



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

# **Potencial terapéutico de la terapia génica combinada con bleomicina para el tratamiento del melanoma**

**Tesis presentada para optar al Título de Doctor de la Universidad  
de Buenos Aires en el Área Química Biológica**

Lic. Chiara Fondello

**Director de Tesis:** Dra. Liliana M. E. Finocchiaro

**Consejero de estudios:** Dr. Juan Carlos Calvo

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

Buenos Aires, 2017

Fecha de defensa: 16/03/2017

## Potencial terapéutico de la terapia génica combinada con bleomicina para el tratamiento del melanoma

El melanoma es una forma de cáncer de piel extremadamente agresiva cuya incidencia continúa en aumento. Se establecieron y caracterizaron tres líneas celulares de melanoma humano. También, se utilizaron ocho líneas de melanoma canino, y dos de melanoma felino, derivadas de tumores de pacientes de nuestros protocolos clínicos veterinarios. A pesar de la heterogeneidad y plasticidad típicas del melanoma, todas las líneas evaluadas fueron sensibles a la bleomicina (BLM) co-administrada durante la transferencia del gen suicida (GS) o del gen del interferón- $\beta$  ( $IFN\beta$ ). La magnitud de la respuesta a la terapia génica con  $IFN\beta$  o GS no se vio limitada por la eficiencia de lipofección debido a un amplio efecto *bystander*. Se halló una correlación significativa entre el efecto citotóxico de la quimio-genoterapia y la fracción celular exhibiendo DNA subdiploide, altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) y pérdida del potencial mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ). Estos datos sugieren que la quimio-genoterapia induce una apoptosis/necrosis dependiente de la mitocondria.

Durante el tratamiento de pacientes veterinarios con GS, se observaron aumentos transitorios del tamaño tumoral (pseudo-progresión) resultando, finalmente, en la reducción o estabilización tumoral. El índice proliferativo (IP, fracción de células en fases S, G<sub>2</sub>/M e hiperdiploide) podría reflejar la respuesta de las células tumorales. La respuesta al GS *in vivo* e *in vitro* correlacionó con el incremento del IP debido al GS (IP<sub>GS</sub>) de las líneas celulares derivadas de los tumores. Esto último, sumado a la disminución en la capacidad de formar colonias y melanoesferas, sugiere que la expresión sostenida de  $IFN\beta$  y GS en combinación con BLM, reduce la fracción de células iniciadoras de tumor (TIC), al inducir una constante proliferación de las mismas. Todos estos resultados permiten vislumbrar el potencial clínico de esta estrategia.

**Palabras clave:** gen suicida, interferón- $\beta$ , terapia génica, bleomicina, melanoma.

## Therapeutic potential of gene therapy in combination with bleomycin for melanoma treatment

Malignant melanoma is an extremely aggressive cancer whose incidence increase worldwide. We established and characterized three human melanoma cell lines. We also used eight canine and two feline melanoma cell lines derived from tumors from patients of our veterinary clinical trials. Even though the melanoma displays typical heterogeneity, all the cell lines were sensitive to bleomycin (BLM) co-administrated with suicide- (SG) or interferon- $\beta$  gene (*IFN $\beta$* ) transfer. Because of the bystander effect, the response magnitude of suicide- (SG) or interferon- $\beta$  gene therapy was not limited by lipofection efficiency. A significant correlation was found between the cytotoxic effect of BLM and both genetic treatments and the fraction of cells exhibiting hypodiploid DNA content, high ROS levels and mitochondria membrane depolarization. These results suggest that these chemo-genetic treatments induced a mitochondria-dependent apoptosis/necrosis.

During SG treatment of melanoma canine patients, we observed transient increases of tumor size (pseudo-progression) that finally resolved as tumor reduction. The proliferative index (IP, fraction of cells in S, G<sub>2</sub>/M and hiperdiploid phase) might reflect tumor cell response. The *in vivo* and *in vitro* GS response correlated with IP increment (IP<sub>GS</sub>) caused by GS treatment of the tumor derived cell lines. These results, and the significant reduction in the colony- and sphere-forming capacity, suggest that BLM and the sustained expression of *IFN $\beta$*  and SG, reduced the melanoma TIC compartment, by promoting long term TIC self-renewal repopulating activity. All these data support the clinical potential of this strategy.

**Key words:** suicide gene, interferon- $\beta$ , gene therapy, bleomycin, melanoma.

## ABREVIATURAS Y GLOSARIO

**ATM:** ataxia telangiectasia mutada  
**ATR:** ataxia telangiectasia asociada a Rad3  
**BLM/IC<sub>50</sub>:** dosis inhibitoria 50 de la BLM  
**BLM:** bleomicina  
**CAT:** catalasa  
**CD:** citosina deaminasa  
**CIT:** células iniciadoras de tumor  
**Ck:** citoqueratina  
**CMV:** promotor del Cito Megalo virus  
**CSC:** célula madre tumoral  
**ctl:** células control sin lipofectar  
**DNA:** ácido desoxirribonucleico  
**DSB:** corte doble cadena  
**EP:** epiteliode  
**esf:** esferoides  
**FB:** fibroblastoide  
**FDA:** *Food and Drug Administration, USA*  
**Foxo1/3/4:** *forkhead box O 1/3/4*  
**GCV:** ganciclovir  
**Gm:** intensidad media de fluorescencia  
**GM-CSF:** factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos  
**GPx:** glutatión peroxidasa  
**GR:** glutatión reductasa  
**GS:** Sistema del gen suicida / prodroga  
**GSH:** glutatión  
**GST:** glutatión S-transferasa  
**HSC:** células madre hematopoyéticas  
**HSVtk:** timidina quinasa del virus herpes *simplex*  
**IC<sub>50</sub>:** concentración inhibitoria 50  
**IFNs:** interferones  
**IFN $\alpha$ :** interferón-alfa  
**IFN $\beta$ :** interferón-beta  
**IL-2:** interleuquina 2  
**IP:** índice proliferativo - fracción celular en fases S, G<sub>2</sub>/M e hiperdiploide  
**IP<sub>ctl</sub>:** índice proliferativo de las células controles  
**IP<sub>GS</sub>:** índice proliferativo de las células *in vitro* tratadas con GS/GCV  
**IPr:** yoduro de propidio  
**Lipofección:** transferencia de ácidos nucleicos mediada por liposomas  
**Lipoplexes:** complejos liposomas/DNA  
**L-NAC:** L-acetil-n-cisteína  
**MyM:** Materiales y Métodos

**MAA:** antígenos asociados a melanoma  
**MAPK:** quinasas de proteínas activadas por mitógenos  
**mc:** monocapas  
**MCR:** resistencia multicelular  
**MCTS:** esferoides tumorales multicelulares  
**ME:** melanoesferas  
**MEMC:** melanoma espontáneo mucoso canino  
**MHC:** complejo mayor de histocompatibilidad  
**MMP:** metaloproteínasa de la matriz extra-celular  
**mts:** metástasis  
**NA/BE:** naranja de acridina/bromuro de etidio  
**NK:** células *natural killer* (células asesinas naturales)  
**NL:** nodo linfático  
**NOX:** NADPH oxidasa  
**NPC:** células madre neurales  
**OMS:** Organización Mundial de la Salud  
**PCNA:** antígeno nuclear de proliferación celular  
**PI3K:** fosfatidilinositol-3-kinasa  
**RNA:** ácido ribonucleico  
**RNAsa:** ribonucleasa  
**RGP:** fase de crecimiento radial  
**ROS:** especies reactivas del oxígeno  
**SCID-XI:** inmunodeficiencia combinada severa  
**SFB:** suero fetal bovino  
**siRNA:** pequeños RNA de interferencia  
**SOD:** superóxido dismutasa  
**SPF:** fracción celular en fase S  
**TCGA:** Atlas del Genoma del Cáncer  
**TD:** tiempo de duplicación  
**TRX:** tioredoxina  
**VEGF:** factor de crecimiento vascular endotelial  
**VGP:** fase de crecimiento vertical  
**wt:** *wild type*: natural, no mutado  
**βgal AS:** actividad de la β-galactosidasa asociada a la senescencia  
**βgal:** β-galactosidasa  
**Δψm:** potencial de membrana mitocondrial

**hM1, hM2, hM4:** líneas celulares de melanoma humano

**Ai, Ov, Bk, Rk, Br, Lo, BI y BI:** líneas celulares de melanoma mucoso canino

**Dc y Rn:** líneas celulares de melanoma mucoso felino

## **Agradecimientos**

A mi Directora, Liliana, por dirigirme y darme la oportunidad de formar parte de la gran familia de UTG. Por buscar expandir mi mirada y darme la libertad para expresarme como soy.

A mi co-director, Gerardo, por su enfoque objetivo y sus charlas.

A mi Consejero de estudios, Juan Carlos, por ser positivo y guiarme a lo largo de todo el doctorado.

A Marce, por ser una especie de hermana mayor. Por tomarse el tiempo para enseñarme y marcarme el camino. Por su cariño. Por sus consejos laborales y de la vida.

A Lucre, por ser mi amiga y compañera de aventuras en los últimos tres años. Por ayudarme, por escuchar, por bancarme.

A Flor, por renovar las ganas de aprender. Por su paciencia para explicar. Por su compañía.

A Doris y Gra, por acompañarme todos los días. A Gra, por su empuje y su apoyo incondicional. A Doris, por ser mi compañera de risas, y por educarme en asuntos académicos, y otros no tan académicos.

A Norbert, por enseñarme. Por su admirable pedagogía y su enorme paciencia. Por su cariño.

A Lour, Ursu y Jesi, por las experiencias compartidas en los años compartidos.

A Gabi y Anita, por su ayuda en el trabajo cotidiano.

A Denu y Yani, por su cariño y por salvarme en más de una ocasión.

A los becarios, directores y a todo el personal del Área de Investigación del Instituto Roffo, por brindarme ayuda siempre que la precisé.

Al Instituto Roffo, por abrirme las puertas y dejarme formar parte de esta institución.

A CONICET, Agencia, ANPCYT/FONCYT y UBA, por financiar este trabajo.

A mis amigas de la vida, Nini, Anto, Agus, Mer, Juli, Lola, Celes, Lu, Mad, Noe y Pilu, por acompañarme en las buenas y en las malas. Por las risas y lágrimas compartidas.

A mis amigos de la facu, Xime, Mati, Juan, Estefi, Euge y Dani, por llenar mis años como estudiante de colores y buenos momentos. Por las risas compartidas.

A mi familia, mamá, papá y Lu por su indescriptible inmenso amor. No tengo palabras. Por estar siempre. Por creer en mí. Por apoyarme. Por ayudarme a ser la persona que soy. Por bancarme en estos 29 años.

A Cris, por su amor inmenso e incondicional. Por quererme como soy. Por su apoyo. Por su fe en mí. Por su paciencia gigante, en especial en este último año.

A Valentina y Juana, mis perras, que me enseñaron la inmensidad del amor canino. A Valentina, por guiarme hacia el grupo de trabajo con el cual daría los primeros pasos en investigación.

A la vida.

# Índice

## Índice

Introducción .....	10
El Melanoma .....	11
BRAF .....	12
Melanoma espontáneo canino mucoso (MECM) .....	13
Heterogeneidad fenotípica .....	13
Las células madre tumorales (CSC).....	14
Dinámica de los niveles de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en la homeostasis de las células madre tumorales.....	14
Índice de proliferación .....	16
Terapia génica del cáncer .....	17
Vectores utilizados en terapia génica .....	18
Los liposomas catiónicos .....	19
El melanoma es muy susceptible al IFN $\alpha/\beta$ .....	19
El potente efecto antitumoral de la terapia génica con el gen IFN $\beta$ .....	20
La eficacia antitumoral del sistema del gen suicida .....	20
El efecto <i>bystander</i> , un gran aliado .....	21
Quimio-genoterapia como estrategia .....	22
Las especies reactivas del Oxígeno (ROS).....	22
Las líneas celulares reflejan la respuesta clínica de los respectivos tumores .....	24
Esferoides: mejor modelo predictivo de la respuesta a las terapias de los respectivos tumores .....	24
Cinética del crecimiento de esferoides tumorales.....	25
Alta similitud de respuesta de los esferoides y los tumores <i>in vivo</i> .....	25
Objetivos.....	27
Materiales y Métodos (MyM).....	29
Líneas celulares .....	30
Establecimiento de las líneas celulares humanas.....	30
Cultivo celular.....	30
Tiempo de duplicación .....	30
Inmunocitoquímica .....	30
Detección del estado mutacional de BRAF .....	31
Plásmidos.....	31
Lipofección .....	31
Eficiencia de lipofección .....	32
Viabilidad Celular: actividad fosfatasa ácida citosólica (APH).....	33
Efecto de las lipofecciones sobre la viabilidad celular.....	33
Determinación del efecto de lipofección sobre la dosis inhibitoria 50 (IC <sub>50</sub> ) de bleomicina.....	34
Análisis del ciclo celular por citometría de flujo .....	34
Determinación de la fracción subG <sub>0</sub> .....	34
Determinación del Índice Proliferativo (IP) .....	34
Determinación de cortes doble cadena (DSB) mediante la inmunotinción de $\gamma$ H2AX.....	34
Determinación de los niveles intracelulares de las especies reactivas del oxígeno (ROS).....	35
Determinación del Potencial de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\psi$ m) .....	36



Tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BE).....	37
Determinación de la permeabilidad de membrana por citometría de flujo.....	38
Determinación de la Senescencia precoz .....	38
Ensayo de capacidad clonogénica .....	38
Ensayo de formación de melanosferas (ME) .....	38
Pacientes veterinarios .....	39
Tratamiento .....	39
Análisis estadístico.....	39
Resultados.....	40
Parte I. Caracterización de nuevas líneas de melanoma humano .....	41
Las líneas celulares humanas derivadas de tumores de pacientes presentaron una heterogeneidad considerable .....	42
Las líneas derivadas de melanoma exhibieron diferentes niveles basales intracelulares de ROS .....	42
Las células tumorales en cultivo expresaron marcadores específicos para melanoma .....	43
Las células de melanoma mostraron heterogeneidad morfológica .....	45
La bleomicina potenció el efecto citotóxico de la lipofección del gen interferón beta en las líneas de melanoma humano .....	46
La co-administración de bleomicina aumentó el potencial terapéutico de la genoterapia en todas las líneas celulares de melanoma humano y canino .....	47
Parte II. Mecanismos involucrados en la respuesta celular a la quimio- genoterapia .....	53
La genoterapia indujo efecto <i>bystander</i> en las líneas evaluadas .....	54
La quimio-genoterapia elevó los niveles intracelulares de especies reactivas del oxígeno .....	54
Los antioxidantes no lograron revertir el efecto citotóxico de la combinación BLM/IFN $\beta$ en células de melanoma .....	56
La quimio-genoterapia aumentó la permeabilidad de la membrana mitocondrial .....	57
La quimio-genoterapia causó eventos de apoptosis tardía/necrosis en células de melanoma humano .....	59
Los tratamientos aumentaron la fracción subG $_0$ en las líneas de melanoma .....	61
La quimio-genoterapia aumentó el daño al DNA en las líneas de melanoma .....	63
Los tratamientos, en especial la bleomina, indujeron senescencia precoz en las líneas de melanoma humano .....	64
Las células tumorales sobrevivientes a los tratamientos presentaron menor capacidad clonogénica .....	65
La quimio-genoterapia disminuyó la capacidad de formar melanosferas de las células tumorales sobrevivientes .....	67
Los tratamientos aumentaron el índice proliferativo en las líneas de melanoma humano y canino .....	68
Parte III. El índice de proliferación (IP) como marcador de la respuesta clínica .....	72
La capacidad de crecimiento de los esferoides determinó su sensibilidad a la genoterapia.....	73
La sensibilidad al gen suicida correlacionó con la eficiencia de lipofección de las células .....	76
La respuesta tumoral al tratamiento con el gen suicida fue el resultado del balance entre pseudo-progresión y destrucción tumoral.....	76
El índice proliferativo reflejó la respuesta de las células tumorales <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	77
La sensibilidad al gen suicida de los tumores <i>in vivo</i> correlacionó con la respuesta <i>in vitro</i> de las respectivas líneas celulares derivadas.....	80
Discusión general .....	82
Conclusiones .....	87
Referencias bibliográficas.....	89

# Introducción

## El Melanoma

El melanoma surge a partir de la transformación de los melanocitos, células productoras de melanina, que comparten su origen con las células de la cresta neural y que, durante el desarrollo embrionario, migran hacia la capa basal de la epidermis de la piel (Somasundaram *et al.* 2012). Puede originarse en la piel (melanoma cutáneo), pero también puede comenzar en otros tejidos pigmentados como el ojo o los intestinos (melanoma mucoso).

El melanoma puede originarse de dos maneras. En la mayoría de los casos, se produce por transformación de un nevus benigno que se desarrolla en una lesión displásica, para luego progresar en una fase de crecimiento radial (RGP) y vertical (VGP) (melanoma primario), que puede invadir la dermis, los nodos linfáticos cercanos, y hasta llegar a diseminarse a los órganos distantes, derivando en un melanoma metastásico (Koh 1991; Miller & Mihm 2006). Sin embargo, también existen melanomas que surgen a partir de la transformación directa de células normales de la piel (De Souza *et al.* 2012).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se diagnostican alrededor de 232.000 nuevos casos de melanoma cada año en el mundo. A pesar del progreso en el desarrollo de nuevas terapias dirigidas, en pacientes con enfermedad avanzada, el pronóstico continúa siendo pobre, y la tasa global anual de mortalidad ha llegado al número sin precedentes de 55.000 muertes por año (America Cancer Society 2016). Más aún, se estima que en el 2017 se diagnosticarán cerca de 74.680 nuevos casos de melanoma en EEUU (Siegel *et al.* 2017). En los EEUU, el melanoma representa menos del 1% de todos los cánceres de piel, pero es la principal causa de muerte por cáncer cutáneo. Desde 1996, la tasa anual de incidencia de melanoma aumentó un 2,6 % por año en personas mayores a 50 años (America Cancer Society 2016).

La incidencia del melanoma continúa mundialmente en aumento (Siegel *et al.* 2017). El pronóstico de la enfermedad está definido, en gran medida, por el estadio del melanoma. Estadios avanzados de la enfermedad, asociados con una alta mortalidad, representan una pequeña fracción de casos comparado con los estadios operables tempranos (Gorantla & Kirkwood 2014).

A pesar de que una parte de los melanomas primarios puede ser tratado con éxito (etapas tempranas), la terapia para el melanoma metastásico continúa siendo un desafío (Miller & Mihm 2006; Fecher *et al.* 2007; De Souza *et al.* 2012; Girotti *et al.* 2015). Mientras que la escisión quirúrgica puede curar la enfermedad local, una vez que la metástasis distal ocurre, la supervivencia global media decae drásticamente. El melanoma se encuentra dentro de las principales causas de "cáncer metastásico de primario desconocido", lo cual refleja el rápido crecimiento de lesiones pobremente diferenciadas, originadas de lesiones cutáneas primarias no reconocidas (Chin *et al.* 2006).

El tratamiento del melanoma cambió a partir del 2011, con la aprobación de nuevas terapias inmunes y dirigidas. El anticuerpo monoclonal ipilimumab, inhibidor de un punto de control inmune, y la pequeña molécula vemurafenib, inhibidor de BRAF, fueron las primeras nuevas terapias que lograron mejorar la evolución de los pacientes. Sin embargo, a pesar de estos avances, no todos los pacientes con mutaciones BRAF responden a los inhibidores de BRAF, y la mayoría de los pacientes que sí responde, desarrolla resistencia luego de un periodo corto de control de la enfermedad. Además, solo 15-20% de los pacientes responde a ipilimumab, y, actualmente, no es posible determinar qué pacientes responderán y cuáles no. La toxicidad de estas drogas, también, limita su uso en algunos pacientes (Girotti *et al.* 2014).

Poco después del desarrollo de la lesión inicial, este tumor disemina rápidamente y desarrolla resistencia a las terapias. Esto hace que muchos pacientes sean refractarios a las monoterapias, incluyendo a las nuevas drogas desarrolladas como vemurafenib y dabrafenib (Sullivan *et al.* 2015). Los pacientes con melanoma sometidos a quimioterapia o a terapias dirigidas con pequeños inhibidores que bloquean los oncogenes mutados más frecuentes (BRAFV600E), pueden desarrollar resistencia a las drogas y experimentar recidiva tumoral (Flaherty, Hodi, *et al.* 2010; Flaherty, Puzanov, *et al.* 2010; Villanueva *et al.* 2010; Girotti *et al.* 2015). Existen varios mecanismos descritos para explicar esta resistencia (Johannessen *et al.* 2010; Nazarian *et al.* 2010; Villanueva *et al.* 2013), sin embargo, la recidiva tumoral puede también deberse, por lo menos en parte, a la existencia y al potencial enriquecimiento de subpoblaciones tumorales resistentes a las terapias (Frank *et al.* 2005; Monzani *et al.* 2007; Roesch *et al.* 2010). Como otros tumores, el melanoma es una neoplasia altamente heterogénea, conformada por subpoblaciones de células tumorales con distintos fenotipos moleculares y biológicos (Schatten *et al.* 2008; Zabierowski & Herlyn 2008; Dick 2009; Boiko *et al.* 2010). Estas subpoblaciones proveen las bases celulares para la complejidad biológica de la enfermedad, incluyendo las propiedades de auto-renovación, diferenciación, iniciación, progresión y mantenimiento tumoral y resistencia a drogas.

A pesar de los avances en investigación sobre melanoma y desarrollo de nuevas drogas, entre el 10% y 20% de los pacientes libre de enfermedad, recaen 5-10 años luego del tratamiento inicial. Este fenómeno, que se conoce como *dormancy* (latencia) tumoral (Ossowski & Aguirre-Ghiso 2010), se ha relacionado con la existencia de células resistentes a las terapias con actividades de tipo *stem* (troncal) (Sato *et al.* 2014). La teoría de las células madre tumorales (CSC, *cancer stem cells*) sugiere que unas pocas células tumorales, resistentes a las terapias convencionales, son responsables de la recaída, progresión y aumento en la agresividad tumoral. Sin embargo, en melanoma, la capacidad tumorigénica no estaría restringida a una pequeña subpoblación de células de melanoma, sino que sería compartida entre células fenotípicamente diversas (Quintana *et al.* 2008; Quintana *et al.* 2010). Aún más, la plasticidad y heterogeneidad incrementadas, constituyen un marcador de la malignidad del melanoma, contribuyendo al fracaso de las terapias y a la progresión de la enfermedad (Hendrix *et al.* 2003; Quintana *et al.* 2010; Somasundaram *et al.* 2012). Teniendo en cuenta que las elecciones terapéuticas para melanoma son limitadas y la mayoría de los tratamientos fracasan en lograr una mejora significativa de la calidad de vida y el tiempo de supervivencia (Flaherty 2011; Girotti *et al.* 2014), es necesario descubrir e identificar nuevas terapias.

## **BRAF**

BRAF es un miembro de la vía de las quinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK, *mitogen activated protein kinases*), y está mutada en aproximadamente 50% de los melanomas, siendo una sustitución del ácido glutámico por valina en el codón 600 (V600E), la mutación más frecuente (Fecher *et al.* 2007; Vidwans *et al.* 2011; De Souza *et al.* 2012). Esta mutación, así como la del oncogén NRAS que ocurre en aproximadamente 20% de los melanomas, causa la sobreactivación de la vía MAPK. Además, los melanomas pueden tener alteraciones en genes o proteínas reguladoras del ciclo celular, incluyendo ciclina D1, quinasas dependientes de ciclinas o mutaciones en el proto-oncogén c-KIT (Somasundaram *et al.* 2012). Sin embargo, la transformación maligna de los melanocitos humanos no es consecuencia de la mutación de un único oncogén, sino que son necesarios eventos génicos adicionales (Miller & Mihm 2006; Bloethner *et al.* 2007; De Souza *et al.* 2012).

## Melanoma espontáneo canino mucoso (MECM)

Independientemente de su origen, el melanoma comparte similitudes biológicas en todas las especies. En los perros, los melanomas son frecuentes, siendo localizados en las mismas zonas que en los seres humanos, es decir, la piel, las mucosas, la matriz ungular y los ojos. Presentan comportamientos variables: los tumores en zonas orales son más frecuentes y agresivos que en otras zonas del cuerpo. El melanoma espontáneo canino mucoso (MECM) es un tumor altamente maligno, metastásico y letal que se caracteriza por su rápido crecimiento, invasión local y metástasis temprana.

En perros, los melanomas en la cavidad oral reflejan la evolución y progresión clínica de la enfermedad originada en diversas mucosas en seres humanos, siendo igualmente propensos a la invasión y diseminación (Bergman *et al.* 2003; Prasad *et al.* 2004; Piliang 2011). Al igual que su contraparte humana, los melanomas caninos son resistentes a la quimio y radioterapia (Bergman & Wolchok 2008).

Las similitudes tanto clínicas como histopatológicas del melanoma mucoso humano y canino, plantean la posibilidad de que estudios en perros den paso a la comprensión de la enfermedad en humanos (Simpson *et al.* 2013).

Existen varios estudios que exploraron ensayos clínicos en cáncer canino como modelo preclínico para pacientes humanos (Rusk *et al.* 2006; Finocchiaro *et al.* 2008; Finocchiaro & Glikin 2008; Gordon *et al.* 2009; Finocchiaro *et al.* 2011; Finocchiaro & Glikin 2012; Paoloni & Vail 2013; Finocchiaro *et al.* 2015).

De esta manera, el modelo canino constituye un buen modelo para comprender el melanoma, y potencialmente desarrollar nuevas terapias que podrán aportar un beneficio mutuo a ambas especies.

La alta tasa de mortalidad debido al melanoma y la falta de un tratamiento eficaz, hacen necesario comprender las bases de la enfermedad y buscar nuevas estrategias terapéuticas.

## Heterogeneidad fenotípica

Los análisis genómicos tumorales de la última década, ejemplificados en El Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA), ayudaron a entender la diversidad entre los diferentes tipos de cáncer y entre tumores del mismo tipo de cáncer, pero de distintos pacientes. Cada vez, se hace más evidente que el cáncer es una enfermedad heterogénea con gran diversidad genética, tanto entre pacientes, como entre las células de un mismo tumor (Mroz & Rocco 2016). Existen diversos modelos para explicar esta heterogeneidad fenotípica, siendo algunos compatibles entre sí, y otros, excluyentes. La evolución clonal contribuye a esta heterogeneidad dado que las células cancerosas sufren cambios genéticos irreversibles a lo largo del tiempo, derivando en diferencias fenotípicas y funcionales (Nowell 1976). Por otro lado, el modelo de célula madre tumoral propone que los tumores están organizados jerárquicamente, en donde una pequeña subpoblación de células tumorigénicas genera una progenie diversa y no tumorigénica, de manera semejante a la diferenciación normal de las células madre (Kleinsmith & Pierce 1964; Lapidot *et al.* 1994; Reya *et al.* 2001). Estos modelos no son excluyentes entre sí, ya que se espera evolución clonal en el cáncer que sigue un modelo CSC.

En cambio, según Quintana *et al.* (2010), el melanoma cutáneo primario y metastásico proveniente de pacientes, presenta células tumorigénicas frecuentes y fenotípicamente diversas, que sufren cambios fenotípicos reversibles *in vivo*. La mayor parte de la heterogeneidad fenotípica del melanoma no estaría asociada con una pérdida del potencial tumorigénico ni organizada en jerarquías estables; sino que existiría un modelo de plasticidad fenotípica, donde la heterogeneidad fenotípica estaría dada en gran parte por cambios

reversibles dentro del linaje de las células tumorigénicas, más que por cambios epigenéticos o genéticos irreversibles (Quintana *et al.* 2008; Quintana *et al.* 2010).

Entonces, mientras que la evolución clonal ocurre en muchos tumores, incluyendo el melanoma, y algunos tipos de cáncer siguen un modelo CSC, Quintana *et al.* (2010) plantean la posibilidad de una plasticidad fenotípica generalizada como fuente independiente de heterogeneidad en la mayoría de los melanomas.

## Las células madre tumorales (CSC)

Las células madre tumorales son un subgrupo dentro de las células tumorales, con capacidad de auto-renovación a largo plazo y con potencial de diferenciarse a múltiples linajes celulares. Este subgrupo de CSC exhibe, comúnmente, las siguientes características: (i) capacidad tumorigénica, (ii) responsabilidad de mantener el crecimiento tumoral, (iii) resistencia a la quimio y radioterapia.

Uno de los factores que contribuye al fenotipo de resistencia a drogas de estas células, es el estado de quiescencia o latencia relativo. Muchos tratamientos de quimio o radioterapia matan preferencialmente a las células de rápido crecimiento, las cuales son activas en la replicación del DNA, siendo, entonces, sensibles a los agentes que producen daño al DNA. Entonces, las CSC en estado quiescente, serían menos vulnerables a los agentes que producen daño al DNA, ya que sería improbable que, dicho daño cause eventos catastróficos sin la replicación del DNA. Esta situación daría más tiempo a las CSC para reparar su DNA y mantener su viabilidad (Yang *et al.* 2016).

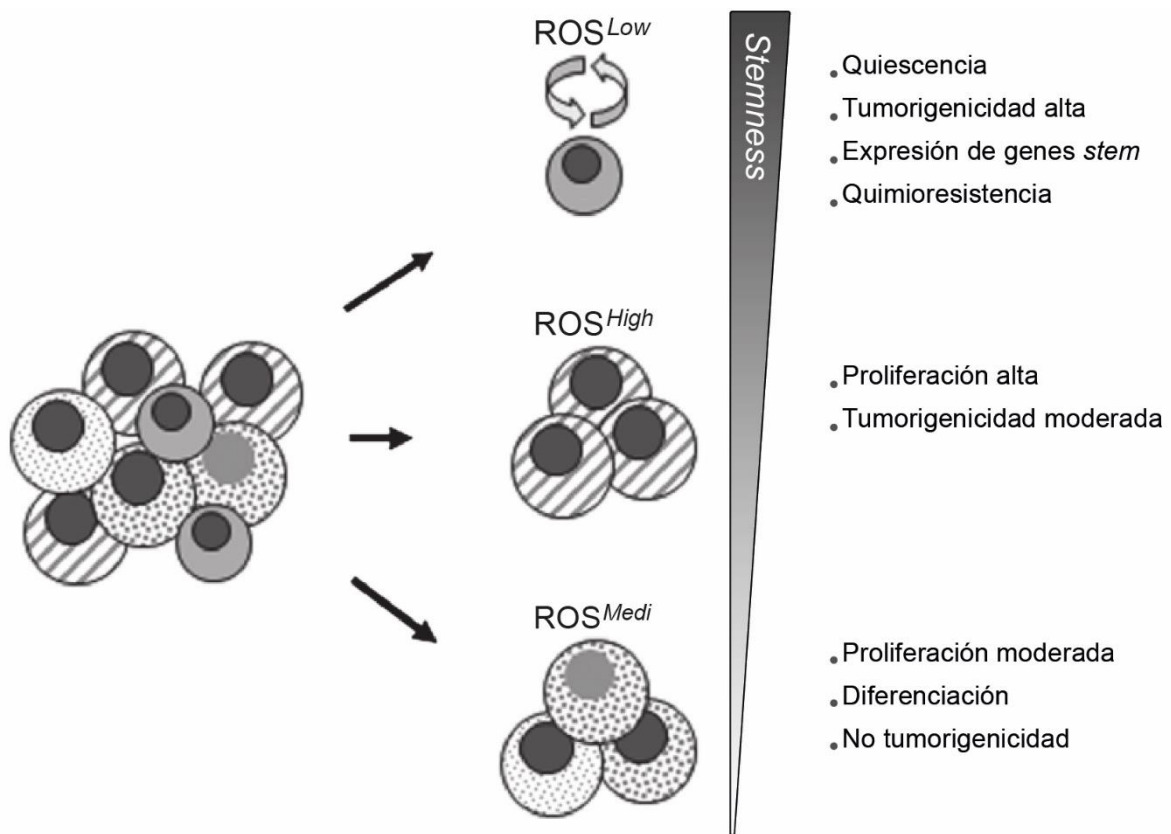
## Dinámica de los niveles de las especies reactivas del oxígeno (ROS) en la homeostasis de las células madre tumorales

En la última década se ha revelado la importancia de la señalización *redox* en la biología de las células madre. Estas especies oxidantes señalizan el estado metabólico de las células madre y, de esta manera, pueden impactar en el destino celular.

Las células tipo *stem* tienen mecanismos únicos, los cuales son importantes para capear los niveles de ROS (*reactive oxygen species*) acumulados, aumentar los sistemas antioxidantes y actuar como reguladores *redox* en la auto-renovación y diferenciación. Por ejemplo, las células *stem* hematopoyéticas mantienen un bajo nivel de ROS, facilitando la quiescencia y la capacidad de repoblación a largo plazo; mientras que mayores niveles de ROS activan la proliferación y diferenciación celular, extenuando la capacidad de auto-renovación en estas células (Jang & Sharkis 2007). Además, bajos niveles intracelulares de ROS presentes en las CSC mamarias, contribuirían a su radioresistencia. De esta manera, el mantenimiento de bajos niveles de ROS en las CSC es importante para la regulación de la quimioresistencia y el estado quiescente (Chang *et al.* 2014).

Según Yoneyama *et al.* (2010), las especies ROS endógenas son esenciales para la proliferación de las células *stem/progenitoras* neuronales. La exposición a *scavengers* de ROS elimina la capacidad de formación de neuroesferas durante el cultivo de células *stem* neurales (NPC, *neural stem/progenitor cells*) embrionarias de hipocampo. De esta manera, las especies ROS generadas endógenamente promueven la actividad proliferativa de las NPC embrionarias, permitiendo la repoblación celular (Yoneyama *et al.* 2010).

Los resultados de Chang *et al.* (2014) proponen que existen distintas subpoblaciones de células con diferentes niveles de ROS, causantes de diversos grados de potencial *stem*, quimioresistencia y tumorigenicidad en células tumorales de cabeza y cuello (**Fig. 1**). Bajos niveles de ROS estarían asociados con mayor potencial *stem*, tumorigenicidad y quimioresistencia.

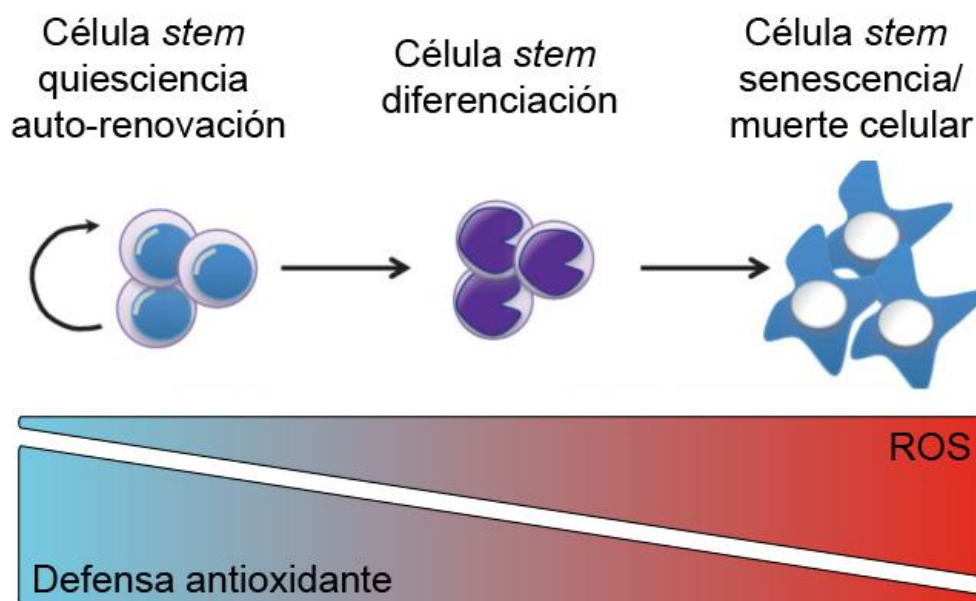


	ROS <sup>Low</sup>	ROS <sup>Medi</sup>	ROS <sup>High</sup>
<b>Stemness</b>	Alta	Baja	Media
<b>Quiescencia</b>	+	-	-
<b>Tumorigenicidad</b>	+++	-	+
<b>Diferenciación</b>	-	+++	+
<b>Quimioresistencia</b>	+++	-	+

**Figura 1. Propiedades fisiológicas de las células con niveles intracelulares de ROS bajos, medios y altos, asociados a la quimioresistencia, potencial *stem*, tumorigenicidad, y actividad proliferativa.** Las células con bajo nivel de ROS se encuentran en estado quiescente, y poseen alta tumorigenicidad y potencial *stem* aumentados, resultando en una quimioresistencia de las CSC a las terapias. Las células con altos niveles de ROS son proliferativamente activas y más sensibles a las terapias y a la diferenciación. Adaptación de Chang *et al.* (2014).

Un aumento en los niveles de ROS está asociado con la diferenciación de las células madre de la sangre en mamíferos, y con el aumento en la producción de sus progenitores intermedios, en los cuales la progresión del ciclo celular está regulada por ROS (**Fig. 2**). En contraste a los progenitores mielíticos, las células madre hematopoyéticas (HSC, *hematopoietic stem cell*) con capacidad de repoblación a largo plazo localizadas en la médula ósea, han mostrado tener bajos niveles de ROS. De hecho, una disminución en la actividad de las células madre de la sangre, ocurre en regiones de la médula ósea con niveles de ROS aumentados (Jang & Sharkis 2007). Consistente con esto, la ablación genética en ratones de la quinasa *ataxia telangiectasia* mutada (ATM), de los factores de transcripción Foxo1/3/4 (*forkhead box O 1/3/4*), o sólo de Foxo3, resultaron en una acumulación de ROS en las HSCs, comprometiendo su actividad. Se sugiere que dichos efectos se deben a los elevados niveles

de ROS resultantes de la expresión disminuida de enzimas antioxidantes, como catalasa (CAT) y superóxido dismutasa 2 (SOD2) (Bigarella *et al.* 2014).



**Figura 2. Efectos de los niveles de ROS sobre las células tumorígenicas.** Las células *stem* quiescentes y/o con auto-renovación presentan bajos niveles de ROS debido a su fuerte maquinaria antioxidante. Niveles intermedios de ROS llevan a las células *stem* hacia la diferenciación. Altos niveles de ROS causan senescencia y muerte de las células *stem* tumorales. Adaptación de Bigarella *et al.* (2014).

## Índice de proliferación

Las células malignas se caracterizan por poseer vías de señalización anormales que involucran procesos de proliferación, apoptosis, migración, invasión y angiogénesis. Durante los últimos años, se han utilizado varios métodos para la determinación de la proliferación en los tumores, incluyendo al Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA, *proliferating cell nuclear antigen*), la marcación con BrdUr, la expresión de ciclina E, la fracción celular en fase S y el índice de marcación de Ki67 (Linderholm *et al.* 2013). Dos de los marcadores biológicos más comúnmente evaluados en la práctica clínica, incluyen el análisis de la inmunotinción de Ki67 y la medición cuantitativa del contenido de DNA (que permite la evaluación de la fracción en fase S) (Ermiah *et al.* 2012).

El antígeno Ki67 es una de las diversas proteínas reguladoras del ciclo celular, la cual puede ser determinada por inmunohistoquímica. El anticuerpo anti-Ki67 reacciona con una proteína nuclear no-histona de 395 KDa, la cual se expresa durante las fases activas del ciclo celular, excepto en G<sub>0</sub> (fracción celular quiescente) (Gerdes *et al.* 1991). Varios estudios han demostrado correlaciones entre la tinción de Ki67 y la supervida global y libre de enfermedad, con el incremento de riesgo de recurrencia en pacientes con alto Ki67 (Goodson *et al.* 2000).

La medición que estima la fracción de células en fase S, refleja la actividad proliferativa. Varios estudios observaron el valor pronóstico de la fracción celular en fase S en cáncer mamario (Michels *et al.* 2000). Altos valores de dicha fracción fueron asociados con estadios avanzados, mayor tamaño tumoral, compromiso de los nodos linfáticos, poca diferenciación tumoral y baja supervivencia en pacientes con carcinoma mamario (Yildirim-Assaf *et al.* 2007).

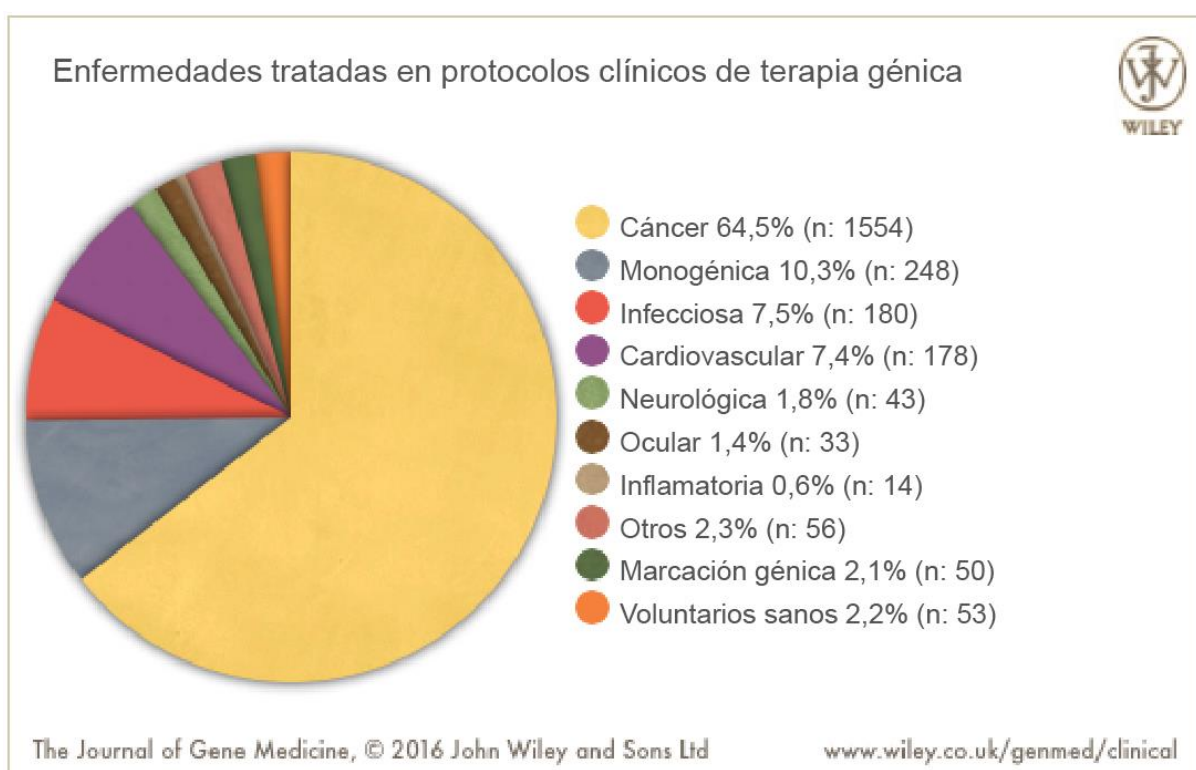
En el presente trabajo, como método para la evaluación de la proliferación se utilizó la cuantificación del contenido de DNA mediante citometría de flujo. Con el fin de analizar la población de células viables, excluimos del análisis a la fracción celular subG<sub>0</sub>. Se definió el



índice proliferativo (IP) como la fracción de células en fases S, G<sub>2</sub>/M e hiperdiploide, excluyendo a la fracción celular sin duplicación de DNA activa (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>).

## Terapia génica del cáncer

La terapia génica involucra la transferencia de material genético (DNA, RNA, siRNA, oligonucleótidos antisentido) a células somáticas de pacientes, con el propósito de curar o frenar la progresión de una enfermedad (Pfeifer & Verma 2001). En 1991, se llevó a cabo el primer ensayo clínico de terapia génica del cáncer en pacientes de melanoma. En el 2000, un ensayo clínico basado en un sistema retroviral para tratar pacientes con inmunodeficiencia combinada severa (SCID-X1), alcanzó corrección completa del fenotipo enfermo. Este ensayo demostró el potencial terapéutico de la terapia génica (Soofiyani *et al.* 2013).



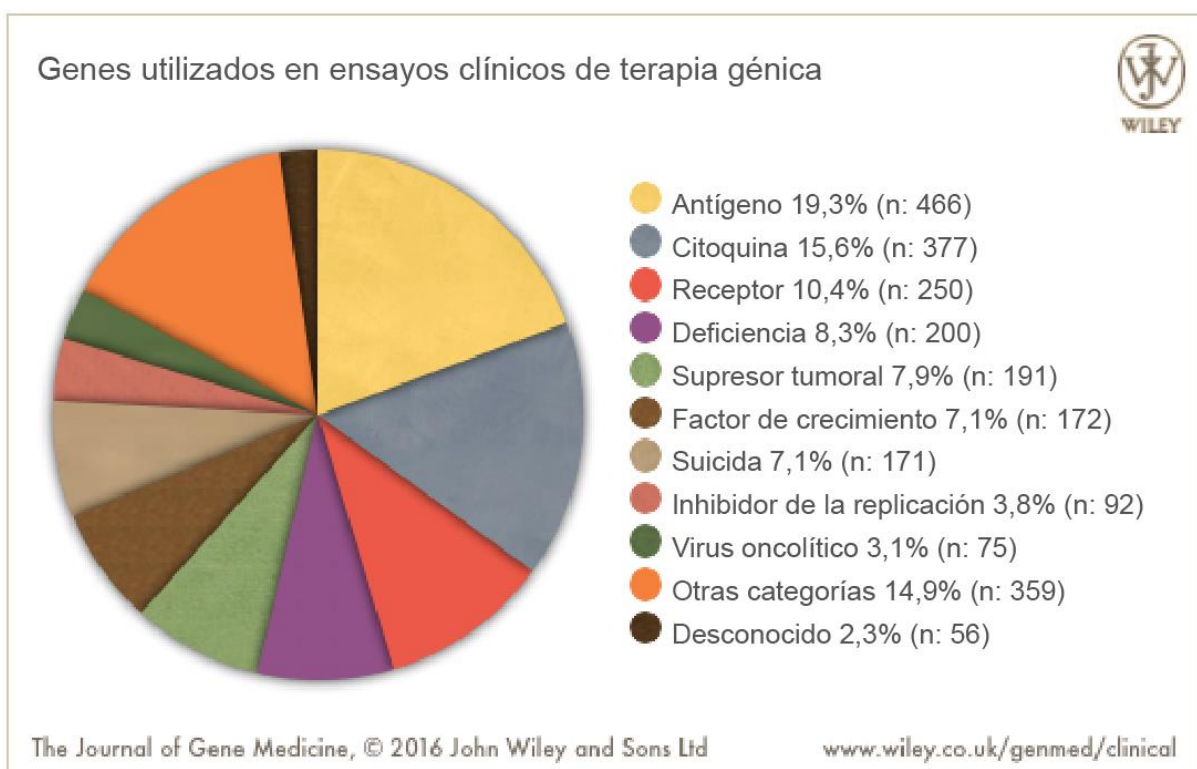
**Figura 3. Protocolos clínicos de Terapia Génica.** Adaptación de *The Journal of Gene Medicine* (agosto 2016).

Hasta el momento, la mayoría de los ensayos clínicos en terapia génica han sido dirigidos al tratamiento del cáncer (64,5% de todos los protocolos de terapia génica) (**Fig. 3**). Se ha utilizado un gran número y variedad de genes en protocolos clínicos de terapia génica en seres humanos (**Fig. 4**). Como es de esperarse, los genes usados con mayor frecuencia (antígenos, citoquinas, supresores tumorales y sistemas suicidas), son aquellos para combatir el cáncer. Estas categorías representan el 49,9% de los protocolos, aunque también se utilizan los genes que codifican para antígenos específicos de patógenos para vacunas de DNA.

En el transcurso del tiempo, se han diseñado y probado varias estrategias para la terapia génica del cáncer:

- Sistema gen suicida: donde los productos proteicos de los genes terapéuticos son enzimas que convierten una prodroga no tóxica, en una citotóxica, como la timidina quinasa del virus herpes *simplex* (HSVtk) y la citosina deaminasa (CD).

- Reparación del ciclo celular aberrante: mediante la supresión de oncogenes dominantes, como Ras y Bcl-2, o la restauración de la función normal de genes supresores tumorales, como p53 y p16, en células tumorales.
- Inmunoterapia: buscando reactivar y reforzar la respuesta del sistema inmune del paciente contra las células tumorales, mediante la expresión de citoquinas.
- Anti-angiogénesis: mediante la supresión de factores angiogénicos, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), o bien, el refuerzo de inhibidores angiogénicos, como la endostatina.
- Genes oncolíticos: basados en el uso de vectores oncolíticos virales (virus herpes *simplex* o adenovirus) o bacterianos (*Salmonella*), para ingresar y erradicar diferentes tipos de células tumorales.
- Radio y quimio-sensibilización de las células tumorales para alcanzar un mayor efecto terapéutico (Cao *et al.* 2010).



**Figura 4. Genes utilizados en ensayos clínicos de terapia génica.** Adaptación de *The Journal of Gene Medicine* (agosto 2016).

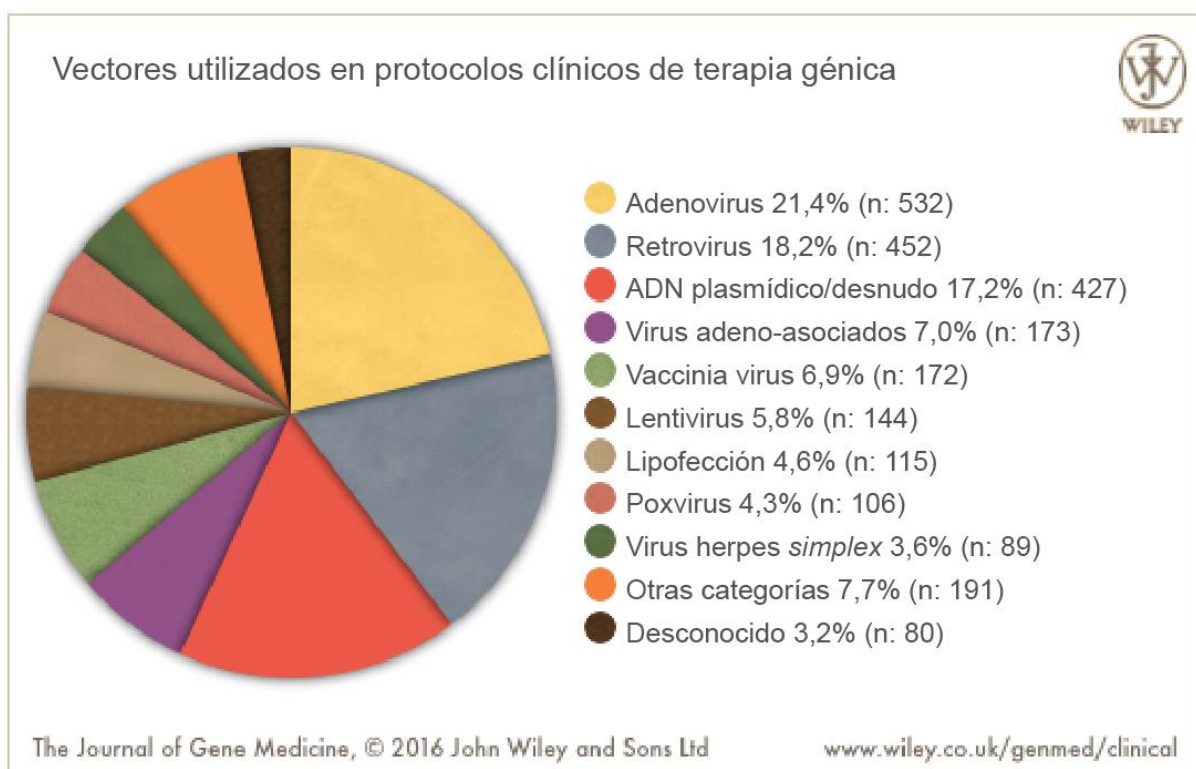
### Vectores utilizados en terapia génica

Los protocolos clínicos de terapia génica han utilizado gran variedad de vectores y técnicas de transferencia (**Fig. 5**). A pesar de que los vectores no virales están ganando popularidad, por el momento, los vectores virales son los más usados, abarcando casi dos tercios de los protocolos. Entre estos últimos, los adenovirus son los más utilizados (21,4% de los protocolos).

Razones de seguridad y la baja capacidad de los vectores virales para los genes terapéuticos, impulsaron el desarrollo de vectores sintéticos basados en sistemas no virales. El sistema no viral más usado en los protocolos clínicos es el DNA desnudo, seguido por la lipofección, la cual involucra complejos: lípidos catiónicos/DNA (4,6% de los protocolos) (Ginn *et al.* 2013).

## Los liposomas catiónicos

Los liposomas catiónicos son un sistema de transferencia genética que permite una expresión eficiente, segura y repetida de los genes de interés. Numerosos protocolos experimentales y ensayos clínicos en terapia génica del cáncer (Finocchiaro *et al.* 2011; Finocchiaro & Glikin 2012; Finocchiaro *et al.* 2015), están usando liposomas catiónicos como una alternativa más segura a los vectores virales. Estos condensan y complejan al DNA, formando complejos liposomas/DNA llamados *lipoplexes*, de alta afinidad por las membranas celulares. Los liposomas catiónicos están entre los vectores más seguros pues son no-infectivos, químicamente definidos y poseen amplia variedad de células huésped. Tienen baja inmunogenicidad, baja toxicidad, y alta estabilidad (Karara *et al.* 2002; Finocchiaro *et al.* 2004; Finocchiaro *et al.* 2008; Finocchiaro & Glikin 2008; Finocchiaro *et al.* 2011; Finocchiaro *et al.* 2015).



**Figura 5. Vectores utilizados en protocolos clínicos de terapia génica.** Adaptación de *The Journal of Gene Medicine* (agosto 2016).

## El melanoma es muy susceptible al IFN $\alpha/\beta$

Los interferones (IFNs) son glicoproteínas producidas por el sistema inmune como respuesta a agentes patógenos (**Fig. 6**). Poseen actividad antiviral, citostática e inmunomoduladora. Modifican tanto la respuesta innata como adaptativa (Gerlach *et al.* 2006). Existen dos grandes subgrupos, según su capacidad de unirse a un tipo de receptor común. El subgrupo de los IFNs tipo I se unen al receptor de IFN tipo I, incluye al IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\omega$  y  $\tau$ ; mientras que IFN $\gamma$  es el único de tipo II.

Los IFNs tienen: actividad antiviral y antitumoral, e impacto sobre el metabolismo celular y la diferenciación. La actividad biológica del IFN tipo I incluye inhibición de la proliferación celular, inducción de apoptosis, activación de los linfocitos NK y aumento de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I.

Los interferones (IFNs) son glicoproteínas con actividad antitumoral (Bracarda *et al.* 2010). La bioterapia sistémica con la proteína recombinante interferón tipo I (IFN tipo I) es un

tratamiento adyuvante aprobado por la FDA para distintas neoplasias, especialmente para melanoma de alto riesgo (estadio IIb y III). A pesar de que una de las mayores barreras de este tratamiento son los efectos adversos y la alta toxicidad sistémica, que limitan el número de dosis y la prosecución del tratamiento en alrededor del 25% de los pacientes, la terapia con la proteína del IFN provee una extensión de la sobrevida libre de enfermedad y sobrevida total (3,8 vs. 2,8 años) (Kirkwood *et al.* 2000). De hecho, un estudio realizado por Kilbridge *et al.* (2001) concluyó que al menos la mitad de los pacientes con melanoma consultados esperaban tolerar los efectos adversos del IFN para ganar ventaja en sobrevida (Parker *et al.* 2016).

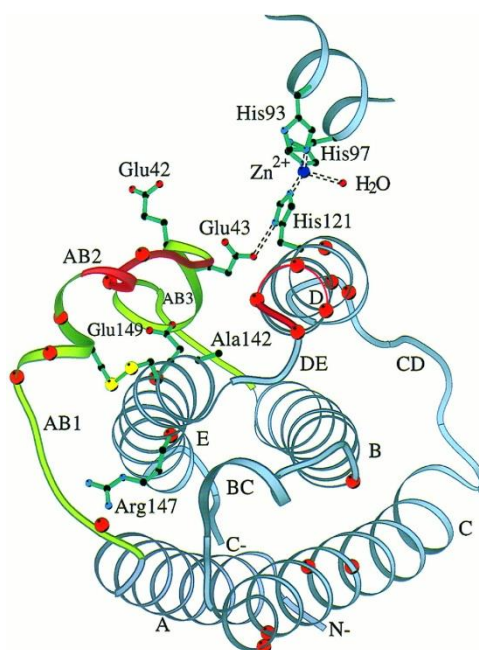


Figura 6. Esquema representativo de la estructura del Interferón.

## El potente efecto antitumoral de la terapia génica con el gen IFN $\beta$

La lipofección con el gen del IFN $\beta$  sería una terapia alternativa, con la cual se lograría una administración localizada y continua de bajas dosis de la citoquina, evitando los efectos adversos de una excesiva toxicidad y manteniendo su eficacia antitumoral. Este tipo de farmacocinética, resultaría en una liberación continua del IFN $\beta$  que podría aumentar la eficacia antitumoral al lograr niveles sostenidos de dicha proteína.

La terapia génica antitumoral por lipofección del gen IFN $\beta$ , restringe la progresión tumoral por citotoxicidad directa mediante supresión de la proliferación e inducción de apoptosis/necrosis; e indirectamente por estimulación del sistema inmune del paciente y supresión de la angiogénesis (Streck *et al.* 2006; Matsumoto *et al.* 2008). La muerte celular inducida por lipofección del gen IFN $\beta$  involucra apoptosis/necrosis, catástrofe mitótica y senescencia (Yoshida *et al.* 2004).

## La eficacia antitumoral del sistema del gen suicida

La terapia con el sistema gen suicida (GS) como tratamiento anti-cáncer fue propuesta por Moolten hace más de 25 años (Moolten 1986). Ya en el 2010, de los 1550 ensayos clínicos de terapia génica reportados, alrededor de un 7% usaban el sistema gen suicida. El gen suicida mejor caracterizado es el que codifica para la timidina quinasa del virus herpes *simplex*

(HSVtk). Se utiliza como terapia del cáncer y otras enfermedades, pues no induce una significativa toxicidad sistémica (Fillat *et al.* 2003; Shen & Nemunaitis 2006).

La HSVtk confiere sensibilidad a la prodroga de baja toxicidad, ganciclovir (GCV), la cual es mono-fosforilada por la HSVtk, y luego, di- y tri-fosforilada por las quinasas propias de las células (Fig. 7). Este GCV trifosforilado es un análogo de la guanosina-trifosfato (GTP) y compite con ella como sustrato de la polimerasa de DNA, para ser incorporado en el DNA naciente. Esto resulta en la detención de la polimerasa de DNA y en la terminación de la síntesis de DNA nuclear y mitocondrial, iniciando las cascadas de las vías de apoptosis (Fig. 8) (Moolten 1986; Matthews & Boehme 1988).

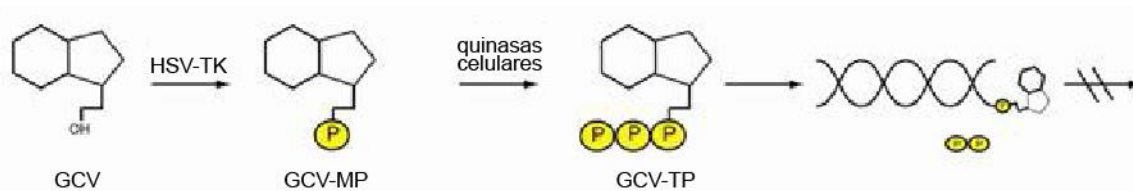


Figura 7. Esquema representativo de las reacciones producidas por el sistema GS (HSVtk/GCV).

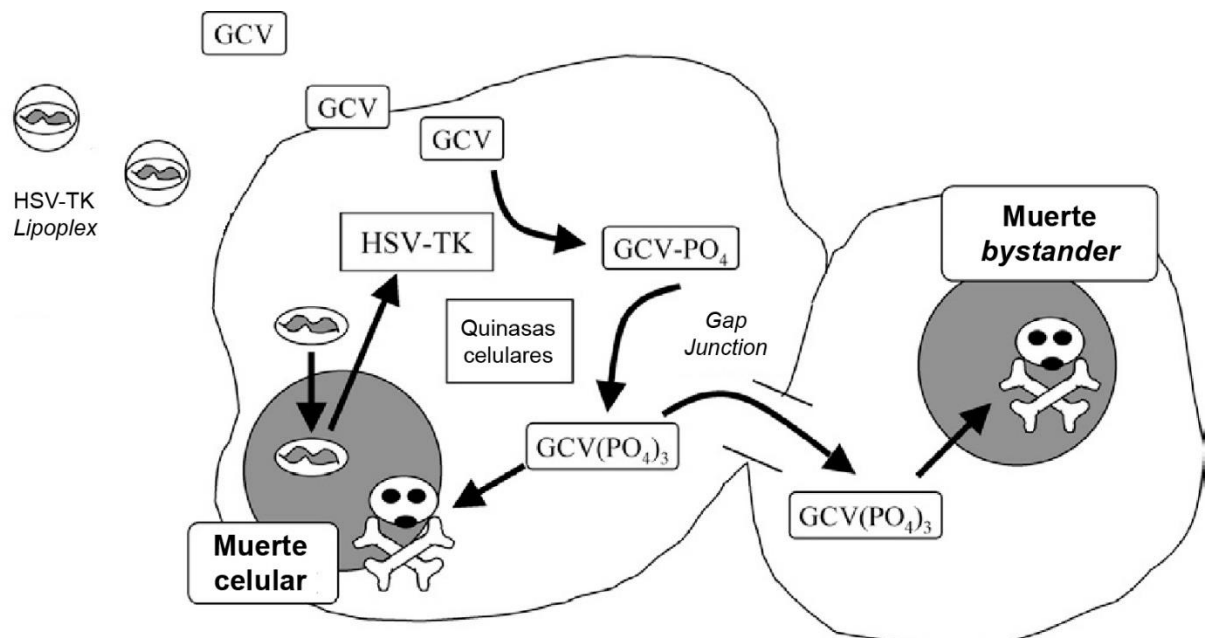


Figura 8. Esquema representativo de la acción del sistema GS (HSVtk/GCV). El GCV ingresa a la célula, donde es mono-fosforilado por la HSVtk, y luego, bi- y tri-fosforilado por las quinasas propias de la célula. El GCV-trifosfato es análogo de la GTP, funcionando como intercalante de DNA e interrumpiendo la síntesis de DNA.

### El efecto *bystander*, un gran aliado

El efecto *bystander* (o efecto contagioso) puede amplificar varias veces el efecto tóxico de las drogas. La forma tóxica de la droga, o bien, alguna pequeña molécula citotóxica producida como consecuencia del tratamiento, difundiría o pasaría a través de las uniones en hendidura (*gap junctions*) o de vesículas apoptóticas, hacia las células vecinas que no fueron transfectadas. En caso de no ser difusible, sería tomada por las células vecinas mediante transporte activo o endocitosis de las células apoptóticas o de sus remanentes tóxicos. En el caso de los tumores sólidos, donde sólo un pequeño porcentaje de las células logra ser transfectado, el efecto *bystander* es sumamente importante (Dey & Evans 2011).

En el caso del sistema del GS, el GCV tri-fosforilado, el cual puede pasar a las células vecinas, interrumpe la síntesis del DNA funcionando como terminador de cadena, llevando a la muerte celular. Así, no sólo elimina a toda célula en replicación que exprese HSVtk, sino también a las adyacentes por efecto *bystander*.

## Quimio-genoterapia como estrategia

Con el fin de lograr un efecto antitumoral más potente, se buscará combinar la bioterapia por transferencia de genes con la quimioterapia. En el presente trabajo, se utilizará la droga bleomicina (BLM), antibiótico antitumoral con actividad endonucleasa. La lipofección aumenta significativamente el ingreso de BLM a la célula, a través de las membranas celulares, el cual es muy limitado debido a su alta hidrofiliidad (Gil-Cardeza *et al.* 2013).

La BLM es una mezcla de sales sulfato de antibióticos glucopeptídicos básicos e hidrosolubles, aislados de *Streptomyces verticillus*, con actividad citotóxica (**Fig. 9**). Los sulfatos de BLM forman complejos con hierro que reducen el oxígeno molecular a superóxido y radicales hidroxilos, causando cortes en la hebra simple y doble del DNA. Estas especies reactivas del oxígeno (ROS) también inducen peroxidación lipídica, oxidación de los carbohidratos, y alteraciones en la síntesis de prostaglandinas. La BLM inyectable, aprobada por la FDA, se emplea sola o en combinación con otros medicamentos para tratar carcinomas de cabeza y cuello, de pene, de testículos, de cuello uterino y de vulva. La BLM también se utiliza en el tratamiento del linfoma de Hodgkin y el linfoma no Hodgkin. Además, se usa para tratar las efusiones y evitar recidivas.

Desafortunadamente, la BLM posee gran toxicidad pulmonar, dependiente de la dosis, que afecta al 20% de los individuos tratados, siendo la fibrosis pulmonar la forma más severa (Burgy *et al.* 2016).

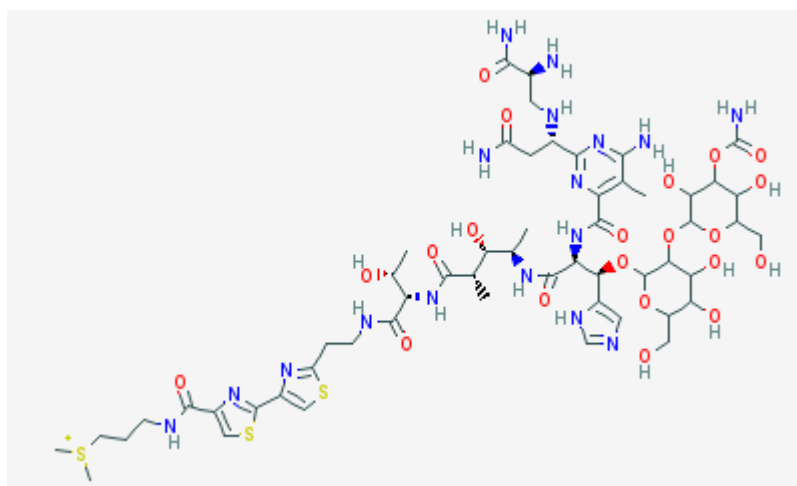


Figura 9. Esquema representativo de la estructura de la BLM.

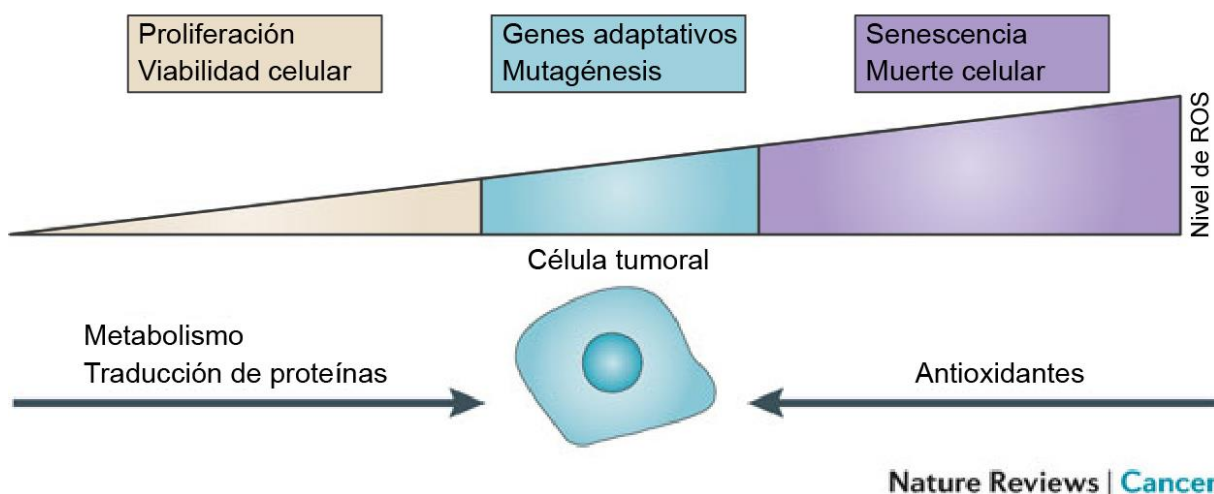
## Las especies reactivas del Oxígeno (ROS)

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son producidas en todas las células como un subproducto normal de los procesos metabólicos. Estas son pequeñas moléculas derivadas del oxígeno que incluyen a los radicales del oxígeno (superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), peróxilo ( $\text{RO}_2\cdot$ ) y alcoxilo ( $\text{RO}\cdot$ )), y ciertos no radicales que son agentes oxidantes, o son convertidos fácilmente en radicales, como el ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ), ozono ( $\text{O}_3$ ), oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ), y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Las especies ROS son producidas dentro de las células de manera endógena, y exógena. Las endógenas son generadas como un subproducto en las organelas intracelulares como mitocondrias, peroxisomas y citocromo

P-450. Las fuentes exógenas de ROS son muy diversas, como contaminantes, drogas, xenobióticos y radiación, entre otros (Prasad *et al.* 2016).

Estas especies oxidantes poseen propiedades heterogéneas y generan diversos efectos, dependiendo de las concentraciones a las cuales estén presentes (**Fig. 10**). Bajos niveles de ROS, provocan proliferación celular mediante la modificación post-traduccional de quinasas y fosfatasa. La producción de estos bajos niveles de ROS puede ser conducida por NADPH y NADPH oxidasa (NOX), y es requerida para la regulación de las vías de señalización intracelulares y la homeostasis. A niveles moderados de ROS, se induce la expresión de genes de respuesta a estrés como *HIF1A*, el cual dispara la expresión de proteínas que activan señales de supervivencia, como el transportador de glucosa GLUT1, y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Sin embargo, altos niveles de ROS, pueden causar daño a las macromoléculas, como DNA, lípidos y proteínas (Acharya *et al.* 2010); inducir la activación de la quinasa de proteínas Cδ (PKCδ); producir senescencia; y/o causar permeabilización de la mitocondria, llevando a la liberación del citocromo c y apoptosis (Prasad *et al.* 2011; Gupta *et al.* 2012).

Las células contrarrestan los efectos negativos de las especies ROS mediante la producción de moléculas antioxidantes, como glutatión (GSH) y tioredoxina (TRX) reducida. Estas moléculas reducen los niveles excesivos de ROS para prevenir el daño celular irreversible. Cabe destacar, que varios de estos sistemas antioxidantes, se basan en el poder reductor de NADPH para mantener sus actividades. Los sistemas de defensa antioxidante en las células que mantienen el balance entre producción y neutralización de los niveles de ROS, incluyen a la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), glutatión S-transferasa (GST) y al glutatión (GSH) (Paulsen & Carroll 2013).



**Figura 10. Relación entre los niveles de ROS y el cáncer.** Los efectos de las especies reactivas del oxígeno (ROS) sobre el destino celular depende en el nivel en que estén presentes. Bajos niveles de ROS (naranja) poseen un efecto beneficioso, promoviendo la proliferación y supervivencia celular. Sin embargo, cuando los niveles de ROS se hacen excesivamente altos (violeta), causan estrés oxidativo, pudiendo llevar a la muerte celular. Para contrarrestar dicho estrés oxidativo, la célula usa antioxidantes para prevenir la acumulación de altos niveles de ROS. En una célula tumoral, el metabolismo aberrante y la traducción de proteínas generan altos niveles anormales de ROS. Mediante mutaciones y adaptaciones adicionales, la célula tumoral ejerce una regulación estricta del balance de ROS y antioxidantes, de manera que la célula sobreviva y que los niveles de ROS sean de reducidos a moderados (azul). Este control extraordinario de ROS y, el mecanismo diseñado para contrarrestarlo, permite a la célula tumoral evadir los efectos perjudiciales de altos niveles de ROS y aumenta la posibilidad de que las células experimenten mutaciones adicionales mediadas por ROS y respuestas de estrés que promuevan la tumorigénesis. Figura adaptada de Cairns *et al.* (2011).

En las células tumorales altamente proliferativas, la regulación de ROS es crucial debido a la presencia de mutaciones oncogénicas que promueven el metabolismo aberrante

y la traducción de proteínas, resultando en una producción incrementada de ROS. Las células transformadas contrarrestan la acumulación de ROS mediante la regulación positiva de los sistemas antioxidantes, creando una paradoja de altos niveles de ROS en presencia de altos niveles de antioxidantes (Cairns *et al.* 2011).

### Las líneas celulares reflejan la respuesta clínica de los respectivos tumores

Las líneas celulares establecidas, mantenidas por múltiples pasajes *in vitro* o trasplantes en ratones (xenogénicos) inmunodeficientes, generalmente implantadas en tejidos heterotópicos, son muy distintas de las líneas originales derivadas de estos tumores y no reflejan exactamente el comportamiento de las células en el huésped original, ni la gran heterogeneidad observada en pacientes.

Por eso, en nuestro laboratorio trabajamos con líneas celulares establecidas a partir de cultivos primarios de tumores de pacientes del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo” y de pacientes veterinarios; buscando reflejar la gran heterogeneidad y plasticidad fenotípica observada en estos pacientes de melanoma.

### Esferoides: mejor modelo predictivo de la respuesta a las terapias de los respectivos tumores

Además del modelo clásico de células en monocapa, se utilizará el modelo de esferoides tumorales multicelulares (MCTS), el cual logra reproducir: la organización de un tumor, reflejando las interacciones intercelulares, la baja penetración de drogas, el gradiente de oxígeno y nutrientes y la resistencia de las células quiescentes del centro; representando así, un modelo 3D de complejidad intermedia entre los cultivos en monocapa y los tumores *in vivo* (Fig. 11) (Santini *et al.* 2000; Hamilton 1998).

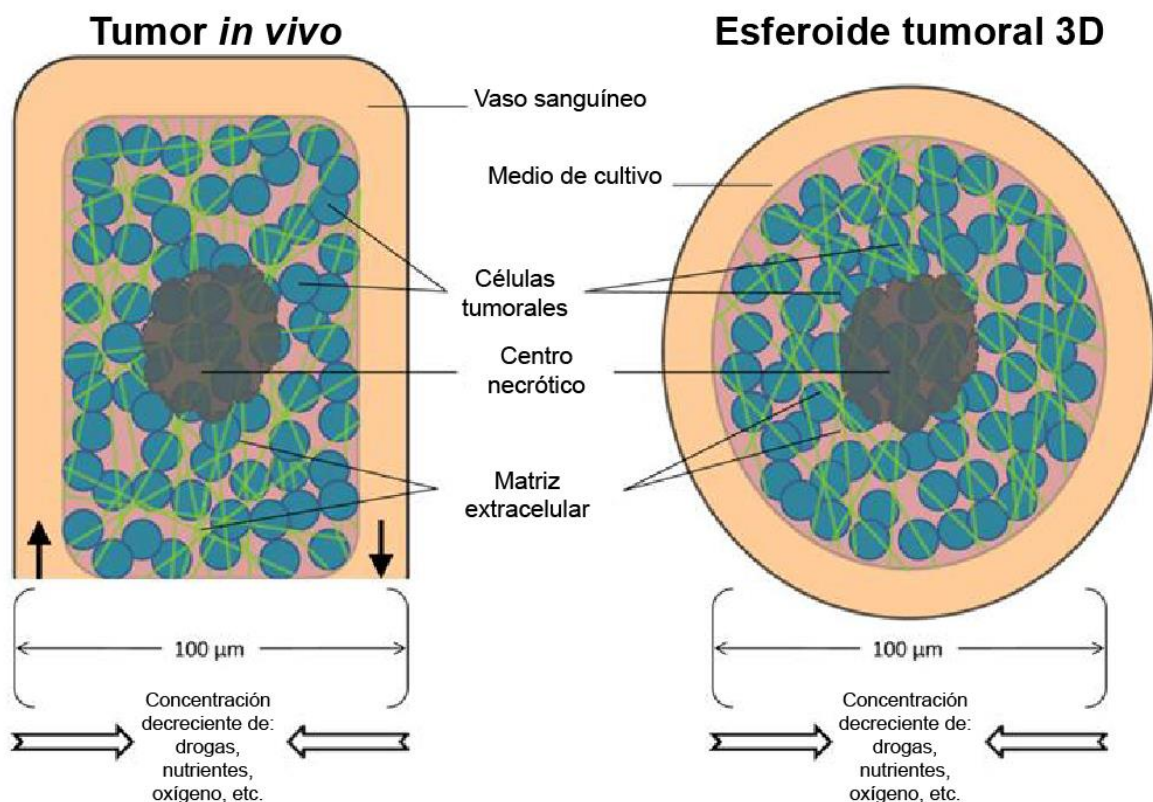


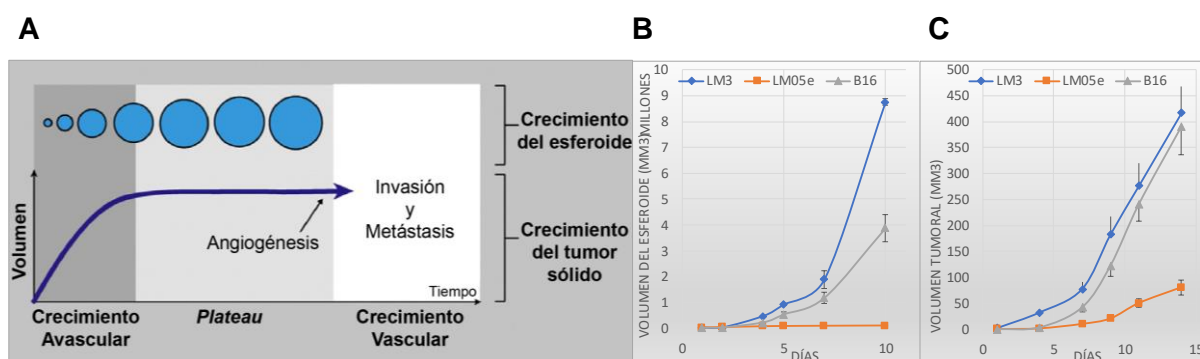
Figura 11. Esquema representativo del tumor *in vivo* y del esferoide tumoral *in vitro*. Comparación de los componentes entre un tumor y el modelo de esferoide (Phung *et al.* 2011).



## Cinética del crecimiento de esferoides tumorales

El crecimiento de los tumores sólidos puede ser discriminado en dos grandes estadios. En el periodo de crecimiento inicial, el volumen del tumor sólido incrementa exponencialmente durante la fase de crecimiento avascular. Posteriormente, el crecimiento celular se mantiene en una fase latente y, luego, comienza la fase de crecimiento vascular inducida por la secreción de factores pro-angiogénicos con la formación de nuevos vasos y el remodelado mediado por proteasas (ej.: MMP-2, MMP-9). Subsecuentemente, las células tumorales adquieren propiedades invasivas y hacen metástasis a sitios distales.

Un patrón de crecimiento similar es encontrando en esferoides (**Fig. 12**), en donde en etapas tempranas, el volumen del esferoide aumenta exponencialmente hasta que alcanza determinado diámetro; subsecuentemente, la tasa de crecimiento empieza a decrecer hasta que el volumen del esferoide permanece constante, llamado *plateau* del crecimiento del esferoide (Costa *et al.* 2014). Este perfil de crecimiento es esencial para establecer la organización estratificada de los esferoides (Costa *et al.* 2016).



**Figura 12. Correlación entre la cinética de crecimiento de los esferoides y la de los tumores sólidos: (A)** crecimiento exponencial inicial (fase de crecimiento avascular) y el estado *plateau*. Figura adaptada de (Costa *et al.* 2016). **(B)** Curvas de crecimiento de los esferoides. Se graficó el volumen promedio de los esferoides en función del tiempo, calculado sobre 20 mediciones en cámara de Neubauer en 4 ensayos independientes. **(C)** Curvas de crecimiento de tumores *in vivo* en ratones Balb/c inyectados con las células de carcinoma mamario LM3 o LM05e, o en ratones C57 inyectados con las células de melanoma B16. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  s.e.m. (n: 5 animales por grupo) de 4 experimentos independientes. (B y C: Finocchiaro LME *et al.*, comunicación personal).

## Alta similitud de respuesta de los esferoides y los tumores *in vivo*

Es muy notable la alta similitud que existe entre los esferoides y los tumores sólidos *in vivo* que los originan en cuanto a su morfología, y dinámica de crecimiento (Casais *et al.* 2006). Ambos presentan un tipo de resistencia a diversas terapias, exclusivo de las estructuras tridimensionales, llamada resistencia multicelular (MCR) (Desoize & Jardillier 2000; Gil-Cardeza *et al.* 2010). Hemos demostrado la alta correlación que existe en la sensibilidad al sistema gen suicida HSVtk/GCV entre tumores de melanoma canino *in vivo* y sus correspondientes esferoides *in vitro* ( $R^2=0,85$ ) (Gil-Cardeza *et al.* 2010). La alta correlación de la resistencia multicelular (MCR) con el crecimiento radial de los esferoides ( $R^2=0,98$ ) y con el índice mitótico de los respectivos tumores originales ( $R^2=0,89$ ) sugiere que una de las posibles causas de MCR sería un rápido recrecimiento celular y repoblación de la zona necrosada por el tratamiento con gen suicida. Esto apoya la implementación de los esferoides como modelo experimental más real, que las células en monocapa, para la optimización y predicción de la respuesta *in vivo* de los respectivos tumores a las estrategias terapéuticas (Gil-Cardeza *et al.* 2010).

Muchas terapias antitumorales han sido evaluadas en un rango de diferentes tipos celulares en sistemas de cultivo 3D y comparadas directamente a las mismas células crecidas

en monocapa (2D). Los estudios han demostrado que las células tumorales son menos sensibles a los agentes antitumorales cuando son evaluados en sistemas 3D en comparación a las 2D. Sin embargo, también, existen numerosos estudios donde los efectos tóxicos de los agentes antitumorales contra las células tumorales en cultivo 3D fueron iguales, o mayores, a las mismas células en cultivo 2D. La información adquirida a partir del empleo estos sistemas de cultivo 3D en la investigación del cáncer, independientemente de si la sensibilidad celular a las drogas aumenta o decrece, tiene el potencial de proveer una representación más acertada de la actividad de la droga o compuesto *in vivo* (Lovitt *et al.* 2014).

Por eso, nos proponemos evaluar los efectos de la transferencia de los genes que codifican para IFN $\beta$  y para la quinasa de timidina del virus herpes *simplex* co-administrado con ganciclovir (HSV $tk$ /GCV), combinados o no con bleomicina (BLM), en monocapas y esferoides de líneas de melanoma provenientes de pacientes oncológicos tanto humanos como veterinarios (Rassnick *et al.* 2001; Boria *et al.* 2004; Freeman *et al.* 2003; Finocchiaro & Glikin 2008; Finocchiaro *et al.* 2011; Gil-Cardeza *et al.* 2010).

# Objetivos

- Obtener y caracterizar nuevas líneas de melanoma humano, establecidas a partir de tumores de pacientes del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”.
- Explorar la sensibilidad *in vitro* a la lipofección del gen del Interferón beta (IFN $\beta$ ) y el sistema de gen suicida (GS) que codifica para la timidina quinasa del virus *Herpes Simplex* / ganciclovir (HSVtk/GCV), en ausencia o presencia de bleomicina (BLM), de cultivos bi y tridimensionales de células de melanoma humano y canino.
- Explorar los mecanismos involucrados en la respuesta celular a la quimio-  
genoterapia: co-administración de bleomicina (BLM) con la lipofección del sistema GS y del gen IFN $\beta$ .
- Relacionar las respuestas al GS de los tumores de pacientes veterinarios *in vivo* con parámetros *in vitro* de las líneas celulares derivadas de sus respectivos tumores.
- Proporcionar una base pre-clínica para futuros ensayos clínicos veterinarios que combinen la terapia génica local con GS e IFN $\beta$  con la quimioterapia con bleomicina.

# **Materiales y Métodos (MyM)**

## Líneas celulares

Se utilizaron tres líneas celulares de melanoma humano *hM1*, *hM2* y *hM4* establecidas en el laboratorio; ocho líneas de melanoma mucoso canino: cuatro previamente establecidas por nuestro grupo de trabajo *Bk*, *Rk*, y *Br* (Gil-Cardeza et al. 2010), y cinco líneas recientemente establecidas: *Ai*, *Ov*, *Lo*, *Bl* y *Rl*; y dos líneas felinas recientemente establecidas: *Dc* y *Rn*.

## Establecimiento de las líneas celulares humanas

Este trabajo siguió los lineamientos de la Declaración de Helsinki y todas las muestras fueron obtenidas con el consentimiento informado de los pacientes. Las muestras clínicas fueron aprobadas de acuerdo con el comité institucional de ética del Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Universidad de Buenos Aires, Argentina. Las líneas celulares de melanoma humano derivadas de muestras tumorales extraídas quirúrgicamente de pacientes con melanoma metastásico en nodos linfáticos (*hM1* y *hM2*) o bazo (*hM4*), fueron obtenidas mediante disgregación mecánica de los fragmentos tumorales en medio de cultivo libre de suero.

Los tumores se lavaron con PBS, y se disgregaron mecánicamente en medio de cultivo con 10% de suero fetal bovino (SFB). Los fragmentos de tumor se incubaron en estufa gaseada (5% de CO<sub>2</sub> en aire) a 37°C (Freshney 1986).

## Cultivo celular

Las células fueron cultivadas a 37°C en atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> en medio D-MEM/F12 (Invitrogen, USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (PAA, Austria), HEPES 10 mM (Sigma, USA) (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* (Santini et al. 2000). Brevemente, se fundió agar para cultivo celular (Sigma), se lo diluyó al 1,5% con medio de cultivo sin suero y se agregó a los pozos de las placas de cultivo para impedir la adhesión celular. Luego se sembraron las células provenientes de monocapas tripsinizadas por encima del agar solidificado.

## Tiempo de duplicación

El tiempo de duplicación se estimó utilizando el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., USA). Para esto, 200.000 células sembradas, por duplicado, en placas de 6 pozos, y cultivadas bajo condiciones normales, fueron contadas diariamente en una cámara de Neubauer, luego de tinción con azul tripán.

## Inmunocitoquímica

Se analizó la presencia de antígenos marcadores de melanoma. Las células se cultivaron sobre cubreobjetos hasta alcanzar un 50% de confluencia, bajo condiciones normales de cultivo. Luego se lavaron, se fijaron con etanol, se secaron, se re-hidrataron, y se incubaron con los siguientes anticuerpos monoclonales siguiendo las indicaciones de los fabricantes: anti melan A humano (BioGenex, San Ramon CA, USA; clon A103), anti S-100 humano (BioGenex; clon15E2E2), anti gp100 humano (BioGenex; clon HMB45), anti citoqueratina humano (Dako; clones AE1/AE3). Luego de ser lavadas, se incubaron con

inmunoglobulinas Multi-Link (BioGenex) conjugadas con estreptavidina/peroxidasa y se revelaron con 3,3'-diaminobenzidina.

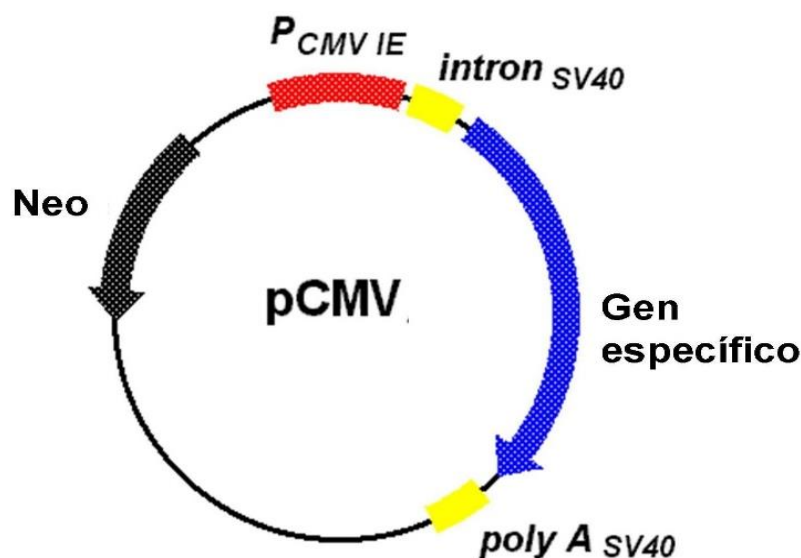
## Detección del estado mutacional de BRAF

Se extrajo el DNA mediante el Kit de Aislamiento de DNA *High Pure FFPE DNA Isolation Kit* (Roche, Indianapolis, IN). El estado mutacional de BRAF fue evaluado utilizando el ensayo comercial (*B-Raf Mutation Analysis Kit II for detection of B-Raf V600E/K/D/R/M Mutations-Entrogen*, Woodland Hills, CA). Este análisis, basado en la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), puede detectar cinco mutaciones puntuales en el codón 600 (V600E, V600K, V600R, V600D, y V600M) cuando están presentes en más del 1% del tejido.

## Plásmidos

Se utilizó el plásmido psCMV (**Fig. 13**) (Finocchiaro *et al.* 2004) conteniendo el gen de  $\beta$ -galactosidasa de *Escherichia coli* ( $\beta$ gal), el gen del interferón- $\beta$  (IFN $\beta$ ) humano o canino (Villaverde *et al.* 2012), o el sistema de gen suicida de la timidina quinasa del virus herpes *simplex* (HSVtk) (Finocchiaro *et al.* 2004). Se utilizó el gen IFN $\beta$  humano para lipofectar a las líneas humanas, y el gen IFN $\beta$  canino para lipofectar a las líneas caninas en todos los experimentos.

Los plásmidos se amplificaron en la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* (Invitrogen). Las bacterias se cultivaron en medio LB con neomicina (100  $\mu$ g/ml) y los plásmidos se purificaron mediante cromatografía de intercambio iónico (Qiagen, USA) según el protocolo del fabricante. EL DNA fue resuspendido a una concentración final de 2 mg/ml en PBS estéril.



**Figura 13. Estructura genérica de los plásmidos utilizados en este trabajo.** Neo: gen de resistencia a la neomicina. P<sub>CMV IE</sub>: promotor del citomegalovirus temprano intermedio. Intrón y cola poly A: del virus SV40.

## Lipofección

Los lípidos DC-Chol (3 $\beta$ N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamil colesterol) y DMRIE (bromuro de 1,2-dimiristil oxipropil-3-dimetil-hidroxi-etilamonio) fueron sintetizados y donados por BioSidus S. A. (Buenos Aires, Argentina). El lípido DOPE (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfatidil etanolamina) fue provisto por Sigma (**Fig. 14**). Los liposomas fueron preparados con

relaciones molares lípido/colípido 1:1 (DMRIE:DOPE) ó 3:2 (DC-Chol:DOPE) por sonicación (Felgner *et al.* 1994). Los lípidos disueltos en cloroformo fueron evaporados a sequedad, y los liposomas fueron preparados por reconstitución en buffer de fosfato de sodio  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1M (pH 7,3) a una concentración final de 1 mg/ml, seguido por 10 ciclos de sonicación a 4°C.

Los *lipoplexes* ( $0,5 \mu\text{g DNA}/\text{cm}^2$ ;  $1 \mu\text{l liposomas}/\text{cm}^2$ ) fueron preparados en buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,1 M (pH 7,3). Luego de 15 minutos de incubación para la formación de los complejos lípido/DNA, estos complejos fueron agregados (gota a gota) a células al 40-60% de confluencia, según la línea celular, en un volumen mínimo de medio libre de suero y antibióticos. Luego de 3 h (*Ai*, *Bk*, *Rk*, *hM1*, *hM4*) o 5 h, se llevó a volumen óptimo con medio con 10% SFB y antibióticos. Se incubó en estufa gaseada en condiciones normales.

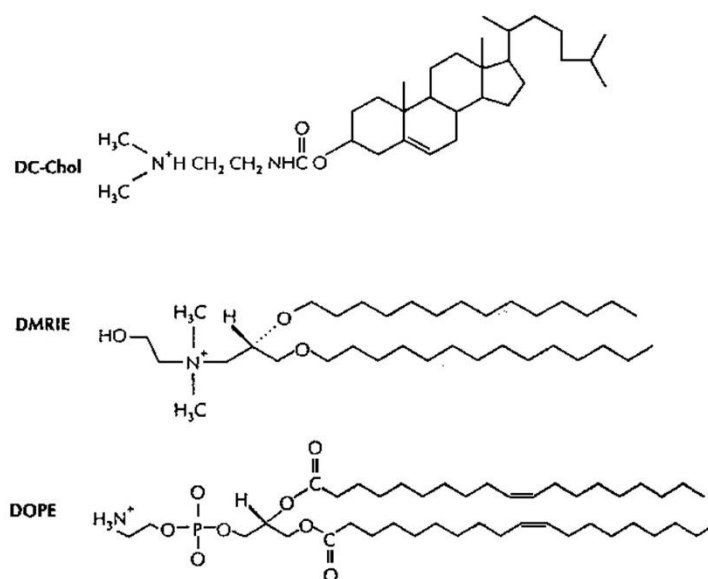


Figura 14. Fórmulas moleculares de los lípidos catiónicos utilizados.

## Eficiencia de lipofección

Para cuantificar la eficiencia de transfección, 24 h post-lipofección, las células lipofectadas con el plásmido psCMV/ $\beta$ gal fueron tripsinizadas, fijadas en suspensión con formaldehído 2% y glutaraldehído 0,2% en PBS, incubadas durante 24 h a temperatura ambiente con el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal, Sigma) y contadas en cámara de Neubauer bajo microscopio invertido (Silhavy & Beckwith 1985).

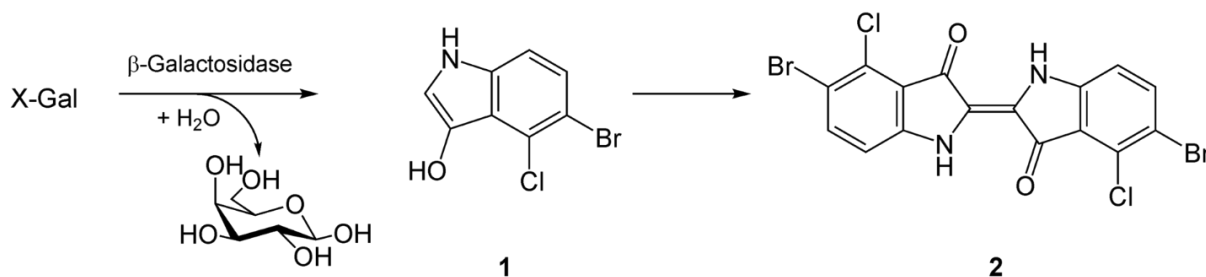
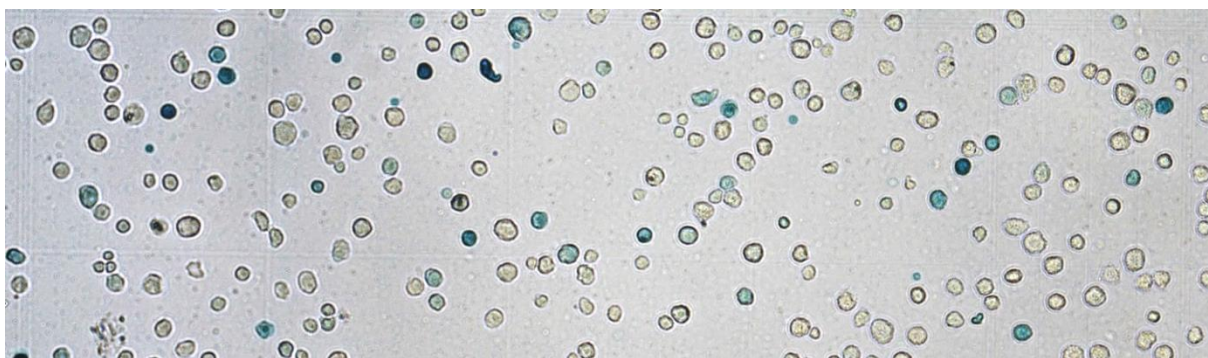


Figura 15. X-Gal es hidrolizado por la  $\beta$ -galactosidasa a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol (1). Este último es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo (2), un compuesto azul insoluble.

El compuesto X-Gal es hidrolizado por la  $\beta$ -galactosidasa a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol, el cual es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto azul



insoluble (**Fig. 15**). La eficiencia de transfección se calculó como número de células que expresan  $\beta$ -galactosidasa (células azules, **Fig. 16**) cada 100 células totales (%). Los resultados se expresaron como el porcentaje promedio de células positivas  $\pm$  s.e.m de al menos 4 ensayos independientes.



**Figura 16.** Células Ai lipofectadas con el plásmido psCMV/ $\beta$ gal y evaluadas para la actividad de  $\beta$ gal, como se describe en MyM.

### **Viabilidad Celular: actividad fosfatasa ácida citosólica (APH)**

La viabilidad celular se evaluó indirectamente por el ensayo colorimétrico de la fosfatasa ácida (APH), en el que se cuantifica la actividad fosfatasa ácida citosólica. El ensayo se basa en la hidrólisis del sustrato para-nitrofenol fosfato por fosfatasas ácidas intracelulares presentes en células viables para producir para-nitrofenol. Se asume que la absorbancia del para-nitrofenol a 405 nm es directamente proporcional al número de células viables (Yang *et al.* 1996).

Viabilidad de las monocapas (mc): las monocapas sembradas en placas de 96 pozos se lavaron con 200  $\mu$ l de PBS. Luego, se agregó 100  $\mu$ l de PBS y 100  $\mu$ l de solución reveladora APH (2 mg/ml de para-nitrofenol fosfato (Sigma) en un buffer 0,1 M de acetato de sodio pH 5,2; 0,1% tritón).

Viabilidad de los esferoides (esf): los esferoides se pasaron con su medio de cultivo (100  $\mu$ l) a una placa de 96 pozos sin agar. Luego, se lavó dos veces con 200  $\mu$ l de PBS, y se agregaron 100  $\mu$ l de solución APH. Para lavar los esferoides, se centrifugaron las placas a 400 g, y se quitaron 200  $\mu$ l de un volumen total de 300  $\mu$ l (Friedrich *et al.* 2007).

Luego se incubó a 37°C durante 2 (mc) o 3 h (esf). Se reveló con el agregado de 10  $\mu$ l de NaOH 1 N, y se determinó la absorbancia a 405 nm con un espectrofotómetro de placa. Las densidades ópticas (OD) obtenidas se relativizaron a la OD de su respectivo control (células sin tratar). Los resultados se expresaron como porcentaje de células sobrevivientes con respecto a células sin tratar (100%).

### **Efecto de las lipofecciones sobre la viabilidad celular**

Las células se lipofectaron con el sistema gen suicida (GS, HSVtk/GCV) o con el gen de  $\beta$ gal, o IFN $\beta$  (humano o canino). Un día después de la lipofección, las células se tripsinizaron y cultivaron en condiciones normales como monocapas (mc) (4-8 x 10<sup>3</sup> células/pozo), o como esferoides sobre agar solidificado 1,5% (esf) (2,5, 5, 10 y 20 x 10<sup>3</sup> células/pozo), solas o co-administradas con GCV (5 mg/ml, Richet, Buenos Aires, Argentina) o/y BLM (3  $\mu$ g/ml), en placas de 96 pozos. A los 6 (mc) o 13 (esf) días de la siembra, se evaluó la viabilidad celular mediante el método APH. Los resultados se expresaron como el porcentaje promedio de células sobrevivientes respecto a células sin tratar (100%)  $\pm$  s.e.m de al menos 4 ensayos independientes.

## **Determinación del efecto de lipofección sobre la dosis inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de bleomicina**

Un día después de ser sembradas, como monocapas en placa de 96 pozos, las células se lipofectaron con los genes  $\beta$ gal, IFN $\beta$  o GS y se agregaron concentraciones crecientes de BLM (1, 3, 5, 10 o 20  $\mu$ g/ml) o vehículo (PBS). A los 5 días se evaluó la viabilidad celular con el método APH. Las OD obtenidas se relativizaron con respecto a la OD de células control, sin lipofectar y sin agregado de BLM, o bien, a su respectivo tratamiento sin agregado de BLM (curvas normalizadas) (100%). Con los valores de viabilidad obtenidos se construyeron curvas dosis-respuesta para cada tratamiento genético (control,  $\beta$ gal, IFN $\beta$  o GS). El IC<sub>50</sub> del BLM para cada tratamiento se determinó mediante el software GraphPad (GraphPad Software Inc., USA) utilizando las curvas dosis-respuesta normalizadas.

## **Análisis del ciclo celular por citometría de flujo**

Células control o lipofectadas con los genes  $\beta$ gal, IFN $\beta$  o GS, en presencia o ausencia de BLM (3 $\mu$ g/ml), se cultivaron por 72 h. Luego se tripsinizaron, se lavaron con PBS, se fijaron en etanol 70% a -20°C por 2 h, se lavaron y se incubaron con la solución de tinción (ioduro de propidio 50  $\mu$ g/ml, Triton X-100 0,1%, RNAsa 100  $\mu$ g/ml en PBS) por 30 min en oscuridad. Las muestras se evaluaron en un citómetro de flujo, procesando 10.000 eventos de cada condición, en un sólo canal (fl3). Los datos se analizaron mediante el programa Flowing (Flowing Software 2.5.1, Finlandia).

## **Determinación de la fracción subG<sub>0</sub>**

La fracción celular con contenido sub-diploide de DNA (subG<sub>0</sub>) fue considerada como fracción celular con DNA fragmentado (Villaverde *et al.* 2012; Vanden Berghe *et al.* 2013; Hollville & Martin 2016). Los resultados se expresaron como porcentajes de células con contenido sub-diploide de DNA respecto al número total de células evaluadas.

## **Determinación del Índice Proliferativo (IP)**

Con el fin de analizar la progresión del ciclo de las células viables, excluimos del análisis a la fracción celular subG<sub>0</sub>. Se definió el índice proliferativo (IP) como la fracción de células en fases S, G<sub>2</sub>/M e hiperdiploide. Los resultados se analizaron mediante el programa Cylchred (Cylchred Software 1.02, Reino Unido) y se expresaron como porcentajes de células en fase S+G<sub>2</sub>/M+hiperdiploide respecto al número total de células viables evaluadas.

## **Determinación de cortes doble cadena (DSB) mediante la inmunotinción de $\gamma$ H2AX**

H2AX es una variante de la familia de proteínas H2A, la cual es un componente del octámero de histonas en nucleosomas. Es fosforilada por quinasas, como ATM (ataxia telangiectasia mutada) o ATR (ataxia telangiectasia asociada a Rad3), en la vía PI3K (fosfatidilinositol-3-kinasa). La fosforilación de esta proteína, H2AX, es el primer paso en el reclutamiento y localización de proteínas de reparación. Poco después de la inducción de DSB, se forman focos de  $\gamma$ H2AX, los cuales representan a los DSB en una relación 1:1. Una vez reparado el DNA, estos  $\gamma$ H2AX desaparecen.

Las células Ai y Ov, control o lipofectadas con los genes  $\beta$ gal, IFN $\beta$  o GS (+GCV), en presencia o ausencia de BLM (3 $\mu$ g/ml), fueron cultivadas como monocapas sobre portaobjetos. A las 72 h de incubación, las células fueron lavadas 2 veces con PBS, fijadas

con una solución de formaldehído 2% y glutaraldehído 0,2% en PBS durante 5 min, lavadas 2 veces con PBS, permeabilizadas con Tritón X-100 0,1% (en H<sub>2</sub>O) 10 minutos, nuevamente lavadas 2 veces con PBS e incubadas con la solución de BSA 2% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se lavó dos veces con PBS, e incubó con el correspondiente primer anticuerpo para la histona H2AX fosforilada Ser-139 clon JBW301 (anti- $\gamma$ H2AX, Upstate, 1:500) en BSA. Al día siguiente se lavó 2 veces con PBS e incubó con el segundo anticuerpo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (SC, 1:2000) durante 1 hora. Las fotografías se realizaron utilizando un microscopio óptico. Los resultados se expresaron como el porcentaje promedio de células positivas  $\pm$  s.e.m de al menos 3 ensayos independientes.

### Determinación de los niveles intracelulares de las especies reactivas del oxígeno (ROS)

Se utilizó la sonda 5-(y-6)-carboxi-2', 7'-diacetato diclorofluoresceína (DCFH<sub>2</sub>-DA) (Invitrogen) (Fig. 17).

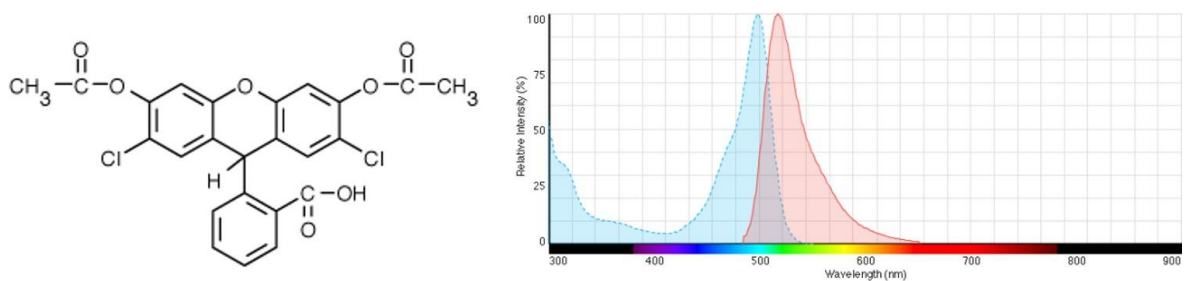


Figura 17. Estructura de la DCFH<sub>2</sub>-DA, y espectro de absorción y emisión de la DCF.

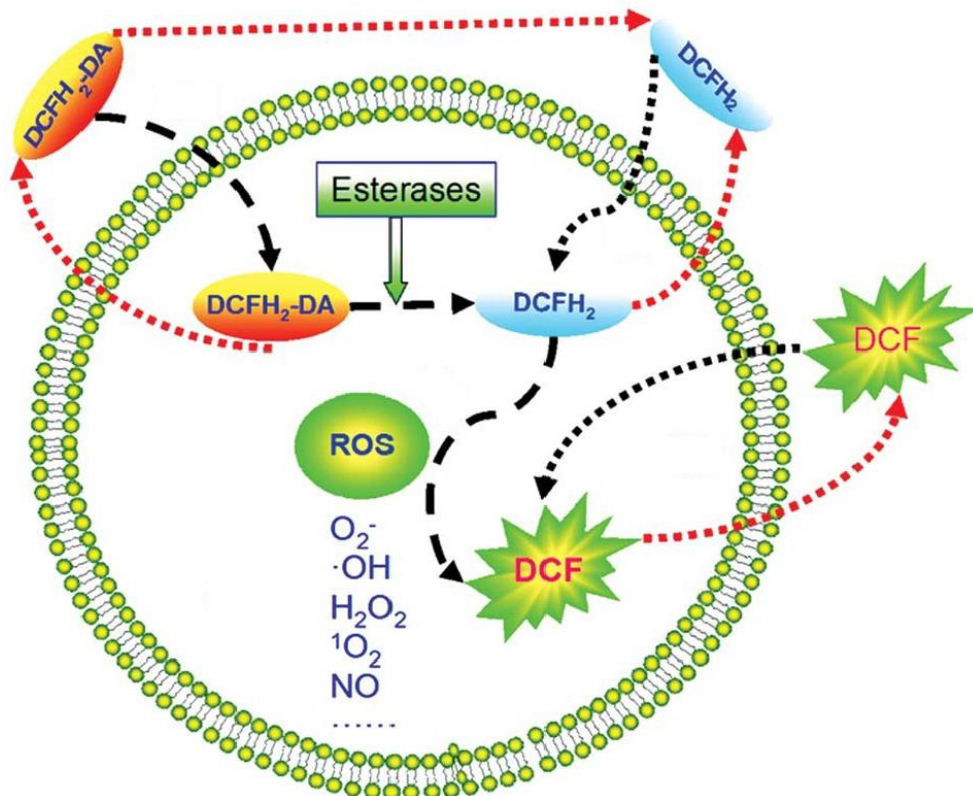


Figura 18. Mecanismo de formación de DCF en células. Figura adaptada de Chen *et al.*, 2010.

Tal como se describe en la **Fig. 18**, la molécula lipofílica no fluorescente DCFH<sub>2</sub>-DA difunde y atraviesa la membrana plasmática, ingresando a la célula. Tras la acción de esterasas intracelulares, la DCFH<sub>2</sub>-DA se deacetila y forma DCFH<sub>2</sub>, la cual también es un compuesto no fluorescente, pero no es capaz de atravesar la membrana celular. Finalmente, la DCFH<sub>2</sub> reacciona con los ROS intracelulares generando el compuesto fluorescente DCF, que emitirá fluorescencia verde de manera proporcional al nivel de ROS intracelulares (Chen *et al.* 2010).

Células control o lipofectadas con los genes  $\beta$ gal, IFN $\beta$  o GS (+GCV), en presencia o ausencia de BLM (3 $\mu$ g/ml), se cultivaron por 24, 48 o 72 h. Luego las células se cosecharon, lavaron, e incubaron con una solución de la sonda DCFH<sub>2</sub>-DA a una concentración 0,5  $\mu$ M en medio sin suero. A los 20 min se lavó con PBS y se restituyó el medio de cultivo habitual. Se procesaron 10.000 eventos (células) de cada situación en un citómetro de flujo evaluando la fluorescencia de DCF (fl1). Los resultados se analizaron utilizando el programa Flowing (Flowing Software 2.5.1, Finlandia). Se determinó la intensidad media de fluorescencia (Gm). Los resultados se expresaron como porcentaje del Gm de las células control (100%).

### **Determinación del Potencial de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\psi$ m)**

La mitocondria es una organela que genera la mayor parte de la energía requerida para el buen funcionamiento de la célula eucariota. Una deficiencia en la función mitocondrial puede originar enfermedades y, eventualmente, la muerte del organismo. La transición de la permeabilidad mitocondrial es un paso importante en la inducción de la muerte celular. Durante este proceso, el gradiente electroquímico de la membrana mitocondrial colapsa. Se cree que este colapso ocurre debido a la formación de poros en la mitocondria por las proteínas pro-apoptóticas. Es por ello que, la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial es considerado una marca de apoptosis. El análisis de los cambios en el potencial de la membrana mitocondrial que pueden ocurrir durante la muerte celular provee información relevante sobre los mecanismos involucrados (Henry-Mowatt *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2012).

Debido a su potencial de membrana negativo, la mitocondria acumula cationes lipofílicos. En base a este fenómeno, se desarrollaron diversas sondas fluorescentes para monitorear la función de la mitocondria en células vivas (Poot *et al.* 1996). Una de ellas es la sonda MitoTracker® CMXRos (Invitrogen) (**Fig. 19**), la cual es catiónica, con fluorescencia intrínseca, y además tiene unido un grupo alquilante. Debido a su potencial de membrana, la mitocondria funcional incorpora esta sonda. Una vez que esta sonda se acumula en la mitocondria, el grupo clorometilo puede reaccionar con los nucleófilos accesibles, incluyendo los grupos tiol de los péptidos y proteínas, para formar un aldehído conjugado. Cuando se altera el potencial mitocondrial, se pierde la fluorescencia roja. La excitación máxima es obtenida a 594 nm, mientras que la máxima emisión es a 608 nm. Esta sonda también puede ser excitada por los 488nm del laser de argón, a pesar de que dicha excitación no sea óptima (Poot *et al.* 1996).

Células *hM1*, *hM2* y *hM4* control o lipofectadas con los genes  $\beta$ gal, IFN $\beta$  o GS (+GCV), en presencia o ausencia de BLM (3 $\mu$ g/ml), se incubaron a 37°C durante 72 h en las condiciones habituales de cultivo. Luego, las células se cosecharon, lavaron, e incubaron con una solución de MitoTracker® Red CMXRos a una concentración 0,1  $\mu$ M en PBS. A los 20 min se lavó con PBS y se restituyó el medio de cultivo habitual. Se procesaron 10.000 eventos (células) de cada situación en un citómetro de flujo evaluando la fluorescencia de MitoTracker (fl2). Los resultados se analizaron utilizando el programa Flowing (Flowing Software 2.5.1, Finlandia). Se determinó el porcentaje de células con pérdida del potencial de la membrana mitocondrial. Los resultados se expresaron como el porcentaje promedio de células con

pérdida de permeabilidad de membrana respecto al total de células pasadas (100%)  $\pm$  s.e.m de al menos 4 ensayos independientes.

Para obtener imágenes, células *hM1* cultivadas sobre cubreobjetos durante 72h post lipofección con genes  $\beta$ gal, IFN $\beta$  o GS (+GCV), en presencia o ausencia de BLM (3 $\mu$ g/ml), se lavaron, e incubaron con una solución de la MitoTracker® Red CMXRos a una concentración 0,1  $\mu$ M en PBS. A los 20 min se lavó con PBS y se restituyó el medio de cultivo habitual. Se tomaron fotografías mediante la utilización de un microscopio de fluorescencia invertido.

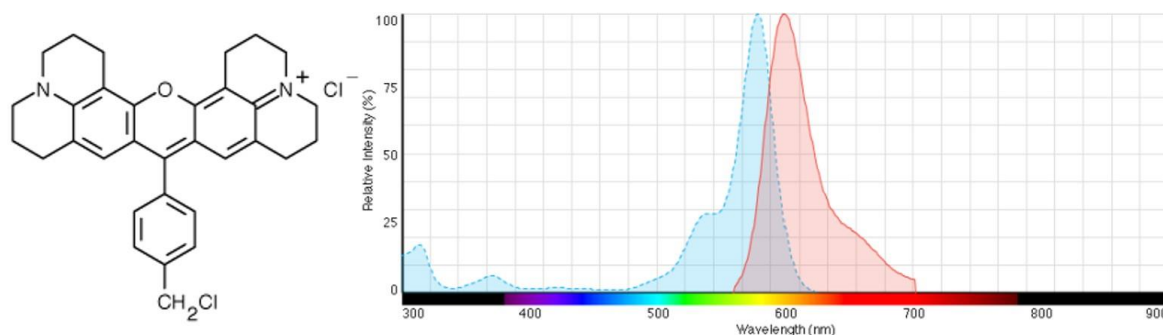


Figura 19. Estructura y espectro de absorción y emisión del Mitotraker CMXRos.

### Tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BE)

La microscopía es una simple pero poderosa herramienta para identificar las alteraciones morfológicas y provee una rápida manera de analizar muerte celular. Numerosas características de la apoptosis se pueden observar al microscopio: el *blebbing* de la membrana (generación de estructuras a modo de pequeñas evaginaciones esféricas) que da la apariencia de racimo de uvas a las células apoptóticas, la compactación de la cromatina y la fragmentación nuclear. Uno de los enfoques más conocidos es la tinción de las células con naranja acridina/bromuro de etidio (NA/BE) (Squier & Cohen 2001).

Las células cultivadas sobre cubreobjetos durante 24, 48, 72, y 120 h post lipofección con  $\beta$ gal, IFN $\beta$  o GS (+GCV), se tiñeron sin fijar con naranja de acridina (NA) (10  $\mu$ g/ml)/ bromuro de etidio (BE) (10  $\mu$ g/ml) durante 1-2 min. El NA es un colorante vital, que penetra en todas las células y emite fluorescencia de color verde. Mientras que, el BE sólo penetra en las células muertas o en proceso de muerte en las cuáles la integridad de la membrana está comprometida produciendo una fluorescencia roja. Se tomaron fotografías utilizando una cámara adaptada a un microscopio de fluorescencia (Fig. 20).

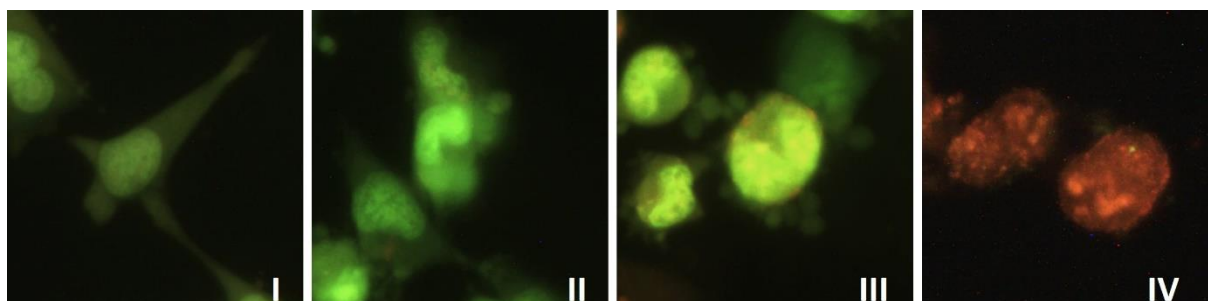


Figura 20. Imágenes representativas de células *hM1* en distintos estados de muerte celular luego del tratamiento de la quimio-generapia detectados por la tinción dual NA/BE (200X). Células viables con núcleos verdes (I); células con núcleos verdes(II)-amarillos(III) en distintos estadios de apoptosis con la cromatina condensada; y células en apoptosis tardía o necróticas con núcleos rojo brillante (IV).

## **Determinación de la permeabilidad de membrana por citometría de flujo**

Células control o lipofectadas con los genes  $\beta$ gal, IFN $\beta$  o GS (+GCV), en presencia o ausencia de BLM (3 $\mu$ g/ml), se cultivaron por 72 h. Luego se tripsinizaron, se lavaron con PBS, y se incubaron con la solución de yoduro de propidio (IPr) 5  $\mu$ g/ml, por 5 min en oscuridad. Se procesaron 10.000 eventos (células) de cada situación en un citómetro de flujo evaluando la fluorescencia del IPr (fl2). Los resultados se analizaron utilizando el programa Flowing (Flowing Software 2.5.1, Finlandia) y se expresaron como porcentaje promedio de células positivas con respecto al número total de células pasadas (100%)  $\pm$  s.e.m de al menos 4 ensayos independientes.

## **Determinación de la Senescencia precoz**

Las células hM1, hM2 y hM4, control o lipofectadas con los genes  $\beta$ gal, IFN $\beta$  o GS (+GCV), en presencia o ausencia de BLM (3 $\mu$ g/ml) fueron cultivadas en monocapas en placas de 12 pozos. Luego de 72 h, fueron fijadas con: formaldehído 2%, glutaraldehído 0.2% en PBS, e incubadas durante 24 h a 37°C, en ausencia de CO<sub>2</sub>, con el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal, Sigma) a pH: 6,5, específico para la detección de la actividad  $\beta$ galactosidasa asociada a senescencia precoz. Luego de la incubación se realizó el recuento de células y se calculó el porcentaje de células azules con respecto al total de células (100%). Los resultados se expresaron como porcentaje promedio de células positivas  $\pm$  s.e.m de al menos 4 ensayos independientes.

## **Ensayo de capacidad clonogénica**

Células control o sobrevivientes 6 días post-lipofección con los genes  $\beta$ gal, IFN $\beta$  o GS (+GCV), en presencia o ausencia de BLM (3 $\mu$ g/ml), se tripsinizaron hasta obtener una suspensión de células aisladas. Las células cosechadas se sembraron a baja densidad en placas de 6 pozos (400-600/ml, 1000-1500 células por pozo en placa de 6) y se incubaron en condiciones normales de cultivo hasta que las colonias fueran visibles. Luego de 7 – 10 días, las placas se lavaron, fijaron con 5% de ácido acético en etanol, y tiñeron con cristal violeta. Se contó el número de colonias por pozo con un microscopio invertido. Se determinó la capacidad clonogénica como el porcentaje de células capaces de formar una colonia de más de 10 células, respecto el número total de células sembradas. Los resultados se expresaron como la capacidad de clonogénica promedio  $\pm$  s.e.m de al menos 4 ensayos independientes.

## **Ensayo de formación de melanosferas (ME)**

Células control o sobrevivientes 6 días post-lipofección con los genes  $\beta$ gal, IFN $\beta$  o GS (+GCV), en presencia o ausencia de BLM (3 $\mu$ g/ml), se tripsinizaron hasta obtener una suspensión de células aisladas. Las células cosechadas se sembraron en placas de baja adherencia (ULA, Greiner Bio-One, Köln, Alemania) de 12 pozos a una densidad de 2000-2500 células viables/ml y se cultivaron en 1 ml de medio libre de suero, suplementado con B27 (Gemini Bioproducts, West Sacramento, CA), y 20 ng/ml EGF. Las melanosferas se contaron luego de 6-8 días de cultivo, con un microscopio invertido Nikon eclipse TE2000-S. La capacidad de formación de melanosferas se determinó como el porcentaje de células capaces de proliferar clonalmente como melanosfera de más de 10 células, respecto el número total de células sembradas. Los resultados se expresaron como la capacidad de formación de melanosferas promedio  $\pm$  s.e.m de al menos 4 ensayos independientes.

## Pacientes veterinarios

Pacientes caninos y felinos con diagnóstico confirmado de melanoma fueron reclutados para el estudio (Finocchiaro *et al.* 2008; Finocchiaro & Glikin 2008). Los propietarios de los mismos fueron notificados acerca de la naturaleza experimental del tratamiento, y todos firmaron en conformidad su consentimiento. El tratamiento fue ejecutado por profesionales veterinarios especialmente entrenados. Las muestras clínicas fueron aprobadas de acuerdo con el comité institucional de ética del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

## Tratamiento

Los pacientes seleccionados para este estudio presentaron enfermedad local (tumor parcialmente resecado o recurrencia post-quirúrgica) y recibieron, en el tumor remanente o áreas adyacentes, múltiples inyecciones de *lipoplexes* portadores de psCMVtk (DNA 1-4 mg) co-administrado con GCV (5-20 mg), de acuerdo al tamaño tumoral. Así continuaron con el tratamiento bisemanal en forma crónica o hasta la desaparición de toda evidencia de enfermedad local (Finocchiaro & Glikin 2008). Además, los pacientes recibieron, semanalmente durante 5 semanas, y luego, cada 2, 4, 8 y 12 semanas, una vacuna subcutánea compuesta por células tumorales autólogas y/o alogénicas formolizadas y células xenogénicas CHO irradiadas productoras de 20–30 mg de hIL-2 y hGM-CSF (Finocchiaro & Glikin 2008). Los volúmenes tumorales se calcularon como  $4/3 \cdot \pi \cdot r_1 \cdot r_2 \cdot r_3$ .

## Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  el error estándar de la media (*standard error of the mean*: s.e.m.). n: número de experimentos independientes. Se realizaron cuadruplicados de cada condición, y al menos 3 experimentos independientes en cada resultado mostrado.

Las diferencias entre grupos fueron determinadas por la prueba t-Student cuando el experimento estaba conformado sólo por 2 grupos. Las diferencias entre más de dos grupos fueron determinadas por análisis de la varianza (ANOVA) de un factor o de dos factores; en ambos casos se usó el post-test de Bonferroni para determinar la significación entre las medias. Las correlaciones se determinaron por la prueba de Pearson. En todos los casos se utilizó el programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., USA). Los valores  $p < 0,05$  se consideraron significativos.

# Resultados



# Parte I

## Caracterización de nuevas líneas de melanoma humano

## Las líneas celulares humanas derivadas de tumores de pacientes presentaron una heterogeneidad considerable

Muchos autores coinciden en que la heterogeneidad, inter e intratumoral, del melanoma, es el determinante clave para el surgimiento de la resistencia a las terapias, llevando al fracaso de los tratamientos y a la recurrencia tumoral (Quintana *et al.* 2010; Vandamme & Berx 2014).

Dado que el melanoma es un tumor altamente heterogéneo, y que, uno de los principales objetivos de este trabajo es evaluar el potencial de la quimio-genoterapia para el tratamiento del melanoma humano, se procedió a la obtención y caracterización de nuevas líneas celulares derivadas de tumores de pacientes de melanoma.

Se establecieron tres líneas celulares de melanoma humano a partir de muestras tumorales extraídas quirúrgicamente de pacientes con melanoma metastásico en nodos linfáticos (*hM1* y *hM2*) o bazo (*hM4*). Las líneas se obtuvieron mediante disgregación mecánica y se mantuvieron en cultivo por más de 80 repiques.

Mediante la determinación de los tiempos de duplicación (TD), se encontró una línea de rápido crecimiento (*hM1*), una de crecimiento intermedio (*hM4*) y otra de crecimiento lento (*hM2*) (**Tabla 1**). Acorde a su mayor tiempo de duplicación, la línea *hM2* presentó el menor índice de proliferación (IP), calculado como porcentaje de células en las fases S, G<sub>2</sub>/M e hiperdiploide.

Línea celular	Tiempo de duplicación (h) / [n]	Índice Proliferativo (%) / [n]	Capacidad clonogénica (%) / [n]	Capacidad de formar Melanoesferas (%) / [n]	Eficiencia de lipofección (%) / [n]
<i>hM1</i>	24,4 ± 0,6 / [3]	18,8 ± 1,5 / [12]	2,3 ± 0,2 / [32]	9,0 ± 0,6 / [12]	8,0 ± 1,2 / [33]
<i>hM2</i>	33,3 ± 0,4 / [3]	14,2 ± 1,6 / [11]	14,6 ± 1,6 / [46]	-	3,4 ± 0,6 / [24]
<i>hM4</i>	28,3 ± 0,1 / [3]	31,4 ± 1,5 / [7]	1,2 ± 0,1 / [6]	3,8 ± 0,4 / [8]	0,4 ± 0,1 / [7]

**Tabla 1. Características de las células de melanoma humano en cultivo.** El curso temporal de crecimiento se determinó por recuento celular mediante exclusión de azul tripán. La eficiencia de lipofección se midió como células azules teñidas por X-Gal, como se describe en MyM. El Índice Proliferativo (IP) de células sin tratar se determinó evaluando el porcentaje de células en fases S, G<sub>2</sub>/M e hiperdiploide.

De acuerdo con su gran capacidad adherente, las células de *hM2* formaron entre 5 y 10 veces más colonias que *hM1* y *hM4* respectivamente, pero no lograron formar melanoesferas (ME) en condiciones de bajo suero y baja adherencia. La línea *hM4*, exhibió la menor capacidad de formación de colonias y esferas.

En conjunto, estos parámetros basales de las líneas celulares obtenidas reflejaron la alta heterogeneidad del melanoma encontrada en la clínica (Hendrix *et al.* 2003; Quintana *et al.* 2010; Somasundaram *et al.* 2012).

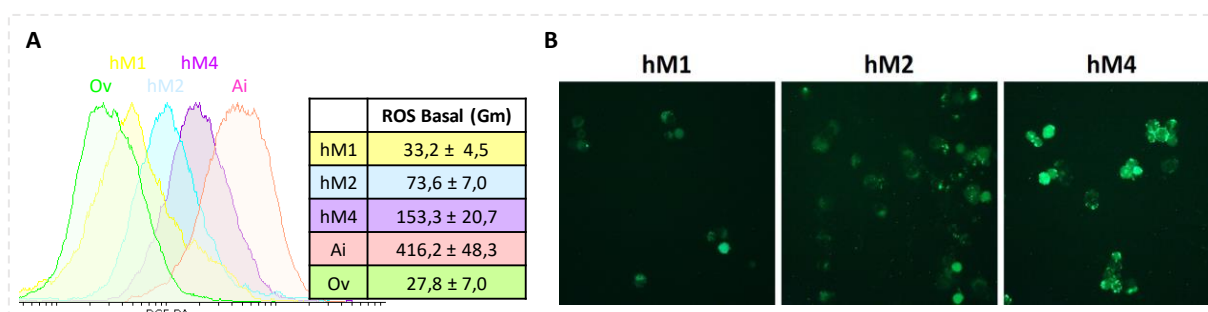
## Las líneas derivadas de melanoma exhibieron diferentes niveles basales intracelulares de ROS

Uno de los principales moduladores que actúan en la progresión tumoral son los niveles intracelulares de las especies reactivas del oxígeno (ROS). A pesar de que bajos niveles en células normales pueden ser beneficiosos, la excesiva acumulación de ROS puede promover el cáncer. Una característica de las células cancerosas, que las distingue de las células normales, es su habilidad de producir grandes cantidades de ROS y su mayor dependencia de un sistema de defensa antioxidante. Los ROS intracelulares son generados, principalmente, por las mitocondrias. Pueden modular diversas vías de señalización, vinculadas a la transformación celular, la inflamación, la supervivencia tumoral, la invasión, la

angiogénesis y la metástasis; participando en varias etapas de la progresión del cáncer (Prasad *et al.* 2016).

Independientemente de su origen, el melanoma comparte similitudes biológicas en todas las especies. Se determinó el estado oxidativo basal de las tres líneas de melanoma humano y de dos líneas de melanoma canino, extraídas quirúrgicamente de mucosa oral (*Ov*) y ocular (*Ai*), que fueron establecidas y caracterizadas previamente en el laboratorio (**Fig. 21**). A tal fin, se evaluaron los niveles intracelulares de ROS de células control utilizando la sonda DCFH<sub>2</sub>-DA. Esta sonda ingresa a la célula y, al ser oxidada por los oxidantes intracelulares emite una fluorescencia verde, tal como se describe en MyM. Como se observa en la **Fig. 21**, la línea de melanoma canino *Ai* presentó los mayores niveles de ROS basales ( $416,2 \pm 48,3$ ), seguida por *hM4* ( $153,3 \pm 20,7$ ) y *hM2* con niveles intermedios ( $73,6 \pm 7$ ). Las líneas *hM1* ( $33,2 \pm 4,5$ ) y *Ov* ( $27,8 \pm 7$ ) exhibieron los menores niveles de ROS, alcanzando niveles 10 veces menores que la línea *Ai*.

Los histogramas (**Fig. 21A**) y las imágenes observadas mediante microscopía de fluorescencia (**Fig. 21B**) confirmaron las diferencias en los niveles intracelulares de ROS entre las líneas evaluadas.

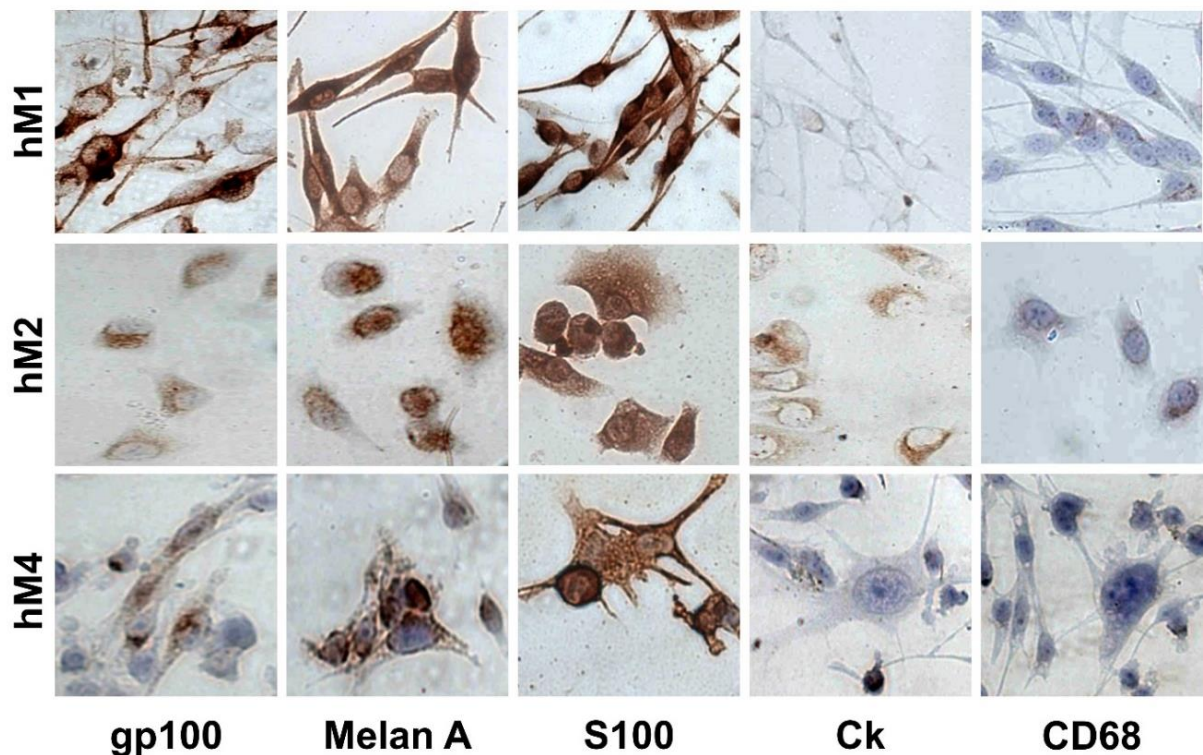


**Figura 21. Niveles basales de especies reactivas del oxígeno (ROS) de las líneas celulares de melanoma humano (*hM1*, *hM2* y *hM4*) y canino (*Ai* y *Ov*).** (A) Los niveles de ROS intracelular se determinaron mediante citometría de flujo utilizando la sonda DCFH<sub>2</sub>-DA, como se describe en MyM. Histogramas representativos de un experimento. (B) Imágenes representativas de células control de las líneas humanas incubadas con la sonda DCFH<sub>2</sub>-DA y observadas bajo microscopio de fluorescencia.

## Las células tumorales en cultivo expresaron marcadores específicos para melanoma

El melanoma maligno se origina principalmente en las células melanocíticas de la epidermis. Estas células productoras de melanina, derivan de la cresta neural, migran durante el desarrollo embrionario y se localizan en la capa basal de la epidermis, el bulbo folicular, los ojos, las orejas y las meninges. El hecho de que compartan diversas características con sus precursores melanocíticos, sugiere que las células de melanoma utilizan los programas de desarrollo de su contraparte normal para su propia progresión (Liu *et al.* 2014). Debido a su origen, los melanocitos mantienen la capacidad de diferenciarse en células tipo fibroblastoide o epitelioides. Esto dificulta la identificación del melanoma en tumores amelanóticos poco diferenciados. Los antígenos asociados a melanoma (MAA, *melanoma associated antigens*), debido a su gran sensibilidad por las células de origen melanocítico, son utilizados de rutina en la clínica para discriminar a los melanomas de otras lesiones neoplásicas. Los MAA que más contribuyen al diagnóstico diferencial, debido a que su especificidad supera el 95 %, son gp100 y Melan-A/MART-1. Este último es expresado en células pigmentadas, mientras que gp100 se expresa en melanocitos activados. Ambos marcadores están asociados con programas de proliferación celular (Hoek *et al.* 2006; Dissanayake *et al.* 2008). Como muestra la **Fig. 22** y la **Tabla 2**, la expresión de Melan A fue elevada en *hM1*, y moderada en *hM2* y *hM4*. Asimismo, las tres líneas co-expresaron gp100, sugiriendo un comportamiento

proliferativo. Debido a que la sensibilidad de estos antígenos específicos raramente excede el 90%, S100 (una isoforma de una proteína de unión a calcio) continúa considerándose como el “*standard de oro*” para la discriminación inmunohistoquímica de las células melanocíticas, a pesar de su menor especificidad (entre 75% y 87%). La especificidad reducida de S100 se debe a que se expresa tanto en tumores de origen glial, como en condrocitos, adipocitos, células dendríticas y tumores derivados de estos tejidos (Viray *et al.* 2013). De los MAA más comúnmente usados en la clínica, S100 es el más sensible, con una marcación en aproximadamente el 95% de las lesiones ensayadas. La expresión de S100 fue alta en las tres líneas celulares humanas. Las células de la línea de tipo epitelióide, *hM2*, expresaron citoqueratina (un marcador específico de queratinocitos), mientras que dicha expresión fue menor en *hM1* y nula en *hM4*. Por otro lado, las tres líneas fueron negativas para CD68 (una glicoproteína asociada a lisosomas).



**Figura 22. Detección de marcadores antigénicos específicos de melanoma mediante inmunocitoquímica.** Células crecidas por dos días sobre portaobjetos cargados fueron fijadas y teñidas con anticuerpos específicos contra gp100, Melan A, S100, citoqueratina (Ck) y CD68, como se describe en MyM, y fotografiadas bajo microscopio óptico (200X).

Línea celular	gp100	Melan A	S100	Citoqueratina	CD68	Tipo celular	BRAF	Origen
<i>hM1</i>	+	+++	+++	-	-	FB	V600E	mts NL
<i>hM2</i>	+	++	+++	+	-	EP	V600E	mts NL
<i>hM4</i>	+	++	+++	-	-	FB	<i>wt</i>	mts bazo

**Tabla 2. Marcadores tumorales y morfología de las células de melanoma humano en cultivo.** Células crecidas durante tres días fueron fijadas y tratadas para la tinción de marcadores específicos (MyM). El estado mutacional de BRAF se evaluó a partir de muestras tumorales (MyM). *wt*: *wild type*; NL: nodo linfático; mts: metástasis; FB: fibroblastoide; EP: epitelióide. El número de signos + representa una estimación semi-cuantitativa de la tinción relativa de cada marcador tumoral de las tres líneas de melanoma humano.

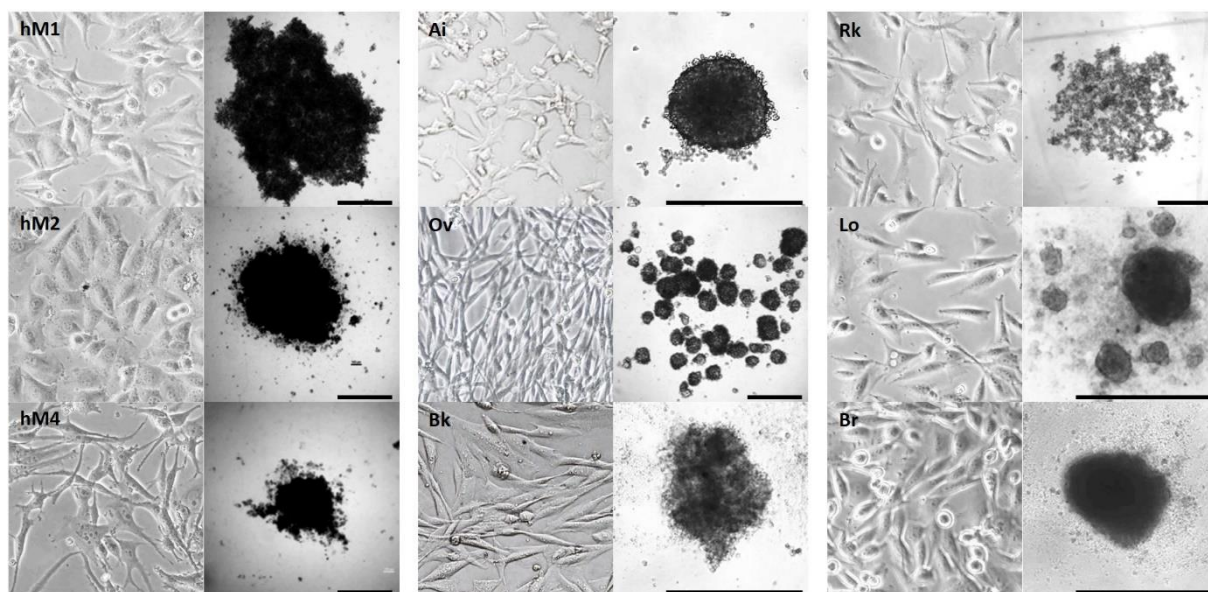
Existen alteraciones genéticas como eventos dominantes en la tumorigénesis del melanoma. Las mutaciones constitutivamente activas de BRAF (gen que codifica para la quinasa de proteínas en serina o treonina B-RAF) son encontradas en alrededor del 50% de

los melanomas. Al parecer, estas mutaciones serían adquiridas somáticamente, ya que sus genotipos normales son detectados en los tejidos normales de pacientes de melanoma. La mutación puntual más común en el gen BRAF, T1799A, causa la sustitución aminoacídica V600E, resultando en un incremento de 500 veces en la actividad quinasa inherente de BRAF, la que aumenta la división y la supervivencia celular (Wan *et al.* 2004). Teniendo en cuenta la relevancia terapéutica del oncogén BRAF, se evaluó su estado mutacional, encontrándose que las líneas *hM1* y *hM2* presentaron la mutación V600E y sólo la línea *hM4* presentó un genotipo silvestre (*wild type*) (Tabla 2).

De este modo, el análisis morfológico y la expresión de los marcadores específicos, confirmaron el diagnóstico histopatológico de melanoma.

### Las células de melanoma mostraron heterogeneidad morfológica

El melanoma espontáneo canino es un tumor extremadamente agresivo que aparece principalmente en la cavidad oral, en la almohadilla plantar y en las transiciones mucocutáneas; y posee alta similitud clínica con el melanoma humano. Ambas enfermedades son quimio y radio resistentes, poseen baja respuesta a los tratamientos convencionales, y comparten similares fenotipos y nichos metastásicos (Glikin & Finocchiaro 2014). Dado que el melanoma es un tumor altamente heterogéneo, se compararon las tres líneas de melanoma humano con seis líneas de melanoma canino, establecidas y caracterizadas previamente en el laboratorio. Estas últimas, extraídas quirúrgicamente de mucosa oral (*Bk*, *Br*, *Ov* y *Rk*), ocular (*Ai*) y metástasis hepática (*Lo*) de pacientes de nuestros protocolos clínicos veterinarios, fueron mantenidas en cultivo por más de 60 repiques.



**Figura 23. Morfología de monocapas (mc) y esferoides (esf) de células de melanoma humano y canino.** Las células fueron crecidas en placa adherente durante 3 días (mc) o en durante 13 días suspensión (esf) y fotografiadas mediante un microscopio invertido con contraste de fase (mc:100X). Barra: 500µm.

Todas las líneas celulares evaluadas fueron capaces de crecer como esferoides (esf) multicelulares. Estos agregados celulares heterogéneos son considerados modelos válidos para reproducir microrregiones tumorales o micrometástasis (Gil-Cardesa *et al.* 2010). El crecimiento tridimensional (3D) de líneas celulares está considerado un modelo más representativo y fidedigno para el análisis de drogas *in vitro*. Como reporta Kimlin *et al.* (2011), los cultivos 3D poseen características de los tumores: interacciones célula-célula, hipoxia, baja penetración de drogas, similar respuesta y resistencia, y la producción de matriz extracelular. Todos estos factores difieren de la dependencia de crecimiento y del fenotipo de

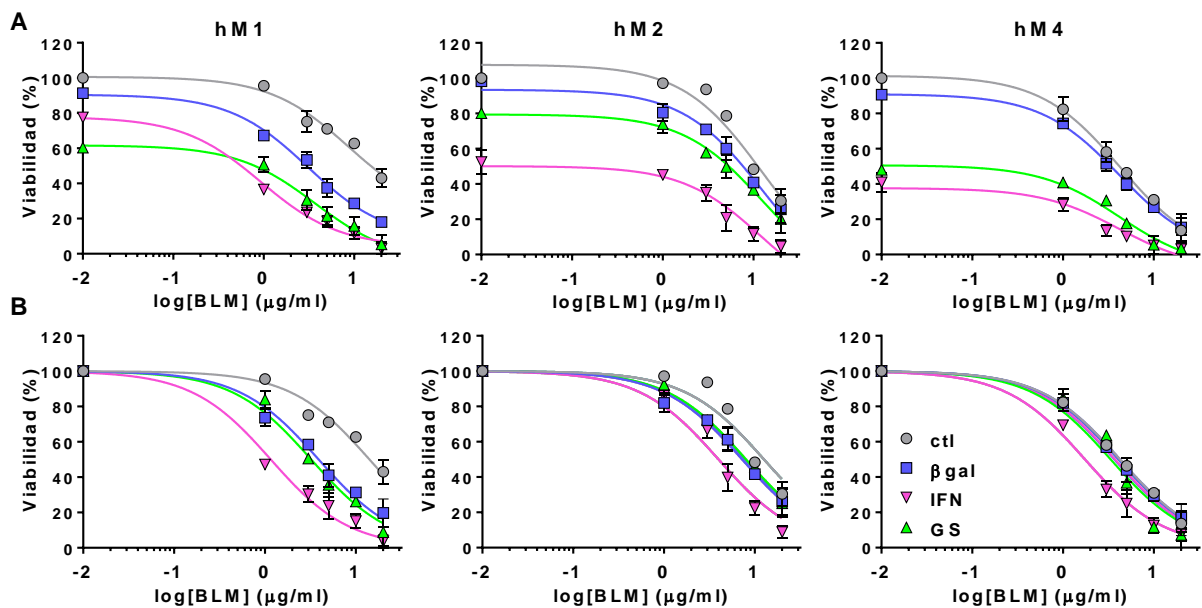
proliferación descontrolada, característicos de la monocapa. El cultivo *in vitro* en 3D constituye un modelo experimental de complejidad intermedia entre el cultivo *in vitro* convencional 2D y los modelos animales (Zanoni *et al.* 2015). En pocas palabras, los esferoides tumorales representan un modelo experimental más real para optimizar y predecir la eficacia de las terapias antitumorales en los correspondientes tumores *in vivo* (Gil-Cardeza *et al.* 2010).

De acuerdo con su gran capacidad adherente, la línea *hM2* exhibió una morfología celular de tipo epitelioide con estrechas interacciones célula-célula y célula sustrato, generando monocapas (mc) tipo “pavimento adoquinado” y esferoides altamente compactos, donde las células parecían íntimamente asociadas entre sí (**Fig. 23**). Por el contrario, las líneas humanas *hM1* y *hM4* y las líneas caninas, presentaron una morfología celular de tipo fibroblastoide, originando monocapas más dispersas, las que fueron fácilmente disgregadas por depleción de  $Ca^{2+}$ .

Mientras que los esferoides de *hM1*, *Rk* y *Bk* se mostraron como agregados laxos, en forma de racimo, donde pueden ser claramente distinguidas células individuales; *hM4*, *Ai*, *Br* y *Lo* formaron esferoides altamente compactos. Por otro lado, *Ov* que exhibió una morfología fibroblastoide en monocapa, generó esferoides múltiples, pequeños y compactos.

### La bleomicina potenció el efecto citotóxico de la lipofección del gen interferón beta en las líneas de melanoma humano

El ataque simultáneo a distintos blancos terapéuticos constituye una estrategia efectiva para el tratamiento de los pacientes oncológicos. La quimio-genoterapia puede proporcionar un abordaje interesante: combinar terapia génica con bleomicina (BLM) para aumentar la efectividad antitumoral de los tratamientos genéticos.



**Figura 24. Efecto del gen IFNβ o del GS (HSVtk/GCV) sobre la sensibilidad a BLM.** Las células se lipofectaron en placas de 96 pozos y se agregaron las diferentes concentraciones de BLM. A los 5 días se midió la viabilidad celular mediante el ensayo de APH. Se muestran las curvas dosis-respuesta a BLM de células de melanoma humano control (sin lipofectar) (○) y lipofectadas con βgal (□), IFNβ (▽) o GS (Δ) creciendo como monocapas. **(A)** Fracción de células viables con respecto al control sin lipofectar y sin droga (100%). **(B)** Fracción de células viables con respecto al control correspondiente a la lipofección sin agregado de droga (100%).

En primer lugar, se evaluó la citotoxicidad dependiente de BLM sobre monocapas de células control o lipofectadas con βgal, IFNβ o GS (+GCV). Dada la alta especificidad de la citoquina IFNβ, con cada línea celular se utilizó el gen de IFNβ correspondiente a su propia

especie (humano o canino). Como se observa en la **Fig. 24A**, la lipofección con GS eliminó cerca del 40% (*hM1*), 20% (*hM2*) y 50% (*hM4*) de las células de melanoma humano, y hasta un 95% (*hM1*), 80% (*hM2*) y 97% (*hM4*) de las mismas luego de la combinación con BLM 20 µg/ml. Por otro lado, la lipofección con IFNβ eliminó alrededor del 23% (*hM1*) y 50% (*hM2* y *hM4*) de estas células alcanzando el 97% (*hM1*), 95% (*hM2*) y 97% (*hM4*) de respuesta luego de la combinación con BLM 20 µg/ml.

El hecho de que la combinación de dos tratamientos desplazara la curva dosis respuesta de la **Fig. 24B** hacia la izquierda, disminuyendo así la dosis requerida para lograr el efecto buscado, correspondería a un efecto de potenciación. Las células *hM1* y *hM2* lipofectadas con GS (curva verde) e IFNβ (curva rosa) presentaron perfiles desplazados hacia la izquierda con respecto a la curva de BLM sin lipofectar (curva gris). La lipofección con un gen no terapéutico (βgal, curva azul), produjo un desplazamiento de la curva dosis respuesta a la BLM, similar al producido por lipofección del GS. Sólo la lipofección del gen IFNβ logró un mayor desplazamiento hacia la izquierda en las tres líneas evaluadas (**Fig. 24B**), evidenciando un efecto de potenciación mayor (superior al efecto individual de cada tratamiento) entre la BLM y la lipofección del IFNβ.

	BLM IC <sub>50</sub> (µg/ml)								
	<i>hM1</i>	vs ctl	vs βgal	<i>hM2</i>	vs ctl	vs βgal	<i>hM4</i>	vs ctl	vs βgal
ctl	14,1 ± 2,3			12,6 ± 2,2			4,2 ± 0,8		
βgal	3,9 ± 0,5	***		7,2 ± 2,5	**		4,1 ± 0,7	ns	
IFN	1,2 ± 0,1	***	***	4,0 ± 1,3	***	***	1,7 ± 0,2	***	***
GS	3,2 ± 0,5	***	ns	7,1 ± 2,3	***	ns	3,3 ± 0,4	*	ns

**Tabla 3. Las IC<sub>50</sub> de BLM en células de melanoma humano control o lipofectadas con βgal, IFNβ o GS.** Se muestran las medias ± s.e.m. de los IC<sub>50</sub> obtenidos de las curvas dosis-respuesta normalizadas. n≥3. \*p≤0,05; \*\*p≤0,01, \*\*\*p≤0,001 con respecto a ctl y βgal.

Por otro lado, la potencia de un fármaco está definida por la dosis requerida de ese fármaco para lograr el 50% de un efecto determinado (concentración inhibitoria 50: IC<sub>50</sub>, **Tabla 3**). Como muestra la **Tabla 3**, en condiciones control (sin lipofectar), se encontró que la línea *hM4* fue la más sensible a la BLM (IC<sub>50</sub> de 4 µg/ml), mientras que *hM1* y *hM2* presentaron IC<sub>50</sub> mayores a 10 µg/ml. La incorporación de BLM por lipofección inespecífica (βgal) de BLM aumentó su potencia en las células de melanoma humano poco sensibles a dicha droga (*hM1* y *hM2*), disminuyendo significativamente la IC<sub>50</sub> (p<0,001) (*hM1*: 4,5 µg/ml y *hM2*: 5,2 µg/ml). Esto no sucedió en la línea sensible, *hM4*. Estos datos corroboran resultados previos de nuestro laboratorio que demuestran que la lipofección con un gen no terapéutico (βgal), aumenta la sensibilidad a BLM en células de melanoma humano (Villaverde *et al.* 2012) y canino (Gil-Cardeza *et al.* 2013).

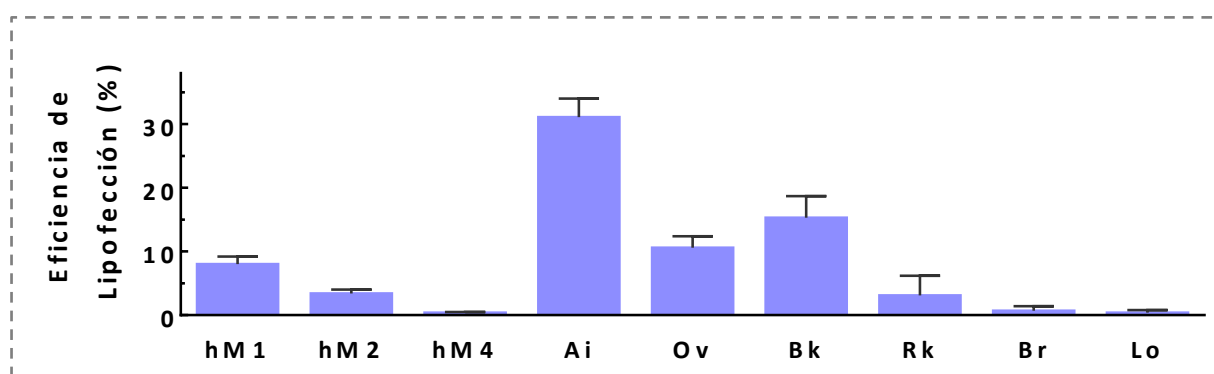
Cabe destacar que, tanto el gen del IFNβ como el GS redujeron significativamente la IC<sub>50</sub> de BLM con respecto a las monocapas sin lipofectar de las tres líneas evaluadas. Sin embargo, sólo la lipofección con el gen del IFNβ alcanzó un efecto significativo (p<0,001) sobre la IC<sub>50</sub> con respecto a la incorporación de BLM por lipofección (βgal), en las tres líneas de melanoma. Estos resultados alentaron el estudio del potencial terapéutico del tratamiento combinado de terapia génica y BLM.

### La co-administración de bleomicina aumentó el potencial terapéutico de la genoterapia en todas las líneas celulares de melanoma humano y canino

Para lograr un efecto antitumoral más potente, se estudió el efecto de la administración de 3 µg/ml de BLM sobre la lipofección del gen IFNβ o del GS, en monocapas y esferoides de

las líneas de melanoma humano y canino. Esta dosis es menor a la  $IC_{50}$  de BLM sola o lipofectada con  $\beta gal$ . Como se explicó previamente, dada la alta especificidad de la citoquina  $IFN\beta$ , con cada línea celular se utilizó el gen de  $IFN\beta$  correspondiente a su propia especie (humano o canino).

Para este ensayo, las células se lipofectaron con los genes  $\beta gal$ ,  $IFN\beta$  o GS y, 24 h después, se sembraron directamente sobre la placa (mc) o sobre cobertura de agar (esf), en ausencia o presencia de BLM. La viabilidad celular se determinó a los 5 (mc) o 13 (esf) días, mediante el ensayo de APH; como se describe en MyM. Como se muestra en la **Fig. 26**, las líneas celulares humanas (**A**) y caninas (**B** y **C**) evaluadas resultaron sensibles a la lipofección, de uno o ambos genes terapéuticos, en ambas configuraciones espaciales. Por otro lado, se calcularon las eficiencias de lipofección para cada línea celular como se describe en MyM (**Fig. 25**).



**Figura 25. Eficiencias de lipofección de las líneas humanas y caninas.** La eficiencia de lipofección se determinó mediante el recuento de células azules luego de la incubación con el sustrato X-Gal, en células previamente crecidas como monocapa y lipofectadas con el gen de  $\beta gal$  (MyM).

En las tres líneas humanas estudiadas la eficiencia de lipofección fue menor a 10% (**Tabla 1** y **Fig. 25**). La línea *hM1*, con 8% de células lipofectadas, resultó sensible al sistema GS en ambas configuraciones espaciales (**Fig. 26A**). Por otro lado, *hM2* con una eficiencia de transfección de alrededor del 3%, resultó menos sensible como monocapa, e insensible como esferoide, al sistema GS; pero muy sensible al gen del  $IFN\beta$  en ambas configuraciones espaciales. La línea celular restante, *hM4*, exhibió una sensibilidad similar a ambos tratamientos. Sorprendentemente, esta línea, a pesar de su exigua eficiencia de transfección (menor al 1%, **Tabla 1** y **Fig. 25**), presentó la mayor sensibilidad a ambos genes, creciendo como monocapa.

Las monocapas de las líneas caninas *Ov* y *Bk*, con eficiencias de lipofección mayores a 10% (**Fig. 25**), resultaron sensibles ( $p < 0,001$ ) al GS reduciendo a 39% y 57% respectivamente, las células viables (**Fig. 26B**). En cambio, el efecto citotóxico ( $p < 0,01$ ) del  $IFN\beta$  no superó el 25% en ninguna de las dos líneas. Por otro lado, se encontraron monocapas exhibiendo sensibilidad similar a ambos genes: alta citotoxicidad (mayor al 55%,  $p < 0,001$ ) en las líneas *Ai* y *Rk* (con eficiencias de transfección del 31% y 3,1%, respectivamente, **Fig. 25**), o poca citotoxicidad (menor al 30%) en las líneas *Br* y *Lo*, con una eficiencia de lipofección menor al 1%. En el caso de las líneas caninas, una baja sensibilidad al GS se correspondió con una baja eficiencia de transfección, sugiriendo que, en estas líneas es necesario alcanzar un mayor umbral en el número de células que expresan el transgen para desencadenar el efecto *bystander*.



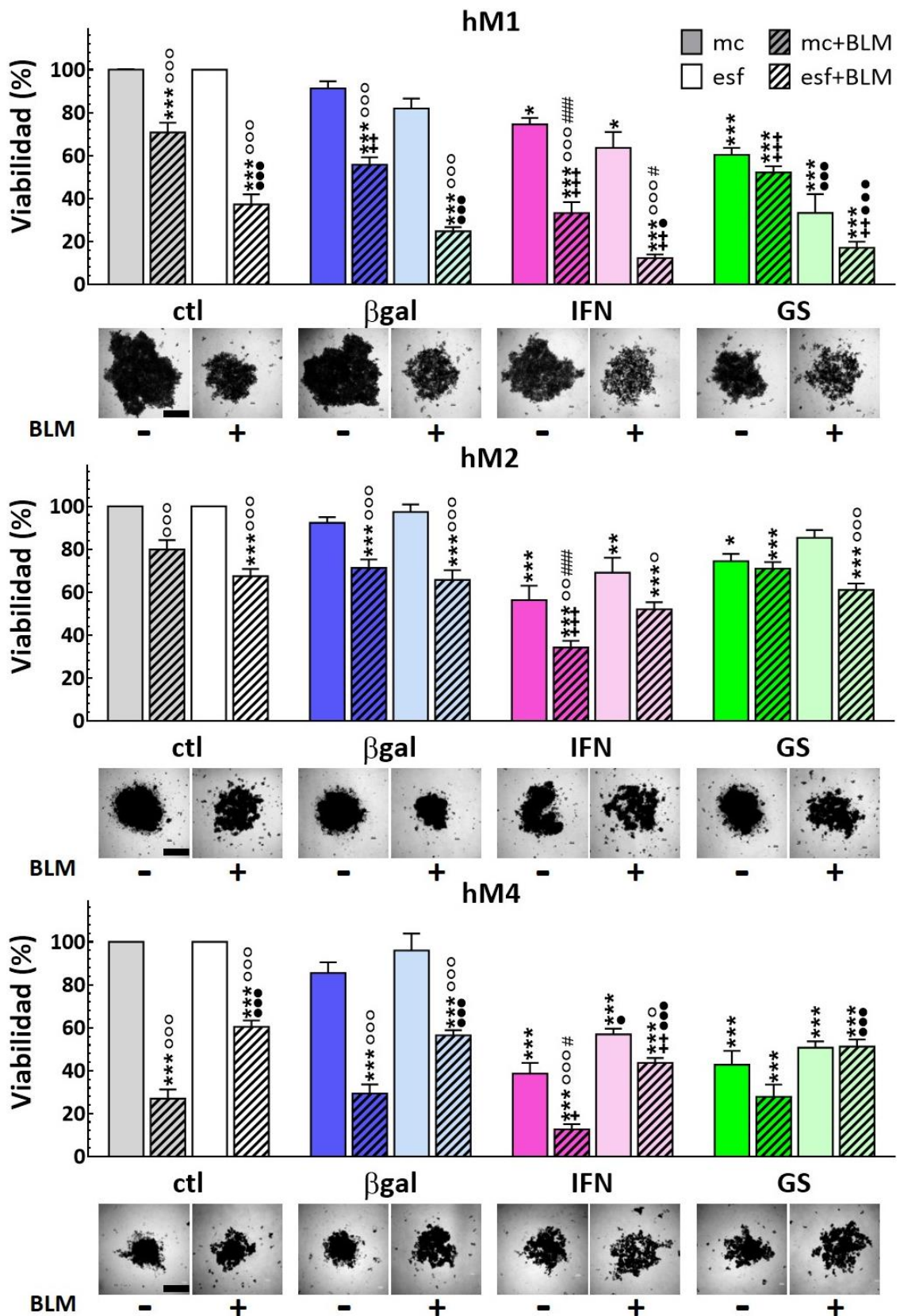


Figura 26A. Efectos de bleomicina (BLM), del gen interferón- $\beta$  (IFN $\beta$ ) y del sistema gen suicida (GS) (HSVtk/GCV) en la viabilidad de monocapas (mc) y esferoides (esf) de células de melanoma humano. Los resultados como medias  $\pm$  s.e.m. de  $n \geq 10$  experimentos independientes, se relativizaron a su respectiva condición control: mc o esf. Un símbolo:  $p < 0,05$ , dos símbolos:  $p < 0,001$ , tres símbolos:  $p < 0,0001$ .

\*vs su respectivo  $\beta$ gal;  $\circ$ BLM vs su respectivo valor en ausencia de BLM; +tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo ctl+BLM; #tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo  $\beta$ gal+BLM;  $\bullet$ esf vs su respectivo valor de mc.

**Paneles inferiores:** imágenes representativas de los esferoides de cada condición de los gráficos de barras, fotografiados mediante un microscopio invertido de contraste de fase (40X). Barra: 500  $\mu$ m.

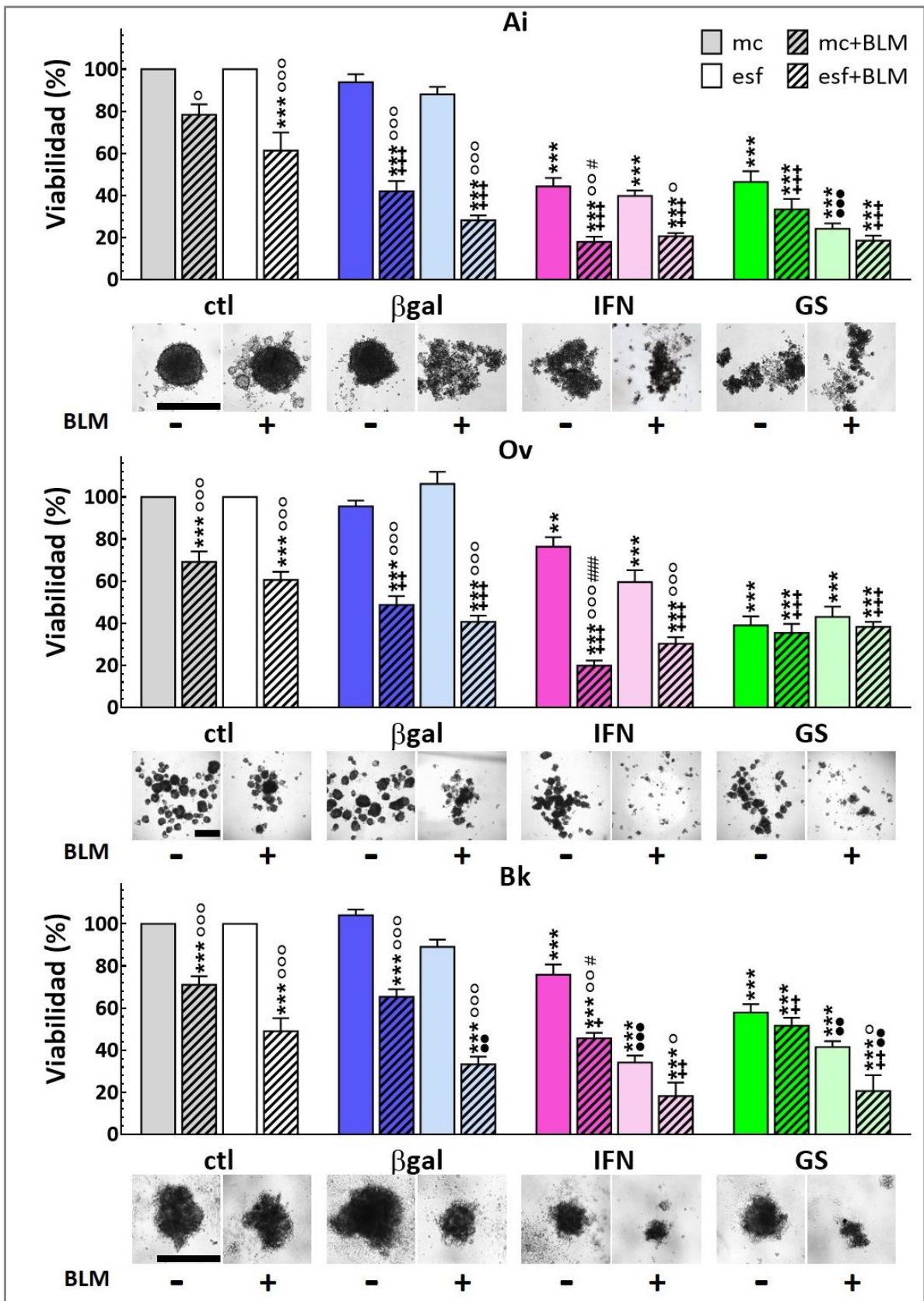


Figura 26B. Efectos de bleomicina (BLM), del gen interferón- $\beta$  (IFN $\beta$ ) y del sistema gen suicida (GS) (HSV $t$ /GCV) en la viabilidad de monocapas (mc) y esferoides (esf) de células de melanoma canino. Los resultados como medias  $\pm$  s.e.m. de  $n \geq 10$  experimentos independientes, se relativizaron a su respectiva condición control: mc o esf. Un símbolo:  $p < 0,05$ , dos símbolos:  $p < 0,001$ , tres símbolos:  $p < 0,0001$ .

\*vs su respectivo  $\beta$ gal; ○BLM vs su respectivo valor en ausencia de BLM; +tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo ctl+BLM; #tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo  $\beta$ gal+BLM; ●esf vs su respectivo valor de mc.

**Paneles inferiores:** imágenes representativas de los esferoides de cada condición de los gráficos de barras, fotografiados mediante un microscopio invertido de contraste de fase (40X). Barra: 500  $\mu$ m.

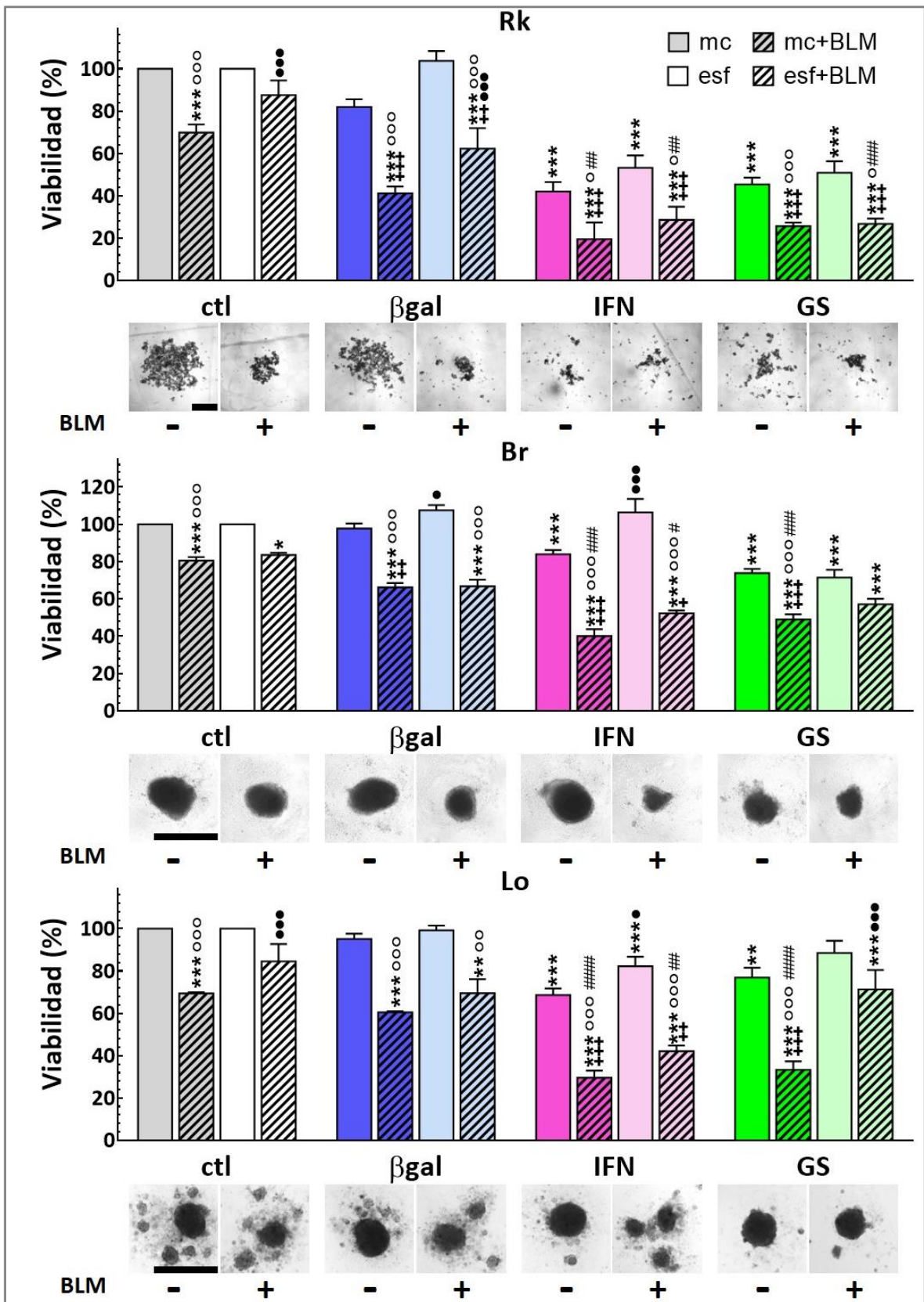


Figura 26C. Efectos de bleomicina (BLM), del gen interferón- $\beta$  (IFN $\beta$ ) y del sistema gen suicida (GS) (HSVtk/GCV) en la viabilidad de monocapas (mc) y esferoides (esf) de células de melanoma canino. Los resultados como medias  $\pm$  s.e.m. de  $n \geq 10$  experimentos independientes, se relativizaron a su respectiva condición control: mc o esf. Un símbolo:  $p < 0,05$ , dos símbolos:  $p < 0,001$ , tres símbolos:  $p < 0,0001$ .

\*vs su respectivo  $\beta$ gal; o BLM vs su respectivo valor en ausencia de BLM; +tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo ctl+BLM; #tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo  $\beta$ gal+BLM; •esf vs su respectivo valor de mc.

**Paneles inferiores:** imágenes representativas de los esferoides de cada condición de los gráficos de barras, fotografiados mediante un microscopio invertido de contraste de fase (40X). Barra: 500  $\mu$ m.

La administración de BLM sola tuvo efecto sobre todas las líneas evaluadas en ambas configuraciones espaciales (excepto en los esferoides de *Bk* y *Lo*). Sin embargo, a excepción de las líneas *hM4* y *Rk*, el efecto citotóxico de la BLM sola no superó el 30%. La lipofección con un gen no terapéutico ( $\beta$ gal) aumentó su efecto citotóxico ( $p < 0,01$ ) en seis de las nueve líneas (*hM1*, *Ai*, *Ov*, *Bk*, *Rk* y *Br*). Esto evidencia que la lipofección inespecífica aumenta la sensibilidad a BLM de las células de melanoma (Gil-Cardeza *et al.* 2013).

La combinación con BLM incrementó los efectos individuales de uno o ambos genes terapéuticos, dependiendo la línea celular evaluada (**Fig. 26**). En las líneas *Br* y *Lo*, con baja sensibilidad al GS, la combinación GS/BLM generó una mayor respuesta ( $p < 0,001$ ) que la lipofección del GS o la lipofección de  $\beta$ gal/BLM por separado.

Cabe destacar que, en las nueve líneas cultivadas como monocapa, la co-administración de BLM potenció el efecto antitumoral del gen del IFN $\beta$  (**Fig. 26**), ya que el tratamiento combinado tuvo un efecto citotóxico significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que el efecto de los tratamientos individuales (vs IFN $\beta$  y vs  $\beta$ gal+BLM). Este resultado corrobora el corrimiento de la curva dosis-respuesta a BLM de las tres líneas humanas con el gen del IFN $\beta$  (**Fig. 25**). Cuando las células fueron cultivadas como esferoides, este efecto de potenciación se mantuvo para las líneas *hM1*, *Bk*, *Br* y *Lo*.

Por otro lado, con excepción de las líneas *hM1*, *Ai* y *Bk*, las otras seis líneas presentaron igual o mayor respuesta a la quimio-genoterapia, cuando las células fueron crecidas como monocapas, que sus respectivos esferoides. Esta menor sensibilidad de los esferoides podría deberse al fenómeno llamado: resistencia multicelular (MCR, *multicellular resistance*), que refleja el fenotipo intrínseco de resistencia a los tratamientos, de la mayoría de los tumores sólidos *in vivo* (Gil-Cardeza *et al.* 2010). Las imágenes obtenidas por observación microscópica de los esferoides tratados correlacionaron con los resultados obtenidos mediante la técnica de APH (ver MyM) (**Fig. 26**).

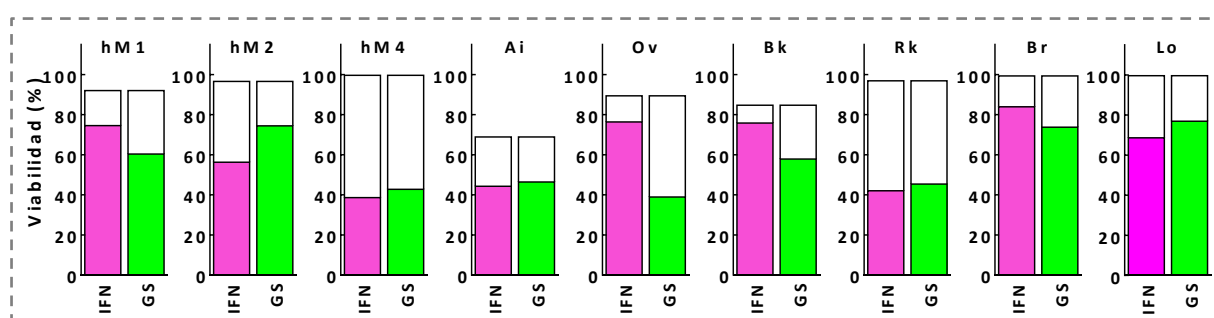
# Parte II

Mecanismos involucrados en la  
respuesta celular a la  
quimio- genoterapia

## La genoterapia indujo efecto *bystander* en las líneas evaluadas

Basta observar las bajas eficiencias de lipofección que se encontraron con el gen marcador  $\beta$ gal en las líneas tumorales estudiadas (**Fig. 25**), para reconocer que la muerte celular inducida por el gen IFN $\beta$  o el GS no se restringe, únicamente, a las células que lo expresan. Este fenómeno, que extiende la citotoxicidad producida por una terapia a las células del entorno que no fueron alcanzadas por dicha terapia, conocido como efecto *bystander*, ha sido ampliamente investigado en nuestro laboratorio (Finocchiaro *et al.* 2004; Villaverde *et al.* 2012; Rossi *et al.* 2015; Villaverde *et al.* 2016).

Este efecto citotóxico, producido por expresión de IFN $\beta$  y del GS, probablemente por la liberación de radicales libres y otros factores a las células vecinas, fue fundamental para garantizar la efectividad de esta terapia, dada la baja eficiencia de transfección que presentaron las líneas, especialmente *hM4*, *Br* y *Lo* (<1%, apenas perceptible la evidencia de incorporación del gen) (**Fig. 27**). En el caso de *hM4*, este bajo porcentaje de células expresando los genes terapéuticos fue suficiente para eliminar más del 50% las de células. Como se muestra en la **Fig. 27**, se determinó la viabilidad esperada si la citotoxicidad fuese igual al porcentaje de lipofección (barra total). La barra rellena (parte inferior) corresponde a los valores de viabilidad obtenidos en respuesta a la lipofección con IFN $\beta$  o GS. La barra vacía (parte superior) corresponde al efecto *bystander*, determinado como la resta entre los valores de viabilidad esperada y la obtenida.



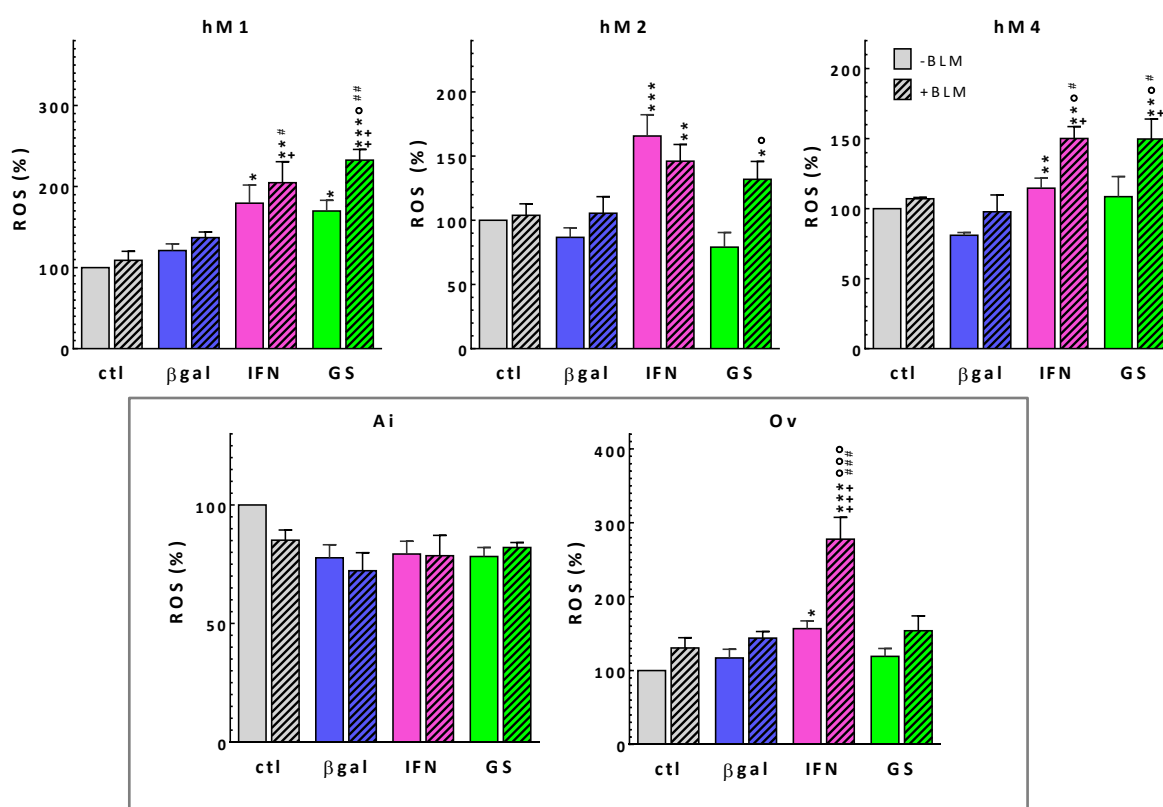
**Figura 27. Eficiencia de lipofección de cada línea celular y efecto bystander del gen del interferón- $\beta$  (IFN $\beta$ ) y del sistema gen suicida (GS) (HSVtk/GCV) en células de melanoma humano y canino, crecidas como monocapa. Se determinó la viabilidad esperada si la citotoxicidad fuese igual al porcentaje de lipofección (barra total). La barra rellena (parte inferior) corresponde a los valores de viabilidad obtenidos en respuesta a la lipofección con IFN $\beta$  o GS. La barra vacía (parte superior) corresponde al efecto *bystander*, determinado como la resta entre los valores de viabilidad esperada y la obtenida.**

## La quimio-genoterapia elevó los niveles intracelulares de especies reactivas del oxígeno

El éxito de la genoterapia y sus combinaciones antitumorales está estrechamente relacionado con los mecanismos mediadores y amplificadores de su efecto citotóxico (Villaverde *et al.* 2012; Rossi *et al.* 2015). Probablemente, el principal punto de amplificación del efecto *bystander* sería la promoción de un estado masivo de estrés oxidativo.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) son constantemente generadas y eliminadas en los sistemas biológicos. Conducen las principales vías regulatorias, como proliferación, diferenciación y viabilidad celular (Gupta *et al.* 2012; Chang *et al.* 2014). Bajo condiciones fisiológicas normales, las células controlan los niveles de ROS balanceando su generación con su eliminación. Sin embargo, bajo condiciones de estrés oxidativo, el exceso de ROS puede dañar a las macromoléculas celulares, como proteínas, lípidos y DNA (Gupta *et al.* 2012). De esta manera, de acuerdo a su nivel de exposición a ROS, la célula atravesará distintas situaciones, que abarcan desde la proliferación a la muerte (Chen *et al.* 2015).

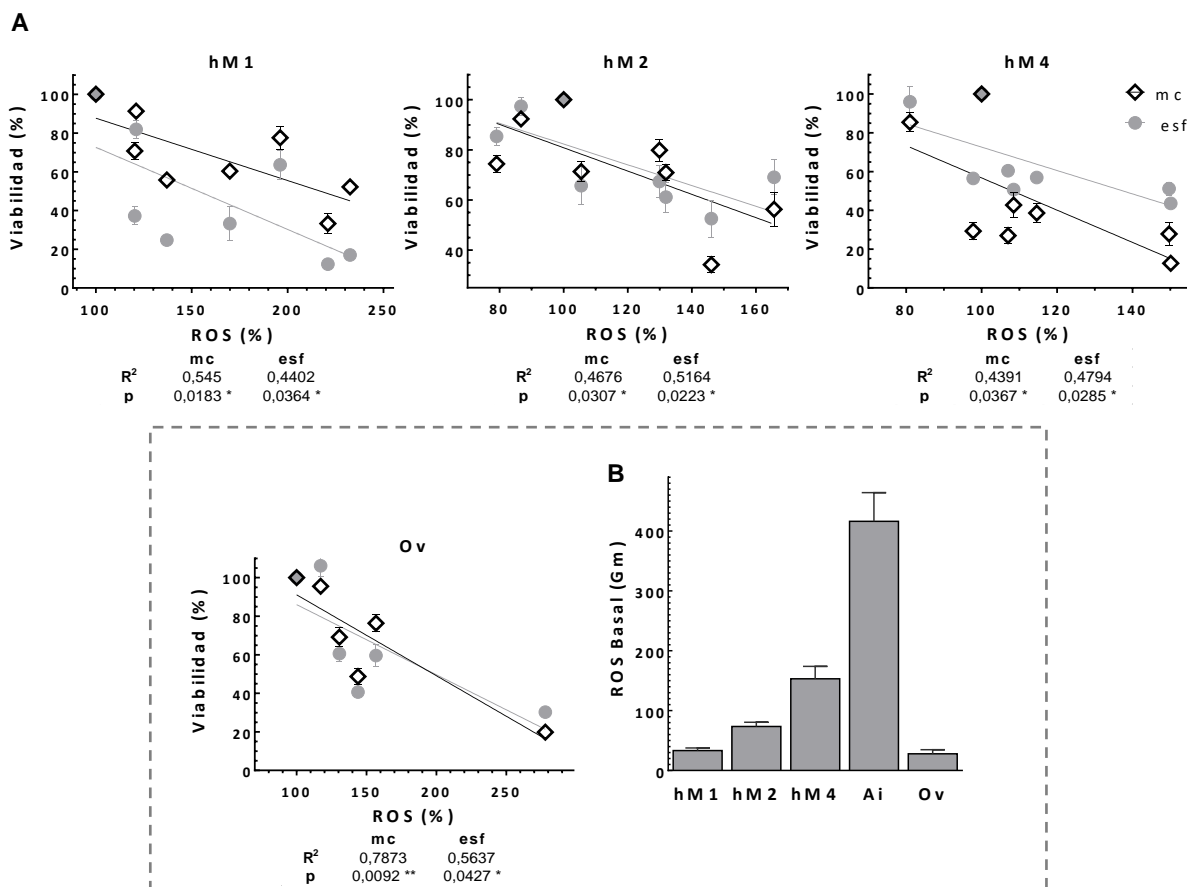
Resultados previos de nuestro laboratorio (Villaverde *et al.* 2012; Rossi *et al.* 2015) indican que la lipofección con IFN $\beta$  aumenta la concentración intracelular de ROS en líneas celulares de melanoma humano y canino. Es por ello, que se exploró una posible relación entre el aumento de los niveles de ROS y la sensibilidad de estas líneas humanas y caninas a la quimio-terapia. Como se observa en la **Fig. 28**, los tratamientos que disminuyeron la viabilidad celular, provocaron un aumento en los niveles de ROS en todas las líneas evaluadas, excepto en *Ai*. Dicha línea, que presentó los mayores niveles basales de ROS (**Fig. 29B**), no produjo un aumento de los mismos en respuesta a los tratamientos, ni a las 24, 48 (datos no mostrados) o 72 h post-tratamiento, a pesar de ser sensible a ellos. En las demás líneas, la lipofección con el gen del IFN $\beta$  aumentó ( $p < 0,05$ ) los oxidantes intracelulares con respecto a  $\beta$ gal, mientras que la lipofección con GS sólo lo hizo en la línea *hM1*. Difiriendo de lo reportado por Wallach-Dayán *et al.* (2006), donde la BLM aumentó los niveles de ROS en células epiteliales, en el presente trabajo la administración de BLM sola no resultó en un aumento significativo en los niveles de ROS. En cambio, su combinación con la lipofección del IFN $\beta$  provocó un fuerte aumento ( $p < 0,05$ ) en los niveles intracelulares de ROS, en comparación al efecto individual de cada tratamiento, en las líneas *hM4* y *Ov*. En la línea *Ov*, la combinación BLM/IFN $\beta$  casi duplicó los niveles de oxidantes intracelulares (278%), con respecto a la lipofección con IFN $\beta$  (154%). La BLM tuvo mayor efecto ( $p < 0,05$ ) sobre los niveles de oxidantes intracelulares en las líneas *hM1* y *hM4* lipofectadas con el sistema GS/GCV, en comparación al efecto de ambos tratamientos por separado.



**Figura 28.** Efectos de la lipofección del GS (HSV $\theta$ k/GCV) y del gen del IFN $\beta$  en presencia o ausencia de BLM sobre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) por las células de melanoma, crecidas como monocapa. Los niveles de ROS intracelular se midieron mediante la sonda H<sub>2</sub>DCF-DA, como se describe en MyM. \*vs su respectivo  $\beta$ gal; oBLM vs su respectivo valor en ausencia de BLM; +tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo ctl+BLM; #tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo  $\beta$ gal+BLM. Un símbolo:  $p < 0,05$ , dos símbolos:  $p < 0,01$ , tres símbolos:  $p < 0,001$ .

El aumento en los niveles de ROS correlacionó con las respuestas citotóxicas en todas las líneas evaluadas, excepto *Ai*. Las cuatro líneas exhibieron una correlación inversa ( $p < 0,05$ )

entre los niveles intracelulares de ROS y la supervivencia celular, luego de la quimio-terapia, en ambas configuraciones espaciales (**Fig. 29A**).



**Figura 29. Correlaciones entre los niveles de ROS intracelulares y la viabilidad celular** de monocapas (mc) (◇) y esferoides (esf) (●) para todos los tratamientos estudiados. **(A)** Se determinaron mediante una prueba de Pearson con el programa GraphPad. **(B)** Niveles basales de especies reactivas del oxígeno (ROS) de células de melanoma humano (*hM1*, *hM2* y *hM4*) y canino (*Ai* y *Ov*), determinados mediante citometría de flujo utilizando la sonda DCFH<sub>2</sub>-DA, como se describe en MyM.

## Los antioxidantes no lograron revertir el efecto citotóxico de la combinación BLM/IFN $\beta$ en células de melanoma

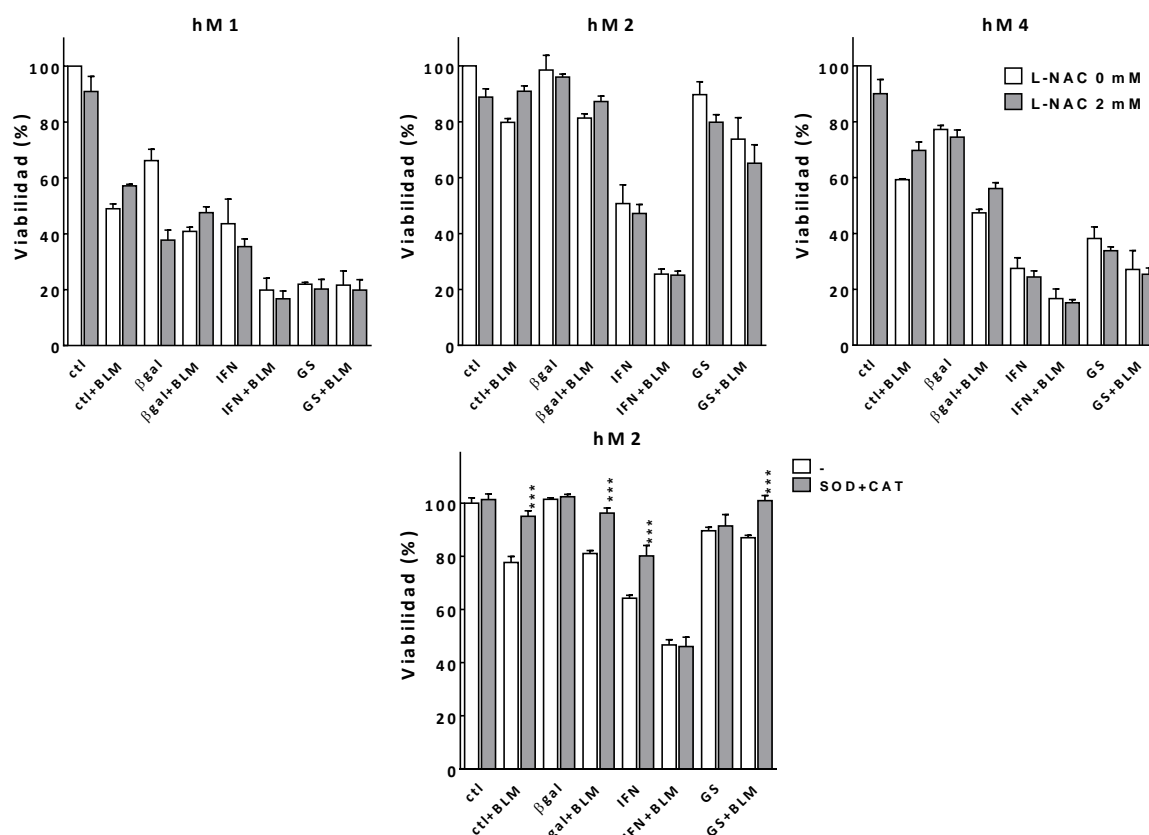
Con el fin de evaluar el rol de los oxidantes intracelulares en los efectos citotóxicos de la quimio-terapia, evaluamos el efecto del antioxidante N-acetil-L-cisteína (L-NAC) o de la combinación de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) sobre la sensibilidad de las células de melanoma humano a nuestros tratamientos.

Como se observa en la **Fig. 30**, el agregado de 2 mM de L-NAC no logró inhibir el efecto citotóxico de ninguno de los tratamientos evaluados. Esto se observó cuando el antioxidante se agregó 24 o 1 h previa a ellos. Según lo reportado por Kucuksayan *et al.* (2013), el agregado de 5 mM de L-NAC inhibió parcialmente el efecto citotóxico de la BLM en células tumorales de testículo. En el presente trabajo, se encontró que dicha concentración de L-NAC no revertía los efectos de BLM, y además poseía un efecto significativamente tóxico sobre las células de melanoma humano (datos no mostrados).

Resultados previos de nuestro laboratorio reportaron que la combinación de las enzimas antioxidantes SOD (1000 IU/ml) y catalasa (100 IU) (SOD+CAT) podía revertir el efecto citotóxico del IFN $\beta$  en líneas de melanoma humano (Villaverde *et al.* 2012). En el presente trabajo dicha combinación enzimática también revirtió el efecto tóxico del IFN $\beta$  y de



BLM sola o lipofectada con  $\beta$ gal o GS ( $p < 0,001$ ) sobre las células *hM2* (**Fig. 30**). Sin embargo, esta combinación de enzimas antioxidantes no logró inhibir el efecto citotóxico de la combinación BLM/IFN $\beta$ .



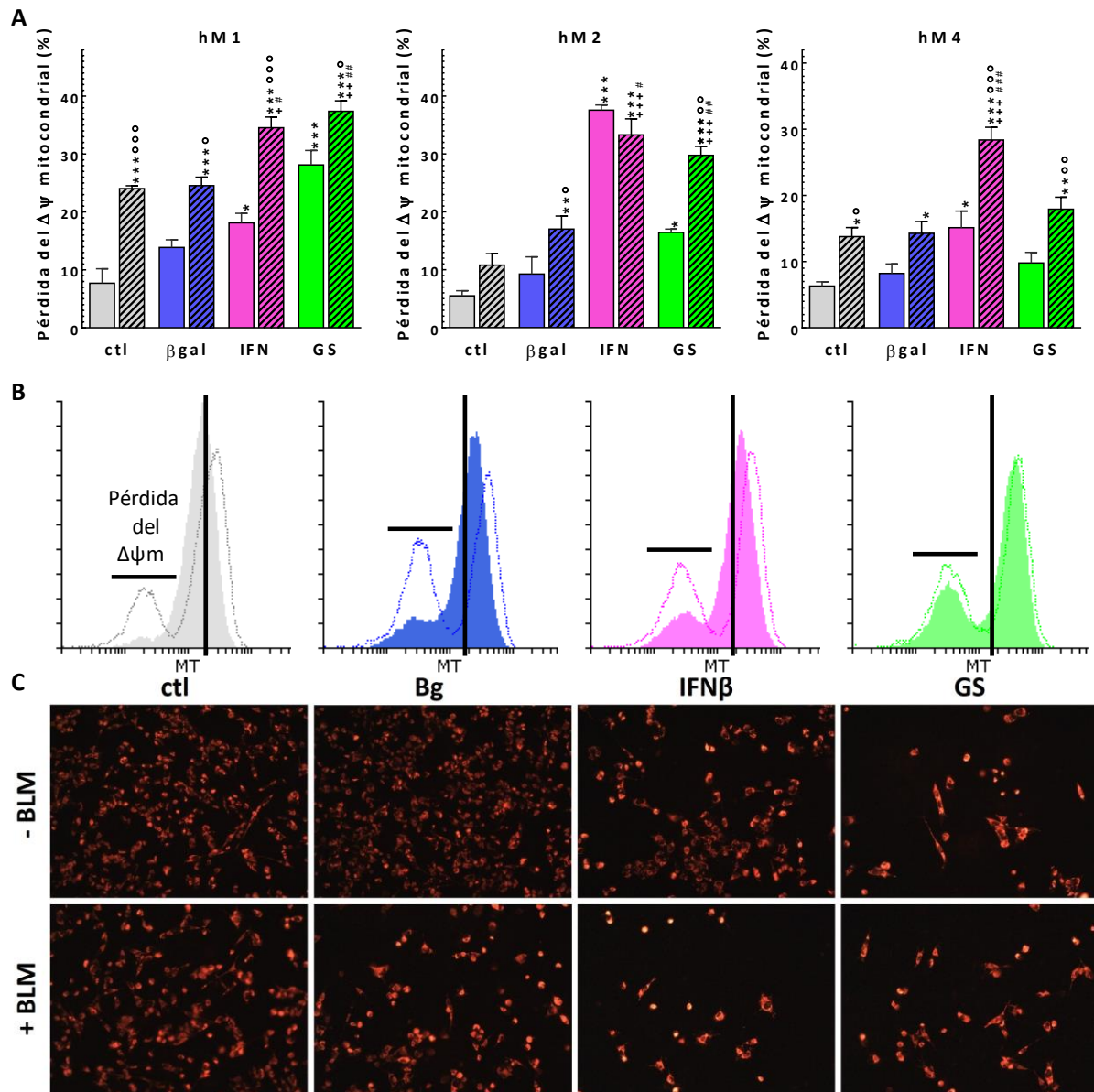
**Figura 30. Efectos de la adición de antioxidantes exógenos sobre la viabilidad de las células de melanoma humano, crecidas como monocapa y lipofectadas con GS (HSVtk/GCV) o IFN $\beta$ , en ausencia o presencia de BLM.** Se suplementó el medio de cultivo de las células, tratadas o sin tratar (control), (A) con 2 mM de L-NAC, o (B) con la combinación enzimática: 1000 IU/ml de catalasa y 100 UI/ml de SOD (CAT+SOD). Los resultados representan las medias  $\pm$  s.e.m. de  $n = 4$  experimentos independientes.

\*\*\* $p < 0,001$  vs sin agregado de antioxidante

## La quimio-genoterapia aumentó la permeabilidad de la membrana mitocondrial

La mitocondria es una organela que genera la mayor parte de la energía requerida para el buen funcionamiento de la célula eucariota. La permeabilidad mitocondrial es un importante paso en la inducción de la muerte celular. Durante este proceso, el gradiente electroquímico de la membrana mitocondrial colapsa debido a la formación de poros por las proteínas pro-apoptóticas (Henry-Mowatt *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2012).

Se evaluó la posibilidad de que la quimio-genoterapia indujera pérdida en el potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) en las líneas de melanoma humano. A tal fin, a las 72 h post-tratamiento, las células se incubaron con la sonda Mitotracker CMXRos; molécula catiónica, muy permeable a la membrana celular que se acumula en la mitocondria de manera dependiente de voltaje. Cuando la membrana mitocondrial se permeabiliza, pierde su potencial, la sonda se escapa de la organela y la fluorescencia desaparece. Al igual que con los niveles de ROS, la lipofección con el gen del IFN $\beta$  aumentó (con respecto al ctl;  $p < 0,05$ ) el porcentaje de células con pérdida del  $\Delta\psi_m$  (18% *hM1*, 38% *hM2* y 15% *hM4*) (**Fig. 31A**). La transferencia del sistema GS/GCV triplicó (respecto al ctl;  $p < 0,05$ ) la fracción de células con pérdida del  $\Delta\psi_m$  en las líneas *hM1* y *hM2*, pero no afectó significativamente las mitocondrias de *hM4*.



**Figura 31. Efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial por la lipofección del GS (HSV $tk$ /GCV) y del IFN $\beta$  en ausencia o presencia de BLM, en monocapas de células de melanoma humano. (A) Se determinó el porcentaje de células con pérdida de potencial mitocondrial, mediante la incubación con la sonda MitoTracker Red CMXRos, como se describe en MyM. Los resultados representan las medias  $\pm$  s.e.m. de  $n = 4$  experimentos independientes. (B) Histogramas e (C) imágenes (200X) representativas de la señal para MitoTracker Red CMXRos en células *hM1* a las 72 h de tratamiento. Histograma lleno: en ausencia de BLM; Histograma vacío: en presencia de BLM.**

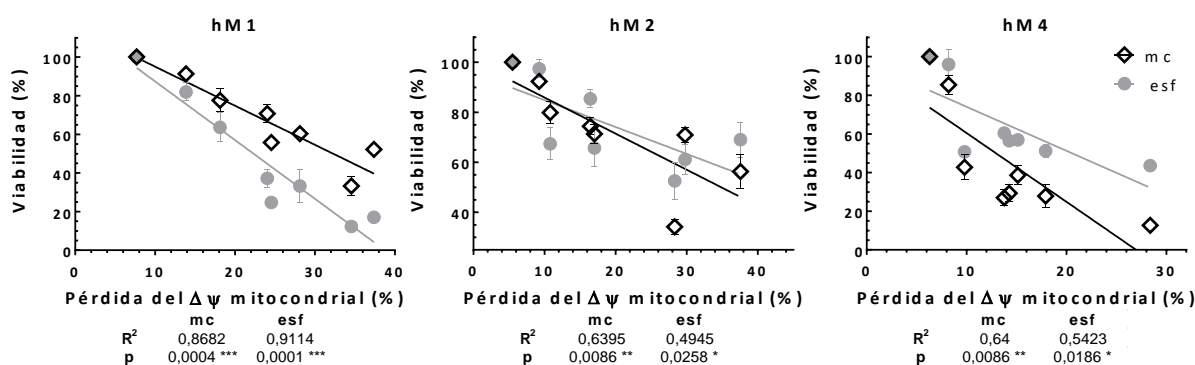
\*vs su respectivo  $\beta$ gal;  $\circ$ BLM vs su respectivo valor en ausencia de BLM; +tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo *ctl*+BLM; #tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo  $\beta$ gal+BLM. Un símbolo:  $p < 0,05$ , dos símbolos:  $p < 0,01$ , tres símbolos:  $p < 0,001$ .

Según lo reportado por Mungunsukh *et al.* (2010), concentraciones similares de BLM a las usadas aquí, inducen despolarización mitocondrial en células endoteliales de pulmón. En el presente trabajo se encontró que su administración por lipofección inespecífica ( $\beta$ gal/BLM) generó disminución del potencial mitocondrial en más del 10% de las células de las tres líneas humanas ( $p < 0,05$ ), pero sólo lo hizo en *hM1* y *hM4*, cuando la droga se administró sin lipofectar. El agregado de BLM a la lipofección del IFN $\beta$  resultó en un fuerte aumento ( $p < 0,05$ ) en la fracción celular con pérdida de  $\Delta\psi_m$  con respecto a ambos tratamientos por separado en las líneas *hM1* y *hM4*; pero no en *hM2*, altamente sensible al IFN $\beta$ . La combinación BLM/GS incrementó ( $p < 0,05$ ) el porcentaje de células con

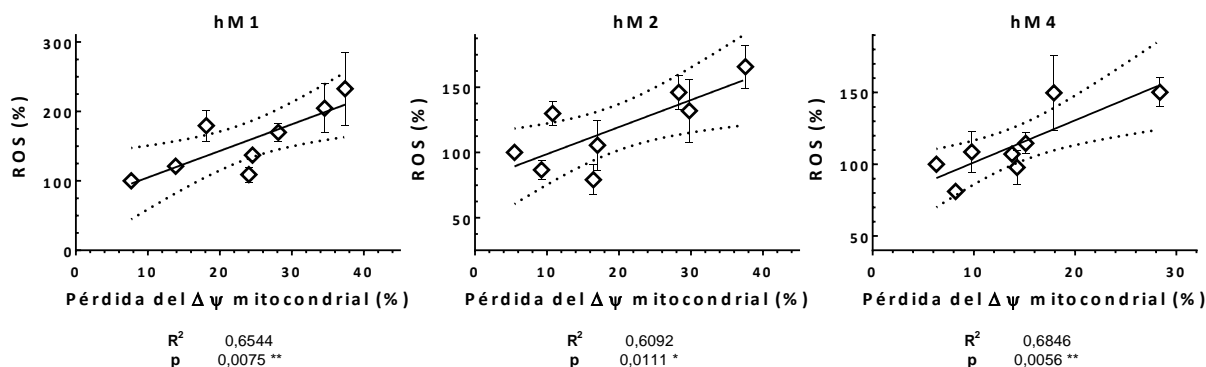
despolarización mitocondrial en comparación a los efectos de cada tratamiento por separado, en el caso de las líneas *hM1* y *hM2*, resultando en más de un 30% de células con despolarización mitocondrial en ambas líneas.

La fracción celular con despolarización de la membrana mitocondrial correlacionó con las respuestas citotóxicas en todas las líneas evaluadas. Se observó una correlación inversa ( $p < 0,05$ ) entre la pérdida de  $\Delta\psi_m$  y la supervivencia celular, luego de la quimio-genoterapia, para las tres líneas evaluadas (**Fig. 32**). Los tratamientos que exhibieron efecto citotóxico indujeron despolarización mitocondrial. Por otro lado, las imágenes de la **Fig. 31C** y el corrimiento hacia la derecha del pico de emisión de Mitotracker de las células tratadas, en especial en la combinación genoterapia/BLM (**Fig. 31B**), sugieren que las células sobrevivientes a los tratamientos presentaron una hiperpolarización de la membrana mitocondrial, hecho que les conferiría mayor resistencia a la apoptosis/necrosis.

Es interesante destacar que la pérdida de  $\Delta\psi_m$  aumentó paralelamente con los niveles de ROS intracelulares ( $p < 0,05$ ). Como se muestra en la **Fig. 33**, se encontró una correlación directa entre los niveles de ROS y la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, inducidos por los tratamientos en las tres líneas humanas.



**Figura 32. Correlaciones entre la fracción celular con pérdida del  $\Delta\psi_m$  y la viabilidad celular** de monocapas (mc) ( $\diamond$ ) y esferoides (esf) ( $\bullet$ ) para todos los tratamientos estudiados. Se determinaron mediante la prueba de Pearson con el programa GraphPad.

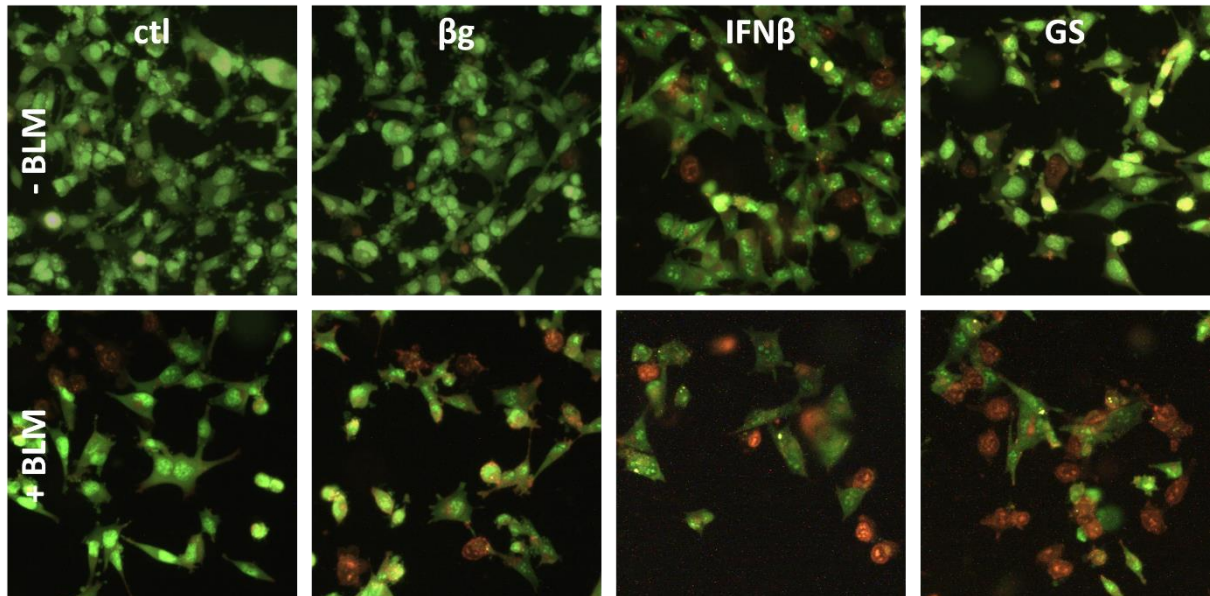


**Figura 33. Correlaciones entre los niveles de ROS y la fracción celular con pérdida del  $\Delta\psi_m$**  para todos los tratamientos estudiados. Se determinaron mediante la prueba de Pearson con el programa GraphPad.

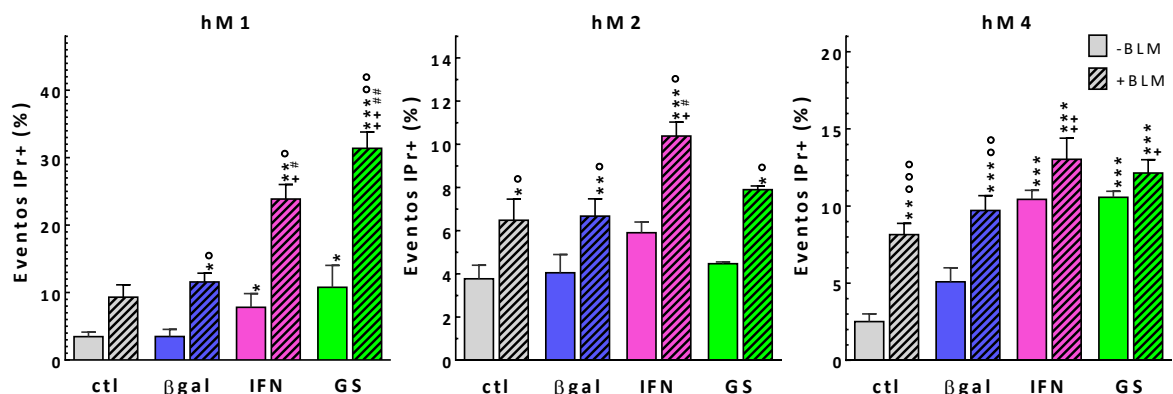
## La quimio-genoterapia causó eventos de apoptosis tardía/necrosis en células de melanoma humano

La doble tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BE) (Squier & Cohen 2001) permitió la observación de eventos de apoptosis/necrosis en células *hM1* luego del tratamiento con quimio-genoterapia a distintos tiempos (48, 72 y 144 h). El NA penetra en todas las células debido a que la membrana celular es permeable a dicho colorante. Por el

contrario, el BE ingresa únicamente en células muertas o en proceso de muerte, cuyas membranas celulares se encuentran comprometidas. La combinación de ambos colorantes en la misma célula provoca un cambio de color de verde a naranja/rojizo.



**Figura 34. Apoptosis/necrosis producida por la lipofección del GS (HSVtk/GCV) y del gen del IFN $\beta$  en presencia o ausencia de BLM, en la línea de melanoma humano *hM1* (100X).** Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos. A las 48 h post tratamiento, se tiñeron con NA/BE para evaluar células viables (verdes), apoptóticas tempranas (núcleos compactos amarillos) y necróticas o apoptóticas tardías (rojas).



**Figura 35. Efectos de la lipofección del GS (HSVtk/GCV) y del gen del IFN $\beta$  en presencia o ausencia de BLM sobre la permeabilidad de las células de melanoma al yoduro de propidio (IPr).** Las células crecidas como monocapa se cosecharon, se incubaron con IP, y luego se analizaron por citometría de flujo, como se describe en MyM. Los resultados representan las medias  $\pm$  s.e.m. de  $n > 3$  experimentos independientes.

\*vs su respectivo  $\beta$ gal;  $\circ$ BLM vs su respectivo valor en ausencia de BLM; +tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo  $ctl+BLM$ ; #tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo  $\beta$ gal+BLM. Un símbolo:  $p < 0,05$ , dos símbolos:  $p < 0,01$ , tres símbolos:  $p < 0,001$ .

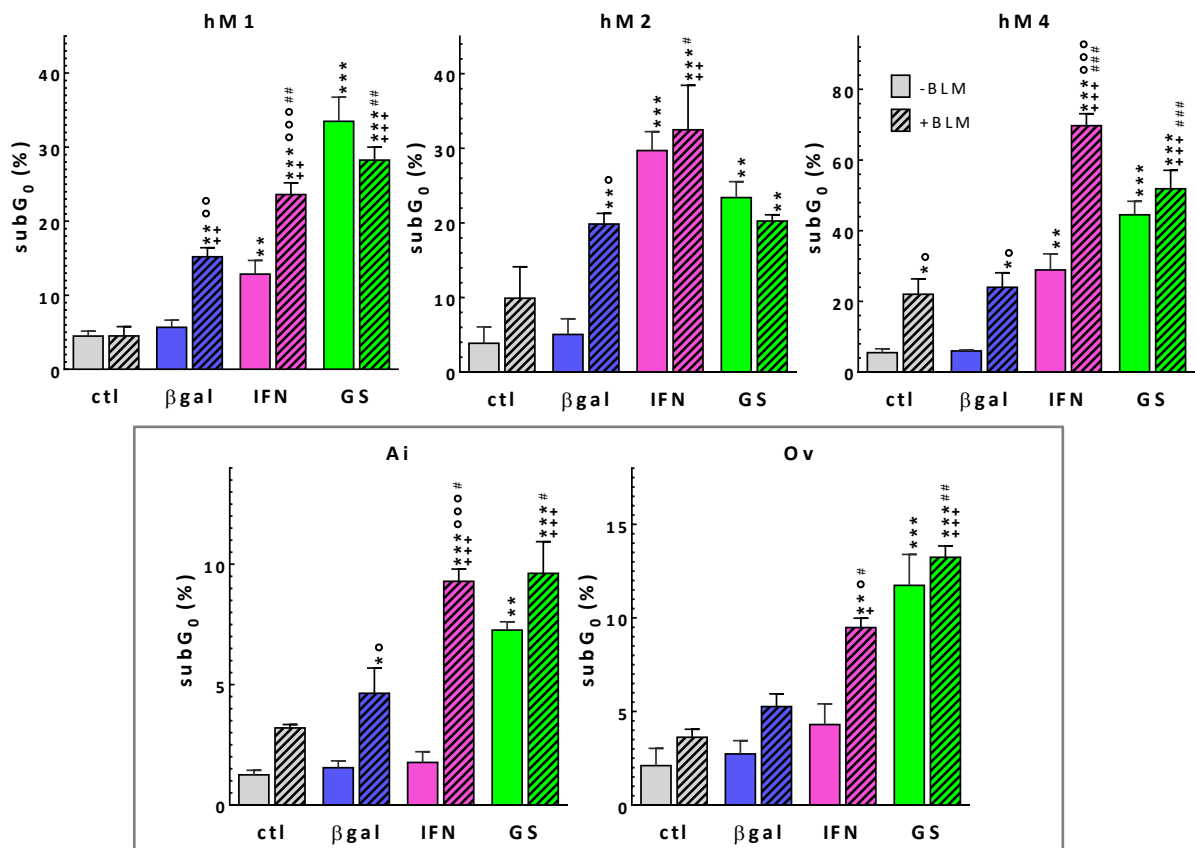
Como se muestra en la **Fig. 34**, se encontró que las células *hM1* control o lipofectadas con  $\beta$ gal, se mostraron mayormente como estructuras verdes, redondas e intactas. A las 48 h, todos los tratamientos, a excepción del control, generaron la aparición de células de color naranja-rojizo, sugiriendo eventos de apoptosis tardía y necrosis. Esto último se vio exacerbado en el caso de los tratamientos combinados BLM/GS o BLM/IFN $\beta$ .

Con el fin de cuantificar este proceso, se utilizó la citometría de flujo para evaluar la integridad de membrana mediante la incorporación de yoduro de propidio (IPr), el cual ingresa a las células que tienen la membrana celular dañada. Las células cuya membrana se encuentre comprometida darán señal positiva para IPr (apoptosis tardía o necrosis), mientras

que las células viables o apoptóticas tempranas serán IPr negativas. De acuerdo con lo observado con la tinción de NA/BE, la línea *hM1* exhibió pérdida de integridad de membrana a las 48 h post-lipofección de los genes IFN $\beta$  y GS ( $p < 0,01$ ). Esto se vio exacerbado cuando ambos genes se combinaron con BLM (**Fig. 35**). Esta misma tendencia se observó en el caso de la línea *hM4*. En cambio, en la línea *hM2*, sólo BLM (pero no la genoterapia) logró aumentar los niveles de incorporación de IPr.

## Los tratamientos aumentaron la fracción subG<sub>0</sub> en las líneas de melanoma

El análisis del estado replicativo de la población celular se realizó por agregado de yoduro de propidio (IPr) post fijación con etanol. El IPr se intercala estequiométricamente entre los ácidos nucleicos resultando en una emisión de fluorescencia proporcional al contenido de DNA de la célula. A causa de la generación de fragmentos de bajo peso molecular durante los procesos de muerte celular, las células en dicho estado pueden ser identificadas en los histogramas del contenido de DNA como la fracción hipodiploide o subG<sub>0</sub>. Como resultado de la estos procesos de muerte celular, las células quedan con menor contenido de DNA en comparación con las células viables, que puede ser fácilmente distinguido por citometría de flujo (Henry *et al.* 2013).

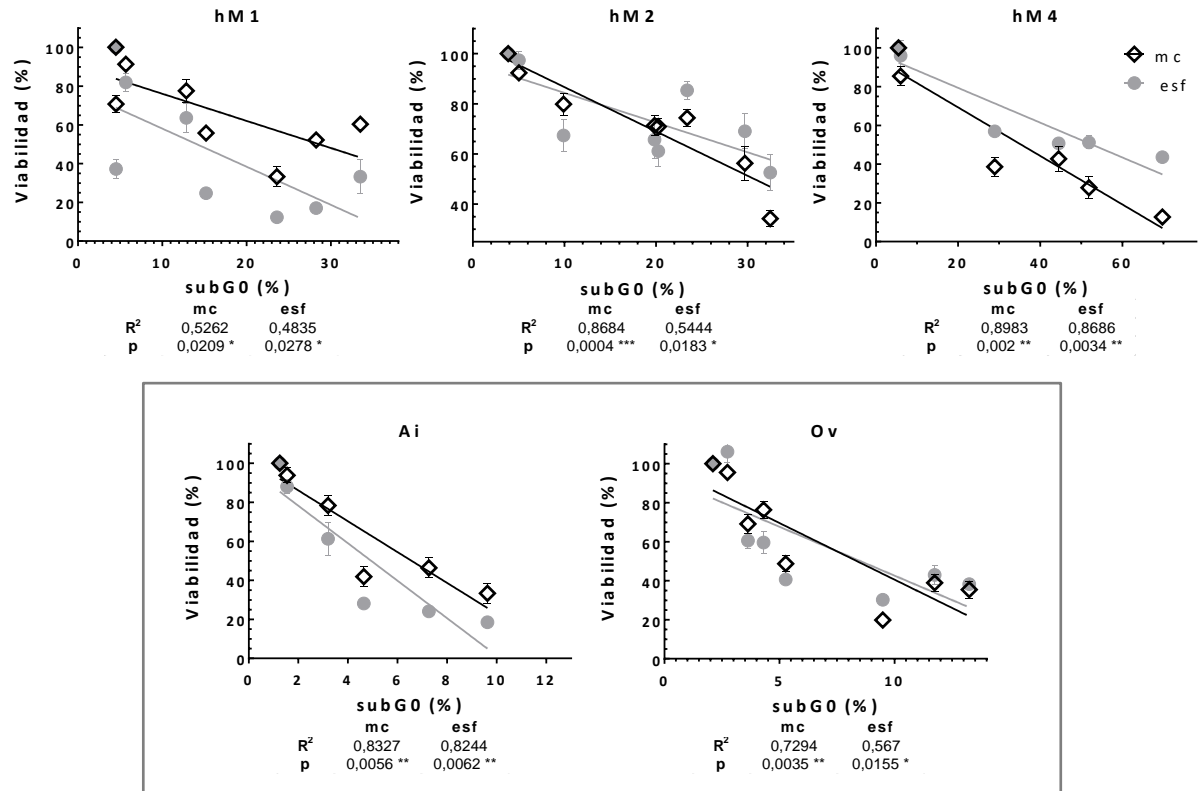


**Figura 36. Efectos de la lipofección del GS (HSV $tk$ /GCV) y del IFN $\beta$  en ausencia o presencia de BLM sobre la fracción subG<sub>0</sub> en células de melanoma.** Las células crecidas como monocapa se cosecharon, fijaron y tiñeron con yoduro de propidio. El contenido de DNA se analizó por citometría de flujo como se describió en MyM. Se determinó el porcentaje de eventos en la fase subG<sub>0</sub>. Los resultados representan la media  $\pm$  s.e.m. de  $n \geq 4$  experimentos independientes.

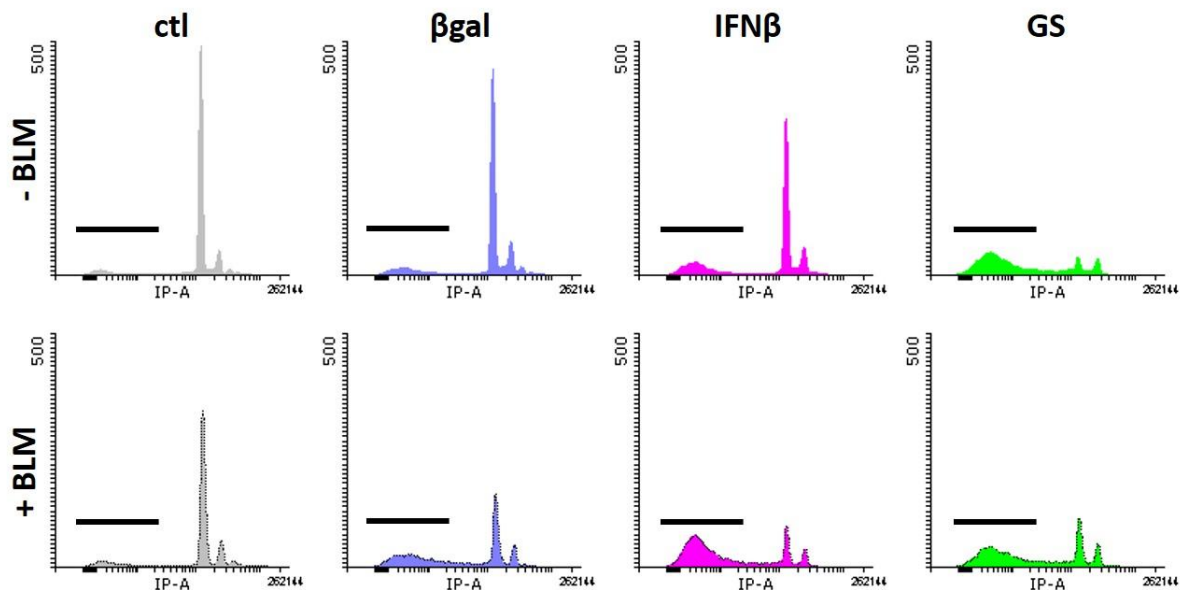
\*vs su respectivo  $\beta$ gal;  $\circ$ BLM vs su respectivo valor en ausencia de BLM; +tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo  $ctl + BLM$ ; #tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo  $\beta$ gal+BLM. Un símbolo:  $p < 0,05$ , dos símbolos:  $p < 0,01$ , tres símbolos:  $p < 0,001$ .

Para profundizar la comprensión de la respuesta celular a la quimio-genoterapia, se examinaron los efectos en el contenido del DNA celular, a las 72 h post-tratamiento. El análisis

de los resultados obtenidos por citometría de flujo sugirieron que los tratamientos provocaron un incremento en la proporción de células en la fase subG<sub>0</sub>, marcador de fragmentación del DNA. Como se observa en la **Fig. 36**, la lipofección con GS aumentó más de 5 veces la fracción hipodiploide (con respecto al ctl) en todas las líneas evaluadas ( $p < 0,001$ ). La genoterapia con IFN $\beta$  indujo un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) de la fracción subG<sub>0</sub> sólo en las líneas humanas, alcanzando niveles 10 veces mayores que el control en la línea *hM2*.



**Figura 37. Correlaciones entre el porcentaje de eventos subG<sub>0</sub> y la viabilidad celular de monocapas (mc) (◇) y esferoides (esf) (●) a todos los tratamientos estudiados, determinadas mediante la prueba de Pearson con el programa GraphPad**



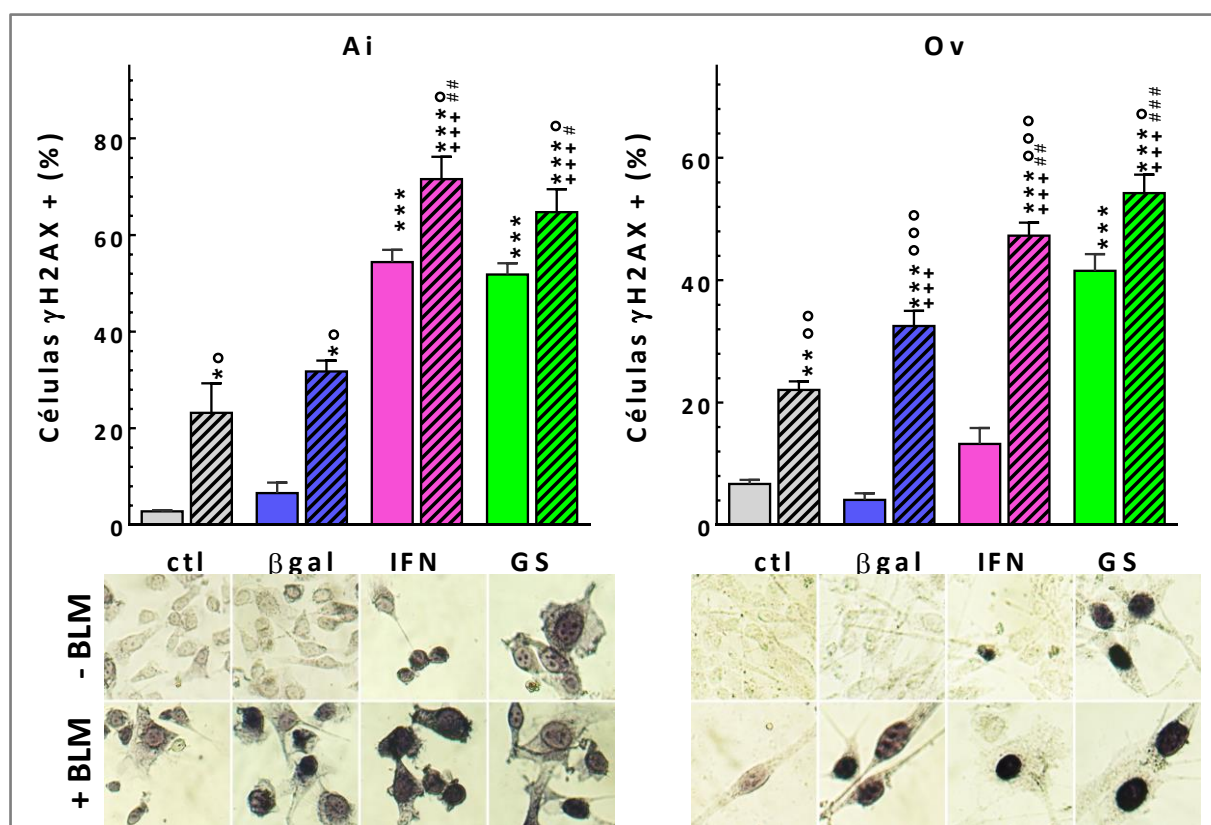
**Figura 38. Histogramas representativos del perfil del ciclo celular de *hM1*. Barra: fracción subG<sub>0</sub>.**

El tratamiento con BLM (sin lipofectar) indujo aumento en la fracción hipodiploide únicamente en células *hM4* ( $p < 0,05$ ). Este resultado era de esperarse debido a la alta sensibilidad de esta línea a la BLM. A pesar de que la incorporación de BLM por lipofección produjo un aumento ( $p < 0,05$ ) en la fracción subG<sub>0</sub> en todas las líneas evaluadas (excepto *Ov*), dicha fracción no superó el 20% de los eventos en ningún caso. La combinación BLM/lipofección del IFN $\beta$  provocó un fuerte incremento ( $p < 0,05$ ) en la fracción subG<sub>0</sub> en comparación con la droga o el gen de la citoquina por separado en todas las líneas evaluadas, excepto en el caso de la línea *hM2*. Este resultado refleja el efecto de potenciación de la combinación BLM/IFN $\beta$  observado sobre la viabilidad celular. En cambio, el agregado de BLM no logró aumentar la fracción hipodiploide producida por la lipofección del GS.

Por otro lado, independientemente de la especie de la que proviene la línea celular, se encontró una correlación significativa ( $p < 0,05$ ) entre la fracción celular en fase subG<sub>0</sub> y la viabilidad de las células tratadas, en las líneas evaluadas (**Fig. 37**).

### La quimio-terapia aumentó el daño al DNA en las líneas de melanoma

Un excelente método para la detección de daño al DNA es la formación de  $\gamma$ H2AX (fosfo-H2AX), pues es una respuesta celular, rápida y sensible, a la presencia de cortes doble hebra (DSB) en el DNA (Kuo & Yang 2008). Cuando el daño al DNA forma DSB, ya sea por causas endógenas o exógenas, es siempre, seguido por la fosforilación de la histona H2AX en el residuo serina 139 (Rogakou *et al.* 1998).



**Figura 39. Efectos de la lipofección del GS (HSVtk/GCV) y del IFN $\beta$  en ausencia o presencia de BLM en la fosforilación de H2AX en células de melanoma canino (Ai y Ov), sembradas sobre cubreobjetos. La presencia de  $\gamma$ H2AX fue analizada mediante inmunocitoquímica (MyM), 72 h post- tratamientos. Se cuantificó el % de células con núcleos positivos para  $\gamma$ H2AX con respecto al número de células totales. Los resultados representan las medias  $\pm$  s.e.m. de 3 experimentos independientes.**

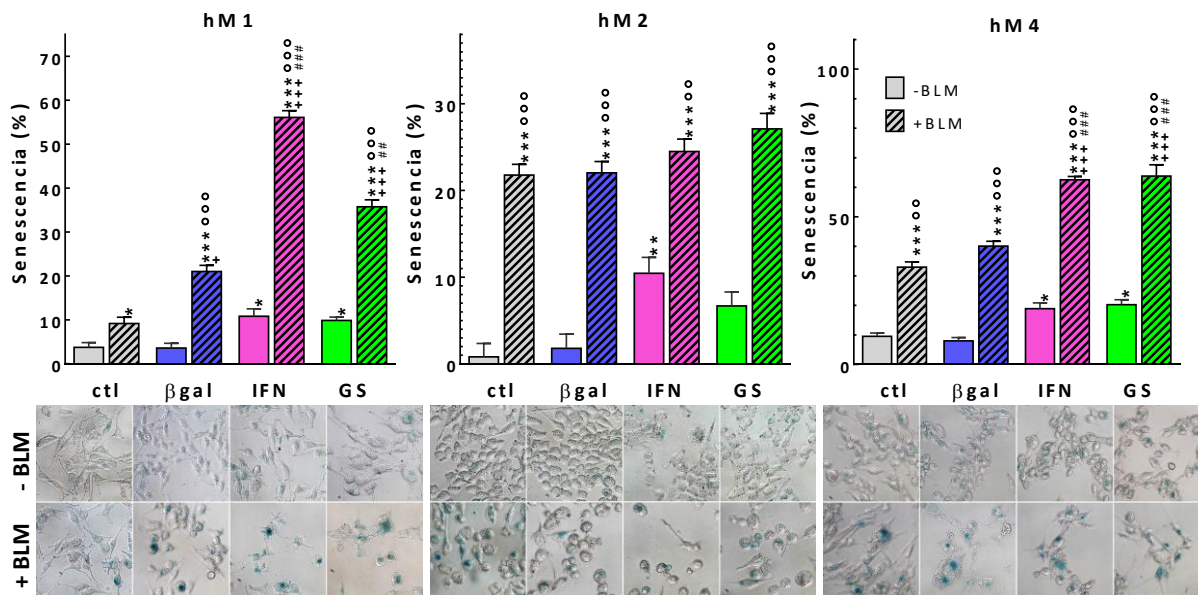
\*vs su respectivo  $\beta$ gal;  $\circ$ BLM vs su respectivo valor en ausencia de BLM; +tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo  $\beta$ gal+BLM; #tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo  $\beta$ gal+BLM. Un símbolo:  $p < 0,05$ , dos símbolos:  $p < 0,01$ , tres símbolos:  $p < 0,001$ .

**Paneles inferiores:** Imágenes representativas de la detección de  $\gamma$ H2AX mediante inmunocitoquímica (200X).

Se evaluó el estado de fosforilación de la histona H2AX en las líneas caninas *Ai* y *Ov* por inmunocitoquímica con un anticuerpo específico contra  $\gamma$ H2AX, a las 72 h post-tratamiento (Fig. 39). En concordancia con lo encontrado al analizar la fracción hipodiploide, la lipofección del GS aumentó más de 10 veces la marcación de  $\gamma$ H2AX en ambas líneas (respecto del control;  $p < 0,001$ ), alcanzando un 52% (*Ai*) y 41% (*Ov*). Luego de ser lipofectadas con el gen del IFN $\beta$ , el 54% de las células de *Ai* resultaron positivas para  $\gamma$ H2AX ( $p < 0,001$ ), no así la línea poco sensible al IFN $\beta$ , *Ov*. Coherentemente con su actividad endonucleasa, la BLM, aumentó ( $P < 0,05$ ) la fosforilación de H2AX con respecto al control, alcanzando un 20% (BLM sola) y 30% (lipofección  $\beta$ gal/BLM) de células positivas para  $\gamma$ H2AX en ambas líneas. Cabe destacar que, la combinación de BLM con los genes terapéuticos (GS e IFN $\beta$ ) indujo un fuerte aumento en la fosforilación de H2AX en comparación a los tratamientos por separado, en ambas líneas.

## Los tratamientos, en especial la bleomina, indujeron senescencia precoz en las líneas de melanoma humano

La senescencia celular es un estado donde las células ya no pueden seguir dividiéndose, a pesar de la presencia de los factores de crecimiento apropiados. Este estado puede ser inducido por el acortamiento de los telómeros (senescencia replicativa) o por señales independientes de telómeros, como el daño al DNA y el estrés oxidativo (senescencia inducida por estrés). El estado de senescencia celular se asocia con: (i) arresto irreversible del crecimiento; (ii) aumento del tamaño celular y (iii) de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia ( $\beta$ gal AS); y (iv) mayor expresión de los inhibidores del ciclo celular como p16 o p21 (Aoshiba *et al.* 2003).



**Figura 40. Efectos de la lipofección del GS (HSV $tk$ /GCV) y del IFN $\beta$  en ausencia o presencia de BLM sobre la senescencia precoz, en células de melanoma humano, crecidas como monocapa.** Se evaluó la actividad de la  $\beta$ gal AS (MyM), en células de melanoma humano a las 72 h post-tratamiento. Los resultados representan las medias  $\pm$  s.e.m. de n: 4 experimentos independientes.

\*vs su respectivo  $\beta$ gal;  $\circ$ BLM vs su respectivo valor en ausencia de BLM; +tratamiento combinado BLM/genos vs su respectivo  $\beta$ gal+BLM; #tratamiento combinado BLM/genos vs su respectivo  $\beta$ gal+BLM. Un símbolo:  $p < 0,05$ , dos símbolos:  $p < 0,01$ , tres símbolos:  $p < 0,001$ .

**Paneles inferiores:** Imágenes representativas de la morfología y la actividad de la  $\beta$ gal AS (azul) de las líneas humanas, a las 72 h de tratamiento con quimio-terapia (200X).

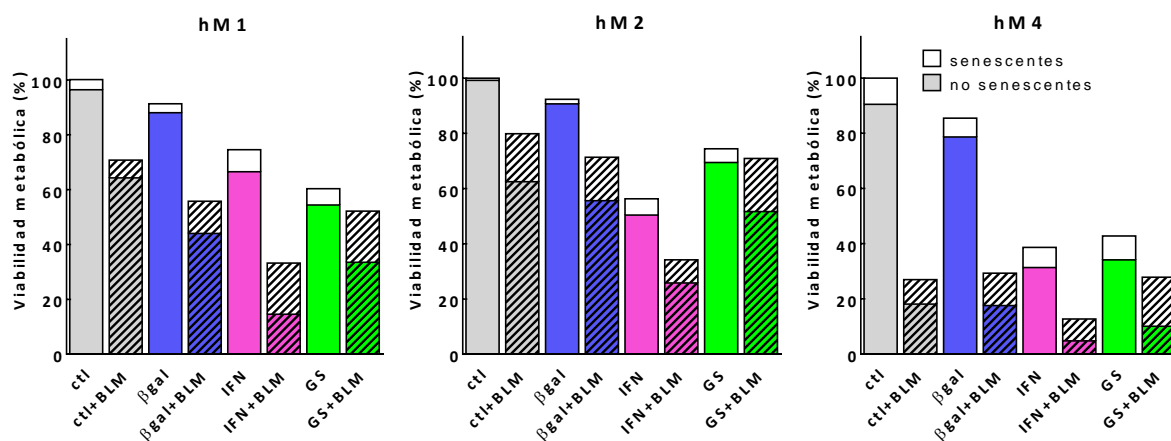
Previamente, en este trabajo, se encontró que la citotoxicidad inducida por la quimio-terapia se correlacionaba con un aumento en la fragmentación del DNA, la cual se vio



reflejada en la fracción de células en fase SubG<sub>0</sub>. Es por ello que, se estudió la posibilidad de que estos tratamientos induzcan senescencia precoz en las células que aparentemente logran sobrevivir al tratamiento. Este fenómeno se ensayó, mediante el análisis de la actividad β-galactosidasa asociada a la senescencia (βgal AS) en condiciones ácidas, en las líneas de melanoma humano, como se describe en MyM (Fig. 40). En las tres líneas evaluadas, el tratamiento genético con IFNβ aumentó (p<0,05) la actividad de la βgal AS, a las 72 h. Este resultado coincide con lo observado por Villaverde *et al.* (2012), donde la lipofección con INFB indujo senescencia en la línea de sarcoma de Ewing humano EW7. La lipofección con GS incrementó la actividad de la βgal AS en hM1 y hM4 (p<0,05), pero no en hM2, línea poco sensible al GS. Cuando las células de melanoma humano fueron tratadas con BLM exhibieron un fenotipo de senescencia celular, como aumento en la actividad de βgal AS y una morfología achatada y agrandada (Fig. 40, paneles inferiores). En concordancia con esto, otros grupos reportaron que el tratamiento con GS incrementó la actividad βgal AS en células de cáncer mamario (Laberge *et al.* 2013) y que la BLM induce senescencia en células epiteliales de pulmón (Aoshiba *et al.* 2003).

El análisis cuantitativo de la senescencia celular en las líneas hM1 y hM4, mostró que el tratamiento combinado de la BLM y la lipofección con los genes terapéuticos, indujo un fuerte aumento en la actividad de la βgal AS, el cual fue mayor (p<0,01) al efecto de ambos tratamientos por separado (Fig. 41).

Tal como muestra la Fig. 40, la quimio-terapia, y especialmente la bleomicina, indujeron senescencia precoz en las líneas de melanoma humano. En estos casos, una fracción de las células sobrevivientes a los tratamientos, entra en senescencia precoz (fracción superior del diagrama de barras), siendo esta una situación irreversible que limita la progresión celular. Entonces, sólo la fracción restante (fracción inferior del diagrama de barras) de las células sobrevivientes mantendría su capacidad proliferativa (Fig. 41). Estos resultados explicarían la baja capacidad de formación de colonias y melanosferas de las células “sobrevivientes” a los tratamientos (Fig. 42 - 45).



**Figura 41. Estimación de la viabilidad celular reproductiva esperada** (células metabólicamente viables y no senescentes), de acuerdo a los valores de viabilidad metabólica evaluados por APH y a los porcentajes de senescencia precoz, en las tres líneas de melanoma humano.

## Las células tumorales sobrevivientes a los tratamientos presentaron menor capacidad clonogénica

El ensayo clonogénico, o ensayo de formación de colonias, es un ensayo de supervivencia celular basado en la capacidad de una única célula de crecer y formar una colonia. Esencialmente, este ensayo muestra la capacidad de cada célula de la población, de experimentar división “ilimitada”. Comúnmente, es un método utilizado para evaluar la muerte

celular reproductiva luego de un tratamiento, donde sólo una fracción de las células sembradas retiene la capacidad de producir colonias (Franken *et al.* 2006).

Con el objetivo de determinar la capacidad clonogénica de las células sobrevivientes a la quimio-genoterapia (6 días post-tratamiento), las células fueron resembradas a baja densidad. Luego de sembrar el mismo número de células sin tratar, se encontró que la línea *hM2* formó respectivamente 5 y 10 veces más colonias que *hM1* y *hM4* (Tabla 1 y Fig. 42A).

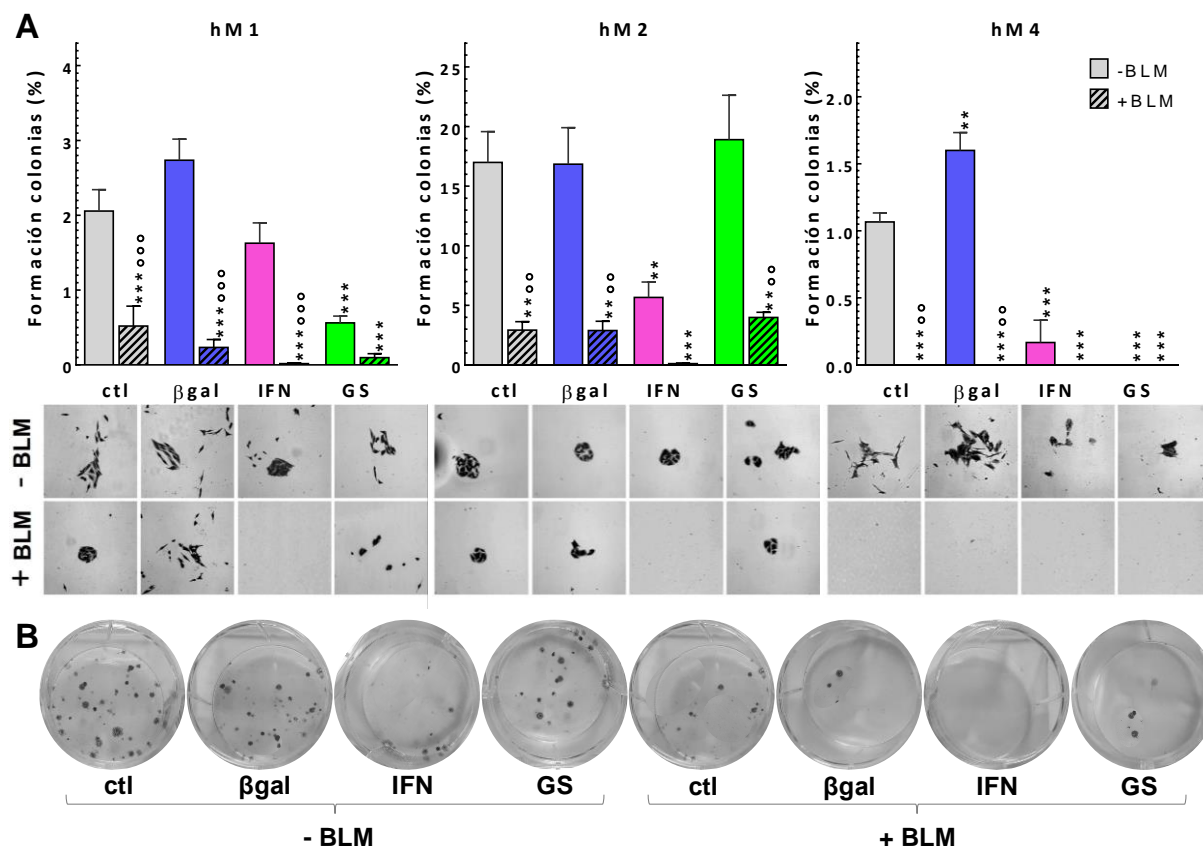


Figura 42. Capacidad clonogénica de las células de melanoma sobrevivientes a la lipofección del GS (HSVtk/GCV) y del gen del IFN $\beta$  en presencia o ausencia de BLM. (A) Se evaluó la capacidad de formar colonias (valor relativizado al número de células sembradas) de células *hM1*, *hM2* y *hM4* sobrevivientes a los tratamientos, sembrando a baja densidad las células residuales luego de 6 días de haber sido tratadas como se describe en MyM. Los resultados se expresan como media  $\pm$  s.e.m. de  $n \geq 6$  experimentos independientes.

\*vs su respectivo  $\beta$ gal;  $\circ$ BLM vs su respectivo valor en ausencia de BLM; +tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo *ctl*+BLM; #tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo  $\beta$ gal+BLM. Un símbolo:  $p < 0,05$ , dos símbolos:  $p < 0,01$ , tres símbolos:  $p < 0,001$ .

**Paneles inferiores:** Imágenes representativas de colonias individuales provenientes de células de las tres líneas de melanoma humano tratadas como se describe en los gráficos de barras. Las colonias crecidas a partir de células sembradas a baja densidad durante 15 días fueron fotografiadas usando un microscopio invertido de contraste de fase (100X).

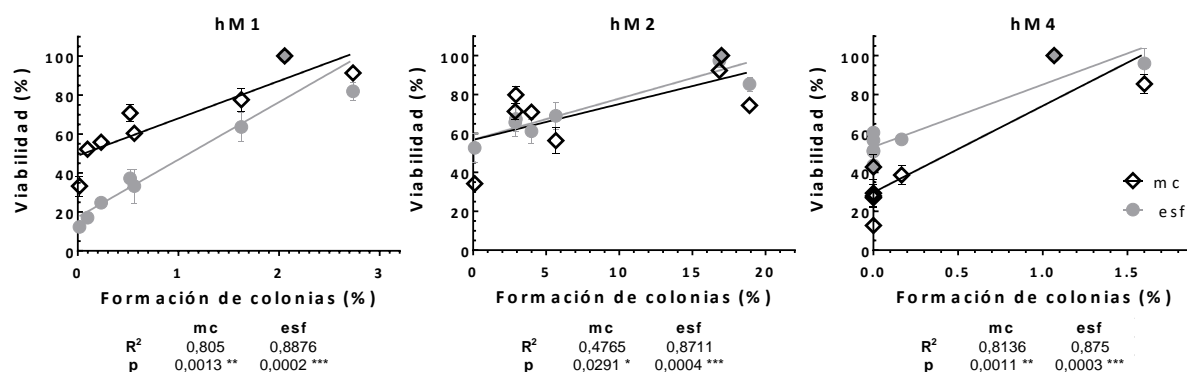
**(B)** Imágenes de un experimento representativo de colonias de células *hM2* sobrevivientes a los tratamientos.

Como se muestra en la Fig. 42, todos los tratamientos que disminuyeron significativamente la viabilidad celular, disminuyeron también la capacidad clonogénica de las células sobrevivientes a los tratamientos. Cabe destacar la drástica disminución de la capacidad clonogénica de las células sobrevivientes de las tres líneas celulares debido al tratamiento con BLM sola o combinada con los genes (Fig. 42). Este resultado, sumado al aumento de la senescencia celular producido por la BLM, indicaría que las células sobrevivientes al tratamiento con BLM, a pesar de aparentar ser viables (impermeables al azul tripán), estarían arrestadas o con muerte celular reproductiva.

La morfología de las colonias fue variable. Mientras que *hM2* formó agregados circulares, *hM1* y *hM4* formaron agregados más alargados (Fig. 42A, paneles inferiores). La línea celular *hM2* generó colonias con capacidad de crecer, que luego de 2 o 3 semanas

produjeron colonias de mayor tamaño, visibles a simple vista (**Fig. 42B**). Por el contrario, las colonias de *hM1* y *hM4* no persistieron a lo largo del tiempo, sufriendo muerte celular luego de dos semanas.

Es relevante destacar la correlación directa entre la fracción de células sobrevivientes a los tratamientos y su capacidad clonogénica en las tres líneas celulares. Esta correlación fue mayor ( $p < 0,0004$ ) cuando las células crecieron como esferoides en las tres líneas humanas evaluadas (**Fig. 43**).



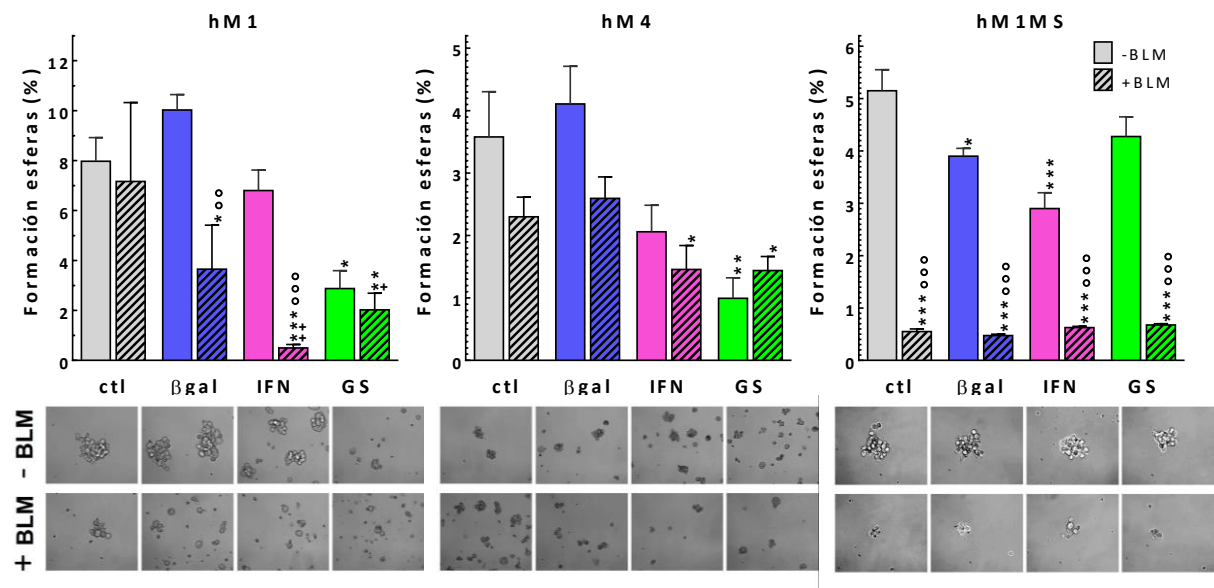
**Figura 43. Correlaciones entre la capacidad clonogénica y la viabilidad celular** de monocapas (mc) ( $\diamond$ ) y esferoides (esf) ( $\bullet$ ) para todos los tratamientos estudiados. Se determinaron mediante la prueba de Pearson con el programa GraphPad.

### La quimio-genoterapia disminuyó la capacidad de formar melanosferas de las células tumorales sobrevivientes

Se ha demostrado que los tratamientos antitumorales, como la quimio o la radio terapia, llevan a un enriquecimiento en la subpoblación de células con propiedades de células madre (*stem*), como la capacidad de auto-renovación (Diehn *et al.* 2009). Sin embargo, poco se conoce sobre los efectos de la quimio-genoterapia sobre esta población celular en particular. Para dilucidar esto, se estudió la capacidad de formar melanosferas (ME) de las células sobrevivientes a los tratamientos. Sólo las líneas de melanoma humano *hM1* y *hM4* formaron ME. Todos los tratamientos citotóxicos disminuyeron el número y tamaño de las ME derivadas de las células sobrevivientes. En la línea *hM1*, la combinación con BLM acentuó los efectos individuales de ambos genes (GS e  $IFN\beta$ ). Es importante destacar la dramática disminución de la fracción iniciadora de ME de las células *hM1* sobrevivientes al tratamiento combinado de BLM/ $IFN\beta$  (**Fig. 44**).

Como se muestra en la **Fig. 44**, las células *hM1* presentaron mayor capacidad de formación de melanosferas que las *hM4*. En cambio, las células *hM2*, capaces de formar esferoides cuando se las sembró sobre una cobertura de agar, no fueron capaces de formar ME en condiciones no adherentes y libres de suero. Mientras que las células *hM1* y *hM4* exhibieron un fenotipo de esfera (**Fig. 44**, paneles inferiores), las células *hM2* crecieron como un fenotipo adherente bajo las mismas condiciones de cultivo (datos no mostrados). Cuando fueron sembradas en medio completo bajo condiciones adherentes normales (suplementado con SFB 10%), las ME de las células *hM1* control, o lipofectadas con los genes  $\beta gal$  e  $IFN\beta$ , se disgregaron y crecieron como monocapa, llegando a confluencia en aproximadamente 3, 3 y 6 semanas respectivamente. Estas células (ctl,  $\beta gal$  e  $IFN\beta$ ) derivadas de ME fueron capaces de formar ME secundarias. En cambio, los demás tratamientos produjeron ME más pequeñas que no fueron capaces de proliferar en medio completo. Por otro lado, las pequeñas ME de *hM4* cuando se sembraron en condiciones normales de adherencia y suero, no fueron capaces de desensamblarse. Independientemente del pretratamiento, las ME de *hM4* permanecieron como ME sin crecer durante tres meses (n: 3, datos no mostrados). Por otro

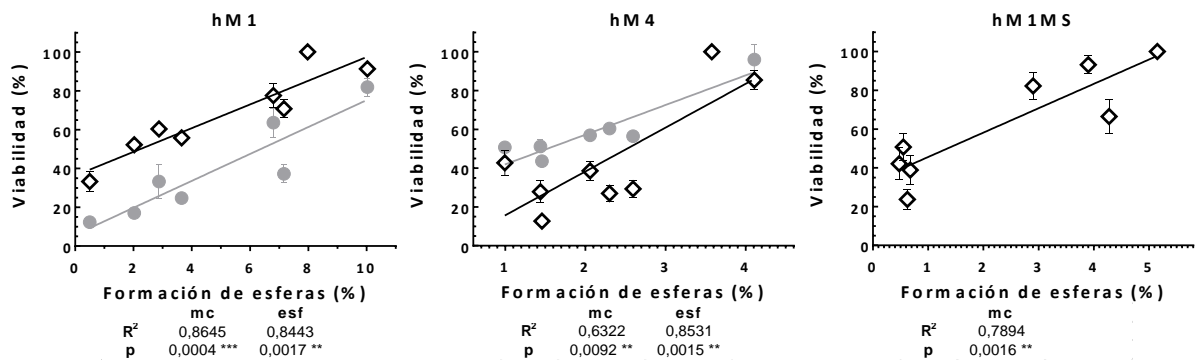
lado, las células *hM1* derivadas de las ME control fueron cultivadas en medio suplementado con SFB, generando la variante *hM1MS* de la línea celular *hM1*.



**Figura 44. Capacidad de formación de melanosferas de las células de melanoma sobrevivientes a la lipofección del GS (HSV $\theta$ k/GCV) y del IFN $\beta$ , en ausencia o presencia de BLM.** La cuantificación se realizó 6 días después de haber sembrado las células a baja densidad en condiciones de baja adherencia, como se describe en MyM. Los resultados representan el porcentaje de melanosferas relativo a la cantidad de células sembradas y se expresan como media  $\pm$  s.e.m. de  $n > 4$  experimentos independientes.

\*vs su respectivo βgal; ○BLM vs su respectivo valor en ausencia de BLM; +tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo ctl+BLM; #tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo βgal+BLM. Un símbolo:  $p < 0,05$ , dos símbolos:  $p < 0,01$ , tres símbolos:  $p < 0,001$ .

**Paneles inferiores:** Imágenes representativas de la capacidad de formación de esferas de las células *hM1*, *hM4* y *hM1MS* sobrevivientes, tratadas como se describe en los gráficos de barras. Esferas crecidas a partir de células sembradas a baja densidad en condiciones de baja adherencia durante 6 días, fueron fotografiadas usando un microscopio invertido de contraste de fase (100X).



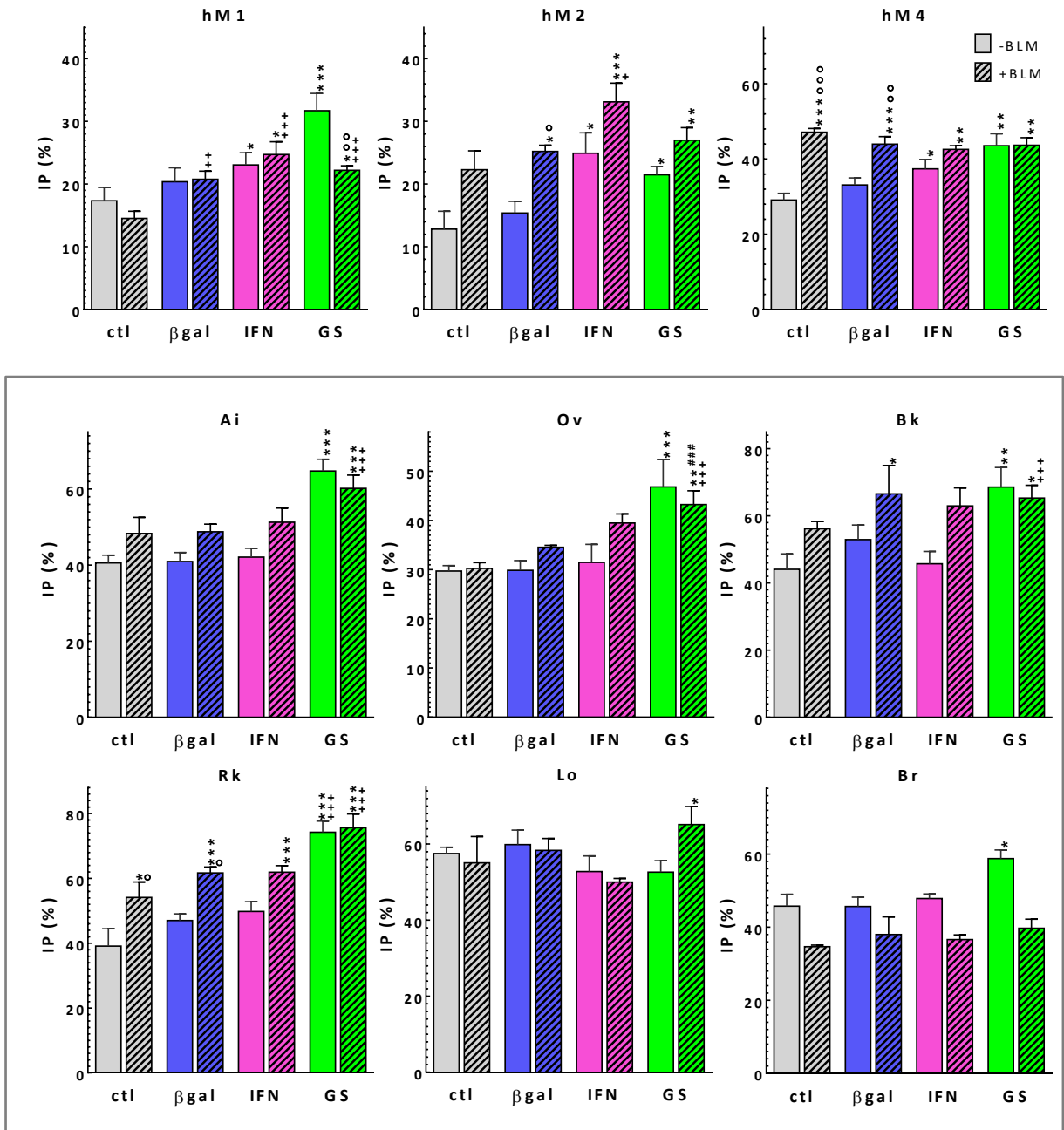
**Figura 45. Correlaciones entre la capacidad de formación de melanosferas y la viabilidad celular de monocapas (mc) (◇) y esferoides (esf) (●) para todos los tratamientos estudiados.** Se determinaron mediante la prueba de Pearson con el programa GraphPad.

Cabe destacar la alta correlación ( $p < 0,05$ ) entre la cantidad de células sobrevivientes a los tratamientos y la capacidad de formación de melanosferas en ambas configuraciones espaciales para las líneas *hM1*, *hM4* y *hM1MS* (Fig. 45).

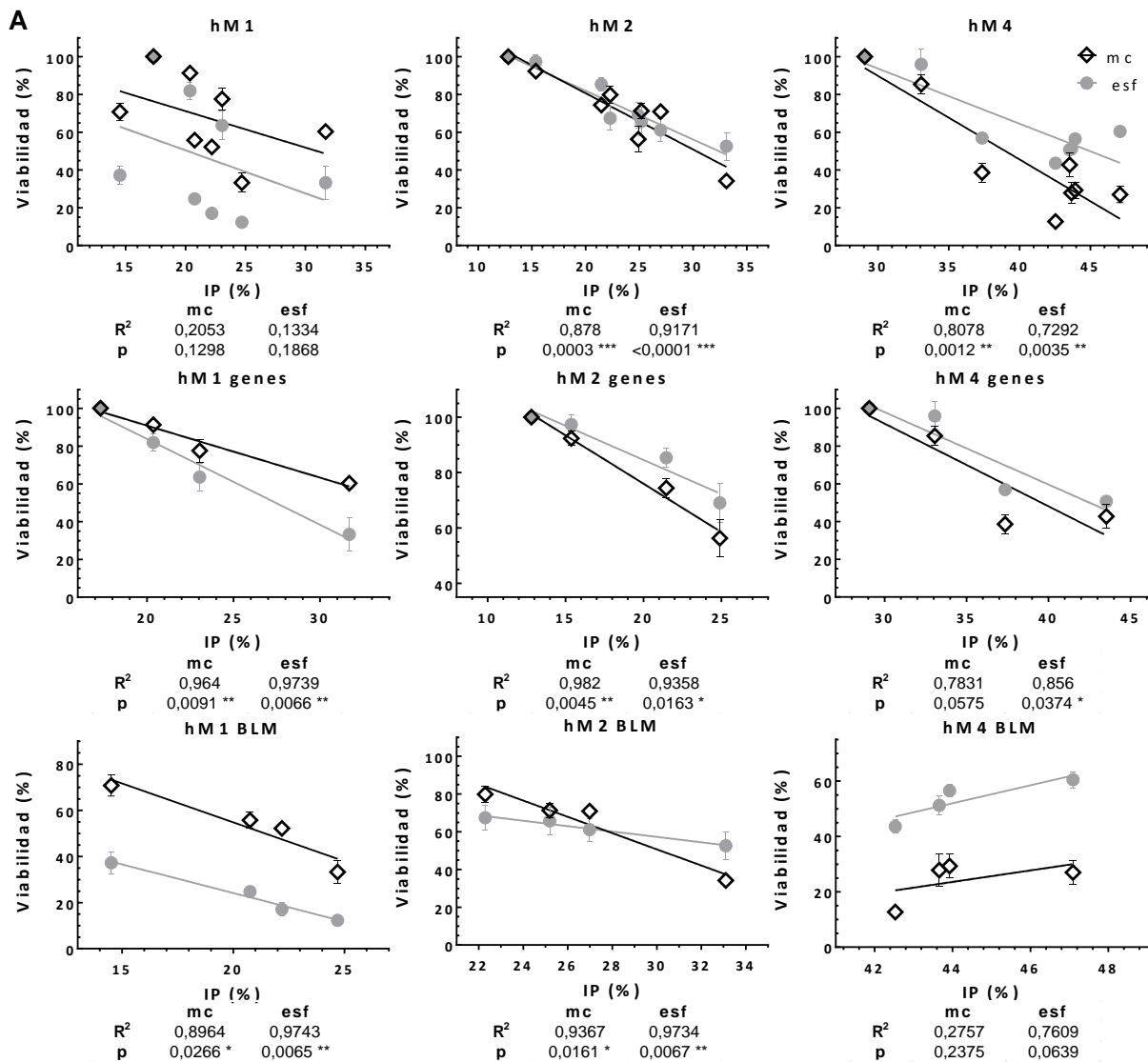
## Los tratamientos aumentaron el índice proliferativo en las líneas de melanoma humano y canino

Como se manifestó más arriba, el análisis del ciclo celular puede realizarse mediante la utilización de yoduro de propidio, el cual se intercala en el DNA y emite fluorescencia de

manera proporcional al contenido de DNA de la célula. Esta técnica se basa en lo siguiente: las células quiescentes y en G<sub>1</sub> tienen dos copias de cromosomas, mientras que las células en mitosis M tienen el doble del contenido de DNA y tendrán, entonces, el doble de la intensidad de fluorescencia que las células G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Las células en fase S tendrán una señal de fluorescencia intermedia entre G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>/M, debido a que estas células están sintetizando DNA en su camino hacia M.



**Figura 46. Efectos de la lipofección del GS (HSVtk/GCV) y del IFN $\beta$  en ausencia o presencia de BLM en la fracción celular S+G<sub>2</sub>/M+hiperdiploide en células de melanoma.** Las células crecidas como monocapas se cosecharon, fijaron y tiñeron con ioduro de propidio. El contenido de DNA se analizó por citometría de flujo como se describió en MyM. Se excluyeron los eventos subG<sub>0</sub> y se determinó el porcentaje de eventos en cada fase del ciclo. El índice de proliferación (IP) fue determinado como el porcentaje de células en fase S, G<sub>2</sub>/M e hiperdiploide. Los resultados representan la media  $\pm$  s.e.m. de n>4 experimentos independientes. \*vs su respectivo beta gal; o BLM vs su respectivo valor en ausencia de BLM; +tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo ctl+BLM; #tratamiento combinado BLM/genes vs su respectivo beta gal+BLM. Un símbolo: p<0,05, dos símbolos: p<0,01, tres símbolos: p<0,001.



**Figura 47A. Líneas de melanoma humano. Las correlaciones entre el índice proliferativo (IP) y la viabilidad celular** de monocapas (mc) (◇) y esferoides (esf) (●) para todos los tratamientos estudiados y para los tratamientos en ausencia o presencia de BLM, se determinaron mediante la prueba de Pearson con el programa GraphPad.

En un trabajo previo se demostró que, en oposición a los tratamientos, existe un mecanismo de repoblación (recrecimiento) cuya potencia sería intrínseca de cada tumor individual (Gil-Cardeza *et al.* 2010).

Con el fin de analizar, únicamente, la progresión del ciclo de las células viables, se excluyó del análisis a la fracción celular subG<sub>0</sub>. Se definió el índice proliferativo (IP) como la fracción de células en fases S, G<sub>2</sub>/M e hiperdiploide. En las tres líneas de melanoma humano evaluadas la quimio-genoterapia aumentó el IP, el cual, subsecuentemente conduciría a una sensibilidad incrementada a estos agentes terapéuticos (**Fig. 46**), evidenciada por el incremento en la fracción subG<sub>0</sub>. Esto se confirmó por la correlación encontrada entre la fracción de células con alto IP y el nivel de respuesta citotóxica a los tratamientos (**Fig. 47**).

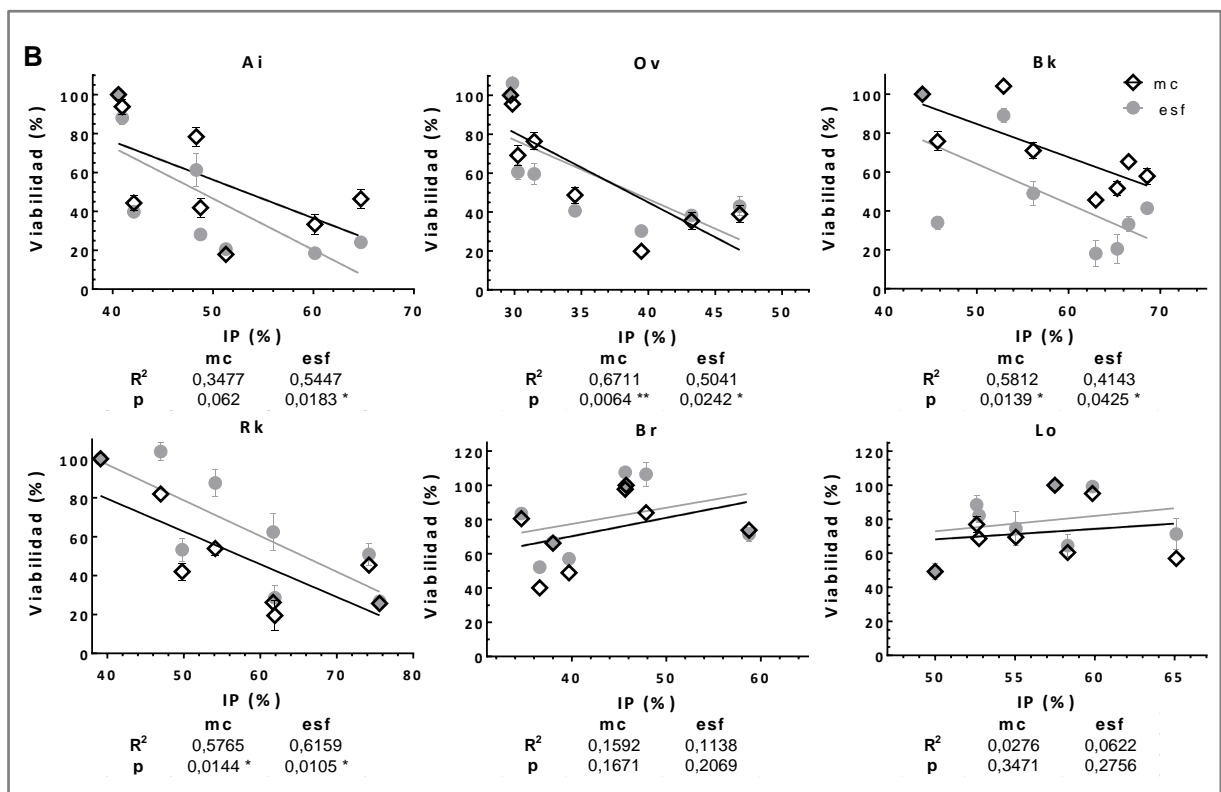
La línea *hM2*, que manifestó el mayor tiempo de duplicación y el menor IP basal, mostró una alta correlación inversa ( $p < 0,0003$ ) entre el índice proliferativo y la viabilidad celular luego de los tratamientos en ambas configuraciones espaciales (mc:  $R^2 = 0,88$ , esf:  $R^2 = 0,91$ ). Esta correlación se mantuvo cuando los tratamientos genéticos y los tratamientos combinados genes/BLM, se analizaron por separado.

En el caso de la línea *hM1*, se encontró una correlación inversa entre el índice proliferativo y la viabilidad celular, cuando se analizaron por separado: los tratamientos genéticos (mc:  $R^2=0,96$ , esf:  $R^2=0,97$ ;  $p<0,009$ ) y los tratamientos combinados genes/BLM (mc:  $R^2=0,90$ , esf:  $R^2=0,97$ ;  $p<0,03$ ). Sin embargo, estos parámetros no correlacionaron cuando se compararon todos los tratamientos en conjunto.

Aún la línea *hM4*, con el mayor nivel basal de IP, incrementó el mismo, en respuesta a los tratamientos. Esta línea, también, presentó una correlación significativa entre el índice proliferativo y la viabilidad de las células tratadas en ambas configuraciones espaciales (mc  $R^2=0,81$ , esf:  $R^2=0,73$ ;  $p<0,0035$ ).

En el caso de las líneas caninas, la lipofección con GS indujo un incremento significativo del IP en 5 de las 6 líneas evaluadas ( $p<0,01$ : *Ai*, *Ov*, *Bk* y *Rk*;  $p<0,05$ : *Br*) (excepto en la línea poco sensible: *Lo*), mientras que esto no ocurrió luego de la lipofección con  $IFN\beta$ . Las líneas caninas con mayor sensibilidad a los tratamientos (*Ai*, *Ov*, *Bk* y *Rk*), presentaron una correlación entre el índice proliferativo y la viabilidad de las células tratadas en ambas configuraciones espaciales ( $p<0,05$ ) (excepto la mc de *Ai*).

Estos resultados, sugieren que la citotoxicidad del tratamiento combinado podría deberse a la capacidad de: (i) matar tanto a células en división, como quiescentes; o bien, (ii) promover la proliferación de células de melanoma, y de esta manera, incrementar su sensibilidad a los agentes terapéuticos.



**Figura 47B.** Líneas de melanoma canino. Las correlaciones entre el índice proliferativo (IP) y la viabilidad celular de monocapas (mc) (◇) y esferoides (esf) (●) para todos los tratamientos estudiados, se determinaron mediante la prueba de Pearson con el programa GraphPad.

# Parte III

El índice de proliferación (IP) como  
marcador de la respuesta clínica

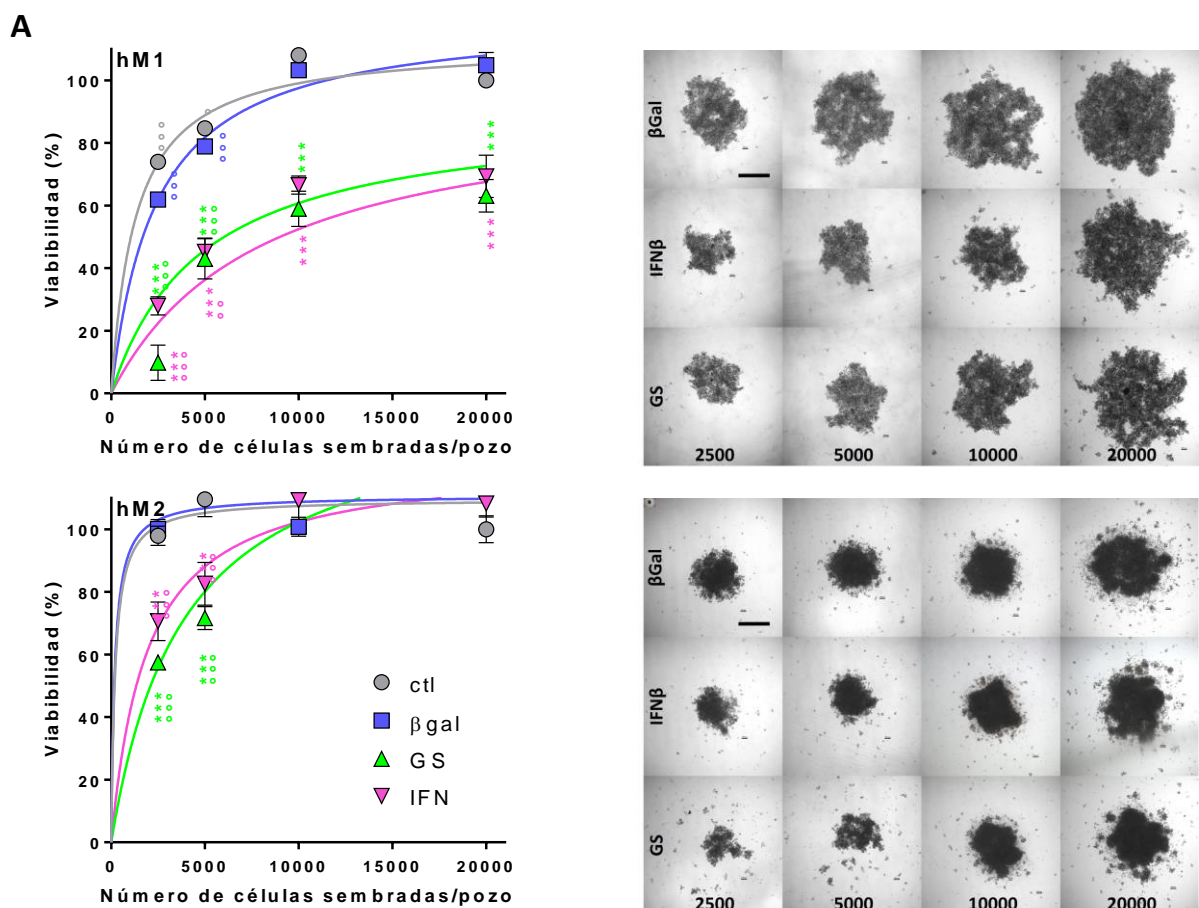


## La capacidad de crecimiento de los esferoides determinó su sensibilidad a la genoterapia

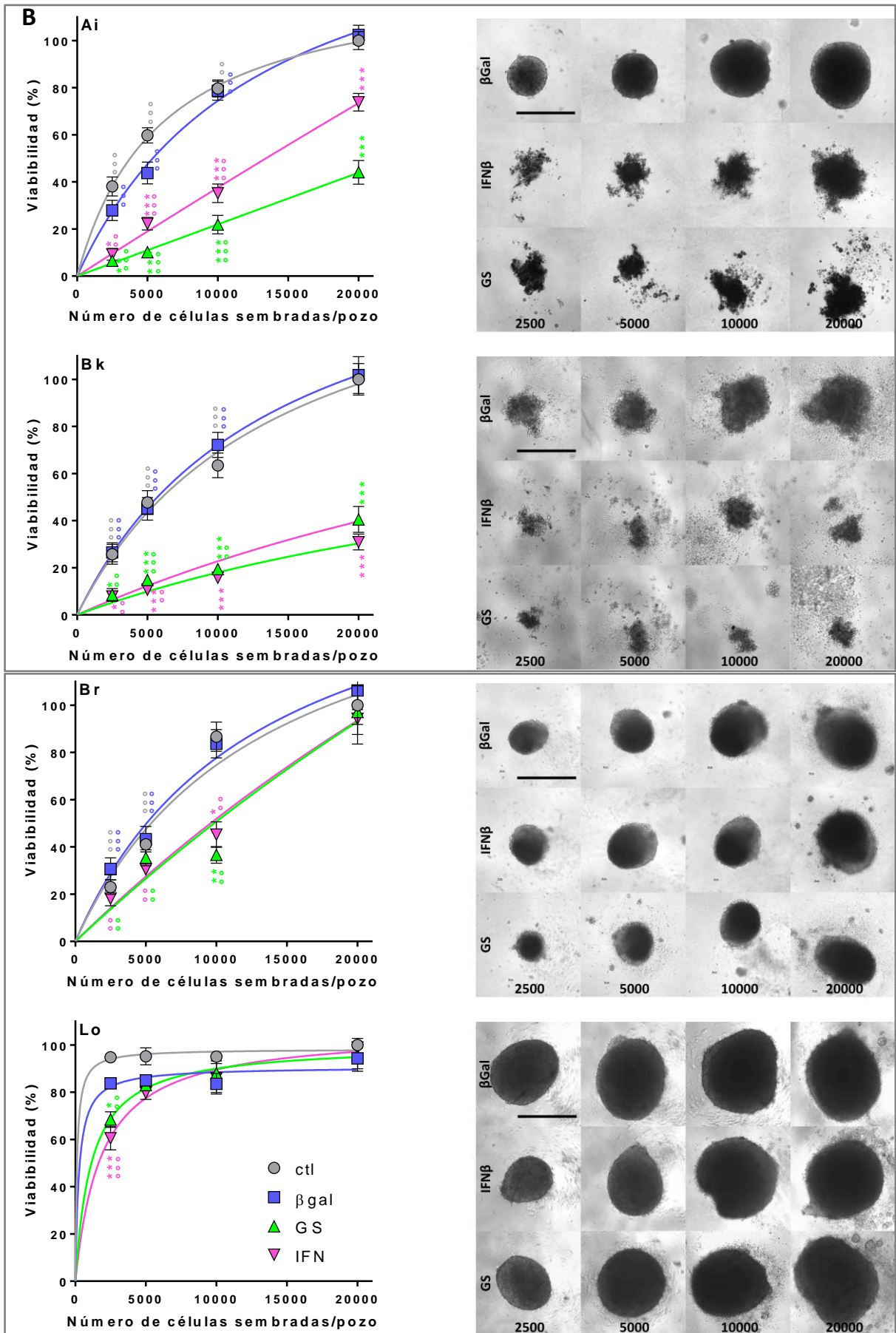
A diferencia de los cultivos en monocapa, que crecen exponencialmente, los tumores sólidos y los esferoides tumorales se caracterizan por una fase exponencial temprana seguida de un período de crecimiento más lento. Se han descrito curvas de crecimiento con tres fases sucesivas (geométrica, lineal y *plateau*), donde la fase geométrica corresponde a la agregación y proliferación de esferoides pequeños, la fase lineal representa el desarrollo de una región interna no proliferativa y finalmente el *plateau* que, en esferoides grandes corresponde a la formación de un centro necrótico (Costa *et al.* 2016).

Se investigaron los efectos del número inicial de células (2500, 5000, 10000, 20000 por pozo) en la formación de esferoides de células control, o lipofectadas con  $\beta$ gal, IFN $\beta$  o GS. A tal fin, 24 h post-lipofección con los genes respectivos, las células se sembraron, en distintas concentraciones sobre cobertura de agar. A los 13 días se fotografiaron los esferoides y se evaluó la viabilidad de los mismos. La lipofección inespecífica con  $\beta$ gal generó esferoides idénticos a los producidos por las células control, es por ello, que sólo se muestran imágenes representativas de los esferoides lipofectados con  $\beta$ gal.

Los patrones de crecimiento, tamaño, forma y grado de compactación de los esferoides, fueron característicos de cada línea celular.



**Figura 48A.** Efecto de la lipofección del GS (HSV $tk$ /GCV) y del IFN $\beta$  en la viabilidad de esferoides formados a partir de distinto número inicial de células humanas (izq.). \*vs su respectivo  $\beta$ gal;  $\circ$ vs su respectivo valor de 20000 células/pozo. Imágenes representativas de esferoides crecidos en suspensión (13 días) y fotografiados mediante un microscopio invertido de contraste de fase (der.). Barra: 500  $\mu$ m.



**Figura 48B.** Efecto de la lipofección del GS (HSV $tk$ /GCV) y del IFN $\beta$  en la viabilidad de esferoides formados a partir de distinto número inicial de células caninas (izq.). \*vs su respectivo  $\beta$ gal;  $\circ$  vs su respectivo valor de 20000 células/pozo. Imágenes representativas de esferoides crecidos en suspensión (13 días) y fotografiados mediante un microscopio invertido de contraste de fase (der.). Barra: 500  $\mu$ m.

Independientemente de la cantidad inicial de células, todas las líneas ensayadas formaron esferoides únicos. Cuatro de estas líneas (*hM2*, *Ai*, *Br* y *Lo*) formaron esferoides compactos en todas las concentraciones celulares evaluadas, donde *Ai*, *Br* y *Lo* formaron esferoides redondeados, con bordes muy definidos (**Fig. 48B**). En cambio, las líneas *hM1* y *Bk* generaron esferoides más laxos, especialmente *hM1*, cuyos esferoides exhibieron forma de racimo.

Aunque todos los esferoides mostraron una primera fase de crecimiento seguida de una meseta, se observaron importantes diferencias entre las seis líneas celulares estudiadas. Tal como muestra la **Fig. 48A**, las líneas *hM1*, *Ai*, *Bk* y *Br*, mostraron un crecimiento extensivo donde la viabilidad del esferoide control acompañó el incremento del número de células sembradas ( $p < 0,05$ ). En estas líneas, el tamaño final del esferoide dependió de la cantidad de células sembradas, sugiriendo que, al no alcanzar su tamaño máximo, estos esferoides aún poseen capacidad para seguir creciendo (**Fig. 48B**). Por el contrario, en las líneas *hM2* y *Lo*, la viabilidad del esferoide no aumentó de acuerdo al número inicial de células sembradas. Independientemente del número de células sembradas, los esferoides de estas líneas llegaron a un mismo tamaño, su máximo tamaño (**Fig. 48B**).

Dado que los esferoides se asemejan a los tumores *in vivo*, se estudió si la capacidad de crecimiento de los esferoides estaba asociada con su respuesta a los tratamientos. Los esferoides de células *hM1*, *Ai* y *Bk* lipofectadas con el sistema de GS o con el gen del IFN $\beta$ , resultaron sensibles a ambos genes en todas las densidades celulares evaluadas ( $p < 0,05$ ) (**Fig. 48A**). En respuesta a la lipofección con ambos genes, los esferoides de estas líneas presentaron menor tamaño y una conformación más laxa (*Ai*) que sus respectivos esferoides control (**Fig. 48B**). Por otro lado, los esferoides de las líneas *hM2* y *Lo*, cuando se formaron con bajo número de células, fueron sensibles a la genoterapia ( $p < 0,05$ ) y disminuyeron su tamaño, sin modificar su conformación compacta (**Fig. 48B**). Pero, cuando se formaron a partir de mayor número de células, dichos esferoides perdieron su sensibilidad, simultáneamente con su capacidad de crecer. En el caso de los esferoides de la línea *Br*, si bien se asemejan a los de las líneas *hM1*, *Ai* y *Bk* en su capacidad de crecimiento, su escasa sensibilidad a ambos genes y baja eficiencia de lipofección produjeron sólo una respuesta significativa en los esferoides formados con 10000 células/pozo y una tendencia no significativa en los esferoides formados con menor número de células.

Estos resultados sugieren que la sensibilidad a la lipofección con el sistema de GS o con el gen IFN $\beta$ , depende de la proporción de células capaces de proliferar en respuesta al tratamiento. Esta fracción incluye a las células proliferativas de las capas externas y a las quiescentes de las capas medias con potencial para pasar a la fracción proliferativa (Brown & Giaccia 1998).

Por otro lado, cuando la capacidad de crecimiento del esferoide es tan alta, que rápidamente llega a su *plateau*, independientemente del número inicial de células que le dieron origen (*hM2*, *Lo*), el recrecimiento predomina sobre la citotoxicidad de los tratamientos, limitando la efectividad de esta terapia génica. Por lo tanto, la respuesta final a la genoterapia depende del balance entre citotoxicidad y re-crecimiento. Estos resultados apoyan fuertemente la teoría de resistencia multicelular por re-crecimiento cuya potencia sería intrínseca de cada tumor (Gil-Cardesa *et al.* 2010).

No se encontró ninguna correlación entre la sensibilidad a los tratamientos genéticos y el grado de compactación de los esferoides, parámetro que podría afectar la capacidad de crecimiento y la expresión transitoria de los transgenes (Dangles *et al.* 2002; Casais *et al.* 2006).

## La sensibilidad al gen suicida correlacionó con la eficiencia de lipofección de las células

Al observar las respuestas del punto anterior, se encontró que la línea celular Br que presentó baja eficiencia de lipofección (**Fig. 25**), presentó baja respuesta a la genoterapia (**Fig. 26 y 48**). Entonces, nos propusimos evaluar si la respuesta a esta terapia génica de todas las líneas celulares veterinarias utilizadas, depende de la efectividad de su lipofección. Como se observa en la **Fig. 49**, se encontró una correlación inversa entre la viabilidad de las células post-tratamiento con el GS y sus respectivas eficiencias de lipofección, en ambas configuraciones espaciales ( $p < 0,01$ ).

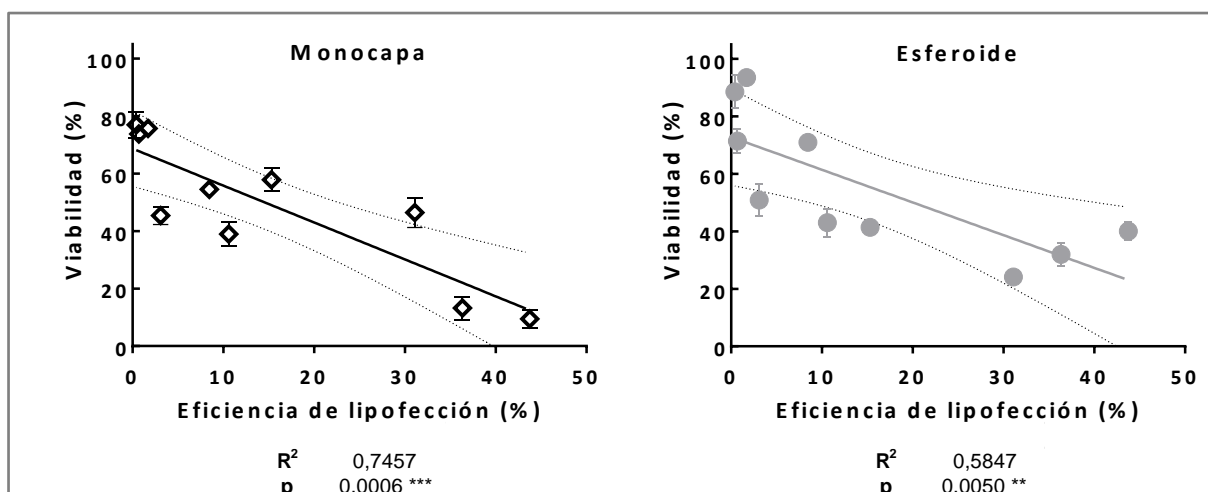


Figura 49. Correlación entre la respuesta *in vitro* al GS en monocapas (mc) (◇) y esferoides (esf) (●) de células Ai, Ov, Bk, Rk, Br, Lo, Bl, Rl, Dc y Rn, y su respectiva eficiencia de lipofección; determinadas mediante la prueba de Pearson con el programa GraphPad.

## La respuesta tumoral al tratamiento con el gen suicida fue el resultado del balance entre pseudo-progresión y destrucción tumoral

Desde hace más de diez años, nuestro laboratorio traslada los conocimientos del laboratorio a la clínica veterinaria, desarrollando con éxito los primeros protocolos clínicos veterinarios latinoamericanos de terapia génica. A su vez, los resultados de la clínica se trasladan al laboratorio para comparar la respuesta de los tumores *in vivo* con la de sus respectivas líneas celulares derivadas.

Estos pacientes caninos (Ai, Ov, Bk, Rk, Bl, Rl, Br, Lo) y felinos (Dc y Rn) con melanoma espontáneo recibieron, 2 veces por semana, durante 5 semanas, inyecciones intratumorales de *lipoplexes* portadores de GS y GCV. Antes de cada tratamiento se midió el tamaño tumoral con calibre. Los volúmenes tumorales se calcularon como  $4/3 \cdot \pi \cdot r_1 \cdot r_2 \cdot r_3$  (Finocchiaro *et al.* 2008).

La respuesta tumoral al tratamiento presentó patrones atípicos. Se registraron fluctuaciones en el volumen tumoral: en momentos reflejando progresión, y en otros, reducción del tamaño tumoral (**Fig. 50**). Esta paradójica dinámica del tamaño tumoral (que comprendía la llamada pseudo-progresión), se debía no sólo al recrecimiento tumoral, sino también a procesos inflamatorios e incremento de la permeabilidad vascular relacionados al tratamiento con GS/GCV. Este balance entre pseudo-progresión y destrucción tumoral en respuesta a esta terapia génica, finalmente resultó en: seis pacientes (Ai, Ov, Bk, Rk, Bl y Rl) con respuestas parciales (RP, reducción del tamaño tumoral mayor al 50%) y cuatro pacientes (Br, Lo y Dc y Rn) con estabilización del tamaño tumoral (ET, aumento o disminución del tamaño tumoral menor al 50%).

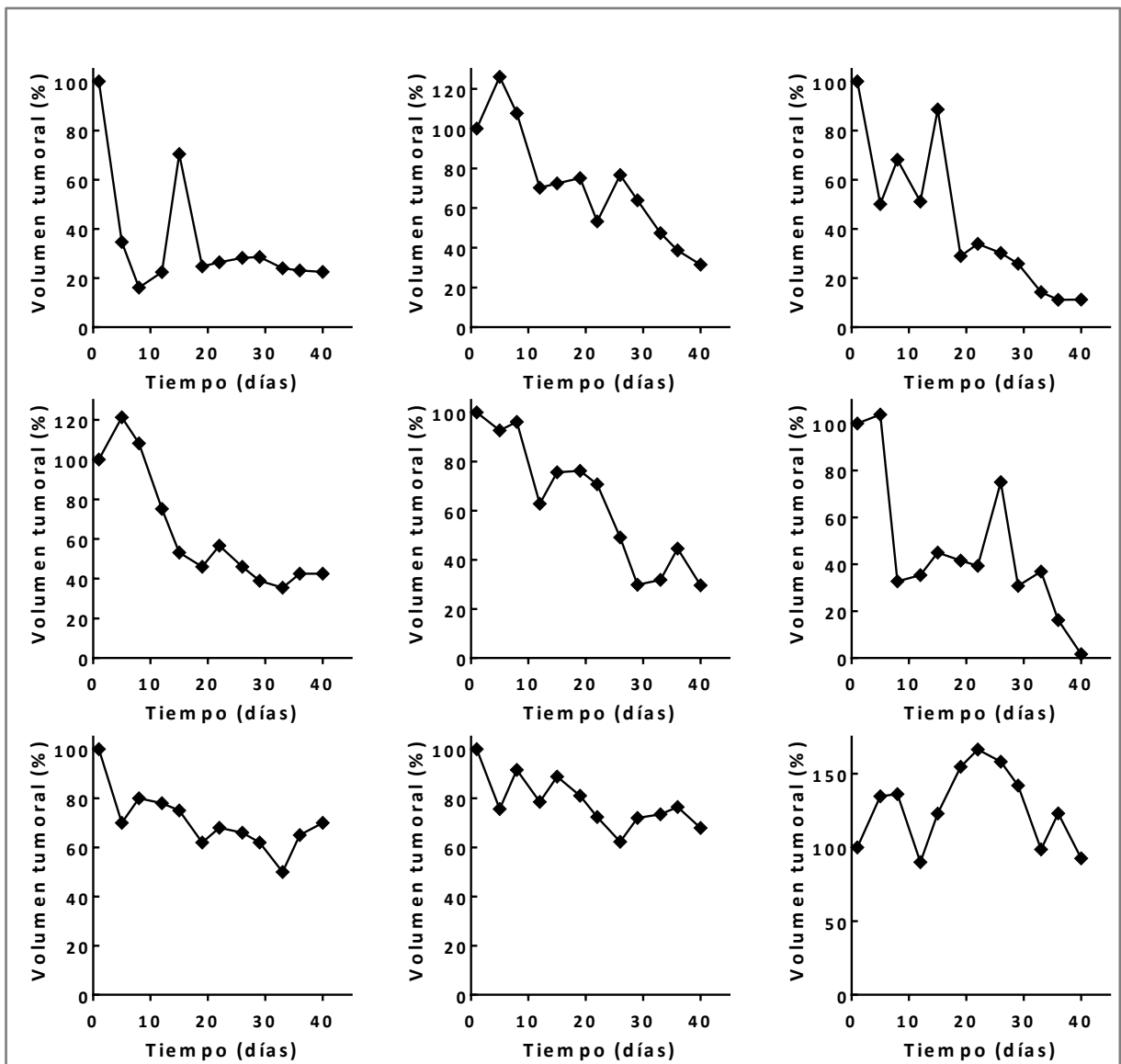


Figura 50. Ejemplos de respuestas individuales de los tumores al GS (HSVtk/GCV) *in vivo*. Se muestra el porcentaje del volumen tumoral relativo al inicial en función del tiempo (días), de nueve pacientes veterinarios (Finocchiaro *et al.*, comunicación personal).

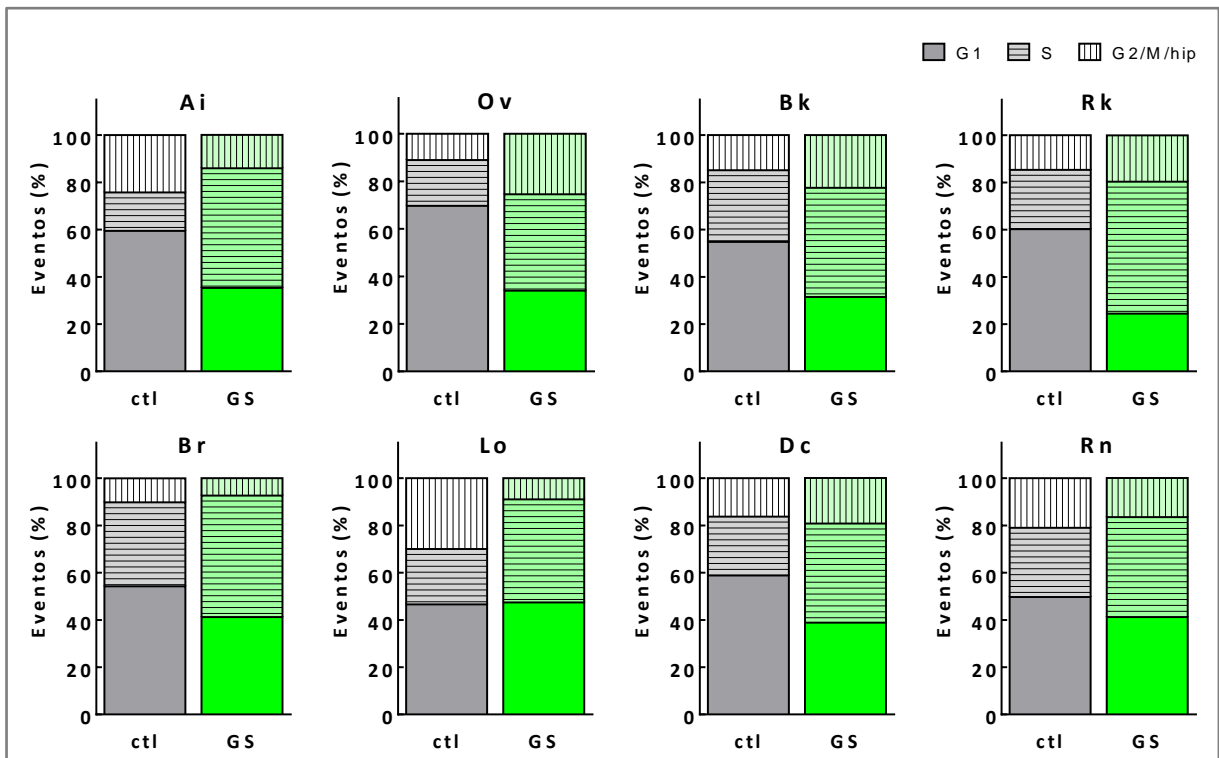
### El índice proliferativo reflejó la respuesta de las células tumorales *in vivo* e *in vitro*

Tal como demostramos previamente, nuestros tratamientos son tóxicos preferentemente para las células proliferativas. Este comportamiento es una característica común de muchos tumores sólidos (Frankel *et al.* 2000).

Por otro lado, en trabajos previos demostramos que la resistencia de los tumores y sus respectivos esferoides, al tratamiento con el sistema del gen suicida (GS), se debía al recrecimiento y repoblación de las áreas necrosadas por el GS (Gil-Cardesa *et al.* 2010).

Para profundizar la comprensión de la respuesta celular al tratamiento con GS/GCV, se ensayaron sus efectos sobre el ciclo celular por citometría de flujo (Fig. 51). El tratamiento con GS tendió a deformar el perfil del ciclo celular. Como se describió anteriormente, se encontró que, respecto a las células control o lipofectadas con  $\beta$ gal, las tratadas con GS/GCV tenían un mayor índice proliferativo (IP), en las líneas sensibles al GS. El IP, definido como la fracción de células que ciclan (en fase S+G<sub>2</sub>/M+hiperdiploide), abarca a todas las células en proceso de proliferación que están sintetizando activamente DNA. Las líneas derivadas de

tumores con pseudo-progresión *in vivo* (Fig. 50), exhibieron un aumento en el IP en respuesta a la lipofección con el GS.



**Figura 51. Efectos de la lipofección con GS (HSVtk/GCV) sobre el ciclo celular en monocapas de células de melanoma canino y felino.** Se excluyeron los eventos subG<sub>0</sub>. Se muestran ejemplos de cuantificación de los eventos subdivididos en cada fase del ciclo celular para algunas líneas celulares caninas y felinas.

Se evaluó la posibilidad de que el estado proliferativo basal, es decir el IP de las células controles (IP<sub>ctl</sub>) de cada línea celular guardara relación con la respuesta al GS de sus respectivos tumores *in vivo*. Como se muestra en la Fig. 52A, se observó una correlación directa ( $R^2=0,75$ ,  $p<0,001$ ) entre el volumen tumoral final en respuesta al GS y el IP de las células controles (IP<sub>ctl</sub>) de sus respectivas líneas celulares. Estos resultados, y los de la Fig. 48, corroboran la teoría de resistencia multicelular por re-crecimiento. Cuanto mayor es el IP<sub>ctl</sub> de la línea celular, mayor será el desplazamiento del balance hacia recrecimiento, resultando en mayor volumen final del tumor o de su respectivo esferoide. Sorprendentemente, se encontró una correlación inversa ( $R^2=0,63$ ,  $p<0,005$ ) entre el IP de las células *in vitro* tratadas con GS/GCV (IP<sub>GS</sub>) y la respuesta de los tumores *in vivo* a dicho tratamiento (Fig. 52B). Estos resultados sugieren que el tratamiento con GS, desplazó el balance hacia destrucción tumoral: eliminando una mayor proporción de células quiescentes, o promoviendo la proliferación de las mismas.

Es importante destacar que, aun cuando algunos pacientes mueren por causas no relacionadas con el melanoma, la supervivencia de los pacientes veterinarios luego del tratamiento con GS también correlacionó ( $R^2=0,69$ ,  $p<0,005$ ) con el IP<sub>GS</sub> de las líneas celulares derivadas de los respectivos tumores de estos pacientes, como se observa en la Fig. 53.

También se encontró una correlación significativa entre el incremento del IP<sub>GS</sub> y la respuesta *in vitro* a la lipofección con el GS de las células de melanoma en ambas configuraciones espaciales ( $p<0,003$ ) (Fig. 54).

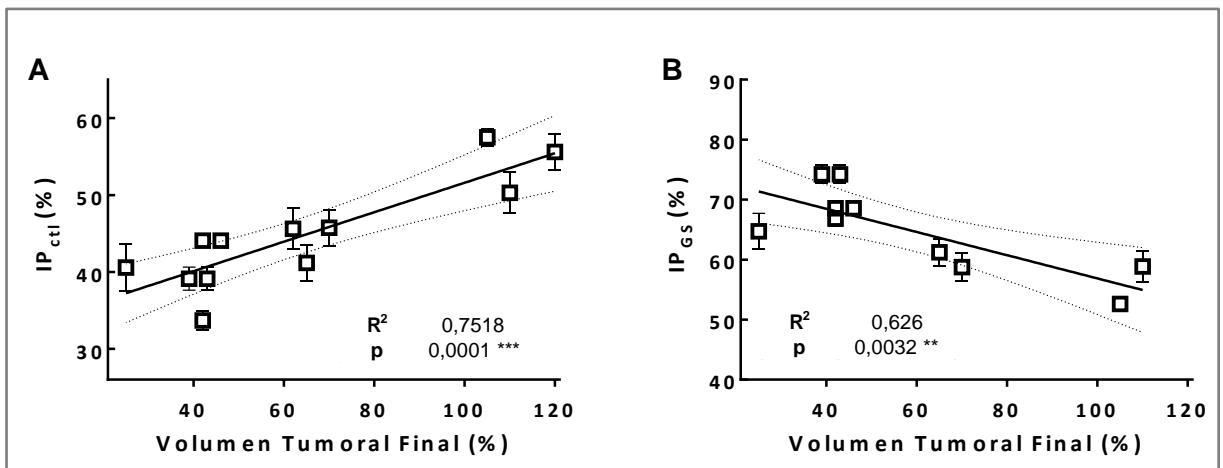


Figura 52. Correlación entre la respuesta al GS (HSVtk/GCV) de los tumores *in vivo* (volumen tumoral final respecto del inicial) y el índice proliferativo (IP) de las células control *in vitro* (IP<sub>ctl</sub>) (A), y el IP de las células tratadas con GS/GCV *in vitro* (IP<sub>Gs</sub>) (B), determinadas mediante la prueba de Pearson con el programa GraphPad.

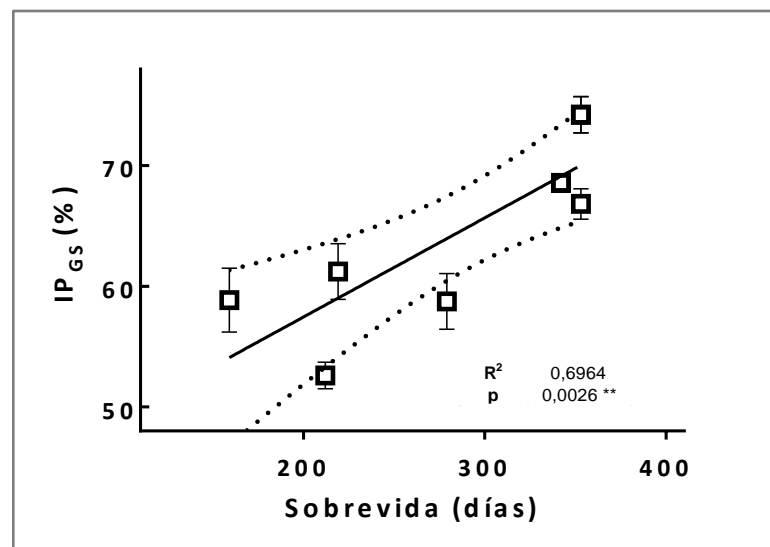


Figura 53. Correlación entre el incremento del IP debido al GS (IP<sub>Gs</sub>) y la supervivencia de los pacientes caninos luego del tratamiento con GS (HSVtk/GCV), determinada mediante la prueba de Pearson con el programa GraphPad.

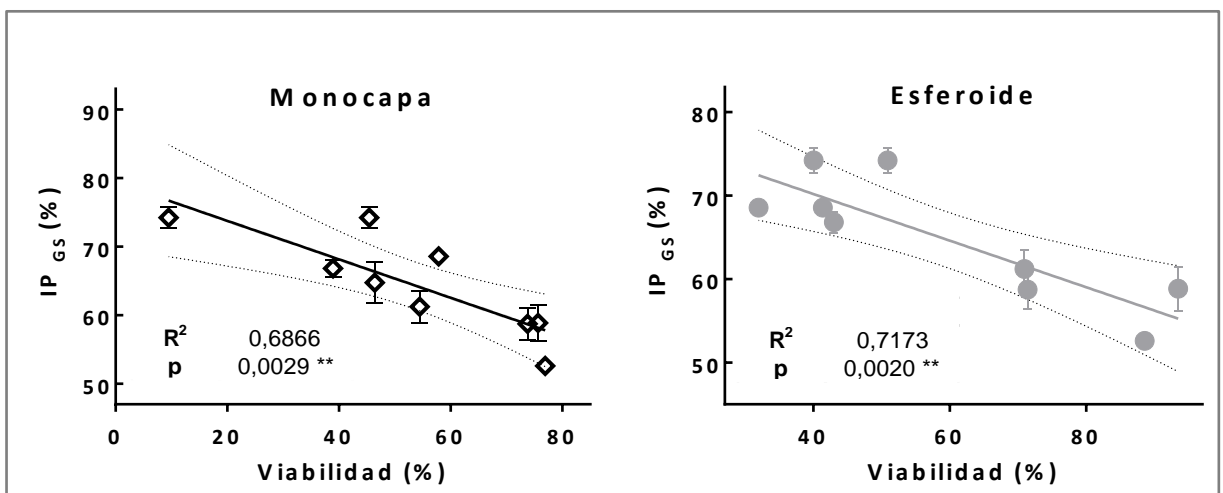


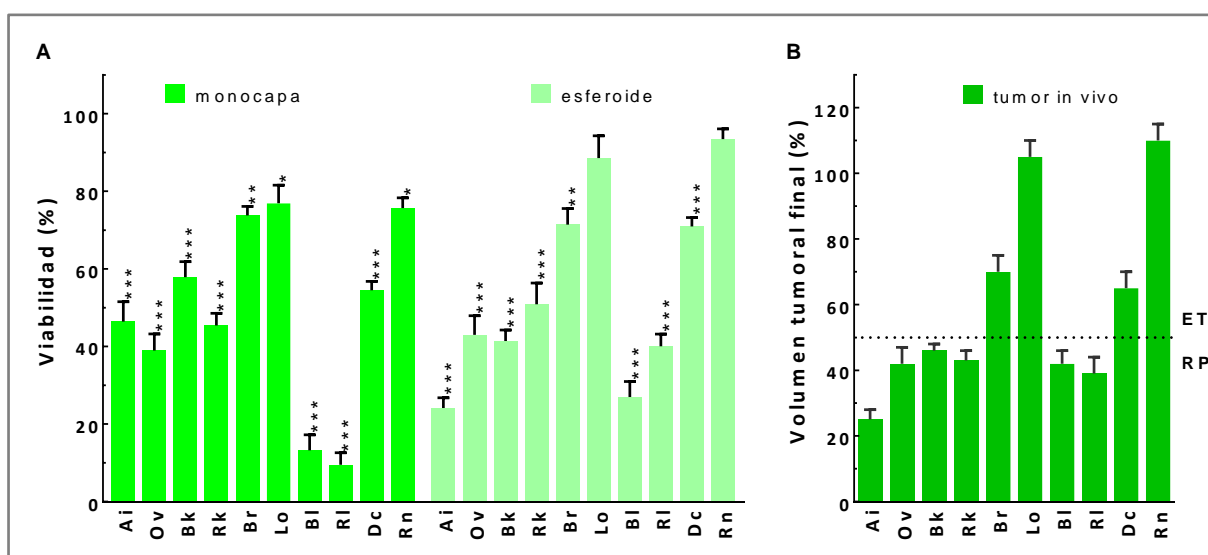
Figura 54. Correlación entre el incremento del IP debido al GS (IP<sub>Gs</sub>) y la respuesta *in vitro* al GS (HSVtk/GCV) de monocapas (mc) (◇) y esferoides (esf) (●) celulares, determinada mediante la prueba de Pearson con el programa GraphPad.

Todos estos resultados sugieren que, la resistencia a este tratamiento genético observada en los tumores y en los cultivos derivados de los mismos, se debe al fenómeno, denominado “resistencia por re-crecimiento” que ya fue demostrado en pacientes y también en esferoides (Brown & Giaccia 1998; Siemann 1998; Gil-Cardeza *et al.* 2010). Durante el tratamiento, muere una gran proporción de las células en proliferación de las capas externas. Subsecuentemente, las células quiescentes cercanas a la periferia logran un mejor acceso a los nutrientes, se dividen y ocupan los lugares que habían quedado vacantes en el tumor.

Por otro lado, la expresión continua y sostenida del GS, al inducir una constante proliferación de las células quiescentes, más resistentes al tratamiento, va reduciendo su proporción, por extenuación y agotamiento de las mismas. De esta manera, el tratamiento continuo con GS va incrementando la fracción de células proliferativas, más diferenciadas y sensibles al tratamiento.

### La sensibilidad al gen suicida de los tumores *in vivo* correlacionó con la respuesta *in vitro* de las respectivas líneas celulares derivadas

Cuando evaluamos las respuestas *in vitro* de las líneas celulares derivadas de estos tumores, que presentaron pseudo-progresión *in vivo*, encontramos que, como monocapas, todas las líneas celulares evaluadas fueron sensibles al GS (Fig. 55A). Cuando las mismas células se cultivaron como esferoides, el patrón de respuestas celulares a GS fue similar a la respuesta tumoral *in vivo* de estos pacientes veterinarios. De los 6 tumores que presentaron respuestas parciales (RP) (Ai, Ov, Rk, Bl y Ri) (Fig. 55B), todos mantuvieron su respuesta al GS/GCV cuando crecieron como esferoides. De los 4 tumores que exhibieron estabilización tumoral (ET) durante las 5 semanas de tratamiento con GS/GCV (Br, Lo, Dc y Rn), la totalidad derivó en líneas celulares sensibles a la lipofeción con GS cuando se cultivaron como monocapas. Cuando crecieron como esferoides, dos de las líneas (Lo y Rn) no respondieron al GS. Por otro lado, siete de las diez líneas celulares manifestaron un fenotipo de resistencia multicelular (MCR) cuando se crecieron como esferoides, en comparación con las mismas células cultivadas como monocapas (Ov, Rk, Lo, Bl, Ri, Dc y Rn).



**Figura 55. Sensibilidad a la lipofeción del sistema del GS (HSVtk/GCV).** (A) Respuesta *in vitro* al GS de monocapas y esferoides. Los resultados representan las medias  $\pm$  s.e.m. de  $n \geq 4$  experimentos independientes. \*vs su respectivo  $\beta$ gal. Un símbolo:  $p < 0,05$ , dos símbolos:  $p < 0,01$ , tres símbolos:  $p < 0,001$ . (B) Respuesta tumores *in vivo* (tratamiento: GS/GCV 2 veces por semana durante 5 semanas). Se muestra el porcentaje del volumen tumoral final relativo al inicial. RP: Respuesta parcial (reducción  $>50\%$ ). ET: Estabilización del tamaño tumoral (aumento o disminución del tamaño tumoral menor al  $50\%$ ).



Cuando comparamos la respuesta *in vivo* al GS de estos tumores que presentan pseudo-progresión con la de las respectivas líneas celulares derivadas, encontramos una alta correlación entre la respuesta de los esferoides al GS con la respuesta *in vivo* de los respectivos tumores ( $R^2=0,93$ ;  $p<0,0001$ ) (**Fig. 56**). Esta correlación fue sensiblemente menor cuando las mismas células fueron cultivadas como monocapas ( $R^2=0,54$ ;  $p<0,008$ ). Este resultado corrobora resultados previos de nuestro laboratorio dónde validamos el uso de los esferoides multicelulares como un modelo experimental más realista para la optimización y la predicción de las respuestas *in vivo* de sus respectivos tumores, a las estrategias terapéuticas (Gil-Cardeza *et al.* 2010).

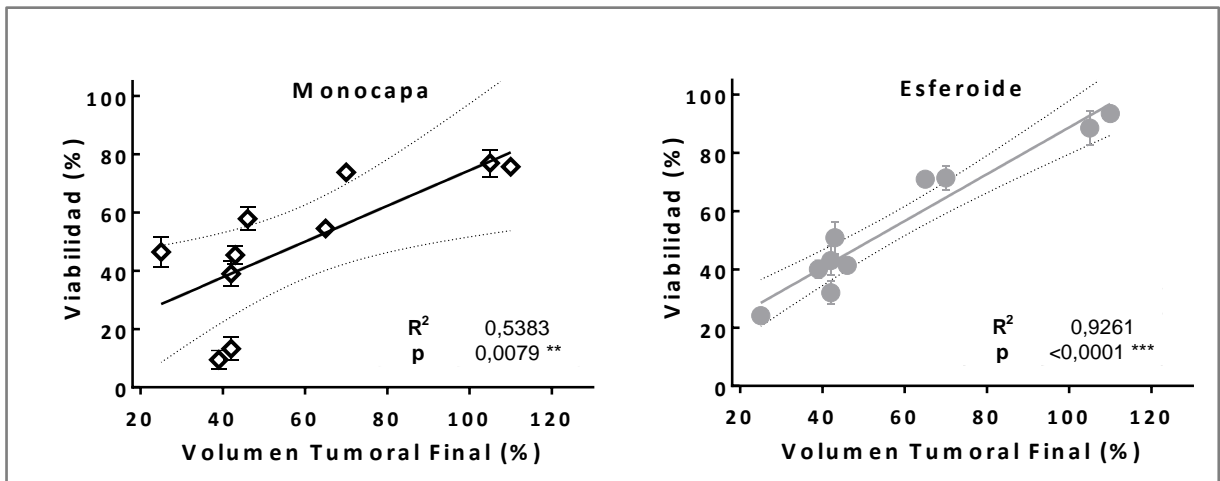


Figura 56. Correlación entre la respuesta *in vitro* al GS (HSVtk/GCV) de monocapas (mc) (◇) y esferoides (esf) (●), y la respuesta de los tumores *in vivo* (volumen tumoral final), determinada mediante la prueba de Pearson con el programa GraphPad.

# **Discusión general**

En el presente trabajo se establecieron y caracterizaron tres líneas celulares de melanoma humano obtenidas a partir de metástasis en nodos linfáticos (*hM1* y *hM2*) y en bazo (*hM4*) de pacientes del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”. También, se utilizaron ocho líneas de melanoma canino (*Ai*, *Ov*, *Bk*, *Rk*, *Bl*, *Rl*, *Br*, *Lo*), y dos de melanoma felino (*Dc*, *Rn*), establecidas y caracterizadas previamente en el laboratorio, provenientes de mucosa oral (*Bk*, *Br*, *Ov*, *Rk*, *Bl*, *Rl* y *Dc*), ocular (*Ai*), abdominal (*Rn*) y metástasis hepática (*Lo*) de pacientes de nuestros protocolos clínicos veterinarios. Todas las líneas presentaron heterogeneidad celular y diversidad en las respuestas a la quimio-genoterapia, reflejando la complejidad clínica de esta enfermedad (Hendrix *et al.* 2003; Quintana *et al.* 2010; Somasundaram *et al.* 2012). No obstante, un patrón emergente de nuestros hallazgos sugiere fuertemente que, en comparación con cada tratamiento individual, la combinación de la transferencia genética del gen suicida (GS) o del gen del interferón- $\beta$  (IFN $\beta$ ) con la bleomicina (BLM) presentó mayor eficacia antitumoral.

Como muestra la **Fig. 26**, las líneas celulares humanas y caninas evaluadas resultaron sensibles a la lipofección, de uno o ambos genes terapéuticos, en las dos configuraciones espaciales estudiadas. Aun cuando todas las líneas evaluadas fueron sensibles a la co-administración de 3  $\mu\text{g/ml}$  de BLM durante la transferencia del GS o del gen IFN $\beta$ , la combinación BLM/IFN $\beta$  mostró la mayor eficacia antitumoral. Esto se vio reflejado en la **Fig. 24** dónde la lipofección de las tres líneas de melanoma humano, con ambos genes (IFN $\beta$  o GS), redujo significativamente la IC<sub>50</sub> de la BLM con respecto a la monocapas sin lipofectar, pero sólo la lipofección con el gen del IFN $\beta$  disminuyó significativamente ( $p < 0,001$ ) la IC<sub>50</sub> de la BLM incorporada por lipofección inespecífica ( $\beta\text{gal}$ ).

El éxito de la genoterapia y sus combinaciones antitumorales está estrechamente relacionado con los mecanismos mediadores y amplificadores de su efecto citotóxico (Villaverde *et al.* 2012; Rossi *et al.* 2015). Este efecto, llamado efecto *bystander*, que extiende la citotoxicidad de la terapia génica a las células del entorno que no fueron alcanzadas directamente por dicha terapia, fue fundamental para garantizar la efectividad de la misma, tanto *in vivo* como *in vitro*. En el caso de la línea *hM4*, menos del 1% de las células expresando los genes terapéuticos fue suficiente para eliminar más del 50% de las mismas.

Probablemente, el principal punto de amplificación del efecto *bystander* sería la promoción de un estado masivo de estrés oxidativo. Tal como se observa en la **Fig. 28**, los tratamientos que disminuyeron la viabilidad celular, aumentaron los niveles intracelulares de las especies reactivas del oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) en 4 de las 5 líneas evaluadas (excepto *Ai*). En estas líneas, el aumento en los niveles de ROS correlacionó significativamente con las respuestas citotóxicas a los tratamientos. En cambio, en el caso de la línea *Ai*, sus altos niveles basales de ROS no aumentaron en respuesta a los tratamientos, aun cuando fue sensible a los mismos. Esto sugiere que su estado oxidativo podría estar saturado, y no puede seguir aumentando, o bien, que un incremento de los ya elevados niveles basales de ROS en respuesta a los tratamientos desencadenaría la muerte de estas células.

Resultados previos de nuestro laboratorio reportaron que la combinación de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD: 1000 IU/ml) y catalasa (CAT: 100 IU) (SOD+CAT) podía revertir el efecto citotóxico del hINF $\beta$  en líneas de melanoma humano (Villaverde *et al.* 2012). En el presente trabajo se encontró que, en las células *hM2*, dicha combinación enzimática no sólo revirtió el efecto tóxico de esta citoquina, sino también el efecto de BLM sola o combinada con la lipofección de  $\beta\text{gal}$  o GS ( $p < 0,001$ ) (**Fig. 30**). Sin embargo, esta combinación de enzimas antioxidantes no logró inhibir el efecto citotóxico de la combinación BLM/IFN $\beta$ , sugiriendo que el efecto amplificador producido por esta combinación supera la capacidad antioxidante de estas enzimas.

Por otro lado, la quimio-genoterapia aumentó la permeabilidad de la membrana mitocondrial (**Fig. 31**). La proporción de células con despolarización de la membrana mitocondrial correlacionó con las respuestas citotóxicas en todas las líneas evaluadas (**Fig. 32**). Aún más relevante es que la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) aumentó paralelamente con los niveles intracelulares de ROS ( $p < 0,05$ ). Como se muestra en la **Fig. 33**, se encontró una correlación directa entre el incremento en los niveles de ROS y la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, inducidos por los tratamientos. Este aumento en los niveles intracelulares de ROS, dependiente de la mitocondria, sugiere que estas organelas serían las principales mediadoras y amplificadoras del efecto *bystander* (Finocchiaro *et al.* 2004; Chen *et al.* 2009; Villaverde *et al.* 2012). Las células transfectadas iniciarían una cascada de señalización intracelular del efecto *bystander*, por una vía dependiente de la mitocondria, la cual, estimularía un aumento de los niveles de ROS. Estos ROS, podrían eventualmente difundir al medio extracelular o pasar a células tumorales adyacentes no modificadas, generando daño oxidativo (Beltinger *et al.* 2000; Chen *et al.* 2009). Estos eventos llevarían a mecanismos de amplificación en los que un número reducido de células expresando los transgenes podrían destruir una alta proporción de células vecinas. Esta hipótesis es apoyada por la correlación inversa ( $p < 0,05$ ) encontrada entre supervivencia celular a la quimio-genoterapia y la fracción celular exhibiendo DNA hipodiploide (**Fig. 37**), altos niveles de ROS (**Fig. 29**) y despolarización de la membrana mitocondrial (**Fig. 32**).

Acompañando la muerte celular por apoptosis y necrosis, la quimio-genoterapia, y especialmente la BLM, indujo senescencia precoz en las líneas de melanoma humano. Como muestra la **Fig. 41**, de las células sobrevivientes a los tratamientos, una fracción entra en senescencia precoz (fracción superior del diagrama de barras), siendo esta, una situación irreversible que limita la progresión celular. Entonces, sólo la fracción restante de las células sobrevivientes (fracción inferior del diagrama de barras) mantendría su capacidad reproductiva. Estos resultados explicarían la baja capacidad de formación de colonias y melanosferas de las células “sobrevivientes” a los tratamientos (**Figs. 42-45**).

En respuesta al tratamiento con GS *in vivo*, los tumores presentaron aumentos transitorios del tamaño tumoral (pseudo-progresión) por recrecimiento tumoral, procesos inflamatorios e incremento de la permeabilidad vascular relacionados al tratamiento con GS/GCV (**Fig. 50**). Esta pseudo-progresión finalmente resultó en seis pacientes con respuestas parciales (RP, reducción del tamaño tumoral mayor al 50%) y cuatro con estabilización del tamaño tumoral (ET, aumento o disminución del tamaño tumoral menor al 50%) (**Fig. 55B**). Esto indicaría que el volumen tumoral final depende del balance entre pseudo-progresión y destrucción tumoral en respuesta al GS/GCV.

Tal como muestra la **Fig. 48**, nuestros tratamientos son tóxicos preferentemente para las células proliferativas. La sensibilidad a la lipofeción con el sistema del GS o con el gen IFN $\beta$ , depende de la proporción de células capaces de proliferar en respuesta al tratamiento. Esta fracción incluye a las células proliferativas de las capas externas, del tumor o esferoide, y a las quiescentes de las capas medias con potencial para pasar a la fracción proliferativa (Brown & Giaccia 1998). Sin embargo, cuando la capacidad de crecimiento del esferoide es tan alta, que rápidamente llega a su *plateau*, independientemente del número inicial de células que le dieron origen (*hM2*, *Lo*), el recrecimiento predomina sobre la citotoxicidad de los tratamientos, limitando la efectividad de esta terapia génica. Estos resultados apoyan fuertemente la teoría de resistencia multicelular por re-crecimiento cuya potencia sería intrínseca de cada tumor (Gil-Cardesa *et al.* 2010).

El índice proliferativo (IP) definido como la fracción de células en fases S, G<sub>2</sub>/M e hiperdiploide, estaría reflejando la capacidad de crecimiento propia de cada línea celular en ausencia de tratamiento (IP<sub>ctl</sub>: primera columna de la **Fig. 51**) o en respuesta al tratamiento con GS (IP<sub>GS</sub>: segunda columna de la **Fig. 51**). Todas las líneas derivadas de tumores con

pseudo-progresión *in vivo* (**Fig. 51**), exhibieron un aumento en el IP en respuesta a la lipofeción con el GS (IP<sub>GS</sub>).

El IP reflejó la respuesta al GS de las células tumorales tanto *in vivo* como *in vitro*. Cuanto más agresivo es el tumor (mayor IP<sub>cti</sub>), el recrecimiento predomina sobre la citotoxicidad del GS. Esto se evidencia en la **Fig. 52A**, dónde el volumen tumoral final en respuesta al GS *in vivo* correlacionó directamente con el estado proliferativo basal de sus respectivas líneas celulares (IP<sub>cti</sub>). Estos resultados sugieren que, la resistencia a este tratamiento genético observada en los tumores y en los cultivos derivados de los mismos, se debe al fenómeno, denominado “resistencia por re-crecimiento” dónde hay una repoblación de las áreas necrosadas por el GS (Brown & Giaccia 1998; Siemann 1998; Gil-Cardeza *et al.* 2010).

Por otro lado, cuanto mayor es la respuesta tumoral *in vivo* al GS, mayor es el aumento del IP de las células *in vitro*, en respuesta al tratamiento con el GS (IP<sub>GS</sub>) (**Fig. 52B**). Es más, el incremento del IP<sub>GS</sub> correlacionó con la supervivencia de los pacientes veterinarios luego del tratamiento con GS (**Fig. 53**). Estos resultados encontrados *in vivo*, se reflejaron *in vitro*. Se encontró una correlación significativa entre el incremento del IP<sub>GS</sub> y la respuesta *in vitro* a la lipofeción con el GS de las respectivas líneas celulares, en ambas configuraciones espaciales (**Fig. 54**). Estos resultados sugieren que el tratamiento con GS, desplazó el balance hacia la destrucción tumoral: eliminando una mayor proporción de células quiescentes, o promoviendo la proliferación de las mismas, y así, aumentando su sensibilidad a este tratamiento genético.

Por otro lado, la sensibilidad al gen suicida de los tumores *in vivo* correlacionó con la respuesta *in vitro* de las respectivas líneas celulares derivadas. El hecho de que las mismas células cultivadas como esferoides presentaran una mayor correlación con la respuesta *in vivo* de los respectivos tumores que sus respectivas monocapas, corrobora resultados previos de nuestro laboratorio dónde validamos el uso de esferoides como modelo predictivo de la respuesta clínica *in vivo* de los tumores respectivos, a las estrategias terapéuticas (Gil-Cardeza *et al.* 2010).

Los datos de la **Fig. 46**, muestran que no sólo el GS, sino también el IFN $\beta$ , la BLM, y sobre todo la combinación de ambos genes con BLM, aumentaron el IP en respuesta a las terapias, en aquellas células sensibles a los tratamientos, el cual, subsecuentemente condujo a una sensibilidad incrementada a estos agentes terapéuticos, evidenciada por el incremento en la fracción subG<sub>0</sub> (**Fig. 36**). Cabe destacar la significativa correlación entre la citotoxicidad a la quimio-genoterapia y la fracción celular exhibiendo (i) altos niveles intracelulares de ROS (**Fig. 29**), y (ii) alto IP (**Fig. 47**).

Existe evidencia de que los melanomas que originan tumores de rápido crecimiento, tienen menor proporción de células iniciadoras de tumor (CIT) (13%); mientras que los melanomas que dan lugar a tumores de crecimiento lento tienen una alta frecuencia (70%) de células iniciadoras (Quintana *et al.* 2010). Consideramos CIT a la sub-población de células con propiedades de células madre (CSC, *cancer stem cells*) o progenitoras, responsables de la iniciación, mantenimiento, recurrencia, metástasis y agresividad de los tumores.

Se ha reportado que las CIT necesitan bajos niveles de ROS para el mantenimiento de: (i) la capacidad de auto-renovación, (ii) el estado quiescente, (iii) la alta tumorigenicidad y (iv) la resistencia a las terapias. En cambio, las células con altos niveles intracelulares de ROS son activamente proliferativas y más sensibles a las terapias y a la diferenciación (Chang *et al.* 2014). Por lo tanto, un aumento en los niveles intracelulares de ROS como resultado del estrés oxidativo, inhibiría la auto-renovación e induciría la diferenciación de las CIT, tal como proponen Sato *et al.* (2014) en células de glioma.

Tal como sugerimos en nuestro trabajo (Fondello *et al.* 2016), la quimio-genoterapia incrementó los niveles intracelulares de ROS y la fracción de células proliferativas más

diferenciadas y sensibles al tratamiento. Entonces, se podría inferir que nuestros tratamientos, al inducir una constante proliferación, estarían extenuando la subpoblación de CIT (Jang & Sharkis 2007; Yoneyama *et al.* 2010). De hecho, esto se observó en la **Fig. 42** y **Fig. 44**, donde las dos principales características de las CIT, la capacidad de formar colonias y melanosferas (ME), casi desaparecen en las células sobrevivientes seis días post-tratamiento combinado de BLM/genoterapia (Fondello *et al.* 2016).

Indudablemente, un resultado muy alentador fue la alta correlación entre la fracción de células sobrevivientes a la quimio-genoterapia y su respectiva capacidad de formar (i) colonias (**Fig. 43**) y (ii) melanosferas (**Fig. 45**), en las tres líneas de melanoma humano evaluadas (Fondello *et al.* 2016).

Todos estos resultados y los de los ensayos clínicos veterinarios en pacientes con melanoma canino espontáneo, sugieren que nuestro tratamiento genético fue capaz de reducir las CIT, tanto *in vitro* como *in vivo*. Inyecciones directas intralesionales de los complejos lípido/GS (*lipoplexes*) co-administrados con GCV, produjeron un 62% de respuestas objetivas *in vivo*, de las cuales 30% eran respuestas completas (Finocchiaro & Glikin 2012). La alta proporción de respuestas tumorales completas sugiere que la terapia con GS fue capaz de eliminar las CIT *in vivo*. Asimismo, la combinación de la vacuna anti-tumoral con la administración local de GS (Finocchiaro & Glikin 2012) o GS e IFN $\beta$  (Finocchiaro *et al.* 2015) en el lecho quirúrgico, retrasó o previno la recurrencia post-quirúrgica y las metástasis distantes, mientras mejoró significativamente la sobrevida global y libre de enfermedad de nuestros pacientes veterinarios.

En conjunto, los datos aquí presentados sugieren que la respuesta a los tratamientos *in vivo* e *in vitro* correlacionó con la fracción de células con alto índice proliferativo. Esto último, sumado a la disminución en la capacidad de formar colonias y melanosferas, sugiere que la expresión sostenida de IFN $\beta$  y GS en combinación con BLM, al inducir una constante proliferación de las células quiescentes, más resistentes al tratamiento, va reduciendo su proporción, por extenuación y agotamiento de las mismas. De esta manera, este tratamiento reiterado en forma periódica, va reduciendo la fracción de TIC, e incrementando la fracción de células más diferenciadas y sensibles al tratamiento.

Todos estos resultados permiten vislumbrar el potencial clínico de nuestros tratamientos.

# Conclusiones

- Se establecieron y caracterizaron tres líneas celulares de melanoma humano obtenidas a partir de metástasis en nodos linfáticos (*hM1* y *hM2*) y en bazo (*hM4*) de pacientes del Instituto de Oncología “Ángel H. Roffo”.
- Estas líneas tumorales presentaron una gran heterogeneidad que se vió reflejada en: (i) la morfología de sus monocapas y esferoides, (ii) la presencia/ausencia de marcadores inmuno-citoquímicos, (iii) sus niveles intracelulares de especies reactivas del oxígeno (ROS) y (iv) su capacidad de formar colonias y melanoesferas.
- En estas líneas, tanto la lipofección del gen interferón- $\beta$  (IFN $\beta$ ) como del sistema gen suicida HSV $tk$ /GCV (GS) redujeron significativamente la IC<sub>50</sub> de bleomicina (BLM) con respecto a las monocapas sin lipofectar. Sin embargo, sólo la lipofección con el gen del IFN $\beta$  disminuyó significativamente la IC<sub>50</sub> de la BLM incorporada por lipofección ( $\beta$ gal).
- Las nueve líneas celulares humanas y caninas evaluadas resultaron sensibles a la quimioterapia, en ambas configuraciones espaciales. La co-administración de BLM incrementó la citotoxicidad de ambos genes terapéuticos.
- La magnitud de la respuesta a la terapia génica con IFN $\beta$  o GS no se vio limitada por la eficiencia de lipofección debido a un amplio efecto *bystander*.
- Los tratamientos aumentaron la permeabilidad de la membrana mitocondrial (pérdida de  $\Delta\psi_m$ ) y los niveles de ROS. Esto sugiere que las mitocondrias serían las principales mediadoras y amplificadoras del efecto *bystander*.
- La quimio-genoterapia indujo muerte celular por apoptosis tardía/necrosis y senescencia precoz.
- La quimio-genoterapia disminuyó la capacidad de formar colonias y melanoesferas de las células tumorales sobrevivientes.
- El índice proliferativo (IP, fracción de células en fases S, G<sub>2</sub>/M e hiperdiploide) reflejó la respuesta de las células tumorales *in vivo* e *in vitro*. Se encontró una correlación inversa entre el incremento del IP debido al GS (IP<sub>GS</sub>) de las líneas celulares derivadas de los tumores y la respuesta al GS de (i) los tumores *in vivo*, y (ii) las respectivas líneas celulares *in vitro*.
- La supervivencia de los pacientes caninos luego del tratamiento con GS también correlacionó con el incremento del IP debido al GS (P<sub>GS</sub>) de las líneas celulares derivadas de los tumores de estos pacientes.
- La sensibilidad al GS de los tumores *in vivo* correlacionó con la respuesta *in vitro* de las respectivas líneas celulares derivadas.
- Todos estos resultados permiten vislumbrar la capacidad predictiva de las líneas celulares de la respuesta clínica *in vivo* de los tumores respectivos a las estrategias terapéuticas y el potencial clínico de nuestros tratamientos.



# **Referencias bibliográficas**

1. Acharya A, Das I, Chandhok D, Saha T. Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential. *Oxid Med Cell Longev*. 2010;3(1):23-34. doi:10.4161/oxim.3.1.10095.
2. American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 2016. 2016:1-72. <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2016/cancer-facts-and-figures-2016.pdf>.
3. Aoshiba K, Tsuji T, Nagai A. Bleomycin induces cellular senescence in alveolar epithelial cells. *Eur Respir J*. 2003;22(3):436-443. doi:10.1183/09031936.03.00011903.
4. Beltinger C, Fulda S, Kammertoens T, Uckert W, Debatin K. Mitochondrial Amplification of Death Signals Determines Thymidine Kinase / Ganciclovir-triggered Activation of Apoptosis. 2000;6(3):3212-3217.
5. Bergman PJ, Mcknight J, Novosad A, et al. Long-Term Survival of Dogs with Advanced Malignant Melanoma after DNA Vaccination with Xenogeneic Human Tyrosinase : A Phase I Trial Advances in Brief Long-Term Survival of Dogs with Advanced Malignant Melanoma after DNA Vaccination with Xenogeneic Human. *Clin Cancer Res*. 2003;9:1284-1290.
6. Bergman PJ, Wolchok JD. Of mice and med (and dogs): development of a xenogeneic DNA vaccine for canine oral malignant melanoma. *Cancer Ther*. 2008;6:817-826.
7. Bigarella CL, Liang R, Ghaffari S. Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development*. 2014;141(22):4206-4218. doi:10.1242/dev.107086.
8. Bloethner S, Snellman E, Bermejo JL, et al. Differential Gene Expression in Melanocytic Nevi with the V600E BRAF Mutation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007;47:238-246. doi:10.1002/gcc.
9. Boiko AD, Razorenova O V, Rijn M Van De, et al. Human Melanoma Initiating Cells Express Neural Crest Nerve Growth Factor Receptor CD271. *Nature*. 2010;466(7302):133-137. doi:10.1038/nature09161.Human.
10. Boria PA, Murry DJ, Bennett PF, et al. Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2004;218(11):1783-1786.
11. Bracarda S, Eggermont AMM, Samuelsson J. Redefining the role of interferon in the treatment of malignant diseases. *Eur J Cancer*. 2010;46(2):284-297. doi:10.1016/j.ejca.2009.10.013.
12. Brown JM, Giaccia AJ. The Unique Physiology of Solid Tumors : Opportunities (and Problems) for Cancer Therapy. *Cancer Res*. 1998;58(9):1408-1416.
13. Burgy O, Wettstein G, Bellaye PS, et al. Deglycosylated bleomycin has the antitumor activity of bleomycin without pulmonary toxicity. *Sci Transl Med*. 2016;8(326):1-10. doi:10.1126/scitranslmed.aad7785.
14. Cairns R, Harris I, Mak T. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(2):85-95. doi:10.1038/nrc2981.
15. Cao S, Cripps A, Wei MQ. New strategies for cancer gene therapy: Progress and opportunities. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010;37(1):108-114. doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05268.x.
16. Casais CC, Karara AL, Glikin GC, Liliana ME. Effects of spatial configuration on tumor cells transgene expression. *Gene Ther Mol Biol*. 2006;10:207-222.
17. Chang CW, Chen YJS, Chou SH, et al. Distinct subpopulations of head and neck cancer cells with different levels of intracellular reactive oxygen species exhibit diverse stemness, proliferation, and chemosensitivity. *Cancer Res*. 2014;74(21):6291-6305. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0626.
18. Chen S, Zhao Y, Zhao G, et al. Up-regulation of ROS by mitochondria-dependent bystander signaling contributes to genotoxicity of bystander effects. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2009;666(1-2):68-73. doi:10.1016/j.mrfmmm.2009.04.006.
19. Chen X, Zhong Z, Xu Z, Chen L, Wang Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy. *Free Radic Res*. 2010;44(6):587-604. doi:10.3109/10715761003709802.
20. Chen Y, Zhang H, Jenny H, Ji W, Min W. Mitochondrial redox signaling and tumor progression. *Cancers (Basel)*. 2015;8(4):1-15. doi:10.3390/cancers8040040.
21. Chin L, Garraway L a, Fisher DE. Malignant melanoma : genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev*. 2006;20:2149-2182. doi:10.1101/gad.1437206.
22. Costa EC, Gaspar VM, Coutinho P, Correia IJ. Optimization of liquid overlay technique to formulate heterogenic 3D co-cultures models. *Biotechnol Bioeng*. 2014;111(8):1672-1685. doi:10.1002/bit.25210.
23. Costa EC, Moreira AF, de Melo-Diogo D, Gaspar VM, Carvalho MP, Correia IJ. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol Adv*. 2016;34(8):1427-1441. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.11.002.
24. 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(8):1283-1289. doi:10.1038/sj.bjc.6600239.
25. De Souza CF, Morais AS, Jasiulionis MG. Biomarkers as key contributors in treating malignant melanoma

- metastases. *Dermatol Res Pract.* 2012;1-14. doi:10.1155/2012/156068.
26. Desoize B, Jardillier JC. Multicellular resistance: A paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2000;36(2-3):193-207. doi:10.1016/S1040-8428(00)00086-X.
  27. Dey D, Evans GRD. Suicide Gene Therapy by Herpes Simplex Virus-1 Thymidine Kinase (HSV-TK). In: *Targets in Gene Therapy.* ; 2011:65-76.
  28. Dick JE. Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat Biotechnol.* 2009;27(1):44-46. doi:10.1038/mt.2008.213.
  29. Diehn M, Cho RW, Lobo NA, *et al.* Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature.* 2009;458(7239):780-783. doi:10.1038/nature07733.
  30. Dissanayake SK, Olkhanud PB, O'Connell MP, *et al.* Wnt5A regulates expression of tumor-associated antigens in melanoma via changes in signal transducers and activators of transcription 3 phosphorylation. *Cancer Res.* 2008;68(24):10205-10214. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2149.
  31. Ermiah E, Buhmeida A, Abdalla F, Khaled BR, Salem N. Prognostic Value of Proliferation Markers: Immunohistochemical Ki-67 Expression and Cytometric S-Phase Fraction of Women with Breast Cancer in Libya. *J Cancer.* 2012;3:421-431. doi:10.7150/jca.4944.
  32. Fecher LA, Cummings SD, Keefe MJ, Alani RM. Toward a Molecular Classification of Melanoma. *J Clin Oncol.* 2007;25(12):1606-1620. doi:10.1200/JCO.2006.06.0442.
  33. 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(4):2550-2561. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8300583>.
  34. Fillat C, Carrio M, Cascante A, Sangro B. Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: fifteen years of application. *Curr Gene Ther.* 2003;3(1):13-26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12553532>.
  35. Finocchiaro LME, Fiszman GL, Karara a L, Glikin GC. Suicide gene and cytokines combined nonviral gene therapy for spontaneous canine melanoma. *Cancer Gene Ther.* 2008;15(3):165-172. doi:10.1038/sj.cgt.7701096.
  36. Finocchiaro LME, Fondello C, Gil-Cardeza ML, *et al.* Cytokine-Enhanced Vaccine and Interferon-beta plus Suicide Gene Therapy as Surgery Adjuvant Treatments for Spontaneous Canine Melanoma. *Hum Gene Ther.* 2015;26(6):367-376. doi:10.1089/hum.2014.130.
  37. Finocchiaro LME, Glikin GC. Cytokine-enhanced vaccine and suicide gene therapy as surgery adjuvant treatments for spontaneous canine melanoma : 9 years of follow-up. *Cancer Gene Ther.* 2012;19(12):852-861. doi:10.1038/cgt.2012.72.
  38. Finocchiaro LME, Glikin GC. Cytokine-enhanced vaccine and suicide gene therapy as surgery adjuvant treatments for spontaneous canine melanoma. *Gene Ther.* 2008;15(4):267-276. doi:10.1038/sj.gt.3303072.
  39. Finocchiaro LME, Fondello C, Gil-Cardeza ML, *et al.* Cytokine-Enhanced Vaccine and Interferon-beta plus Suicide Gene Therapy as Surgery Adjuvant Treatments for Spontaneous Canine Melanoma. *Hum Gene Ther.* 2015;26(6):367-376. doi:10.1089/hum.2014.130.
  40. Finocchiaro LME, Bumashny VF, Karara AL, Fiszman GL, Casais CC, Glikin GC. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system in multicellular tumor spheroids. *Cancer Gene Ther.* 2004;11:333-345. doi:10.1038/sj.cgt.7700682.
  41. Finocchiaro LME, Villaverde MS, Gil-cardeza ML, Riveros MD, Glikin GC. Cytokine-enhanced vaccine and interferon- b plus suicide gene as combined therapy for spontaneous canine sarcomas. *Res Vet Sci.* 2011;91:230-234. doi:10.1016/j.rvsc.2010.12.012.
  42. Flaherty KT. BRAF Inhibitors and Melanoma. *Cancer J.* 2011;17(6):505-511. doi:10.1097/PPO.0b013e31823e5357.
  43. Flaherty KT, Hodi FS, Bastian BC. Mutation-driven drug development in melanoma. *Curr Opin Oncol.* 2010;22(3):178-183.
  44. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, *et al.* Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med.* 2010;363(9):809-819. doi:10.1056/NEJMoa1002011.Inhibition.
  45. Fondello C, Agnetti L, Villaverde MS, Simian M, Glikin GC, Finocchiaro LME. The combination of bleomycin with suicide or interferon-beta gene transfer is able to efficiently eliminate human melanoma tumor initiating cells. *Biomed Pharmacother.* 2016;83:290-301. doi:10.1016/j.biopha.2016.06.038.
  46. Frank NY, Margaryan A, Huang Y, *et al.* ABCB5-Mediated Doxorubicin Transport and Chemoresistance in Human Malignant Melanoma. *Cancer Res.* 2005;65(10):4320-4333.
  47. Frankel A, Man S, Elliott P, Adams J, Kerbel RS. Lack of Multicellular Drug Resistance Observed in Human Ovarian and Prostate Carcinoma Treated with the Proteasome Lack of Multicellular Drug Resistance Observed in Human Ovarian and Prostate Carcinoma Treated with the Proteasome. *Clin Cancer Res.*

2000;6:3719-3728.

48. Franken N a P, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.* 2006;1(5):2315-2319. doi:10.1038/nprot.2006.339.
49. Freeman KP, Hahn KA, Harris FD, King GK. Treatment of Dogs with Oral Melanoma by Hypofractionated Radiation Therapy and Platinum-Based Chemotherapy (1987–1997). *J Vet Intern Med.* 2003;17:96-101.
50. Freshney R. *Animal Cell Culture: A Practical Approach.*; 1986. doi:10.1290/BR090501.1.
51. Friedrich J, Eder W, Castaneda J, et al. A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the Acid phosphatase assay. *J Biomol Screen.* 2007;12(7):925-937. doi:10.1177/1087057107306839.
52. Gerdes J, Li L, Schlueter C, et al. Immunobiochemical and Molecular Biologic Characterization of the Cell Proliferation-associated Nuclear Antigen That Is Defined by Monoclonal Antibody Ki-67. *Am J Pathol.* 1991;138(4):867-873.
53. Gerlach N, Schimmer S, Weiss S, Kalinke U, Dittmer U. Effects of Type I Interferons on Friend Retrovirus Infection. *J Virol.* 2006;80(7):3438-3444. doi:10.1128/JVI.80.7.3438.
54. Gil-Cardeza ML, Villaverde MS, Fiszman GL, et al. Suicide gene therapy on spontaneous canine melanoma : correlations between in vivo tumors and their derived multicell spheroids in vitro. *Gene Ther.* 2010;17(1):26-36. doi:10.1038/gt.2009.107.
55. Gil-Cardeza ML, Rossi úrsula A, Villaverde MS, Glikin GC, Finocchiaro LME. Cationic lipid: DNA complexes allow bleomycin uptake by melanoma cells. *Biomed Pharmacother.* 2013;67(4):269-275. doi:10.1016/j.biopha.2013.01.002.
56. Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 – an update. *J Gene Med.* 2013;15:65-77. doi:10.1002/jgm.
57. Girotti MR, Lopes F, Preece N, et al. Paradox-breaking RAF inhibitors that also target SRC are effective in drug-resistant BRAF mutant melanoma. *Cancer Cell.* 2015;27(1):85-96. doi:10.1016/j.ccell.2014.11.006.
58. Girotti MR, Saturno G, Lorigan P, Marais R. No longer an untreatable disease: How targeted and immunotherapies have changed the management of melanoma patients. *Mol Oncol.* 2014;8(6):1140-1158. doi:10.1016/j.molonc.2014.07.027.
59. Glikin GC, Finocchiaro LME. Clinical trials of immunogene therapy for spontaneous tumors in companion animals. *Sci World J.* 2014;2014:1-13. doi:10.1155/2014/718520.
60. Goodson WH, Moore DH, Ljung BM, et al. The prognostic value of proliferation indices: A study with in vivo bromodeoxyuridine and Ki-67. *Breast Cancer Res Treat.* 2000;59(2):113-123. doi:10.1023/A:1006344010050.
61. Gorantla VC, Kirkwood JM. State of Melanoma An Historic Overview of a Field in Transition. *Hematol Clin NA.* 2014;28(3):415-435. doi:10.1016/j.hoc.2014.02.010.
62. Gordon I, Paoloni M, Mazcko C, Khanna C. The Comparative Oncology Trials Consortium: Using Spontaneously Occurring Cancers in Dogs to Inform the Cancer Drug Development Pathway. *PLoS Med.* 2009;6(10):2-6. doi:10.1371/journal.pmed.1000161.
63. Gupta SC, Hevia D, Patchva S, Park B, Koh W, Aggarwal BB. Upsides and Downsides of Reactive Oxygen Species for Cancer : The Roles of Reactive Oxygen Species. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16(11):1295-1322. doi:10.1089/ars.2011.4414.
64. Hamilton G. Multicellular spheroids as an in vitro tumor model. *Cancer Lett.* 1998;131:29-34.
65. Hendrix MJC, Seftor E a, Hess AR, Seftor REB. Molecular plasticity of human melanoma cells. *Oncogene.* 2003;22(20):3070-3075. doi:10.1038/sj.onc.1206447.
66. Henry CM, Hollville E, Martin SJ. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods.* 2013;61(2):90-97. doi:10.1016/j.ymeth.2013.01.008.
67. Henry-Mowatt J, Dive C, Martinou J-C, James D. Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene.* 2004;23:2850-2860. doi:10.1038/sj.onc.1207534.
68. Hoek KS, Schlegel NC, Brafford P, et al. Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res.* 2006;19(4):290-302. doi:10.1111/j.1600-0749.2006.00322.x.
69. Hollville E, Martin SJ. Measuring Apoptosis by Microscopy and Flow Cytometry. *Curr Protoc Immunol.* 2016;112:14.38.1-14.38.24. doi:10.1002/0471142735.im1438s112.
70. Jang Y, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood.* 2007;110(8):3056-3063. doi:10.1182/blood-2007-05-087759.An.
71. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, et al. COT/MAP3K8 drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature.* 2010;468(7326):968-972. doi:10.1038/nature09627.COT/.
72. Karara AL, Bumashny VF, Fiszman GL, Casais CC. 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.* 2002;9:96-99.
73. Kilbridge BKL, Weeks JC, Sober AJ, *et al.* Patient Preferences for Adjuvant Interferon Alfa-2b Treatment. *J Clin Oncol.* 2001;19(3):812-823.
  74. Kimlin LC, Casagrande G, Virador VM. In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: An update. *Mol Carcinog.* 2011;52(3):167-182. doi:10.1002/mc.21844.
  75. Kirkwood BJM, Ibrahim JG, Sondak VK, *et al.* High- and Low-Dose Interferon Alfa-2b in High-Risk Melanoma: First Analysis of Intergroup Trial E1690/S9111/ C9190. *J Clin Oncol.* 2000;18(12):2444-2458.
  76. Kleinsmith LJ, Pierce GB. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res.* 1964;24:1544-1551.
  77. Koh HK. Cutaneous Melanoma. *N Engl J Med.* 1991;325(3):171-182.
  78. Kucuksayan E, Cort A, Timur M, Ozdemir E, Yucel SG, Ozben T. N-acetyl-L-cysteine inhibits bleomycin induced apoptosis in malignant testicular germ cell tumors. *J Cell Biochem.* 2013;114(7):1685-1694. doi:10.1002/jcb.24510.
  79. Kuo LJ, Yang L-X. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo (Brooklyn).* 2008;22(3):305-309.
  80. Laberge R-M, Adler D, DeMaria M, *et al.* Mitochondrial DNA damage induces apoptosis in senescent cells. *Cell Death Dis.* 2013;4(7):1-8. doi:10.1038/cddis.2013.199.
  81. Lapidot T, Sirad C, Vormoor J. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Lett to Nat.* 1994;367:645-648.
  82. Linderholm BK, Linder S, Arnesson L, Stål O. Identification of intermediate risk breast cancer patients with 1 e 3 positive lymph nodes and excellent survival after tamoxifen as only systemic adjuvant therapy by use of markers of proliferation and apoptosis. *The Breast.* 2013;22:643-649. doi:10.1016/j.breast.2013.07.043.
  83. Liu J, Fukunaga-Kalabis M, Li L, Her M. Developmental Pathways Activated in Melanocytes and Melanoma. *Biophys Chem.* 2014;257(5):2432-2437. doi:10.1016/j.immuni.2010.12.017.Two-stage.
  84. Lovitt CJ, Shelper TB, Avery VM. Advanced Cell Culture Techniques for Cancer Drug Discovery. *Biology (Basel).* 2014;3:345-367. doi:10.3390/biology3020345.
  85. Matsumoto K, Kubo H, Murata H, *et al.* A pilot study of human interferon beta gene therapy for patients with advanced melanoma by in vivo transduction using cationic liposomes. *Jpn J Clin Oncol.* 2008;38(12):849-856. doi:10.1093/jjco/hyn114.
  86. Matthews T, Boehme R. Antiviral Activity and Mechanism of Action of Ganciclovir. *Clin Infect Dis.* 1988;10(Supplement 3):S490-S494. doi:10.1093/clinids/10.Supplement\_3.S490.
  87. Michels J-J, Duigou F, Marnay J, Denoux Y, Delozier T, Chasle J. Flow cytometry in primary breast carcinomas: prognostic impact of multiploidy and hypoploidy. *Breast Cancer Res Treat.* 2000;62:117-126. doi:10.1002/cyto.b.10040.
  88. Miller AJ, Mihm MC. melanoma. *N Engl J Med.* 2006:51-65.
  89. Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E, *et al.* Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential. *Eur J Cancer.* 2007;3:1-12. doi:10.1016/j.ejca.2007.01.017.
  90. Moolten FL. Tumor Chemosensitivity Conferred by Inserted Herpes Thymidine Kinase Genes : Paradigm for a Prospective Cancer Control Strategy1. *Cancer Res.* 1986;46:5276-5281.
  91. Mroz EA, Rocco JW. The Challenges of Tumor Genetic Diversity. *Cancer.* 2016;(614):1-11. doi:10.1002/cncr.30430.
  92. Mungunsukh O, Griffin AJ, Lee YH, Day RM. Bleomycin induces the extrinsic apoptotic pathway in pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2010;298(5):L696-L703. doi:10.1152/ajplung.00322.2009.
  93. Nazarian R, Shi H, Wang Q, *et al.* Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature.* 2010;468(7326):973-977. doi:10.1038/nature09626.Melanomas.
  94. Nowell PC. The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations. *Science (80- ).* 1976;194:23-28.
  95. Ossowski L, Aguirre-Ghiso JA. Dormancy of metastatic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010;23(1):41-56. doi:10.1111/j.1755-148X.2009.00647.x.
  96. Paoloni MC, Vail DM. *Clinical Trials and Developmental Therapeutics.* Fifth Edit. Elsevier Inc.; 2013. doi:10.1016/B978-1-4377-2362-5.00017-7.
  97. Parker BS, Rautela J, Hertzog PJ. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat Rev.* 2016;16(3):131-144. doi:10.1038/nrc.2016.14.
  98. Paulsen CE, Carroll KS. Cysteine-mediated redox signaling: Chemistry, biology, and tools for discovery. *Chem*

Rev. 2013;113(7):4633-4679. doi:10.1021/cr300163e.

99. Pfeifer A, Verma IM. GENE THERAPY: Promises and Problems. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2001;2(1):177-211. doi:10.1146/annurev.genom.2.1.177.
100. Phung YT, Barbone D, Broaddus VC, Ho M. Rapid generation of in vitro multicellular spheroids for the study of monoclonal antibody therapy. *J Cancer.* 2011;2(1):507-514. doi:10.7150/jca.2.507.
101. Piliang MP. Acral Lentiginous Melanoma. *Clin Lab Med.* 2011;31(2):281-288. doi:10.1016/j.cl.2011.03.005.
102. Poot M, Zhang YZ, Kramer JA, et al. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J Histochem Cytochem.* 1996;44(12):1363-1372. doi:10.1177/44.12.8985128.
103. Prasad ML, Patel SG, Huvos AG, Shah JP, Busam KJ. Primary Mucosal Melanoma of the Head and Neck: A Proposal for Microstaging Localized, Stage I (Lymph Node-Negative) Tumors. *Cancer.* 2004;100(8):1657-1664. doi:10.1002/cncr.20201.
104. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett.* 2016;1-32. doi:10.1016/j.canlet.2016.03.042.
105. Prasad S, Yadav VR, Ravindran J, Aggarwal BB. ROS and CHOP are Critical for Dibenzylideneacetone to Sensitize Tumor Cells to TRAIL Through Induction of Death Receptors and Downregulation of Cell Survival Proteins. *Cancer Res.* 2011;144(5):724-732. doi:10.1038/jid.2014.371.
106. Quintana E, Shackleton M, Foster HR, et al. Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell.* 2010;18(5):510-523. doi:10.1016/j.ccr.2010.10.012.
107. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Timothy M, Morrison SJ. Efficient tumor formation by single human melanoma cells. *Nature.* 2008;456(7222):593-598. doi:10.1038/nature07567.
108. Rassnick KM, Ruslander DM, Cotter SM, et al. Use of carboplatin for treatment of dogs with Malignant Melanoma: 27 Cases (1989 – 2000). *J Am V Med Assoc.* 2001;218(9):1444-1448.
109. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414(6859):105-111. doi:10.1038/35102167.
110. Roesch A, Fukunaga-kalabis M, Schmidt EC, et al. A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell.* 2010;141(4):583-594. doi:10.1016/j.cell.2010.04.020.A.
111. Rogakou EP, Pilch DR, Ann H, et al. DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139 \*. *J Biol chemistry.* 1998;273(10):1-12. doi:10.1074/jbc.273.10.5858.
112. Rossi UA, Gil-Cardesa ML, Villaverde MS, Finocchiaro LME, Glikin GC. Interferon-beta gene transfer induces a strong cytotoxic bystander effect on melanoma cells. *Biomed Pharmacother.* 2015;72:44-51. doi:10.1016/j.biopha.2015.04.002.
113. Rusk A, McKeegan E, Haviv F, Majest S, Henkin J, Khanna C. Preclinical evaluation of antiangiogenic thrombospondin-1 peptide mimetics, ABT-526 and ABT-510, in companion dogs with naturally occurring cancers. *Clin Cancer Res.* 2006;12(24):7444-7455. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0109.
114. 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(2-3):75-87. doi:10.1016/S1040-8428(00)00078-0.
115. Sato A, Okada M, Shibuya K, et al. Pivotal role for ROS activation of p38 MAPK in the control of differentiation and tumor-initiating capacity of glioma-initiating cells. *Stem Cell Res.* 2014;12(1):119-131. doi:10.1016/j.scr.2013.09.012.
116. Schatton T, Murphy GF, Frank1 NY, et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature.* 2008;451(7176):345-349. doi:10.1038/nature06489.Identification.
117. Shen Y, Nemunaitis J. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) for cancer treatment. *Cancer Gene Ther.* 2006;13(11):975-992. doi:10.1038/sj.cgt.7700946.
118. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics , 2017. *A Cancer J Clin.* 2017;67:7-30. doi:10.3322/caac.21254.
119. Siemann DW. The tumor microenvironment: a double-edged sword d. *Int J Radiat Oncol.* 1998;42(4):697-699.
120. Silhavy TJ, Beckwith JR. Uses of lac fusions for the study of biological problems. *Microbiol Rev.* 1985;49(4):398-418.
121. Simpson RM, Bastian BC, Michael HT, et al. Sporadic naturally occurring melanoma in dogs as a preclinical model for human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013;27(1):37-47. doi:10.1111/pcmr.12185.
122. Somasundaram R, Villanueva J, Herlyn M. *Intratumoral Heterogeneity as a Therapy Resistance Mechanism. Role of Melanoma Subpopulations.* Vol 65. Elsevier Inc.; 2012. doi:10.1016/B978-0-12-397927-8.00011-7.

123. Soofiyani SR, Baradaran B, Lotfipour F, Kazemi T, Mohammadnejad L. Gene therapy, early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs. *Adv Pharm Bull.* 2013;3(2):249-255. doi:10.5681/apb.2013.041.
124. Squier MK, Cohen JJ. Standard quantitative assays for apoptosis. *Mol Biotechnol.* 2001;19(3):305-312. doi:10.1385/MB:19:3:305.
125. Streck CJ, Dickson P V, Ng CYC, *et al.* Antitumor efficacy of AAV-mediated systemic delivery of interferon-beta. *Cancer Gene Ther.* 2006;13(1):99-106. doi:10.1038/sj.cgt.7700878.
126. Sullivan R, LoRusso P, Boerner S, Dummer R. *Achievements and Challenges of Molecular Targeted Therapy in Melanoma.* Vol 35.; 2015. doi:10.14694/EdBook\_AM.2015.35.177.
127. Vandamme N, Berx G. Melanoma cells revive an embryonic transcriptional network to dictate phenotypic heterogeneity. *Front Oncol.* 2014;4:352. doi:10.3389/fonc.2014.00352.
128. Vanden Berghe T, Grootjans S, Goossens V, *et al.* Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods.* 2013;61(2):117-129. doi:10.1016/j.ymeth.2013.02.011.
129. Vidwans SJ, Flaherty KT, Fisher DE, Tenenbaum JM, Travers MD, Shrager J. A melanoma molecular disease model. *PLoS One.* 2011;6(3):1-10. doi:10.1371/journal.pone.0018257.
130. Villanueva J, Vultur A, Herlyn M. Resistance to BRAF inhibitors: Unraveling mechanisms and future treatment options. *Cancer Res.* 2013;71(23):7137-7140. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1243.Resistance.
131. Villanueva J, Vultur A, Lee JT, *et al.* Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by co-targeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer.* 2010;18(6):683-695. doi:10.1016/j.ccr.2010.11.023.Acquired.
132. Villaverde MS, Gil-Cardesa ML, Glikin GC, Finocchiaro LME. Interferon- $\beta$  lipofection I. Increased efficacy of chemotherapeutic drugs on human tumor cells derived monolayers and spheroids. *Cancer Gene Ther.* 2012;19(7):508-516. doi:10.1038/cgt.2012.27.
133. Villaverde MS, Gil-Cardesa ML, Glikin GC, Finocchiaro LME. Interferon-beta lipofection II. Mechanisms involved in cell death and bystander effect induced by cationic lipid-mediated interferon-beta gene transfer to human tumor cells. *Cancer Gene Ther.* 2012;19(6):420-430. doi:10.1038/cgt.2012.19.
134. Villaverde MS, Targovnik AM, Miranda MV, Finocchiaro LME, Glikin GC. Cytotoxic effects induced by interferon-beta gene lipofection through ROS generation and mitochondrial membrane potential disruption in feline mammary carcinoma cells. *Cytokine.* 2016;84:47-55. doi:10.1016/j.cyto.2016.05.018.
135. Viray H, Bradley WR, Schalper KA, Rimm DL, Rothberg BEG. Marginal and joint distributions of S100, HMB-45, and Melan-A across a large series of cutaneous melanomas. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137(8):1063-1073. doi:10.5858/arpa.2012-0284-OA.
136. Wallach-Dayana SB, Izbicki G, Cohen PY, Gerstl-Golan R, Fine A, Breuer R. Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006;290(4):L790-L796. doi:10.1152/ajplung.00300.2004.
137. Wan PT, Garnett MJ, Ros SM, *et al.* Mechanism of activation of the Raf-MEK signaling pathway by oncogenic mutations of B-Raf. *Cell.* 2004;116:856-867.
138. Yang M, Liu P, Huang P. Cancer stem cells, metabolism, and therapeutic significance. *Tumor Biol.* 2016;37(5):5735-5742. doi:10.1007/s13277-016-4945-x.
139. Yang TT, Sinai P, Kain SR. An acid phosphatase assay for quantifying the growth of adherent and nonadherent cells. *Anal Biochem.* 1996;241(1):103-108. doi:10.1006/abio.1996.0383.
140. Yildirim-Assaf S, Coumbos A, Hopfenmüller W, Foss H-D, Stein H, Kühn W. The prognostic significance of determining DNA content in breast cancer by DNA image cytometry: the role of high grade aneuploidy in node negative breast cancer. *J Clin Pathol.* 2007;60(6):649-655. doi:10.1136/jcp.2005.035550.
141. Yoneyama M, Kawada K, Gotoh Y, Shiba T, Ogita K. Endogenous reactive oxygen species are essential for proliferation of neural stem/progenitor cells. *Neurochem Int.* 2010;56(6-7):740-746. doi:10.1016/j.neuint.2009.11.018.
142. Yoshida J, Mizuno M, Wakabayashi T.  $\beta$  gene therapy for cancer: Basic research to clinical application. *Cancer Sci.* 2004;95(11):858-865. doi:10.1111/j.1349-7006.2004.tb02194.x.
143. Zabierowski SE, Herlyn M. Melanoma stem cells: The dark seed of melanoma. *J Clin Oncol.* 2008;26(17):2890-2894. doi:10.1200/JCO.2007.15.5465.
144. Zannoni M, Piccinini F, Arienti C, *et al.* 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Sci Rep.* 2015;6:1-11. doi:10.1038/srep19103.
145. Zhang J, Zhang H, Zhang X, Yu Z. Synergistic effect of retinoic acid and vitamin D analog EB1089-induced apoptosis of hepatocellular cancer cells. *Cytotechnology.* 2012;65(3):457-465. doi:10.1007/s10616-012-9500-z.