



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Román
Seco Gudiña

Tesis doctoral

Terapia dirigida en el proceso
tumoral: un enfoque
multidisciplinar

Santiago de Compostela, 2023

Programa de doctorado en Nanomedicina



TESIS DE DOCTORADO

TERAPIA DIRIGIDA EN EL PROCESO TUMORAL: UN ENFOQUE MULTIDISCIPLINAR

Román Seco Gudiña

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN NANOMEDICINA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2023



D./Dna. **Román Seco Gudiña**

Título da tese: **Terapia dirigida en el proceso tumoral: un enfoque multidisciplinar**

Presento a miña tese, seguindo o procedemento axeitado ao Regulamento, e declaro que:

- 1) A tese abarca os resultados da elaboración do meu traballo.
- 2) De ser o caso, na tese faise referencia ás colaboracións que tivo este traballo.
- 3) Confirmo que a tese non incorre en ningún tipo de plaxio doutros autores nin de traballos presentados por min para a obtención doutros títulos.
- 4) A tese é a versión definitiva presentada para a súa defensa e coincide a versión impresa coa presentada en formato electrónico

E comprométome a presentar o Compromiso Documental de Supervisión no caso de que o orixinal non estea na Escola.

En **Santiago de Compostela, 18 de Maio de 2022.**

Sinatura electrónica

D./Dna. **Maria de la Fuente/Rafael López/José Rivas**

En condición de: **Titor/a e director/a**

Título da tese: **Terapia dirigida en el proceso tumoral: un enfoque multidisciplinar**

INFORMA:

Que a presente tese, correspóndese co traballo realizado por D/Dna Román Seco Gudiña, baixo a miña dirección/titorización, e autorizo a súa presentación, considerando que reúne os requisitos esixidos no Regulamento de Estudos de Doutoramento da USC, e que como director/titor desta non incorre nas causas de abstención establecidas na Lei 40/2015.

En **Santiago de Compostela, 18 de Maio de 2022**

Sinatura electrónica

El trabajo descrito en esta tesis se realizó en el Hospital Universitario de Santiago de Compostela (CHUS), y en el Instituto de Materiales de la Universidad de Santiago de Compostela, España.

Yo, Román Seco Gudiña, autor de esta tesis, declaro que no tengo ningún conflicto de intereses.

Yo, Román Seco Gudiña, autor de esta tesis, declaro que todas las figuras presentes en este documento son realizadas por mí, salvo las indicadas en el apartado de anexos.

“Esto es por los locos, los inadaptados, los rebeldes, los alborotadores, las clavijas redondas en los agujeros cuadrados... Los que ven las cosas de manera diferente — no les gustan las reglas... Puedes citarlos, estar en desacuerdo con ellos, glorificarlos o vilipendiarlos, pero lo único que no puedes hacer es ignorarlos porque cambian las cosas... Empujan a la raza humana hacia adelante, y mientras algunos pueden verlos como los locos, nosotros vemos genios, porque las personas que están lo bastante locas como para creer que pueden cambiar el mundo, son las que lo hacen.”.

A mis padres

A mi abuelo

Agradecimientos

Siempre se me ha inculcado que es de buen nacido ser agradecido, debido a eso quiero que mis primeras palabras sean de agradecimiento.

En primer lugar agradecer a mis directores, por la confianza que han depositado en mí para realizar esta tesis: A **María** por su tiempo y dedicación, por permitirme realizar todos los experimentos necesarios y guiarme en mis primeros pasos, partiendo de prácticamente cero y mostrándome la dinámica de trabajo de un grupo de investigación. A **Pepe** por su apoyo y sus lecciones tan sabias, su buena acogida la primera vez que nos entrevistamos y sobre todo esa calidez tan entrañable que le caracteriza. Asimismo su interés y fascinación por todos los experimentos que he hecho mezclando las áreas de biomedicina con la física o la química. A **Rafa** me gustaría agradecerle prácticamente todo lo que ha hecho por mí. Nunca serán suficientes las palabras o los gestos para demostrarle cuanta gratitud le debo. Primeramente por querer entrevistarme, por confiar en mí y mis ideas de ciencia ficción, apoyarme ante el mínimo problema o quitarle importancia para que no me agobiara. Por su gran interés en todo lo que le he comentado o mostrado, su preocupación, su cercanía, sus consejos y su disposición a ayudarme siempre.

Agradecer también a mis compañeras (**Abi, Sandra A., Sandra D., y Sainza**) de la unidad de Nano-Oncología quienes me ayudaron a comenzar este viaje enseñándome técnicas, programas y el funcionamiento de todo el entramado que supone la investigación.

También mostrar mi agradecimiento a **Marta y Jose Luis** del Servicio de Microscopía y Gestión de Laboratorios por su buena voluntad y toda la ayuda recibida.

Me gustaría agradecer también a todos los miembros del grupo NANOMAG, por su ambiente tan acogedor y amigable, en especial: A **Yolanda**, por su asesoramiento, sus ideas, su tiempo, su interés en que sacara artículos y pósteres así como nuevos resultados con mis experimentos tan excéntricos. A mis compañeros **Ángela, Lisandra, Pelayo y Susana** con quienes he compartido viajes, congresos, tardes interminables de trabajo, apuros por tener que entregar tareas en los tiempos establecidos, debates sobre ciencia y un largo etcétera que conforman el gran aprendizaje que he adquirido hasta hoy, tanto a nivel profesional como personal. Por último, mencionar de forma especial a **Manu**. Me gustaría agradecerle desde el primer momento su cercanía, sus buenas vibraciones, su compañerismo y ante todo su amistad, su ayuda y su sinceridad. Todo lo que me ha enseñado, apoyado, su forma de ver el mundo, su entusiasmo por lo que hace, esas noches sempiternas debatiendo sobre el mundo de la investigación y sus pormenores, la visión de futuro...sin duda alguna de las personas que más me han aportado en esta gran aventura.

No puedo olvidarme del pilar más fundamental de todo esto, y es mi familia. En especial mis padres, con su apoyo incondicional desde siempre, creyendo en mí y no dejando que cayera o vacilara en ningún momento. Nunca podré devolver todo el bien que han hecho por mí y que a día de hoy siguen haciendo. Espero que con lo que pueda conseguir de todo esto, el bien que supone dedicarse a los demás, servir al prójimo, mejorar la calidad de vida de las personas, recompense todo el esfuerzo que han dedicado a que siguiera esta senda. Gran parte de lo que he conseguido en mi vida es gracias a ellos. Por todo eso y muchas más cosas os doy las gracias.

Me gustaría también dedicar unas líneas a ciertas personas que aunque no hayan contribuido de forma tan directa han ayudado al desarrollo o continuación de esta gran etapa de mi vida:

A **Anxo**, todo esto empezó por ti, sigo manteniendo la promesa que le hice a tu abuelo y no descansaré hasta cumplirla. Gracias por aparecer en mi vida y darle la orientación que necesitaba.

A **Luis**, gracias por enseñarme lo que significa la entereza, la fuerza y la esperanza. Ha sido un privilegio conocer a una gran persona como tú y visitarte siempre que podía. Solo lamento no haber podido llegar a tiempo.

A mi abuelo, gracias por todo lo que has significado para mí, te fuiste justo al principio de todo esto, pero conservo todos tus valores de honestidad, honradez y trabajo bien hecho a la hora de hacer las cosas. Espero que desde donde estés te sientas orgulloso de mí, tanto o más que yo de haber sido tu nieto.

A **Selene**, gracias por tu apoyo, tu ayuda, tu compañía y tu amistad. Apareciste en uno de los momentos más delicados que he tenido, levantándome el ánimo, ayudándome a seguir adelante demostrándome que existe gente buena y con un gran corazón como tú.

A **Frances**, gracias por cruzarte en mi camino. Has supuesto un rayo de luz y alegría en un día nublado y triste. Me has hecho ver las cosas desde otra perspectiva y me has dado la paz y serenidad que siempre he buscado.

Muchas gracias a todos

Índice

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	19
ÍNDICE.....	25
ABREVIATURAS	32
RESUMEN	36
INTRODUCCIÓN.....	42
1. GENERAL	42
2. SÍNTESIS PROTEICA.....	46
2.1. Concepto.....	46
2.2. Transcripción como paso previo	47
2.2.1. Polimerasa	47
2.2.2. Etapas transcripción.....	47
2.3. Etapas de la síntesis proteica.....	49
2.3.1. Iniciación	49
2.3.2. Elongación	50
2.3.3. Terminación.....	51
2.4. Errores en la síntesis proteica, implicación en cáncer.....	52
3. CICLO CELULAR.....	52
3.1. General	52
3.2. Sistema de control	53
3.3. Existencia de una fase especializada de G1 llamada G0.....	54
3.4. Control de la división y del crecimiento celular	54
3.5. Vía de señalización del gen Rb, implicación en cáncer	55
4. MUERTE CELULAR	57
4.1. Necrosis.....	58
4.2. Apoptosis.....	59
4.2.1. Mecanismo	60
4.2.2. Vía intrínseca.....	61
4.2.3. Vía extrínseca	61
4.2.4. Regulación	62
4.2.5. Inhibición de la apoptosis implicación en cáncer.....	64
5. TERAPIA GÉNICA	65
5.1. Vectores virales	65
5.2. Vectores no virales	67
5.2.1. Plásmidos.....	69
6. SISTEMAS DE LIBERACIÓN.....	71
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	76
MATERIAL Y MÉTODOS	81
1. CULTIVOS CELULARES	81

1.1.	Células utilizadas	81
1.2.	Medios de cultivo	82
1.3.	Tripsinización	82
1.4.	Congelación de células	82
2.	GENERACIÓN DEL VECTOR	82
3.	OBTENCIÓN DE BACTERIAS Y PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO	83
4.	TRANSECCIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS	83
4.1.	Vector de expresión con gen testigo	83
4.2.	Vector de expresión citotóxico	84
5.	MICROSCOPÍA	85
5.1.	Microscopía óptica.....	85
5.2.	Microscopía confocal/fluorescencia	85
6.	OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	86
6.1.	Extracción de proteínas totales	86
6.2.	Cuantificación de proteínas	86
7.	ESTUDIO DE LA TOXICIDAD	86
7.1.	Ensayo con MTT	86
7.2.	Ensayo con trypan blue.....	87
7.3.	Examen óptico en microscopio.....	87
8.	NANOPARTÍCULAS	87
8.1.	Selección.....	87
8.2.	Captación	90
8.3.	Captación magnética.....	90
8.4.	Transfección	91
8.5.	Magnetofección	92
8.6.	Separación magnética	93
9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	94
RESULTADOS.....		98
1.	EXPRESIÓN DEL PROMOTOR E2F.....	98
1.1.	Expresión en células tumorales	98
1.2.	Expresión en células sanas.....	99
2.	EXPRESIÓN DEL VECTOR CITOTÓXICO EN CÉLULAS TUMORALES ..	99
2.1.	Producción de proteínas totales	100
2.2.	Supervivencia en células tumorales.....	101
2.2.1.	Ensayo de viabilidad con MTT	101
2.2.2.	Ensayo de viabilidad con trypan blues.....	103
3.	EXPRESIÓN DEL VECTOR CITOTÓXICO EN CÉLULAS SANAS	104
3.1.	Producción de proteínas totales	104
3.2.	Ensayo de viabilidad celular con MTT.....	105
3.3.	Ensayo de viabilidad celular con Trypan blue.....	105
4.	EVALUACIÓN DE SISTEMAS BASADOS EN NANOPARTÍCULAS.....	106
4.1.	Tolerabilidad en células tumorales: captación y viabilidad.....	106

4.2.	Captación clásica vs captación magnética	108
4.3.	Separación magnética.....	110
4.4.	Transfección y Magnetofección	111
4.5.	Expresión promotor E2F en células tumorales	112
4.6.	Expresión promotor E2F en células sanas.....	113
4.7.	Expresión del vector citotóxico en células tumorales	114
4.8.	Expresión del vector citotóxico en células sanas	116
5.	IMÁGENES	117
DISCUSIÓN.....		141
1.	PROMOTOR E2F COMO DIANA TERAPÉUTICA.....	142
2.	EXPRESIÓN DEL PROMOTOR E2F	142
3.	EXPRESIÓN CITOTÓXICA SUBROGADA AL PROMOTOR E2F.....	143
4.	EVALUACIÓN DE LOS SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS	144
5.	PERSPECTIVAS FUTURAS	146
CONCLUSIONES.....		151
BIBLIOGRAFÍA		155
ANEXOS.....		164

Abreviaturas

ABREVIATURAS

A549	Células epiteliales alveolares humanas
AAV	Virus adeno-asociado
ADN	Acido desoxirribonucleico
AMP	Adenosín monofosfato
Anti-IAPS	Anti inhibidores de apoptosis
Apaf1	Factor activador de peptidasa apoptótica 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNpi	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ASP	Asparragina
ATCC	Colección americana de cultivos tipo
ATP	Adenosín trifosfato
BAD	Promotor de muerte asociado a BCL-2
BAX	Proteína X asociada a BCL-2
BCA	Ácido bicinconínico
BCL-2	Protooncogen célula B linfoma 2
BH3	BCL-2 homología 3
BID	Agonista de la muerte del dominio que interactúa con BH3
BSA	Albumina de suero bovino
CARD	Dominios de reclutamiento de caspasa
CDK	Quinasas dependientes de ciclina
CMV	Citomegalovirus
CYS	Cisteína
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte
DMEM	Medio eagle modificado de dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
E2F	Factor de transcripción involucrado en el control del ciclo celular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EIF2	Factor de iniciación eucariota 2
FADD	Proteína del dominio de muerte asociada a FAS
FAS	Receptor de muerte fas
FBS	Suero fetal bovino
GFP	Proteína verde fluorescente

GTP	Guanosín trifosfato
HeLa	Henrietta Lacks (células malignas de cérvix)
IAP	Inhibidor de apoptosis
INK4A	Inhibidor 4A de quinasa dependiente de ciclina
IRES	Sitio interno de entrada al ribosoma
Kb	Kilobase
MEM	Medio mínimo esencial
MNP	Nanopartículas magnéticas
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NP	Nanopartícula
nm	Nanómetro
NSCLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
P16	Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina
P27	Inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina
PBS	Tampón fosfato salino
pCMV	Plásmido con promotor CMV
PDA	Polipolidopamina
PEI	Polietilenimina
pH	Potencial hidrogeno
ppi	Pirofosfato
pRB	Proteína del retinoblastoma
pUB	Plásmido con promotor ubiquitina
RB	Gen del retinoblastoma
RIPA	Ensayo de radioinmunoprecipitación
rpm	Revoluciones por minuto
S (ribosoma)	Svedberg, coeficiente de sedimentación
TEM	Microscopio electrónico de transmisión
U87-MG	Glioma maligno Uppsala 87
µm	Micrómetro

Resumen

RESUMEN

El cáncer figura entre las principales causas de mortalidad humana, y se vuelve intratable cuando se propaga desde el lugar de aparición del tumor primario a los diferentes órganos. Representa la segunda causa mundial de muerte después de la cardiopatía isquémica y la primera causa de morbilidad.

Se define al cáncer como un comportamiento en el que las células del organismo pierden la regulación fisiológica relacionada con el crecimiento, la división y la muerte celular. Esto se traduce en una ganancia de funciones que les permiten crecer y dividirse indefinidamente causando problemas a las células adyacentes que siguen con sus procesos biológicos normales. Todas estas anomalías se producen a nivel genético en procesos acumulativos permitiendo a estas células sobrevivir a toda costa, acumulando cada vez más cambios genéticos o mutaciones que les benefician a nivel de supervivencia. Existen tres procesos claves para el desarrollo de una célula tumoral: la síntesis proteica, el ciclo celular y la muerte celular. Tenemos hasta 11 acontecimientos descritos que caracterizan al cáncer, pero en esta tesis nos hemos centrado en los 3 mencionados.

La síntesis proteica comprende el proceso de traducción de proteínas desde el ARN. No obstante abarca todo el proceso de expresión de un gen (ADN) hasta su decodificación en proteínas funcionales. Primeramente una secuencia específica de un gen (promotor) inicia el proceso de conversión de ADN a ARN con la ayuda de unas enzimas (polimerasas), una vez transcrito el gen a ARN una estructura llamada ribosoma añade aminoácidos en base a la secuencia de ese ARN formando cadenas de péptidos los cuales conformaran la estructura de la proteína resultante. En los procesos tumorales al tener un cambio o mutación desde la base (ADN) el producto resultante (proteína) puede no ejercer su función correctamente, lo cual es crucial para el desarrollo de las funciones básicas vitales.

El ciclo celular se define como la serie de acontecimientos mediante los cuales una célula duplica su material genético y se divide en dos. Se halla altamente regulado por un conjunto de componentes llamados CDKs, las cuales permiten la continuación o interrupción del ciclo vital dependiendo de los estímulos recibidos tanto internos como externos. Existen una serie de factores que permiten o favorecen el crecimiento celular y la división como son los mitógenos y los factores de crecimiento. Dentro de los mitógenos destacamos el factor de transcripción E2F que favorece la entrada en la fase de división siendo uno de los más importantes a la hora de regular esta fase. Se ha observado que una anomalía en las proteínas que lo regulan o en el factor mismo desencadena una respuesta proliferativa constante, tal y como se puede observar en la mayoría de cánceres humanos.

La muerte celular se determina como el punto final de la vida celular, sea por un proceso patológico o para el mantenimiento de la homeostasis del cuerpo como ocurre en el

desarrollo embrionario, la renovación de tejidos, etc. Diferenciamos dos tipos: necrosis y apoptosis. La necrosis es entendida como el resultado de un proceso patológico que daña la célula hasta tal punto que no puede repararse produciendo una respuesta inflamatoria al “romperse”. La apoptosis en cambio se define como la muerte celular programada en la que la célula no se desintegra y no produce respuesta inflamatoria. Este proceso se encuentra muy regulado, en el que intervienen unas enzimas llamadas caspasas. Estas caspasas son activadas a través de dos vías: la intrínseca y la extrínseca. Ambas vías están controladas por factores los cuales permiten o no la acción de estas proteínas. De presentarse mutaciones, la acción tanto de las caspasas como de sus proteínas reguladoras sería aberrante, impidiendo el correcto funcionamiento del proceso de apoptosis, en el caso del cáncer evitándolo.

Los tratamientos convencionales, mayoritariamente la quimioterapia, se han focalizado en destruir estas células de división rápida maximizando el daño a estas células, pero a menudo a expensas de las células normales y la calidad de vida general del paciente. Atendiendo un poco de la biología del cáncer vemos que es una enfermedad genética, y centrarnos en la base del problema puede ofrecernos la solución. Las terapias basadas en los genes nos brindan otro enfoque más preciso y atractivo para su tratamiento. Se entiende como terapia génica a la transferencia de material genético o ácidos nucleicos al interior de un grupo de células para que sean las efectoras de una acción terapéutica. Para administrar material genético se emplean diferentes métodos englobados en dos grandes grupos: vectores virales y no virales. Los virales comprenden toda clase de virus, agentes infecciosos evolucionados para introducir su material genético en el interior de células huésped con una alta eficiencia. Pero con el inconveniente de que son altamente inestables y a veces peligrosos. Los no virales se definen como aquellos agentes que intentan emular funciones de los virus como vehículos de transferencia de material genético mediante sistemas sintéticos sean agentes químicos, polímeros, nanopartículas, etc. Dada la eficacia y seguridad estos son los más utilizados.

Con todo este conocimiento establecimos que la base del cáncer era crecer y dividirse. Existe entonces una biosíntesis proteica constante que no puede detenerse y que de hacerlo la célula moriría. Los mitógenos como el factor de transcripción E2F tienen un papel fundamental en la división celular. La vía de señalización pRB–E2F que regula la división parece estar alterada en la mayoría de tumores humanos.

Hipotetizamos que una terapia génica dirigida, empleando esta vía de señalización pRB–E2F podría constituir una alternativa de tratamiento factible. Con el uso de vectores no virales, empleando plásmidos, como molécula de ADN, condicionados a la expresión del promotor del factor E2F, podríamos sintetizar un producto (una proteína) el cual sería capaz de interrumpir el proceso de síntesis proteica, en células tumorales. Al interrumpir la biosíntesis, la célula de por sí no podría seguir con sus procesos normales, desencadenando un proceso de apoptosis. Al existir esta condición de expresión subrogada a la presencia del factor E2F, solo aquellas células en división o de división rápida se verían afectadas, dejando a las demás intactas.

Para corroborar nuestra hipótesis primeramente decidimos diseñar plásmidos condicionados a la expresión del promotor E2F con una proteína fluorescente. De expresarse

en células, esto nos daría un indicativo de que este factor está altamente activo. Posteriormente a estos análisis se procedería al diseño de otro plásmido, esta vez con el mismo promotor pero con otro gen que detuviera la síntesis proteica, resultando tóxico para aquellas que fueran tumorales. Un descenso en los niveles proteicos y/o disminución en la viabilidad celular nos proporcionarían los datos suficientes para afirmar la efectividad de la terapia. Para medir estos datos optamos por recurrir a ensayos de viabilidad y de cuantificación de proteínas.

Analizamos la expresión del plásmido con promotor E2F y proteína GFP, en tres líneas tumorales (A549, HeLa y U87) y una línea sana de fibroblastos (BJ) utilizando un sistema basado en lípidos catiónicos (comercial) y otro sistema con nanopartículas inorgánicas. Pudimos observar que la expresión se daba de forma eficiente para el caso del sistema comercial y más tenue para el sistema de nanopartículas, en todas las células cancerígenas. Para los fibroblastos esta expresión fue inexistente.

Establecida la expresión del factor y del plásmido, decidimos realizar ensayos de cuantificación de proteínas y viabilidad con el otro plásmido citotóxico, utilizando los mismos sistemas de administración. Los niveles de concentración proteica totales se reducían con respecto a los controles para las células tumorales mientras que para los fibroblastos permanecían en niveles basales. Pudimos observar también que para las líneas tumorales la supervivencia disminuía de forma considerable, mientras que para los fibroblastos seguía sin mostrarse efecto alguno. Se estableció que el plásmido citotóxico resultaba efectivo en células de división rápida con alteraciones en la vía de señalización de E2F. Este novedoso plásmido selectivo, parece ofrecer una plataforma de tratamiento prometedora para una variedad de cánceres, cuyo sello distintivo es el crecimiento celular descontrolado.

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. GENERAL

El cáncer se ubica como una de las principales causas de muerte y una barrera importante para aumentar la esperanza de vida en todos los países del mundo. En general representa la carga clínica, social y económica más alta en términos de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) por causas específicas entre todas las enfermedades humanas. El riesgo general de 0 a 74 años de desarrollar cáncer es del 20,2% (22,4% en hombres y 18,2% en mujeres, respectivamente). Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2019, el cáncer es la primera o la segunda causa de muerte antes la edad de 70 años en 112 de 183 (**Figura I-1**) países y ocupa el tercer o cuarto lugar en otros 23 países^{1,2}.

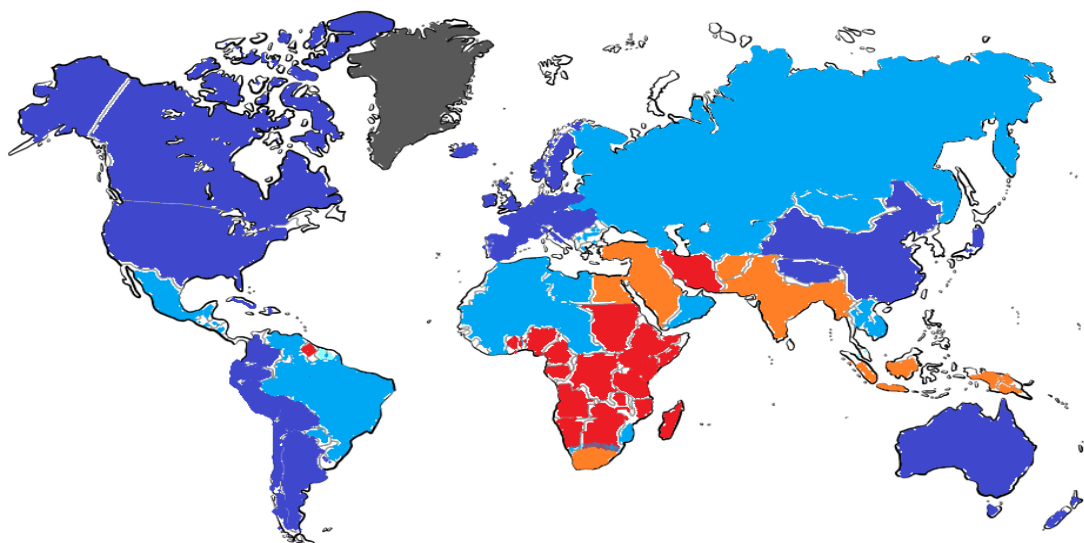


Figura I-1. Ranking mortalidad de cáncer entre 0 y 70 años. Se puede observar que en aquellos países de color azul oscuro el cáncer se sitúa como primera causa de muerte, coincidiendo con los que están más desarrollados. En el caso de los países de color azul claro el cáncer representa la segunda causa de muerte. Los de color naranja se sitúan entre la tercera y cuarta causa. Y finalmente aquellos de color rojo el cáncer se halla entre la quinta y la novena causa de muerte, en contraparte a los países más desarrollados.

En cuanto a la mortalidad, el cáncer es la segunda causa mundial de muerte (9.9 millones de muertes) después de la cardiopatía isquémica, pero probablemente se convertirá en la primera para 2060. Los cánceres de pulmón, hígado y estómago son más mortales en la población general, mientras que los cánceres de pulmón y mama son las principales causas de mortalidad relacionada con el cáncer en hombres y mujeres, respectivamente³ (**Figura I-2**). Los cánceres de próstata y tiroides tienen el mejor pronóstico, con una supervivencia a cinco años de $\sim 100\%$, mientras que los cánceres de esófago, hígado y especialmente páncreas tienen el peor pronóstico, por lo general $<20\%$ a los cinco años.

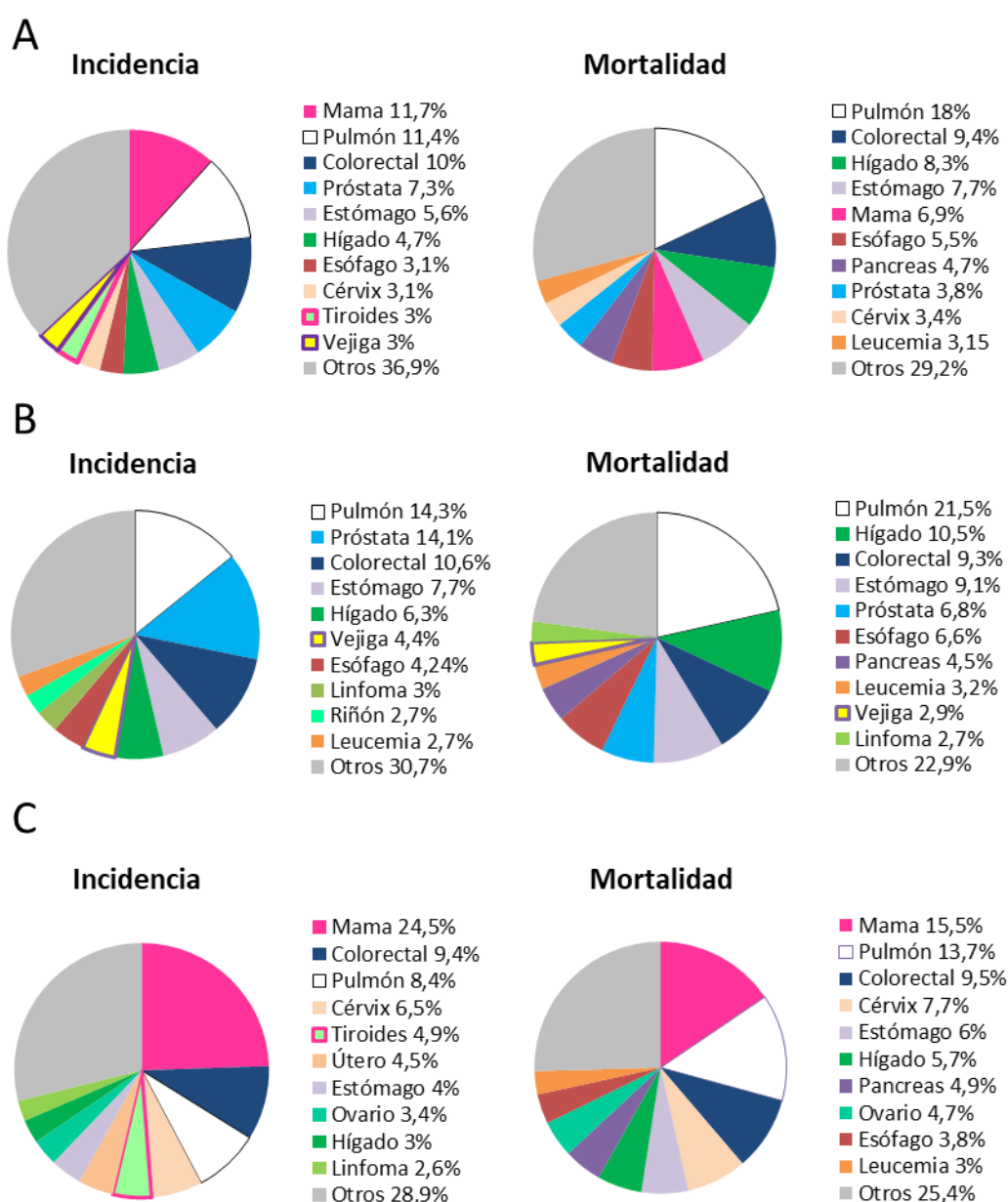


Figura I-2. Se muestran los datos de incidencia y mortalidad para ambos sexos (A), para hombres (B) y para mujeres (C) de los 10 tipos de cáncer más comunes.

El cáncer se produce como consecuencia de la pérdida de la regulación fisiológica de la proliferación celular y/o apoptosis, como resultado de la adquisición de alteraciones en el material genético⁴. Estas alteraciones pueden provocar una **ganancia** o **pérdida** de la **función** de las **proteínas** codificadas. En ambos casos, el cambio puede llevar a que la célula adquiera una ventaja proliferativa perdiendo su capacidad de diferenciación, pudiendo también evadirse de la muerte celular programada o apoptosis⁵.

Las células tumorales proliferan a pesar de las restricciones normales y son capaces de invadir y colonizar los tejidos de su entorno, proceso al cual llamamos malignidad. Aquellas células que se dividen y crecen sin control forman una masa amorfa llamada **tumor** o neoplasma. Se dice que un tumor es benigno cuando se produce este crecimiento, pero no invade otros tejidos. Se habla de tumor maligno a aquel que además de crecer en número y masa es capaz de invadir otros tejidos, característica que es esencial en el cáncer⁶.

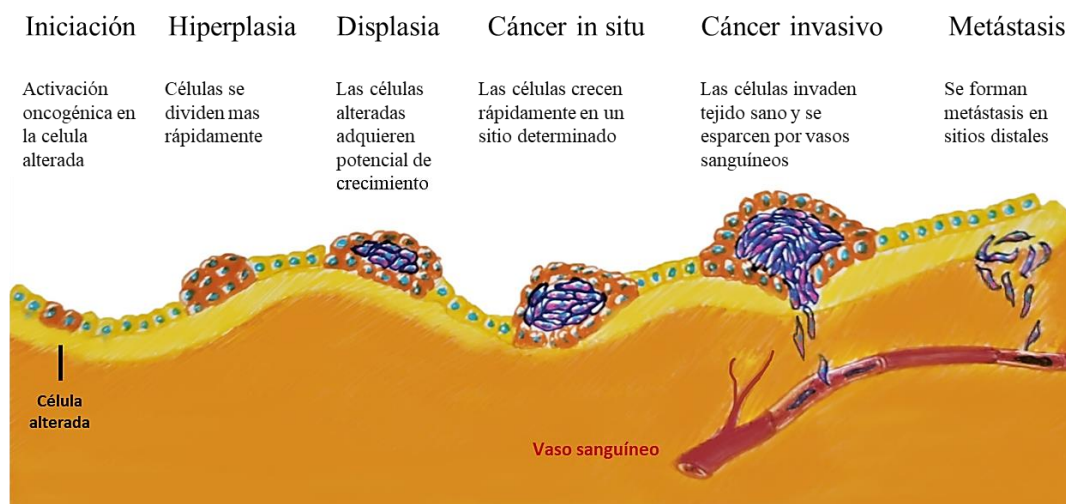


Figura I-3. Progresión tumoral desde el inicio de mutaciones en células puntuales hasta la formación de metástasis.

El proceso por el cual una célula o un conjunto de células son capaces de liberarse de la masa tumoral y viajan por el torrente sanguíneo para anidar en otros lugares se denomina **metástasis**. El tumor del cual se desprenden se llamará tumor primario y los sitios o tejido colonizados por este, tumores secundarios.

Parece ser que la mayoría de cánceres se originan a partir de una sola célula, que experimenta una mutación. A través de la progenie de la misma, se van acumulando más cambios que les confieren más características evolutivas y mutaciones adicionales que desembocan finalmente en una célula tumoral. Esta célula iniciadora puede ser una célula progenitora de tejido o una célula más diferenciada que adquiere la habilidad de autorenovarse de forma indefinida⁷. El desarrollo de un cáncer necesita de una acumulación gradual de mutaciones, hecho que ayuda a comprender la progresión tumoral en la cual un leve desorden inicial evoluciona de forma gradual hasta un cáncer totalmente destructivo⁸⁻¹¹.

Hanahan y Weinberg en su día elaboraron un modelo que define seis propiedades que adquiere y caracterizan un tumor maligno. Esta revisión tomó una gran repercusión en cómo se veía una célula maligna siendo un referente en lo que se refiere a las bases moleculares. Al cabo de una década, con todos los avances que se estaban produciendo, estos dos científicos decidieron que era hora de actualizar su modelo añadiendo otras características. Con esto lo que pretendían era representar un principio de organización para racionalizar la diversidad y complejidad de las enfermedades neoplásicas¹².

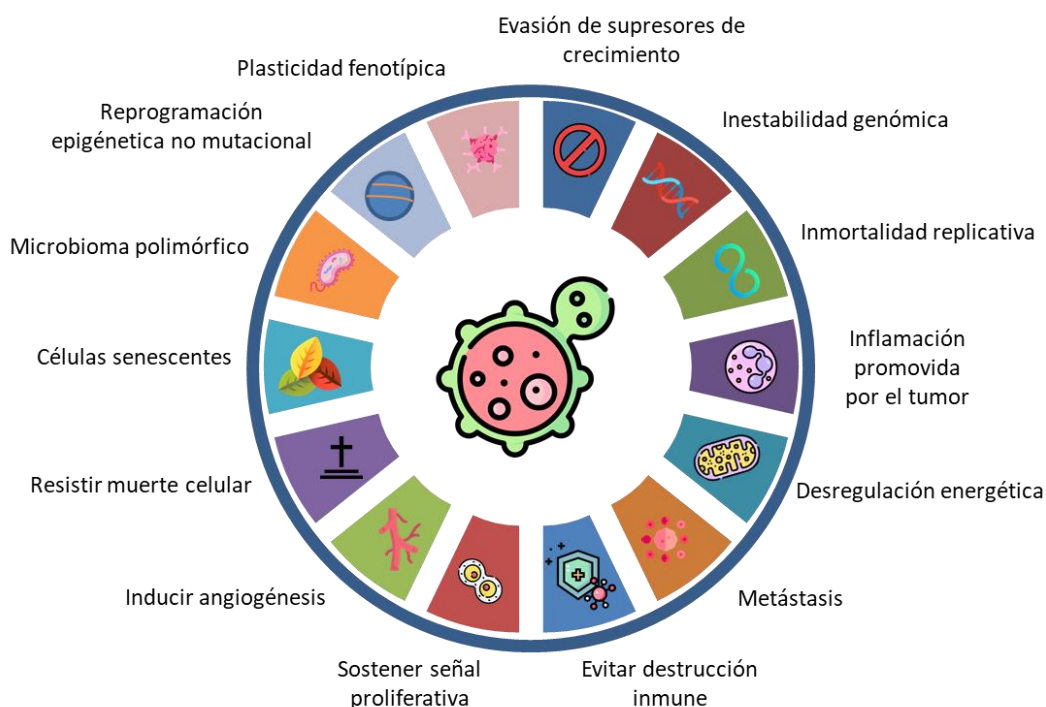


Figura I-4. Sellos distintivos del cáncer. Actualmente podemos distinguir hasta 14 procesos que caracterizan o definen a una célula tumoral, como se puede ver en el diagrama.

Podemos observar, que el cáncer rompe las reglas más básicas del comportamiento celular mediante las cuales se forman y mantienen los organismos. Estudiando estas transgresiones, podemos establecer cuáles son las reglas normales y como se refuerzan.

Este primer capítulo se dividirá en varios apartados, los primeros consideraremos la naturaleza del cáncer describiendo el proceso natural desde el punto de vista celular/molecular. Nos centraremos en puntos clave como son la resistencia a la muerte celular y la señal proliferativa sostenida.

A continuación hablaremos de la importancia de las terapias alternativas frente a las estrategias actuales en cuanto a tratamiento. Y abordaremos que sistemas existen para llevar a cabo dichos tratamientos.

2. SÍNTESIS PROTEICA

Las proteínas son moléculas estructuralmente complejas y cuyo funcionamiento es esencial para la vida. Su estructura viene dada por una secuencia de **aminoácidos** que se organizan a distintos niveles hasta lo que comúnmente conocemos como proteína¹³. Las proteínas no son solo los elementos estructurales de las células sino que también ejecutan prácticamente todas las funciones celulares¹⁴. Así pues, las enzimas facilitan gran cantidad de reacciones químicas de una célula, otras proteínas embebidas en la membrana plasmática forman canales controlando el paso de pequeñas moléculas hacia dentro y hacia fuera de la célula, algunas incluso transportan mensajes entre células, etc. Aquellas que son especializadas actúan como anticuerpos, toxinas, hormonas, fibras elásticas o fuentes de luminiscencia. Podría decirse que las proteínas son la mano que ejecuta la orden dada por las instrucciones de un aparato, siendo en este caso las instrucciones el ADN y el aparato la célula.

2.1. Concepto

El proceso de síntesis o biosíntesis de proteínas es lo que comúnmente se conoce en genética como **traducción**, esto significa el paso de **ARN a proteínas**^{5,13,14}. No obstante debemos saber que antes de empezar una síntesis de una proteína, se tiene que fabricar una molécula de ARN correspondiente mediante la transcripción. Por tanto cuando la célula necesita una proteína determinada, una región de nucleótidos de la molécula de ADN del cromosoma se copia primero a ARN. Después estos segmentos de ARN se utilizan como moldes para dirigir la síntesis de proteínas.

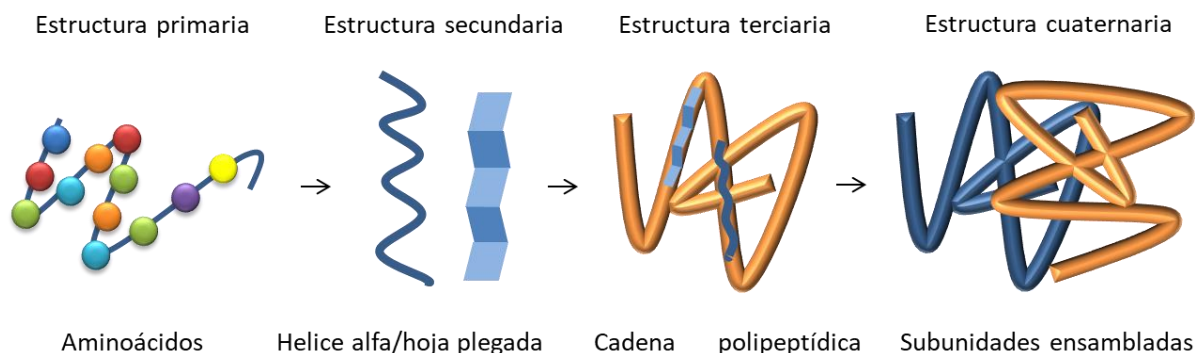


Figura I-5. Niveles de organización de las proteínas.

Todas las células desde los organismos unicelulares hasta los más complejos expresan la información genética de esta manera, un principio fundamental denominado **dogma central** de la biología molecular^{13,15}.

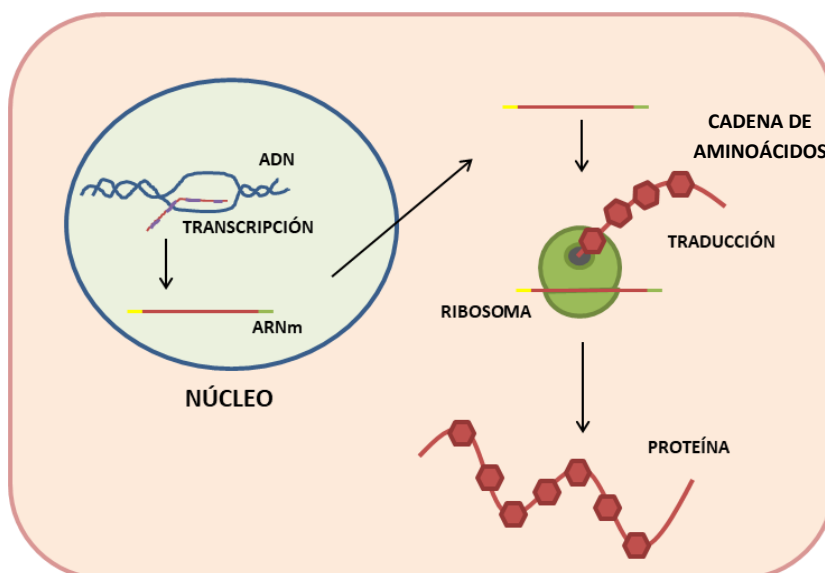


Figura I-6. En el diagrama se presenta el proceso de síntesis proteica de forma resumida, desde la conversión del ADN a ARN, hasta la conformación de la proteína.

2.2. Transcripción como paso previo

Es el proceso de síntesis de ARN a partir de ADN. Se realiza en el nucleoplasma¹⁶. Es el primer paso de la expresión génica, es decir, el proceso por el que se genera un producto funcional, una proteína en este caso, utilizando la información contenida en un gen. Sólo se transcribe una hebra de DNA, aunque haya genes en ambas. La reacción de síntesis de RNA es similar a la de la del DNA¹⁷.

2.2.1. ARN polimerasa

Es la principal enzima involucrada en la transcripción, sintetiza ARN a partir de un molde de ADN¹⁸. Esta síntesis se produce en dirección 5' 3'. Presenta elevada procesividad, y una tasa de error de 1/10.000, por carecer de actividad de corrección de pruebas. Existen 3 tipos de polimerasas, dependiendo del tipo se sintetizaran los distintos tipos de ARN. La ARN polimerasa I intervendrá en la síntesis de ARNr, la polimerasa II en ARNm y la polimerasa III en el ARNt¹⁹⁻²¹.

2.2.2. Etapas de la transcripción

○ Iniciación.

La ARN polimerasa se une a una secuencia iniciadora de ADN llamada **promotor**, que se encuentra al inicio de un gen, y determina cuando es necesaria la transcripción de un gen específico²²⁻²⁵. Cada gen tiene su propia región promotora. La ARN polimerasa al unirse al ADN separa las hebras de la cadena para poder utilizar el molde de cadena sencilla y poder así sintetizar ARN.

○ Elongación.

El molde de cadena sencilla de ADN actúa como plantilla para sintetizar otra nueva, esta vez compuesta por ácido ribonucleico (ARN). Esta síntesis se produce por la complementariedad de bases (es decir A=T C=G). Se realiza en dirección 5' 3' y lee el molde

en dirección contraria es decir 3' 5'. La cadena resultante contiene la misma secuencia, en sentido contrario, de nucleótidos con la excepción de que la base timina T es sustituida por uracilo U²⁶.

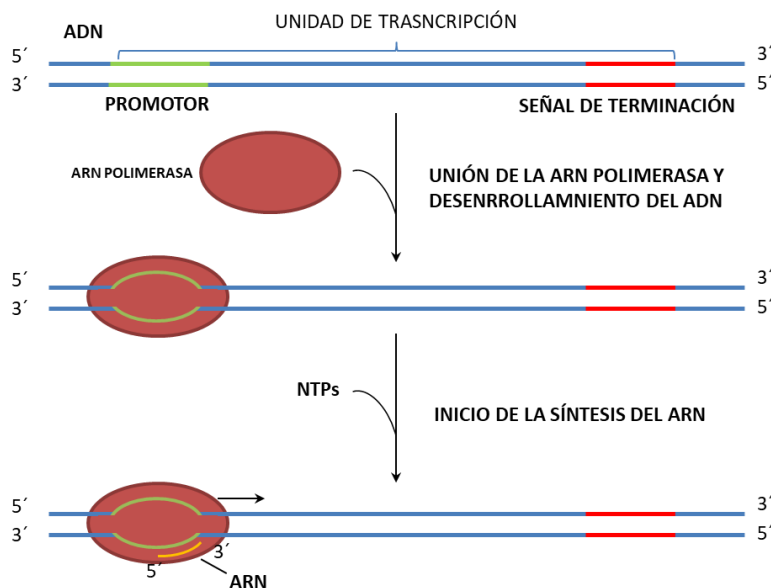


Figura I-7. Iniciación de la transcripción.

○ Terminación.

Una vez que aparecen unas secuencias llamadas terminadores se detiene la síntesis de ARN. A continuación estas secuencias son liberadas de la ARN polimerasa permitiendo que esta se pueda volver a unir en otros sitios y volver a sintetizar más fragmentos de ARN. El ARN de eucariotas sufre modificaciones en sus extremos y la eliminación de intrones (regiones que no codifican proteínas)²⁷⁻³².

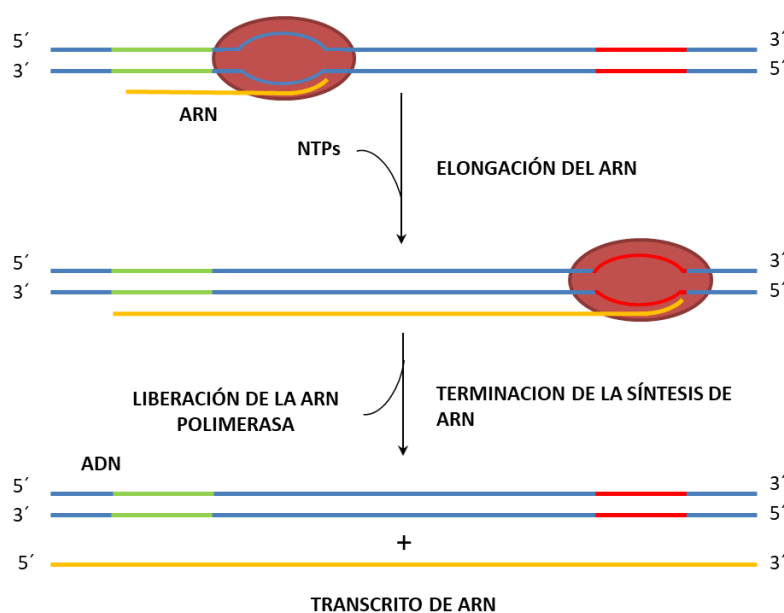


Figura I-8. Elongación y terminación.

2.3. Etapas de la síntesis proteica

Este proceso a diferencia de la transcripción se lleva cabo en el citoplasma, en unas estructuras llamadas **ribosomas**, no obstante comparten las mismas etapas principales³³⁻³⁸. En primer lugar, antes de producirse la iniciación tiene que darse a cabo la activación del aminoácido. En este proceso, el aminoácido se une a su correspondiente ARNt con gasto de energía para formar un complejo Aminoácido-ARNt + AMP y pirofosfato (ppi). Este ppi va ser hidrolizado por una pirofosfatasa, de este modo la reacción va estar vinculada hacia la formación del complejo Aminoácido-ARNt + AMP + ppi. La enzima que participa en esta reacción se conoce como aminoacil ARN sintetasa, teniendo la misma una función correctora, es decir, puede corregir posibles errores que se hayan producido en la activación del aminoácido^{39,40}.

2.3.1. Iniciación

Por lo general el ribosoma eucariota tiene un coeficiente de sedimentación 80s, formado por una subunidad mayor de 60s y otra menor 40s. En esta primera fase se produce la separación de ambas subunidades, debido a la incorporación de un factor proteico de iniciación⁴¹. En la subunidad menor ocurre la incorporación de un aminoácido iniciador, la metionina, este se incorpora gracias a la asociación a un factor de iniciación (eIF2) y a una molécula de GTP. Una vez que la metionina está unida a esta subunidad se produce el ingreso del ARNm con los diferentes codones que van a codificar la síntesis de los distintos aminoácidos⁴². Incorporado el ARNm, la metionina se fija sobre el codón de iniciación AUG del mismo, formando el complejo de iniciación 40s constituido por: Subunidad menor-metionina-ARNm.

Para que la síntesis de la proteína siga adelante es necesaria la reasociación de ambas subunidades, hecho que ocurre en la siguiente etapa, donde la subunidad 60s se incorpora al complejo de iniciación 40s quedando el ribosoma funcional para realizar la síntesis de proteína, formando así el **complejo de iniciación 80s**^{5,43}.

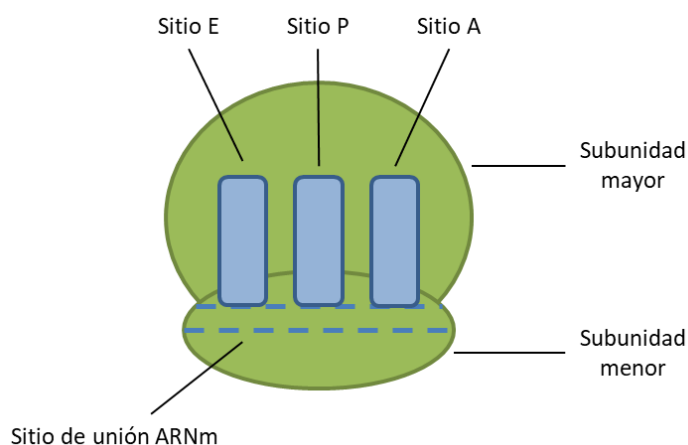


Figura I-9. Estructura del ribosoma.

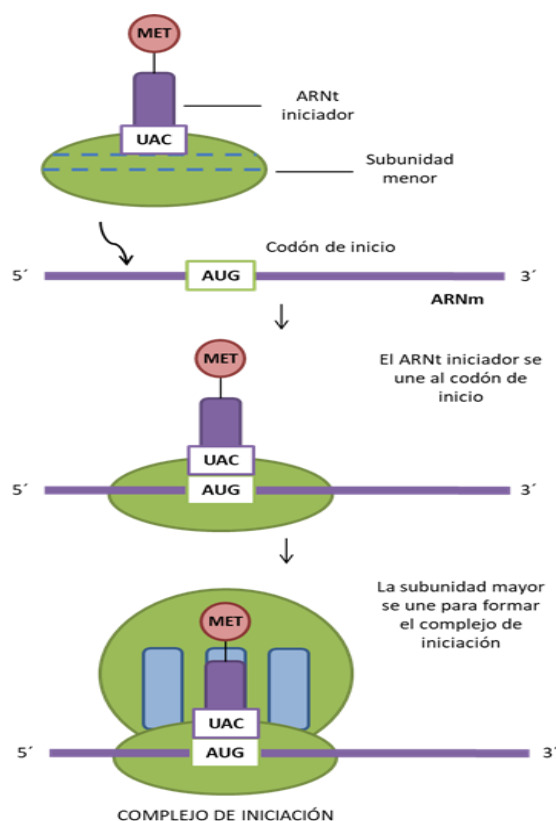


Figura I-10. Iniciación de la traducción.

2.3.2. Elongación

En esta etapa se produce la incorporación sucesiva de los distintos aminoácidos los cuales están unidos a sus correspondientes ARNt. Esta incorporación es seleccionada por la complementariedad de bases, que posee el anticodón del ARNt con el codón del ARNm, determinando así una secuencia específica. En una primera síntesis, la metionina se incorpora en el sitio P y la siguiente incorporación de otro aminoácido se produce en el sitio A.

Para la formación de enlace peptídico (enlace entre aminoácidos) interviene una enzima denominada peptidil transferasa que rompe el enlace entre el ARNt y su aminoácido correspondiente formando uno nuevo con el aminoácido que se incorpora. Para que la cadena siga creciendo se produce un movimiento la subunidad menor que se desplaza dejando los ARNt en sitios híbridos, es decir el primer ARNt con sitio P de la subunidad mayor en el sitio E de la subunidad menor y el segundo ARNt con sitio A de la subunidad mayor en el sitio P de la subunidad menor. El ribosoma en el siguiente paso, se desplaza nuevamente en sentido contrario reiniciando la posición inicial dejando el sitio A completamente libre. A continuación el ARNt que queda en el sitio E se desprende permitiendo que se vuelva a repetir el ciclo.

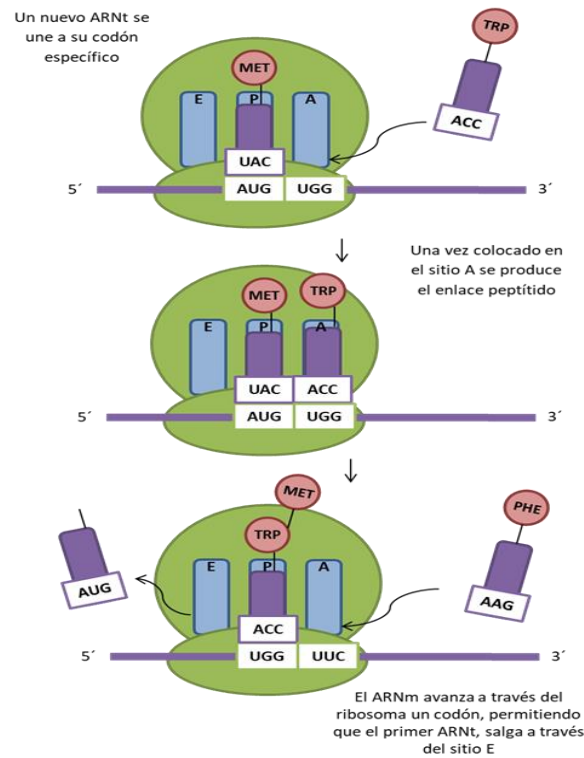


Figura I-11. Elongación de la traducción.

2.3.3. Terminación

En esta fase se produce la terminación del proceso de traducción. Cuando aparecen unos codones específicos denominados codones de terminación o codones sin sentido, se detiene la síntesis, pues ningún ARNt puede unirse a estos y no pueden incorporarse más aminoácidos. Proteasas intervienen para liberar la cadena polipeptídica y que esta sufra las modificaciones postraduccionales las cuales proporcionarían las distintas propiedades y funciones de la futura proteína^{44,45}. Estas modificaciones vienen dadas por la secuencia específica de aminoácidos.

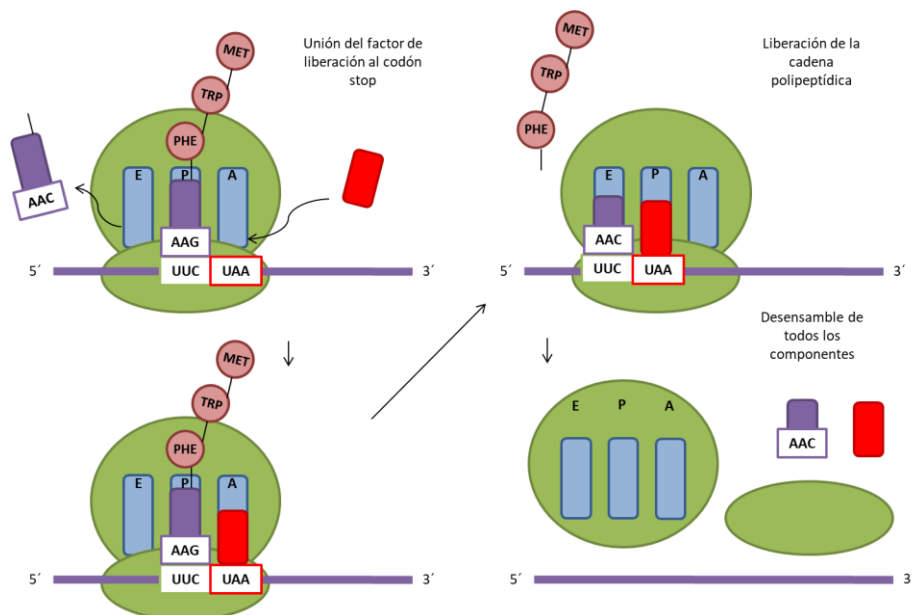


Figura I-12. Terminación de la traducción.

2.4. Errores en la síntesis proteica, implicación en cáncer.

Por norma general, todo el proceso de biosíntesis, desde transcripción hasta la conformación de una proteína funcional se encuentra altamente regulada y controlada. No obstante el cuerpo humano no se libra de cometer pequeños errores. Cuando estos errores se comenten a nivel genético se habla de mutaciones genéticas. Estos cambios como su nombre indica, afectan a la secuencia de nucleótidos (genes) alterando por consiguiente la secuencia de aminoácidos y la estructura final de la proteína. Esta proteína a veces no presenta cambio alguno, si la mutación es silenciosa, pero en otras ocasiones puede originar una función nueva o carecer de ella. Ante estos escenarios, pueden producirse efectos anormales cambiando el funcionamiento mismo de la célula entera⁴⁶. Por ejemplo si nuestro cambio se produce en los genes codificados para una proteína correctora de la traducción, esta proteína no sería capaz de corregir los posibles errores en nuestra secuencia de ARN, con lo que aparte de tener esta modificación en nuestra proteína correctora tendríamos otro cambio en diferentes proteínas (aquellas que intenta corregir). Si este cambio (mutación) se transmitiera en las siguientes generaciones celulares se iría cada vez haciendo más peligroso.

Obviamente el cuerpo cuenta con puntos de control en los que si esto sucede la célula no sigue con su ciclo vital y muere, el problema viene cuando estas mutaciones también afectan a esos sistemas de control, que es lo que ocurre en la mayoría de cánceres humanos.

3. CICLO CELULAR

3.1. General

Desde el origen de la vida, todos los organismos vivos, desde las bacterias hasta los mamíferos, son el resultado de repetidas rondas de crecimiento y división celular. El mecanismo esencial mediante el cual todos los seres vivos se reproducen se conoce como ciclo celular⁵.

Podríamos entonces definir el ciclo celular como la secuencia de acontecimientos mediante los cuales una célula duplica su material genético y, habitualmente, los demás componentes celulares, y se divide en dos^{5,47}.

El ciclo celular se divide en dos fases principales: **mitosis**, o período breve, en el que la célula divide a su núcleo y a su citoplasma y origina dos células hijas; e **interfase**, periodo más largo durante el cual la célula aumenta su tamaño, desarrolla la mayor parte de las actividades celulares y duplica su material genético^{5,47,48}.

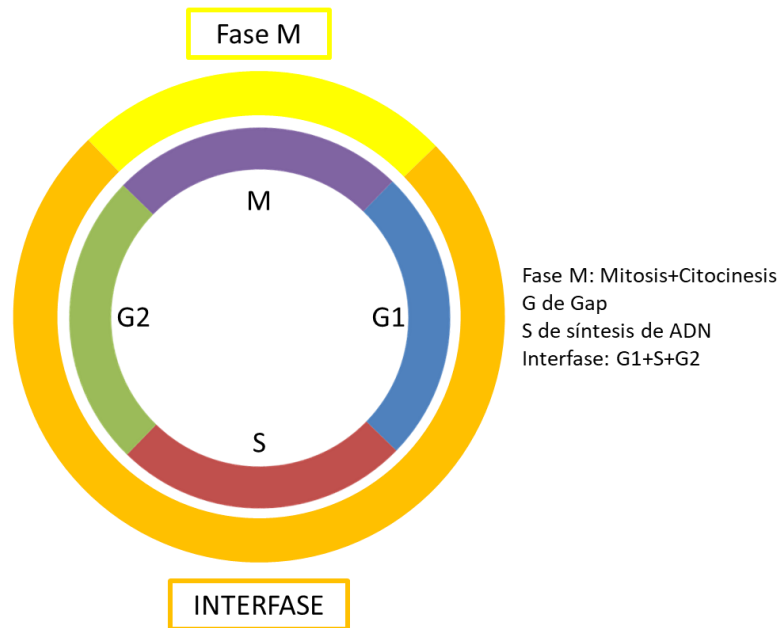


Figura I-13. Ciclo celular.

3.2. Sistema de control

El sistema de control del ciclo celular desencadena los acontecimientos del ciclo celular y asegura que estos se produzcan en el momento adecuado y en el orden correcto. Funciona de forma muy parecida a como lo hace un **temporizador** que desencadena los acontecimientos del ciclo en una secuencia determinada⁴⁷⁻⁴⁹.

El sistema de control reacciona a varias señales intracelulares y extracelulares y detiene el ciclo si la célula no puede completar un proceso esencial o se encuentra en condiciones ambientales o intracelulares desfavorables. Por ejemplo, los sensores detectan que la síntesis de ADN ha finalizado, si algo no funciona bien impiden que este proceso finalice, enviando señales al sistema de control para que se retrase hacia la siguiente etapa⁵⁰. Estos retrasos permiten que la maquinaria sea reparada y se evite el desastre que podría ocurrir si el ciclo progresara prematuramente.

El sistema de control se basa pues en un mecanismo bioquímico cíclico en el que una serie de proteínas interactúan para inducir y coordinar las distintas etapas⁵¹.

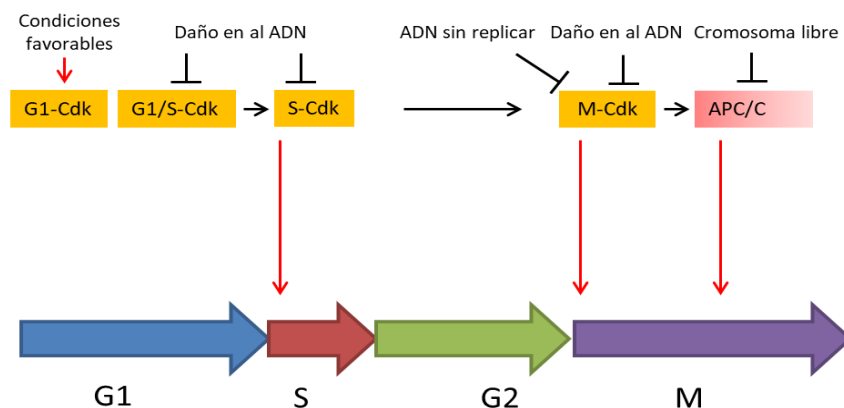


Figura I-14. Regulación del ciclo celular.

3.2.1. Quinasas dependientes de ciclina y Ciclinas

Los componentes fundamentales del sistema de control del ciclo celular son miembros de una familia de proteínas quinasas denominadas quinasas dependientes de ciclina (Cdk)^{52,53}.

Las oscilaciones de la actividad de varios complejos CDK-ciclina regulan diferentes acontecimientos del ciclo celular. Así, la activación de los complejos CDK-ciclina de la fase s (CDK-S) estimula el comienzo de la fase s, la activación de los complejos CDK de la fase m (CDK-M) desencadena la mitosis.

Los mecanismos que regulan las actividades de los complejos CDK-ciclina incluyen la fosforilación de la subunidad CDK, la unión a proteínas inhibidoras de CDK (CKI) la proteólisis de las ciclinas y los cambios de la transcripción de genes que codifican reguladores de las CDK.

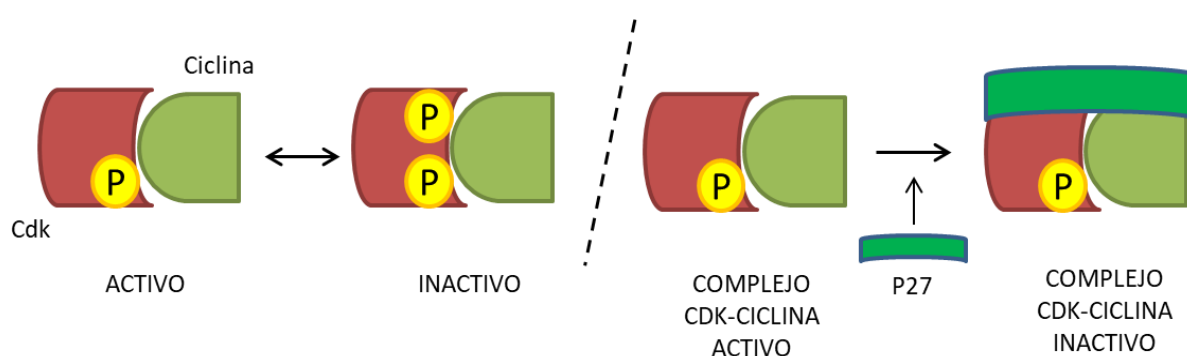


Figura I-15. Ciclinas y su regulación mediante fosforilación (activadora e inactivadora) y mediante unión de una proteína inhibidora como es la p27.

3.3. Existencia de una fase especializada de G₁ llamada G₀

En ausencia de una señal que favorezca la proliferación celular, la actividad CDK se mantiene inhibida en G₁. Las células quedan paradas, como si hubieran desmantelado su sistema de control. Es en este momento cuando las células entran en un **estado especializado no proliferativo** llamado G₀^{5,47,48}.

La variación de G₀ explica la gran variación de duración del ciclo celular en distintos tipos celulares. Las células pueden permanecer en G₀ días, semanas o incluso años antes de volver a proliferar. Por ejemplo las neuronas adultas no se dividen, los hepatocitos cada 1-2 años o el epitelio digestivo puede proliferar incluso más de 2 veces al día⁵.

3.4. Control de la división y del crecimiento celular

Las moléculas señalizadoras extracelulares que regulan el tamaño celular y el número de células son proteínas de secreción solubles, de unión a la superficie de las células o componentes de la matriz extracelular. Pueden dividirse en tres clases principales:

- **Mitógenos**

Estimulan la velocidad de la división celular eliminando los frenos moleculares (estimulan la actividad de CDK-G₁ y CDK-G₁/S) que contienen la progresión del ciclo celular en la fase G₁.

La función clave de los complejos CDK-G₁ es activar un grupo de factores reguladores de genes denominados **proteínas E2F**, que se unen a secuencias específicas de ADN de las regiones promotoras de una gran variedad de genes que codifican proteínas necesarias para la entrada en S^{5,54}. La expresión génica de E2F está inhibida por la interacción entre E2F y miembros de la familia de la proteína del **retinoblastoma** (Rb). Cuando los mitógenos estimulan la proliferación celular se acumulan complejos CDK-G₁ activos que fosforilan miembros de la familia Rb y disminuyen su afinidad por E2F. Después las proteínas E2F liberadas activan la expresión de sus genes diana⁵⁵.

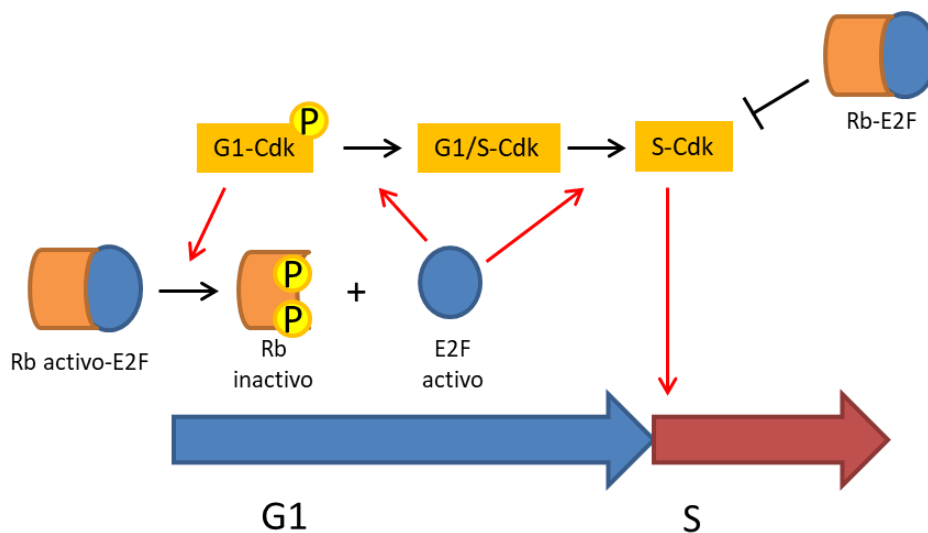


Figura I-16. Implicación de E2F y RB en el ciclo celular.

- **Factores de crecimiento**

Inducen el crecimiento celular (aumento de la masa) estimulando la **síntesis de proteínas** e inhibiendo la degradación de macromoléculas⁵⁶.

- **Factores de supervivencia**

Estimulan la supervivencia de las células inhibiendo el tipo de muerte celular programada conocida como apoptosis.

3.5. Vía de señalización del gen Rb, implicación en cáncer

Se ha estudiado que la perturbación de la función de la **proteína retinoblastoma** (Rb) se encuentra en la mayoría de los tumores humanos^{57,58}.

La vía Rb consta de cinco familias de proteínas: CDKN, ciclinas tipo D, ciclinas dependientes de ciclinas (CDK4, CDK6), familia de proteínas Rb (Rb, p107, p130), y la familia de **factores de transcripción E2F**.

E2F es un factor de transcripción, **estimula** la transcripción de elementos necesarios para la **transición G₁-S**. En ausencia de señales (estímulos) mitóticas el factor E2F se mantiene inactivo gracias a su unión con Rb. Mientras E2F permanezca unido a la proteína del retinoblastoma la célula se mantendrá en fase G₁. El ciclo celular no progresa a la fase S.

Las quinasas dependientes de ciclina como las CDK4/CDK6 y la CDK2 se encargan de fosforilar a RB y hasta cierto punto E2F. Pero requieren de proteínas reguladoras denominadas ciclinas D y E para su actividad. En ausencia de ellas las CDKs son inactivas. Los estímulos mitogénicos incrementan las CDK/ciclinas que fosforilan a Rb. Cuando Rb esta fosforilado se libera E2F.

La mutación inactivante de RB favorece la progresión a la fase S, por tanto Rb es un ejemplo de gen supresor de tumores.

Los inhibidores de las CDKs son importantes para detener la progresión del ciclo celular (ie, p16 (INK4A) con CDK4/6 y CDK1; p21 con las anteriores y CDK2). Por tanto una mutación que inactive o suprima la actividad de toda esta maquinaria reguladora daría como resultado la progresión del ciclo celular aun cuando la célula no lo necesitara.

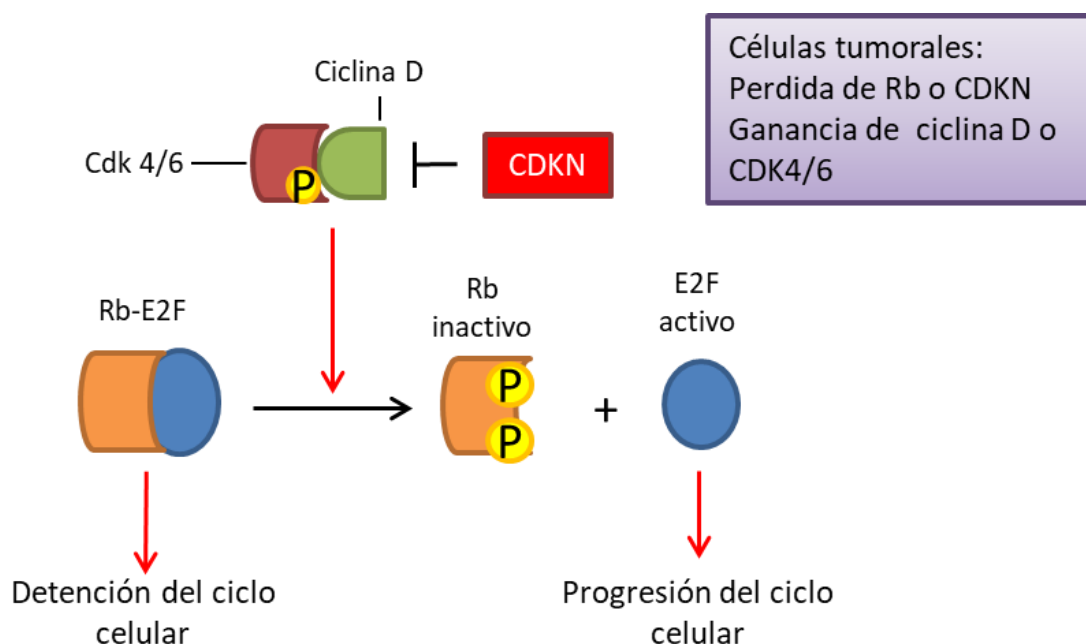


Figura I-17. Vía de señalización del retinoblastoma (RB) en el cáncer. Los componentes de la vía de señalización de RB, E2F, ciclinas de tipo D, CDK4/6, p16Ink4a (CDKN2A), y sus interacciones funcionales, se representan en el diagrama. Las alteraciones genéticas y epigenéticas en los principales cánceres humanos, se resumen en el cuadro de color morado en la esquina superior derecha del diagrama.

4. MUERTE CELULAR

Todos los seres vivos mantienen una situación de homeostasis, la cual les permite mantener una condición interna estable compensando los cambios en su entorno, mediante el intercambio regulado de materia y energía con el exterior. Esta homeostasis es una forma de equilibrio dinámico que se hace posible gracias a una red de sistemas de control retroalimentados que constituyen los mecanismos de autorregulación de los seres vivos.

Cuando las células se exponen a un estrés ligero, pueden alterar su estado funcional para mantener este equilibrio. Cuando se da una situación de mayor estrés fisiológico o estímulos patológicos dan lugar a una adaptación, una lesión reversible, una lesión irreversible o en algunos casos la muerte celular.

La muerte celular es el **punto final** en un proceso patológico pero también consideramos que es algo normal en el desarrollo embrionario, en la renovación de tejidos y en la selección de clones en el tejido linfóide^{59,60}.

Con un criterio morfológico, se distinguen dos grandes tipos de muerte celular: **necrosis y apoptosis**.

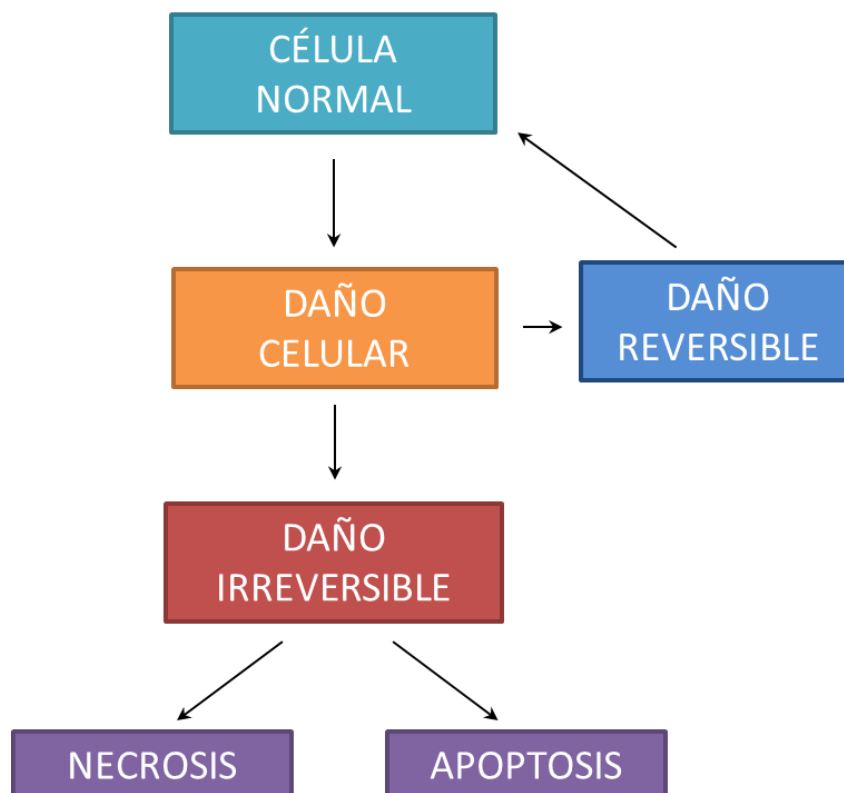


Figura I-18. Homeostasis y daño celular. La célula dependiendo del daño o estrés sufrido podrá revertirse a su estado original. Por el contrario de no poder repararlo morirá desencadenando uno de los dos procesos: necrosis o apoptosis.

4.1. Necrosis

Es un **proceso patológico** que ocurre cuando las células se exponen a un ambiente físico o químico desfavorable como puede ser la hipoxia, temperaturas extremas, exposición a tóxicos, infecciones, radiación y traumatismos⁶¹.

Ocurren graves alteraciones en los orgánulos, la célula se hincha y acaba por romperse la membrana plasmática, liberando su contenido y provocando una **respuesta inflamatoria**. En condiciones fisiológicas este daño a la membrana también puede ser ocasionado por un virus o por proteínas llamadas perforinas.

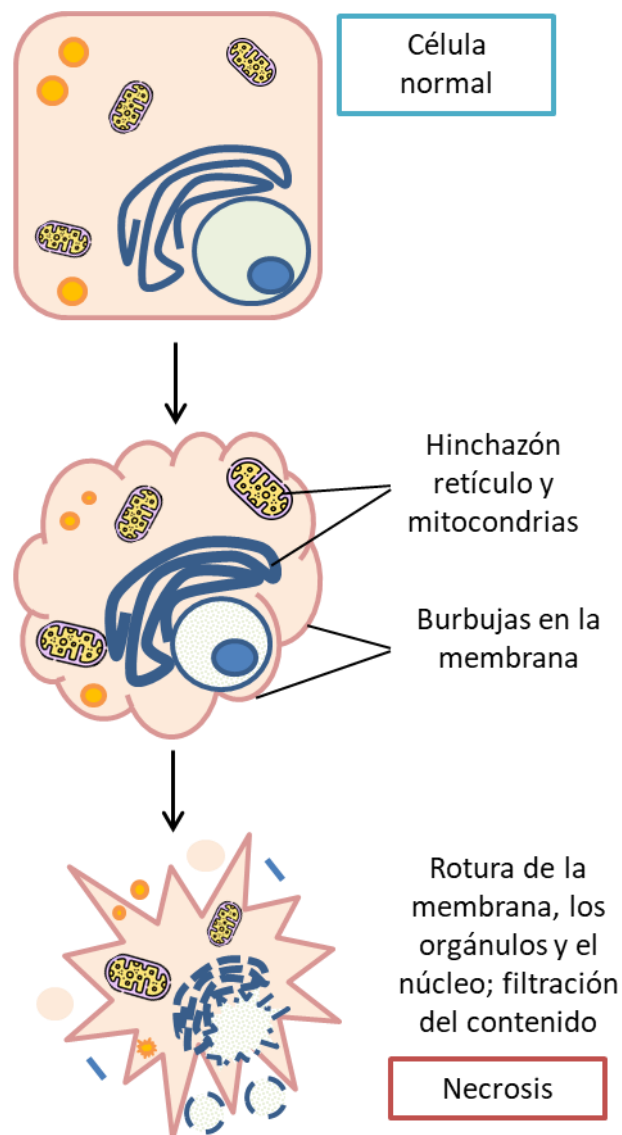
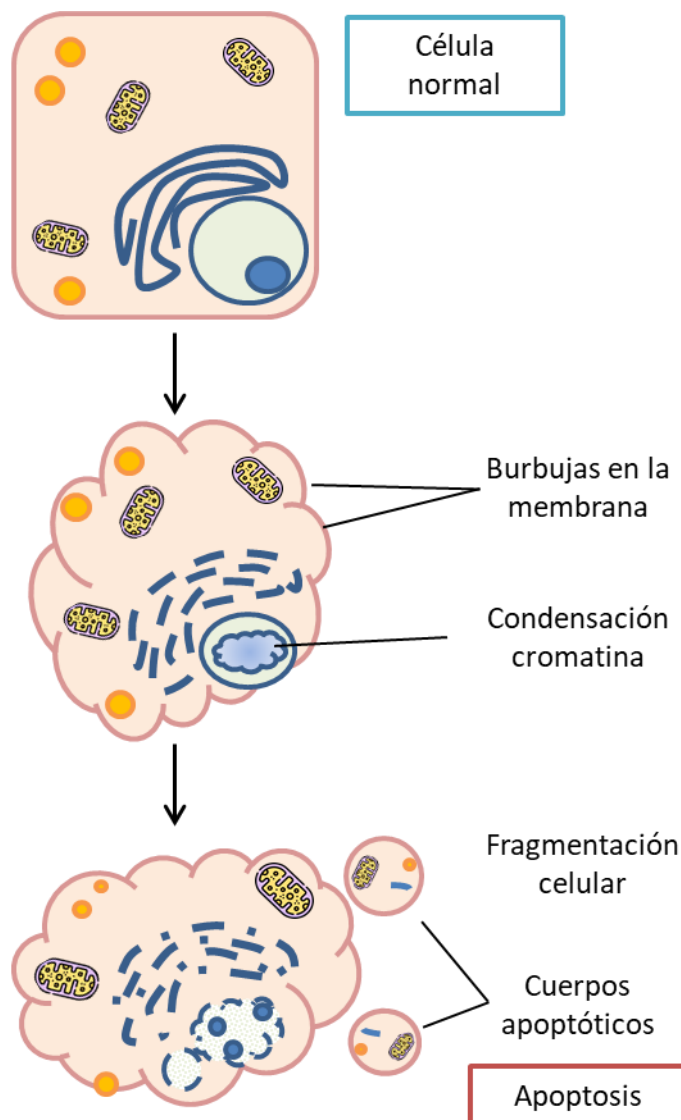


Figura I-19. Principales eventos en necrosis.

4.2. Apoptosis

La **muerte celular programada** se produce, aunque no siempre, por **apoptosis** (del griego, caída de, como las hojas de un árbol). Aunque no es la única forma de muerte es la más común y mejor entendida^{61,62}.

Las células que se mueren por apoptosis experimentan **cambios morfológicos** característicos. Como si la célula se marchitase porque se va arrugando, en principio se conserva la integridad de los orgánulos. Se produce la pérdida de estructuras especializadas de la membrana, el citoesqueleto se colapsa, la envoltura nuclear se desensambla y la cromatina se condensa dando una forma característica, como de medias lunas. Con frecuencia la célula se rompe en fragmentos rodeados de membrana denominados cuerpos apoptóticos. Además la superficie de estos cuerpos apoptóticos se altera químicamente de modo que una célula adyacente o una célula especializada (macrófagos) los fagocite rápidamente antes de que se libere el contenido.



4.2.1. Mecanismo

El mecanismo de la apoptosis depende de enzimas proteolíticas denominadas **caspasas** con centro activo en **Cys**, las cuales escinden proteínas intracelulares específicas en **Asp**, de ahí su nombre. Las caspasas están presentes en todas las células en forma de precursores inactivos denominados **procaspasas**. Las procaspasas iniciadoras se activan cuando se mantienen próximas entre sí en complejos de activación: una vez activadas escinden y activan otras procaspasas ejecutoras que a su vez activan otras caspasas ejecutoras (y otras proteínas diana de la célula) produciendo una cascada proteolítica irreversible y amplificadora^{63,64}. Actúan sobre proteínas específicas de la envoltura nuclear, que tienen que ver con la degradación del ADN, del citoesqueleto y proteínas de adhesión celular.

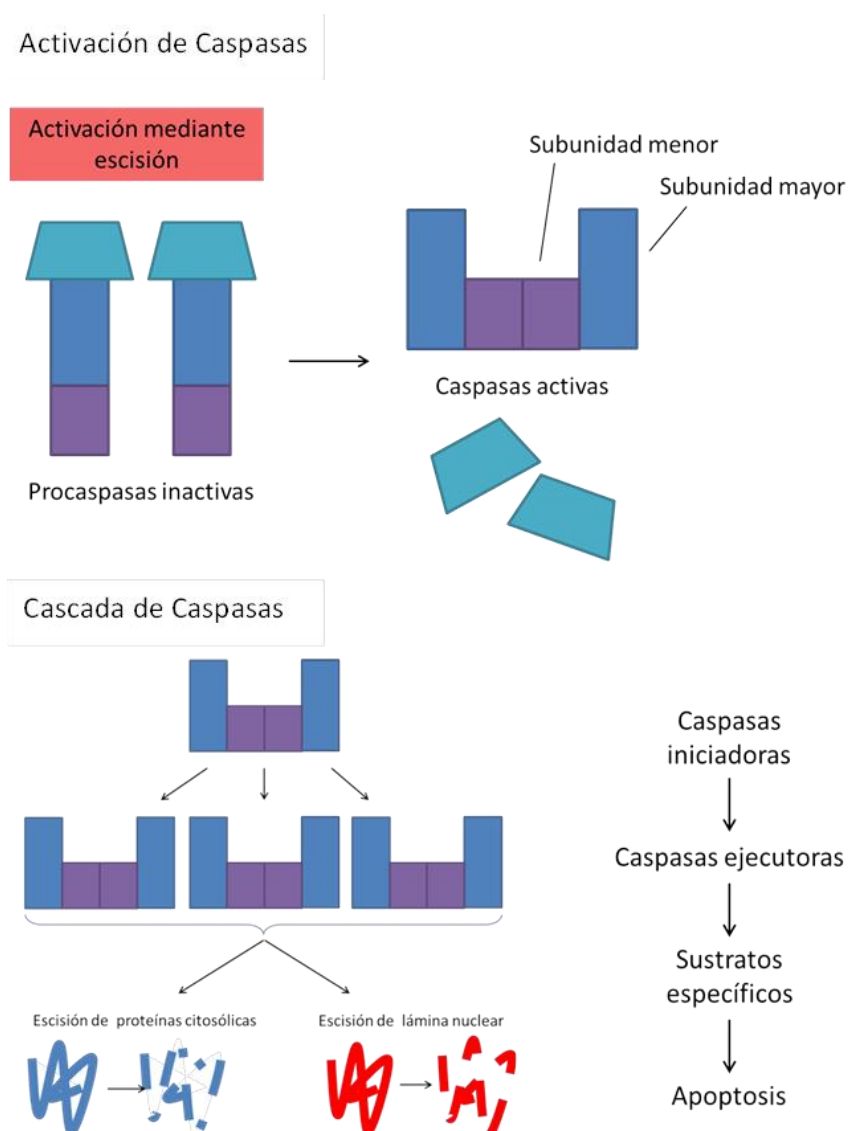


Figura I-21. Mecanismo de activación de caspasas.

Las células utilizan al menos dos vías diferentes para activar las procaspasas iniciadoras y desencadenar una cascada de caspasas que desencadene apoptosis: La **vía intrínseca** y la **vía extrínseca**.

4.2.2. Vía extrínseca

Se activa mediante ligandos extracelulares que se unen a receptores de muerte de la superficie celular (**Fas**). Los receptores de muerte reclutan las **procaspasas 8 y 10** mediante proteínas adaptadoras (**FADD**) formando el **DISC** (complejo de señalización que induce muerte) y activará a las caspasas ejecutoras⁶⁵.

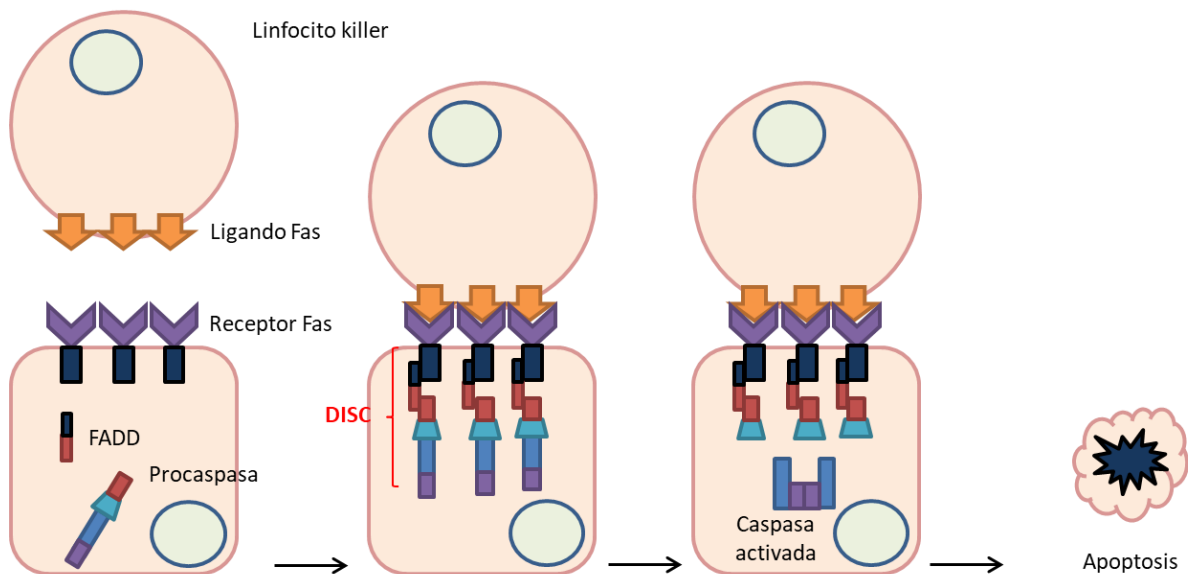


Figura I-22. Vía extrínseca de la apoptosis regulada por los receptores Fas.

4.2.3. Vía intrínseca

Se activa por señales intracelulares que se generan cuando las células están estresadas. El **citocromo c** que se libera del espacio intermembrana de la mitocondria activa el **Apaf1** la cual se ensambla en una estructura con forma estrellada, el **apoptosoma**, esta formación a su vez recluta procaspasas con dominio de unión a CARD y activa la **procaspasa 9**^{66,67}. Estas procaspasas mediante escisión activaran a caspasas ejecutoras las cuales favorecerán la apoptosis.

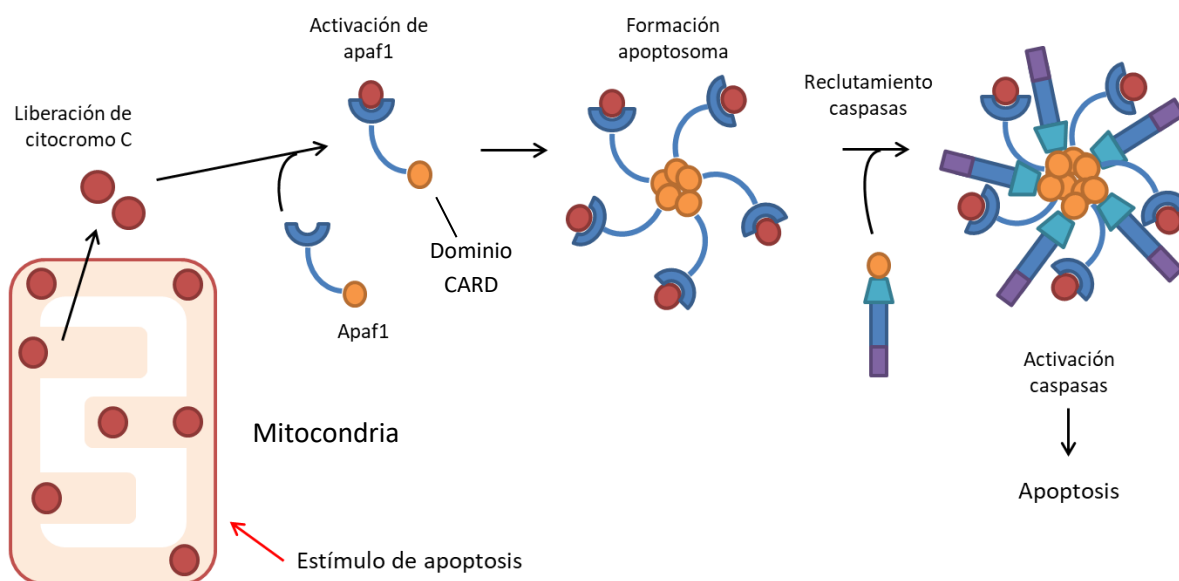


Figura I-23. Vía intrínseca.

4.2.4. Regulación

Tanto las proteínas señalizadoras extracelulares como las proteínas intracelulares **Bcl2** y las **IAP** regulan estrechamente el programa apoptótico asegurando que en una situación normal las células solo se autoeliminan cuando beneficia al organismo.

4.2.4.1. Familia IAP

Son inhibidores de proteínas apoptóticas. Se descubrieron en virus, en los que impiden que la célula infectada muera por apoptosis porque tiene proteínas que son inhibidoras. Se unen a procaspasas impidiendo su activación o se unen a caspasas para inhibir su actividad. Para neutralizar la actividad antiapoptótica de estas proteínas existen las denominadas anti-IAPs que se liberan cuando se recibe un estímulo apoptótico^{68,69}.

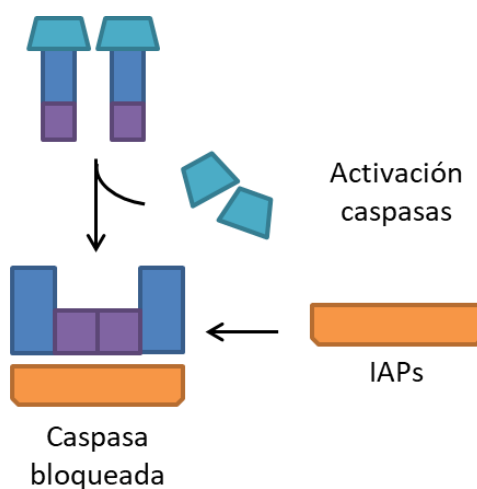


Figura I-24. Mecanismo de inactivación por IAPs.

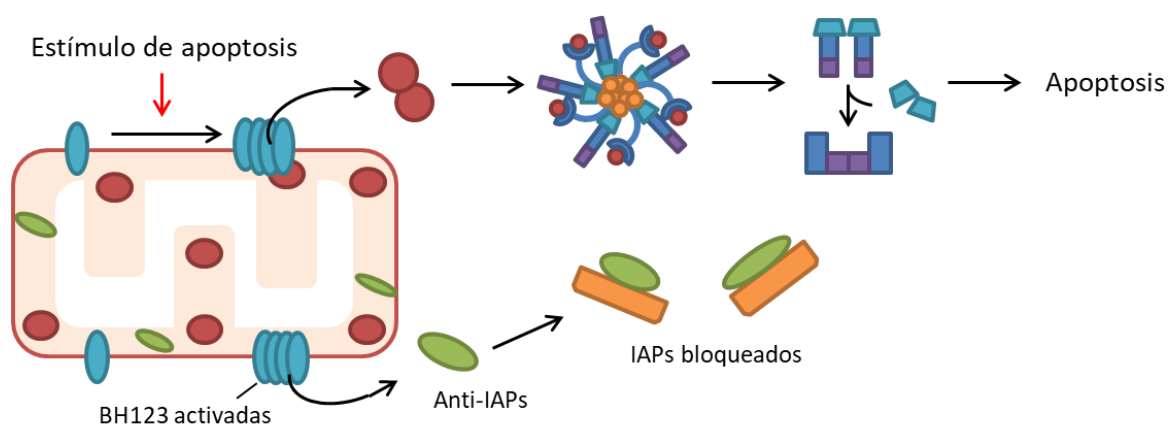


Figura I-25. Inhibición de los IAPs durante la apoptosis.

4.2.4.2. Familia Bcl-2

Las proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas Bcl2 regulan la vía intrínseca controlando la liberación de proteínas intermembrana mitocondriales. La proteína Bcl-2 fue identificada en un tumor linfóide, en el que estaba aumentada. Existe una gran cantidad de miembros en la familia bcl-2 de los cuales podemos nombrar algunos activadores como Bax, Bad, Bid, Bag...e inhibidores: Bcl-2, Bcl-X. La función de algunos de ellos, como Bad, está regulada por fosforilación^{70,71}.

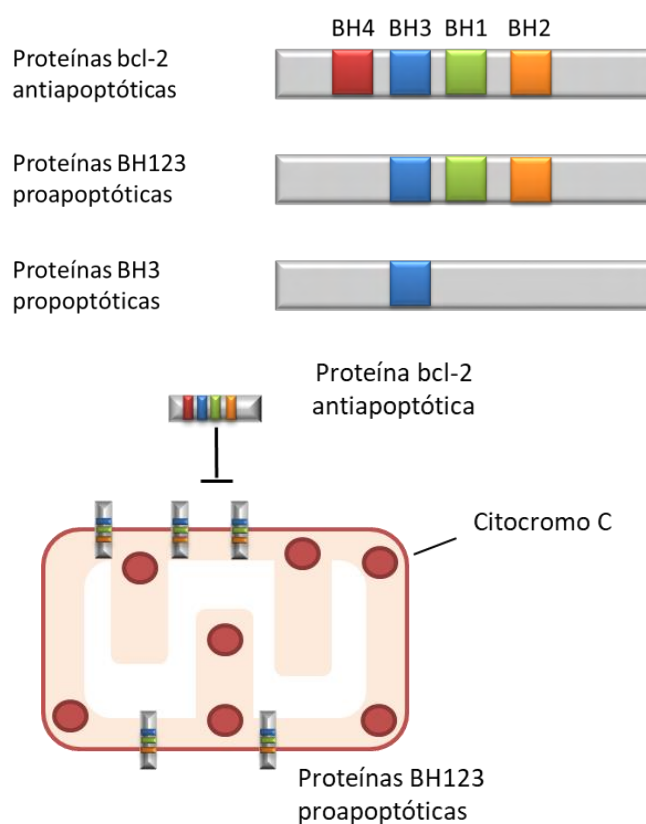


Figura I-26. Familia de proteínas BCL-2.

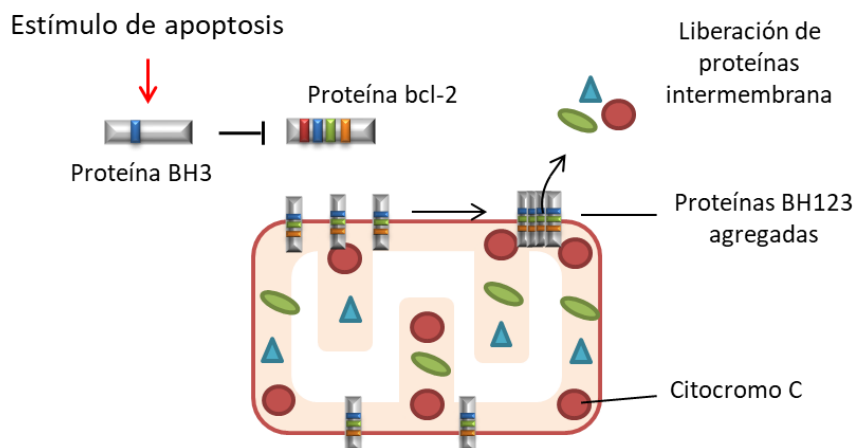


Figura I-27. Inactivación familia de proteínas BCL-2.

4.2.5. Inhibición de la apoptosis, implicación en cáncer

Algunas mutaciones en los genes que regulan la apoptosis permiten a las células tumorales sobrevivir cuando no deberían hacerlo. La inhibición de la apoptosis puede darse mediante 3 procesos diferentes (**Figura I-28**): por producción de proteínas antiapoptóticas (bcl-2), por inhibición de proteínas proapoptóticas o por inactivación de proteínas anti-IAPs. Todos ellos necesitan de factores de supervivencia para que se produzca la señalización y la célula no muera⁷². En procesos tumorales esta señal no es siempre necesaria, pues toda la maquinaria correspondiente para el mantenimiento y crecimiento de células tumorales se encuentra siempre activada sin necesidad de señales exógenas, acumulando así más alteraciones y aumentando su malignidad.

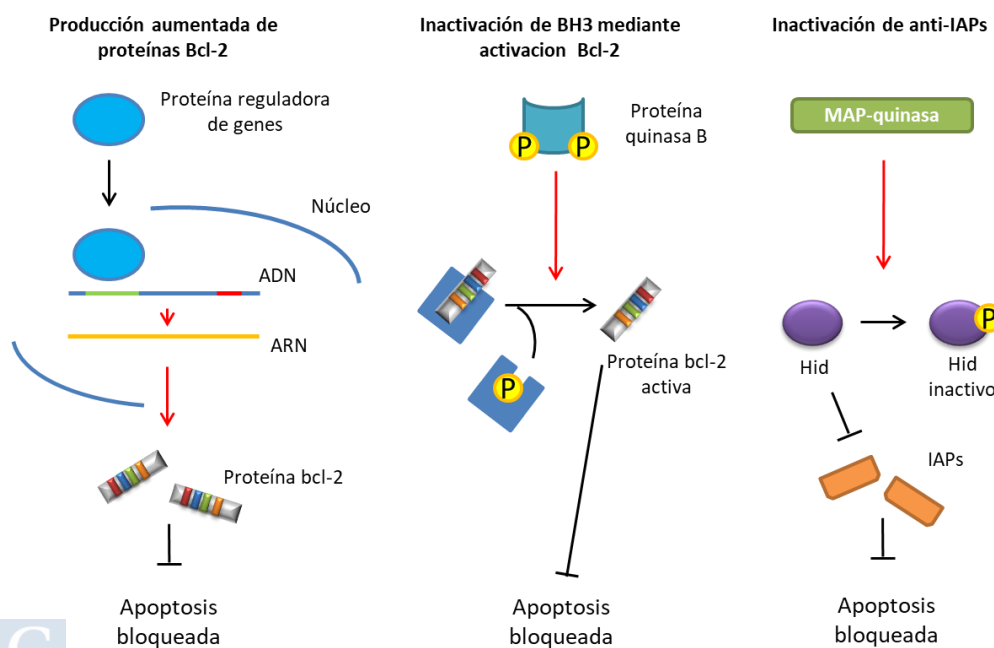


Figura I-28. Inhibición de la apoptosis por tres vías.

5. TERAPIA GÉNICA

La visión tradicional de los tratamientos en oncología consisten principalmente en **quimioterapia**, **cirugía** y **radiación**, cuyo objetivo fundamental es maximizar el daño a las células tumorales que se dividen rápidamente, pero a menudo a expensas de las células normales y la calidad de vida general del paciente.

El desarrollo de fármacos contra el cáncer ha cambiado desde los descubrimientos fortuitos del pasado, a la focalización intencionada de las células tumorales en la actualidad, que aprovecha los nuevos avances tecnológicos y una mayor comprensión de la biología tumoral. El objetivo de estos nuevos tratamientos es afectar la función esencial de la célula tumoral sin afectar a las células normales y limitar los efectos secundarios.

Debido a la naturaleza intrínseca de anormalidad genética en el cáncer, es obvio pensar que abordar este problema desde su raíz es lo más coherente, por lo que el uso de terapias génicas para el tratamiento se postula como una forma de tratamiento atractiva y emergente en las últimas décadas.

Toda estrategia de **terapia génica** se basa, en la **transferencia** de **material genético** o ácidos nucleicos (transferencia génica) al interior de un grupo de células. Estas células pueden ser células enfermas, en nuestro caso cancerígenas, –cuyo daño se pretende reparar–, o bien un grupo de células normales que se modifican genéticamente para que sean las efectoras de una acción terapéutica, sintetizando una proteína concreta, por ejemplo⁷³.

Los ácidos nucleicos terapéuticos han de ser transportados al interior de las células diana por medio de **vectores** adecuados. Se pueden distinguir dos tipos fundamentales de vectores: los basados en virus (**vectores virales**) y los vectores sintéticos (**vectores no virales**) que intentan imitar la capacidad natural que tienen los virus de introducir ácidos nucleicos en las células^{73,74}.

5.1. Vectores virales

Este tipo de vectores fueron los primeros en ser utilizados, dada su alta eficacia como vehículos de material genético. Los virus están compuestos por una molécula de ADN o de ARN rodeado de una cápside proteica y, en algunos casos, una envuelta lipoproteica. Su ciclo biológico pasa por la introducción del genoma viral en determinados tipos celulares, habitualmente por la presencia de receptores específicos en la membrana celular^{73,75}. Para poder utilizar un virus como vector, es necesario insertar el ácido nucleico terapéutico en el genoma viral, y conseguir al mismo tiempo que el virus no se replique y por tanto no sea patogénico. Por este motivo, los virus utilizados en terapia génica se denominan virus recombinantes y defectivos.

- Retrovirus

Son **virus ARN** que tienen una envuelta fosfolipídica, con glicoproteínas que determinan el tropismo del virus al ser reconocidas por receptores celulares específicos. El genoma viral se integra en el genoma de la célula huésped⁷⁵.

- Adenovirus

Los adenovirus son **virus ADN** sin envuelta, responsables de las principales enfermedades de vías respiratorias altas. El genoma viral se NO integra en el genoma de la célula huésped⁷⁵.

- Virus adenoasociados

Pertenecen al grupo de los **dependovirus**, virus ADN sin envuelta que necesitan de funciones helper para completar su ciclo replicativo completo. Estas funciones helper las aporta un adenovirus que sobreinfecta las mismas células que previamente habían sido infectadas por un dependovirus⁷³.

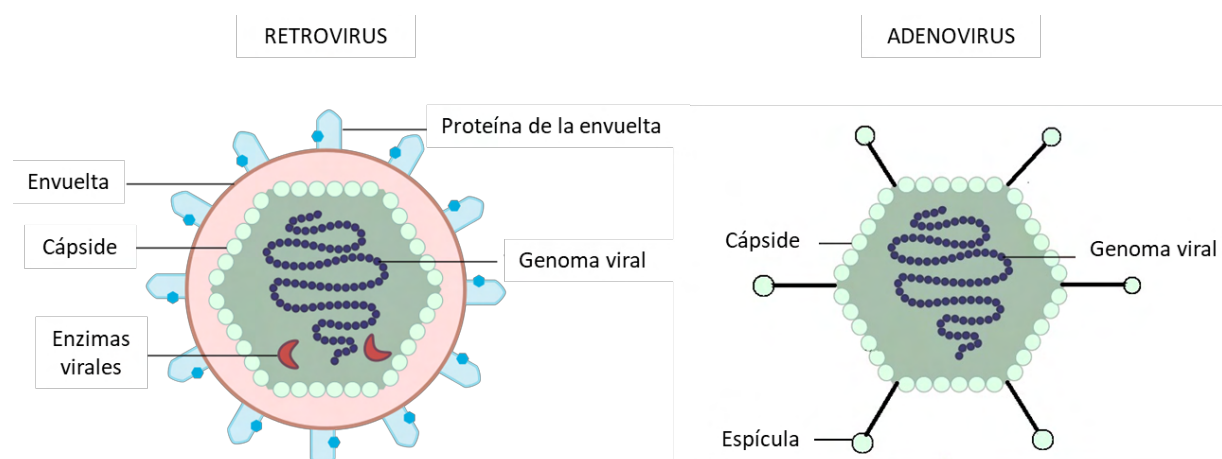


Figura I-29. Esquema de la estructura de retrovirus y adenovirus. En ambos casos se puede ver que el genoma viral se halla altamente protegido por una coraza, manteniendo la integridad de su material genético el cual debe sortear las barreras del organismo y de las propias células.

5.2. Vectores no virales

Los Vectores no-virales representan un intento de **emular** las funciones de los **virus** como vehículos de transferencia de material genético mediante sistemas sintéticos. Por lo general son vectores mucho más seguros desde el punto de vista de su peligrosidad biológica y patogenicidad. Los vectores no-virales no se diferencian conceptualmente de los fármacos a los que estamos acostumbrados. La principal limitación de este tipo de vectores es que, su eficacia in vivo es mucho menor que la de los vectores virales.

Esto se debe a la inestabilidad propia de sistemas sintéticos complejos y a las diferentes barreras que han de superar. Los vectores no-virales más utilizados son los siguientes:

- Inyección Directa, lo más sencillo es inyectar directamente el ácido nucleico en el órgano de interés. En ocasiones se utiliza la inyección de ADN formulado con diversos polímeros que lo protegen de la acción de las nucleasas y prolongan su vida media tras la administración. También se utiliza el ADN encapsulado en microesferas de polímeros biodegradables, que pueden inyectarse en un órgano y proporcionar liberación sostenida del ácido nucleico terapéutico durante un periodo de tiempo más o menos prolongado, dependiendo del tipo de polímero utilizado. Otra variedad es la transferencia génica balística (pistola génica o “gene gun”), en la que el ácido nucleico terapéutico se adsorbe sobre la superficie de una bolas microscópicas de oro u otro metal inerte, que son disparadas a presión sobre el órgano diana⁷³.
- Complejos formados por el ácido nucleico terapéutico y otros componentes: son los sistemas más complicados de elaborar y optimizar, pero los más eficaces dentro de los vectores no-virales. El principio que subyace a todos los sistemas de este tipo es la complejación del ADN (molécula grande con alto número de cargas negativas) con polímeros de naturaleza catiónica, de manera que la neutralización de cargas da lugar a complejos más o menos estables, de pequeño tamaño, en los que el ADN está protegido de la acción de nucleasas. Suele distinguirse entre lipoplexos y poliplexos. Sobre la estructura básica de un lipoplexo o un poliplexo pueden añadirse otro tipo de moléculas que actúen como estabilizadores, ligandos para receptores específicos, moléculas desestabilizadoras del endosoma, señales de localización nuclear⁷³.

	Retrovirus	Adenovirus	AAV	No virales
Tamaño máximo	7-8kb	7-8kb	5kb	Sin límite
Partículas/mL	10*8/mL	10*12/mL	10*11/mL	Sin límite
Administración	Ex vivo	Ex vivo/In vivo	Ex vivo/In vivo	Ex vivo/In vivo
Integración en el genoma	Si	No	Si/No	Mínima
Duración expresión in vivo	Corta	Corta	Larga	Corta
Inmunogenecidad	Poca	Mucha	Poca	Nada
Inmunidad previa	Improbable	Si	Si	No
Problemas seguridad	Mutagénesis	Inflamación/Toxicidad	Mutagénesis	Ninguno

Tabla I-1. Principales características de los vectores virales y no virales.

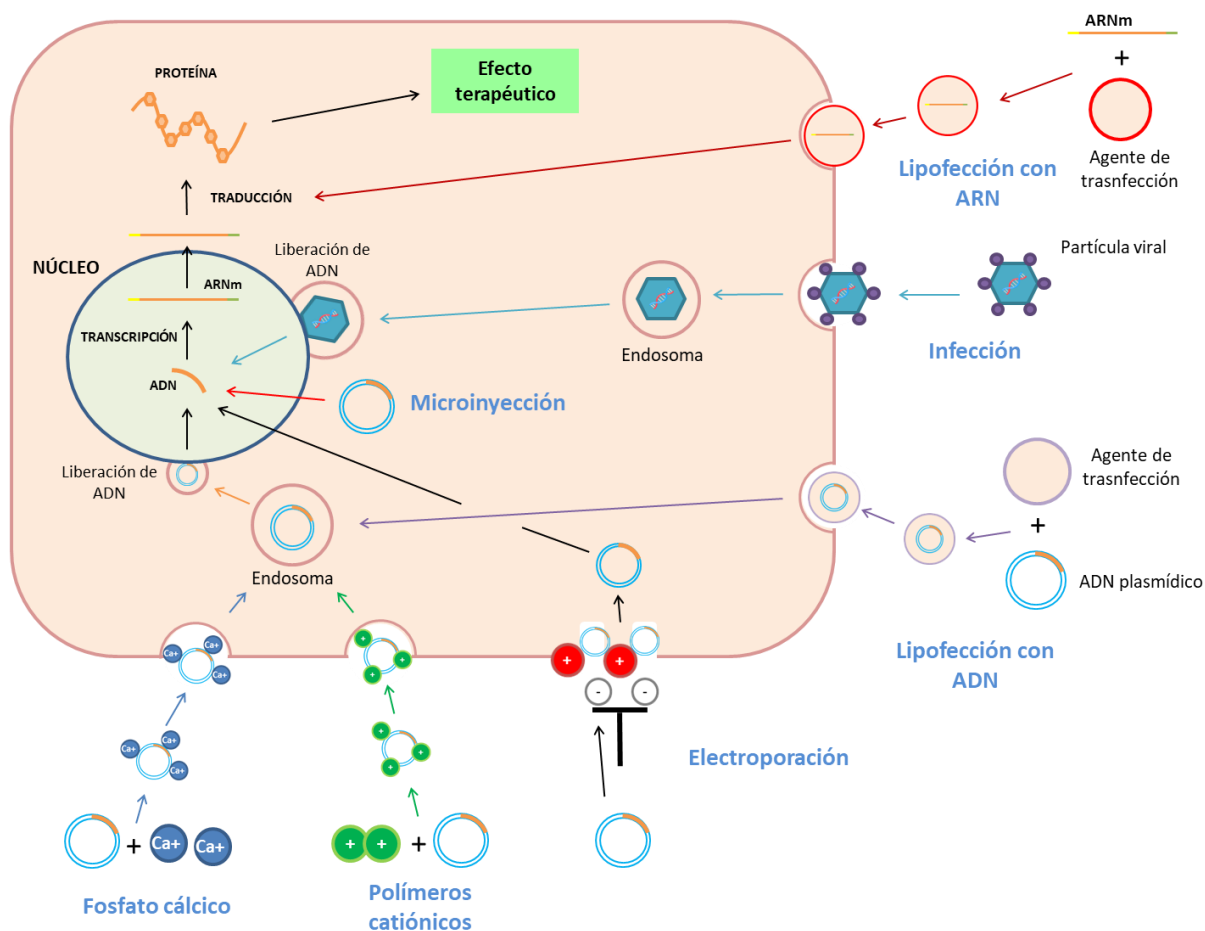


Figura I-30. Métodos de transferencia génica. Se puede apreciar en la imagen los diferentes métodos empleados para introducir material genético, sea ADN o ARN al interior de la célula. En esencia puede verse que tanto para procesos virales como no virales, el fin de todos ellos es afectar a la síntesis de proteínas favoreciendo la expresión de las mismas u otras específicas, o bien inhibiéndolas (como en el caso de la administración de ARNpi) para lograr el efecto terapéutico deseado.

5.2.1 Plásmidos

Son moléculas circulares de **ADN** bicatenario extracromosómico (no contiene genes relacionados con las funciones básicas vitales) de origen **bacteriano** con capacidad autónoma de replicación. Normalmente estos plásmidos contienen genes de resistencia a antibióticos, los cuales mediante la conjugación, las bacterias intercambian unas con otras para adaptarse a las distintas condiciones de un medio. Poseen Tamaño muy variable: entre 1 y 200 kb y son Dependientes de la maquinaria enzimática del hospedador⁷⁵.

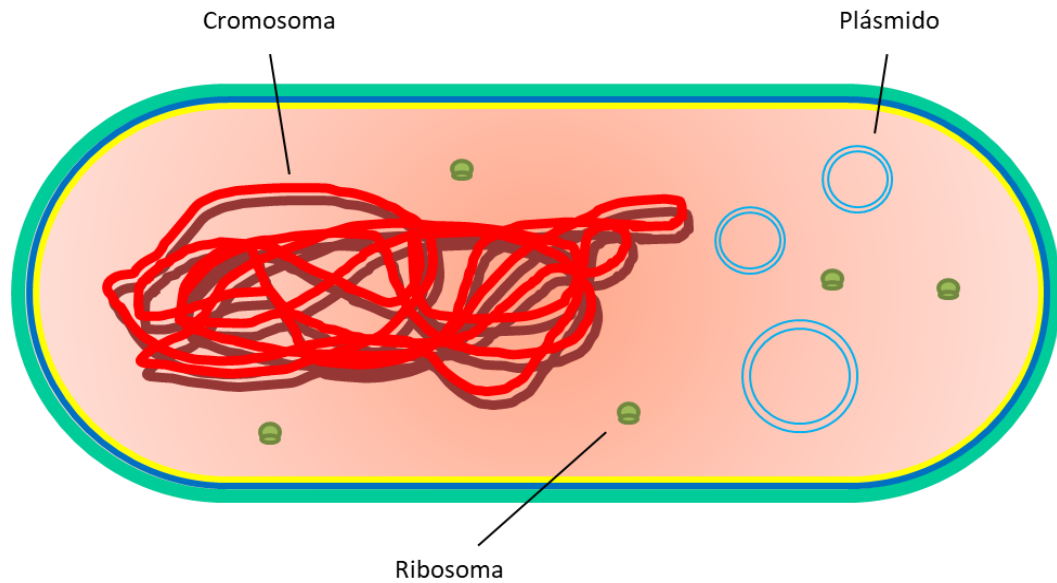


Figura I-31. Esquema de una bacteria y su material genético.

Los plásmidos cobran especial interés en terapia génica, pues resultan ser moléculas lo suficientemente **estables** en un sistema eucariota como para expresar sus proteínas codificadas. A través de la regulación dirigida es posible controlar en que sistemas, estos vectores son capaces de volverse eficaces. Entendiendo como eficaces, que puedan transcribir sus proteínas en gran cantidad como lo haría un virus.

¿Cómo es posible esta regulación en sistemas eucariotas? Para responder esta pregunta es necesario recordar el proceso de biosíntesis proteica del que hemos hablado anteriormente. Si recordamos, en la transcripción, las polimerasas sintetizan ARN a partir de ADN (gen) hasta llegar al constructo final que son las proteínas. Hemos mencionado que existe una región fundamental para que pueda ocurrir esto y es el **promotor**.

En los plásmidos, mediante ingeniería genética es posible modificar o insertar una región promotora que nos resulte de utilidad para que se exprese en un determinado sistema eucariota. Esto se consigue mediante el uso de enzimas de restricción, unas proteínas específicas que rompen la doble hélice de ADN, dejando nuestro vector abierto para insertar una nueva secuencia, sea el promotor, un gen de interés o un gen testigo como puede ser una proteína fluorescente⁷⁶⁻⁷⁸.

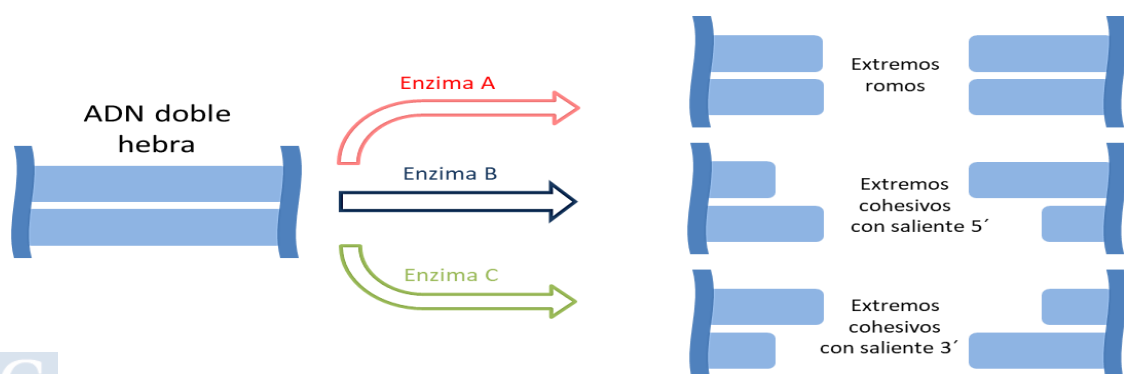


Figura I-32. Simetrías de corte de diferentes enzimas de restricción.

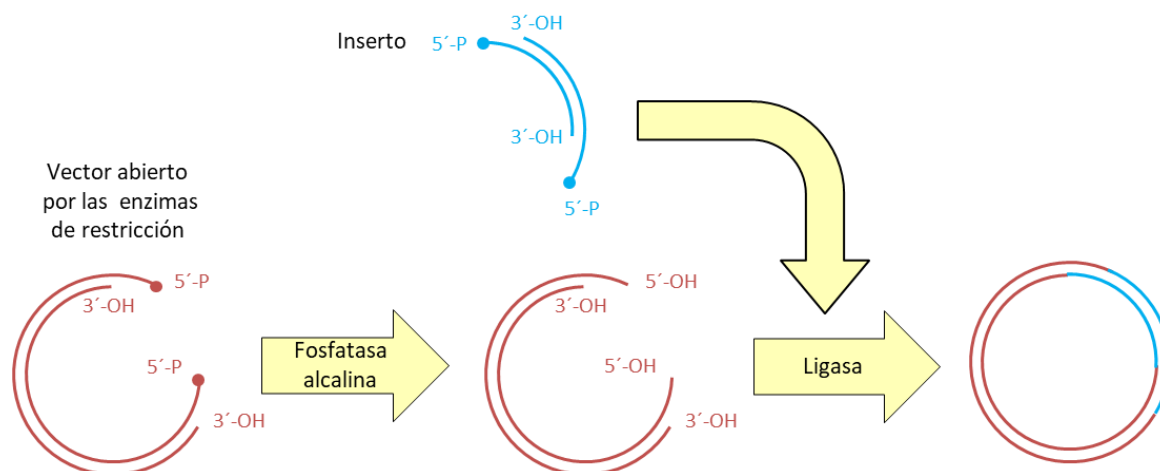


Figura I-33. Proceso de inserción y ligación de un gen (inserto) en un plásmido.

Una vez modificado, el plásmido, puede expresarse en presencia de un factor que sea característico del sistema que vayamos usar, por ejemplo, en lo que se basa este trabajo, de células tumorales. Aprovechando una sobreexpresión de moléculas que se unan a nuestro promotor podemos controlar la expresión de nuestro inserto y darle cierta especificidad.

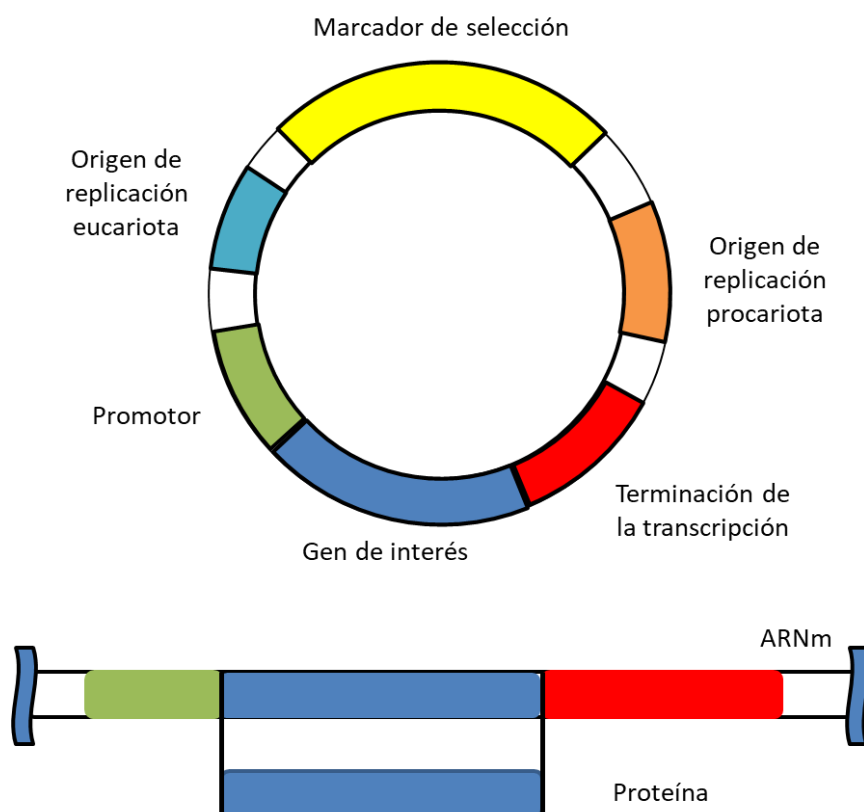


Figura I-34. Estructura clásica de un plásmido usado como vector de expresión. Obsérvese el constructo final (proteína) en azul proveniente del gen codificado en el vector. Del mismo modo que el ADN endógeno, este fragmento se transcribirá y traducirá en una proteína funcional.

- **Plásmidos citotóxicos, una aproximación terapéutica**

Es lícito pensar que modificando el patrón de expresión de un plásmido, es posible convertirlo en nuestra arma. Dado que, en una célula tumoral resulta imposible corregir la mayoría de sus funciones, lo más evidente es impedir que siga su curso, en otras palabras, destruirla. A través de especificidad conferida a un vector de expresión sería posible producir una molécula capaz de interferir con los procesos propios de la célula, alterando la biología de ésta, hasta un punto en que esta no tuviera más remedio que morir por apoptosis, sin afectar a aquellas células no deseadas.

Este tipo de terapias resultan ser algo demasiado novedoso y escaso. Al comienzo de este apartado hemos mencionado que en un sistema in vivo, lo más habitual y eficaz es el uso de virus. Motivo por el cual la tecnología con plásmidos se queda un poco rezagada, pero que en todo caso empieza a verse como algo emergente y prometedor.

6. SISTEMAS DE LIBERACIÓN

Hemos hablado de que para introducir ácidos nucleicos terapéuticos es necesario contar con un vector adecuado. Administrar ADN exógeno desnudo no resulta una idea factible, pues en un sistema in vitro la misma célula lo identifica como extraño y procede a destruirlo, además de que la carga superficial entre el ADN y la membrana plasmática imposibilita su entrada. En un sistema in vivo a parte de estos mecanismos, nuestro sistema inmune nos protege de todos los agentes externos dificultando más aun la administración, asimismo existen una gran cantidad de enzimas y agentes que degradan el material genético exógeno impidiendo que este penetre en las células.

Dado que el uso de virus entraña una serie de inconvenientes como son la seguridad y la estabilidad de los mismos, existen distintos tipos de procedimientos in vitro para superar estos obstáculos, como la utilización de **biolística**, **electroporación**, **microinyección**... pero si lo que nos interesa es utilizar un vector no viral nuestro objetivo es **imitar** el funcionamiento de un **virus** al introducir su material genético (que suele ser lo más eficaz) y lo más importante, realizar esta transferencia en sistemas vivos, los métodos que resultan más atractivos y que pueden utilizarse tanto in vitro como in vivo son los basados en **nanopartículas (Figura I-35)**.

Las nanopartículas engloban muchos tipos de nanoestructuras que han demostrado tener un gran potencial para transportar fármacos usados en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades (**Figura I-36**).

Como su nombre indica son sistemas de tamaño manométrico normalmente entre 1 y 100 nm⁷⁹. Se clasifican, atendiendo a su composición, en nanopartículas orgánicas (poliméricas, dendrímeros, liposomas y micelas) y en nanopartículas inorgánicas (de oro, de óxidos de hierro, de sílice mesoporosa y nanotubos de carbono). Los fármacos pueden incorporarse por encapsulación, por adsorción a su superficie, por absorción y por conjugación⁷⁹.

Para evitar los efectos secundarios, debidos a la biodistribución inespecífica y a la liberación incontrolada de los fármacos, se han desarrollado los sistemas de liberación de fármacos estímulo-respuesta⁸⁰⁻⁸⁷. Estos vectores liberan el fármaco tras producirse un estímulo que puede ser interno o externo. Dentro de los estímulos internos se encuentran los

cambios en el pH, variaciones en la concentración de enzimas o metabolitos y gradientes redox⁸⁸⁻⁹⁰. En este caso, se aprovechan los cambios tisulares asociados a situaciones patológicas como son las producidas por el cáncer, para desencadenar la liberación del fármaco, dándole cierta especificidad⁹¹.

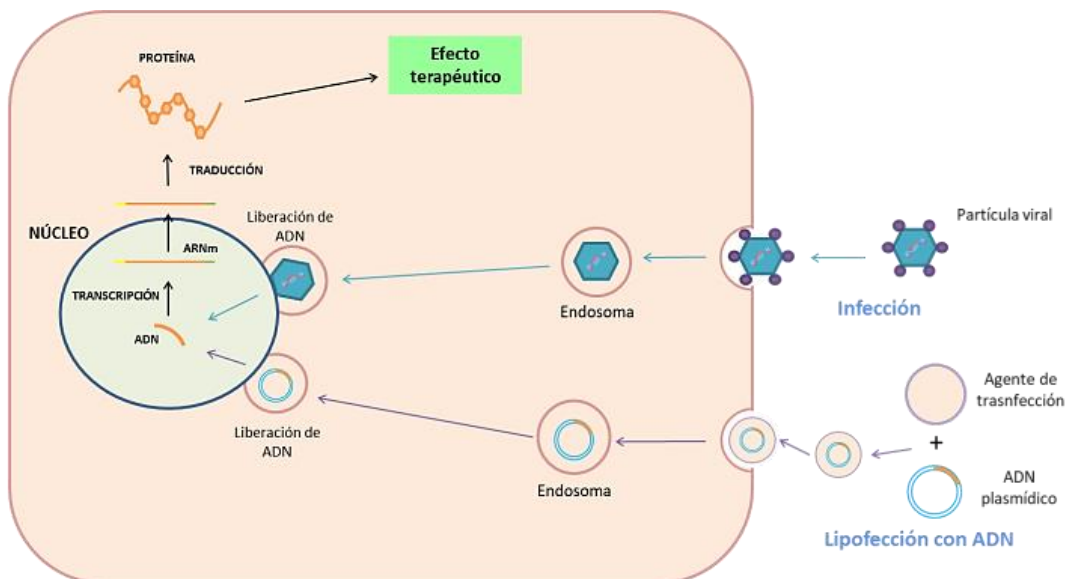
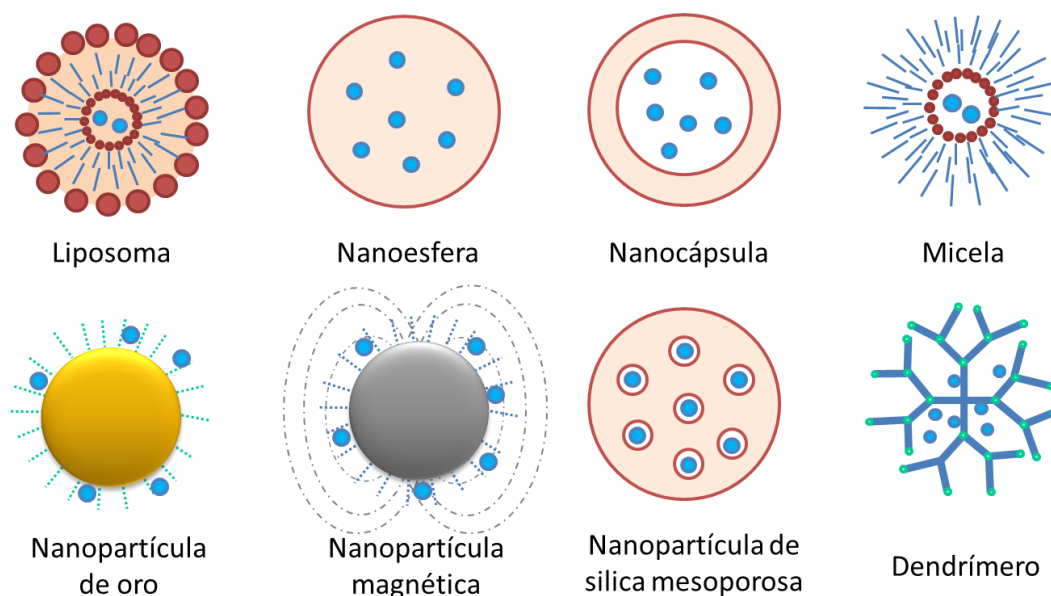


Figura I-35. Comparación entre vectores virales y no virales. En una infección el virus introduce el material genético para que la maquinaria celular sea la responsable de su transcripción y traducción en proteínas. La lipofección como método clásico no viral, basado en nanopartículas lipídicas (agente de transfección), imita la infección de un virus facilitando la entrada de ADN a través de la célula.



Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

De acuerdo con los antecedentes expuestos, el cáncer se caracteriza por errores en nuestros genes que se van a acumulando de forma progresiva. A pesar de estos errores mantiene siempre 2 procesos básicos: crecer y dividirse; por tanto mantiene una biosíntesis proteica constante y pronunciada. De parar o interrumpir estos procesos las células tumorales mueren, ya que son incapaces de seguir con su ciclo vital.

La vía de señalización E2F-pRb parece estar alterada en la mayoría de tumores humanos, siendo esta una de las principales vías que regula el ciclo celular, y por tanto la división. Para detener el ciclo vital a nivel específico, evitando generar resistencias como ocurre con los fármacos convencionales, es necesario no afectar al funcionamiento básico de la expresión génica. Nosotros presentamos la hipótesis que una terapia génica dirigida, empleando esta vía de señalización E2F-pRB constituye una alternativa de tratamiento atractiva y específica.

En base a todo esto postulamos que usando plásmidos modificados, subrogados a la expresión del factor E2F (esto es utilizando su promotor), podría producirse un producto el cual sería capaz de interrumpir el proceso de síntesis proteica, en células tumorales. Al interrumpir la biosíntesis, la célula de por si no puede seguir con sus procesos normales, viéndose este efecto exacerbado en tumores, ya que requiere de una mayor demanda para su propagación. Las células afectadas por tanto morirían por apoptosis, induciendo a su vez la actuación del sistema inmune, el cual llevaría a cabos procesos de fagocitación, reciclado, presentación de antígenos tumorales, etc. Con todo esto se evitaría futuras contaminaciones de células adyacentes con material tumoral.

Asimismo usando un sistema de administración basado en nanopartículas, se podría favorecer la transferencia del plásmido al interior de la célula, además de aumentar (en algunos casos) la respuesta inmune en la zona afectada. Para conferir más especificidad al a terapia se utilizaría un sistema estímulo-respuesta permitiendo la liberación del agente terapéutico en aquellas células de interés.

Para demostrar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo 1: Evaluar la expresión del promotor de E2F en diferentes líneas celulares tumorales, utilizando un plásmido subrogado a E2F con GFP.

Objetivo 2: Analizar y comparar la expresión de E2F en líneas celulares tumorales y sanas.

Objetivo 3: Analizar y comparar el efecto de un plásmido (citotóxico) con promotor E2F en células tumorales y sanas.

Objetivo 4: Evaluar la factibilidad de los distintos sistemas de nanopartículas así como sus propiedades, para elegir la más adecuada en procesos de transfección.

Objetivo 5: Analizar y comparar expresión de E2F y efecto del plásmido citotóxico en células tumorales y sanas, empleando nanopartículas como agentes de transfección.

Material y Métodos

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. Células utilizadas

Para evaluar la sobreexpresión del factor de transcripción E2F, y posible utilidad para el vector, se utilizó una batería de 3 líneas celulares tumorales y 1 línea de células no tumorales, a modo de comprobante negativo. Dos de dichas líneas proceden de adenocarcinomas (A549 y HeLa) y una de sarcoma (U87). Todas ellas obtenidas a partir de la colección de Cultivos Celulares Americana (ATCC).

Tanto la línea celular U87 como la no tumoral (BJ fibroblast) fueron cedidas por el Prof. Fernando Domínguez del Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CiMUS), de Santiago de Compostela.

Nombre	Origen	Tipo celular	Morfología	Tipo de crecimiento	Medio de cultivo
A549	Pulmón	NSCLC Adenocarcinoma	Epitelial	Adherente	DMEM completo
BJ	Piel	Normal	Epitelial	Adherente	MEM completo 10% PBS
HeLa	Cérvix	Adenocarcinoma cervical	Epitelial	Adherente	DMEM completo
U87-MG	Cerebro	Glioblastoma	Epitelial	Adherente	DMEM completo

Tabla M-1. Cultivos celulares utilizados

1.2. Medios de cultivo

Las líneas celulares tumorales fueron cultivadas en medio completo DMEM (Dulbecco modified Eagle médium) 1X (Gibco®, Life Technologies, NY, EE.UU) (1:1, v/v) suplementado con suero fetal bovino (Gibco®, Life Technologies) al 10% y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco®, Life Technologies, NY, EE.UU) en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂ a 37°C.

Para la línea celular BJ fibroblast se cultivó en medio completo MEM (minimum essential media) 1X (Gibco®, Life Technologies, NY, EE.UU) (1:1, v/v) suplementado con suero fetal bovino (Gibco®, Life Technologies) al 10% y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco®, Life Technologies, NY, EE.UU) en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂ a 37°C.

1.3. Tripsinización

Tras retirar el medio a las células y lavarlas con una solución de PBS (Gibco®), se incubaron entre 10-15 minutos, dependiendo de la línea celular, a 37°C con una solución de tripsina/EDTA 10X (Lonza). Transcurrido ese tiempo, la tripsina fue neutralizada con medio completo. Las células se recogieron y se centrifugaron a 900 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por último las células se resuspendieron en medio completo y sembradas de nuevo. Los factores de dilución entre subcultivos eran 1:10 para las células tumorales con 2 pases por semana, y 1:2 para las células no tumorales, con la misma frecuencia (1 o 2 días por semana).

En caso de ser necesario calcular la concentración, se realizó una alícuota de 10 µL de la solución total (1mL) y se procedió a contarlas en una cámara de *Neubauer* (Zuzi, Beriáin, Navarra).

1.4. Congelación de células

Una vez centrifugadas las células fueron resuspendidas en el volumen necesario de medio sin suplementos con un 10% de DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) en una concentración final de $1,5 \cdot 10^6$ células por mililitro. Esto para las líneas tumorales. En el caso de la línea de fibroblastos las células fueron resuspendidas en suero fetal bovino con un 10% de DMSO en la misma concentración que las tumorales.

Las células fueron almacenadas en un congelador a -80°C durante el periodo de una semana, para posteriormente ser trasladadas a un tanque de nitrógeno a una temperatura de -187°C.

2. GENERACIÓN DEL VECTOR

Se decidió por la construcción de dos vectores con secuencias promotoras idénticas pero difiriendo en el casete de expresión, conteniendo el primero un gen testigo y el segundo el elemento citotóxico del mismo. Para su construcción se optó por delegar el trabajo a la empresa Recombina S.L. (Mutilva, Navarra) quienes sintetizaron las secuencias y las introdujeron en vectores modelos para su producción. Del mismo modo realizaron la transformación de bacterias proporcionando el plásmido puro y el contenido en bacterias.

El desarrollo del plásmido citotóxico se realizó en varias fases. En la primera mediante síntesis génica se obtuvo la secuencia del producto citotóxico, posteriormente mediante PCR se procedió a su amplificación y solapamiento de los fragmentos de la secuencia promotora con la secuencia de nuestro producto. El fragmento resultante se clonó en un vector de expresión pENTRY, tal y como se ha explicado en el apartado de terapia génica, empleando enzimas de restricción para tal fin.

3. OBTENCIÓN DE BACTERIAS Y PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Para hacer crecer las bacterias de interés (*E. coli*), a una concentración la cual permitiese la extracción del plásmido, se sembraron a través de un hisopo en una placa 100 mm (Corning®, NY, EE.UU) mediante un método de agotamiento en estrías. La placa contenía agar-agar (Sigma) enriquecido para bacterias con ampicilina (100 µg/mL). Una vez sembradas, la placa se incubó boca abajo durante 16 horas a 37°C.

Transcurrido ese tiempo se eligieron entre 3 y 2 colonias de la placa y se crecieron en 5 mL de medio LB (100 µg/mL, Sigma) en agitación (300 rpm) toda la noche. Una vez que el medio se encontraba lo suficientemente turbio, se procedió a la extracción del ADN plasmídico (5-20 µg de ADN) mediante la realización de *minipreps*.

Para la realización de las *minipreps* se utilizó el kit comercial E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit I, Q-spin (Omega), siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

4. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE CÉLULAS

4.1. Vector de expresión con gen testigo

Para evaluar la expresión y/o actividad del promotor E2F en las diferentes líneas celulares se procedió a realizar transfecciones con un plásmido subrogado a este promotor en cual se contenía un gen testigo GFP (proteína verde fluorescente).

Todas las células fueron transfectadas con el vector de expresión que contiene la región promotora E2F y el gen que codifica la proteína GFP utilizando el reactivo K2® (Biontex, München / Laim Alemania).

K2® es un compuesto de base lipídica de baja toxicidad formulado para transfectar células con ADN o ARN. Los complejos que se forman de la interacción entre K2® y el plásmido son internalizados en la célula, debido a la naturaleza lipídica de K2®. Una vez en el citoplasma se produce la liberación del ADN de su envuelta, debido a efectos osmóticos y de fusión con el endosoma, permitiendo al plásmido navegar libremente por la célula.

Las células crecieron en una placa de 12 pocillos (Corning®, NY, EE.UU) hasta alcanzar el 80% de confluencia. En este momento se realizó la transfección. Para ello se añadieron en un eppendorf, 3µL de reactivo K2® por cada 1µg de ADN en un volumen final de 100µL de medio DMEM sin suplementos ni antibióticos. La mezcla se incubó durante 15-20 minutos a temperatura ambiente. Al cabo de ese tiempo el medio completo presente en la placa se retiró, se lavaron los pocillos con PBS y se añadió medio DMEM sin suplementos, posteriormente se

añadieron los 100μL de la mezcla a repartir entre dos pocillos, de modo que cada uno llevara 50μL.

Para evitar una excesiva toxicidad, dependiendo de la línea, los pocillos conservaron DMEM completo con suplementos.

La eficacia de transfección se analizó mediante un análisis en microscopia de fluorescencia. Todos estos experimentos fueron realizados a una concentración aproximada de 2×10^5 células por pocillo, a una temperatura de 37°C en 5% CO₂ durante 24 horas antes del experimento.

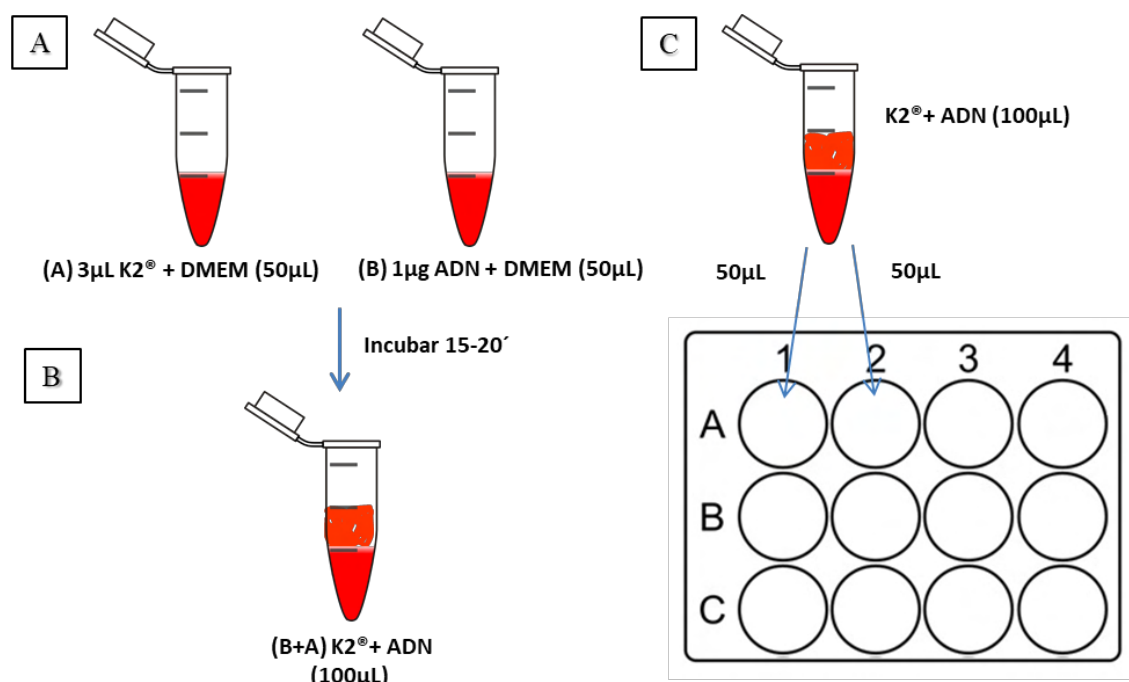


Figura M-1. Esquema del proceso de transfección. El reactivo de transfección y el material genético se añaden en DMEM hasta un volumen de 50μL (A). Posteriormente ambos reactivos se mezclan durante 15-20 minutos hasta un volumen final de 100μL (B). Concluido el tiempo de incubación la mezcla se reparte en dos pocillos los cuales contienen las células a transfectar (C).

4.2. Vector de expresión citotóxico

Del mismo modo que en el apartado anterior las células fueron sometidas a una transfección con otro plásmido. Esta vez fueron transfectadas con el vector de expresión con un gen citotóxico y el promotor E2F.

Las células crecieron en una placa de 12 pocillos (Corning®, NY, EE.UU) hasta alcanzar el 80% de confluencia. Para la transfección se añadieron en un eppendorf, 3μL de reactivo K2® por cada 1μg de ADN en un volumen final de 100μL de medio DMEM sin suplementos ni antibióticos. La mezcla se incubó durante 15-20 minutos a temperatura ambiente. Al cabo de ese tiempo el medio completo presente en la placa se retiró, se lavaron los pocillos con PBS y se añadió medio DMEM sin suplementos, posteriormente se añadieron los 100μL de la mezcla a repartir entre dos pocillos, de modo que cada uno llevara 50μL.

La eficacia de transfección aquí se analizó mediante un análisis de microscopía óptica simple o con tinción de trypan blue (Gibco®, Life Technologies) en algunos casos, y un ensayo de MTT.

5. MICROSCOPIA

5.1. Microscopía óptica

Con el fin de estudiar de forma aproximada la eficacia de transfección del plásmido se procedió a realizar un examen en fresco de las placas de 12 pocillos 24-36 horas después de la transfección. La tinción con trypan blue normalmente se emplea para ensayos de viabilidad, no obstante aquí se planteó de manera diferente, como comprobante de transfección.

Debido a la naturaleza del vector, éste carecía de un gen testigo como lo es la GFP o una secuencia IRES con dicho gen, por tanto su observación en microscopia confocal o de fluorescencia era inoperante. Para suplir esta falta se ideó una nueva utilidad para la tinción con trypan blue, para ello se hipotetizó que debido a la tinción por exclusión de células muertas, aquellas que estuvieran transfectadas sufrirían un proceso de apoptosis, por tanto con cierto grado de error, la tinción positiva de estas correspondería con una transfección positiva.

Tras 24-36 horas después de la transfección los pocillos fueron cuidadosamente vaciados de medio (para evitar desperdiciar las células apoptóticas), a continuación se añadieron dos gotas (3-5 μ L) de solución trypan blue diluidas en un volumen total de 250 μ L de PBS en cada pocillo. Al cabo de 5-10 minutos se procedió a su examen en un microscopio invertido.

5.2. Microscopía confocal/fluorescencia

Gracias a la microscopia confocal y de fluorescencia, es posible la visualización de muestras que expresan proteínas fluorescentes las cuales nos dan indicativo de eficacia de transfección así como, en este caso, expresión y/o actividad del promotor E2F.

Para la visualización de las muestras, se procedió a realizar una transfección tal y como es descrita en el apartado **4.1**. Aquí para contrastar con la eficacia de otros plásmidos se emplearon dos con gen testigo como son pCMV-mCherry y pUb-GFP (este último como comprobante preliminar). En el caso del primero este codificaba una proteína roja fluorescente y el segundo otra de color verde idéntica a la nuestra. Ambas construcciones difieren de la nuestra en su promotor que bien es el de un virus (el cual no hace distinción y genera muchas copias de sus genes) o es el de un proteína ubicua en células eucariotas.

Una vez preparadas las muestras, en torno a 24-36 horas después de la transfección (conteniendo nuestro plásmido y los otros dos como controles) se procedió a sellar la placa con parafilm para evitar la entrada de contaminación y/o vapores que dificultasen la observación en el microscopio. Todas las muestras fueron visualizadas y fotografiadas a un aumento fijo, permitiendo así una comparación en la eficacia de transfección a parte de un comprobante de las mutaciones en las células.

En un primer experimento se realizó con una sola línea celular para ajustar valores, posteriormente se realizó una transfección completa tanto las líneas tumorales como no

tumorales. Como controles negativos se cultivaron células con los reactivos de transfección vacíos.

Las preparaciones fueron observadas primeramente en un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axio Scope A1, Oberkochen, Alemania) y fotografiadas con el programa Axiovision de Zeiss. Para una visualización en mayor resolución y fiabilidad las muestras fueron nuevamente observadas en un microscopio confocal (Leica TCS SP8).

6. OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

6.1. Extracción de proteínas totales

Para la extracción de proteínas totales se optó por realizar un lisado celular con buffer RIPA (Thermo Scientific, MA, USA). La lisis se realizó tanto de células transfectadas como no transfectadas (estas últimas fueron tratadas con el reactivo de transfección vacío). Pasadas 24-36 horas postransfección (en ambas poblaciones de células) el medio fue recogido en un falcon de 15mL y las células lavadas con PBS. A continuación las células fueron tripsinizadas y recogidas en el mismo falcon de 15 mL. Una vez recogido todo el volumen total de células y medio la muestra fue centrifugada a 900 rpm durante 5 minutos, con el fin de recolectar el mayor número de células posible (tanto vivas como muertas).

Terminada la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el pellet seco fue resuspendido en RIPA dejándolo en incubación 15 minutos a 4°C. Tras ese tiempo la muestra se centrifugo nuevamente a 16000 rpm durante 10 minutos, quedando en el sobrenadante las proteínas totales.

6.2. Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método BCA (ácido bicinonínico) Protein Assay (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) según las instrucciones del fabricante, utilizando la albúmina sérica bovina (BSA) (Thermo Scientific, NY, EE.UU) para realizar la curva patrón.

Este método se basa en la reducción de Cu^{2+} (azul) a Cu^{+} por parte de las proteínas de la muestra. Para ello se tomaron 2-5 μL de cada muestra (extraídas en el apartado anterior) y se realizó un quintuplicado, de las mismas. Se completó el volumen hasta 10 μL utilizando agua destilada estéril en una placa de 96 pocillos. Del mismo modo se prepararon los pocillos con la concentración de albumina conocida, manteniendo una concentración fija sin diluciones. Una vez preparadas todas las muestras se añadieron 200 μL del reactivo de BCA y se incubó la placa a 37 °C durante 30 minutos. Al cabo de ese tiempo se midió la absorbancia en el rango de 550-590 nm. A partir de ahí los datos fueron contrastados comparando la muestra control (albumina) con la muestra sin transfección y la muestra transfectada.

7. ESTUDIO DE LA TOXICIDAD



7.1. Ensayo con MTT

Para evaluar la eficacia del vector tóxico, se analizó la viabilidad celular mediante uno de los sistemas más utilizados, que es el ensayo colorímetro cuyo reactivo es MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)- 2,5-Difeniltetrazolio Bromuro] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU).

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del compuesto MTT por parte de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, que pasa de un color amarillo a otro morado (formazán). Determinando la funcionalidad de las células. En caso de existir toxicidad bien por falta de células o por una inoperancia de las mitocondrias, dependiendo de la intensidad de coloración en la muestra a analizar, puede determinarse el número de células vivas. La cantidad de células vivas es directamente proporcional a la cantidad de formazán producido.

Para analizar la toxicidad del vector se realizó una transfección como en los apartados 4.1 y 4.2.

Al cabo de 24-36 horas después de la transfección los pocillos fueron lavados con PBS y se les añadió una mezcla con 4,4g del compuesto MTT diluido en DMEM sin suplementear hasta llegar a un volumen total de 8 mL. Cada pocillo de la placa recibiría 1 mL de la mezcla y se incubaría durante 4 horas a 37 °C. Pasado ese tiempo, la mezcla sería desechada de los pocillos con suavidad (evitando que las células pudieran desprenderse de la misma) y fueron reemplazados con 500µL de DMSO para la permeación celular y la solubilización de los cristales de formazán. Para facilitar la solubilización, la placa se incubó 15 minutos en un horno seco (37 °C).

Como el lector de placas estaba configurado para leer una placa de 96 pocillos, la solución de DMSO y los cristales solubles se trasladaron de la placa de 12 a una de 96 pocillos, estableciendo por columnas la muestra a analizar. La absorbancia se midió a 570 nm utilizando el lector de microplacas Multiskan GO (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) Tras las mediciones del ensayo se establecieron los valores de viabilidad en porcentajes, con datos normalizados utilizando la fórmula: % viabilidad = $(\text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ muestra} - \text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ control negativo}) / (\text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ control positivo} - \text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ control negativo}) \times 100$.

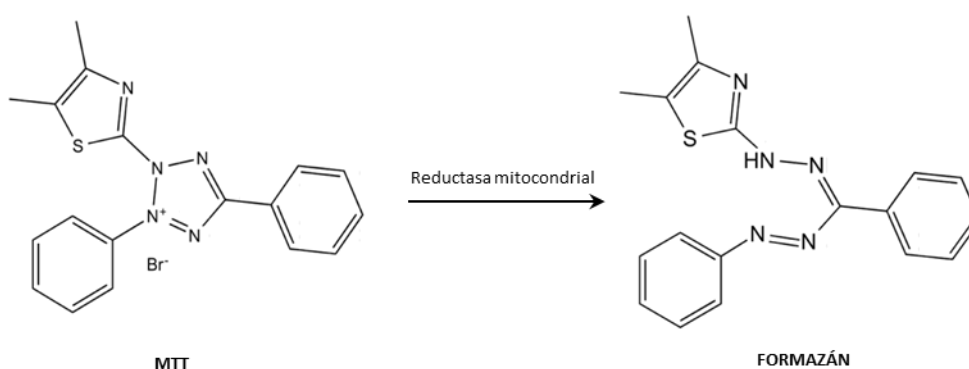


Figura M-2. Reacción de MTT. El MTT (amarillo) se reduce en la mitocondria de la célula, formando cristales de formazán (violeta).

7.2. Ensayo con trypan blue

La solución de trypan blue es un colorante que permite diferenciar células vivas de células muertas. La premisa de esta técnica reside en el concepto de que las células viables no absorben colorantes impermeables, sin embargo las células muertas son permeables y absorben estos colorantes.

Para realizar la prueba las células eran transfectadas como se relata en apartados anteriores y 24-36 horas después de la transfección, tripsinizadas del medio. Las células se recogieron y se centrifugaron a 900 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente y resuspendidas en PBS. Se añadieron de 2 a 3 gotas de la solución trypan blue y se dejó incubar durante 5 minutos, agitando moderadamente el falcon evitando la precipitación de las células. Al cabo del tiempo de incubación se tomó una muestra de 10 μ L para observarla en una cámara de neubauer contabilizando así las células muertas y las vivas.

Las muestras a analizar eran contrastadas con una muestra control que bien contenía el plásmido fluorescente o el reactivo de transfección vacío.

7.3. Examen óptico en microscopio

Para observar de forma aproximada pero fiable la cantidad de células apoptóticas, durante el proceso de transfección y después de este, las muestras eran examinadas con frecuencia en un microscopio invertido en el aumento más lejano. De esta forma podía monitorizarse de una forma rápida y eficaz el efecto tóxico de nuestro vector y compararlo con las demás muestras.

8. NANOPARTÍCULAS

Una de las principales finalidades de todo este trabajo ha sido poder introducir material genético de forma eficiente en el interior de las células, para posteriores experimentos in vivo. Para ello se recurrió al empleo de nanopartículas magnéticas las cuales brindan muy buenos resultados tanto in vitro como in vivo. Todas las nanoestructuras magnéticas fueron desarrolladas y cedidas por el Dr. Manuel Antonio González Gómez, del grupo de investigación, de Nanotecnología y Magnetismo (NANOMAG) de la Universidad de Santiago de Compostela, dirigido por el Prof. José Rivas, en el Instituto de Materiales de la Universidad de Santiago de Compostela.

8.1. Selección

Para escoger la nanoestructura magnética adecuada se decidió por establecer una batería de distintas nanopartículas con morfología, composición y tamaño variable:

- Multinúcleos de magnetita recubiertos con sílice, multi- $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, de 190 nm de diámetro.
- Magnetita funcionalizada con polietilenimina, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$, de 10 nm de diámetro.
- Magnetita funcionalizada con polidopamina, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}$, de aproximadamente 15 nm de diámetro.
- Carburo de hierro recubierto con sílice, $\text{Fe}_5\text{C}_2@\text{SiO}_2$, de 19 nm de diámetro.

Para evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas in vitro, se utilizó el ensayo de bromuro de 4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Las células se sembraron a una densidad de 10^4 células / pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37°C en 5% de CO_2 durante 24 h. Las células se incubaron en concentraciones crecientes* (10, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400 $\mu\text{g} / \text{ml}$) en sextuplicado durante 48 h. Las células no tratadas como control positivo y Triton-X 100 tratadas como negativas también se incluyeron.

Para el ensayo MTT, el medio completo se reemplazó con 110 μL de medio fresco sin suplementos que contenían 20 μL de solución MTT para cada pocillo (5 mg / ml en PBS) y se incubó a 37°C durante 4 h. Después del tiempo de incubación, se retiró la mezcla de medio MTT y se añadieron 100 μL de DMSO para la permeación celular y la solubilización de los cristales de formazán. Para facilitar la solubilización, la placa se incubó 15 minutos en un horno seco (37°C). La absorbancia se midió a 570 nm utilizando el lector de microplacas Multiskan GO (Thermo ScientificTM, Waltham, Massachusetts, EE. UU.).

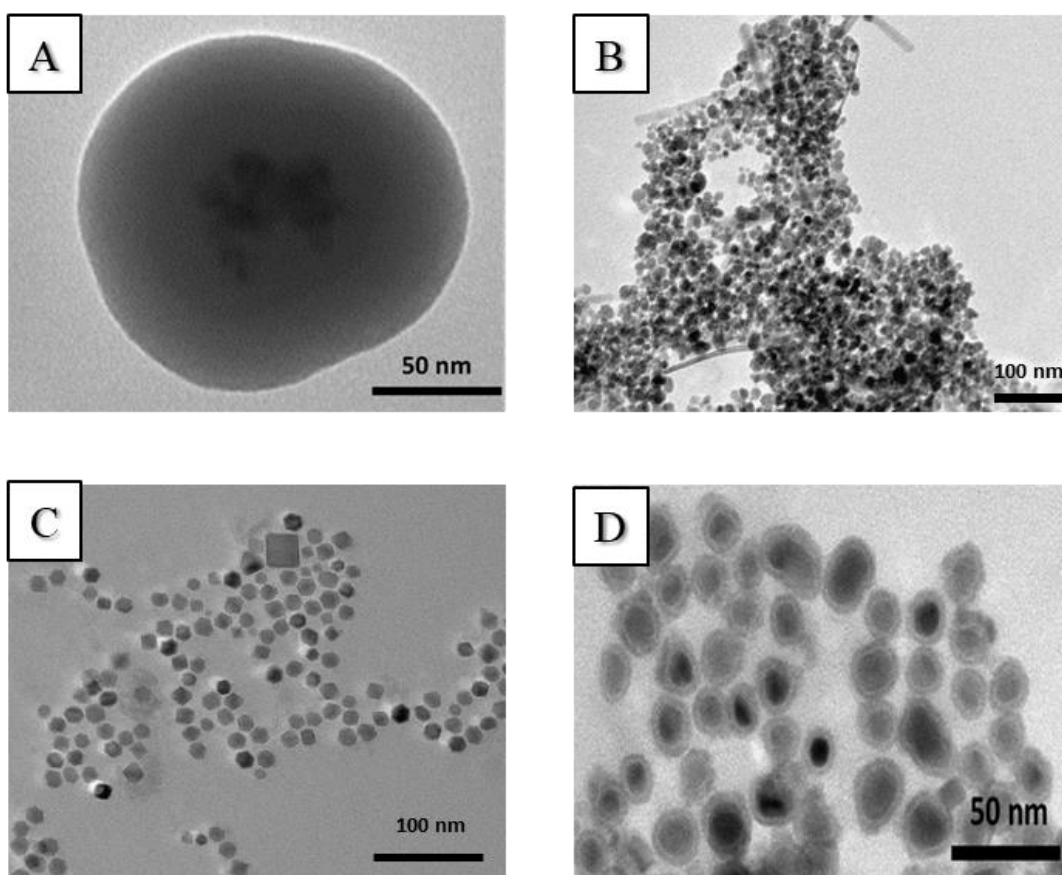


Figura M-3. Micrografías TEM de las diferentes nanoestructuras magnéticas usadas. (A) multi- $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (B) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ (C) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}$ (D) $\text{Fe}_5\text{C}_2@\text{SiO}_2$.

8.2. Captación

Los procesos de captación se muestran como una internalización de nanopartículas por parte de las células. Las células se sembraron a una densidad de 10^4 células / pocillo en una placa de 12 pocillos y se incubaron a 37°C en 5% de CO_2 durante 24 h. Las nanopartículas magnéticas se inocularon al día siguiente al 80% de confluencia, a diferentes concentraciones en cada pocillo siendo estas 30, 60 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Para evitar los efectos secundarios de la citotoxicidad de las nanopartículas, se realizó el experimento en todas las etapas con medio DMEM completo. El período de incubación duraba 4 horas, al cabo de ese tiempo los pocillos se lavaron cuidadosamente con PBS y se reemplazaron con medio completo fresco.

Para observar la eficacia de la captación, las células eran observadas, al cabo de las 4 horas de incubación, en el caso de las partículas sin compuesto fluorescente bajo un microscopio óptico invertido. En el otro caso las células se observaron en un microscopio de fluorescencia, alternando entre los diferentes filtros para ver la emisión en diferentes longitudes de onda dependiendo de los distintos compuestos fluorescentes.

8.3. Captación magnética

Debido a las propiedades magnéticas que presentan estas nanoestructuras, se propuso aprovechar su buena respuesta magnética tras aplicar un campo magnético atractivo para agilizar los procesos de captación, disminuyendo así los tiempos de incubación, toxicidad y recursos.

El principio se basa en la interacción de un imán situado a una distancia fija, el cual atrae las nanopartículas hacia sí. De existir una célula entre esta nanopartícula magnética y el imán permanente, ésta se vería obligada a fagocitar la nanopartícula reduciendo considerablemente los tiempos de incubación y en cierto modo, aumentando la eficacia.

De igual forma que el apartado anterior las células fueron tratadas de idéntico modo, en cuanto a sembrado y preparación. Para realizar la captación magnética las partículas fueron inoculadas con una concentración fija (100 $\mu\text{g/ml}$ para aquellas partículas más tolerables y 50 $\mu\text{g/ml}$ para las demás). Inmediatamente después de agregar las nanopartículas al medio, debajo de la placa se colocó una placa de idénticas dimensiones y pocillos la cual poseía en cada pocillo un disco magnético de neodimio-hierro-boro, coincidiendo con los pocillos superiores los cuales contenían células y nanopartículas. Esta construcción se mantuvo así durante 15 minutos en incubación. Al cabo de ese tiempo ambas placas fueron separadas, y los pocillos lavados cuidadosamente con PBS, y vueltos a completar con medio completo fresco.

Para comprobar la eficacia de la captación magnética las células eran observadas en un microscopio óptico invertido y en uno fluorescente, comparando los datos con los obtenidos con la captación clásica, sin fuerza magnética.

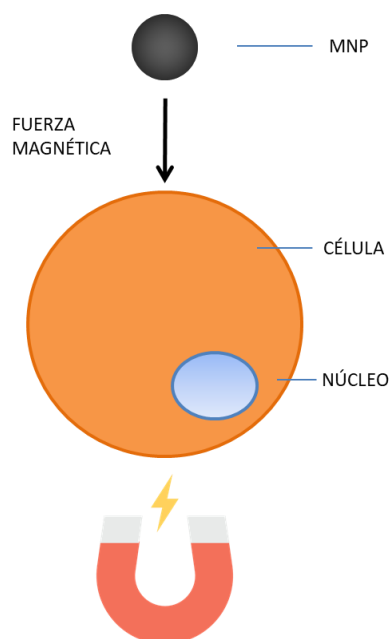


Figura M-4. Fundamento de la técnica de captación magnética, las partículas son atraídas hacia el interior de las células mediante la acción de un imán a una distancia determinada.



Figura M-5. Placa utilizada para realizar los experimentos con los discos magnéticos de neodimio-hierro-boro en lugar de células. Esta se colocaba debajo de otra placa la cual contenía las células y las nanopartículas magnéticas, con el fin de aplicar un campo magnético atractivo, el cual favorece la internalización de dichas nanopartículas en células.

8.4. Transfección

Debido a la carga negativa que presentan las moléculas de ADN, al igual que los compuestos catiónicos comerciales, se optó por elegir aquellas nanopartículas que estuvieran recubiertas con un polímero de carga positiva (como el PEI o la polidopamina). Estas cargas permiten la interacción del ADN con la partícula permitiendo la compactación y unión

mediante fuerzas electroestáticas, que posteriormente serán disueltas al entrar en la célula, bien por efectos osmóticos, cambios de pH, etc.

Las células crecieron en una placa de 12 pocillos hasta alcanzar el 80% de confluencia. En este momento se realizó la transfección. Para ello se añadieron en un eppendorf, 50 µg/mL de nanopartículas por cada 1µg de ADN en un volumen final de 100µL de medio DMEM sin suplementos ni antibióticos. La mezcla se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, en leve agitación evitando la precipitación de las partículas. Al cabo de ese tiempo el medio completo presente en la placa se retiró, se lavaron los pocillos con PBS y se añadió medio DMEM sin suplementos, posteriormente se añadieron los 100µL de la mezcla a repartir entre dos pocillos, de modo que cada uno llevara 50µL.

La eficacia de transfección se analizó mediante un análisis en microscopia de fluorescencia para la transfección con el gen testigo, para el vector citotóxico se evaluó la eficacia con un ensayo MTT con idénticas condiciones como en el apartado 1.7.1. Todos estos experimentos fueron realizados a una concentración aproximada de 2×10^5 células por pocillo, a una temperatura de 37°C en 5% CO₂ durante 24 horas antes del experimento.

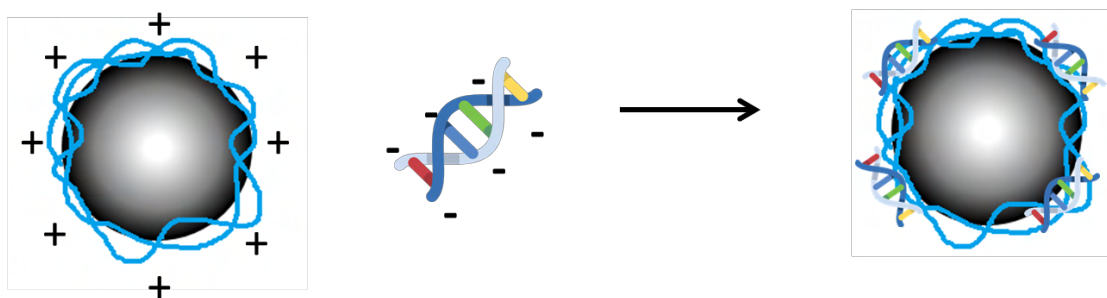


Figura M-6. Fundamento de las interacciones electrostáticas de una molécula de ADN con los polímeros que recubren las partículas magnéticas.

8.5. Magnetofección

Pudiendo aprovechar las propiedades magnéticas anteriormente descritas sobre las nanoestructuras magnéticas, se decidió realizar una transfección dirigida mediante fuerza magnética.

Para la transfección impulsada por el campo magnético atractivo, las células se sembraron en las mismas condiciones (2×10^5 células / pocillo en una placa de 12 pocillos a 37 ° C en 5% de CO₂ durante 24 h). El ADN plasmídico se diluyó en 50 µl de medio libre de suero y suplementos y 50 µg/mL de nanopartículas en otros 50 µl de medio sin suplementos. Las diluciones se mezclaron y se incubaron durante 30 minutos, con una leve agitación. Después de este tiempo, las células se inoculaban con la "mezcla de transfección" y se incubaron durante 15 minutos con la placa magnética, anteriormente descrita.

Al finalizar ese tiempo, las muestras se lavaron con PBS y se cambiaron con medio completo fresco. La eficacia de transfección se analizó mediante un análisis en microscopia óptica simple y de fluorescencia al cabo de 24-26 horas postransfección.

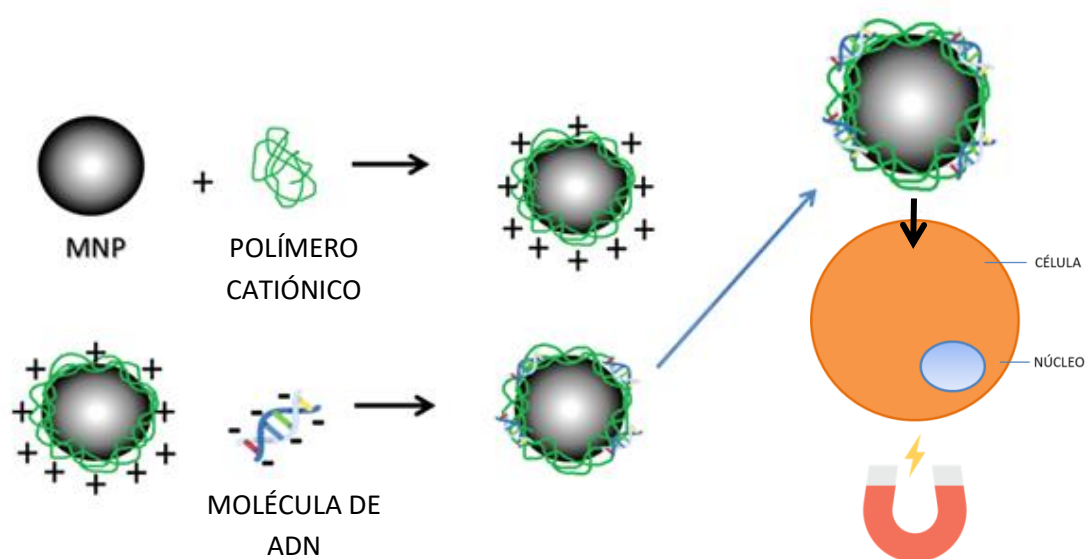


Figura M-7. Proceso de funcionalización de una partícula y unión a material genético, para su posterior captación en el interior de una célula (magnetofección).

8.6. Separación magnética

Otra aplicación surgida de las propiedades magnéticas es la manipulación de las propias células que contienen las nanopartículas. Tras realizar una captación o una transfección como en apartados anteriores, las células eran tripsinizadas como si de un pase celular se tratara. Una vez despegadas de la placa, las células eran trasladadas a un falcon de 15 mL o un eppendorf dependiendo de la cantidad y mediante el uso de un imán a una distancia fija las células podían ser “movidas” permitiendo diferenciar a la hora de volver a sembrar las células que contenían nanopartículas de las que no.

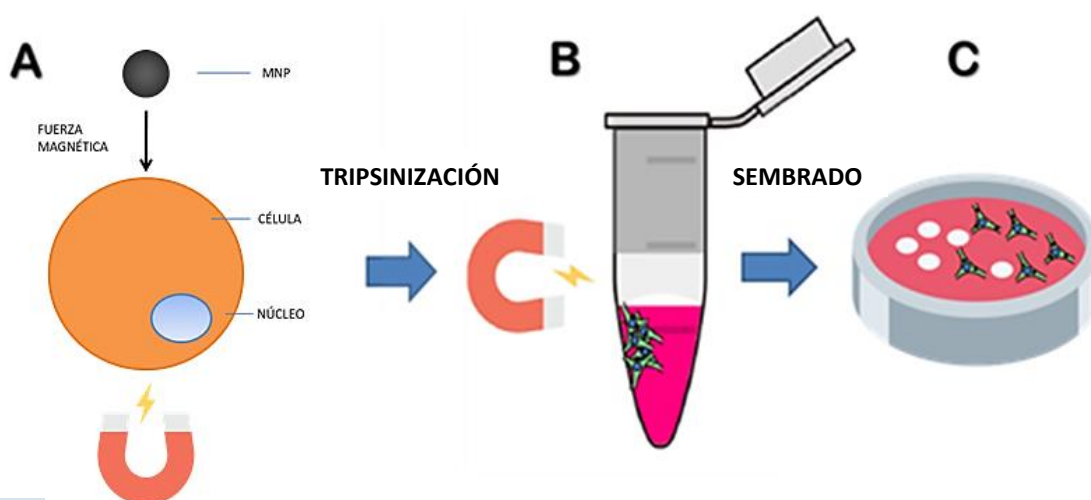


Figura M-8. Proceso de separación magnética, las células captan las partículas mediante fuerza magnética (A), posteriormente tras tripsinizarlas pueden manipularse utilizando un imán recogiendo solo las que poseen partículas en su interior (B) para volver a sembrarse (C).

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para comprobar que los datos de las variables cuantitativas estudiadas se distribuían de manera normal se procedió a su estudio mediante los test de Kolgomorov-Smirnov y Shapiro-Wilk.

De existir normalidad, los resultados fueron analizados mediante el test de T de Student para 2 muestras independientes en el caso de querer comparar dos medias, y test de ANOVA para k muestras en el caso de comparar más de 2. En caso de encontrar diferencias significativas en el test ANOVA, los datos fueron comparados mediante comparaciones múltiples (post hoc).

En ausencia de normalidad se realizaron los test de U de Mann Whitney o Kruskal Wallis, dependiendo de las muestras comparadas.

En todos los casos, los resultados fueron considerados significativos cuando la probabilidad era menor de 0,05 ($p < 0,05$)* y muy significativos cuando era menor de 0,01 ($p < 0,01$)**. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism Versión 5.0.

Resultados

RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DEL PROMOTOR E2F

1.1. Expresión en células tumorales

Para evaluar la expresión y/o actividad del promotor E2F en células tumorales se procedió a realizar transfecciones con un plásmido subrogado a este promotor en cual se contenía un gen testigo GFP (proteína verde fluorescente) para las distintas líneas celulares (A549, HeLa y U87). De producirse la expresión del plásmido este sintetizaría la proteína fluorescente, ofreciendo un aporte visual de la actividad de E2F, a partir de las 24 horas post-transfección.

El porcentaje de eficiencia se midió realizando un conteo manual en diferentes cuadrantes de todas las células en campo claro, y posteriormente un conteo con los filtros de fluorescencia de aquellas células que mostraban la proteína. El porcentaje que se calculó, era resultado de la proporción de células totales sobre las transfectadas (media de los cuadrantes).

Se pudo observar que un alto porcentaje de las células mostraban una expresión de la proteína GFP (verde) al ser observadas a microscopio fluorescente, siendo este porcentaje cercano al 70% (**Figura R-1**). Atendiendo a los diferentes tipos celulares se puso de manifiesto que en aquellas células de forma estrellada (A549 y HeLa) poseían una intensidad superior a U87 (células provenientes de glioma). Asimismo estas células provenientes de carcinomas como son HeLa y A549 (células epiteliales) mostraban una tasa de transfección más alta la cual rondaba entre un 10-15% más.

Como medida adicional y como comprobante de la intensidad y capacidad de expresión (eficiencia) se realizaron mismos experimentos con otro plásmido inespecífico (con un promotor de CMV) codificando otra proteína fluorescente de color rojo (mCherry). Al inspeccionar los niveles de expresión de esta transfección, se pudo apreciar una gran similitud en cuanto a eficiencia, comparando los resultados con el plásmido condicionado a E2F-GFP (**Figura R-2**).

En base a estos resultados pudimos concluir que en todas las líneas tumorales se produjo una respuesta positiva, esto es, una óptima expresión si se comparan el nivel de expresión de E2F-GFP con CMV-mCherry (**Figura R-2**).

Se pudo establecer que las líneas celulares HeLa y A549 (carcinomas) eran más susceptibles a las transfecciones que otro tipo celular. Esto en parte puede ser explicado por el origen celular, las células epiteliales son más propensas a incorporar material a su interior celular que otras líneas, al ser la capa más externa de cualquier tejido, una de sus funciones

básica es asimilar o captar sustancias externas para el transporte hacia la cara más interna de los tejidos.

Atendiendo a la tasa de crecimiento también a favor de A549 y HeLa, sus ciclos vitales poseían una duración menor a U87 (16 horas para HeLa, entre 16-22 horas A549, y 24-48 para U87), se dedujo que la concentración de E2F era más alta y por tanto su promotor se encontraba más activo

En resumen, en nuestro modelo experimental la expresión del plásmido en las distintas líneas tumorales dependía en gran medida de su origen y sobre todo de la expresión del factor E2F, a mayor concentración, mayor serán los niveles del producto expresado, en este caso el gen testigo de GFP (mayor nivel de producto expresado se traducía como intensidad verde más fuerte).

1.2. Expresión en células sanas

Para verificar que la expresión del promotor E2F se trataba de algo específico de células tumorales, y que en base a ello nuestro plásmido también lo era, se realizaron los mismos experimentos de transfección con el plásmido condicionado a E2F-GFP en células sanas, que se corresponden con la línea celular BJ fibroblast.

Los fibroblastos fueron transfectados con idénticas condiciones a las células tumorales para evitar resultados dispares. Dado que la tasa de división de esta línea era distinta a células tumorales, se decidió alargar el tiempo de visualizado a 48 horas post-transfección, permitiendo que estas pudieran dividirse y así facilitar la entrada del plásmido al interior del núcleo y expresar su producto. Durante el proceso de división celular en el momento de la prometáfase, la membrana nuclear se desintegra lo que permite la entrada de material exógeno de forma más eficiente y que este pueda ser leído y expresado por la maquinaria de polimerasas.

No obstante a pesar de aumentar el tiempo de visualizado, no hubo señal por parte del vector (**Figura R-3**). Se analizaron exhaustivamente los pocillos para poder localizar la mínima expresión pero los resultados fueron negativos.

Para descartar un error en la transfección o en la inoperancia de las mismas células para expresar material extraño, se decidió realizar otra transfección utilizando un plásmido con promotor inespecífico (CMV) que codificaba la proteína mCherry (roja). En este caso se pudo ver una visualización de células que expresaban un color rojo intenso, aunque en número muy reducido, fue posible localizar células con dicha expresión (**Figura R-4**).

A diferencia de las líneas tumorales, la línea BJ (fibroblastos) no mostró alguna respuesta de expresión del plásmido E2F-GFP. No se pudo comprobar que en fibroblastos la actividad del promotor E2F fuera significativa. En cuanto a eficiencia, no pudo ser posible el cálculo debido a la inexistente presencia de proteína fluorescente. Comparando estos datos con los del plásmido que codificaba mCherry, tampoco fue posible concluir o corroborar que el plásmido se hallara activo para esta línea celular con un margen de error aceptable.

2.1. Producción de proteínas totales

A través de la prueba del ácido bicinonínico que mide la cantidad de proteínas en células, lo que se pretendía era comprobar que tanto nuestro vector citotóxico interrumpía el proceso de síntesis proteica. Esta interrupción provocaría como consecuencia muerte celular, por lo que medir la disminución en la cantidad de proteínas, se mostraba como buen indicador de que el plásmido ejecutaba su función. Para ello lo más simple y lógico era hacer una evaluación cuantitativa de la concentración de proteínas totales de las células. Tal y como se describe en el apartado de MATERIAL Y METODOS, se procedió a realizar una curva patrón, para posteriormente mediante un lisado, interpolar los resultados con la ecuación de la recta y de esta forma comprobar la concentración de proteínas totales.

Para las mediciones comparativas de BCA, se siguió siempre el mismo procedimiento: un grupo control el cual no se vería afectado por ningún agente de transfección, un segundo grupo en el cual se utilizaría el plásmido condicionado con el gen testigo, (a modo de vector inocuo) y un tercer grupo el cual contendría el vector citotóxico.

La razón de incluir dos grupos con plásmidos residía en ofrecer un resultado más robusto y fiel a la realidad. En muchos protocolos se establece la inclusión de un grupo con el agente de transfección vacío, pero realmente esto no refleja la realidad de lo que supone un proceso de terapia génica (introducción de material genético y producción de proteínas exógenas). Por lo que a la hora de comparar efectos citotóxicos es necesario ver la comparación con un grupo intacto y otro que sufre un mismo proceso de inoculación de material genético externo, que produce en menor medida un ligero efecto de toxicidad (por la naturaleza del procedimiento, la transfección es muy agresiva para las células).

Una vez realizado el cálculo de la recta patrón y su ecuación, las mediciones de las absorbancias, de los lisados celulares, se extrapolaron para los 3 grupos de todas las líneas tumorales.

Para las células HeLa en el grupo control la concentración proteica daba un valor de 2,67 mg/mL $\pm$ 0,13, para el plásmido inocuo 2,49 mg/mL $\pm$ 0,12 y para el plásmido citotóxico 1,94 mg/mL $\pm$ 0,13 (**Figura R-5**). Realizando un test ANOVA para muestras independientes no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el plásmido inocuo. Sin embargo comparando los datos con el tercer grupo (plásmido toxico) si se pudo establecer una diferencia significativa ($p < 0,05$). Lo que en términos porcentuales se traducía como una disminución de producción de proteínas totales del 27% comparado con el grupo control, y del 22% comparado con el otro plásmido.

En cuanto a la línea células A549 los resultados fueron bastantes similares a HeLa, las concentraciones proteicas fueron 2,62 mg/mL $\pm$ 0,10 para el grupo control 2,49 mg/mL $\pm$ 0,11 para el plásmido inocuo y 2,11 mg/mL $\pm$ 0,13 para el tóxico. El test estadístico (ANOVA) mostró una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los grupos control y el grupo del plásmido toxico (**Figura R-6**). En términos porcentuales la producción proteica disminuía para el plásmido citotóxico un 21% respecto al control y un 15% respecto al otro plásmido.

Para U87 los resultados fueron de: una concentración de 2,08 mg/mL $\pm$ 0,11 para el grupo control, 2,05 mg/mL $\pm$ 0,11 para el plásmido con GFP, y 1,67 mg/mL $\pm$ 0,10 para el plásmido toxico (**Figura R-7**). El test de ANOVA mostró nuevamente una diferencia

significativa de los dos primeros grupos con el tercero ($p < 0,05$). En términos porcentuales la disminución del grupo toxico frente al control era del 20% y frente al otro plásmido del 19%.

Se pudo poner de manifiesto que para todas las líneas celulares tumorales el plásmido citotóxico reducía significativamente la producción de proteínas totales. Con una disminución comprendida entre el 20-27% respecto al control (sin inocular). Esto implica que la concentración medida en la placa se correspondía también con una menor cantidad de células vivas.

La disminución de concentración proteica, por parte del plásmido E2F-GFP fue atribuida a la toxicidad asociada al proceso de transfección, la cual se comprendía entre valores del 1-5%.

2.2. Supervivencia en células tumorales

2.2.1. Ensayo de viabilidad celular con MTT

Para examinar el efecto antitumoral que ejercía el vector citotóxico en las líneas celulares establecidas, realizamos el ensayo de viabilidad celular con el compuesto MTT.

Con la prueba del MTT, se mide la actividad mitocondrial de las células vivas. Este compuesto reacciona en el interior de las células cambiando de una coloración amarilla a otra violeta (cristales) mediante un proceso de óxido-reducción (redox), según el estado de la célula. Aquellas que sufran muerte celular no podrán reaccionar con el compuesto y no se producirá la coloración característica, por lo que a menos intensidad en la coloración menor cantidad de células.

Para todos los experimentos se siguieron las mismas pautas. Se realizaron las mediciones de absorbancia con un grupo control sin tratar, un segundo grupo control con el plásmido inocuo (E2F-GFP) para comparar que tanto afecta el proceso de transfección en la viabilidad y un último grupo con el vector toxico. También se realizaron mediciones en las que no había presente células, como control negativo, proporcionando los datos necesarios para normalizar (descartar la absorbancia de las mismas placas y eliminar ruido de fondo) los valores de viabilidad.

Tras las mediciones del ensayo se establecieron los valores de viabilidad en porcentajes, con datos normalizados utilizando la fórmula: % viabilidad = $(\text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ muestra} - \text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ control negativo}) / (\text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ control positivo} - \text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ control negativo}) \times 100$.

El grupo control al no ser tratado se asumió como el valor máximo en viabilidad (100%). De igual modo el grupo negativo se asumía como el valor mínimo (0%).

Para las células **HeLa**, los porcentajes de viabilidad fueron un $92 \% \pm 5$ para el plásmido E2F-GFP (inocuo) y un $77 \% \pm 3,9$ para el plásmido citotóxico (**Figura R-8**). Se realizó un test ANOVA comparando el grupo control (100%) con los otros dos. Las diferencias entre el control y el plásmido E2F-GFP no se mostraron significativas, la magnitud de efecto no era lo suficientemente grande como para asegurar una diferencia clara. Entre el control y el plásmido toxico si pudo observarse una diferencia significativa ($p < 0.05$). Asimismo la comparación entre ambos plásmidos demostraba una reducción obvia, en términos de viabilidad, por parte del citotóxico. Atendiendo a valores porcentuales las reducciones eran de

un 8% para el plásmido inocuo y un 33% del citotóxico frente al control. Descartando la disminución de la supervivencia de las células por parte del proceso de transfección se podía ver una disminución del 25% (reducción entre los dos plásmidos).

Como medida secundaria en **HeLa**, dada la buena tolerabilidad que ofrecía el grupo del plásmido inocuo, se optó por subir la concentración de material genético de 1µg/mL a 1,5µg/mL. Los resultados fueron para el plásmido E2F-GFP una viabilidad del 78% ± 3,5 y para el plásmido citotóxico del 44% ± 2,8 (**Figura R-9**). Nuevamente se realizó un ANOVA entre todos los grupos, mostrando ahora diferencias significativas entre todos ellos ($p < 0,05$ entre control y E2F-GFP, E2F-GFP y tóxico; $p < 0.01$ entre control y plásmido tóxico). Al observar estos datos y saber que, a mayor carga de agentes de transfección y material genético la viabilidad se vería resentida, solo se tuvo en cuenta la disminución entre plásmidos (se optó por realizar test de dos muestras independientes). Descartando el proceso de transfección, la disminución en cuanto a supervivencia se situaba en un 34% por parte del vector citotóxico.

Para **A549** los resultados mostraron patrones similares a HeLa. Los valores de viabilidad fueron 90% ± 5 para el plásmido inocuo y 71% ± 4 para el plásmido citotóxico (**Figura R-10**). El test estadístico mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) al igual que en HeLa, entre el grupo control y el plásmido tóxico. En términos porcentuales el plásmido E2F-GFP mostraba una reducción del 10% frente al control y para el citotóxico de un 29%. Suprimiendo el efecto de toxicidad asociada al proceso de transfección el porcentaje de disminución de la supervivencia daba un valor del 19%.

Volvimos a repetir la medida adicional en **A549** (subir la concentración del plásmido de 1µg/mL a 1,5µg/mL) para confirmar que el resultado con HeLa no era mero azar. Se pudo observar una disminución drástica de los dos grupos tratados, siendo el del plásmido tóxico el más pronunciado. El plásmido inocuo mostraba una viabilidad del 53% ± 5 frente al control y el vector tóxico de un 7% ± 0,5 (**Figura R-11**). Debido a la discordancia con el grupo sin inocular, se decidió analizar los datos directamente con un análisis de dos muestras independientes. Las diferencias entre estos dos grupos resultó ser muy significativa ($p < 0.01$). En valores porcentuales se había observado una disminución del 47% para el plásmido E2F-GFP y del 93% para el citotóxico. Para este caso en particular relativizando (eliminando) la toxicidad asociada del proceso de transfección pudo ofrecernos datos más aproximados del efecto del plásmido citotóxico, siendo el valor de esta de un 46%.

En cuanto a **U87** los resultados obtenidos no distaban mucho de los de HeLa y A549. Las viabilidades fueron para el grupo del plásmido inocuo del 100% ± 6 y del 70% ± 7 para el plásmido citotóxico (**Figura R-12**). El test estadístico solo mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo control y el citotóxico. Los valores porcentuales mostraron una disminución del 30%. Como aquí la transfección no afectó a la viabilidad no fue necesaria la reducción entre plásmidos.

Para la medida adicional en **U87** (subir la concentración del plásmido de 1µg/mL a 1,5µg/mL) los resultados fueron para el plásmido inocuo del 92% ± 4,8 y para el plásmido citotóxico 57% ± 5 (**Figura R-13**). El test estadístico mostró una diferencia muy significativa ($p < 0.01$) entre ambos plásmidos. En valores porcentuales se podía observar una disminución

del 8% para el plásmido E2F-GFP y del 43% para el vector citotóxico. Eliminando el efecto de toxicidad asociada al proceso de transfección la disminución se situaba en un 35%.

De todos estos datos pudo confirmarse que el plásmido toxico poseía un efecto antitumoral, reduciendo considerablemente el porcentaje de viabilidad. Comparando con los controles sin tratar se reducía la viabilidad en un 29-33% dependiendo de la línea celular. Eliminando la toxicidad base de la transfección, la reducción quedaría entre un 19% y 25%.

Por otro lado se descubrió que el plásmido citotóxico poseía un efecto dosis-dependiente, de modo que a mayor concentración más efecto producía (mayor disminución en la viabilidad celular). Las disminuciones en cuanto a la viabilidad podían aumentar hasta un 46%, siendo el valor mínimo de un 34%.

A parte de las toxicidades, también pudimos ver que al igual que en experimentos de actividad del promotor E2F, la actividad del plásmido citotóxico dependía en gran medida de la línea celular a estudiar. Las más susceptibles a expresar el plásmido fueron nuevamente las líneas provenientes de carcinomas, que en este caso se traducían como un aumento en las toxicidades.

2.2.2. Ensayo de viabilidad celular con Trypan blue

El ensayo con trypan blue se basaba en la tinción de las células muertas de forma contraria al ensayo con MTT (tinción de células vivas). Las células viables no absorben colorantes impermeables, sin embargo las células muertas son permeables y absorben estos colorantes.

De acuerdo con el protocolo de la técnica era necesario, después del proceso de transfección, recoger las células a estudiar, centrifugarlas, teñirlas y analizarlas en la cámara de Neubauer. Este proceso resultó ser demasiado agresivo y no fue posible el análisis “ordinario”. Tuvo que idearse otro enfoque para poder detectar que células se hallaban muertas y en qué proporción, aprovechando al máximo el principio de la técnica. Como alternativa se pensó que tras las transfecciones en el momento de visualización de expresión del plásmido (24-48hr), podría hacerse la tinción in situ de los pocillos para poder observarse bajo un microscopio de campo claro. Justo al realizar los lavabos para renovar el medio, se disolvía en el PBS un par de gotas de la solución de trypan blue y se dejaba incubar 5 minutos la mezcla en contacto con las células transfectadas. Del mismo modo se hacía el mismo procedimiento con un control, para verificar la diferencia. Tras ese tiempo se eliminaba la mezcla con sumo cuidado y se volvía a añadir PBS para poder visualizar la muestra (no se añadía medio completo dado que el rojo fenol interfería en la interpretación del resultado).

Se compararon dos grupos en esta ocasión, uno control el cual poseía el plásmido inocuo y el otro plásmido citotóxico. Se realizó esta comparativa para descartar la toxicidad base de las transfecciones. En todas las líneas tumorales (HeLa, A549 y U87) se pudo vislumbrar una clara diferencia a simple vista, en la cantidad de células que permanecían vivas. No obstante se procedió a comparar el número (proporción) de cuantas células permanecían vivas con las que se hallaban teñidas (**Figura R-14**).

Las células que estaban muertas (en estado de apoptosis) se mostraban con una morfología redonda, flotando en la placa o precipitadas en el fondo. Al permitir el paso del colorante trypan blue, se podían visualizar en color azul. Las células vivas seguían manteniendo su integridad estructural por lo que se mantenían pegadas al fondo de la placa y se mostraban sin coloración. Dado que las células muertas pierden su morfología carecen de las uniones extracelulares que las mantienen unidas a las placas, esto explica la ausencia de muchas de ellas tras realizar los lavados.

En los pocillos considerados control (con el plásmido inocuo) se podía apreciar una mayor concentración de células, mientras que en los tratados con el vector citotóxico la cantidad de células se veía reducida de forma considerable. En el grupo control se vio que la cantidad de células apoptóticas mostraba una proporción baja, existían más células sin teñir y en mayor número que las otras. En el grupo a estudiar (plásmido toxico) puedo observarse muy poca concentración de células vivas y un alto número de células apoptóticas.

Con estos resultados pudimos concluir que el plásmido citotóxico ejercía un efecto antitumoral bien por la presencia de más células en estado de apoptosis o por la ausencia de población celular en los pocillos.

3. EXPRESIÓN DEL VECTOR CITOTÓXICO EN CÉLULAS SANAS

3.1. Producción de proteínas totales

Del mismo modo que para las líneas tumorales, para los fibroblastos se repitieron los mismos experimentos con la prueba del BCA, para averiguar si la síntesis proteica se veía comprometida tras la inoculación del plásmido citotóxico. Se repitieron los ensayos con tres grupos (control, vector inocuo y vector toxico) por motivos evidentes. Los resultados obtenidos se extrapolaron con la (ecuación) curva patrón obtenida en un principio.

Los valores de las concentraciones proteicas fueron $2,67 \text{ mg/mL} \pm 0,13$ para el grupo control, $2,62 \text{ mg/mL}$ ($n=3; \pm 0,11$) para el plásmido control, y $2,63 \text{ mg/mL} \pm 0,11$ para el plásmido toxico (**Figura R-15**). En términos porcentuales la producción proteica disminuía para el plásmido citotóxico un 1,5% respecto al control y aumentaba un 0,4% respecto al otro plásmido. El test estadístico no manifestaba diferencias significativas entre los tres grupos. La magnitud del efecto se mostraba como inexistente.

En esta ocasión, a la luz de los resultados, en todos los grupos no se pudo establecer una diferencia significativa en las medias obtenidas. Con lo que se pudo concluir que el plásmido citotóxico no afectaba a la síntesis proteica de fibroblastos, por tanto no se expresaba en células no tumorales.

Como aclaración entre los grupos control y el plásmido E2F-GFP, se esperaba mayor concentración en el segundo (se sintetiza GFP, una proteína exógena), pero dada la demostrada inoperancia del mismo para expresar sus productos las concentraciones se mantienen en niveles basales.

3.2. Ensayo de viabilidad celular con MTT

A la vista de los resultados con las líneas tumorales, se decidió repetir el ensayo de viabilidad con MTT para los fibroblastos, con la finalidad de averiguar qué efecto producía el plásmido citotóxico en células no tumorales. Se establecieron 3 grupos (control, plásmido inocuo y plásmido toxico). La única salvedad con respecto a experimentos previos, fueron los tiempos de incubación. Dado que los fibroblastos crecían a diferente velocidad que las células tumorales, el ensayo con MTT se realizaba a partir de las 48hr post-transfección, pudiéndose extender hasta 60. La razón de esto era proporcionar el tiempo necesario al plásmido para que pudiera expresarse durante el periodo de división celular, que en el caso de los fibroblastos era más lento que en líneas tumorales. Con esto se aseguraba que, de no existir diferencias no se deberían a la imposibilidad de llegar al núcleo (recordemos que para que el material genético penetre en el núcleo, la membrana nuclear debe permitir la entrada, evento que solo ocurre durante la división).

Realizados los ensayos al cabo de ese tiempo los datos fueron recogidos y expresados en porcentajes (datos normalizados) utilizando la fórmula: $\% \text{ viabilidad} = (\text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ muestra} - \text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ control negativo}) / (\text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ control positivo} - \text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ control negativo}) \times 100$.

Los porcentajes daban como resultado para el grupo control un $100\% \pm 6$, para el plásmido inocuo un $96\% \pm 6,9$ y para el plásmido toxico un $94\% \pm 7$ (**Figura R-16**). Tras la comparación con análisis estadístico no se pudo confirmar que la magnitud del efecto (diferencia) fuera significativamente relevante. Atendiendo a valores porcentuales las reducciones eran de un 4% para el plásmido inocuo y un 6% del citotóxico frente al control. Descartando la disminución de la supervivencia de las células por parte del proceso de transfección se podía ver una disminución del 2% (reducción entre los dos plásmidos).

Tras observar estos datos, las reducciones en cuanto a viabilidad se consideraban dentro de las desviaciones estándar por lo que no se pudo establecer una diferencia entre todos los grupos. El plásmido citotóxico no disminuía la viabilidad de células sanas con lo que el efecto de toxicidad a primera vista parecía ser específico de células tumorales.

Para esta ocasión no se realizó secundariamente un experimento con un aumento concentración de $1\mu\text{g/mL}$ a $1,5\mu\text{g/mL}$ pues no era necesario. Lo único que se vería sería un aumento de la toxicidad asociada al agente de transfección, por lo que se decidió no realizar dicha prueba.

3.3. Ensayo de viabilidad celular con Trypan blue

Se procedió a repetir el ensayo con la técnica colorimétrica en fibroblastos, realizando los mismos pasos y protocolo “adaptado” que para líneas tumorales. Recordemos que los estándares de la técnica implican que, después de realizar un ensayo (de transfección en este caso), las células debían ser centrifugadas y analizadas en una cámara de Neubauer añadiendo el colorante para su posterior conteo. Debido a la experiencia previa de alta toxicidad y de la gran tasa de error que podía producirse de evaluar en la estimación de células apoptóticas se decidió por emplear el protocolo modificado (realizar la tinción después de los lavados con PBS tras los periodos de incubación del plásmido a las 48-60hr). Se pretendía obtener un

análisis más visual y cualitativo que cuantitativo, pues para eso contábamos con la prueba de MTT.

Se compararon dos grupos (control con plásmido inocuo y plásmido toxico). El motivo de esta comparación era ver la diferencia más aproximada entre mismos procesos pero con diferente agente terapéutico, siendo realmente efectivo uno, y descartar el efecto de la transfección misma.

El primer resultado que se pudo visualizar fue la mejor manipulación de fibroblastos. Mientras las células tumorales daban más problemas a la hora de lavados, tinción y visualización, los fibroblastos se mostraban más estables en placa, en parte debido a la incapacidad del plásmido de generar una respuesta. Estas células no tumorales se presentaban en mayor número que las tumorales, además de contar con la morfología intacta. Por otra parte la cantidad de células entre ambos grupos no parecía verse reducida. Atendiendo a la coloración de células apoptóticas tampoco podía observarse un aumento en el grupo del plásmido citotóxico (**Figura R-17**). En cuanto a la proporción (células apoptóticas/células vivas) no se observaron diferencias entre ambos grupos.

Pudimos concluir que los fibroblastos se presentaban como una línea celular más estable que las líneas tumorales. El proceso de transfección no afectaba tanto a células sanas como a las tumorales. El efecto del plásmido citotóxico era inexistente, por lo que en células sanas no se producía una apoptosis tan acusada como en tumorales.

4. EVALUACIÓN DE SISTEMAS BASADOS EN NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Se han descrito 3 metodologías diferentes para demostrar que existe un efecto citotóxico selectivo por parte de un plásmido subrogado a E2F, con un alto grado de eficacia.

Queda de manifiesto de una manera estadística, en cuestión de interrupción de biosíntesis y viabilidad que existen diferencias significativas entre las células tumorales y las no tumorales cuando son tratadas con el plásmido citotóxico condicionado al promotor E2F.

No obstante todos estos resultados han sido obtenidos con agentes de transfección comerciales, los cuales son polímeros que compactan el material genético para introducirlo en células. Estos polímeros no pueden usarse en humanos dado que son incapaces de penetrar en las células en un sistema vivo y por su alta toxicidad en el cuerpo humano. Para posteriores experimentos in vivo o en ensayos clínicos la idea más óptima era trasladar esta tecnología a sistemas de liberación basados en nanopartículas.

4.1. Tolerabilidad en células tumorales: captación y viabilidad

Para evaluar los procesos de expresión, liberación de material genético y transfección en general se decidió por elegir una batería de nanopartículas inorgánicas. Este conjunto de nanopartículas serían seleccionadas basándonos en su tolerabilidad, caracterizada por el nivel de viabilidad y captación de las células. Aquellas cuyos parámetros fueran los más óptimos se incluirían para realizar los experimentos de transfección.

En primer lugar se decidió por realizar un ensayo de viabilidad para determinar hasta qué punto las células eran capaces de soportar las nanopartículas. El ensayo que se eligió dada la

sensibilidad de este y la rapidez que suponía fue el ensayo con MTT que mide la actividad mitocondrial de las células vivas. Recordemos que este compuesto reacciona en el interior de las células cambiando de una coloración amarilla a otra violeta (cristales) mediante un proceso de óxido-reducción (redox), según el estado de la célula. Aquellas que sufran muerte celular no podrán reaccionar con el compuesto y no se producirá la coloración característica, por lo que a menos intensidad en la coloración menor cantidad de células.

Los valores de viabilidad se expresaron en porcentajes, con datos normalizados utilizando la fórmula: $\% \text{ viabilidad} = (\text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ muestra} - \text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ control negativo}) / (\text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ control positivo} - \text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ control negativo}) \times 100$.

Este primer ensayo fue realizado con células HeLa, al tratarse de células muy versátiles y de alta sensibilidad las usamos como un modelo para las otras líneas celulares (si recordamos en experimentos anteriores los patrones de comportamientos eran muy similares entre todas las líneas tumorales). Las nanoestructuras magnéticas a estudiar fueron nanopartículas con un núcleo de magnetita, recubiertas con sílice. Dado que todas las partículas a probar poseían la misma estructura (diferiendo solo una en la naturaleza del núcleo) quisimos averiguar cómo se comportaban estos materiales en las células.

En el ensayo se dispuso en una placa de 96 pocillos 8 columnas con concentraciones crecientes 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400 $\mu\text{g/mL}$. Con un control el cual se asumía como el 100% y otro control negativo el cual suponía el 0%.

Para la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ las células presentaron una media de $68\% \pm 5$ de viabilidad, para 25 $\mu\text{g/mL}$ la viabilidad fue del $69\% \pm 4,8$, a 50 $\mu\text{g/mL} \pm 5$ la viabilidad disminuía hasta el $54\% \pm 5,4$, en 100 $\mu\text{g/mL}$ subía hasta el 57%, para las concentraciones de 150, 200 y 300 $\mu\text{g/mL}$ esta se mantendría cerca del $50\% \pm 2$ y en 400 $\mu\text{g/mL}$ caería hasta el $27\% \pm 0,67$ (**Figura R-18**).

Paralelamente al ensayo de viabilidad se comprobaba la capacidad de captación (internalización) de las nanopartículas por parte de las células mediante un examen óptico en un microscopio de campo claro. Las nanopartículas no se notaban perceptibles a bajas concentraciones, no obstante a partir de 100 $\mu\text{g/mL}$ se podían visualizar en el interior de las células, como pequeños puntos negros, más oscuros que las vesículas intracelulares (las cuales eran muy brillantes). A medida que se incrementaba la concentración, la saturación tanto de las células como de la placa aumentaba conforme el número de partículas.

Con el fin de usar valores más reales para la asociación con material genético, se decidió repetir más experimentos de viabilidad con otras nanopartículas acotando las concentraciones a 30, 60 y 100 $\mu\text{g/mL}$. La naturaleza de las partículas seguía siendo la misma (núcleo de magnetita, a excepción de un grupo el cual contenía carburo de hierro) pero cambiando la superficie de contacto (cubierta de sílica), la cual se vería asociada a un polímero de naturaleza catiónica como eran la polidopamina y PEI.

Para las nanopartículas de magnetita y sílica (desnuda) la viabilidad se situaba al $72\% \pm 4,3$ para la concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$, a 60 $\mu\text{g/mL}$ la viabilidad disminuía ligeramente hasta el $58\% \pm 3$ y a 100 $\mu\text{g/mL}$ volvía a subir hasta $74\% \pm 3,7$ (**Figura R-19**). La captación mostraba como las partículas penetraban en las células y se hallaban incluidas en el citoplasma de las mismas, sin afectar a la morfología.

En cuanto a las nanopartículas de magnetita y silica asociada con polidopamina los datos resultaron mejores comparados con las nanopartículas sin polímeros, con un incremento de la viabilidad en todas las concentraciones. A 30 $\mu\text{g/mL}$ la viabilidad era del $89\% \pm 4$, a 60 $\mu\text{g/mL}$ alcanzaba el $100\% \pm 4,5$ y a 100 $\mu\text{g/mL}$ del $97\% \pm 3,9$ (**Figura R-19**). Aquí la captación seguía mismos patrones que las nanopartículas sin polidopamina.

Las nanopartículas de magnetita y silica con el otro polímero asociado (PEI) mostraron unos niveles más bajos en cuanto a viabilidad de $68\% \pm 4,4$, $54\% \pm 5,1$ y $48\% \pm 5$ a 30, 60 y 100 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (**Figura R-19**). Cabe recordar que este polímero es ligeramente tóxico. La captación se veía saturada, este polímero mostraba tendencia a agregar las partículas y por tanto a generar cúmulos.

Por último se analizaron los datos de las partículas de carburo de hierro y silica. Los resultados de las viabilidades para estas fueron de $100\% \pm 5$, $78\% \pm 5,2$ y $67\% \pm 4,2$ para 30, 60 y 100 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura R-19**). La captación aquí se mostraba como en forma de redes negras, envolviendo las células o penetrando en ellas, sin afectar a la morfología de las mismas.

Recapitulando el análisis de la tolerabilidad se pudo apreciar que a medida que se aumentaba la concentración la viabilidad se ve reducida ligeramente, destacando dos saltos, uno a 50 $\mu\text{g/mL}$ y otro a 400 $\mu\text{g/mL}$, en los cuales descendía de una forma más pronunciada. Las células toleraban de forma óptima las nanopartículas inorgánicas. Los datos sugerían que entre 50 y 300 se alcanzaban los niveles óptimos para realizar experimentos. Atendiendo a la viabilidad de las diferentes nanopartículas, destacaron las que poseían un polímero asociado de polidopamina, y las que contaban con un núcleo de carburo de hierro. Estos dos grupos mostraban unos rangos de viabilidad excelentes, seguidos de las nanopartículas de magnetita.

Haciendo énfasis en la captación se pudo observar que todas las nanopartículas basadas en un núcleo de magnetita, eran internalizadas en el interior de las células quedándose en el citoplasma. Las nanopartículas de magnetita con polidopamina y las no asociadas a polímeros mostraban un comportamiento muy similar, se internalizaban con gran eficiencia y no afectaban a la morfología. En cuanto a las nanopartículas con el polímero PEI, se producía el mismo fenómeno, pero estas se mostraban más propensas a agregarse, formando cúmulos los cuales no eran capaces de ser fagocitados (el tamaño del agregado superaba a veces el de la célula) razón por la cual podría ser el motivo de su toxicidad más elevada. Por último, como dato curioso, se observó que las nanopartículas de carburo de hierro formaban una especie de red que envolvía a las células, en algunos casos al internalizarse lo hacían esta vez como en casos anteriores (en forma de puntos). A pesar de esta curiosa forma de agregarse, la integridad de las células no se veía comprometida ni su viabilidad.

En base a todos los ensayos realizados los resultados obtenidos por HeLa mostraron una alta tolerabilidad (biocompatibilidad, viabilidad) e internalización (captación) de las nanopartículas.

4.2. Captación clásica vs captación magnética

Los procesos de captación se muestran como una internalización de nanopartículas por parte de las células. Del mismo modo que con un agente de transfección comercial estos

procesos necesitan de un periodo de incubación de duración considerable. Dadas las propiedades magnéticas de las nanopartículas con las que hemos trabajado, sacando provecho de las mismas, se propuso utilizar esto a nuestro favor y favorecer la captación mediante fuerza magnética.

Quisimos comparar que tanto favorecía el uso de esta captación dirigida frente a una clásica, con sus periodos de incubación.

Los experimentos realizados con ambos tipos de captación se realizaron en nuevamente en HeLa (nos servía como modelo para las demás líneas celulares). De lo que se trataba era averiguar qué tan factible era el proceso de captación magnética frente al proceso clásico (pasivo). Una vez perfeccionada la técnica solo se utilizaría esta para todos los demás experimentos derivados de la captación magnética. Como anotación, la línea celular A549 fue excluida de estos experimentos, en vista de la gran similitud y comportamientos que compartía con HeLa.

Los experimentos de captación se realizaron con partículas con recubrimientos poliméricos de carga positiva (en el caso de PEI Y Polidopamina) como consecuencia de los buenos resultados obtenidos tanto en captación como viabilidad así como su recubrimiento, el cual posibilitaba la compactación y unión del plásmido mediante fuerzas electrostáticas. También probamos las partículas de carburo de hierro como elección alternativa, por si las otras dos opciones no resultaban satisfactorias. Asimismo se estableció para todas las células una concentración fija de 100 $\mu\text{g/mL}$ dada la alta permisibilidad mostradas por HeLa.

En la primera serie de experimentos con HeLa de captación pasiva o clásica con las nanopartículas con magnetita y PEI, la placa se mostraba colmada de partículas y pequeños agregados. La situación mejoraba ligeramente para las nanopartículas con polidopamina, no se observaban agregados de gran tamaño y la placa se mostraba un poco menos cargada. Para las partículas de carburos de hierro las células estaban rodeadas de fibras negras con apenas agregados. A pesar de realizar lavados con PBS, tras los periodos de incubación, la mayoría de partículas permanecían adheridas al fondo. Para esta clase de experimentos los tiempos de incubación se alargaban hasta las 4 horas. Cabe mencionar que durante las incubaciones las muestras se hallaban en medio sin suplementos (el motivo de esto residía en los futuros procesos de transfección donde la suplementación interfiere con la inoculación de material genético, por este motivo durante fases previas era necesario observar el comportamiento de las células y las partículas en estos medios).

Mientras que en los experimentos con incubaciones de carácter pasivo el periodo de incubación rondaba como mínimo las 4 horas, los de captación inducida por fuerza magnética se reducían de manera considerable. Partimos de una incubación estándar de 4 horas y pudimos recortarla hasta los 10 minutos (el tiempo más adecuado se situaba en torno a los 15) para ello primeramente comparamos el tiempo de incubación de 4 horas paralelamente a los 15 minutos y como medida adicional a los 10-12 minutos. Observamos que tras la incubación de 10 minutos al realizar los lavados la mayoría de nanopartículas desaparecían de la placa lo que indicaba que el proceso no se encontraba en su punto óptimo. Decidimos que el mejor tiempo para captación inducida era de 15 minutos.

En estos procesos inducidos por un campo magnético aplicado, se pudo observar una mejor delimitación de la morfología celular, así como una concentración menor de nanopartículas desperdigadas por el fondo de la placa. Para el caso de las nanopartículas funcionalizadas con PEI se observaba la disminución en la formación de agregados. En el caso de las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con PDA solo se observaba una disminución en la cantidad de nanopartículas en la base de la placa. Y en cuanto al último grupo de carburos de hierro se vio que las formaciones en red desaparecían y se conformaban como algo mas definido alrededor de las células. La densidad de las nanopartículas en el interior de las células, mostraba ser casi idéntica a los procesos pasivos (**Figuras R-20**). Por otra parte como consecuencia del poco tiempo de incubación, apenas fue necesario el uso de medio sin suplementación, o de usarse el contacto era mínimo. Todo esto supone una disminución en cuanto a toxicidad para las células, recordemos que el uso de medios sin suplemento favorece la aparición de microorganismos y eso puede condicionar la contaminación de las muestras.

No obstante la concentración de nanopartículas se percibía demasiado saturada en la placa (ver **figura R-20**), formando gran número agregados, con lo que para las demás líneas celulares se decidió por usar una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ (a excepción del grupo de polidopamina, pues se distribuían de forma más uniforme y menos agregada por la placa). Disminuyendo la concentración a unos rangos más aceptables se evitaría una posible interferencia en siguientes pruebas.

Para la línea celular U87, las nanopartículas con magnetita y PEI mostraban una distribución muy precisa y delimitada (**Figura 21-A**). No había apenas agregados y las partículas se agrupaban en el citoplasma, cercanas al núcleo. Las partículas de magnetita y polidopamina mostraban un patrón de agrupación alrededor del núcleo con pocos agregados con una distribución regular en todas las células (**Figura 21-B**). Por ultimo las partículas de carburo de hierro mostraban un comportamiento idéntico a las anteriormente mencionadas (**Figura 21-C**).

En cuanto a la línea celular BJ (fibroblastos) las nanopartículas con magnetita y PEI mostraron una distribución delimitada en las células extendiéndose por todo el citoplasma de la célula, se percibían algunos agregados (**Figura 22-A**). Para los otros dos grupos de magnetita y polidopamina (**Figura 22-B**), y carburos de hierro (**Figura 22-C**) la distribución era idéntica, extendidas por todo el citoplasma.

En base a todo esto vimos que esta técnica de captación magnética resultaba enormemente eficiente, pues se había conseguido mejorar, los tiempos de incubación y uso de productos disminuyendo tanto el tiempo como cantidad de los mismos. También pudimos concluir que reduciendo la concentración de nanopartículas con PEI o carburos de hierro de 100 $\mu\text{g/mL}$ a 50 $\mu\text{g/mL}$ evitábamos la formación de agregados, manteniendo la concentración de las partículas en el interior celular óptima.

4.3. Separación magnética

De igual modo que en algunas técnicas se utilizan las nanopartículas unidas a anticuerpos para separar proteínas específicas en una muestra, o mismo para separar células con un

ligando específico, aquí lo que se planteó fue realizar una separación de células en lo que se refiere a la captación. Esto se materializaría en una supuesta mejora a la hora de realizar transfecciones, manipulación específica de células, enriquecimiento celular, liberación de fármacos...

Los experimentos se realizaron primeramente con células HeLa para ver la factibilidad de la técnica. La finalidad era mejorar la manipulación de células a la hora de realizar los experimentos de viabilidad y/o transfección. El hecho de utilizar HeLa se basaba en su capacidad para producir una respuesta sensible. Tanto las otras líneas tumorales como las no tumorales presentaban más estabilidad, por lo que teniendo un resultado óptimo por parte de unas células más “delicadas” podría pasarse a su utilización directa con las demás.

Se compararon los tres grupos candidatos de nanopartículas ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$ y $\text{Fe}_5\text{C}_2@\text{SiO}_2$). Para todas las partículas las células eran capaces de separarse mediante la acción de un imán evitando la pérdida de las mismas. Al volver a sembrarlas en las placas mediante la acción nuevamente de un imán colocado en la base se favorecía a su vez la adhesión de las mismas, con un impacto nocivo mínimo (**Figura R-23**).

Esta técnica suponía un recorte más en los tiempos necesarios entre los experimentos dado que los periodos de anclaje a la placa dependiendo de la línea solían tardar entre 3 y 4 horas. Asimismo se comprobó que con esta manipulación se evitaba el uso de centrifugación y por tanto un menor estrés celular. Nos dimos cuenta de que estos procesos serían de especial utilidad tanto para el enriquecimiento celular, selección específica y en la transición entre transfecciones y ensayos de viabilidad.

4.4. Transfección y Magnetofección

A la vista de los resultados obtenidos en la captación magnética (una mejora con respecto a la captación clásica pasiva), se propuso otro experimento comparativo entre una transfección normal usando nanopartículas y una transfección dirigida por fuerza magnética o magnetofección.

Para estos experimentos nuevamente se volvió a usar HeLa como modelo de prueba. En esta ocasión como se desconocía el comportamiento del agente de transfección (nanopartículas) se optó por utilizar primeramente un plásmido comercial inespecífico con una proteína fluorescente de color rojo a una concentración de partículas de 100 $\mu\text{g/mL}$ (magnetita y polidopamina), 50 $\mu\text{g/mL}$ (para demás partículas) y una concentración de material genético de 1 $\mu\text{g/mL}$.

Las nanopartículas utilizadas en primer lugar fueron las de magnetita y silica funcionalizadas con polidopamina. Los resultados fueron comparados con un control el cual llevaba un agente de transfección comercial. Se pudo observar que se las partículas ejercían su labor y transportaban el material genético al interior de las células. La capacidad de transfección obviamente no era tan alta como cabía esperar pero se podía vislumbrar una considerable eficiencia. El grupo perteneciente a la magnetofección presentó mejores resultados que por transfección simple (**Figura R-24**). A partir de aquí todos los experimentos se realizaron utilizando esta técnica dada la mejora que suponía con las anteriores.

Posteriormente se realizaron nuevas magnetofecciones utilizando el plásmido condicionado a E2F con el gen testigo, y las partículas de polidopamina. En un primer momento los resultados parecían ser extremadamente eficientes, puesto que se podía observar casi la totalidad de las células coloreadas. La polidopamina de hecho poseía también su propia emisión en el espectro fluorescente dado que se podía excitar y emitir a una longitud de onda determinada. Analizando esto más en detalle se llegó a la conclusión de lo que se observaba en el microscopio era el solapamiento de ambas señales pues tanto el plásmido como la polidopamina compartían cierto rango de emisión (500nm por parte de la polidopamina y 510 de la GFP). Por lo que las partículas con polidopamina fueron descartadas debido al enmascaramiento de los resultados (**Figura R-25**).

Como segunda opción se pasó a utilizar las nanopartículas con núcleo de magnetita, cubierta de silica y funcionalizadas con el polímero PEI. Se realizaron los mismos experimentos con el plásmido de proteína fluorescente roja, pero esta vez solo se realizó una comparación de la transfección con el producto comercial y el proceso de magnetofección. Comparando también los resultados con los obtenidos con las partículas con polidopamina, se observó que la eficiencia había disminuido ligeramente pero aun así se conservaba cierta expresión del plásmido (**Figura R-26**). A la luz de estos resultados se decidió usar estas nanopartículas para el resto de experimentos.

4.5. Expresión promotor E2F en células tumorales

Para evaluar la expresión y/o actividad del promotor E2F en células tumorales se procedió a realizar transfecciones con el plásmido subrogado a este promotor en cual se contenía un gen testigo GFP (proteína verde fluorescente) para las distintas líneas celulares (A549, HeLa y U87). Las transfecciones en este caso serían dirigidas por fuerza magnética (magnetofección) y el agente de transfección las nanopartículas magnéticas. De producirse la expresión del plásmido este sintetizaría la proteína fluorescente, ofreciendo un aporte visual de la actividad de E2F del mismo modo que con el agente comercial (24 horas post-transfección).

El porcentaje de eficiencia se midió realizando un conteo manual en diferentes cuadrantes de todas las células en campo claro, y posteriormente un conteo con los filtros de fluorescencia de aquellas células que mostraban la proteína. El porcentaje que se calculó, era resultado de la proporción de células totales sobre las transfectadas (media de los cuadrantes).

Se pudo observar que un alto porcentaje de las células mostraban una expresión de la proteína GFP (verde) al ser observadas a microscopio fluorescente, siendo este porcentaje mayor al 90% (**Figura R-25**).

Debido al enmascaramiento de los espectros de emisión de la polidopamina y la proteína verde fluorescente, observados en HeLa, no se pudo dar por válido tanto la señal como la eficiencia con este tipo de partículas. De acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos de captación magnética, de entre las 3 posibilidades disponibles (magnetita-polidopamina, magnetita-PEI, carburos de hierro) se decidió por usar aquellas partículas ya funcionalizadas con el polímero PEI (considerando que poseían un polímero catiónico que

facilitaría la unión con el plásmido). Se procedió a usar estas partículas con el plásmido subrogado a E2F y GFP a 50 $\mu\text{g/mL}$ (concentración nanopartículas) frente a 1 $\mu\text{g/mL}$ (concentración de plásmido).

Los resultados obtenidos con la línea celular HeLa mostraban una expresión poco intensa de la proteína GFP, así como un número reducido de células mostrando fluorescencia. No se pudo analizar la eficiencia debido a la señal tan débil del plásmido. A pesar de ello se extendieron los experimentos para A549 y U87.

Se pudo observar que para las demás líneas celulares existía una expresión; al igual que en HeLa, reducida del plásmido. La intensidad de la señal se encontraba muy debilitada y apenas podía distinguirse las células del ruido de fondo (**Figura R-27**). En esta ocasión no se pudo comprobar que las células provenientes de carcinomas (HeLa, A549) fueran más susceptibles a la transfección (magnetofección), que las demás (U87). Comparando este resultado con el obtenido con el agente de transfección, (Figura R-1) la eficacia y eficiencia de la inoculación se vieron mermadas de forma considerable.

De todo esto pudimos deducir que dada la especificidad de la expresión del plásmido, sumado a la complejidad del sistema de liberación con nanopartículas, nos dio como resultado una expresión poco intensa. Con los agentes comerciales el proceso de expresión se reducía simplemente a un escape de la vía endosomal y liberación del material genético con el polímero de transfección. En este caso el proceso se mostraba más intrincado. No obstante se consideró como una prueba positiva (existía actividad) en la que se seguía observando la expresión del promotor para las líneas tumorales.

4.6. Expresión promotor E2F en células sanas

Para verificar que la expresión del promotor E2F se trataba de algo específico de células tumorales, y también nuestro plásmido, se realizaron los mismos experimentos de transfección con el plásmido condicionado a E2F-GFP en células sanas (fibroblastos). Del mismo modo que en células tumorales, se emplearon en fibroblastos las técnica de magnetofección y las nanopartículas magnéticas (magnetita-PEI).

Para los fibroblastos se utilizaron las mismas condiciones en los procesos de magnetofección, que para líneas tumorales siendo la concentración de partículas (magnetita-PEI) de 50 $\mu\text{g/mL}$ y la de ADN de 1 $\mu\text{g/mL}$. Teniendo en cuenta que la tasa de división de esta línea era distinta a células tumorales, al igual que con el agente comercial los tiempos de observación de alargaron entre 48hr y 60hr para permitir la entrada y/o liberación del material genético del polímero de la nanopartícula.

Al cabo de esas horas no fue posible visualizar la expresión GFP. Como comprobante de que las partículas se habían internalizado se realizó también una observación en campo claro, viendo como estas se hallaban en el citoplasma (**Figura R-28**). En cuanto a eficiencia, no pudo ser posible el cálculo debido a la inexistente presencia de proteína fluorescente.

A diferencia de las líneas tumorales, la línea BJ (fibroblastos) no mostró alguna respuesta de expresión del plásmido E2F-GFP. No se pudo comprobar que en fibroblastos la actividad del promotor E2F fuera significativa. Del mismo modo que en células tumorales a parte de la comprobada falta de actividad del promotor E2F, el intrincado mecanismo para la liberación

del vector y su expresión, dificultaba en gran medida la actividad del mismo. Lo que nos demostraba la alta complejidad del sistema plásmido-nanopartículas.

4.7. Expresión del vector citotóxico en células tumorales

Para examinar el efecto antitumoral que ejercía el vector citotóxico, junto al sistema de nanopartículas (magnetita-PEI) en las líneas tumorales establecidas, realizamos el ensayo de viabilidad celular con el compuesto MTT.

Con la prueba del MTT, se mide la actividad mitocondrial de las células vivas. Este compuesto reacciona en el interior de las células cambiando de una coloración amarilla a otra violeta (cristales) mediante un proceso de óxido-reducción (redox), según el estado de la célula. Aquellas que sufran muerte celular no podrán reaccionar con el compuesto y no se producirá la coloración característica, por lo que a menos intensidad en la coloración menor cantidad de células. El efecto del plásmido toxico se midió realizando los ensayos de viabilidad celular, tras 24-36 horas después la realización de la magnetofección.

Para todos los experimentos se siguieron las mismas pautas. Se realizaron las mediciones de absorbancia con un grupo control el cual estaría tratado con nanopartículas solas, un segundo grupo control con el plásmido inocuo (E2F-GFP) y las nanopartículas y un último grupo con el vector toxico y las nanopartículas. La razón de incluir en el grupo control las nanopartículas residía en suprimir la toxicidad asociada a la presencia de las mismas y analizar de forma más precisa la actividad del vector citotóxico (recordemos que la expresión E2F-GFP era muy débil con lo que se podía prever una disminución en la eficacia de su versión toxica, eliminando la variable de las partículas el mínimo cambio sería perceptible).

También ante la poca expresión del promotor E2F demostrada con los sistemas de partículas y la evidencia de la eficacia dosis-dependiente del plásmido citotóxico con productos comerciales, se decidió subir la concentración del mismo. Por tanto las concentraciones de las nanopartículas se mantuvieron (50 µg/mL) y en el caso de la concentración de plásmido se aumentó de 1 µg/mL a 1,5 µg/mL. De esta forma queríamos maximizar el resultado y comprobar la alta tolerabilidad de las partículas frente a otros agentes, permitiendo aumentar el principio activo lo máximo posible.

Igualmente se realizaron mediciones en las que no habían células, como control negativo, proporcionando los datos necesarios para normalizar (descartar la absorbancia de las mismas placas y eliminar ruido de fondo) los valores de viabilidad. El grupo control se asumió como el valor máximo en viabilidad (100%). De igual modo el grupo negativo se asumía como el valor mínimo (0%).

Tras las mediciones del ensayo se establecieron los valores de viabilidad en porcentajes, con datos normalizados utilizando la fórmula: % viabilidad = $(\text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ muestra} - \text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ control negativo}) / (\text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ control positivo} - \text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ control negativo}) \times 100$.

Los resultados para la línea células HeLa proporcionaron los siguientes datos: se obtuvo un $90\% \pm 6$ de viabilidad en el grupo de nanopartículas y plásmido E2F-GFP, y un $94\% \pm 5$ de viabilidad en el grupo del plásmido citotóxico (**Figura R 29-A**). Realizando un test ANOVA para muestras independientes no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el plásmido inocuo. Asimismo comparando los datos con el tercer grupo

(plásmido toxico) tampoco se pudo establecer una diferencia significativa ($p>0,05$). Lo que en términos porcentuales se traducía como una disminución de la viabilidad del 6% comparado con el grupo control, y un aumento del 4% comparado con el otro plásmido. Estos datos diferían bastante de los que anteriormente fueron descritos con el agente comercial (**Figura R-8 y Figura R-10**) donde la reducción de viabilidad comprendía entre el 25-34%. Para este caso no se pudo realizar un análisis comparativo de reducción de viabilidad asociada a transfección puesto que los resultados obtenidos se situaban dentro de los márgenes de error típico o estándar.

Para A549 los resultados que se obtuvieron fueron, un $92\% \pm 5,9$ de viabilidad para el plásmido inocuo y un $94\% \pm 4,8$ para el plásmido toxico (**Figura R 29-B**). El test estadístico (ANOVA para muestras independientes) no mostró una diferencia significativa ($p>0,05$) entre el grupo control el plásmido inocuo y el citotóxico. Los valores porcentuales mostraron una disminución del 2% para el plásmido E2F-GFP y un 6% para el plásmido citotóxico, respecto del control. Estos datos al igual que para la línea celular HeLa mostraban disparidad con los anteriormente descritos con el agente comercial (Figura R-12 y Figura R-13) donde la reducción de viabilidad comprendía entre el 19-46%. De la misma forma y patrón que HeLa, en A549 los valores obtenidos se situaban en el rango de error típico por lo que no podíamos hablar de reducciones de viabilidad como tales. Por este motivo tampoco se pudo hacer un análisis comparativo de reducción de viabilidad asociada a transfección entre ambos plásmidos.

La última línea, U87, presentó como resultados, un $100\% \pm 6,8$ de viabilidad para el plásmido inocuo E2F-GFP y un $95\% \pm 4,5$ para el plásmido citotóxico (**Figura R 29-C**). El test estadístico ANOVA para muestras independientes no mostró diferencias entre el grupo control y el del plásmido inocuo. Asimismo tampoco encontró diferencias significativas entre el grupo del vector citotóxico y el control ($p>0,05$). Como tampoco las hubo entre ambos plásmidos. En valores porcentuales la disminución solo se presentaba en el grupo del plásmido citotóxico siendo esta de un 5%. Al igual que en los datos obtenidos con el producto comercial la viabilidad del plásmido inocuo no se vio afectada en absoluto. Sin embargo la disminución por parte del vector tóxico solo alcanzaba un 5% frente a un 30-35% del producto comercial. Los resultados fueron ligeramente mayores a las otras dos líneas, mostrando mismo patrón que en experimentos anteriores sobre la robustez de esta línea celular. En esta ocasión tampoco fue posible hacer un análisis comparativo de reducción de viabilidad asociada a transfección entre ambos plásmidos.

A la vista de estos resultados de viabilidad, se concluyó que no se producía un nivel de expresión suficientemente óptimo con el sistema de nanopartículas. Mientras que para el producto comercial se barajaban cifras de una disminución en torno a 29-33% (19-25% si eliminamos la toxicidad asociada a transfección), con el sistema de nanopartículas estas cifras disminuían a un 2-6% lo que en términos estadísticos no podían corroborar la efectividad del efecto antitumoral asociado a nuestro plásmido citotóxico.

4.8. Expresión del vector citotóxico en células sanas

A la vista de los resultados con las líneas tumorales, se decidió repetir el ensayo de viabilidad con MTT para los fibroblastos, con la finalidad de averiguar qué efecto producía el plásmido citotóxico en células no tumorales con el sistema de nanopartículas (magnetita-PEI).

Se establecieron 3 grupos (control, plásmido inocuo y plásmido toxico). El grupo control, al igual que en células tumorales fue tratado con nanopartículas solas, para suprimir la toxicidad asociada a la presencia de las mismas y analizar de forma más precisa la actividad del vector citotóxico. En cuanto a los demás grupos se realizaron de idéntica forma que en células tumorales (plásmido asociado a nanopartículas). Con salvedad respecto a experimentos previos, los tiempos de incubación fueron modificados. Dado que los fibroblastos crecían a diferente velocidad que las células tumorales, el ensayo con MTT se realizaba a partir de las 48hr post-transfección, pudiéndose extender hasta 60. La razón de esto era proporcionar el tiempo necesario al plásmido para que pudiera expresarse y disociarse del sistema polímero-nanopartícula durante el periodo de división celular, que en el caso de los fibroblastos era más lento que en líneas tumorales.

Ante la poca expresión del promotor E2F demostrada con los sistemas de partículas y la evidencia del efecto dosis-dependiente del plásmido citotóxico con productos comerciales, se decidió subir la concentración del mismo. Las concentraciones de las nanopartículas se mantuvieron (50 µg/mL) pero se aumentaron de 1 µg/mL a 1,5 µg/mL en el caso del plásmido. Maximizando así el resultado que se pudiera obtener y descartando efectos al azar.

Se establecieron los valores de viabilidad en porcentajes, con datos normalizados utilizando la fórmula: $\% \text{ viabilidad} = (\text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ muestra} - \text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ control negativo}) / (\text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ control positivo} - \text{Abs}_{570\text{nm}} \text{ control negativo}) \times 100$.

Los porcentajes daban como resultado para el plásmido inocuo un $96\% \pm 5,2$ y para el plásmido toxico un $96\% \pm 7,1$ (**Figura R-30**). Tras la comparación con análisis estadístico no se pudo confirmar que la magnitud del efecto (diferencia) fuera significativamente relevante. Atendiendo a valores porcentuales las reducciones eran de un 4% para el plásmido inocuo y un 4% del citotóxico frente al control. Para este caso no se pudo realizar un análisis comparativo de reducción de viabilidad asociada a transfección puesto que los resultados obtenidos eran idénticos.

Tras observar estos datos, las reducciones en cuanto a viabilidad tanto del proceso de transfección (4%) como del efecto citotóxico del plásmido (4%), se consideraban dentro de las desviaciones estándar por lo que no se pudo establecer una diferencia entre todos los grupos.

En base a todo esto se vio que las magnetofecciones no disminuían la viabilidad (estadísticamente hablando) y por otra parte el plásmido citotóxico tampoco ejercía su función.

Quedó demostrado así que el sistema de nanopartículas-polímero-plásmido se mostraba ineficaz en fibroblastos por lo que no se podía hablar de un efecto citotóxico claro. En cierto modo un resultado que cabía esperar dada la experiencia previa con el producto comercial que tampoco mostraba una eficacia notoria en este tipo de células.

5. IMÁGENES

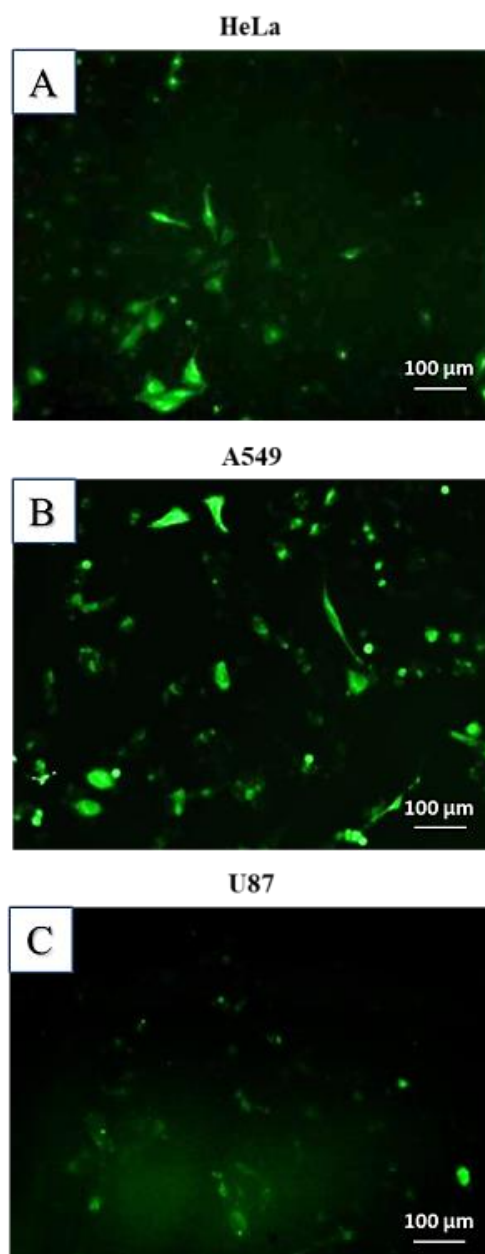


Figura R-1. Evaluación de la expresión del promotor E2F en las distintas líneas celulares. Aquí se muestra una fotografía representativa de cada población celular realizada con un aumento de 200X. Tanto en células HeLa (A) como en A549 (B) se puede visualizar una mayor intensidad de la proteína GFP (verde). En la línea U87 (C) esta intensidad se ve reducida así como el número de células totales que se encuentran expresando la proteína fluorescente. Lo que se deduce de esto es la gran respuesta por parte de células epiteliales, como son HeLa y A549, en cuanto a eficiencia de expresión de material genético exógeno. Se deduce que todas aquellas líneas que comparten características similares, serán más susceptibles al plásmido. Por otro lado las células que presenten una mayor actividad del promotor poseerán una mayor intensidad en la señal.

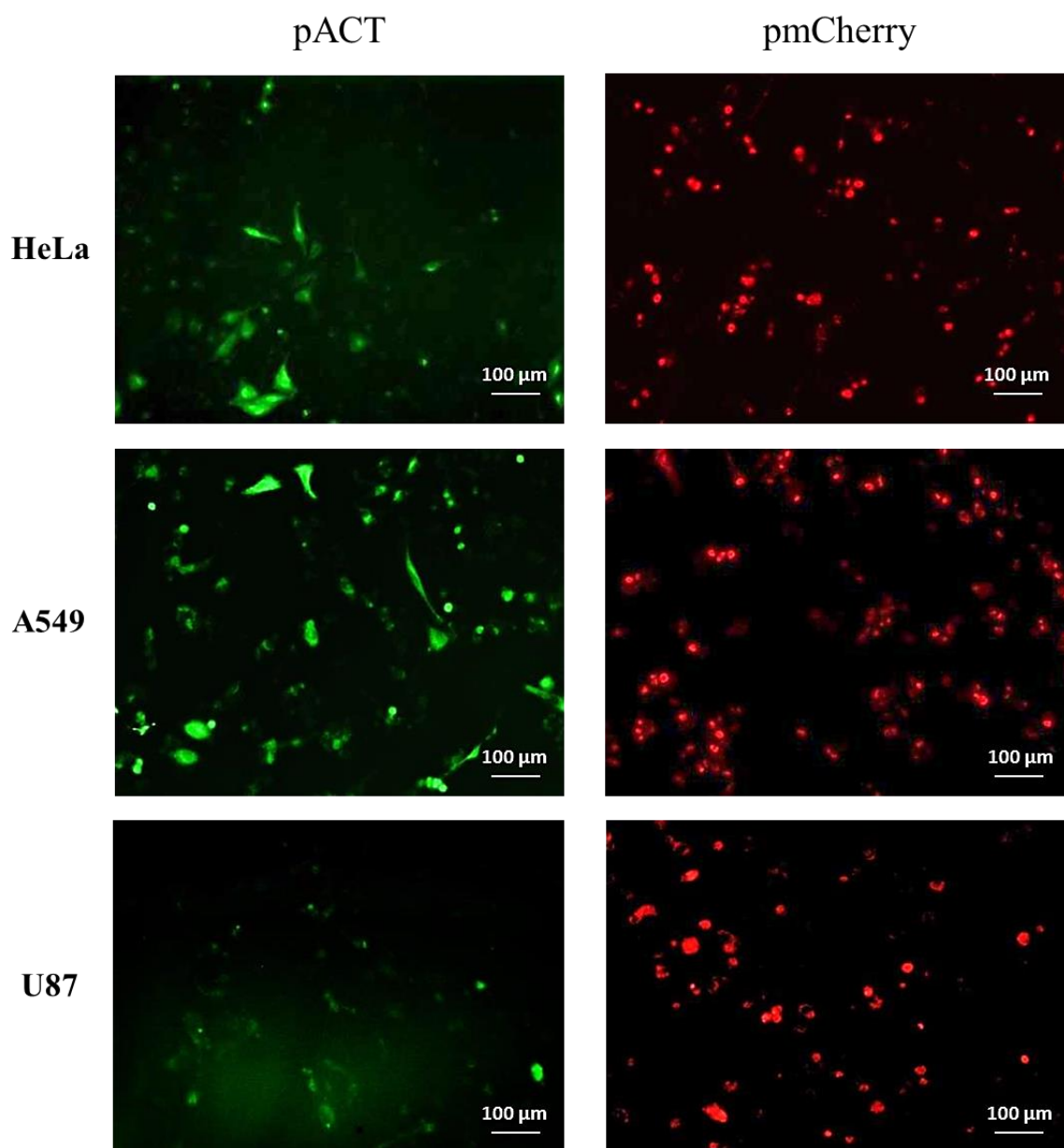


Figura R-2 Comparación entre los niveles de expresión de un plásmido subrogado y otro no específico. Mientras que en el grupo pACT (que se corresponde con el plásmido subrogado E2F y con proteína GFP) los niveles de expresión se mantienen altos, vemos que dependiendo de la línea la intensidad y el número cambian (véase U87 cuya imagen difiere de HeLa y A549). Observando el grupo de pmCherry todas las líneas presentan los mismos niveles de intensidad, pero con la diferencia otra vez de la línea U87 la cual muestra un número menor de células transfectadas. Con esto se refuerza la hipótesis de que las células epiteliales presentan unos resultados más eficientes que las demás líneas. Como anotación puede observarse que para todas las células transfectadas con el plásmido mCherry sufren un cambio morfológico, que se debe a la naturaleza propia del plásmido, que las vuelve más redondeadas. Fotografías realizadas con un aumento de 200X.

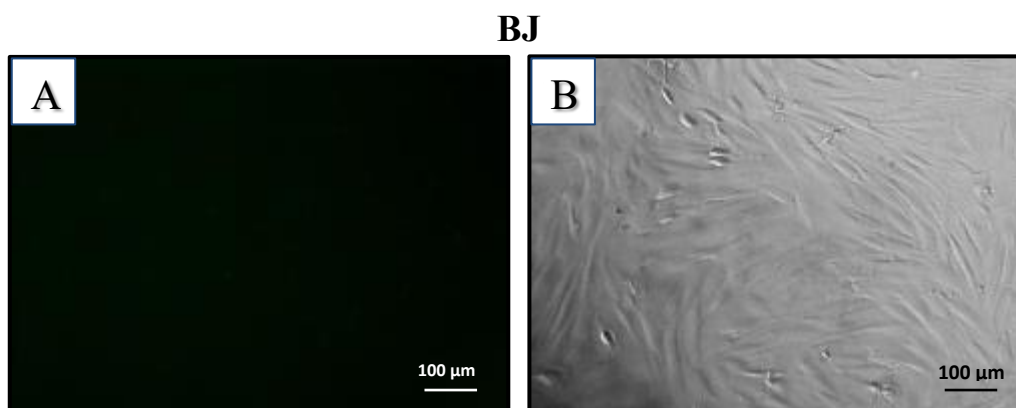


Figura R-3 Evaluación de la expresión del promotor E2F en la línea celular BJ fibroblast. En la fotografía se muestra como los fibroblastos bajo el espectro de emisión de la GFP (A) no exhiben respuesta alguna. Se puede observar también que en campo claro (B) las células mantienen su integridad estructural y morfológica, formando el típico patrón de monocapa. Cabe mencionar que ambas figuras corresponden a la misma fotografía cambiando solamente el filtro que permite la visualización en fluorescencia. Todo esto es realizado con un aumento de 200X.

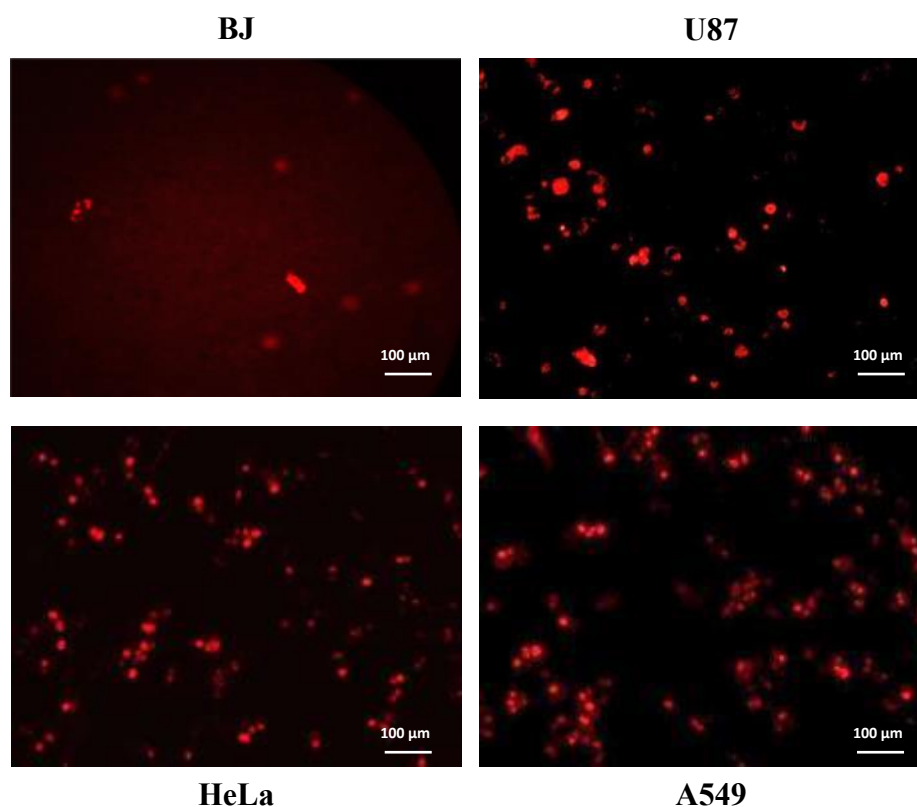


Figura R-4 Evaluación de la eficiencia de transfección de las distintas líneas celulares empleando un plásmido modelo. En la imagen se muestra una transfección realizada con un plásmido comercial cuya expresión no se encuentra condicionada por ningún promotor específico. En las imágenes se ven las diferentes líneas tumorales (HeLa, A549 Y U87) y no tumorales (BJ) expresando la proteína fluorescente roja. Se puede apreciar que para el grupo BJ solo ha sido posible encontrar un número reducido células expresándose. Esto se explica en gran parte por la reducida posibilidad de la entrada al núcleo. Las células no tumorales no se dividen con tanta rapidez y la membrana nuclear no se halla desdibujada lo que dificulta la entrada de material genético. Para las líneas tumorales esto no ocurre, pues su cometido es dividirse indefinidamente, lo que se traduce como una expresión génica y proteica constante. El aumento de la fotografía es de 200X.

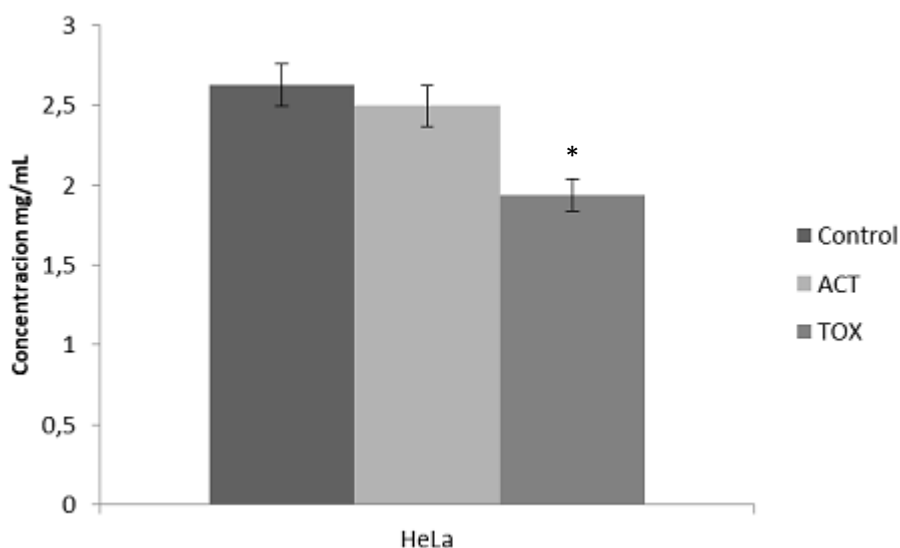


Figura R-5. Datos interpolados de la curva patrón de BCA con los obtenidos en los lisados celulares de ambos plásmidos en HeLa (el inocuo y el citotóxico). Se estableció como control un lisado celular el cual no se vio afectado por agentes de transfección y nos sirve de medida de cuanto la transfección afecta al nivel de concentración proteica (control), dada la agresividad del proceso. Se aprecia que entre los grupos control y ACT (plásmido inocuo) no se observa una diferencia significativa, aunque en este último disminuya sensiblemente la concentración de proteínas. Atendiendo al último grupo se puede ver que si hay una reducción clara en la concentración pudiendo establecer que el plásmido citotóxico hace su cometido, reduciendo la biosíntesis proteica. Se realizó un test ANOVA para k muestras independientes $*(p<0,05)$, $N=3$.

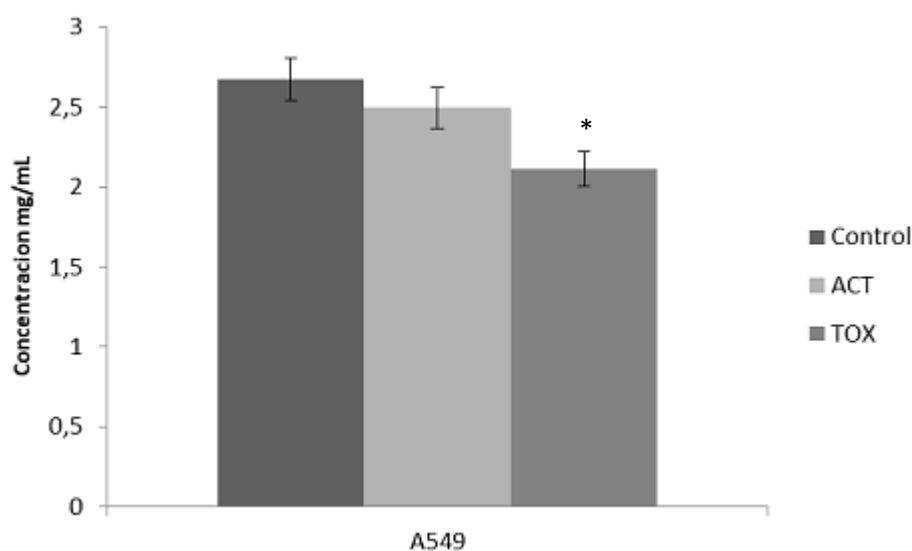


Figura R-6. Datos interpolados de la curva patrón de BCA con los obtenidos en los lisados celulares de ambos plásmidos en A549 (el inocuo y el citotóxico). Se aprecia que entre los grupos control y ACT (plásmido inocuo) no se observa una diferencia significativa, aunque en este último disminuya ligeramente la concentración de proteínas. Atendiendo al último grupo (TOX) se puede apreciar que si hay una reducción clara en la concentración pudiendo establecer que el plásmido citotóxico hace su cometido, reduciendo la biosíntesis proteica. Se realizó un test ANOVA para k muestras independientes $*(p<0,05)$, $N=3$.

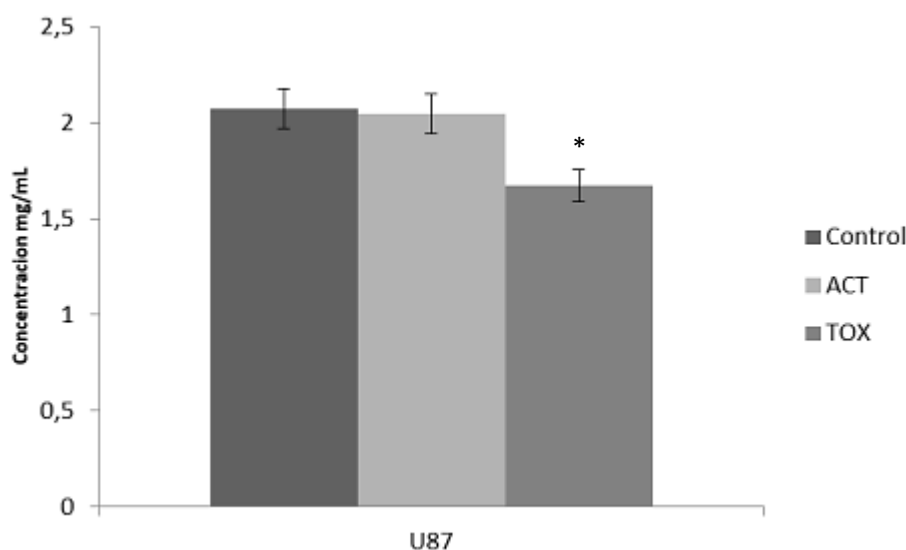


Figura R-7. Datos interpolados de la curva patrón de BCA con los obtenidos en los lisados celulares de ambos plásmidos en U87 (el inocuo y el citotóxico). Se observa que entre los grupos control (sin tratar) y ACT (plásmido inocuo) no existe una diferencia significativa, ambas barras se encuentran casi en el mismo valor, llegando a una diferencia centesimal. Atendiendo al último grupo (TOX) se puede apreciar que si existe una reducción clara en la concentración pudiendo establecer que el plásmido citotóxico hace su función, reduciendo la biosíntesis proteica. Se realizó un test ANOVA para k muestras independientes *($p < 0,05$), $N=3$.

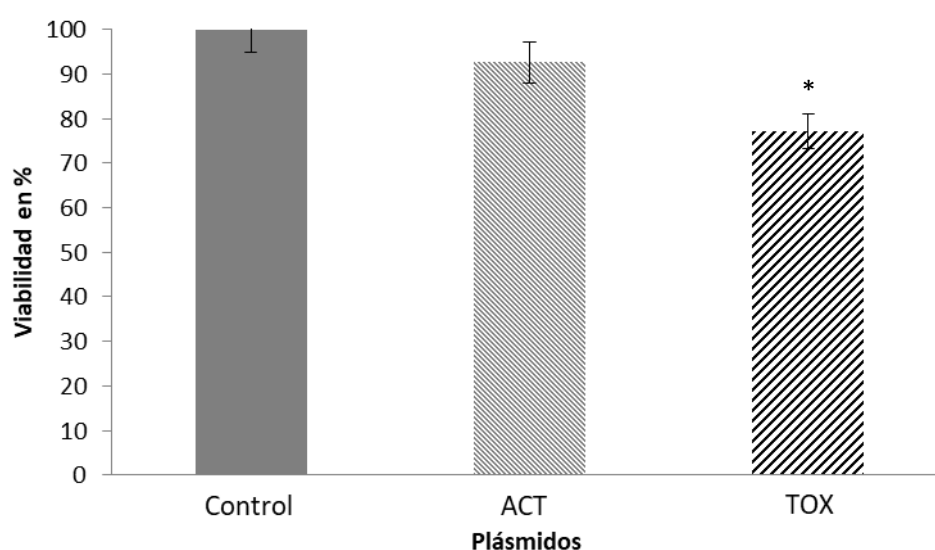


Figura R-8. Evaluación de la viabilidad celular (MTT) mostrada en porcentajes (datos normalizados) en células HeLa. En la gráfica se muestran los porcentajes de viabilidad comparados con una muestra control. En esta grafica se representan los valores de viabilidad con una concentración de plásmido de 1 $\mu\text{g/mL}$. En el grupo control no se ha administrado ningún tipo de terapia y se asume la viabilidad como el 100%. El grupo denominado ACT, las células han sido tratadas con un plásmido inocuo, el cual disminuye la viabilidad debido a la agresividad del proceso. El tercer grupo (TOX) muestra las células tratadas con el plásmido en cuestión. Entre el grupo control y el ACT no se observan diferencias significativas. No es el caso del tercer grupo (TOX) el cual exhibe un efecto citotóxico claro. Se comprueba de esta forma que el plásmido toxico ejerce un efecto antitumoral. En este caso se realizó un test ANOVA para k muestras independientes *($p < 0,05$), $N=3$.

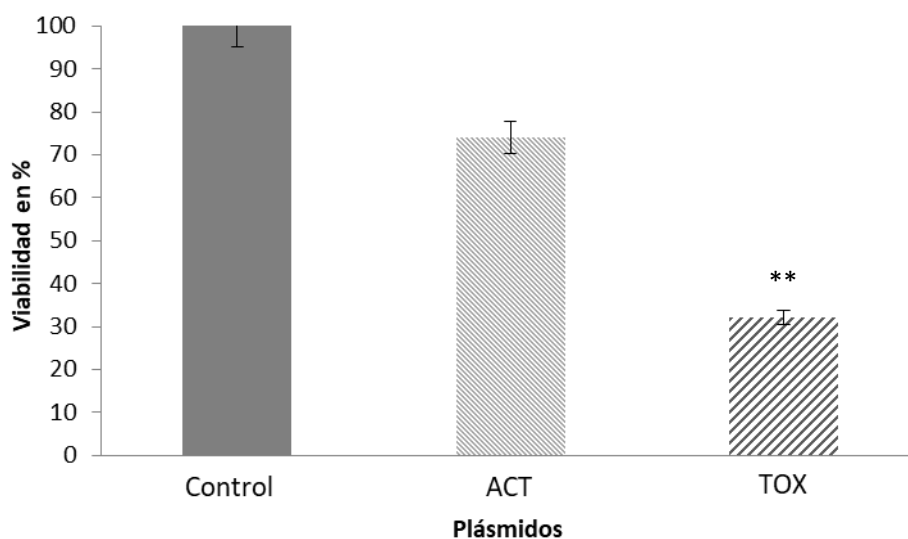


Figura R-9. Evaluación de la viabilidad celular (MTT) mostrada en porcentajes (datos normalizados) en células HeLa. En esta grafica se representan los valores de viabilidad con una concentración de plásmido de 1,5 $\mu\text{g/mL}$. Se observa una clara diferencia entre todos los grupos. Tanto en el control (sin tratar) como en los otros dos. La principal diferencia entre el control y el grupo del plásmido ACT (inocuo) es debida a la mayor presencia de agentes de transfección que disminuyen la viabilidad de por sí. El grupo TOX muestra un resultado extremadamente claro de toxicidad asociada a dosis. Para este análisis se decidió por realizar una prueba t de student para dos muestras independientes, entre ambos plásmidos, dado que ya existía una magnitud del efecto grande para demostrar diferencias significativas entre el grupo TOX y el control ******($p < 0,01$), $N=2$.

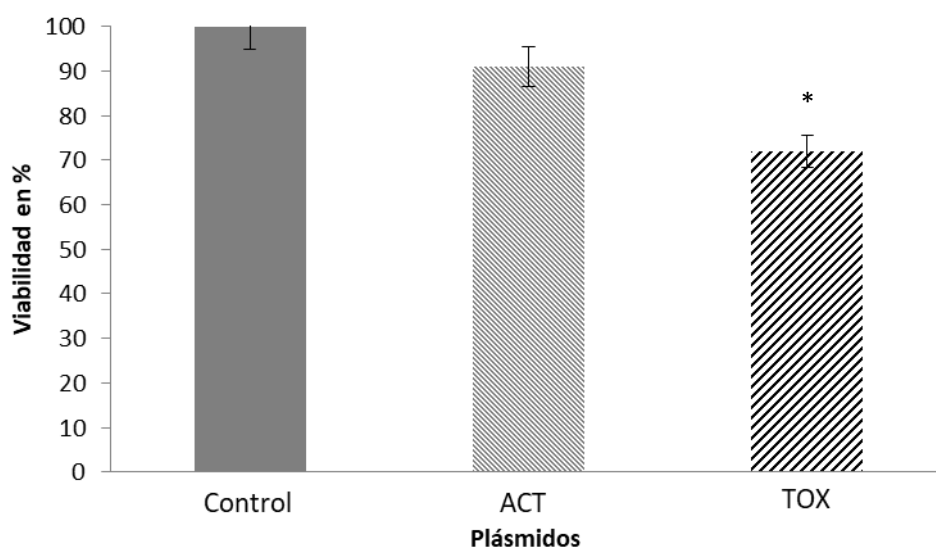


Figura R-10. Evaluación de la viabilidad celular mostrada en porcentajes (datos normalizados) en A549. En la gráfica se muestran los porcentajes de viabilidad comparados con una muestra control. En esta grafica se representan los valores de viabilidad con una concentración de plásmido de 1 $\mu\text{g/mL}$. En el grupo control no se ha administrado ningún tipo de terapia y se asume la viabilidad como el 100%. El grupo denominado ACT, las células han sido tratadas con un plásmido inocuo, el cual disminuye la viabilidad debido a la agresividad del proceso. El tercer grupo (TOX) muestra las células tratadas con el plásmido en cuestión. Entre el grupo control y el ACT no se observan diferencias significativas. No es el caso del tercer grupo (TOX) el cual exhibe un efecto citotóxico claro. Se comprueba de esta forma que el plásmido toxico ejerce un efecto antitumoral. En este caso se realizó un test ANOVA para k muestras independientes *****($p < 0,05$), $N=3$.

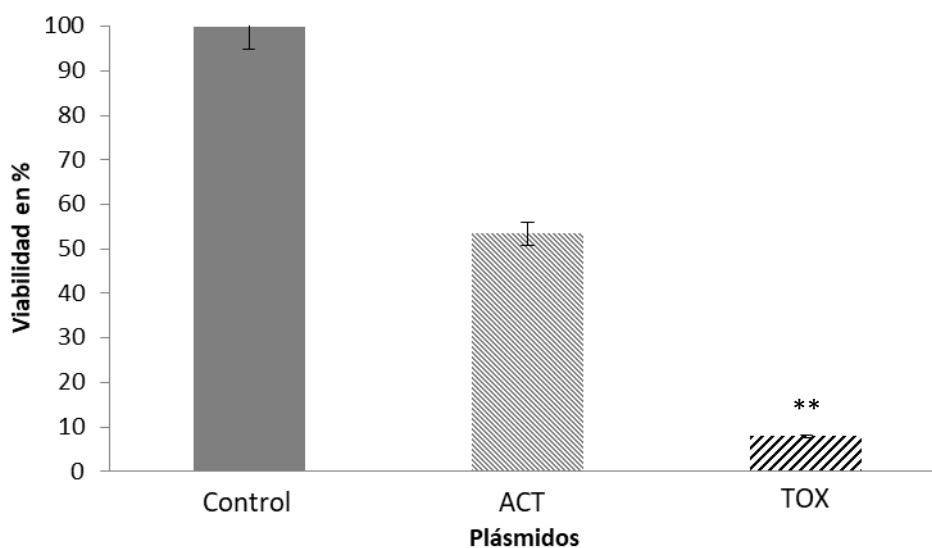


Figura R-11. Evaluación de la viabilidad celular mostrada en porcentajes (datos normalizados) en A549.

En esta grafica se representan los valores de viabilidad con una concentración de plásmido de 1,5 $\mu\text{g/mL}$. Se observa una clara diferencia entre todos los grupos. Tanto en el control (sin tratar) como en los otros dos. La principal diferencia entre el control y el grupo del plásmido ACT (inocuo) es debida a la mayor presencia de agentes de transfección que disminuyen la viabilidad de por sí. El grupo TOX muestra un resultado extremadamente claro de toxicidad asociada a dosis. Para este análisis se decidió por realizar una prueba t de student para dos muestras independientes, entre ambos plásmidos, dado que ya existía una magnitud del efecto grande para demostrar diferencias significativas entre el grupo TOX y el control ******($p < 0,01$) , $N=2$.

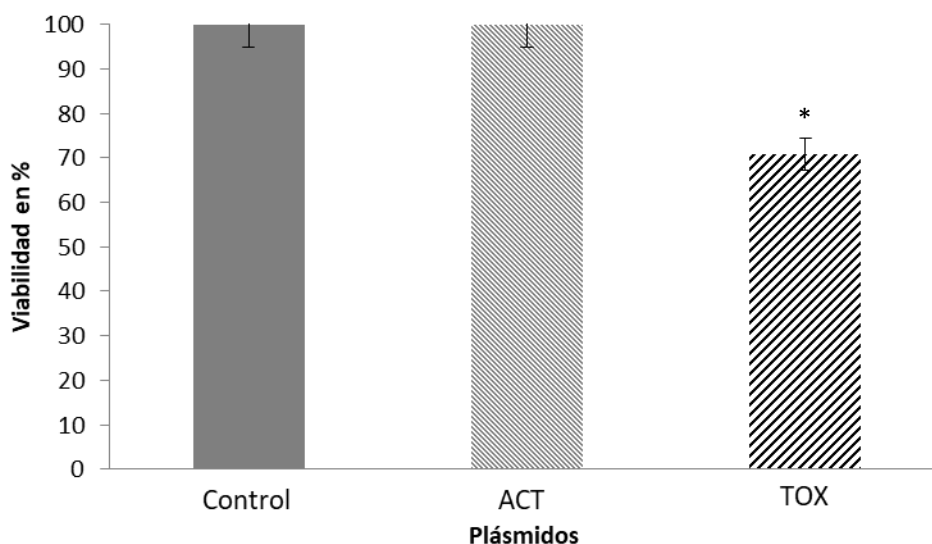


Figura R-12. Evaluación de la viabilidad celular mostrada en porcentajes (datos normalizados) en U87.

En la gráfica se muestran los porcentajes de viabilidad comparados con una muestra control. En esta grafica se representan los valores de viabilidad con una concentración de plásmido de 1 $\mu\text{g/mL}$. En el grupo control no se ha administrado ningún tipo de terapia y se asume la viabilidad como el 100%. El grupo denominado ACT, las células han sido tratadas con un plásmido inocuo, el cual disminuye la viabilidad debido a la agresividad del proceso. El tercer grupo (TOX) muestra las células tratadas con el plásmido en cuestión. Entre el grupo control y el ACT no se observan diferencias significativas. No es el caso del tercer grupo (TOX) el cual exhibe un efecto citotóxico claro. Se comprueba de esta forma que el plásmido toxico ejerce un efecto antitumoral. En este caso se realizó un test ANOVA para k muestras independientes *****($p < 0,05$), $N=3$.

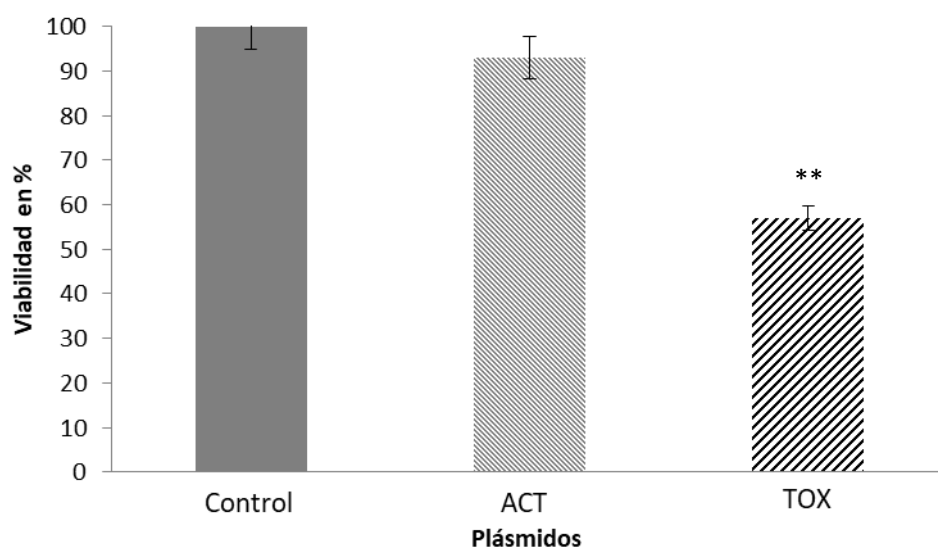


Figura R-13. Evaluación de la viabilidad celular mostrada en porcentajes (datos normalizados) en U87.

En esta grafica se representan los valores de viabilidad con una concentración de plásmido de 1,5 $\mu\text{g/mL}$. Se observa una clara diferencia entre todos los grupos. Tanto en el control (sin tratar) como en los otros dos. La principal diferencia entre el control y el grupo del plásmido ACT (inocuo) es debida a la mayor presencia de agentes de transfección que disminuyen la viabilidad de por sí. El grupo TOX muestra un resultado extremadamente claro de toxicidad asociada a dosis. Para este análisis se decidió por realizar una prueba t de student para dos muestras independientes, entre ambos plásmidos, dado que ya existía una magnitud del efecto grande para demostrar diferencias significativas entre el grupo TOX y el control ******($p < 0,01$), $N=2$.

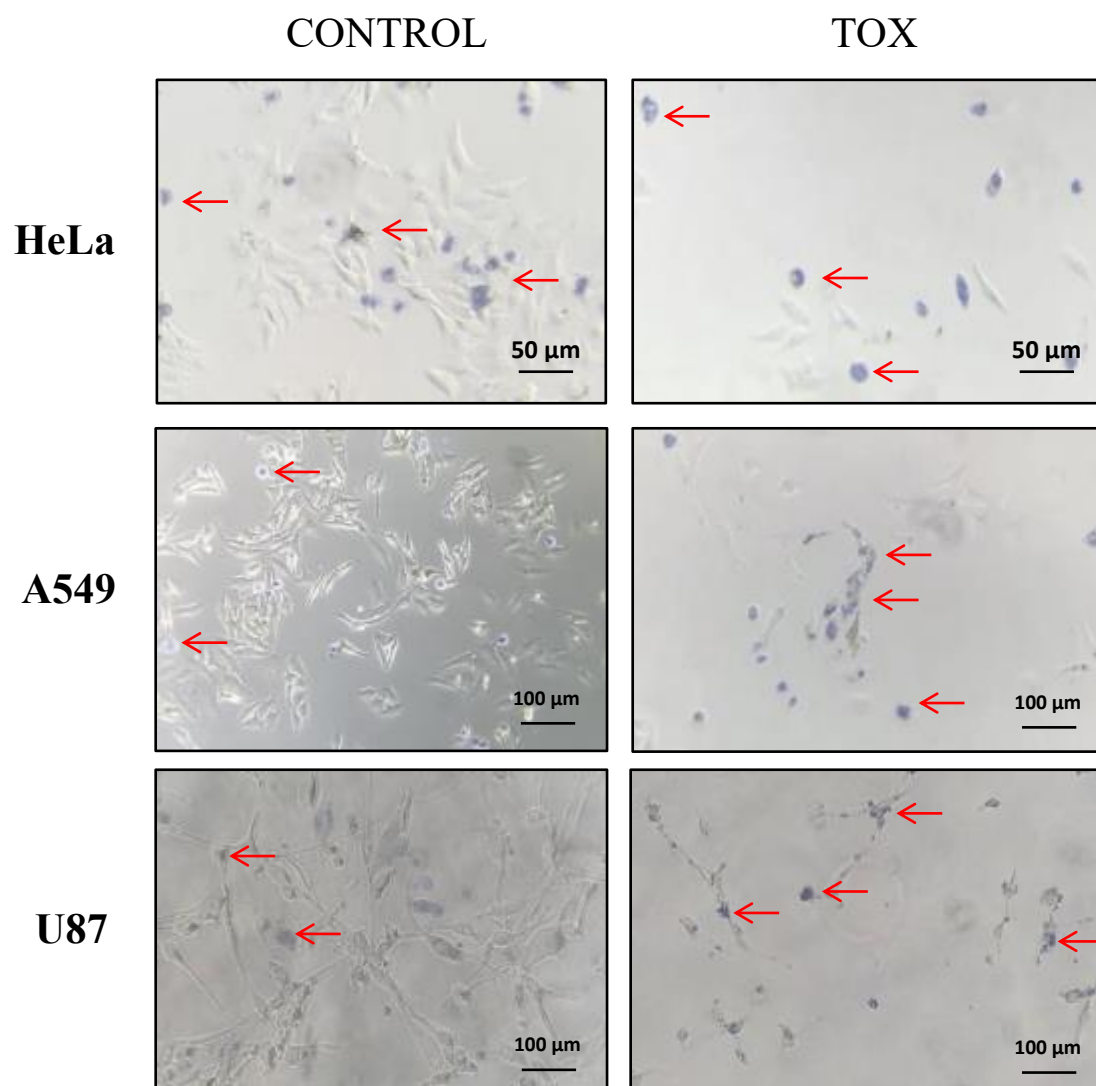


Figura R-14 Evaluación de la viabilidad celular mediante la tinción con trypan blue. A la izquierda se muestran las líneas celulares no tratadas, observándose como el colorante penetra en aquellas células muertas (señaladas con flechas). A la derecha se puede visualizar la tinción después de la transfección con el plásmido toxico. Se puede distinguir que en el grupo control existe un mayor número de células si se compara con el grupo TOX. La proporción de células muertas respecto de las restantes es mucho mayor en el grupo TOX que en el control. Las fotografías se realizaron con aumentos de 200X para las células HeLa y de 100X para A549 y U87.

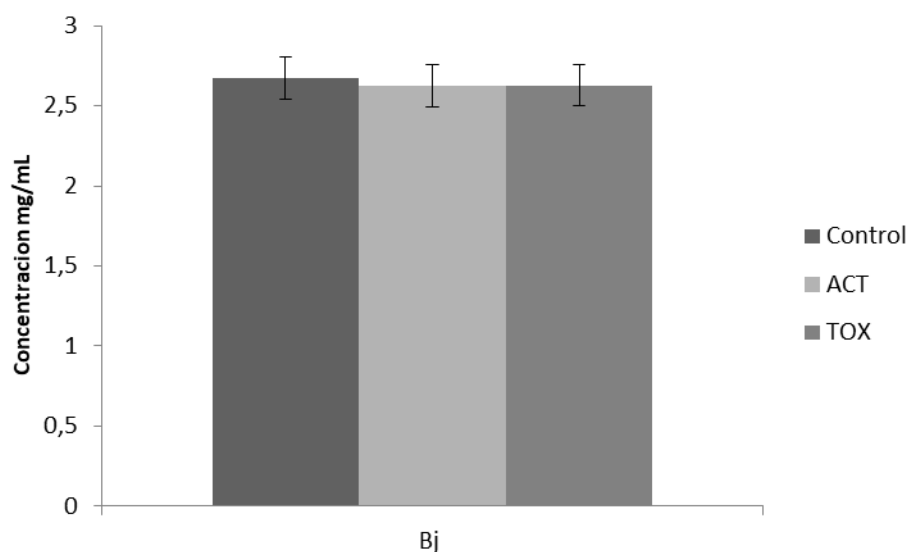


Figura R-15. Datos interpolados de la curva patrón de BCA con los obtenidos en los lisados celulares de ambos plásmidos en BJ (el inocuo y el citotóxico). La comparación de los tres grupos de estudio no arroja ninguna diferencia significativa entre ellos, se muestra incluso que entre ambos grupos de plásmidos (ACT y TOX) los valores numéricos de las barras son prácticamente idénticos. El plásmido en cuestión (TOX) no altera la concentración de proteínas en fibroblastos. Se realizó un test ANOVA para k muestras independientes, N=3.

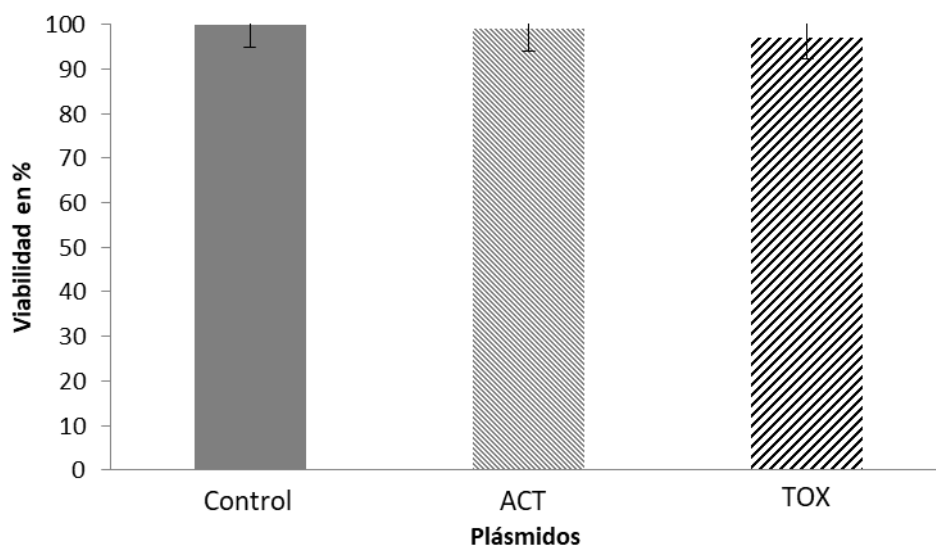


Figura R-16. Evaluación de la viabilidad celular mostrada en porcentajes (datos normalizados) en fibroblastos (BJ). La gráfica presenta los resultados de la viabilidad en los tres grupos a comparar en fibroblastos. Un grupo control (en gris oscuro), el grupo del plásmido inocuo o ACT (trama de puntos grises) y el grupo del plásmido citotóxico o TOX (trama de rallas grises). Se puede ver que entre los tres grupos las diferencias no son significativas (los valores se hallan dentro de las barras de error). Estos resultados no suponen una evidencia clara de toxicidad del vector citotóxico. Se realizó un test ANOVA para k muestras independientes, N=3.

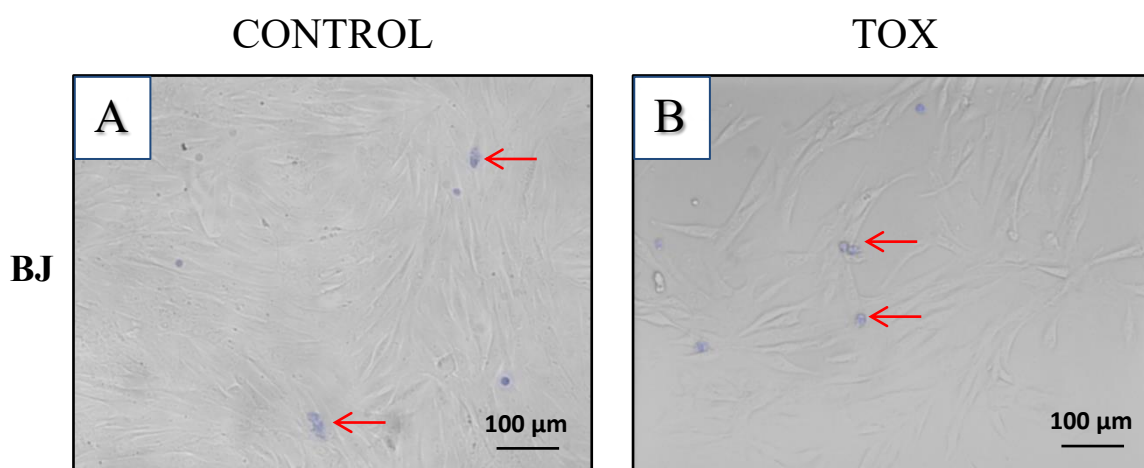


Figura R-17 Evaluación de la viabilidad celular mediante la tinción con trypan blue. Las imágenes muestran la cantidad de células apoptóticas (señaladas con flechas) en comparación con las viables. Se aprecia que en el grupo control (A) como en el grupo TOX (B) la diferencia es mínima. Ambos grupos fueron tratados con plásmidos, siendo para el grupo control el plásmido inocuo y para el grupo TOX el plásmido citotóxico. Comparando ambos grupos no es posible establecer una diferencia clara, por lo que la expresión del plásmido citotóxico es ineficiente. Las fotografías se realizaron con aumentos de 100X.

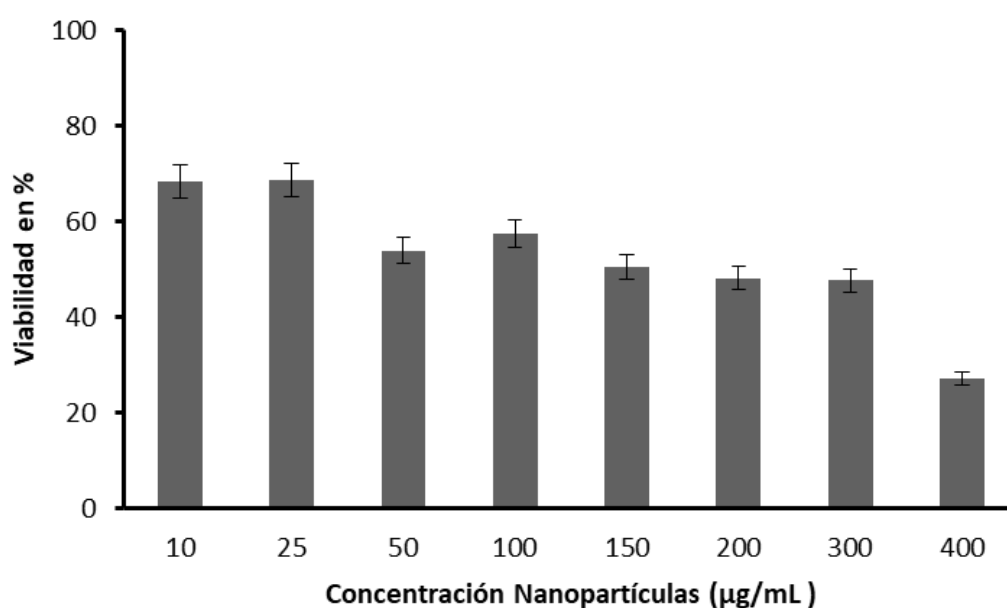


Figura R-18. Estudio de la viabilidad celular representada en porcentajes mediante ensayo de MTT. En la gráfica se muestran los datos de concentraciones de nanopartículas frente a la viabilidad. Se puede apreciar que a medida que se aumenta la concentración (eje X) la viabilidad (eje Y) se ve reducida ligeramente, destacando dos saltos, uno a 50 μg/mL y otro a 400 μg/mL. Las células toleran de forma óptima las nanopartículas inorgánicas. Los datos sugieren que entre 50 y 300 se alcanza los niveles óptimos para realizar experimentos con partículas (no se observan diferencias en estos rangos), N=6.

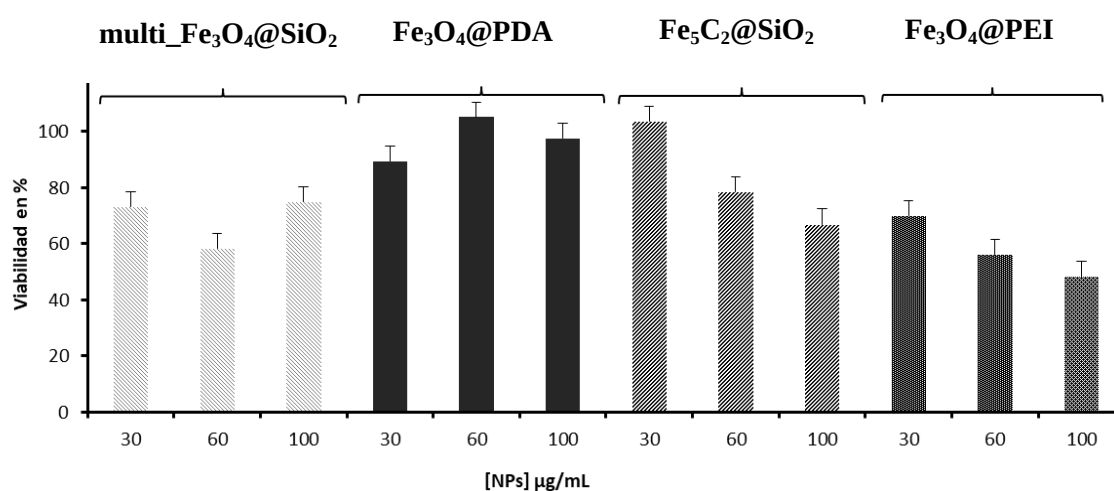


Figura R-19. Estudio de la viabilidad celular representada en porcentajes, mediante ensayo de MTT. En la gráfica se muestran los diferentes grupos de nanopartículas y el impacto que tienen en la viabilidad celular. Se puede ver que la máxima viabilidad se corresponde con las nanopartículas recubiertas con polidopamina Fe₃O₄@PDA seguidas de las nanopartículas con núcleo de carburo de hierro Fe₅C₂@SiO₂. A partir de estos resultados se establecieron como candidatas principales las nanopartículas de Fe₃O₄@PDA, seguidas de Fe₃O₄@PEI dada la presencia de polímeros catiónicos en la superficie y finalmente Fe₅C₂@SiO₂, basándonos en la viabilidad y eficiencia de estas últimas, N=8.

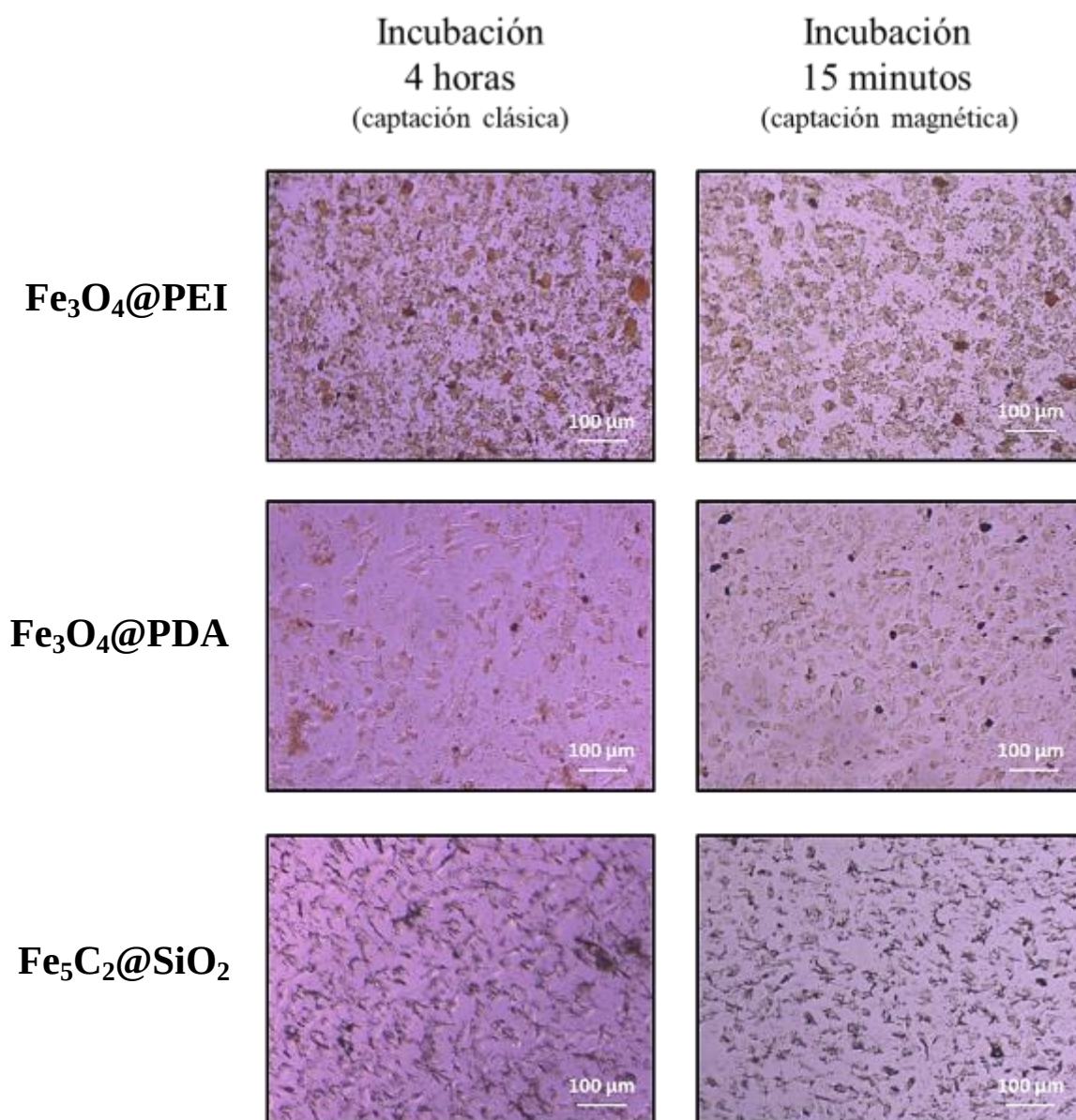
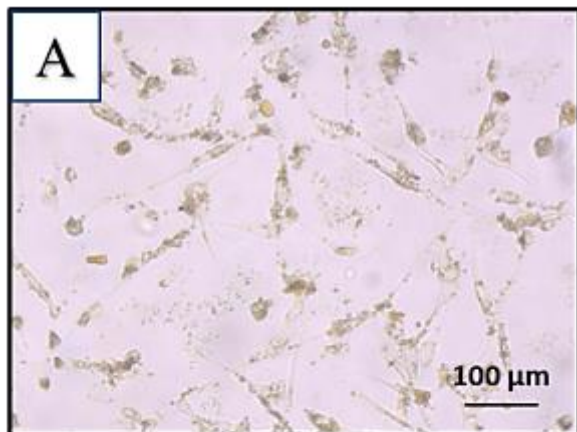
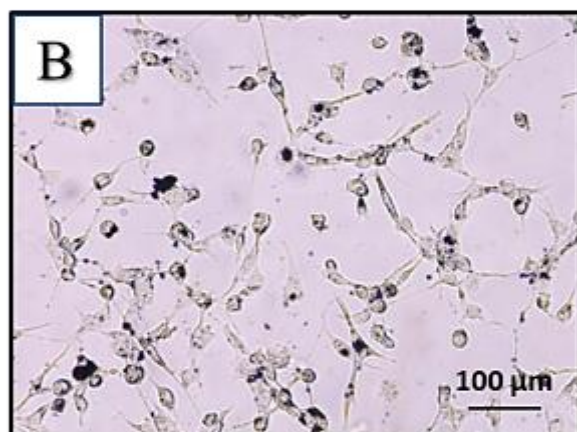
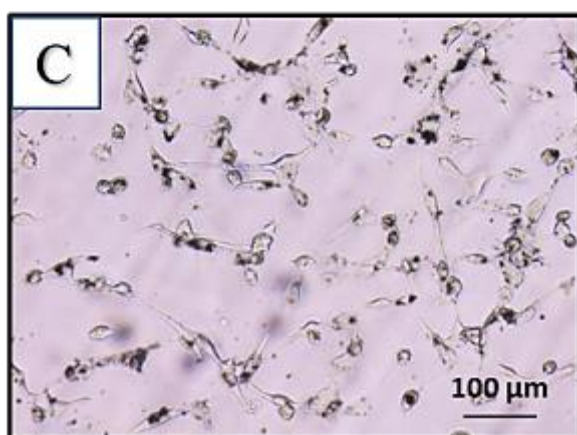


Figura R-20. Estudio de la captación clásica pasiva frente a la captación magnética. Las imágenes se corresponden a la línea celular **HeLa**. En las imágenes que se corresponden con la incubación a 4 horas (captación clásica), se aprecia al mayor ruido de fondo. Las células se muestran más saturadas de partículas y la base de las placas presenta más suciedad. En el grupo de incubación de 15 minutos (captación magnética) se puede observar una delimitación de la morfología celular más clara, así como una concentración menor de partículas desperdigadas por el fondo de la placa. Si comparamos ambos grupos de captación, en cuanto a la densidad de las nanopartículas en el interior de las células, parece ser casi idéntica, con lo que el método de captación magnética resulta más factible. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 200X.

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$  **$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}$**  **$\text{Fe}_5\text{C}_2@\text{SiO}_2$** **Figura R-21. Estudio de la captación magnética.**

Las imágenes se corresponden a la línea celular U87. Las imágenes que se observan se corresponden a una incubación con nanopartículas dirigidas por fuerza magnética (15 minutos) y con posterior lavado con PBS. Las células presentan una buena tolerabilidad por las partículas, pues no modifican sus patrones morfológicos. No existen diferencias entre los tres grupos (A, B y C) por lo que todas estas nanopartículas comparten afinidad por las células. Asimismo estas nanopartículas se muestran distribuidas en el citoplasma con cierta predilección por la zona del núcleo. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 200X.

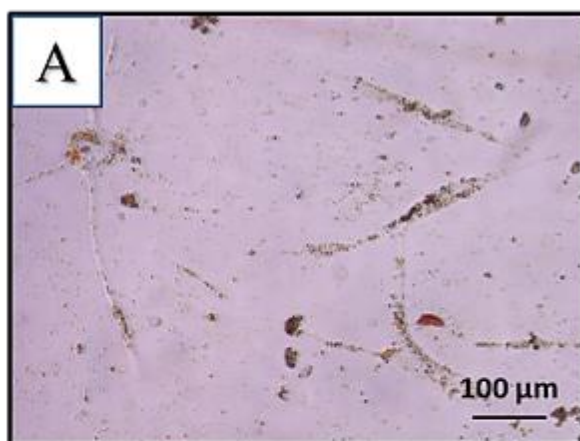
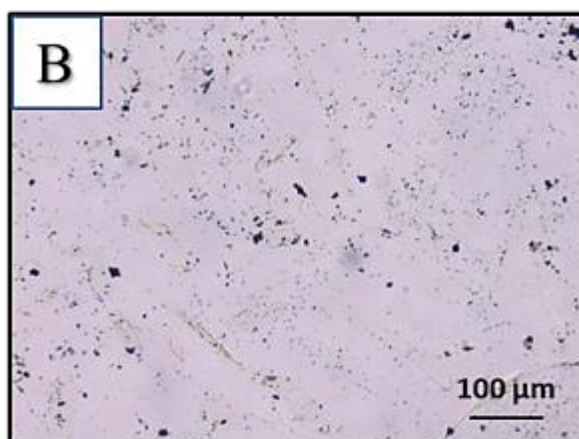
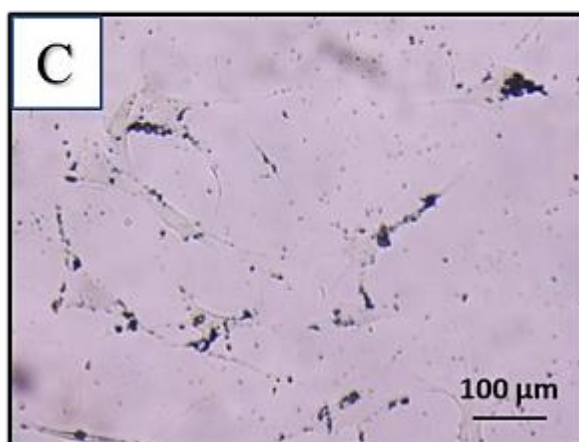
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PEI}$  **$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PDA}$**  **$\text{Fe}_5\text{C}_2@\text{SiO}_2$** 

Figura R-22. Estudio de la captación magnética. Las imágenes se corresponden a la línea celular **BJ fibroblast**. Las imágenes que se observan se corresponden a una incubación con nanopartículas dirigidas por fuerza magnética (15 minutos) y con posterior lavado con PBS. Se puede apreciar que en todos los tipos de nanopartículas (A, B y C) las células conservan su morfología (lo cual es indicativo de compatibilidad) así como la presencia de las partículas en el interior del citoplasma. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 200X.

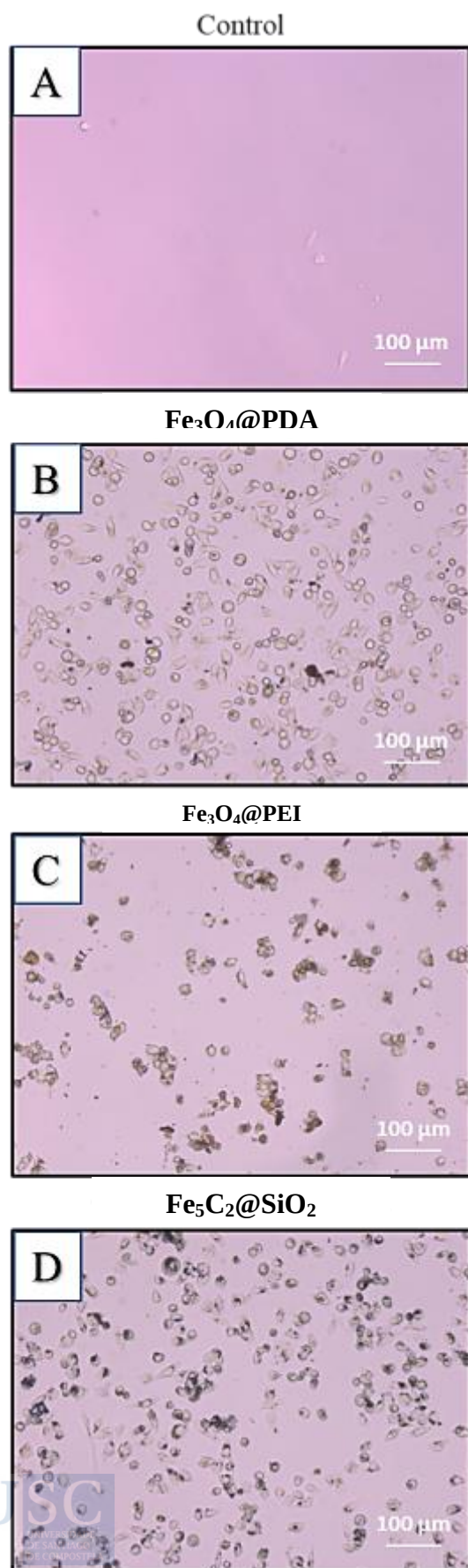


Figura R-23 Evaluación de la separación magnética con diferentes nanopartículas en células HeLa. Las imágenes presentan el diferente resultado tras realizar una captación magnética con su posterior manipulación de las nanopartículas a estudiar. Se estableció un grupo control (A) el cual no fue tratado. Para los demás grupos se observó una gran capacidad de captación y manejo de las células. Los grupos de magnetita con polidopamina (B) y magnetita y PEI (C) mostraron una eficacia muy buena, siendo el grupo de la polidopamina superior en cuanto a internalización. El último grupo compuesto por nanopartículas con un núcleo diferente (D), también mostro una gran eficacia a la hora de la captación y movimiento de las células dirigidas por fuerza magnética. Se puede ver a excepción del control, como las células guardan en su interior las partículas, señal de que solamente aquellas que fueron recogidas mediante un imán son las que están sembradas en la placa. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 200X.

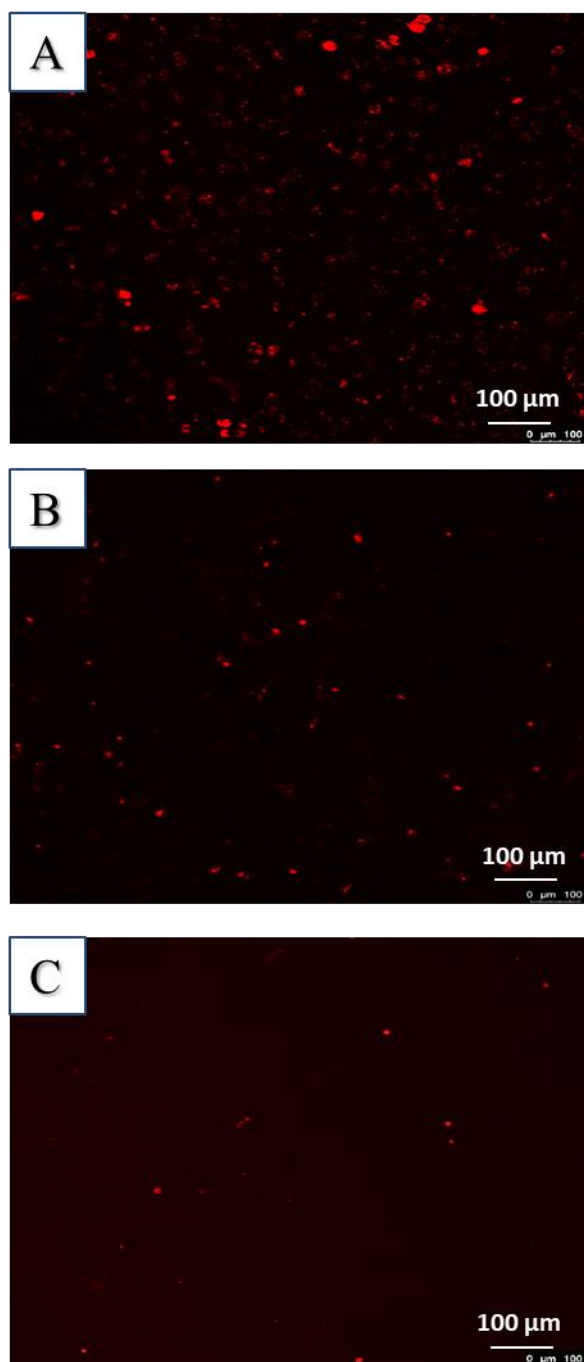


Figura R-24 Evaluación de la expresión del plásmido mCherry en células HeLa usando partículas de magnetita funcionalizadas con polidopamina. En las imágenes se observan los diferentes niveles de expresión en cuanto a intensidad como eficiencia. Para el grupo control (A) se utilizó un agente de transfección comercial, puede verse que la totalidad de las células presentan la proteína roja. En el segundo grupo (B) el plásmido fue asociado con partículas magnéticas y la transfección se realizó mediante fuerza magnética, (magnetofección), se puede ver que a pesar de no ser tan eficiente como en el grupo control se muestra altamente eficaz. Por último se comparó con un tercer grupo el cual no había sido inducido por una fuerza magnética (C), en este caso si se puede ver una reducción muy notoria de la eficiencia, demostrando que los experimentos con magnetofección resulta la mejor elección. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 200X.

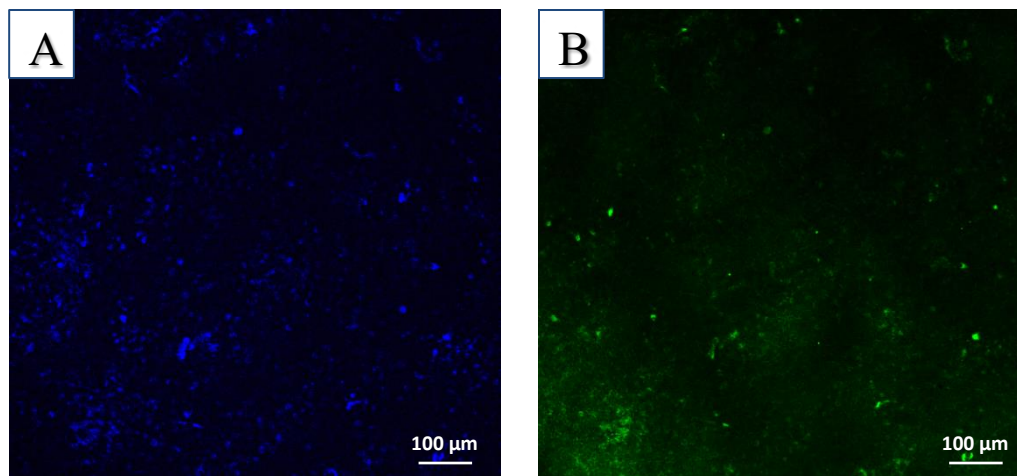


Figura R-25 Evaluación de la emisión fluorescente de las nanopartículas de polidopamina en HeLa. En la figura se observa la misma foto la cual se cambia entre los distintos filtros de emisión. La primera se corresponde al espectro de emisión de la polidopamina (A) la cual nos permite la visualización de las células en color azul. La segunda se puede observar las mismas células pero en otra coloración (B) verde, propia del espectro de emisión de GFP. Debido a los valores de excitación comunes entre ambas imágenes, dichas emisiones parecen solaparse con lo realmente lo que vemos en la segunda imagen no se puede demostrar que sea la expresión de GFP.

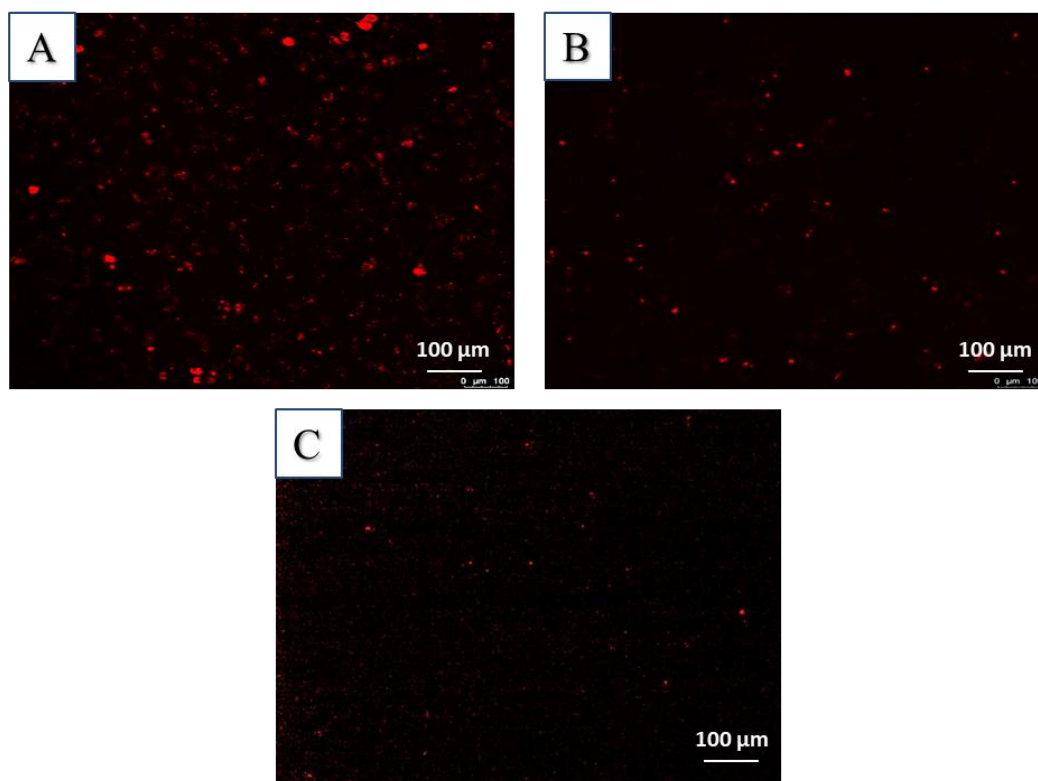


Figura R-26 Evaluación de la expresión del plásmido mCherry en células HeLa usando partículas de magnetita funcionalizadas con polidopamina y PEI. En las siguientes ilustraciones se muestran las expresiones del plásmido mCherry. Los diferentes grupos, muestran como control (A) aquel en el que se empleó el agente comercial, un segundo grupo con nanopartículas funcionalizadas con polidopamina (B) y un tercero con nanopartículas funcionalizadas con PEI (C). Entre los grupos de nanopartículas se puede ver una ligera mejora en cuanto a eficiencia por parte de las nanopartículas con polidopamina. No obstante el resultado de las recubiertas con el polímero PEI ofrece una buena alternativa. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 200X.

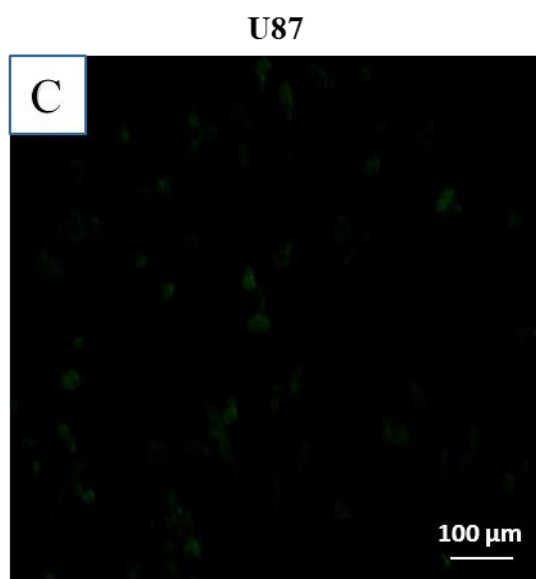
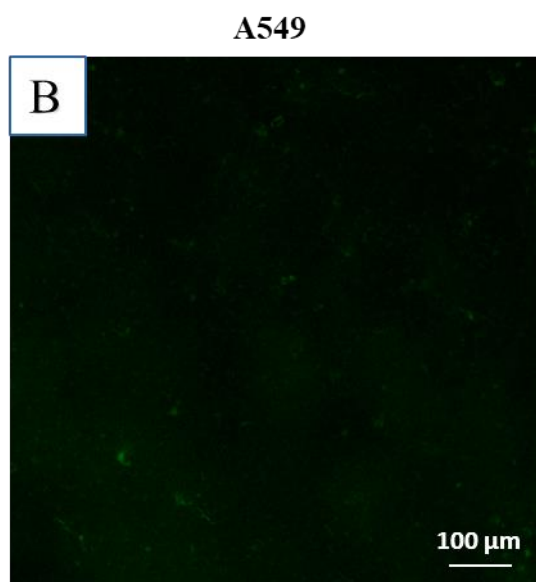
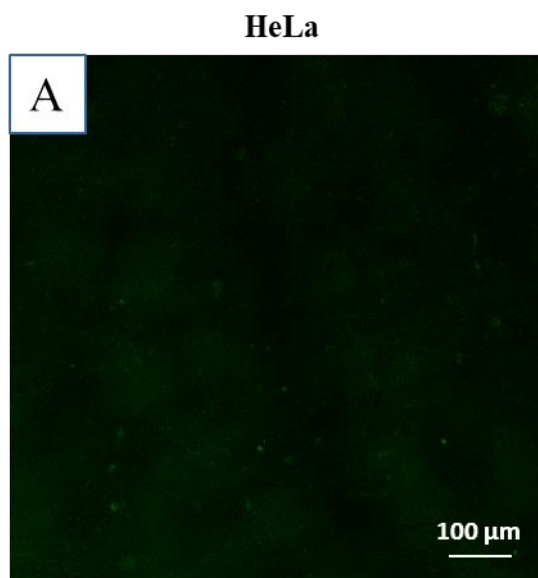


Figura R-27. Evaluación de la expresión del promotor E2F en las distintas líneas celulares empleando nanopartículas magnéticas. Aquí se muestra una fotografía representativa de cada población celular realizada con un aumento de 200X. Para los tres grupos, HeLa (A), A549 (B) y U87 (C) las intensidades del plásmido subrogado al promotor E2F se muestran muy tenues. Se supone que esto puede ser debido a la mayor dificultad del plásmido para llegar al núcleo o de la complejidad del sistema de liberación del conjunto plásmido-polímero-nanopartícula.

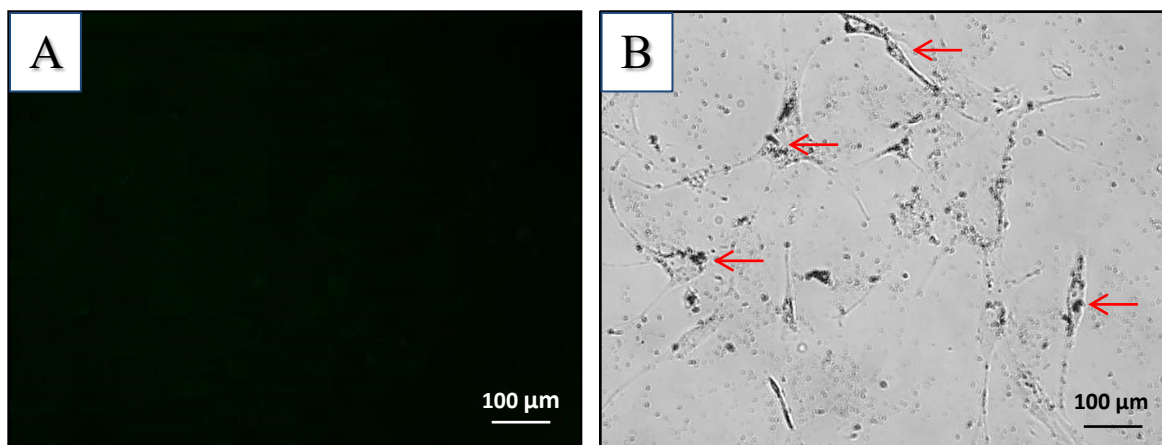


Figura R-28 Evaluación de la expresión del promotor E2F en la línea celular BJ fibroblast. En la fotografía se muestran ambas figuras correspondientes al mismo cuadrante cambiando solamente el filtro que permite la visualización en fluorescencia. Todo esto es realizado con un aumento de 200X. Las células bajo el filtro que permite la visualización de la GFP (A) no exhiben respuesta alguna. Se puede observar que en campo claro (B) las células mantienen su integridad estructural y morfológica, como también las nanopartículas contenidas en las mismas (flechas).

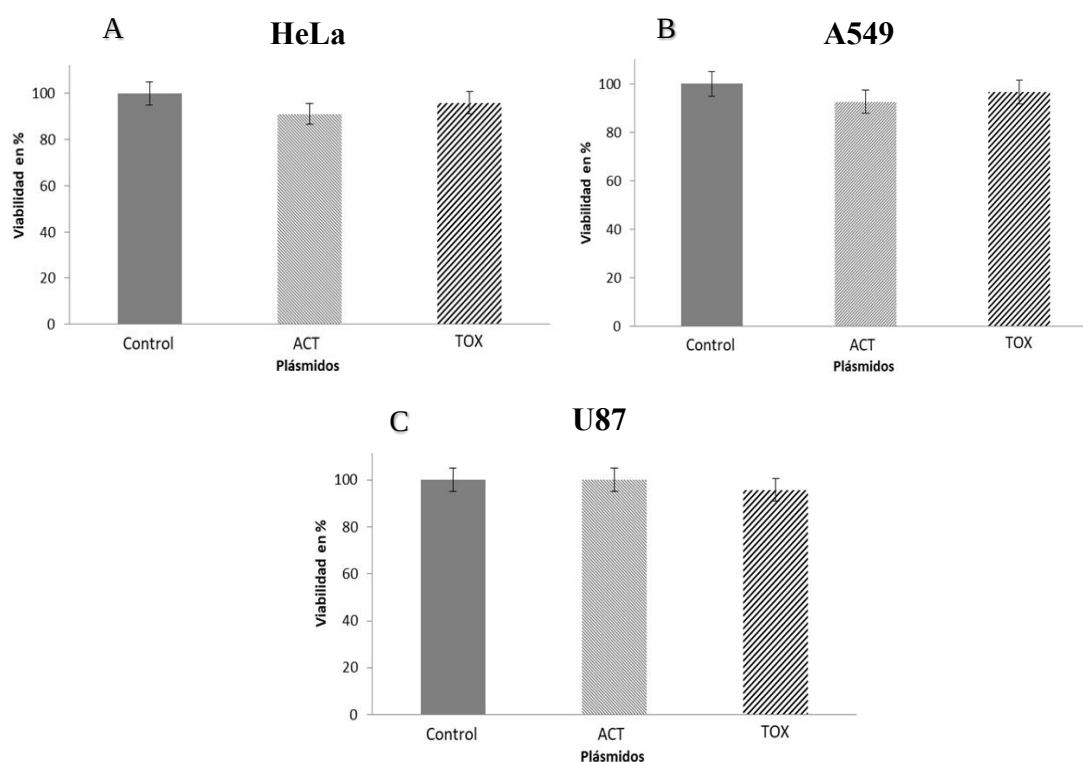


Figura R-29 Evaluación de la viabilidad celular de las distintas líneas, mostrada en porcentajes (datos normalizados) de los sistemas nanopartículas-plásmido. Se pueden observar en todas las gráficas la comparación de los tres grupos a estudiar, grupo control (en gris oscuro), grupo de plásmido inocuo o ACT (trama de puntos grises) y grupo del plásmido citotóxico o TOX (trama de rallas grises). Para las células HeLa (A) se puede ver que entre los tres grupos las diferencias no son significativas, (los valores se hallan dentro de las barras de error). Para el grupo de A549 (B) los tres grupos muestran una distribución similar a HeLa. Por ultimo en el caso de las células U87 (C) vemos la misma tendencia de no diferenciarse los 3 grupos. Se deduce de todos estos resultados que los sistemas basados en asociación plásmido y nanopartículas no suponen una evidencia clara de toxicidad del vector citotóxico. Se realizó un test ANOVA para k muestras independientes en todas las gráficas, N=3.

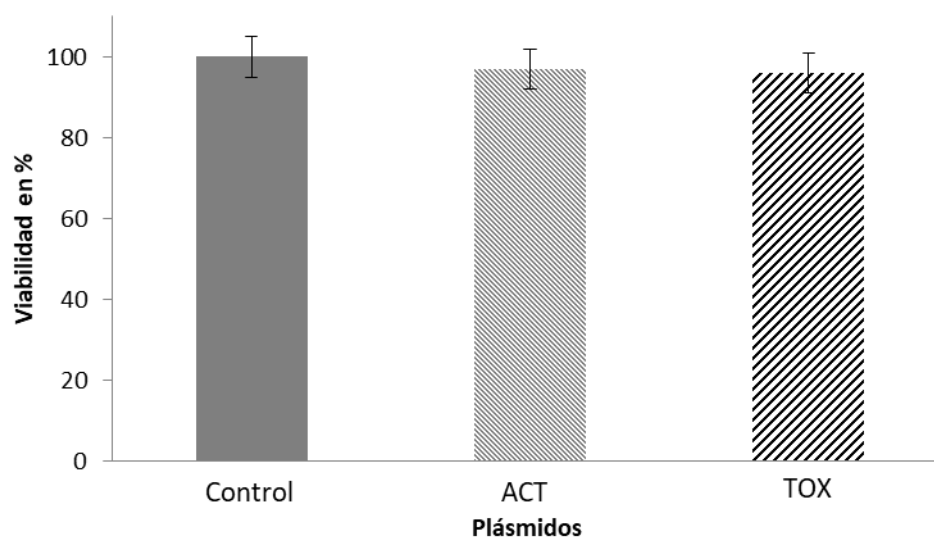


Figura R-30. Evaluación de la viabilidad celular mostrada en porcentajes (datos normalizados) de fibroblastos con el sistema de nanopartículas y plásmidos. La gráfica presenta los resultados de la viabilidad en los tres grupos a comparar en fibroblastos. Un grupo control (en gris oscuro), el grupo del plásmido inocuo o ACT (trama de puntos grises) y el grupo del plásmido citotóxico o TOX (trama de rallas grises). Se puede ver que entre los tres grupos las diferencias no son significativas (los valores se hallan dentro de las barras de error). Se deduce de todos estos resultados que los sistemas basados en asociación plásmido y nanopartículas no suponen una evidencia clara de toxicidad del vector citotóxico. Se realizó un test ANOVA para k muestras independientes, $N=3$.

Discusión

DISCUSIÓN

Nuestro cuerpo está compuesto por millones de células las cuales desempeñan una determinada función dependiendo del tipo que sean, así una célula adiposa formara grasa y almacenara energía, una célula epitelial formara recubrimientos de órganos y los protegerá de agentes externos, una célula nerviosa formara parte del sistema nervioso y permitirá la conducción de los impulsos nerviosos, etc. Todas estas células funcionan como una sociedad o ecosistema. Así pues en contraste con las células de vida independiente como las bacterias, que compiten para sobrevivir, las células de un organismo pluricelular están comprometidas a colaborar entre sí. Para coordinar su comportamiento las células emiten, reciben e interpretan conjuntos de señales que indican como deben actuar. Esto se traduce a que dependiendo de las señales las células se dividen, se mantienen quiescentes, se diferencian o se mueren en la medida que sea necesario para el bien del organismo. Miles de millones de estas células sufren mutaciones a diario y rompen esta armonía. Una mutación puede proporcionar ventajas selectivas, permitiendo que se divida de forma más vigorosa que sus vecinas y convirtiéndose en la fundadora de un clon mutante en crecimiento⁵.

Las células tumorales rompen pues las reglas más básicas del comportamiento celular mediante las cuales se forman y mantienen los organismos pluricelulares (homeostasis). En los organismos pluricelulares este proceso se produce a una escala temporal de años o décadas, en el cáncer esto es cuestión de meses. Por lo que podemos tratar el desarrollo del cáncer como un proceso de microevolución⁵.

El desarrollo de la genética molecular durante los últimos años, y especialmente toda la información derivada del Proyecto Genoma Humano, han propiciado que podamos afrontar la modificación directa de las alteraciones genéticas o la utilización de ácidos nucleicos como agentes terapéuticos. La terapia génica se presenta como una nueva modalidad terapéutica surgida a finales de los años 80, y que puede definirse como la transferencia de ácidos nucleicos (ADN o ARN) con fines terapéuticos⁷³.

Debido a la incidencia en aumento, de tumores potencialmente mortales y la tasa de supervivencia general a 5 años, muy baja, para pacientes con tratamientos convencionales, el desarrollo de estrategias de tratamiento alternativas, seguras y efectivas se ha convertido en un importante objetivo. En este escenario la terapia génica se postula como una interesante propuesta que puede proporcionar un enfoque más preciso y seguro para el tratamiento del cáncer.

1. PROMOTOR E2F COMO DIANA TERAPÉUTICA

Hasta principios del siglo XX, la terapia del cáncer se limitaba a la extirpación del tumor mediante la cirugía. La radioterapia, la quimioterapia y la inmunoterapia se introducen poco a poco como nuevas estrategias de tratamiento. Pero como hemos mencionado en el apartado anterior el cáncer evoluciona en cuestión de meses, se adapta y se hace más fuerte con cada estímulo recibido.

Se ha observado que tras la administración de quimioterapia a las células tumorales, éstas son capaces de identificar como nocivo aquello que fagocitan, por lo que ante esta captación indiscriminada de material, deciden no sintetizar las enzimas hidrolíticas que permiten su liberación en la célula, o cambian su conformación estructural para que ningún objeto extraño penetre sus membrana⁹². Parece increíble pensar que estas células puedan “aprender” a sobrevivir pero de hecho es lo que ocurre.

Esto deja a las terapias convencionales un poco varadas. Entonces ¿porque no imitar este comportamiento de adaptación y utilizarlo a nuestro favor? De la misma forma que el cáncer sufre un proceso de evolución en el cual pasa de tener unas características determinadas a otras mucho más ventajosas para su supervivencia, los tratamientos también deben evolucionar.

Sabemos que la base del cáncer es crecer, dividirse y esparcirse, por tanto existe una biosíntesis proteica constante para llevar a cabo todos estos procesos. La vía de señalización E2F-pRB parece estar alterada en la mayoría de tumores humanos, siendo esta una de las principales vías que regula el ciclo celular, y por tanto la división^{5,54,57,58}.

De igual modo que hacen los virus, los cuales utilizan las células como sus propias factorías de autoensamblado para replicarse y propagarse⁷⁵, utilizar esta vía de señalización, sin alterar el funcionamiento de la misma como instrumento para matar una célula es lo más parecido a utilizar la propia evolución tumoral contra sí misma. El cáncer no puede evolucionar ante algo que necesita, que es la expresión génica.

Se hipotetizó que una terapia génica dirigida, empleando esta vía de señalización E2F-pRB podría constituir una alternativa de tratamiento atractiva y específica. Se postuló que, usando plásmidos modificados (más seguros que los virus) condicionados a la expresión del promotor del factor E2F, al igual que los virus oncolíticos⁹³, podría producirse un producto (una proteína) el cual sería capaz de interrumpir el proceso de síntesis proteica, en células tumorales. Al interrumpir la biosíntesis, la célula de por sí no podría seguir con sus procesos normales, viéndose este efecto exacerbado en tumores, ya que estos requieren de una mayor demanda de recursos para su crecimiento o propagación. Todo esto desencadenaría un proceso de apoptosis (muerte celular programada) en células tumorales pero no en las demás.

2. EXPRESIÓN DEL PROMOTOR E2F

Teniendo clara la hipótesis se decidió por la construcción de un vector de expresión (plásmido) con las secuencias promotoras para el gen E2F. Este promotor en concreto poseía los ocho dominios de unión de E2F que aportan selectividad a la hora de expresarse en células tumorales. Es sabido que la familia de E2F cuenta con distintos miembros, 3 de los cuales poseen una función “activadora” (E2Fs ,1-3) mientras que los restantes tienen una función

represora (4-8). E2F1 es el miembro más estudiado y el cual posee más dominios de unión al ADN, de factibilidad a la hora de elegir uno el miembro número 1 era la elección más sostenible. Además este disponía de una función directa sobre la apoptosis y regulación de la entrada en fase S del ciclo celular.

Una vez construido quisimos evaluar la expresión y/o actividad del promotor E2F en células tumorales, tal y como se teoriza también en Cascallo *et al*⁹⁴. Para ello realizamos transfecciones (entendidas por la introducción de material genético externo, en este caso plásmidos, en células eucariotas) con un plásmido condicionado a este promotor el cual contenía un gen testigo GFP (proteína verde fluorescente) en varias líneas tumorales. De producirse la expresión del plásmido (transcripción y traducción de su material genético) este sintetizaría la proteína fluorescente, ofreciendo un aporte visual de la actividad de E2F, viendo las células en una tonalidad verde bajo un microscopio de fluorescencia.

Pudimos observar que todas las líneas tumorales mostraron una expresión de la proteína verde fluorescente en unos rangos óptimos, pudiendo compararlos y equipararlos con otra proteína fluorescente proveniente de otro plásmido inespecífico, en cuanto a eficiencia. Quedaba comprobado que la expresión del promotor E2F en células tumorales era lo suficientemente fuerte como para inducir la expresión de GFP de nuestro plásmido.

Para verificar que la expresión del promotor E2F se trataba de algo específico de células tumorales, y por tanto, nuestro plásmido también lo era, se realizaron los mismos experimentos de transfección en células sanas. Aquí comprobamos que la expresión de la proteína GFP en células sanas era indetectable, si bien se habían alargado las horas de visualización para permitir la división y la activación del promotor, no fue lo suficientemente robusta como para generar el producto. Esto se explica probablemente, aunque no con toda seguridad, por la reducida posibilidad de entrada al núcleo. Tras ver el resultado con el plásmido mCherry aunque solo se pudo observar un número reducido de células, sería conveniente repetir estos mismos experimentos con otra construcción tipo virus para discernir si es un problema de entrada al núcleo.

Sin embargo, quedó demostrada la actividad del promotor E2F en células cancerígenas, de forma similar al trabajo de Cascallo *et al*⁹⁴. El siguiente paso que se planteaba era diseñar otro plásmido pero difiriendo en el producto sintetizado, pasando de un gen testigo como es el de la GFP, a otro citotóxico.

3. EXPRESIÓN CITOTÓXICA SUBROGADA AL PROMOTOR E2F

Comprobada la actividad del promotor E2F en células tumorales, decidimos diseñar nuevamente un plásmido con esta región y sustituir el gen testigo de GFP, por un gen el cual codificaba un producto citotóxico. Primeramente hicimos ensayos de cuantificación proteica para ver como afectaba nuestro plásmido a la biosíntesis de proteínas. Para evaluar la efectividad citotóxica condicionada a la actividad del promotor E2F se realizaron ensayos de viabilidad celular uno midiendo la actividad mitocondrial (MTT) y otro la permeabilidad de la membrana (Trypan blue) tras otra ronda de transfecciones previas con el nuevo plásmido.

Las pruebas de cuantificación proteica (BCA) demostraron que las líneas tumorales mostraban una disminución significativa en la producción de proteínas totales. Incluso

obviando el efecto propio que ejercía el proceso de transfección, que disminuía la viabilidad y por tanto podía reducir la concentración proteica ligeramente, los resultados se mostraban contundentes. En cuanto a las células sanas los resultados de cuantificación no exhibieron datos suficientemente sólidos como para asegurar que la síntesis proteica se veía comprometida. Del mismo modo que para la demostración de la expresión con GFP en células sanas, el plásmido citotóxico no mostraba actividad alguna.

Para los ensayos de viabilidad, en el caso de la prueba con MTT, que mide la actividad mitocondrial y su capacidad de metabolizar el compuesto, las células tumorales mostraron con casi idéntico patrón entre todas las líneas celulares, una disminución considerable en los grupos transfectados con el plásmido citotóxico. Pudimos también observar que, aumentando la dosis del plásmido (concentración), el efecto se exacerbaba determinando que el efecto citotóxico era dosis dependiente. Estos resultados junto a los obtenidos de las pruebas que determinaban la concentración proteica demostraban parte de nuestra hipótesis, pues deteniendo la síntesis proteica podíamos producir la muerte celular programada en células.

Las pruebas con MTT para la células sanas al igual que en las pruebas de expresión de GFP y las pruebas con BCA para medir la concentración proteica dieron el mismo resultado negativo. Si bien es cierto que este tipo de células son difíciles de transfectar, los niveles de expresión del promotor E2F para células similares como se indica en Tsukuda *et al*⁹⁵ son ilegibles. No está claro por tanto si la escasa actividad del plásmido en las células sanas se debe a inoperancia del vector o a una ausencia de actividad del promotor. Para concretar esto sería conveniente realizar los mismos experimentos con un vector viral cuya eficiencia es mucho mayor⁹⁶. No obstante pudimos establecer que nuestro plásmido realmente funcionaba tal cual se había teorizado (en células de división rápida) y constituía una potencial terapia muy precisa.

Como medida más visual, realizamos un último ensayo de viabilidad celular basado en la permeabilidad de las células muertas respecto a su tinción con un colorante (trypan blue). Del mismo modo que en todas las demás pruebas las diferencias se hicieron notorias solo en las líneas tumorales, con una disminución del total de las poblaciones celulares, y un aumento de aquellas apoptóticas (teñidas), elevando la proporción de estas últimas frente a las que aún permanecían vivas en el grupo transfectado. Para la línea celular sana las diferencias eran imperceptibles.

Pudimos comprobar en base a todo lo comentado que nuestro vector citotóxico ejercía un potente efecto antitumoral, dosis dependiente y específico para aquellas líneas que tenían una expresión o actividad importante del promotor E2F del mismo modo que se demuestra con otro tipo de vectores en Alonso *et al*⁹³ o Fueyo *et al*⁹⁷. Todo esto fue demostrado realizando transfecciones *in vitro* con un producto comercial, con lo que el siguiente movimiento era llevar a cabo estos mismos experimentos usando otros sistemas de administración más extrapolables a la clínica.

4. EVALUACIÓN DE LOS SISTEMAS DE NANOPARTÍCULAS

Con el fin de trasladar a sistemas *in vivo* o clínica, los resultados obtenidos en transfecciones con los productos comerciales, se decidió por utilizar la tecnología de las

nanopartículas. Debido a la imposibilidad de los productos de transfección *in vitro* para usarse en sistemas vivos^{98,99}, era necesario emplear nanopartículas que permitieran el uso de estas terapias génicas para posibles nuevos tratamientos.

Primeramente se establecieron una lista de posibles candidatas (nanopartículas magnéticas) a las cuales se les realizaron ensayos de viabilidad y captación. Tras los resultados obtenidos pudimos ver que eran bien toleradas por las células tanto en cuestión de supervivencia celular como de internalización dentro de las mismas. Una vez demostrada la alta biocompatibilidad era necesario repetir los experimentos de transfección, expresión de GFP condicionada a promotor E2F y expresión de vector citotóxico con estos sistemas.

Dado que teníamos unos sistemas basados en nanopartículas magnéticas y estas pueden ser manipuladas por un gradiente de campo magnético externo, decidimos explotar esta propiedad física característica para mejorar los procedimientos relacionados con la interacción celular y llevar a la práctica nuestra posible terapia. Secundariamente también queríamos demostrar una mejora del uso de nanopartículas con respecto a lo que ya se conocía *in vitro*, antes de probar la eficacia de nuestro vector. Vimos que aplicando campos magnéticos pudimos reducir los tiempos de captación celular (internalización de las nanopartículas en las células) coincidiendo con los tiempos descritos por Kami *et al*¹⁰⁰ traduciéndose en una mejora con respecto a las incubaciones de los productos comerciales. Asimismo, podíamos manipular las células aplicando un campo magnético cuando las nanopartículas se hallaban en el interior de las células, de forma similar a lo expuesto por Kang *et al*¹⁰¹. Quedó así demostrada una mejora en los procedimientos en cuanto a eficacia y eficiencia.

Después de haber perfeccionado estas técnicas, ahora sí, se procedió a repetir los experimentos (viabilidad y la expresión) con los plásmidos propuestos. Pudimos ver que con los sistemas de nanopartículas las expresiones del plásmido E2F-GFP no eran tan intensas que como con el producto comercial. Aquí se dedujo que era posible a la mayor dificultad o complejidad de liberación del material genético exógeno. El producto comercial constaba solamente de un polímero catiónico similar a los liposomas, que compactaba el ADN y lo introducía en la célula. Una vez en el interior podían llevarse a cabo diferentes procesos por los que estos complejos se separan y el ADN puede viajar al núcleo para así expresarse en su forma final¹⁰². En el caso de las nanopartículas supone un proceso un poco menos simple. Aunque el principio sea el mismo, de compactación y asociación con un polímero mediante fuerzas electrostáticas, tridimensionalmente podía ocurrir que el polímero redujera la facilidad de disociación con el ADN plasmídico. Al estar anclado en una superficie este no siempre se “abre” y podía conformar un entramado que no se desplegara. También podía ocurrir que el tiempo de liberación del plásmido no era lo suficientemente rápido como para que se produjera una expresión eficiente. Un plásmido dentro de una célula tiene una vida media de 1-7 días⁷³, en caso de producirse una liberación tardía el resultado que se obtendría podría explicar también esta falta de intensidad. Estas fueron algunas de las posibles explicaciones dada la baja intensidad, sumado a la alta especificidad del vector para expresarse. No obstante al percibirse cierta visualización de proteína GFP (muy tenue) decidimos seguir adelante con el sistema con nanopartículas-plásmido.

Cuando experimentamos con células sanas al igual que en el caso del agente de transfección comercial no se observó señal alguna, con lo que con cierto margen de error quedaba claro que fuera cual fuera el sistema de administración, el vector solo respondía ante células tumorales.

Para la expresión del plásmido citotóxico no repetimos la prueba de cuantificación proteica porque el fin de la etapa con nanopartículas era averiguar la efectividad del plásmido, ya se había demostrado que afectaba al proceso de síntesis y que se correspondía con una disminución de viabilidad, por lo que no era necesario volver a realizarlo.

Repetimos el ensayo con MTT en células tumorales observando que no se producía respuesta alguna comparando el grupo transfectado (citotóxico) con los grupos control, esto en parte era de esperar dada la escasa respuesta del vector de expresión con el gen testigo GFP. Asimismo repetimos también con células sanas, siendo el resultado idéntico.

No se repitió tampoco la prueba de viabilidad con trypan blue, debido a que este colorante interfería con las partículas magnéticas, por lo que quedó descartado.

Como explicamos anteriormente con el resultado expuesto de expresión del plásmido E2F- GFP, existen una serie de motivos por los cuales nuestro plásmido no pudo expresarse en su máximo exponente. No obstante esto no significa que las pruebas fueran un fracaso, ya que aunque la señal no fuera todo lo intensa que se pretendía, si había cierto grado de positividad (con lo que en el caso del plásmido citotóxico podría ocurrir este resultado aunque fuera imperceptible con las técnicas usadas). De todo esto pudimos concluir que se perfilaba como una terapia potencialmente específica e innovadora, lo cual supone un paso importante en el desarrollo de futuros tratamientos en los que reducir los efectos adversos aumentando los beneficios es la meta a conseguir.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Queda claro que el tratamiento de las enfermedades oncológicas necesita tener un enfoque de extrema precisión y multidisciplinariedad para maximizar los beneficios y reducir los riesgos. La expresión dirigida de genes de interés, que incluyen distintos sistemas de administración y expresión operativa de promotores de genes específicos, es una estrategia innovadora para la terapia génica contra el cáncer¹⁰³⁻¹⁰⁵.

A lo largo de este trabajo, hemos aprovechado los mecanismos biológicos propios de las células cancerígenas para utilizarlos en su contra, como son la biosíntesis proteica y división celular. Se teorizó que explotando la maquinaria responsable del crecimiento tumoral, al igual que haría un virus en condiciones normales, podríamos tratar de forma precisa aquellas células en división rápida. Todo esto sin afectar a la adaptación que la célula tumoral pudiera ejercer ante tal terapia.

Pudimos demostrar que usando un producto determinado (que detuviera la biosíntesis) y empleando esta tecnología de “parasitismo” intracelular, las células tumorales entraban en estado de apoptosis, mientras que las células sanas permanecían inalteradas. Asimismo pudimos comprobar también que, deteniendo el mecanismo de biosíntesis, las células morían sin que estas pudieran tener una capacidad de respuesta. Este efecto apoptótico fue corroborado en 3 líneas tumorales diferentes, lo que nos proporciona una idea de la

versatilidad (y universalidad del promotor usado) de lo que puede suponer esta nueva tecnología.

También observamos que el uso con nanopartículas magnéticas se postulaba como algo seguro y efectivo, minimizando costes y recursos a la hora de hacer experimentación in vitro. Aunque los resultados no fueron todo lo que se esperaba de ellos, si nos pudieron ofrecer una propuesta factible y atractiva para futuros experimentos tanto in vitro como in vivo.

Como reflexión final, podemos decir que la terapia génica se muestra como algo positivo y prometedor, teniendo un papel muy importante en el tratamiento del cáncer. Dado el enfoque que se está dando a la medicina personalizada, estamos seguros que de aquí en un futuro, el tratamiento basado en el estudio genético y el tratamiento usando mutaciones/genes determinados para cada tumor y persona, será el modelo a seguir.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Los plásmidos subrogados a la expresión del promotor E2F con gen testigo (GFP) son capaces de transfectarse y expresarse en las líneas celulares establecidas de Cáncer de cérvix, adenocarcinoma y glioblastoma. La expresión del promotor se halla altamente activa en estas líneas tumorales.
2. La expresión de los plásmidos con promotor E2F y gen GFP se muestra ausente para la línea no tumoral BJ fibroblast. Transfectando esta misma línea con otros plásmidos comerciales se observa una expresión mínima de los mismos.
3. La expresión del plásmido citotóxico en células tumorales disminuye considerablemente la concentración proteica así como la viabilidad celular, mientras que en células sanas estos valores se mantienen intactos. El vector ejerce un potente efecto antitumoral, dosis dependiente y específico para aquellas líneas que tienen alta actividad del promotor E2F.
4. El uso de nanopartículas inorgánicas parece ser bien tolerado por las células (en términos de supervivencia y captación celular). Dada la naturaleza magnética de las partículas es posible acortar los periodos de incubación desde 4 horas aproximadamente a 15 minutos. Las nanopartículas magnéticas se postulan como algo seguro y eficaz, minimizando costes y recursos.
5. Los niveles de expresión del plásmido unido a nanopartículas son considerablemente bajos. Del mismo modo la viabilidad de todas las líneas celulares se mantiene casi intacta. No se puede asegurar la eficacia del plásmido con nanopartículas. La eficacia del sistema de liberación nanopartícula-plásmido se reduce considerablemente frente al sistema del producto comercial.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Sung, H, Ferlay, J, Siegel, RL, Laversanne, M, Soerjomataram, I, Jemal, A, Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 71: 209- 249. (2021)
2. Bray F, Laversanne M, Weiderpass E, Soerjomataram I. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer.* In press. (2021)
3. World Health Organization (WHO). Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. WHO; (2020)
4. Weinberg, R.A. *The Biology of Cancer.* 1st Edition, Garland Science, New York. (2007)
5. Alberts, B., et al. *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed., Garland Pub., 2008. [Biología molecular de la célula (5ª ed.). Omega, (2004)]
6. Bishop, J. Michael. *How to Win The Nobel Prize: An Unexpected Life in Science.* Harvard University Press, (2004)
7. Vogelstein, B., Kinzler, K.W., “Cancer genes and the pathways they control”, *Nature Medicine*, vol 10, no. 1, pp. 789-799. (2004)
8. Stewart, D., Stillman, B. *Molecular Approaches to Controlling Cancer.* In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology LXX: Molecular Approaches to Controlling Cancer, Cold Spring Harbor. (2005)
9. Bielas JH, Loeb KR, Rubin BP, True LD, Loeb LA. Human cancers express a mutator phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(48):18238-42. (2006)
10. Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature.* 255(5505):197-200, (1975)
11. Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;100 (3):776-81. (2003)
12. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011
13. Nelson, David L. (David Lee), 1942-. *Lehninger, principles of biochemistry.* New York:W.H. Freeman (2005)
14. Branden, C. & Tooze, J. *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, Inc., New York. (1991)
15. Stent, G. S. *Molecular Genetics; an Introductory Narrative.* San Francisco: W.H. Freeman. (1971)
16. Olson MO , Dundr M , Szebeni A . The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol.* 10:189–196. (2000)
17. Darnell JE Jr. RNA. *Sci. Am.* 253(4):68–78. (1985)

18. Mooney RA , Landick R . RNA polymerase unveiled. *Cell*. 98:687–690. (1999)
19. Ebright RH . RNA polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J. Mol. Biol.* 304:687–698. (2000)
20. Hirose Y , Manley JL . RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev.* 14:1415–1429. (2000)
21. Cramer P , Bushnell DA , Fu J . et al. Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science*. 288:640–649. (2000)
22. Dvir A , Conaway JW , Conaway RC . Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11:209–214. (2001)
23. Harley CB , Reynolds RP . Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 15:2343–2361. (1987)
24. Green MR . TBP-associated factors (TAFIIs): multiple, selective transcriptional mediators in common complexes. *Trends Biochem. Sci.* 25:59–63. (2000)
25. Roeder RG . The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 21:327–335. (1996)
26. von Hippel PH . An integrated model of the transcription complex in elongation, termination, and editing. *Science*. 281:660–665. (1998)
27. Eddy SR . Noncoding RNA genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:695–699. (1999)
28. Crick F . Split genes and RNA splicing. *Science*. 204:264–271. (1979)
29. Cech TR . Nobel lecture Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from *Tetrahymena*. *Biosci. Rep.* 10:239–261. (1990)
30. Black DL . Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell*. 103:367–370. (2000)
31. Chow LT , Gelinas RE , Broker TR . et al. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell*. 12:1–8. (1977)
32. Berget SM , Moore C , Sharp PA . Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74:3171–3175. (1977)
33. Sachs AB , Varani G . Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two side to every story. *Nat. Struct. Biol.* 7:356–361. (2000)
34. Smith, C.A. The ribosome: Cold spring harbor symposia on quantitative biology volume LXVI. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 31: 78-78. (2003)
35. Frank J . The ribosome—a macromolecular machine par excellence. *Chem. Biol.* 7:R133–141. (2000)
36. Nissen P , Hansen J , Ban N . et al. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*. 289:920–930. (2000)
37. Yusupov MM , Yusupova GZ , Baucom A . et al. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science*. 292:883–896. (2001)
38. Wimberly BT , Brodersen DE , Clemons WM . et al. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*. 407:327–339. (2000)
39. Rubio Gomez MA, Ibba M. Aminoacyl-tRNA synthetases. *RNA*. 26(8):910-936. (2020)

40. Kozak M. Regulation of translation in eukaryotic systems. *Annu Rev Cell Biol.* 8:197-225. (1992)
41. Kozak M. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene.* 234:187–208. (1999)
42. Daneholt B . A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. *Cell.* 88:585–588. (1997)
43. Allen GS, Frank J. Structural insights on the translation initiation complex: ghosts of a universal initiation complex. *Mol Microbiol.* 63(4):941-50. (2007)
44. Voges D , Zwickl P , Baumeister W . The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 68:1015–1068. (1999)
45. Sauer RT, Bolon DN, Burton BM, Burton RE, Flynn JM, Grant RA, Hersch GL, Joshi SA, Kenniston JA, Levchenko I, Neher SB, Oakes ES, Siddiqui SM, Wah DA, Baker TA. Sculpting the proteome with AAA(+) proteases and disassembly machines. *Cell.*119. (2004)
46. Cohen FE . Protein misfolding and prion diseases. *J. Mol. Biol.* 293:313–320 (1999)
47. Mitchison JM The Biology of the Cell Cycle. Cambridge: Cambridge University Press. (1971)
48. Murray AW & Hunt T The Cell Cycle: An Introduction. New York: WH Freeman. (1993)
49. Hartwell LH , Weinert TA . Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science.* 246:629–634. (1989)
50. Forsburg SL, Nurse P. Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu Rev Cell Biol.* 7:227-56. (1991)
51. Hartwell LH, Culotti J, Pringle JR, Reid BJ. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science.*183(4120). (1974)
52. Morgan DO . Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13:261–291. (1997)
53. Pavletich NP . Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and CIP and Ink4 inhibitors. *J. Mol. Biol.* 287:821–828. (1999)
54. Stillman B . Cell cycle control of DNA replication. *Science.* 274:1659–1664. (1996)
55. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell;* 81(3):323-30. (1995)
56. Neufeld TP , Edgar BA . Connections between growth and the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:784–790. (1998)
57. Harbour JW , Dean DC . The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 14:2393–2409. (2000)
58. Knudsen, E.S. & Wang, J.Y. "Targeting the RB-pathway in cancer therapy", *Clinical Cancer Research*, vol. 16, no. 4, pp. 1094-1099. (2010)
59. Ellis RE , Yuan JY , Horvitz RA . Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:663–698. (1991)
60. Li H , Yuan J . Deciphering the pathways of life and death. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:261–266. (1999)

61. Kumar, Vinay, et al. Robbins Basic Pathology. 10th ed., Elsevier - Health Sciences Division, (2017)
62. Kerr JF , Wyllie AH , Currie AR . Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer. 26:239–257. (1972)
63. Kumar S. Caspase function in programmed cell death. Cell Death Differ. 14(1):32-43. (2007)
64. Nicholson DW , Thornberry NA . Caspases: killer proteases. TIBS. 22:299–306. (1977)
65. Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. Annu Rev Genet. 33:29-55. (1999)
66. Cain K, Bratton SB, Cohen GM. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. Biochimie.84(2-3). (2002)
67. Jiang X, Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. Annu Rev Biochem. 2004
68. Ekert PG , Silke J , Vaux DL . Caspase inhibitors. Cell Death Differ. 6:1081–1086. (1999)
69. erhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. Genome Biol. 2(7) (2001)
70. Adams JM , Cory S . The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science. 281:1322–1326. (1988)
71. Chao DT , Korsmeyer SJ . BCL-2 family: regulators of cell death. Annu. Rev. Immunol. 16:395–419. (1998)
72. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. Nature. 411(6835):342-8. (2001)
73. Francisco J. Novo: Genética Humana: conceptos, mecanismos y aplicaciones de la Genética en el campo de la Biomedicina. Ed. Pearson. (2007)
74. T.Strachan, A.P. Read: Human Molecular Genetics, 5th edition. Garland Science, (2019)
75. Prescott et al. “Microbiología. 5ª Edición. Editorial Mc. Graw Hill Interamericana. (2004)
76. Herráez, A. Texto Ilustrado e Interactivo de Biología Molecular e Ingeniería Genética (2ª Edición). Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud. Editorial Elsevier España S.L., Barcelona, España. (2012)
77. Perera, J., Tormo, A., García, J. L.. Ingeniería Genética. Volumen I: preparación, análisis, manipulación y clonaje de DNA. Volumen II: expresión de DNA en sistemas heterólogos. Editorial Síntesis, Madrid, España. (2002)
78. Primrose, S. B., Twyman, R. M. Principles of Gene Manipulation and Genomics (7th Edition). Blackwell Publishing, Malden, MA. EE.UU (2006)
79. Jong W, Borm P. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. International Journal of Nanomedicine. 3(2):133-149. (2008)
80. Kreuter J, Speiser P. In Vitro Studies of Poly(methyl Methacrylate) Adjuvants. Journal of Pharmaceutical Sciences. 65(11):1624-1627. (1976)
81. Crucho C. Stimuli-Responsive Polymeric Nanoparticles for Nanomedicine. ChemMedChem. 10(1):24-38. (2014)

82. Lee B, Yun Y, Park K. Smart nanoparticles for drug delivery: Boundaries and opportunities. *Chemical Engineering Science*. 125:158-164. (2015)
83. Ganta S, Devalapally H, Shahiwala A, Amiji M. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*. 126(3):187-204. (2008)
84. Liu D, Yang F, Xiong F, Gu N. The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential. *Theranostics*. 6(9):1306-1323. (2016)
85. Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature Materials*. 12(11):991-1003. (2013)
86. Karimi M, Ghasemi A, Sahandi Zangabad P, Rahighi R, Moosavi Basri S, Mirshekari H et al. Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems. *Chem Soc Rev*. 45(5):1457-1501. (2016)
87. Roco M. The long view of nanotechnology development: the National Nanotechnology Initiative at 10 years. *Journal of Nanoparticle Research*. 13(2):427-445. (2011)
88. Bamrungsap S, Zhao Z, Chen T, Wang L, Li C, Fu T et al. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine*. 7(8):1253-1271. (2012)
89. Safari J, Zarnegar Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *Journal of Saudi Chemical Society*. 18 (2):85-99. (2014)
90. Zhao M, Biswas A, Hu B, Joo K, Wang P, Gu Z et al. Redox-responsive nanocapsules for intracellular protein delivery. *Biomaterials*. 32(22):5223-5230. (2011)
91. Ko J, Park K, Kim Y, Kim M, Han J, Kim K et al. Tumoral acidic extracellular pH targeting of pH-responsive MPEG-poly(β -amino ester) block copolymer micelles for cancer therapy. *Journal of Controlled Release*. 123(2):109-115. (2007)
92. Hunter, F.W., Barker, H.R., Lipert, B. et al. Mechanisms of resistance to trastuzumab emtansine (T-DM1) in HER2-positive breast cancer. *Br J Cancer* 122, 603–612. (2020)
93. Alonso MM, Cascallo M, Gomez-Manzano C, Jiang H, Bekele BN, Perez-Gimenez A, Lang FF, Piao Y, Alemany R, Fueyo J. ICOVIR-5 shows E2F1 addiction and potent antglioma effect in vivo. *Cancer Res*. 1;67(17):8255-63. (2007)
94. Cascallo M, Alonso MM, Rojas JJ, Perez-Gimenez A, Fueyo J, Alemany R. Systemic toxicity-efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway. *Mol Ther*. (9):1607-15. (2007)
95. Tsukuda K, Wiewrodt R, Molnar-Kimber K, Jovanovic VP, Amin KM. An E2F-responsive replication-selective adenovirus targeted to the defective cell cycle in cancer cells: potent antitumoral efficacy but no toxicity to normal cell. *Cancer Res*. 62(12):3438-47. (2002)
96. Bouard D, Alazard-Dany D, Cosset FL. Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br J Pharmacol*. 157(2):153-165. (2009)

97. Fueyo J, Gomez-Manzano C, Alemany R, Lee PS, McDonnell TJ, Mitlianga P, Shi YX, Levin VA, Yung WK, Kyritsis AP. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene*.19 (1):2-12. (2000)
98. Moffett HF, Coon ME, Radtke S, Stephan SB, McKnight L, Lambert A, Stoddard BL, Kiem HP, and Stephan MT, Hit-and-run programming of therapeutic cytoreagents using mRNA nanocarriers, *Nature Comm*. 8 389. (2017)
99. Stewart MP, Sharei A, Ding X, Sahay G, Langer R, and Jensen KF, In vitro and ex vivo strategies for intracellular delivery, *Nature* 538 183–192. (2016)
100. Kami D, Takeda S, Itakura Y, Gojo S, Watanabe M, Toyoda M. Application of magnetic nanoparticles to gene delivery. *Int J Mol Sci*.12(6):3705-22. (2011)
101. Kang, J. H., Krause, S., Tobin, H., Mammoto, A., Kanapathipillai, M., and Ingber, D. E. A combined micromagnetic-microfluidic device for rapid capture and culture of rare circulating tumor cells. *Lab Chip* 12, 2175–2175. (2012)
102. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 65(1):36-48. (2013)
103. Lee SE, Jin RJ, Lee SG, Yoon SJ, Park MS, Heo DS, Choi H. Development of a new plasmid vector with PSA-promoter and enhancer expressing tissue-specificity in prostate carcinoma cell lines. *Anticancer Res*. 20(1A):417-22. (2000)
104. Chen, JS., Liu, JC., Shen, L. et al. Cancer-specific activation of the survivin promoter and its potential use in gene therapy. *Cancer Gene Ther* 11, 740–747. (2004).
105. Chen C, Yue D, Lei L, Wang H, Lu J, Zhou Y, et al. Promoter-Operating Targeted Expression of Gene Therapy in Cancer: Current Stage and Prospect. *Mol Ther - Nucleic Acids* 508–14. (2018)

Anexos

PRIMERA BASE	SEGUNDA BASE				TERCERA BASE
	U	C	A	G	
U	UUU Fenilalanina	UCU Serina	UAU Tirosina	UGU Cisteína	U
	UUC	UCC	UAC	UGC	C
	UUA Leucina	UCA	UAA Stop	UGA Stop	A
	UUG	UCG	UAG Stop	UGG Triptófano	G
C	CUU Leucina	CCU Prolina	CAU Histidina	CGU Arginina	U
	CUC	CCC	CAC	CGC	C
	CUA	CCA	CAA Glutamina	CGA	A
	CUG	CCG	CAG	CGG	G
A	AUU Isoleucina	ACU Treonina	AAU Asparragina	AGU Serina	U
	AUC	ACC	AAC	AGC	C
	AUA Metionina	ACA	AAA Lisina	AGA Arginina	A
	AUG	ACG	AAG	AGG	G
G	GUU Valina	GCU Alanina	GAU Ácido	GGU Glicina	U
	GUC	GCC	GAC	GGC	C
	GUA	GCA	GAA Ácido	GGA	A
	GUG	GCG	GAG Glutámico	GGG	G

Figura A-1. La tabla muestra el código genético con los 64 tripletes de nucleótidos o codones posibles con sus correspondientes aminoácidos.

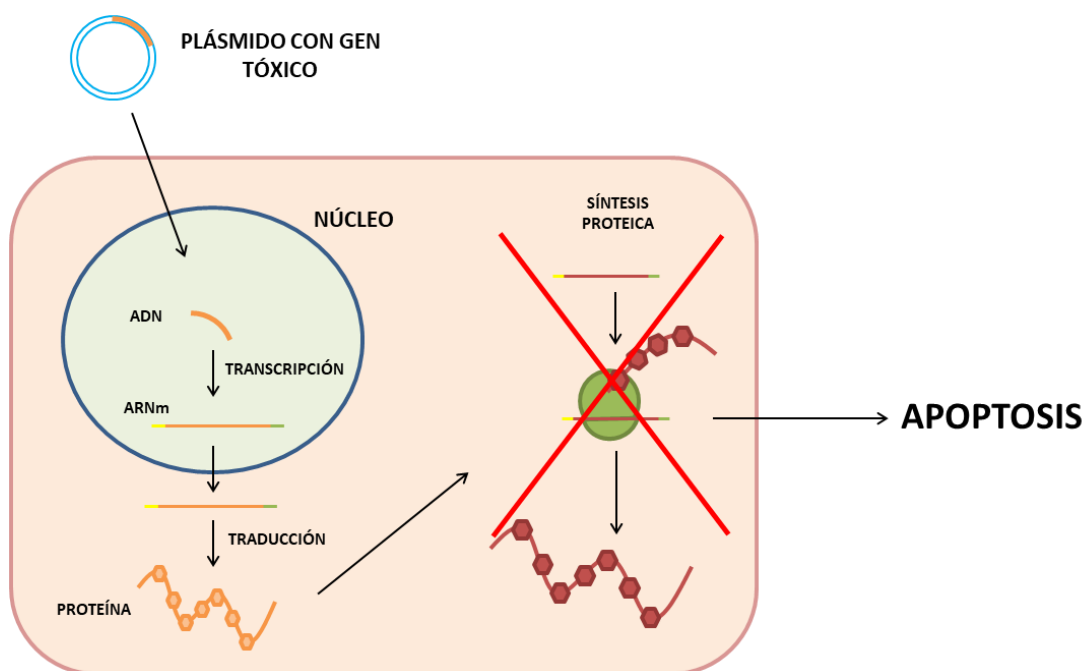


Figura A-2. En el diagrama se presenta la hipótesis planteada, exponiendo que el empleo de un gen determinado puede dar resultado a un producto el cual interrumpa todos los procesos de síntesis proteica de la célula y con ello conduciendo a la apoptosis.

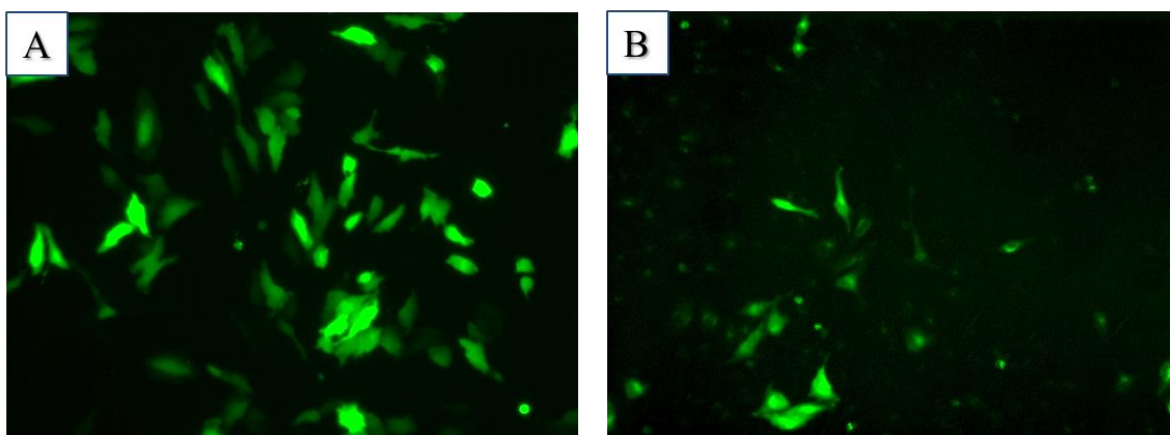


Figura A-3 Comparación preliminar entre los niveles de expresión de un plásmido subrogado y otro no específico en células HeLa. En la figura se observan células HeLa transfectadas con el plásmido pUB con un promotor ubicuo y GFP (A), se puede apreciar la mayor intensidad y el mayor número de células que presentan la proteína fluorescente. Por otra parte aquellas que han sido transfectadas con el plásmido condicionado (pACT) y GFP, muestran una intensidad un poco menor (B), no obstante se muestran en unos niveles bastante aceptables entendiéndose que es un plásmido específico.



Figura A-4. Vídeo de la manipulación de células con nanopartículas captadas en su interior, aplicando un campo magnético.

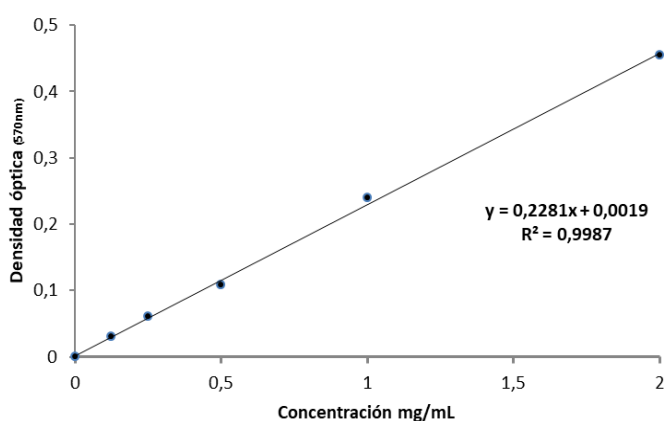


Figura A-5. Curva patrón resultante del ensayo con BCA. En la imagen se pueden observar las distintas mediciones realizadas junto a la ecuación de la recta que se utilizaría más adelante para calcular nuestras muestras.

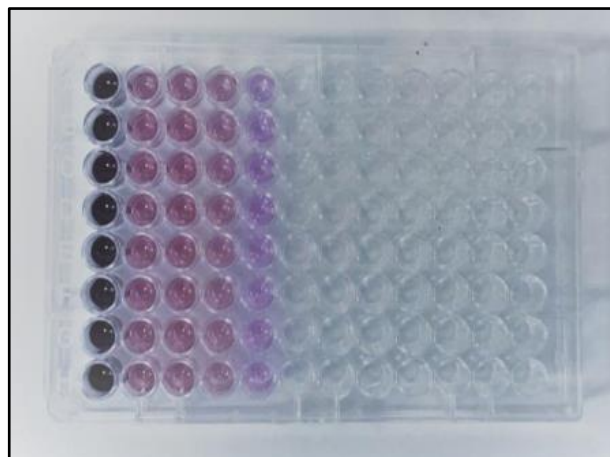


Figura A-6. Curva patrón resultante del ensayo con BCA. En la imagen se puede observar las distintas mediciones realizadas de manera visual, las cuales conforman los distintos puntos de la recta patrón del BCA. Se puede notar que a menor concentración proteica la coloración disminuye en intensidad.




CC0 1.0 Universal (CC0 1.0) Public Domain Dedication

This is a human-readable summary of the [Legal Code \(read the full text\)](#). [Disclaimer](#)

No Copyright



The person who associated a work with this deed has **dedicated** the work to the public domain by waiving all of his or her rights to the work worldwide under copyright law, including all related and neighboring rights, to the extent allowed by law.

You can copy, modify, distribute and perform the work, even for commercial purposes, all without asking permission. See **Other Information** below.



Figura A-7. Permisos para la figura I-29.

NANOPARTÍCULA	D _H (nm)	PDI	ZETA(mV)	D TEM (nm)
Fe ₃ O ₄ @PEI	80,44	0,375	28,7	10
Fe ₃ O ₄ @PDA	163	0,283	22	14,9
Fe ₅ C ₂ @SiO ₂	45,15	0,445	-45,7	19

Tabla A-1. En la figura se representan los principales parámetros de las partículas utilizadas, siendo estos el diámetro hidrodinámico (D_H), la polidispersidad (PDI), el potencial Zeta y el diámetro medido en microscopia electrónica. Un valor correcto comprendido en los rangos de referencia como pueden ser en la polidispersidad o el potencial zeta, proporciona una menor toxicidad en las partículas así como una mejora en la captación de las mismas, por parte de las células.



El cáncer figura entre las principales causas de mortalidad humana, y se vuelve intratable cuando se propaga desde el lugar de aparición del tumor primario a los diferentes órganos. Hasta principios del siglo XX, la terapia del cáncer se limitaba a la extirpación del tumor mediante la cirugía. El tratamiento de las enfermedades oncológicas necesita tener un enfoque de extrema precisión para maximizar los beneficios y reducir los riesgos. La expresión dirigida de genes de interés, que incluyen distintos sistemas de administración y expresión operativa de promotores de genes específicos, es una estrategia innovadora para la terapia génica contra el cáncer. A lo largo de este trabajo, hemos aprovechado los mecanismos biológicos propios de las células cancerígenas para utilizarlos en su contra.