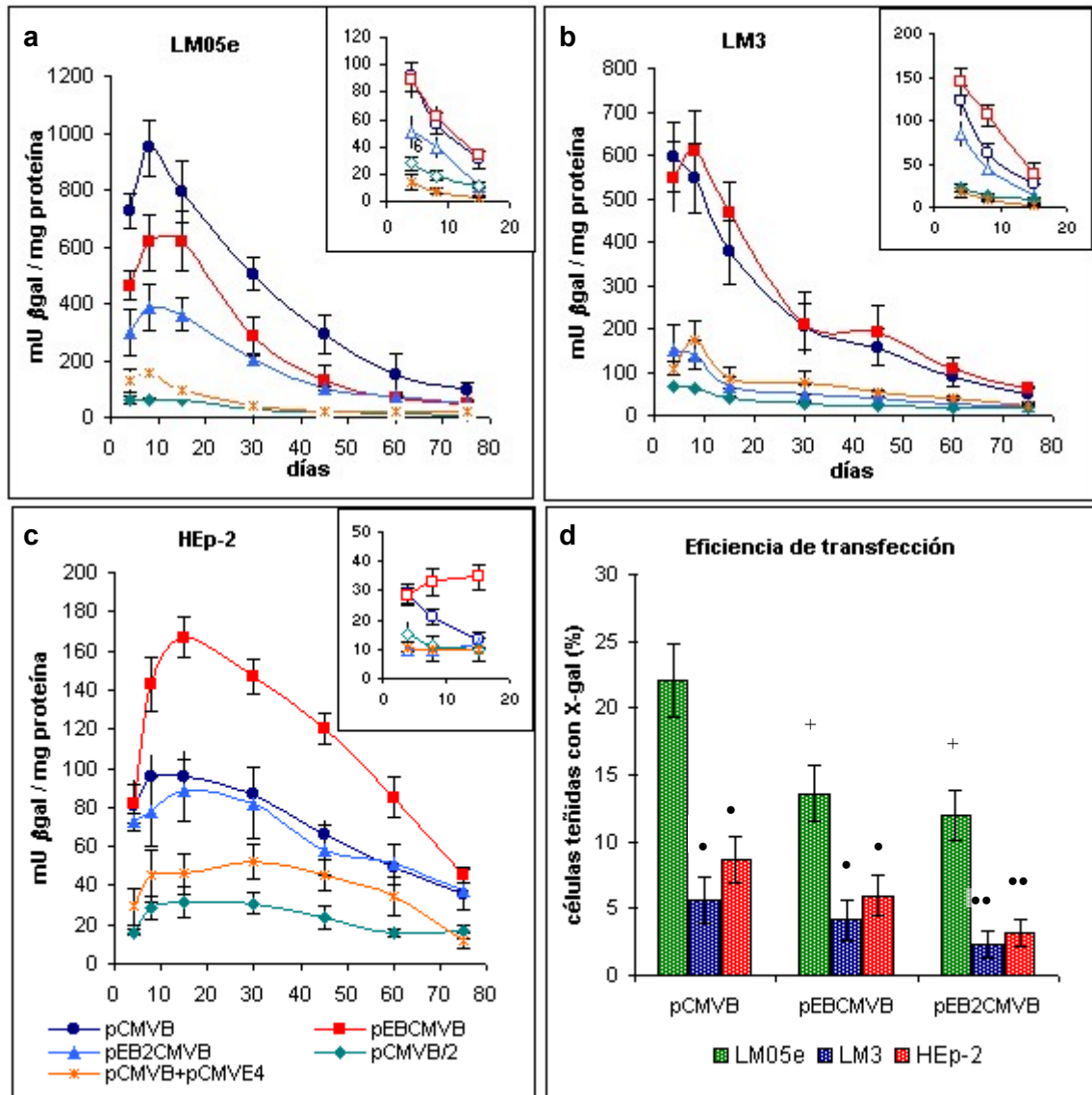


FIGURA 5: Efecto de los elementos de persistencia EBNA-1/oriP y E4 en la expresión de βgal.

(a-c) Actividad βgal específica luego de lipofección con los plásmidos indicados en células cultivadas en esferoides (gráfico principal, símbolos llenos) o monocapas (gráfico insertado, símbolos vacíos). A los tiempos indicados, las células fueron homogeneizadas y se midió la actividad βgal como se describe en M & M. Los resultados se expresaron como mU βgal / mg proteína ± s.e.m. de (n) ensayos independientes, luego de corregir el fondo (pCMVβ: n=14; pEBCMVβ: n=9; pEB2CMVβ: n=8; pCMVβ+pCMVE4: n=8; pCMVβ/2: n= 6). Valores de p (entre paréntesis, días a los que corresponden):

	LM05e		LM3		HEp-2	
	Esferoides	Monocapas	Esferoides	Monocapas	Esferoides	Monocapas
pCMVβ vs						
pEBCMVβ	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p<0.05 (8-60)	p<0.05 (15)
pEB2CMVβ	p<0.05 (4-30)	n.s.	p<0.05 (4-45)	n.s.	n.s.	p<0.05 (4)
pCMVβ/2	p<0.01 (4-45)	p<0.05 (4-8)	p<0.01 (4-45)	p<0.05 (4-8)	p<0.01	p<0.01 (4-8)
pCMVβ+pCMVE4	p<0.01 (4-45)	p<0.05 (4-15)	p<0.05 (4-45)	p<0.05 (4-8)	p<0.01	p<0.05 (4)
pCMVβ/2 vs						
pEBCMVβ	p<0.01 (4-15)	p<0.05 (4-8)	p<0.01 (4-15)	p<0.01 (4-8)	p<0.01	p<0.01
pEB2CMVβ	p<0.01 (4-15)	p<0.05 (8)	p<0.05 (8)	p<0.05 (4-8)	p<0.01	n.s.
pCMVβ+pCMVE4	p<0.001 (8)	p<0.001(8-15)	p<0.01 (8-15)	n.s.	n.s.	n.s.

(d) Eficiencia de la transferencia genética. Células transfectadas con los plásmidos indicados fueron teñidas con X-Gal a las 48 hs post-transfección y contadas, como se describe en M & M. Los resultados se expresaron como porcentaje de células teñidas ± s.e.m. de (n) experimentos independientes (pCMVβ: n=16; pEBCMVβ: n=9; pEB2CMVβ: n=8).

⁺ p < 0.05: con respecto a pCMVβ en la misma línea celular. ^o p < 0.05 y ^{oo} p<0.01: con respecto al mismo plásmido en LM05e/E.

Para ello, se diseñó una serie de construcciones derivadas del pCMV β , que contienen diferentes fragmentos del promotor CMVie río arriba del gen indicador β gal (ver Materiales y Métodos): (i) p Δ 5'CMV β : una construcción que contiene la región 3' entre los sitios *Nco I* y *Sac I* (208 pb), por delección de la región 5' entre los sitios *Eco RI* y *Nco I* (325 pb). Dicha región 5' fue sustituida por (ii) cuatro repeticiones en tándem de la secuencia consenso de unión a myc-max [70], obteniendo pMYCCMV β , o (iii) una copia de la secuencia consenso KCS, que une factores liberados en presencia de IFN- β [71], obteniendo pKCSCMV β . Por otra parte, (iv) el promotor CMVie completo fue delecionado y reemplazado por un promotor mínimo que contiene las secuencias TATA-BOX y Sp1-CS2 de la región 3' del CMVie, obteniendo pTATA β ; y luego (v) cuatro repeticiones en tándem de la secuencia consenso de unión a myc-max fueron añadidas río arriba, obteniendo pMYCTATA β .

La actividad del gen reporter en todas estas construcciones fue evaluada en monocapas y en esferoides durante un período de 75 días (**Fig. 6**).

La delección del fragmento *Eco RI* - *Nco I* (p Δ 5'CMV β) disminuyó fuertemente la expresión del gen reporter dirigida por el promotor CMVie en las tres líneas celulares cultivadas tanto en esferoides (más del 95% de inhibición) como en monocapas (aprox. 80-85% de inhibición). La inserción de 4 secuencias consenso myc-max (67 bp) restauró parcialmente la fuerza del promotor CMVie: 25% en LM05e/E y 50-60% en LM3/E y HEp-2/E. Como los niveles de myc-max aumentan con la proliferación y con la apoptosis, la menor actividad de esta construcción en LM05e/E podría deberse a la menor tasa de crecimiento de estas células en esferoides. Contrariamente, en monocapas esta restauración fue prácticamente total al día 4 en LM05e y HEp-2, debido probablemente a su proliferación, que dispara la expresión de las proteínas myc-max.

La inserción de la secuencia consenso KCS (18 bp) restauró aproximadamente un 10-25% (E) y 25-60% (M) de la actividad del promotor CMVie. Este comportamiento diferencial de monocapas y esferoides podría deberse a diferencias en los niveles de factores regulatorios que se unen a los promotores en células cultivadas en dos y tres dimensiones.

Por otro lado, debido a la falta de suficientes elementos regulatorios, pTATA β sólo sostuvo un 10% de la expresión del pCMV β , aún con la inserción de 4 secuencias myc-max (pMYCTATA β).

En el panel derecho de la **Fig. 6** se muestran micrografías representativas de esferoides de las tres líneas celulares transfectados con pMYCCMV β ó pKCSCMV β , a

los 8 días y a los 60 días post-transfección, teñidos con X-Gal. Como se esperaba, puede observarse a los 8 días post-lipofección una tinción azul intensa, ligeramente mayor con pMYCCMV β que con pKCSCMV β . A los 60 días, la cantidad de células teñidas disminuye y se hace similar para ambos plásmidos.

A partir de estos datos pueden extraerse cuatro conclusiones importantes:

- (i) La composición del cassette de expresión fue un determinante clave en los niveles de expresión del transgén, pero no afectó su duración.
- (ii) El promotor CMVie completo dirigió la mayor expresión del transgén a partir de ADN plasmídico.
- (iii) La expresión del transgén fue dependiente del promotor y del número de secuencias regulatorias presentes.
- (iv) Los esferoides mostraron siempre una mayor actividad del transgén que las correspondientes monocapas.

Tomando en cuenta todo lo expuesto hasta aquí, se ha demostrado que las células cultivadas en esferoides incrementaron fuertemente la expresión del transgén con todos los plásmidos evaluados, pero tal vez el hallazgo más sorprendente fue que la expresión del gen indicador fue aún detectable a los 75 días post-lipofección. Esta expresión persistente in vitro de un transgén a partir una transfección transitoria con vectores no virales no había sido informada anteriormente.

La persistencia de la expresión se debe a la expresión génica sostenida

Para evaluar si la persistencia de la actividad β gal fue debida a la expresión sostenida del transgén, y no sólo a un lento recambio de la proteína en el citoplasma, se analizó la expresión a largo plazo de un producto génico de secreción como el hGM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos).

Mediante cotransfección con pCMV β y pCMVG β , la expresión intracelular de β gal se midió paralelamente a la citoquina secretada producida por el gen hGM-CSF (Fig. 7, izquierda). Como sucedió con la β gal, la producción máxima de hGM-CSF en esferoides LM3 y LM05e ocurrió entre los días 4 y 15, con una rápida caída hasta el día 30 seguida de una caída más lenta hasta el día 75. Como la secreción de hGM-CSF durante 24 hs, luego de renovar el medio de cultivo, refleja la tasa diaria real de expresión del transgén, esta cinética equivalente de ambos transgenes en esferoides LM05e y LM3 confirmó que la persistencia se debió principalmente a la expresión

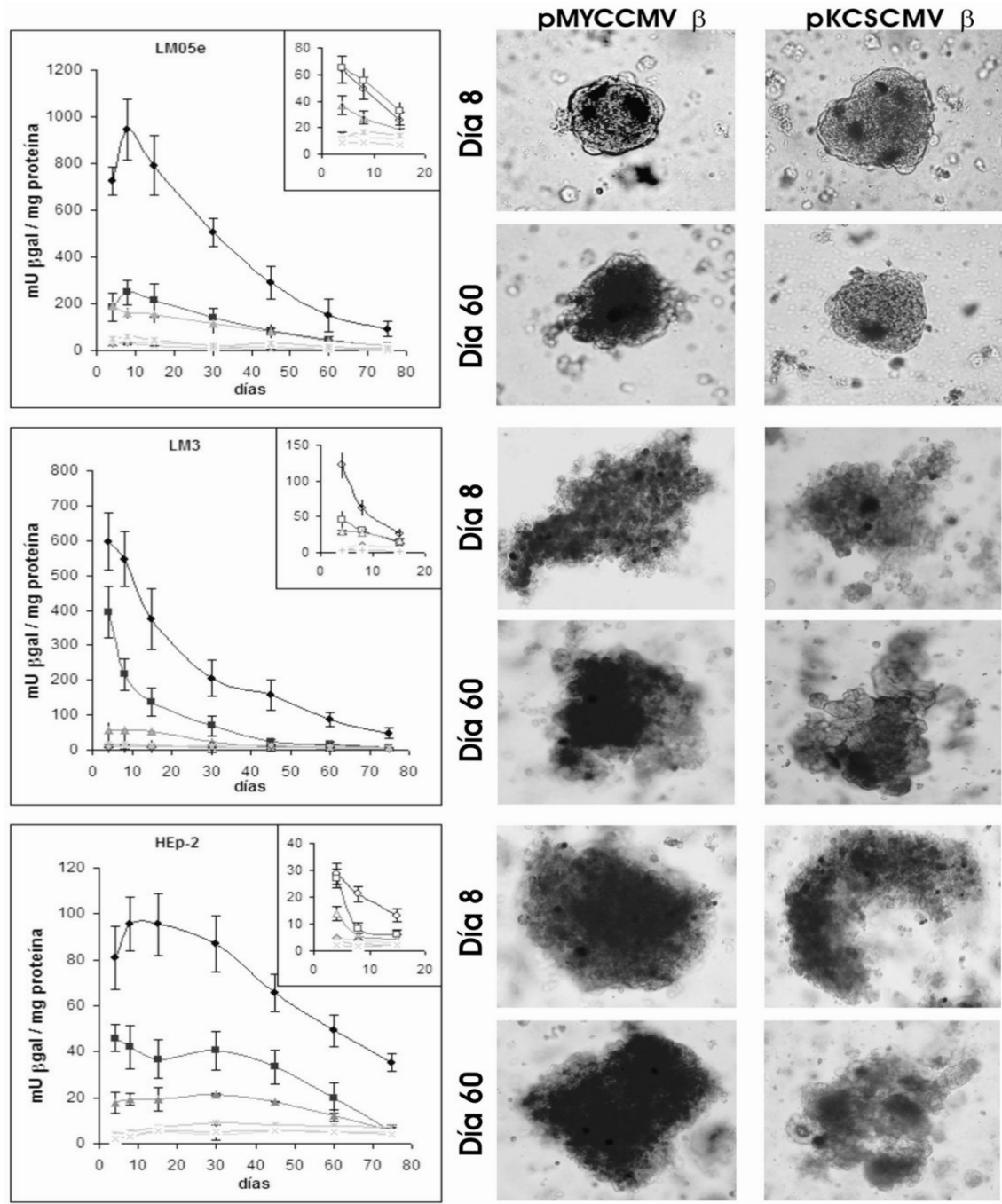


FIGURA 6: Propiedades del promotor CMVie parcialmente deletado/ sustituido.

Izquierda: Actividad β gal específica luego de lipofección con pCMV β (●), pMYCCMV β (■), pKCSCMV β (▲), p Δ 5'CMV β (◆), pMYCTATA β (x) ó pTATA β (x) en células LM05e, LM3 y HEp-2 cultivadas en esferoides o monocapas. Cada valor representa media \pm s.e.m. de (n) ensayos independientes (pCMV β : n=14, pMYCCMV β : n=9, pKCSCMV β : n=6, p Δ 5'CMV β : n=8, pMYCTATA β : n=5, pTATA β : n=5).

Valores de p	LM05e		LM3		HEp-2	
	Esferoides	Monocapas	Esferoides	Monocapas	Esferoides	Monocapas
pCMV β vs						
pMYCCMV β	p<0.01	n.s.	p<0.05	n.s.	p<0.05	p<0.05
pKCSCMV β	p<0.01	n.s.	p<0.05	n.s.	p<0.05	p<0.05
p Δ 5'CMV β , pTATA β	p<0.01	p<0.05	p<0.01	p<0.05	p<0.01	p<0.05
p Δ 5'CMV β , pTATA β ,						
pMYCCMV β	p<0.01	p<0.05	p<0.01	p<0.05	p<0.01	p<0.05
pKCSCMV β	p<0.01	p<0.05	p<0.01	p<0.05	p<0.01	p<0.05

Derecha: Micrografías representativas de esferoides LM05e, LM3 y HEp-2 lipofectados con pMYCCMV β ó pKCSCMV β , a los 8 ó 60 días post-transfección, teñidos con X-Gal. Las áreas azules en los esferoides indican actividad β -galactosidasa.

génica continua. Pero los esferoides HEp-2, cuyos niveles de expresión fueron marcadamente inferiores a los de LM05e (aprox. 10%), mostraron una producción máxima de hGM-CSF a los 4 días, seguida de una caída continua que llevó la expresión al 5% del nivel inicial a los 40 días.

Al comparar los patrones de expresión de β gal y hGM-CSF, se puede observar que en las células HEp-2 la producción de hGM-CSF cayó más rápidamente que la actividad β gal. Ya que la vida media de la enzima β -galactosidasa en algunas líneas celulares puede alcanzar varios días [76], se puede asumir que la persistencia de la actividad β gal se debe parcialmente a su estabilidad en el citoplasma. Por otro lado, la exposición continua y a largo plazo de los esferoides a los altos niveles de hGM-CSF secretado podría tener un efecto tóxico inespecífico que llevara a regular negativamente su propia expresión, o a su degradación. Este resultado obtenido con esferoides cultivados in vitro está notablemente de acuerdo con la expresión in vivo de G-CSF medida en suero de ratones luego de inyecciones i.v. de lipoplexes que contenían el gen del G-CSF, especialmente diseñados para la expresión a largo plazo [51].

A los 8 días, las monocapas mostraron actividades más bajas que los esferoides en LM05e (aprox. 3 veces) y en LM3 (aprox. 20 veces), tal como sucedió con la actividad β gal. Por el contrario, a los 4 días la producción de hGM-CSF en HEp-2 resultó equivalente en esferoides y en monocapas. Pero en todas las líneas celulares la producción en monocapas decayó inmediatamente, mientras que en esferoides dicha producción disminuyó suavemente. Esto dio lugar a mayores diferencias entre esferoides y monocapas a los 15 días: en dicho punto, las relaciones E/M en producción fueron 118 para LM3, 20 para HEp-2 y 7 para LM05e.

Tal como fue el caso con el gen de la β gal, el promotor SV40e generó una producción de hGM-CSF sustancialmente más baja que el promotor CMVie, con una cinética de caída similar en las tres líneas celulares (**Fig. 7**, derecha). Esta producción fue menor y de caída más rápida en monocapas que en esferoides, excepto en células LM05e, en las que tanto esferoides como monocapas mostraron niveles de producción similares.

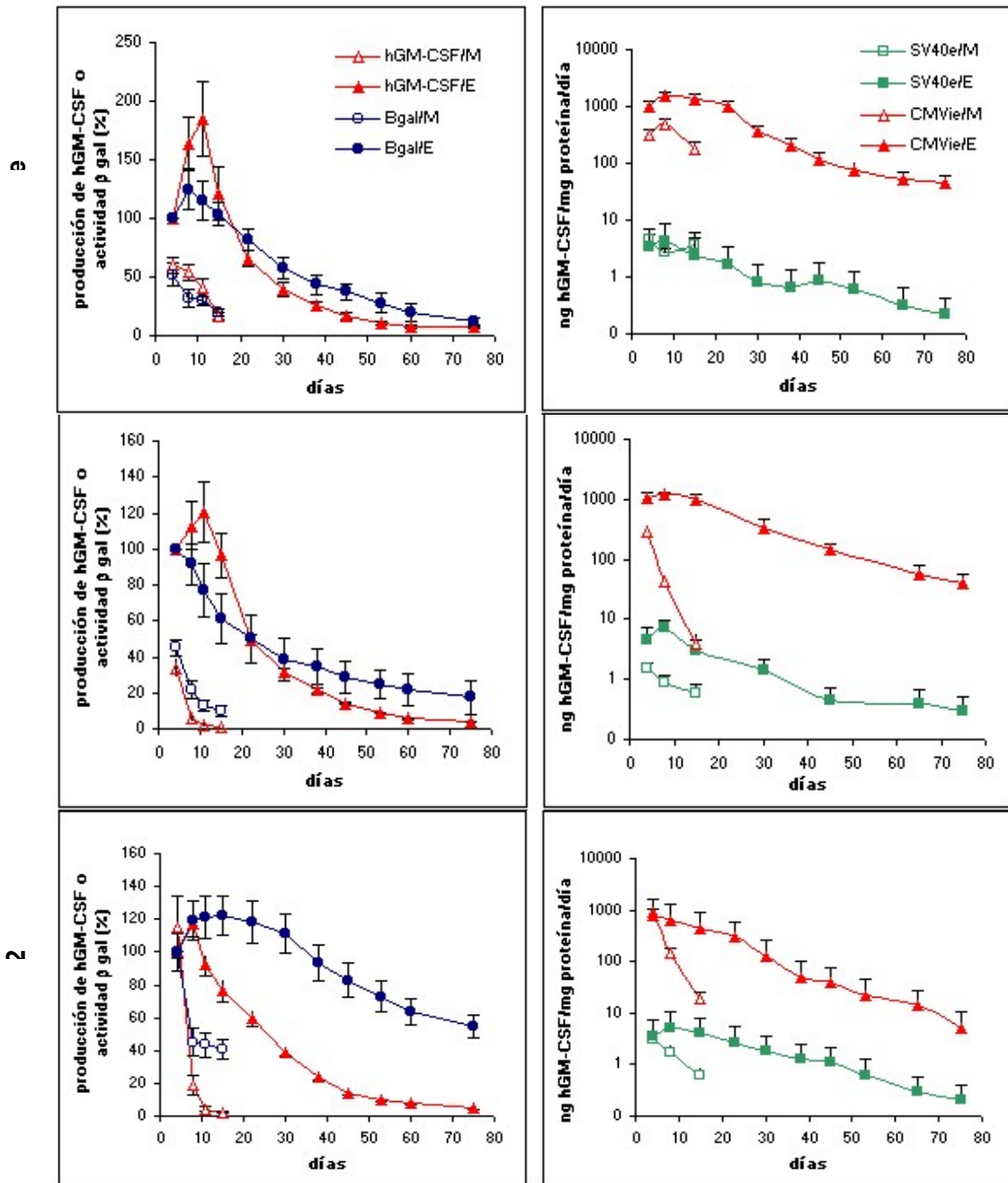


FIGURA 7: Expresión de la proteína de secreción hGM-CSF.

Izquierda: Actividad β -galactosidasa específica y producción de hGM-CSF. Las células fueron cotransfectadas con los plásmidos pCMV β + pCMVGM y cultivadas en esferoides (E) o monocapas (M). Los datos fueron expresados como porcentaje sobre la actividad β gal ó la producción de hGM-CSF en esferoides al día 4. Cada valor representa media \pm s.e.m. de (n) ensayos independientes (pCMV β : n=20; pCMVGM: n=9). pCMV β vs pCMVGM: $p < 0.01$ entre los días 15 y 75 en HEP-2/E. pCMV β vs pCMVGM: $p < 0.01$ entre los días 8 y 15 en HEP-2/M.

Línea celular	Act β gal máx (mU/mg prot)	Prod de hGM-CSF máx (ng/mg prot/día)
LM05e/E	64	1568
LM3/E	67	1185
HEP-2/E	23	783

Derecha: Producción específica de hGM-CSF luego de colipofección con los plásmidos pCMV β +pCMVGM ó pCH110+pSVGGM en células LM05e, LM3 y HEP-2 cultivadas en esferoides (E) o monocapas (M). Cada valor representa media \pm s.e.m. de (n) ensayos independientes (pCMVGM: n=9; pSVGGM: n=4). pCMVGM vs pSVGGM: $p < 0.01$ en las tres líneas celulares.

El efecto de la configuración espacial del cultivo sobre la expresión de transgenes fue reversible

Al ser transferidos desde placas no adherentes a placas de cultivo normales, los esferoides tendieron a desarmarse y crecer como monocapas. La capacidad para formar dichas monocapas se correlacionó inversamente con el grado de compactación de los esferoides: los esferoides HEp-2 formaron monocapas más rápidamente que LM05e ó LM3, y esta capacidad decreció en las tres líneas celulares con el tiempo, cuando los esferoides se hicieron más compactos.

Esferoides lipofectados con pCMV β fueron transferidos a placas de cultivo normales a diferentes tiempos post-transfección (4 a 37 días), y 7 días después se midió la actividad β gal específica en las monocapas resultantes (eliminando previamente los esferoides remanentes). La actividad β gal en estas monocapas cayó a valores similares a los de monocapas controles en todas las líneas celulares (**Fig. 8**, izquierda). En cada tiempo evaluado, las actividades β gal fueron menos de un 15% de aquellas de los esferoides de los cuales derivaron 7 días antes, mientras que en los esferoides que continuaron como tales, la expresión cayó sólo al 95% - 50%, dependiendo del tiempo evaluado. Estos resultados demuestran que el aumento de la expresión depende estrechamente de la configuración espacial y que puede ser reversible.

La tinción con X-Gal confirmó estas observaciones. Ocho días post-transfección los esferoides fueron transferidos a placas normales y, 2 a 4 días después, los esferoides remanentes y las monocapas que estaban creciendo en forma radial fueron teñidos con X-Gal y fotografiados. Como se esperaba, se pudo observar una tinción intensa en los esferoides remanentes, mientras que las monocapas mostraron pocas o ninguna célula teñida (**Fig. 8**, derecha).

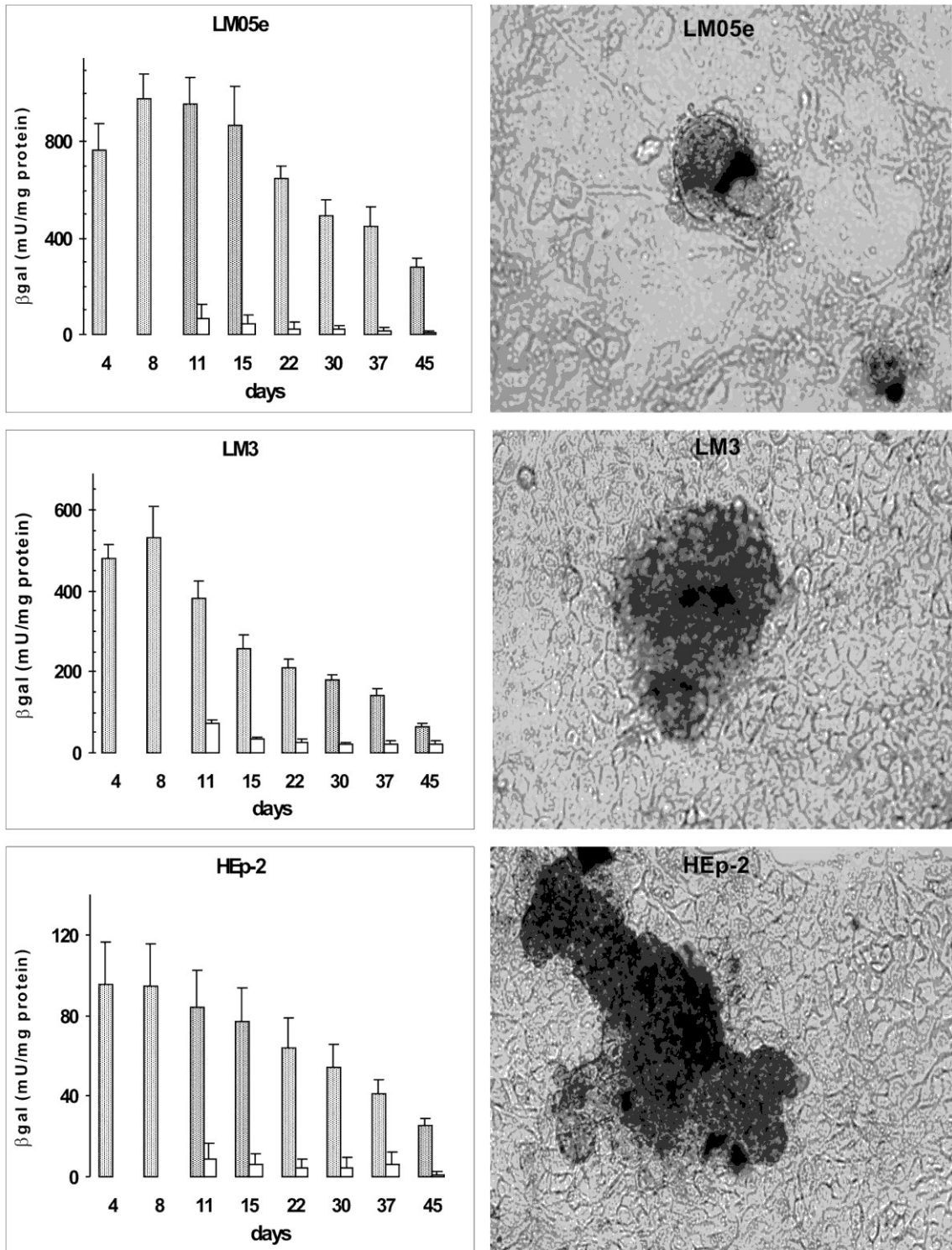


FIGURA 8: Efectos de la reversión de la configuración del cultivo sobre la expresión de β gal.

Izquierda: Actividad β -galactosidasa en esferoides LM05e, LM3 y HEp-2 y en monocapas derivadas de los respectivos esferoides a diferentes tiempos post-lipofección con pCMV β . A cada tiempo, la monocapa deriva de esferoides sembrados en placas de cultivo normales 7 días antes. Cada valor representa media \pm s.e.m. de 6 ensayos independientes.

Derecha: Micrografías representativas de esferoides LM05e, LM3 y HEp-2 desensamblándose y monocapas creciendo radialmente, teñidos con X-Gal a los 11 días post-lipofección con pCMV β . (Los esferoides fueron transferidos a placas de cultivo normales al día 8 post-lipofección). Las áreas azules indican actividad β -galactosidasa.

La expresión del transgén a largo plazo ocurrió independientemente de la integración del plásmido en el genoma celular

Los vectores se mantuvieron en forma episomal

Se extrajo el ADN genómico y episomal de esferoides a los 40 días post-lipofección con pCMV β o pEBCMV β , y se realizó un ensayo de Southern Blot con una sonda para *lacZ* (**Fig. 9 a**). Dicho ensayo no reveló ninguna integración de los vectores plasmídicos en el genoma de las células huésped, y el plásmido en forma de episoma fue detectado 40 días post-lipofección, demostrando que la mayor parte de los plásmidos lipofectados se mantuvo como episomas.

El efecto de la configuración tridimensional sobre la expresión de transgenes integrados fue opuesto al observado en la expresión transitoria de los mismos

La medición de la actividad β gal específica en células LM3 transfectadas establemente con β -galactosidasa y cultivadas en monocapas o en esferoides mostró que el efecto que produce la configuración espacial sobre la expresión de transgenes integrados fue opuesto al observado en la expresión transitoria de los mismos transgenes (**Fig. 9 b**). Mientras que entre los días 4 y 8 de cultivo la actividad β gal específica fue similar en monocapas y esferoides, al día 15 la expresión en esferoides fue la mitad de la de monocapas. Es importante notar que a los 30 días de cultivo la actividad en esferoides LM3 cayó a un 12% del máximo alcanzado a los 8 días, mientras que en los mismos transfectados transitoriamente esta relación fue del 38%. Esto sugiere que la expresión de un transgén es una característica propia de la configuración tridimensional, y que su pérdida gradual ocurre tanto con genes integrados como episomales, siendo más lenta en el último caso.

Estos resultados coinciden con los de Klunder y Hulser [76], quienes encontraron una reducida porción de células productoras de β gal en esferoides transfectados en forma estable, con respecto a las mismas células creciendo en monocapas.

Puede observarse que la actividad β gal en monocapas fue mayor en las células transfectadas establemente que en las transitorias, lo cual es fácilmente explicable por el hecho de que casi el 100% de las células transfectadas establemente expresa β gal, mientras que la eficiencia de lipofección para LM3 es de aproximadamente el 10%.

Para corroborar que estas observaciones se extendieran a la expresión de otros transgenes, se evaluó la producción específica de hIL-2 en células LM3 transfectadas en forma transitoria y estable (**Fig. 9 c**).

Las células transfectadas transitoriamente produjeron a los 4 días 3.6 veces más hIL-2 en esferoides que en monocapas, y ambas producciones cayeron de manera similar con el tiempo. Puede observarse que la expresión de hIL-2 en esferoides cayó más rápidamente que la de β gal, debido probablemente a la alta toxicidad generada por la exposición continua y a largo plazo de los esferoides a altos niveles de la citoquina.

Por otro lado, las monocapas transfectadas establemente con hIL-2 expresaron a los 4 días unas 500 veces menos hIL-2 que las monocapas transfectadas en forma transitoria, lo cual podría deberse también a la toxicidad a largo plazo de la hIL-2. Al ser transferidas de monocapas a esferoides, las mismas células transfectadas establemente produjeron niveles no detectables de hIL2 (<0.1 ng hIL2/mg proteína/día). Se obtuvieron resultados muy similares con la línea celular LM38 (datos no mostrados).

Todos estos datos sostienen la hipótesis de que la alta expresión de transgenes en esferoides fue generada por plásmidos en forma episomal, ya que en caso de haber ocurrido una integración, su contribución a la expresión del transgén hubiera sido despreciable.

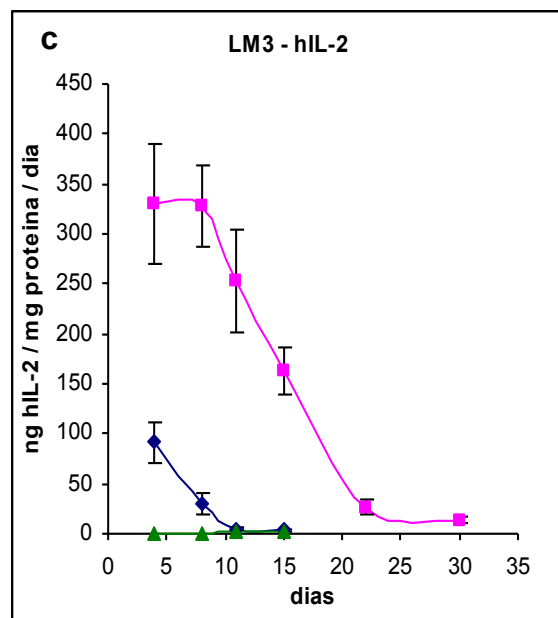
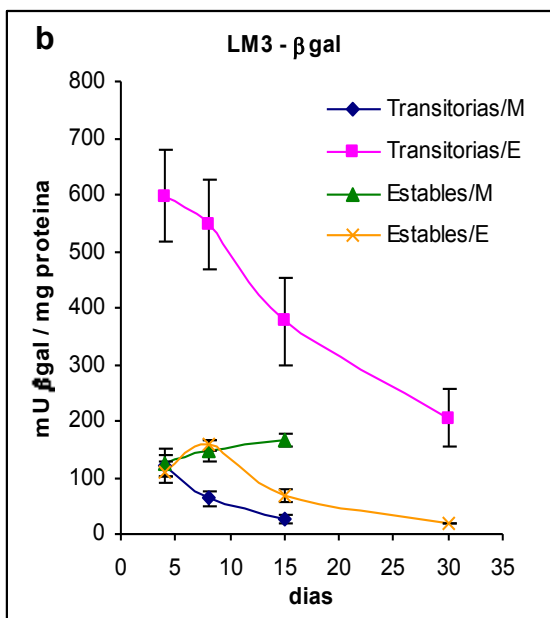
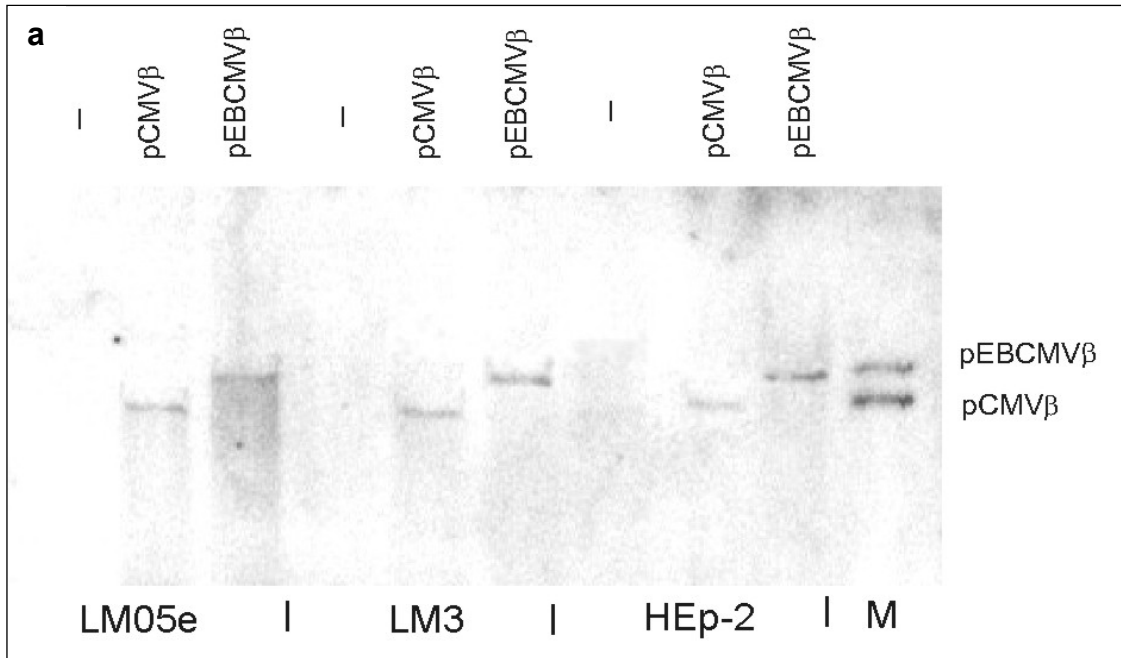


FIGURA 9: (a) Análisis por Southern blot de DNA episomal de esferoides. A los 40 días post-lipofección con pCMVβ ó pEBCMVβ; se extrajo el ADN de esferoides LM05e, LM3 y HEP-2. El mismo fue separado por electroforesis, transferido e hibridizado con una sonda para el gen de la βgal como se describe en M & M. Las líneas celulares y los plásmidos se indican en la fotografía.

M: Plásmidos digeridos con *Hind III* como marcadores de peso molecular.

(b) Expresión de βgal ó (c) hIL-2 en células LM3 transfectadas en forma estable y transitoria. En células cultivadas en monocapas o esferoides. Medida a diferentes tiempos y expresada como media ± s.e.m. de (n) ensayos independientes (βgal: n=4; hIL-2: n=5)

(a) Transfección estable, esferoides 15 y 30 d: p<0.01 respecto a monocapas 15d.

Transfección transitoria, esferoides vs. monocapas: p<0.01.

Esferoides estables vs. transitorias: p<0.01.

(b) Transfección transitoria, esferoides vs monocapas: p<0.001.

Monocapas estables vs transitorias, día 4: p<0.001; día 7: p<0.05.

RESPUESTA AL SISTEMA GEN SUICIDA/PRODROGA HSVtk/GCV EN ESFEROIDES

A pesar de la eficiente expresión de transgenes, los esferoides resultaron más resistentes que las monocapas al sistema HSVtk/GCV

Conociendo el efecto intensificador de la configuración tridimensional sobre la expresión de transgenes, se resolvió estudiar cómo puede influir la configuración espacial de las células en la eficacia del sistema gen suicida/prodroga HSVtk/GCV.

En primer lugar, se evaluó la citotoxicidad de dosis crecientes de la prodroga ganciclovir (GCV) (0.1-1000 $\mu\text{g/ml}$) en monocapas y esferoides de células LM05e, LM3 y B16 transfectadas transitoriamente con HSVtk (LM05e/tk, LM3/tk y B16/tk). Las mismas células transfectadas transitoriamente con βgal (LM05e/ β , LM3/ β y B16/ β) fueron usadas como controles negativos (**Fig. 10 a-b** y **Tabla 1**).

Todas las líneas celulares transfectadas con HSVtk manifestaron un fenotipo relativamente resistente al GCV al ser cultivadas en esferoides, comparadas con las mismas células cultivadas en monocapas. Los esferoides LM05e/tk, LM3/tk y B16/tk resultaron aproximadamente 16, 3 y 9 veces menos sensibles al GCV que sus respectivas monocapas. Esto estaría indicando la presencia de resistencia multicelular (MCR), un tipo de resistencia inherente a las estructuras tridimensionales que ya ha sido descrita en esferoides frente a quimioterapia y radioterapia [5].

Línea celular	IC ₅₀ βgal ($\mu\text{g/ml}$ GCV)	IC ₅₀ TK ($\mu\text{g/ml}$ GCV)	IC ₅₀ βgal / IC ₅₀ TK
Monocapas			
LM05e	96 \pm 23	0.18 \pm 0.06*	533
LM3	91 \pm 28	1.0 \pm 0.4*	91
B16	49 \pm 7	0.7 \pm 0.3*	70
Esferoides			
LM05e	>1000	2.8 \pm 0.9*/#	357
LM3	358 \pm 181	3.3 \pm 1.4	108
B16	290 \pm 21	6.0 \pm 3.0*	48

TABLA 1: Sensibilidad al GCV de monocapas y esferoides de células que expresan HSVtk ó βgal . Concentraciones de GCV que produjeron un 50% de disminución en la viabilidad celular (IC₅₀) a partir de los experimentos mostrados en la Figura 17.

Los resultados representan media \pm s.e.m. de n experimentos independientes (LM05e: n=5; LM3: n=7; B16: n=6).

* $p < 0.05$ = IC₅₀ TK vs IC₅₀ βgal

$p < 0.05$ = IC₅₀ TK de esferoides vs monocapas

Sin embargo, en todos los ensayos realizados en cultivos en dos o tres dimensiones, las células transfectadas con HSVtk fueron significativamente más sensibles al GCV que sus respectivos controles transfectados con β gal, como puede observarse a partir de los datos de IC₅₀ que se presentan en la **Tabla 1**. Este hecho apoya la factibilidad de esta estrategia suicida *in vivo*.

Los esferoides de células que expresan β gal fueron menos sensibles al GCV que sus respectivas monocapas. En el caso de los esferoides LM05e, la curva de sobrevivencia de las células transfectadas con pCMV β se retardó notablemente, impidiendo la interpolación de la IC₅₀ correspondiente, y en consecuencia los resultados comparativos sólo pueden acotarse.

Por último, es importante notar que los esferoides mostraron sensibilidades similares al GCV 10 μ g/ml en las tres líneas evaluadas, a pesar de sus diferentes comportamientos en monocapas.

El efecto bystander in vitro fue menor en esferoides

Para determinar la extensión del efecto bystander *in vitro*, se co-cultivaron durante 5 días en monocapas y en esferoides diferentes proporciones (100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 0/100) de células LM05e, LM3 y B16 lipofectadas con pCMVtk ó pCMV β , con concentraciones crecientes de GCV (0.1-1000 μ g/ml) (**Fig. 10 a-b**).

Las monocapas de células LM05e lipofectadas con pCMVtk (LM05e/tk) fueron las más sensibles al GCV, y la dilución con cantidades crecientes de células LM05e/ β tuvo poco efecto sobre la sensibilidad de esta línea celular al GCV. Las curvas de sobrevivencia celular con 25% y 50% de células LM05e/tk fueron similares a las que contenían 75% y 100% de dichas células, lo cual sugiere un fuerte efecto *bystander*. En el caso de las monocapas de LM3 y B16, las células resultaron más sensibles a la dilución con sus respectivas células β , sugiriendo un efecto *bystander* menor.

Al ser transferidas de monocapas a esferoides, las curvas de sobrevivencia de las tres líneas celulares se corrieron notablemente hacia la derecha a medida que el porcentaje de células /tk disminuyó, sugiriendo un débil efecto *bystander* en esferoides.

El efecto *bystander* se hace evidente cuando la muerte celular inducida por GCV no se restringe a las células que expresan el gen suicida [35] La **Fig. 10 c** muestra la proporción de muerte celular a una dosis de GCV de 10 μ g/ml, con respecto a la fracción de células que expresan el gen transfectado (porcentajes de células lipofectadas con HSVtk corregidos por sus respectivas eficiencias de

transfección, medida como porcentaje de células que expresan β gal). Se estimó el efecto *bystander* a la concentración de GCV farmacológicamente relevante de 10 μ g/ml (comparable a la dosis estándar para pacientes humanos), que eliminó a la mayor parte de las células */tk* y tuvo poco efecto sobre las células */ β* . La línea punteada representa el porcentaje teórico de muerte celular si no existiera efecto *bystander*. Todas las curvas están arriba de esta línea teórica, indicando la presencia de efecto *bystander* en las tres líneas celulares evaluadas, sin importar la configuración espacial del cultivo. Sólo un 1% de células LM05e/*tk* fue suficiente para inducir un poderoso efecto *bystander* que eliminó a un 80% y un 30% de las células cultivadas en monocapas y en esferoides, respectivamente. La presencia de un 5% de células LM05e/*tk* fue suficiente para destruir, respectivamente, al 90% (M) y 50% (E) de las células. Este efecto fue menor en células LM3/*tk* y B16/*tk*, donde un 5% de ellas fue capaz de destruir, respectivamente, al 70 (M) y 45% (E) ó 75 (M) y 50% (E) de los cultivos.

El agregado de GCV a los 8 días post-transfección no modificó la sensibilidad de los esferoides LM05e pero disminuye la de LM3

Teniendo en cuenta que los esferoides expresan transgenes muy eficientemente durante los primeros 15 días, se decidió evaluar la sensibilidad de los esferoides compactos LM05e y LM3 al sistema HSV*tk*/GCV iniciando la incubación con GCV a los 8 días post-transfección, momento en el cual los esferoides ya se encuentran bien formados y compactos y la difusión del GCV hacia su interior podría verse dificultada (**Fig. 11 a**).

En esferoides LM05e, sumamente compactos, la sensibilidad al GCV agregado recién a los 8 días post-transfección (GCV/8d) fue la misma que la observada con el agregado de esta prodroga a las 24 hs post-transfección (GCV/1d). En cambio, la sensibilidad al GCV de los esferoides LM3/*tk* con el GCV/8d disminuyó unas 6 veces con respecto a la observada con GCV/1d, mientras que la sensibilidad de los esferoides LM3/ β no varió. Estos datos sugieren que la difusión del GCV al interior de los esferoides no disminuyó o bien no fue un factor limitante. Posiblemente los esferoides LM3 pierden sensibilidad al GCV por aumento de la MCR en los esferoides de 8 días, con respecto a los de 1 día.

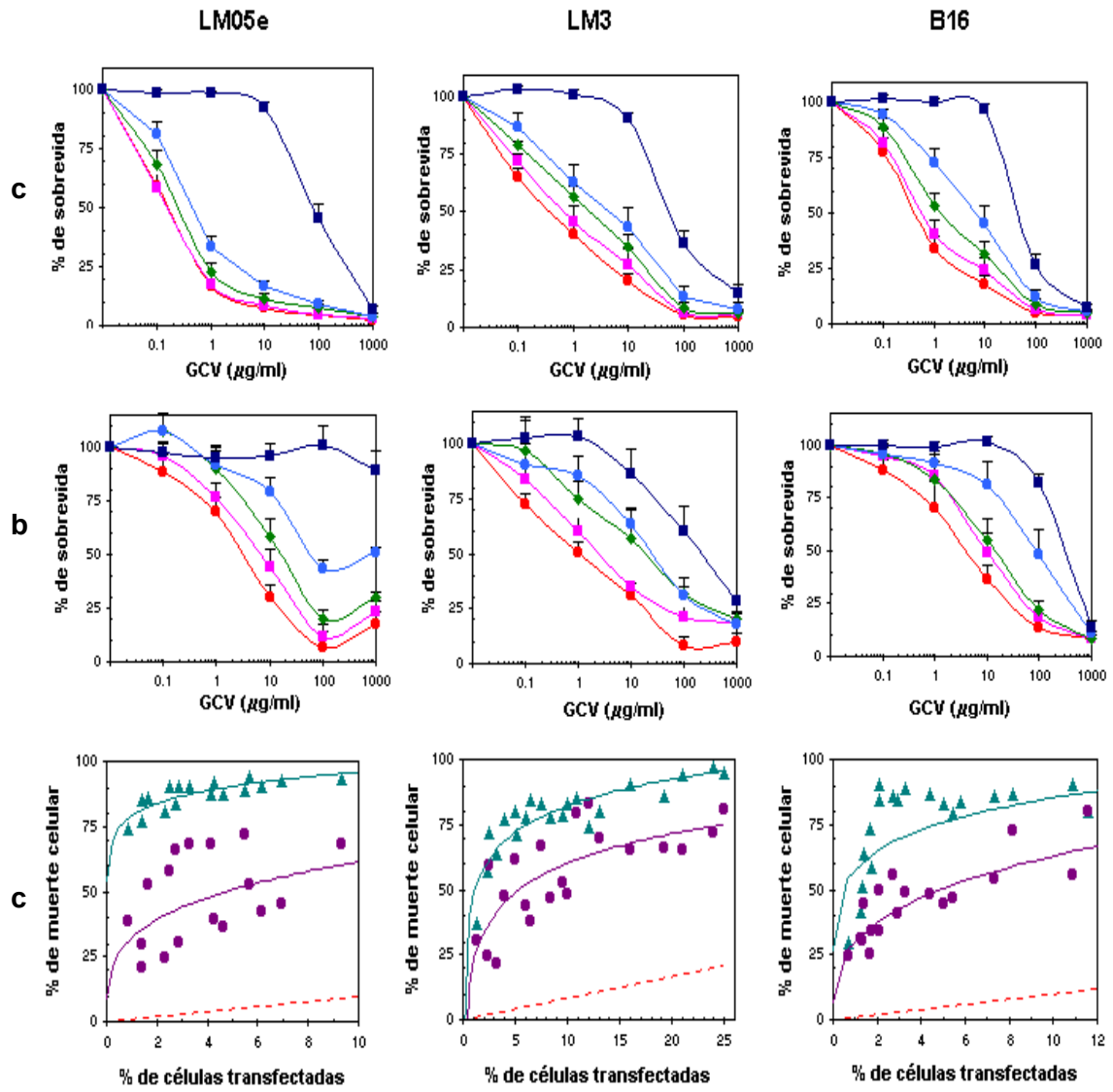


FIGURA 10: Sensibilidad al GCV y efecto *bystander* en monocapas y esferoides

(a-b) Curvas de dosis-respuesta al GCV de diferentes combinaciones de células LM05e, LM3 y B16 que expresan HSV tk ó βgal , cultivadas en monocapas (a) o esferoides (b). Los resultados se expresaron como media \pm s.e.m. de (n) ensayos independientes (LM05e: n=5; LM3: n=7; B16: n=6).

Relaciones células tk / células β : (■) 100/0; (●) 75/25; (◆) 50/50; (■) 25/75; (●) 0/100

Valores de p para GCV 10 $\mu g/ml$:

TK/ βgal	LM05e		LM3		B16	
Monocapas	TK vs	βgal vs	TK vs	βgal vs	TK vs	βgal vs
75/25	n.s.	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.001$
50/50	n.s.	$p < 0.001$	$p < 0.05$	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.001$
25/75	$p < 0.01$	$p < 0.001$	$p < 0.01$	$p < 0.001$	$p < 0.05$	$p < 0.001$
0/100	$p < 0.001$		$p < 0.001$		$p < 0.001$	
Esferoides						
75/25	n.s.	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.01$	n.s.	$p < 0.001$
50/50	$p < 0.05$	$p < 0.01$	n.s.	n.s.	n.s.	$p < 0.01$
25/75	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.01$	n.s.	$p < 0.01$	$p < 0.05$
0/100	$p < 0.001$		$p < 0.001$		$p < 0.001$	

(c) Proporción de células sobrevivientes en función del número de células que expresan HSV- tk , luego de incubar con GCV 10 $\mu g/ml$. Los valores corresponden a experimentos individuales, en los que cada condición fue realizada por triplicado. La línea punteada representa la curva teórica esperada si no hubiera efecto *bystander*. Referencias: (▲) Monocapas; (●) Esferoides.

El agregado de GCV durante la transfección eliminó más del 40% de las células en esferoides transfectados con HSVtk

Está descrito que una vez que el GCV entra a la célula, éste es rápidamente fosforilado por la HSVtk, perdiendo su capacidad de atravesar membranas celulares. Entonces, su vida media dentro de la célula es aproximadamente 6 veces más larga que la del GCV no modificado [77,78]. Se decidió investigar el efecto del agregado de GCV 10 µg/ml previo a la formación de los esferoides (durante la transfección) en células LM05e y LM3. Luego de 24 horas u 8 días, los esferoides fueron expuestos a concentraciones crecientes de GCV (**Fig. 11 b-c**).

Los resultados obtenidos muestran que la corta exposición inicial al GCV (de 6 a 8 horas) fue suficiente para eliminar a más del 40% de las células *tk* en los esferoides de ambas líneas celulares, mientras que la supervivencia de las células β no se vio afectada significativamente. Por otra parte, la exposición subsiguiente de las células sobrevivientes a concentraciones crecientes de GCV, a partir del día 1 ó del día 8 post-transfección, tuvo un mayor efecto en LM3 que en LM05e: la exposición de las células sobrevivientes de los esferoides LM3 al GCV 10 µg/ml agregado al día 1 ó al día 8 eliminó al 68% ó 35% de las mismas, respectivamente. En cambio, para LM05e dichos valores fueron del 37% (día 1) y 16% (día 8). Esto sugiere que las células que expresan HSVtk, requieren sólo una corta exposición al GCV para iniciar una cascada de eventos irreversible, que resulta en la muerte celular programada, que ocurre durante varios días [35].

En este experimento, las células fueron expuestas a GCV 10 µg/ml en forma de monocapas (durante la transfección), lo que asegura la entrada uniforme del GCV a todas las células. Si se compara el efecto producido por esta única exposición con el producido por la exposición a la misma concentración de GCV pero con las células ya en esferoides (durante 10 días), puede observarse que ambos efectos son similares. Esta evidencia favorece la hipótesis de que la difusión no sería un factor limitante, pues son las capas externas replicativamente activas de los esferoides las sensibles al sistema HSVtk/GCV, tal como se detalla a continuación.

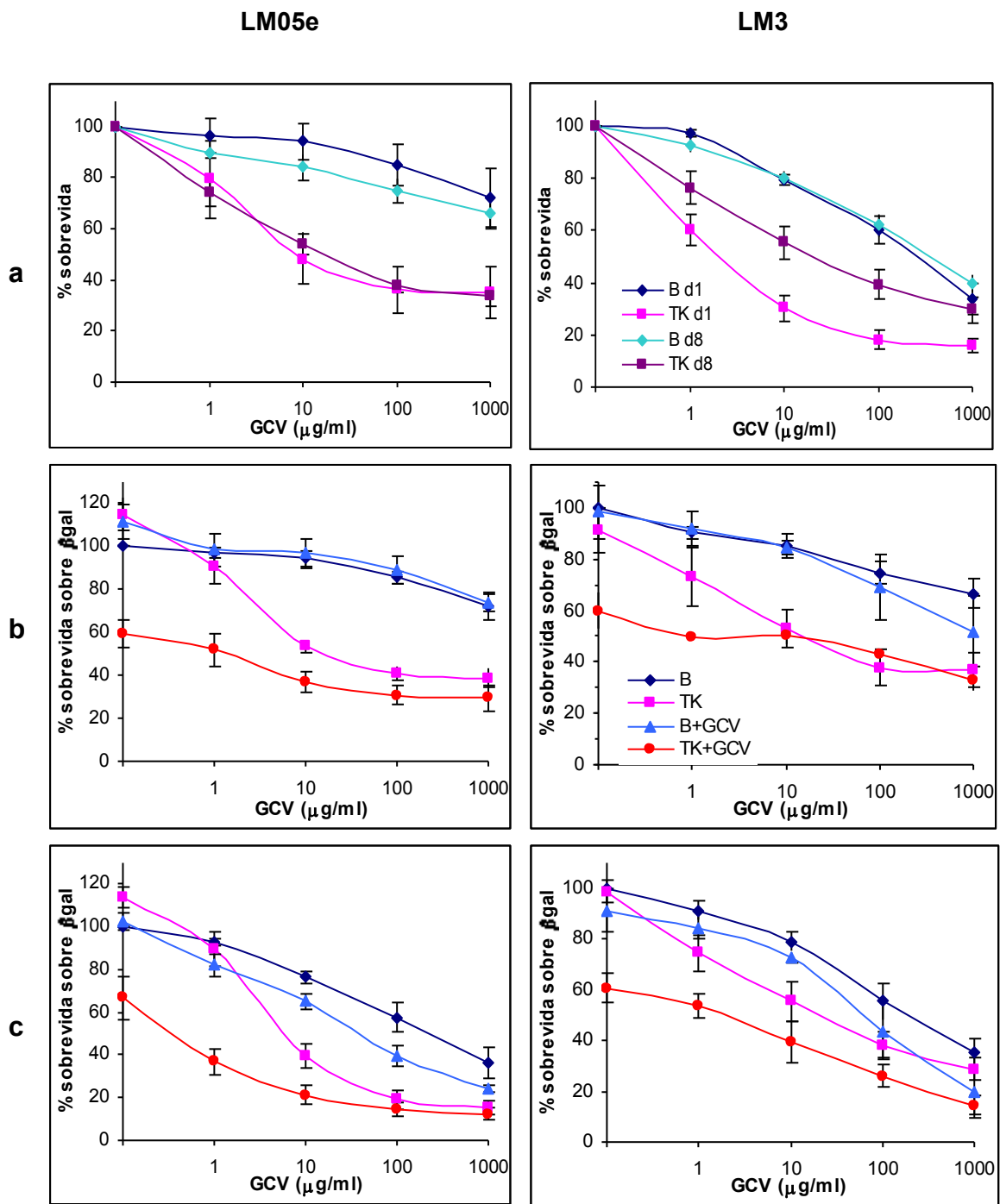


FIGURA 11: Efecto del agregado del GCV a los 8 días post-transfección y durante la transfección.

Curvas de dosis-respuesta a concentraciones crecientes de GCV de células LM05e y LM3 que expresan HSVtk ó β gal, cultivadas en esferoides. Los resultados se expresaron como media \pm s.e.m. de (n) ensayos independientes

(a) La incubación con GCV se inició a las 24 hs ó a los 8 días post-transfección. (LM05e: n=7; LM3: n=5). LM3, TK d1 vs. TK d8: $p < 0.05$.

(b-c) Se agregó GCV 10 μ g/ml durante la transfección, y la incubación con concentraciones crecientes de GCV se inició (b) a las 24 hs post-transfección, o (c) a los 8 días post-transfección. Los resultados fueron expresados como porcentajes de sobrevida con respecto a los controles transfectados con β gal sin agregado de GCV durante ni después de la transfección. (LM05e día 1: n=4, LM05e día 8: n=3; LM3 día 1: n=5, LM3 día 8: n=3). (Ver valores de p en pág. 68).

El tratamiento con el sistema HSVtk/GCV disminuyó el tamaño de los esferoides

En la **Fig. 12** se pueden observar micrografías de esferoides LM05e y LM3 cotransfectados con HSVtk + β -galactosidasa, o sólo con β -galactosidasa como control, incubados durante 10 días en presencia o ausencia de GCV 10 μ g/ml y 100 μ g/ml, fijados y teñidos con X-Gal.

Como la parte de los esferoides replicativamente activa se encuentra mayoritariamente en las capas externas, son éstas las sensibles a este sistema suicida y por lo tanto los esferoides transfectados con HSVtk e incubados con GCV son notablemente más pequeños que sus respectivos controles β gal.

Es importante notar que no se observan diferencias significativas en la sensibilidad de los esferoides LM05e al GCV, así se haya iniciado la incubación a las 24 hs ó a los 8 días post-transfección, mientras que los esferoides LM3 son menos sensibles cuando se coloca el GCV a los 8 días, todo lo cual concuerda con lo observado en las curvas de la Fig. 11.

Además, como puede observarse, la exposición a GCV 100 μ g/ml no tuvo un efecto visible sobre los esferoides LM05e transfectados con β gal, pero sí sobre los LM3, lo cual coincide con lo observado en las curvas de sobrevivencia al GCV de ambas líneas celulares (Figs. 10 y 11). Esto podría sugerir la existencia de una actividad quinasa intrínseca en los esferoides LM3, ausente o en bajos niveles en LM05e.

Por otra parte, cabe aclarar que la menor tinción X-Gal en los esferoides cotransfectados con β gal y HSVk se debe a que fueron lipofectados con la mitad de plásmido β gal que los controles.

Valores de p de la Figura 11:

β gal d1 vs	LM05e			LM3		
	TK d1	β gal d8	TK d8	TK d1	β gal d8	TK d8
1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
10	p<0.001	n.s.	p<0.001	p<0.001	n.s.	p<0.05
100	p<0.001	n.s.	p<0.001	p<0.001	n.s.	p<0.05
1000	p<0.01	n.s.	p<0.001	p<0.01	n.s.	n.s.

β gal vs	LM05e			LM3		
	TK	β + GCV	TK + GCV	TK	β + GCV	TK + GCV
1	n.s.	n.s.	p<0.001	n.s.	n.s.	p<0.001
10	p<0.001	n.s.	p<0.001	p<0.01	n.s.	p<0.001
100	p<0.001	n.s.	p<0.001	p<0.01	n.s.	p<0.001
1000	p<0.01	n.s.	p<0.01	n.s.	n.s.	p<0.05
(c)						
1	n.s.	n.s.	p<0.001	p<0.05	n.s.	n.s.
10	p<0.01	n.s.	p<0.05	p<0.01	n.s.	n.s.
100	p<0.01	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.
1000	p<0.05	n.s.	p<0.05	n.s.	n.s.	n.s.

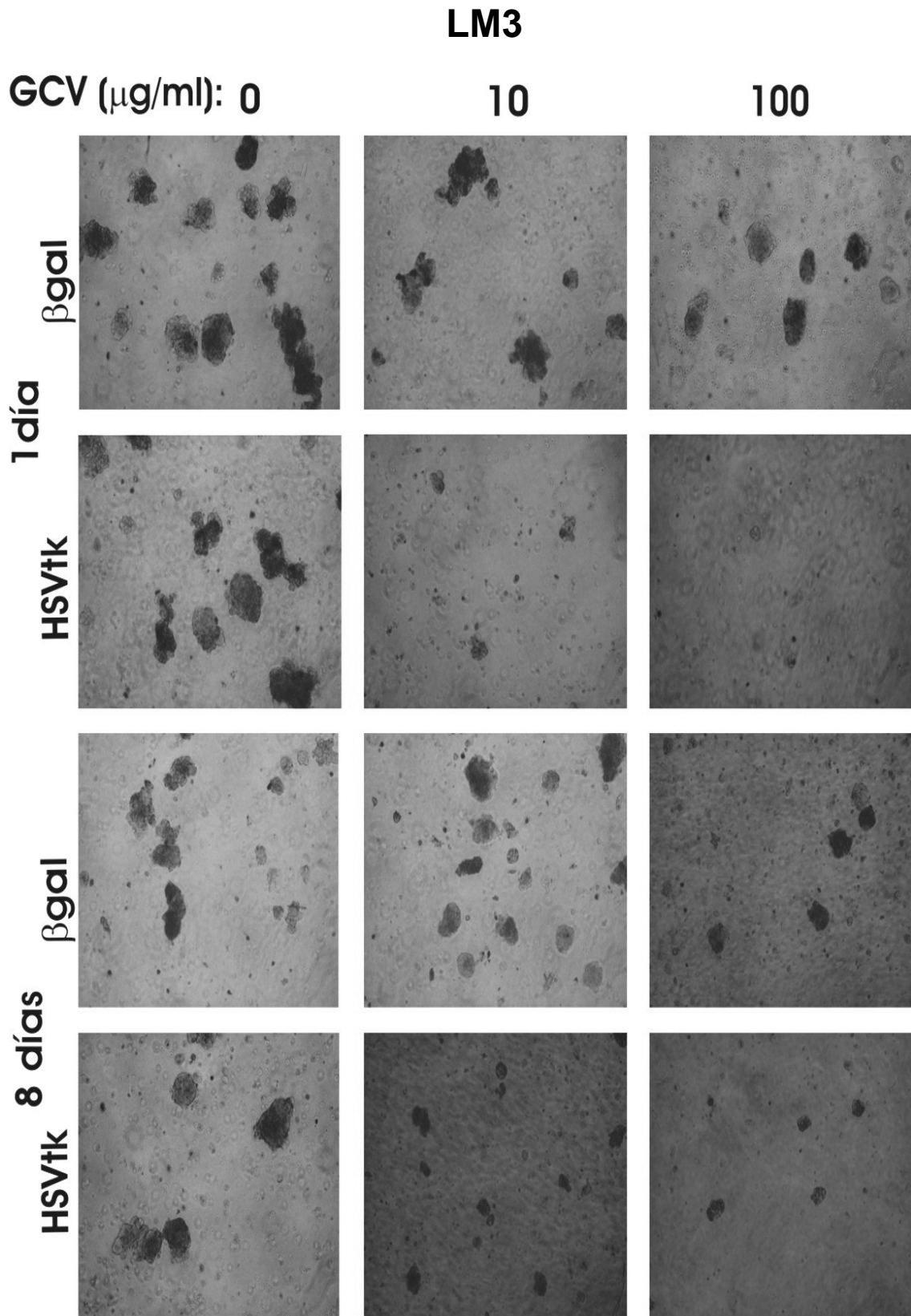


FIGURA 12 a: Efecto del sistema HSVtk/GCV sobre el tamaño de los esferoides.

Células LM3 cotransfectadas con pCMV β +pCMVtk ó pCMV β solo (como control) y cultivadas en esferoides fueron incubadas a partir del día 1 ó del día 8 post-transfección con las concentraciones de GCV indicadas durante 10 días y luego teñidas con X-Gal. Se fotografiaron alícuotas de las suspensiones de esferoides utilizando un microscopio invertido de contraste de fase.

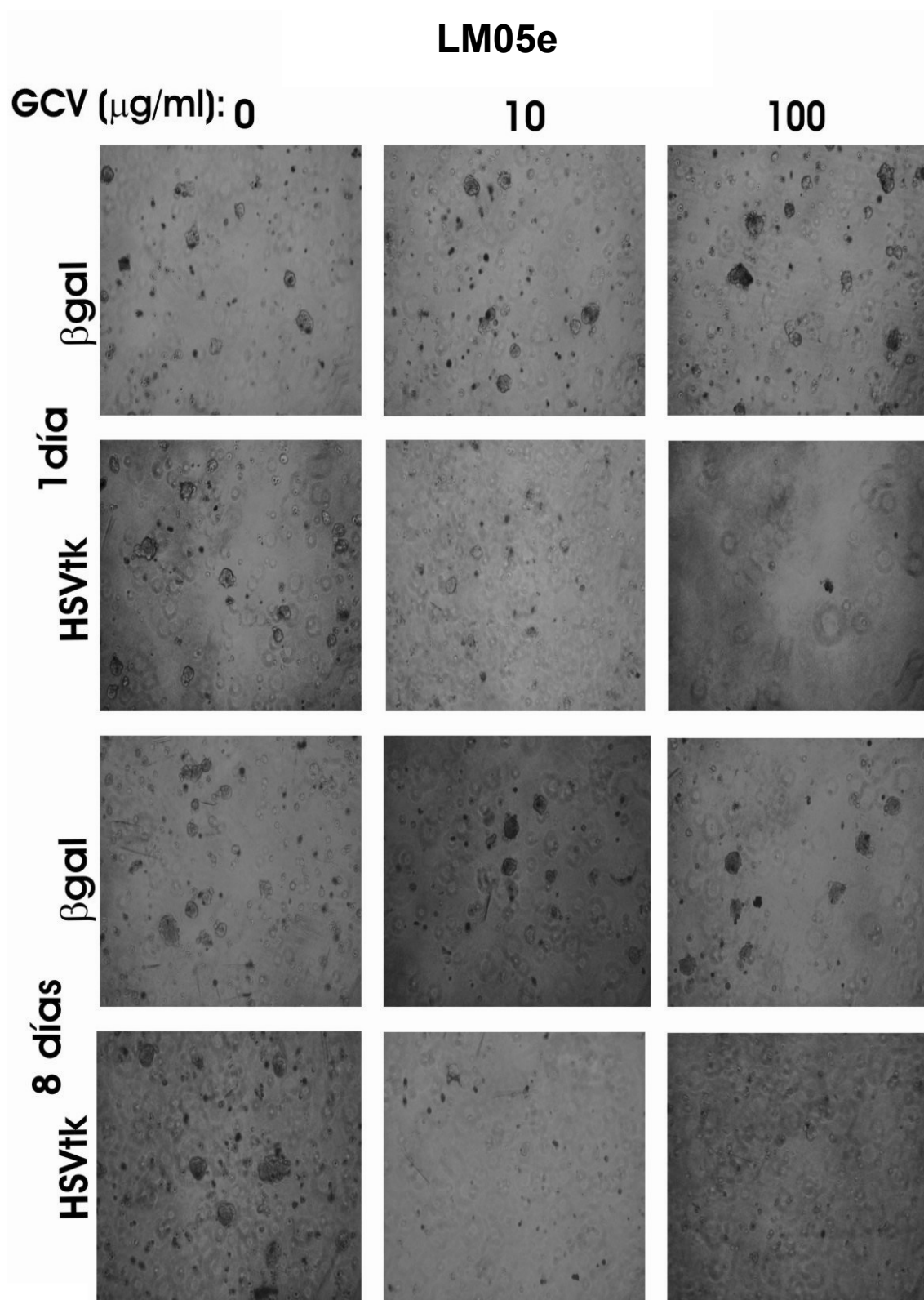


FIGURA 12 b: Efecto del sistema HSVtk/GCV sobre el tamaño de los esferoides.

Células LM05e cotransfectadas con pCMV β +pCMVtk ó pCMV β solo (como control) y cultivadas en esferoides fueron incubadas a partir del día 1 ó del día 8 post-transfección con las concentraciones de GCV indicadas durante 10 días y luego teñidas con X-Gal. Se fotografiaron alícuotas de las suspensiones de esferoides utilizando un microscopio invertido de contraste de fase.

El efecto bystander requirió contacto físico entre células y proliferación celular

Se supone que la potencia del efecto bystander asociado al sistema HSVtk/GCV se intensifica por el contacto físico entre las células [79]. La organización tridimensional de las células tumorales en esferoides se basa en células muy próximas entre sí, con un mayor número de interacciones célula-célula que los cultivos en monocapa. Por lo tanto, sería lógico esperar un mayor efecto bystander en esferoides con respecto a monocapas. Sin embargo, la geometría tridimensional no sólo no aumentó sino que disminuyó el efecto bystander.

Para investigar este aspecto, se compararon las curvas de supervivencia al GCV de monocapas sembradas a tres densidades celulares diferentes, de manera de obtener cultivos con distintos grados de contactos intercelulares. Al cocultivar en monocapa células LM05e, LM3 y B16 transfectadas con β gal con sus respectivas contrapartes *tk* a distintas densidades celulares, se observó un marcado efecto *bystander* en la densidad intermedia, en la cual la mayoría de las células están en contacto entre sí (**Fig. 13**). Por el contrario, cuando estas células fueron cultivadas a baja densidad, el efecto bystander fue más débil, aunque significativo. Esto indicaría que el efecto bystander requiere una estrecha proximidad o bien un contacto directo entre células que expresan HSVtk y células vecinas. Sin embargo, cuando el cocultivo se realizó a una mayor densidad celular, con un alto grado de contactos célula-célula, el efecto bystander no mejoró. En esta última condición, la efectividad del sistema HSVtk/GCV, dependiente del ciclo celular, podría verse limitada por una disminución de la fracción de células en proliferación en el cultivo a alta densidad [64].

Los mediadores apoptóticos resultaron regulados diferencialmente en monocapas y esferoides

Para investigar si existe una correlación entre la muerte celular inducida por el sistema HSVtk y los cambios en los niveles de proteínas intracelulares pro- y antiapoptóticas como Bax y Bcl-xL, se midieron los niveles de dichas proteínas en monocapas y esferoides tratados con GCV 10 μ g/ml, mediante Western Blot (**Fig. 14**).

Un aumento en los niveles de Bax y una disminución en los de Bcl-xL luego del tratamiento con GCV apoyan la mayor sensibilidad al GCV de las monocapas LM05e/*tk* y B16/*tk* con respecto a sus respectivos esferoides, en los que el GCV aumentó los niveles de ambas proteínas (LM05e) o no los modificó (B16). En el caso de LM3, un aumento en Bax inducido por GCV similar en monocapas y esferoides, sin

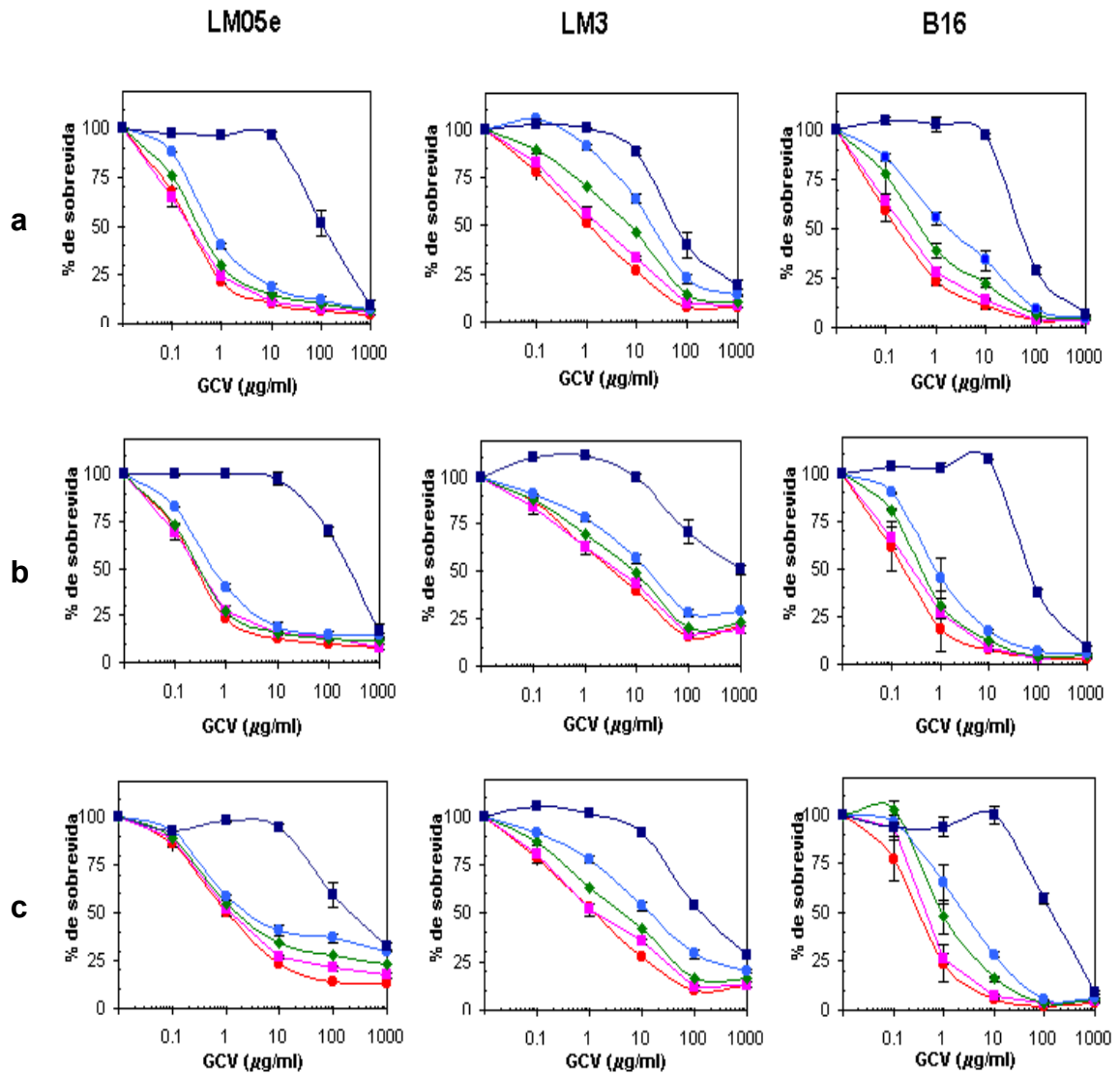


FIGURA 13: Efecto de la densidad celular en monocapas sobre la sensibilidad al GCV.

Sensibilidad de diferentes proporciones de células LM05e, LM3 y B16 que expresan HSV tk ó βgal . Curvas de dosis-respuesta al GCV de células cultivadas en monocapas sembradas a distintas densidades celulares (células/cm²): 10⁴ (a); 2 x 10⁴ (b); 4 x 10⁴ (c). Los resultados fueron expresados como media \pm s.e.m. de 4 experimentos independientes.

Relaciones células tk /células β : (■) 100/0; (●) 75/25; (◆) 50/50; (◼) 25/75; (●) 0/100

Valores de p para GCV 10 $\mu g/ml$:

TK/ βgal	LM05e		LM3		B16	
(a)	TK vs	βgal vs	TK vs	βgal vs	TK vs	βgal vs
75/25	n.s.	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.001$
50/50	$p < 0.01$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.01$	$p < 0.001$
25/75	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.01$	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p < 0.001$
0/100	$p < 0.001$		$p < 0.001$		$p < 0.001$	
(b)						
75/25	n.s.	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.001$
50/50	n.s.	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.001$
25/75	n.s.	$p < 0.001$	$p < 0.01$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
0/100	$p < 0.001$		$p < 0.001$		$p < 0.001$	
(c)						
75/25	n.s.	$p < 0.01$	n.s.	$p < 0.001$	n.s.	$p < 0.001$
50/50	n.s.	$p < 0.01$	n.s.	$p < 0.001$	$p < 0.01$	$p < 0.001$
25/75	n.s.	$p < 0.01$	$p < 0.05$	$p < 0.01$	$p < 0.001$	$p < 0.001$
0/100	$p < 0.001$		$p < 0.001$		$p < 0.001$	

cambios en Bcl-xL, podría explicar la similitud en monocapas y esferoides de esta línea celular en cuanto a su sensibilidad al GCV y efecto *bystander* [80,81,82].

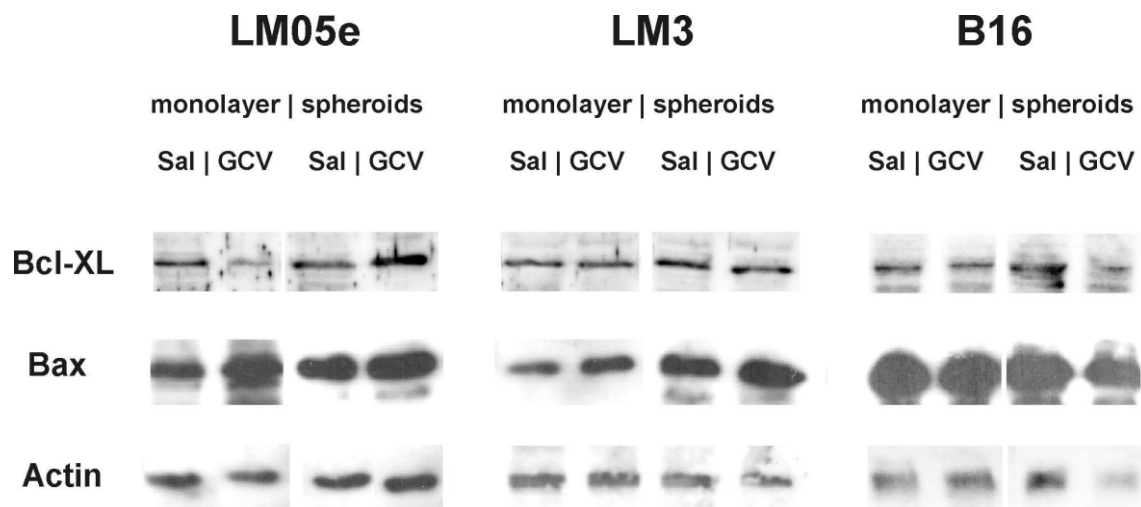


FIGURA 14: Modulación de la expresión de Bax y Bcl-XL en monocapas y esferoides.

Análisis por Western Blot de los niveles de Bax y Bcl-XL en células LM05e, LM3 y B16 lipofectadas con HSVtk, cultivadas en monocapas o en esferoides y tratadas con solución salina (sal) o con GCV 10 µg/ml. Debajo se muestran los controles de expresión constitutiva de actina. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

LOS ESFEROIDES TUMORALES SERÍAN ÓPTIMOS MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y TERAPIA GÉNICA

Los cultivos en monocapa y los esferoides representan dos modelos tumorales experimentales muy distintos. En comparación a las monocapas convencionales, las células cultivadas en agregados tridimensionales reflejan más adecuadamente muchas de las características de los tumores *in vivo*. Las mismas incluyen contactos íntimos célula-célula, microambiente celular, poblaciones celulares crónicamente hipóxicas, forma celular esférica, modificaciones en la cromatina y duraciones del ciclo celular; todo lo cual puede afectar la expresión génica y el comportamiento biológico [2,6,18,83].

En este trabajo se demuestra que las células tumorales cultivadas en esferoides proveen un medio para lograr una expresión de un transgén fuertemente aumentada y persistente, y que la alta expresión del transgén se correlaciona con el grado de compactación de los esferoides. Hasta donde sabemos, esta expresión persistente de un transgén *in vitro* a partir de vectores no virales no ha sido demostrada previamente. Todos los plásmidos evaluados aumentaron la expresión del transgén en esferoides. Entonces, la razón principal para la expresión aumentada de un transgén heterólogo deberá ser buscada en ciertas propiedades específicas que parecen estar optimizadas en células que crecen en agregados tridimensionales, respecto de células en monocapa: i) la forma nuclear específica, ii) la conformación y empaquetamiento del ADN, iii) la accesibilidad y composición de los factores de transcripción, iv) la activación transcripcional/post-transcripcional, y v) la incrementada síntesis de proteínas [76,83].

La propiedad más llamativa de los esferoides fue que la expresión del gen indicador se mantuvo durante toda la vida del esferoide y parece ser independiente de la integración del plásmido al genoma del huésped. Las diferencias significativas en las actividades generadas por diferentes construcciones observadas al día 8 convergieron hacia valores bajos similares luego de 30-60 días de incubación, indicando que más allá del promotor usado, la configuración tridimensional es la principal responsable de la expresión génica a largo plazo. Es importante señalar que la expresión del transgén en esferoides a los 75 días no sólo fue detectable sino que fue similar a la de monocapas a los 8 días en todas las líneas celulares evaluadas.

Al menos cuatro procesos parecen ser críticos para la expresión eficiente y sostenida de un transgén heterólogo en esferoides. Primero, la capacidad de retención

nuclear del ADN transfectado de las células del esferoide. Segundo, una menor disminución en el porcentaje de células transfectadas por dilución del plásmido durante la lenta replicación de los esferoides. Tercero, la lenta pérdida del transgén debida a la destrucción por nucleasas o al traslado a compartimientos no nucleares. Cuarto, una baja atenuación de la función del promotor, que llevaría al silenciamiento de la expresión del transgén.

Hasta el presente, la búsqueda de una expresión eficiente y duradera de un transgén, sin que medie la integración del mismo, se ha focalizado en la construcción de vectores persistentes o replicativos mediante el agregado de determinadas secuencias virales, como por ejemplo EBNA-1/*oriP* de EBV. En este trabajo se demuestra que en esferoides el promotor CMV_{ie} es capaz de lograr este objetivo sin necesidad de adicionar secuencias de origen viral cuya inocuidad no está asegurada.

Dos preguntas surgen de nuestros datos: ¿Cuán significativo sería el efecto de la configuración espacial en la expresión de un transgén *in vivo*, donde las células diferenciadas ensambladas en tres dimensiones presentan bajas tasas de replicación y pueden permanecer metabólicamente activas durante períodos muy largos? ¿Podría la transferencia genética no viral y no integrativa ser útil para aplicaciones particulares de la terapia génica que necesitan de la expresión de un transgén a mediano plazo?

El mensaje más positivo que emerge de este trabajo es que la configuración tridimensional es la principal responsable de la expresión génica a largo plazo. Los esferoides multicelulares tumorales, que reflejan más estrechamente a los tumores sólidos y micrometástasis *in vivo*, constituyen un modelo experimental realista para investigar muchos de los aspectos de la biología tumoral. Por lo tanto es plausible especular que la expresión alta y persistente de un transgén puede ser lograda por medio de transferencia genética no viral en tumores *in vivo*. Esto fue confirmado por el hecho de que cinco líneas celulares con pocos repiques en cultivo derivadas de melanomas caninos espontáneos formaron esferoides que expresaron pCMV β 3 a 6 veces más eficientemente que sus respectivas monocapas durante los primeros 15 días post-lipofección transitoria (datos no mostrados). Contrariamente, resultados preliminares sugieren que el incremento en la expresión observado en esferoides tumorales no ocurrió en la línea celular no tumoral VERO, de riñón de mono [ATCC #CCL 81], que mostró niveles de actividad β gal similares en esferoides y en monocapas (19.5 ± 3.3 y 25.3 ± 4.5 mU/mg proteína, respectivamente, n=13) durante los primeros 15 días post-lipofección transitoria.

Por otra parte, este trabajo demuestra por primera vez que las células transfectadas con HSVtk y cultivadas en esferoides presentan un fenotipo

relativamente resistente al GCV al compararlas con las mismas células creciendo en monocapas. Sin embargo, a pesar de la resistencia relativa de los cultivos tridimensionales al sistema HSVtk/GCV con respecto a sus respectivas monocapas, en las tres líneas celulares evaluadas los esferoides transfectados con HSVtk fueron significativamente más sensibles al GCV que sus contrapartes transfectadas con β gal, lo que apoya la factibilidad de esta estrategia suicida *in vivo*.

Esta resistencia ocurre a pesar de la mayor expresión de transgenes observada en esferoides y no parece ser consecuencia directa de una baja penetración del GCV al interior de los esferoides, sino de otros mecanismos que darían lugar a un menor efecto *bystander*. La resistencia relativa de los esferoides al GCV dependería de: (i) el origen de las células tumorales; (ii) la eficiencia de la transferencia genética y de la expresión del transgén HSVtk; (iii) el estado proliferativo de las células de los esferoides; (iv) la comunicación vía uniones *gap*; y (v) los cambios en el reostato intracelular Bax/Bcl-xL de la apoptosis mediada por mitocondrias.

Estudios posteriores de los mecanismos moleculares y mediadores intercelulares que podrían involucrar sensibilidad o resistencia a la citotoxicidad inducida por HSVtk/GCV, como (i) expulsión activa de GCV mediante mecanismos celulares específicos (como la resistencia a multidrogas), (ii) privación transitoria de oxígeno y/o nutrientes, que lleva a apoptosis tardía [84] y (iii) desarrollo de una nueva forma de resistencia a la muerte conocida como *resistencia multicelular* (MCR), exclusiva de las estructuras tridimensionales [5], son imperativos para resolver este rompecabezas.

Los esferoides de la línea celular LM05e constituyen un modelo de estudio muy interesante ya que son considerablemente sensibles al sistema HSVtk/GCV a pesar de tener una muy baja tasa de crecimiento. Los altos niveles de expresión de transgenes de estos esferoides podrían contrarrestar parcialmente esta baja tasa de replicación. Pero el posible pasaje de GCV fosforilado de una célula a otra no puede explicar por sí mismo la muerte de una alta proporción de células no replicativas, ya que se supone que el mecanismo del GCV necesita de la replicación del ADN [80,85,86]. Entonces, la efectividad del efecto *bystander* en el sistema HSVtk/GCV podría no estar restringida a su capacidad de matar células en división activa y sugiere la participación de mediadores adicionales de muerte celular. Otros factores solubles liberados al espacio extracelular o pequeñas moléculas proapoptóticas (<1000 Da) que difunden o que se transfieren a través de uniones *gap* desde células moribundas a células vecinas, podrían estar involucrados en el efecto *bystander* [82,87,88]. Se ha informado que las

mitocondrias son amplificadores de la apoptosis inducida por HSVtk/GCV, por regulación tanto de la fase de iniciación como la fase efectora de la apoptosis [81,82]. Los radicales libres mitocondriales, como los radicales del oxígeno altamente reactivos o el óxido nítrico, podrían eventualmente difundir o pasar a células tumorales adyacentes no modificadas, produciendo daño oxidativo [82,87]. Estos eventos llevarían a mecanismos de amplificación en los que sólo unas pocas células que expresan HSVtk podrían destruir el esferoide completo, sugiriendo la factibilidad del sistema HSVtk/GCV para algunos tumores *in vivo* de lento crecimiento.

Es sumamente interesante notar que la sensibilidad de los esferoides al sistema HSVtk/GCV es muy similar a la de los tumores *in vivo*. El tratamiento con GCV 10 µg/ml reduce el tamaño de los tumores LM3 y B16 (generados por inyección subcutánea de células en ratones Balb/c y C57, respectivamente) en un 60-70%. El porcentaje de muerte celular por tratamiento de esferoides de las mismas líneas celulares, transfectados con HSVtk e incubados con GCV 10 µg/m, fue el mismo.

En conjunto, nuestros datos sugieren que la sensibilidad *in vitro* al GCV y el efecto *bystander* de células lipofectadas transitoriamente con el gen HSVtk es inherente a cada tumor individual; y que los resultados obtenidos en cultivos en monocapas pueden no predecir el éxito del tratamiento. Entonces, la evaluación del tratamiento HSVtk/GCV puede requerir muestras de cada tumor cultivadas como esferoides, que representan más cercanamente la situación *in vivo*. La relevancia biológica y clínica de estas observaciones queda por ser determinada. Por lo tanto, el próximo paso es evaluar cuán generalizable es este efecto en células humanas tumorales y no tumorales de varias histologías.

Si la expresión aumentada y persistente de un transgén es característica de los esferoides tumorales, la posibilidad de una terapia génica dirigida en la que las células tumorales expresan niveles más altos del gen introducido que el tejido normal queda abierta. Además, si luego de la transferencia genética ocurre un evento de integración de baja probabilidad, éste no contribuiría significativamente en la expresión del transgén.

La expresión eficiente, específica de tejido y a largo plazo es uno de los principales objetivos en el desarrollo de nuevas estrategias en terapia génica. Todas estas observaciones alientan la implementación de estrategias no virales para la introducción de genes terapéuticos en tumores, en las que se requiere la expresión alta y duradera de un gen.

CONCLUSIONES

A modo de resumen, a partir de todo expuesto en el presente trabajo se puede concluir que:

- Las características generales de los esferoides en cuanto a morfología, metabolismo y crecimiento son muy variables, dependen estrechamente de la línea celular a la que pertenecen y se asemejan a los tumores *in vivo* de los que derivan.
- Los esferoides expresan transgenes lipofectados mucho más eficientemente que sus respectivas monocapas.
- La expresión de transgenes en esferoides decae más lentamente que la de monocapas, independientemente del plásmido utilizado, y persiste durante más de 75 días con niveles significativos.
- El efecto intensificador de la expresión observado en esferoides es máximo cuando el transgén se encuentra dirigido por el promotor CMVie.
- El agregado de las secuencias EBNA-1 y *oriP* de EBV en el vector aumenta la expresión del transgén sólo en células humanas HEp-2.
- La delección de 325 pb del extremo 5' del promotor CMVie inhibe más de un 95% la expresión del transgén, y su reemplazo por 4 secuencias de unión a myc-max (67 bp) o por una secuencia consenso KCS (18 bp) la restaura parcialmente (hasta 60% y 25% respectivamente).
- Los niveles de expresión de los distintos plásmidos en esferoides tienden a confluir a partir de los 30 días post-transfección.
- El aumento en la expresión se revierte cuando los esferoides son desensamblados y transformados en monocapas, lo que confirma que dicho aumento depende estrictamente de la configuración espacial.
- El aumento en la expresión no es consecuencia de la integración de los vectores en el genoma celular. Los mismos persisten en forma episomal.
- En el caso de células transfectadas establemente, el efecto de la configuración tridimensional del cultivo es opuesto al observado en transfecciones transitorias: la expresión en esferoides es menor que la de monocapas y cae rápidamente.
- Los esferoides transfectados con HSVtk son significativamente más sensibles al GCV que sus contrapartes transfectadas con β gal, lo que apoya la factibilidad de esta estrategia suicida *in vivo*.
- El tratamiento con el sistema HSVtk/GCV disminuye el tamaño de los esferoides, lo que concuerda con el hecho de que las células proliferativamente activas se encuentran en las capas más externas.

- Los esferoides son entre 3 y 16 veces menos sensibles al sistema HSV tk /GCV que sus respectivas monocapas, y presentan un menor efecto bystander.
- Los esferoides de las tres líneas evaluadas muestran sensibilidades similares al GCV 10 μ g/ml, a pesar de sus diferentes comportamientos en monocapas.
- Los esferoides con baja tasa de replicación celular muestran un efecto *bystander* mayor a lo esperado, indicando la participación de elementos adicionales en la propagación de la muerte celular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Santini MT, Rainaldi G. Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology*. 1999; 67:148-157.
2. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science*. 1998; 240:177-184.
3. Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst*. 1971; 46:113-120.
4. Hamilton G. Multicellular spheroids as in vitro tumor model. *Cancer Lett*. 1998; 131(1):29-34.
5. Desoize B, Jardillier JC. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000, 36:193-207.
6. Mueller-Klieser W. Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol*. 1997; 273:C1109-C1123.
7. Dangles V, Lazar V, Validire P et al. Gene expression profiles of bladder cancers: evidence for a striking effect of in vitro cell models on gene patterns. *Br J Cancer*. 2002; 86:1283-1289.
8. Conger AD, Ziskin MC. Growth of mammalian multicellular tumor spheroids. *Cancer Res*. 1983; 43:556-560.
9. Sharom FJ. The P-Glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? *J Membrane Biol*. 1997; 160:161-175.
10. St Croix B, Man S, Kerbel RS. Reversal of intrinsic and acquired forms of drug resistance by hyaluronidase treatment of solid tumors. *Cancer Lett*. 1998; 131:35-44.
11. Pedro D, Beltran PJ, Wang YF et al. Cell density-dependent regulation of *mdr-1* gene expression in murine colon cancer cells. *Int J Oncol*. 1996; 9:865-878.
12. Sakata K, Kwok TT, Gordon G et al. Resistance to verapamil sensitization of multidrug-resistant cells grown as multicellular spheroids. *Int J Cancer*. 1994; 59:282-286.
13. Kerbel RS. Impact of multicellular resistance on the survival of solid tumors, including micrometastases. *Invasion Metastasis*. 1994; 14:50-60.
14. Huang YW, Baluna R, Vitetta ES. Adhesion molecules as targets for cancer therapy. *Histol Histopathol*. 1997; 12:467-477.

15. Mansbridge JN, Knuchel R, Knapp MA, Sutherland RM. Modulation of EGF signal transduction by cell-cell contacts and microenvironment: Involvement of tyrosine phosphatases. *J Cell Physiol.* 1992; 151:433-442.
16. Santini MT, Rainaldi G, Indovina PL. Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000; 36:75-87.
17. Sutherland RM et al. Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. *Cancer Res.* 1986; 46:5320-5329.
18. Bates RC, Edwards NS, Yates JD. Spheroids and cell survival. *Critical Rev. Oncol Hematol.* 2000; 36:61-74.
19. Ben Ze'ev A, Farmer SR, Penman S. Protein synthesis requires cell-surface contact while nuclear events respond to cell shape in anchorage-dependent fibroblasts. *Cell.* 1980; 21:365-372.
20. Mueller-Klieser W. Tumor biology and experimental therapeutics. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000; 36:123-139.
21. Fracasso G, Colombatti M. Effect of therapeutic macromolecules in spheroids. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000; 36:159-178.
22. Lund-Johansen M, Forsberg K, Bjerkvig R, Laerum OD. Effects of growth factors on a human glioma cell line during invasion into rat brain aggregates in culture. *Acta Neuropathol.* 1992; 84:190-197.
23. Offner FA, Wirtz HC, Schiefer J et al. Interaction of human malignant melanoma (ST-ML-12) tumor spheroids with endothelial cell monolayers. *Am J Pathol.* 1992; 141:601-610.
24. Zwi LJ, Baguley BC, Gavin JB, Wilson WR. The use of vascularised spheroids to investigate the action of flavone acetic acid on tumour blood vessels. *Br J Cancer.* 1990; 62:231-237.
25. Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R. The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. *J Biomol Screen.* 2004; 9:273-285.
26. Borgstrom P, Hughes GK, Hansell P et al. Leukocyte adhesion in angiogenic blood vessels. Role of E-selectin, P-selectin, and beta2 integrin in lymphotoxine-mediated leukocyte recruitment in tumor microvessels. *J Clin Invest.* 1997; 99:2246-2253.

27. Stuschke M, Budach V, Sack H. Radioresponsiveness of human glioma, sarcoma, and breast cancer spheroids depends on tumor differentiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1993; 27:627-636.
28. Djordjevic B, Lange CS, Rotman MZ et al. Increasing radiosensitivity in the course of fractionated X irradiation: the effect of dead and dying cells. *Radiat Res.* 1998; 150:275-282.
29. Gottesman M. Cancer gene therapy: an awkward adolescence. *Cancer Gene Ther.* 2003; 10:501-508.
30. Oldfield EH, Ram Z, Culver KW et al. Gene therapy for the treatment of brain tumors using intra-tumoral transduction with the thymidine kinase gene and intravenous ganciclovir. *Hum Gene Ther.* 1993; 4:39-69.
31. Culver KW, Ram Z, Wallbridge S et al. In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science.* 1992; 256:1550-1552.
32. Bi WL, Parysek LM, Warnick R, Stambrook PJ. *In vitro* evidence that metabolic co-operation is responsible for the bystander effect observed with HSVtk retroviral gene therapy. *Human Gene Ther.* 1993; 4: 725-731.
33. Hamel W, Magnelli L, Chiarugi VP, Israel MA. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells. *Cancer Res.* 1996; 56:2697-27
34. Vrionis FD, Wu JK, Qi P et al. The bystander effect exerted by tumor cells expressing the herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tk) gene is dependent on connexin expression and cell communication via gap junctions. *Gene Ther.* 1997; 4:577-585.
35. Freeman SM, Ramesh R, Munshi A et al. In situ use of suicide genes for cancer therapy. In *Gene therapy of cancer* (1999), Academic Press, 155-176.
36. Ramesh R, Marrogi AJ, Munshi A et al. In vivo analysis of the "bystander effect": a cytokine cascade. *Exp Hematol.* 1996; 24:829-838.
37. Martin LA, Lemoine NR. Direct cell killing by suicide genes. *Cancer Metastasis Rev.* 1996; 15: 301-316.
38. Cooper M. Non-infectious gene transfer and expression systems for cancer gene therapy. In *Gene therapy of cancer* (1999), Academic Press, 77-94.

39. Felgner PL, Ringold GM. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature*. 1989; 337: 387-388.
40. Gao X, Huang L. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther*. 1995; 2:710-722.
41. Mountain A. Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol*. 2000; 18:119-128.
42. Saeki Y, Wataya-Kaneda K, Tanaka K, Kaneda Y. Sustained transgene expression in vitro and in vivo using an Epstein-Barr virus replicon vector system combined with HVJ liposomes. *Gene Therapy*. 1998; 5:1031-1037.
43. Scimmenti CR, Calos MP. Epstein-Barr virus vectors for gene expression and transfer. *Curr Opin Biotech*. 1998; 9:476-479.
44. Van Craenenbroeck K, Vanhoenacker P, Haegeman G. Episomal vectors for gene expression in mammalian cells. *Eur J Biochem*. 2000; 267:5665-2678.
45. Yates JL, Warren N, Sugden B. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*. 1985; 313:812-815.
46. Tomiyasu K, Satoh E, Oda Y *et al*. Gene transfer in vitro and in vivo with Epstein-Barr virus-based episomal vector results in markedly high transient expression in rodent cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 253: 733-738.
47. Lindenboim L, Anderson D, Stein R. The use of Epstein-Barr virus-based shuttle vectors in rat PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol*. 1997; 17:119-127.
48. Mizuguchi H, Hosono T, Hayakawa T. Long-term replication of Epstein-Barr virus-derived episomal vectors in the rodent cells. *FEBS Lett*. 2000; 472:173-178.
49. Kaneda Y, Saeki Y, Nakabayashi M *et al*. Enhancement of transgene expression by cotransfection of OriP plasmid with EBNA-1 expression vector. *Hum Gene Ther*. 2000; 11:471-479.
50. Lei DC, Kunzelmann K, Koslowsky T *et al*. Episomal expression of wild-type CFTR corrects cAMP-dependent chloride transport in respiratory epithelial cells. *Gene Ther*. 1996; 3: 427-36.
51. Tu G, Kirchmaier AL, Liggitt D *et al*. Non-replicating Epstein-Barr virus-based plasmids extend gene expression and can improve gene therapy *in vivo*. *J Biol Chem*. 2000; 39:30408-16.

52. Tsukamoto H, Wells DJ, Brown SC *et al.* Enhanced expression of recombinant dystrophin following intramuscular injection of Epstein-Barr virus (EBV)-based mini-chromosome vectors in mdx mice. *Gene Ther.* 1999; 6:1331-1335.
53. Mücke S, Polack A, Pawlita M *et al.* Suitability of Epstein-Barr virus-based episomal vectors for expression of cytokine genes in human lymphoma cells. *Gene Ther.* 1997; 4:82-92.
54. Yew NS, Marshall J, Przybylska M. Increased duration of transgene expression in the lung with plasmid DNA vectors harboring Adenovirus E4 open reading frame 3. *Hum Gene Ther.* 1999; 10:1833-1843.
55. Lusky M, Grave L, Dieterlé A *et al.* Regulation of Adenovirus-mediated transgene expression by the viral E4 gene products: requirement for E4 ORF3. *J Virol.* 1999; 73:8308-8319.
56. Lamfers ML, Hemminki A. Multicellular tumor spheroids in gene therapy and oncolytic virus therapy. *Curr Opin Mol Ther.* 2004; 6:403-411.
57. Grill J, Lamfers ML, van Beusechem VW *et al.* The organotypic multicellular spheroid is a relevant three-dimensional model to study adenovirus replication and penetration in human tumors in vitro. *Mol Ther.* 2002; 6:609-614.
58. Enger PO, Thorsen F, Lonning PE *et al.* Adeno-associated viral vectors penetrate human solid tumor tissue in vivo more effectively than adenoviral vectors. *Hum Gene Ther.* 2002; 13:1115-1125.
59. Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T *et al.* A retroviral wild-type p53 expression vector penetrates human lung cancer spheroids and inhibits growth by inducing apoptosis. *Cancer Res.* 1993; 53: 4129-4133.
60. Mohanam S, Chintala SK, Go Y *et al.* In vitro inhibition of human glioblastoma cell line invasiveness by antisense uPA receptor. *Oncogene.* 1997; 14:1351-1359.
61. Tupper J, Greco O, Tozer GM. Analysis of the horseradish peroxidase/indole-3-acetic acid combination in a three-dimensional tumor model. *Cancer Gene Ther.* 2004; 11:508-513.
62. Mitrofanova E, Hagan C, Qi J *et al.* Sodium iodide symporter/radioactive iodine system has more efficient antitumor effect in three-dimensional spheroids. *Anticancer Res.* 2003; 23:2397-2404.

63. Karara AL, Bumashny VF, Fiszman GL *et al.* Lipofection of early passages of cell cultures derived from murine adenocarcinomas: *in vitro* and *ex vivo* testing of the thymidine kinase/ganciclovir system. *Cancer Gene Ther.* 2001; 8:96-99.
64. Finocchiaro, LME, Bumashny VF, Karara AL *et al.* Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in multicellular tumor spheroids. *Cancer Gene Ther.* 2004; 11:333-345.
65. Finocchiaro LME, Glikin GC. Intracellular melatonin distribution in cultured cell lines. *J Pineal Res.* 1998; 24:22-34.
66. Dolbeare F, Gray JW. Use of restriction endonucleases and exonuclease III to expose halogenated pyrimidines for immunochemical staining. *Cytometry.* 1988; 9:631-635.
67. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-254.
68. MacGregor GR, Caskey T. Construction of plasmids that express E coli β -galactosidase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17:2365-2365.
69. Hall CV, Jacob PE, Ringold GM, Lee F. Expression and regulation of Escherichia coli *lacZ* gene fusions in mammalian cells. *J Mol Appl Genet.* 1983; 2(1):101-109.
70. Sugaya S, Fujita K, Kikuchi A *et al.* Inhibition of tumor growth by direct intratumoral gene transfer of herpes simplex virus thymidine kinase gene with DNA-liposome complex. *Hum Gene Ther.* 1996; 7:223-230.
71. Kuhen KL, Vessey JW, Samuel CE. Mechanism of interferon action: identification of essential positions within the novel 15-base-pair KCS element required for transcriptional activation of the RNA-dependent protein kinase *pkp* gene. *J Virology.* 1998; 72:9934-9939.
72. Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, *et al.* Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem.* 1994; 269:2550-2561.
73. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular Cloning, a laboratory manual. 1982; Cold Spring Harbor Laboratory, 280-281.
74. Hirt B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol.* 1967; 26:365-369.

75. Ballangrud AM, Yang WH, Dnistrian A *et al.* Growth and characterization of LNCaP prostate cancer cell spheroids. *Clin Cancer Res.* 1999; 5:3171s-3176s.
76. Klunder I, Hulser DF. Beta-galactosidase activity in transfected *Ltk*-cells is differentially regulated in monolayer and in spheroid cultures. *Exp Cell Res.* 1993; 207:155-162.
77. Elion GB, Furman PA, Fyfe JA *et al.* Selectivity of action of an antiherpetic agent 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977; 74:5716-5720.
78. Elion GB. The chemotherapeutic exploitation of virus-specified enzymes. *Adv Enzyme Regul.* 1980; 18:53-60.
79. Yang L, Chiang Y, Lenz HJ *et al.* Intracellular communication mediates the bystander effect during herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir-based gene therapy of human gastrointestinal tumor cells. *Hum Gene Ther.* 1998; 9:719-728.
80. Tomicic MT, Thust R, Kaina B. Ganciclovir-induced apoptosis in HSV-1 thymidine kinase expressing cells: critical role of DNA breaks, Bcl-2 decline and caspase-9 activation. *Oncogene.* 2002; 21:2141-2153.
81. Craperi D, Vicat JM, Nissou MF *et al.* Increased bax expression is associated with cell death induced by ganciclovir in a herpes thymidine kinase gene-expressing glioma cell line. *Hum Gene Ther.* 1999; 10:679-688.
82. Beltinger C, Fulda S, Kammertoens T *et al.* Mitochondrial amplification of death signals determines thymidine kinase/ganciclovir-triggered activation of apoptosis. *Cancer Res.* 2000; 60: 3212-3217.
83. Sutherland R, Buchegger F, Schreyer M *et al.* Penetration and binding of radiolabeled anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibodies and their antigen binding fragments in human colon multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 1987; 47:1627-1633.
84. Jacobson MD, Raff MC. Programmed cell death and bcl-2 protection by very low oxygen. *Nature.* 1995; 374: 814-816.
85. Moolten FL. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer strategy. *Cancer Res.* 1986; 46:5276-5281.
86. Pope IM, Poston GJ, Kinsella AR. The role of the bystander effect in suicide gene therapy. *Eur J Cancer.* 1997; 33:1005-1016.

87. Herdener M, Heigold S, Saran M, Bauer G. Target cell-derived superoxide anions cause efficiency and selectivity of intercellular induction of apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29:1260-1271.

88. Kolchinsky A, Roninson I.B. Drug resistance conferred by MDR-1 expression in spheroids formed by glioblastoma cell lines. *Anticancer Res.* 1997; 17:3321-3328.