

**EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE MUERTE CELULAR INDUCIDO POR UNA
PROTEÍNA DE FUSIÓN RECOMBINANTE GENERADA A PARTIR DE LOS
GENES DE LAS PROTEÍNAS B13R Y Tk DEL VIRUS DEL HERPES SIMPLE,
EN LÍNEAS CELULARES TRATADAS CON GANCICLOVIR**

EDDY CAROLINA BETANCOURT VILLAMIZAR

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS
BUCARAMANGA
2012**

**EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE MUERTE CELULAR INDUCIDO POR UNA
PROTEÍNA DE FUSIÓN RECOMBINANTE GENERADA A PARTIR DE LOS
GENES DE LAS PROTEÍNAS B13R Y Tk DEL VIRUS DEL HERPES SIMPLE,
EN LÍNEAS CELULARES TRATADAS CON GANCICLOVIR**

EDDY CAROLINA BETANCOURT VILLAMIZAR

**Trabajo de Investigación para optar al título de Maestro en Ciencias Básicas
Biomédicas**

**Director
H José Arteaga, MD PhD
Co-Director
Maria E Cardona, Mc PhD**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BASICAS
MAESTRIA EN CIENCIAS BASICAS BIOMEDICAS
BUCARAMANGA
2012**

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	11
1. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE	16
1.1 Terapia génica	16
1.2 Terapia con genes que codifican para enzimas activadoras de pro-fármacos -GDEPT 17	
1.3 Terapia con genes suicidas mediada por el sistema HSVtk/GCV	20
1.4 Respuesta Inmune Antitumoral	23
1.5 HSVtk/GCV y respuesta inmune específica antitumoral.....	28
1.6 Muerte Celular.....	29
1.6.1 Apoptosis y Necrosis.....	29
1.6.2 Mecanismos de muerte celular no-apoptóticos	32
1.6.2.1 Muerte Celular Tipo II.....	32
1.6.2.2 Necroptosis	34
1.6.2.3 Muerte Necrótica mediada por PARP1.....	36
1.7 Proteína B13R	36
2. OBJETIVOS.....	39
2.1 Objetivo Principal.....	39
2.2 Objetivos Específicos.....	39
3. MATERIALES Y METODOS	40
3.1 Diseño y construcción de vectores de fusión expresando los genes Tk y/o SPI-2 ...	40
3.2 Cultivo celular y transfección.....	41
3.3 Tinción con GIEMSA.....	41
3.4 Microscopía confocal	41
3.5 Citometría de flujo.....	42
3.6 Electroforesis SDS-PAGE y análisis de electroinmunoensayo.....	42
3.7 Evaluación de apoptosis.....	43
3.7.1 Expresión de la fosfatidil serina.....	43
3.7.2 Potencial de membrana mitocondrial.....	44
3.7.3 Actividad de Caspasa-3.....	44

4. RESULTADOS	46
4.1 El vector pEGFP-SPI2-Tk expresa una proteína de fusión con localización y características específicas	46
4.2 El sistema HSVTk/GCV en presencia de la proteína B13R induce un tipo de muerte celular con características morfológicas diferentes a las de la apoptosis en células HEK-293T	49
4.3 El sistema HSVTk/GCV en presencia de la proteína B13R induce una muerte celular tardía, asociada a cambios en la expresión de la fosfatidil serina en la membrana citoplasmática de células HEK-293T	52
4.4 El sistema HSVTk/GCV en presencia de la proteína B13R inhibe la actividad proteolítica tipo caspasa 3 en células HEK-293T	54
4.5 El sistema HSVTk/GCV en presencia de la proteína B13R induce pérdida del PMM en menor proporción a la observada en un proceso de apoptosis en células HEK-293T	55
5. DISCUSION	58
6. CONCLUSIONES	64
7. PERSPECTIVAS	65
8. BIBLIOGRAFIA	¡Error! Marcador no definido.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia de morbilidad por cáncer en el mundo en el año 2008.....	11
Figura 2. Activación del GCV mediante fosforilación.	22
Figura 3. Representación esquemática de los mecanismos de la respuesta inmune antitumoral. Modificado de [55].....	24
Figura 4. Mecanismos moleculares de otros tipos de muerte celular no-apoptótica.	33
Figura 5. Niveles de las proteínas GFP y B13R-Tk-GFP en extractos de proteínas totales de células HEK-293T transfectadas con los plásmidos pEGFPN3 y pEGFP-SPI2-Tk.	46
Figura 6. Niveles de expresión de GFP en células HEK-293T transfectadas con diferentes plásmidos reporteros.....	47
Figura 7. Localización de la proteína de fusión EGFP-B13R y la proteína EGFP nativa en células Cos7.....	48
Figura 8. Aspecto morfológico de células HEK-293T luego del tratamiento con el sistema HSVTk/GCV, en presencia o ausencia de la proteína B13R.	49
Figura 9. Características morfológicas asociadas al proceso muerte celular en células HEK-293T luego del tratamiento con el sistema HSVTk/GCV, en presencia o ausencia de la proteína B13R.....	50
Figura 10. Expresión de fosfatidil serina e integridad de la membrana plasmática de células HEK-293T luego del tratamiento con el sistema HSVTk/GCV, en presencia o ausencia de la proteína B13R.	53
Figura 11. Inhibición de caspasa-3 en células HEK-293T luego del tratamiento con el sistema HSVTk/GCV, en presencia o ausencia de la proteína B13R.....	55
Figura 12. Cambios en el potencial de membrana mitocondrial (PMM) en células HEK-293T luego del tratamiento con el sistema HSVTk/GCV, en presencia o ausencia de la proteína B13R.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

ACV	Aciclovir
Ag	Antígeno
ATG	Genes relacionados con autofagia
Bcl2	Linfoma 2 Célula B
BE	Efecto Bystander
BNIP3	ProteínaBCL2/adenovirus E1B 19kd-interactuante 3
CMH	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CXCR4	C-X-C (alfa) quimioquina receptor 4
GCV	Ganciclovir
GCV-TP	Ganciclovir Trifosfatado
GDEPT	Terapia con genes que codifican para enzimas activadoras de pro-fármacos (<i>Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy</i>)
GFP	Proteína Verde Fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
HSV	Virus del Herpes Simple
IL	Interleucina
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide
PMM	Potencial de Membrana Mitocondrial
OMS	Organización Mundial de la Salud
PARP1	Poly [ADP-ribosa] polimerasa- 1
PI	Yoduro de Propidio
PT	Permeabilidad mitocondrial
Tk	Timidin Quinasa
VIH-1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1

EVALUACIÓN DEL MECANISMO DE MUERTE CELULAR INDUCIDO POR UNA PROTEÍNA DE FUSIÓN RECOMBINANTE GENERADA A PARTIR DE LOS GENES DE LAS PROTEÍNAS B13R Y Tk DEL VIRUS DEL HERPES SIMPLE, EN LÍNEAS CELULARES TRATADAS CON GANCICLOVIR*

Autores: BETANCOURT-VILLAMIZAR, Eddy C. CARDONA, Maria E. ARTEAGA, H José**

Palabras Clave: HSVTk/GCV, GDEPT, SPI-2, proteína fusión reportera GFP, muerte celular

En el área de la terapia génica antitumoral se han propuesto diferentes alternativas. El método GDEPT parece ser una alternativa bastante promisoria. Para la GDEPT se han explorado diversas combinaciones de enzimas y pro-fármacos. La combinación HSV/Tk y GCV, ha sido el sistema más investigado. En este sistema, la muerte celular es inducida por el GCV al ser fosforilado por HSV/Tk e inhibir la síntesis de DNA y desencadenar apoptosis. En los tratamientos antitumorales es deseable que la muerte celular se asocie a la inducción de una fuerte respuesta inmune antitumoral. Aunque Tk/GCV permite la ablación de un número considerable de células tumorales, la apoptosis es poco inmunogénica.

Nosotros creemos que modificando el mecanismo de muerte celular en Tk/GCV se podría mejorar su inmunogenicidad y eficiencia. Hemos propuesto adicionar a este sistema, la proteína inhibidora de caspasas B13R y hemos diseñado y construido una proteína recombinante de fusión, constituida por B13R del VV, fusionada con Tk y GFP.

La evaluación de Tk/GCV en presencia de B13R en células HEK-293T, mostró que, en este sistema, la muerte celular ocurre mediante un mecanismo diferente a la apoptosis, caracterizada por: diferencias morfológicas, baja actividad de caspasas, compromiso del potencial de membrana de membrana mitocondrial por disminución con respecto al proceso clásico de apoptosis, expresión de fosfatidil serina en la membrana y pérdida de la integridad de la membrana plasmática. Considerando la función de B13R como inhibidor de caspasas y su efecto a estímulos apoptóticos irreversibles, es posible sugerir que este tipo de muerte celular pudiera ser una de las formas de necrosis programada.

Este sistema pudiera utilizarse para estudios del efecto de las formas de muerte celular sobre el sistema inmune y especialmente, su respuesta ante las diferentes formas de muerte de células tumorales y su posible aplicación como método alternativo de GDEPT.

* Tesis de grado de Master en Ciencias Biomédicas

** Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director ARTEAGA,

** Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director ARTEAGA, H José, Codirector CARDONA, Maria E.

EVALUATION OF THE MECHANISM OF CELL DEATH INDUCED BY A RECOMBINANT FUSION PROTEIN GENERATED FROM GENES OF THE PROTEINS B13R AND HERPES SIMPLEX VIRUS Tk, IN CELL LINES TREATED WITH GANCICLOVIR*

Authors: BETANCOURT-VILLAMIZAR, Eddy C. CARDONA, Maria E. ARTEAGA, H José**

Key Words: HSVtk/GCV, GDEPT, SPI-2, fusion reporter protein B13R-GFP, cell death

In the field of antitumoral gene therapy different approaches have been proposed. GEDPT seems to be a very promising alternative. For GDEPT various combinations of enzymes and pro-drugs have been explored. HSV/Tk and GCV has been the most extensively investigated combination. In this method, cell death is induced by GCV which, when phosphorylated by the HSVtk, inhibits the DNA synthesis and triggers apoptosis. In all cancer treatments it is desirable that the tumor cell death could lead to induction of strong immune response against tumors. Although Tk/GCV system enables the ablation of a substantial number of tumor cells, apoptotic cell death is poorly immunogenic.

We believe that by modifying the mechanism of cell death in TK/GCV could improve its immunogenicity and efficiency. We have proposed to add to this system, the caspase inhibitor protein B13R. For that, we have designed and constructed a vector that expresses the DNA sequence encoding the recombinant fusion protein, comprising B13R VV, with the HSV/Tk and GFP.

The evaluation of the Tk/GCV in the presence of B13R in HEK-293T cells, showed that, in this model, cell death occurs by a different mechanism to apoptosis, characterized by: morphological differences, low caspase activity, decreased MMP with respect to the classical process of apoptosis, expression of phosphatidylserine on the outside of the plasma membrane and loss of the plasma membrane integrity. Considering the role of the caspase inhibitor B13R on the effect of an irreversible apoptotic stimuli, it is possible to suggest that this type of cell death could be one of the programmed necrosis forms.

HSVtk-B13R/GCV could be used for studies of the effect of different forms of cell death on the immune system and, particularly the kind of response to various forms of tumor cell death and its possible application as an alternative method of GDEPT.

* Thesis of grade of Master in Basic Biomedical Sciences

** Faculty of Health, Medicine School. Master in Basic Biomedical Sciences. Thesis supervisor ARTEAGA, H José. Cosupervisor CARDONA, Maria E

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un problema de salud pública de importancia global. Anualmente se presentan alrededor de 13'000.000 nuevos casos y según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, esta forma de enfermedad causa aproximadamente 7'500.000 de muertes por año (Figure 1) [1]. Aunque actualmente se han desarrollado grandes avances en el tratamiento farmacológico de las enfermedades tumorales, aun existen muchos casos de tumores que no responden a ningún tipo de tratamiento y en su gran mayoría, después de cierto estado de desarrollo, son incurables. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas entre las cuales, y tal vez las más exploradas, son la terapia génica y la inmunoterapia.

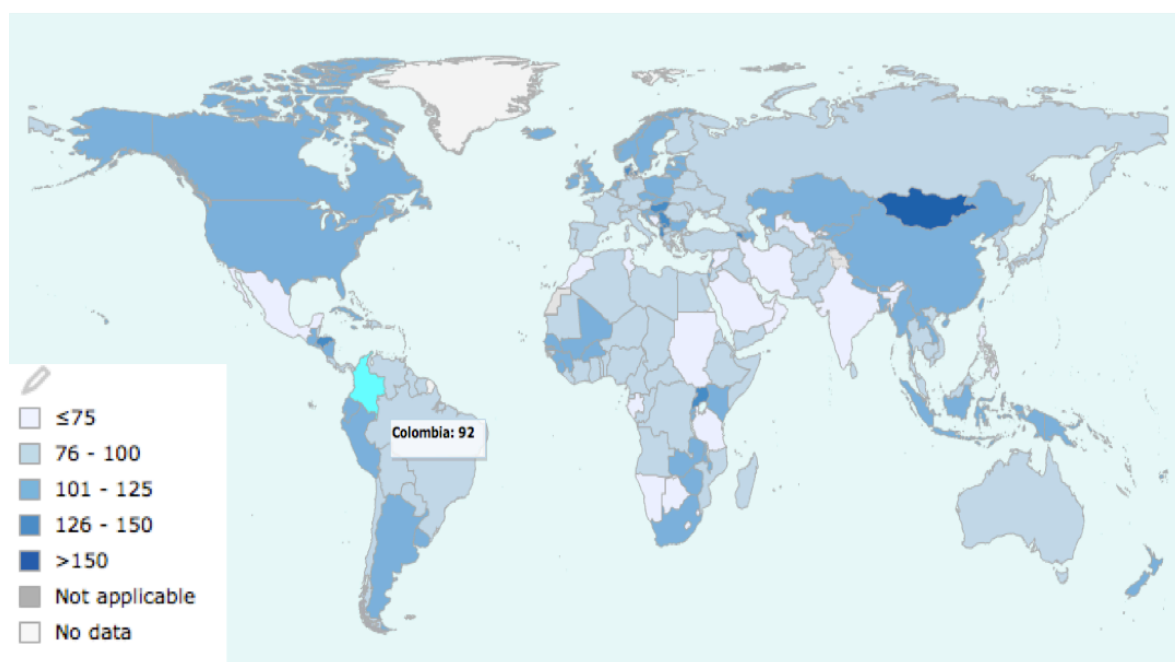


Figura 1. Incidencia de morbilidad por cáncer en el mundo en el año 2008.
Datos reportados por la OMS. En Colombia la incidencia por año asciende a 92 casos por cada 100,000 habitantes[1]

Los cánceres de pulmón, estómago, hígado, colon y mama son la causa principal de mortalidad en el mundo. Entre estos tipos de tumores existen grandes diferencias debido a la complejidad de los eventos conducentes al desarrollo de cualquier tipo de tumor, los cuales generalmente, involucran a lo largo del proceso de transformación tumoral, una gran variedad de alteraciones genéticas. Sin embargo, este mismo hecho podría considerarse una característica común, es decir, debido al gran número de alteraciones en el perfil de expresión génica que presentan las células tumorales, éstas podrían considerarse como células que, en un contexto fisiológico específico, exhiben características antigénicas diferentes con respecto a sus células parentales no-tumorales.

Adicionalmente, en todos los procesos de transformación tumoral existen algunas otras características comunes, e inclusive alteraciones comunes en la expresión de genes bien definidos o grupos de éstos, que serían blancos terapéuticos estratégicos para su silenciamiento e inducción de muerte de las células tumorales por técnicas de terapia génica. Sin embargo, la modificación génica de todas las células tumorales por medio de esta técnica parece ser una meta difícil de alcanzar con la tecnología actual. Una posible alternativa para el tratamiento de tumores por medio de terapia génica es la inducción de la ablación de las células tumorales, directamente a través de la modificación de las células tumorales con los denominados genes suicidas o indirectamente mediante terapia inmunogénica.

Uno de los genes suicidas más estudiados es el gen de la Timidin Quinasa del virus del herpes simple tipo 1 (HSVTK, del inglés *Herpes simplex virus type 1, thymidine kinase*). Esta enzima convierte el pro-fármaco Ganciclovir (GCV) en un producto citotóxico que afecta solo las células en división. Las células tumorales modificadas con el gen *HSVTK* son eliminadas *in vivo* después del tratamiento con GCV (HSVTK/GCV) [2]. En algunos casos, este tratamiento está asociado con la erradicación de células tumorales distantes no modificadas (efecto *bystander*

distante). Este efecto parece estar mediado por una respuesta inmune antitumoral específica, la cual involucra tanto células T CD8+ como CD4+ y genera memoria inmunológica [3].

Recientemente, se ha generado un gran interés con respecto a los mecanismos de muerte de células infectadas, especialmente por virus, que conducen a una buena respuesta inmune antimicrobiana o a una evasión de ésta; igualmente se ha intentado correlacionar estos eventos con lo que pudiera suceder durante la eliminación de células propias y la generación de una respuesta autoinmune y finalmente con los mecanismos de muerte celular que podrían generar el mejor tipo de respuesta en modelos de vacunas celulares antitumorales. Aún no está completamente claro si los mecanismos de muerte celular asociados a la inducción de una buena respuesta inmune contra antígenos exógenos o endógenos son la necrosis, la apoptosis o un mecanismo diferente.

En muchos casos, la terapia génica suicida con HSVtk/GCV induce muerte celular por apoptosis. Sin embargo, algunas observaciones recientes sobre los procesos de muerte de células infectadas por virus sugieren que la inducción de muerte celular por necrosis puede ser un evento más inmunogénico que la apoptosis, la cual es el mecanismo fisiológico normal de remoción de células senescentes y remodelación de tejidos. Por lo anterior, creemos que la técnica de suicidio génico es una buena alternativa para el desarrollo de vacunas celulares antitumorales pero es importante desarrollar sistemas alternativos de terapia con suicidio génico que permitan la inducción de muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis con el fin de identificar las mejores condiciones para la inducción de una respuesta inmune óptima contra tumores mediante este procedimiento.

Recientemente, se ha demostrado que líneas celulares que expresan la proteína anti-apoptótica B13R del virus vaccinia mueren por un mecanismo de necrosis cuando son sometidas a estímulos pro-apoptóticos irreversibles [4]. Esto permite

proponer que la inducción de muerte celular por el método HSVtk/GCV en presencia de la proteína B13R pudiera generar muerte celular por necrosis y que este mecanismo en un modelo de terapia génica mediada por suicidio génico pudiera inducir una respuesta inmune antitumoral más eficiente. En este trabajo se presenta el desarrollo y la caracterización de un sistema de inducción de muerte celular por el sistema de HSVtk/GCV en presencia de la proteína B13R.

Dada la complejidad que presenta el cáncer como enfermedad al tratarse esencialmente de una enfermedad genética, se ha observado una baja eficiencia de los tratamientos convencionales que adicionalmente presentan serias desventajas como son los efectos adversos por citotoxicidad, el no control de la metástasis y la recidiva en tejidos próximos, entre otras. De allí, surge la necesidad de buscar nuevos tipos de terapia que conserven los efectos de daño al ADN que se causa a las células tumorales y la inducción de muerte celular observadas en los tratamientos convencionales; pero además, se reconozcan las diferencias bioquímicas, ambientales y moleculares de las células tumorales con el fin de reducir la toxicidad de las células normales. La terapia genética con genes suicidas se observa como una buena alternativa de medicina molecular que mediante la introducción de material genético a las células induce modificación de los componentes genéticos de las células obteniendo fines terapéuticos. El sistema HSV-Tk/GCV, es un tipo de terapia ampliamente usado, incluso en estudios de investigación fase clínica III, y que actúa eficientemente en la inhibición de la síntesis de ADN de las células tumorales en división.

Dada la experiencia de nuestro grupo en la terapia genética antitumoral con el sistema HSVtk/GCV y su efecto inmunogénico creemos que puede mejorarse adicionando nuevos adyuvantes y cambiando el mecanismo de muerte celular de apoptosis a necrosis. Esto último es posible adicionando al sistema HSV-Tk/GCV péptidos inhibidores de caspasas pero para una aplicación *in vivo*, un gen codificador de una proteína híbrida generada a partir de la fusión gen de la HSVtk

y el gen SPI-2 (codificador de una proteína inhibidora de caspasas B13R) pudiera tener efecto similar. Este vector pudiera utilizarse en modelos de vacunas de ADN o vacunas celulares antitumorales, utilizando como fuente de antígeno genes codificadores para proteínas antigénicas o células tumorales modificadas con la proteína de fusión TK-B13R y subsecuente tratamiento con GCV.

1. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

1.1 Terapia génica

La terapia génica fue concebida, inicialmente, como una estrategia para tratar enfermedades causadas por alteraciones de genes claramente definidos mediante la modificación de diversos tipos de células, insertando en su genoma una copia del gen normal. Blaese y colaboradores llevaron a cabo el primer ensayo clínico de terapia génica en un paciente con inmunodeficiencia severa congénita debida a un déficit en la producción de adenosina deaminasa mediante la modificación génica *ex vivo* de linfocitos periféricos y su posterior re-infusión en el paciente [5]. Desde entonces, han transcurrido más de dos décadas durante las cuales se han desarrollado varios ensayos clínicos para el tratamiento de diversos tipos de patologías congénitas monogénicas, los cuales en su conjunto han incluido un número considerable de pacientes. Hasta la fecha, tal vez el ensayo mas relevante se llevó a cabo en Francia a finales de los años 90, en el cual se trató un grupo de niños con inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X mediante el trasplante de médula ósea autóloga, cuyas células fueron modificadas *ex vivo* con la versión correcta del gen de la cadena γ de la Interleuquina 2 [6].

Sin embargo, a lo largo del tiempo, se han desarrollado otros tipos y aplicaciones de terapia génica, basados en la modificación genética de células o tejidos para conferirles características especiales, los cuales incluyen modelos de tratamiento para enfermedades cardiovasculares [7], enfermedades neoplásicas [8] e incluso de la infección por VIH-1 [9], entre otros. Una de estas aplicaciones es la eliminación de células no deseadas mediante su modificación con un gen suicida o genes estimuladores de la respuesta inmune cuya aplicación más importante pudiera ser el tratamiento de enfermedades neoplásicas.

1.2 Terapia con genes que codifican para enzimas activadoras de pro-fármacos -GDEPT

La quimioterapia, la radioterapia y la cirugía han sido utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de las enfermedades malignas con una eficiencia y especificidad, en muchos casos limitada y casi siempre asociada a efectos secundarios importantes. Adicionalmente, el tratamiento farmacológico frecuentemente induce el surgimiento de sub-poblaciones de células tumorales resistentes.

La terapia génica se ha propuesto como una nueva estrategia de tratamiento para enfermedades tumorales y hasta la fecha se han estudiado y evaluado experimentalmente diversos enfoques metodológicos. En algunos modelos se busca la inducción directa de muerte de las células tumorales a través de la reconstitución con genes supresores, tales como *p53* cuya función se encuentra alterada en un alto porcentaje de tumores [revisado en ¹⁰]; otros modelos buscan la inhibición de oncogenes, algunos de los cuales codifican para factores de transcripción que son esenciales para el mantenimiento de la proliferación celular [¹¹], o el silenciamiento de receptores de las células tumorales a través de los cuales se induce el mantenimiento de la proliferación tumoral celular [^{12, 13}], entre otros.

Una estrategia diferente busca, mediante modificación genética, la sensibilización de las células tumorales al efecto de ciertos fármacos anticancerígenos [¹⁴] o bien, la quimio-sensibilización de células tumorales a través de su modificación con genes suicidas [¹⁵]; ésta última es una de las formas más utilizadas. Sin embargo, la mayoría de estos modelos carecen, en distintos grados, de niveles aceptables de eficiencia y/o especificidad para modificar todas las células tumorales y evitar la afectación de células normales, respectivamente. Otras estrategias buscan la inducción de una respuesta inmune antitumoral, la cual podría alcanzar altos grados de especificidad dadas las propiedades de reconocimiento del sistema inmune, esta vía podría llevarse a cabo bien sea modificando las células tumorales

con el propósito de volverlas más inmunogénicas o mediante la inmunización, utilizando genes codificadores de antígenos específicos de tumores [¹⁶, ¹⁷].

La estrategia de modificar las células tumorales con genes que codifican para enzimas que activan sustancias potencialmente tóxicas o pro-fármacos (genes suicidas) conocida como GDEPT (del inglés, *gene-directed enzyme prodrug therapy*) [¹⁸, ¹⁹] es una de las estrategias de terapia génica promisorias para el tratamiento del cáncer.

En la GDEPT, el gen suicida es introducido en las células tumorales por diversos métodos. Posteriormente, se administra el pro-fármaco correspondiente, el cual será activado por la enzima codificada por el gen suicida para convertirlo en el respectivo fármaco dentro de la célula tumoral. Debido a que los pro-fármacos utilizados no presentan actividad intrínseca en las células humanas no modificadas y puesto que la enzima solo se expresa en las células tumorales, esta estrategia disminuiría significativamente los efectos secundarios observados durante la administración sistémica de fármacos antitumorales. Adicionalmente, este método permite la administración de cantidades altas de pro-fármaco para alcanzar altas concentraciones del agente tóxico restringidas al tejido tumoral o a células muy próximas a éste.

Por otro lado, el sistema gen suicida/pro-fármaco puede ser diseñado para conferirle selectividad de acción a nivel tumoral, por ejemplo, utilizando vectores portadores de genes suicidas que se expresan bajo el control de promotores respondedores a elementos reguladores específicos de los distintos tipos de células tumorales [²⁰]. Otra estrategia sería la utilización de pro-fármacos que son preferentemente activos en las células hipóxicas [²¹].

Una de las limitaciones de la mayoría de los procedimientos de terapia génica es la imposibilidad de modificar genéticamente todas las células blanco, debido a las limitaciones en la eficiencia de los métodos de transferencia de genes. La GDEPT,

en algunos casos, se asocia al transporte intercelular del producto del gen y/o el pro-fármaco activado dando lugar al llamado "efecto bystander" o efecto espectador (BE; del inglés *bystander effect*), el cual permite la ablación de tumores enteros, aunque no todas las células blanco hayan sido modificadas con el gen suicida.

El BE es la principal característica que, para la mayoría de las aplicaciones, debe poseer cualquier estrategia de GDEPT para que sea exitosa. Inicialmente, este tipo de terapia se desarrolló teóricamente como una alternativa clínica paliativa debido a la imposibilidad de modificar genéticamente todas las células de una masa tumoral para su eliminación, lo cual es un requisito esencial para una aplicación terapéutica.

Algunos estudios realizados con una variedad de combinaciones de genes suicidas/pro-fármaco, han demostrado que la erradicación completa del tumor es posible incluso cuando el producto del gen suicida se expresa en menos de un 10% de las células tumorales [22, 23, 24]. El BE funciona a través de la libre difusión de los metabolitos tóxicos o mediante mecanismos de comunicación intercelular mediados por los espacios presentes en algunas de las uniones intercelulares conocidos como uniones *gap* [25, 26, 27]. Sin embargo, ambos mecanismos pueden presentar desventajas; el primero porque puede acarrear riesgos sistémicos debidos a la difusión y por lo tanto aumentar la toxicidad, mientras que el segundo presenta la desventaja de que muchas células tumorales no tienen uniones *gap* funcionales [28, 29, 30].

El BE es dependiente de varias características relacionadas tanto con la clase de pro-fármaco utilizado como con la naturaleza de las células tratadas [31, 32]. Un hallazgo muy importante fue la demostración de que el BE, en algunos modelos, podía ser potenciado por una respuesta inmune antitumoral específica, desarrollada después del tratamiento. La inducción de este tipo de respuesta pudiera ser mediada por la liberación de "antígenos tumorales". Estas moléculas

podrían actuar como “señales de peligro” para el sistema inmune, el cual podría, en este contexto, generar una respuesta inmune específica contra las sustancias potencialmente antigénicas del tumor y de esta manera eliminar células tumorales que no expresan el gen suicida, las cuales pueden estar localizadas aun en sitios distantes del tumor original produciendo de esta manera el efecto de espectador o “bystander” distante. Adicionalmente, este efecto persiste en el tiempo, lo cual significaría un proceso de inmunización o “efecto de vacunación” [33, 34]. Esta propiedad de algunos sistemas de la GEDPT la hace muy atractiva, por cuanto el tratamiento de un tumor localizado podría conducir a la destrucción de metástasis distantes procedentes del tumor primario.

Se ha sugerido que la activación del sistema inmunológico mediada por la GDEPT pudiera ser modulado, incluso, por la elección de un sistema de suicido génico, dependiendo de si los mecanismos de muerte celular inducidos por la terapia están mediados principalmente por apoptosis o por necrosis [11].

Para el diseño de un sistema de terapia basado en el sistema gen suicida/profármaco muchos otros aspectos adicionales a los expuestos anteriormente, deben ser considerados. Sin embargo, dado el enfoque de este trabajo, el énfasis ha sido orientado hacia los posibles efectos de los mecanismos de muerte celular inducidos por un tipo de GDEPT específico, la terapia de suicidio génico mediada por el sistema HSVtk/GCV.

1.3 Terapia con genes suicidas mediada por el sistema HSVtk/GCV

Se han estudiado diversos sistemas de GDEPT, muchos de los cuales son muy prometedores y se encuentran en diferentes etapas de desarrollo que van desde estudios preclínicos *in vitro* hasta ensayos clínicos en fase III. En algunos de ellos se han estudiado, con algún detalle, aspectos referentes a los mecanismos de inducción de muerte celular y al efecto BE distante y, este último, especialmente

en lo relacionado con los aspectos inmunológicos mediadores de este tipo de respuesta (Tabla 1).

Tabla 1. Diversas combinaciones y tipos de GDEPT

Enzima	Pro-fármaco	Modo de acción de los metabolitos tóxicos	Transporte de metabolitos tóxicos	Probado clínicamente	Efecto Bystander
Timidin Quinasa HSV-1	Ganciclovir- Aciclovir-Penciclovir	Bloqueo de síntesis de ADN. Inhibición de la ADN polimerasa	Vía uniones gap	Fase III	BE Local y Distante
Citosin Deaminasa <i>E. coli-S. Cerevisiae</i>	5-fluorocitosina	Bloqueo de ADN y síntesis de ARN	Uniones gap y difusión	Fase II	BE Local y Distante
Purina nucleósido fosforilasa <i>E. coli</i>	6-Metil-purine fludarabina fosfato	Bloqueo ADN, ARN y síntesis de proteínas	Difusión Pasiva	No	BE Local y Distante
Nitroreductasa <i>E. Coli</i>	Dinitroaziridinil benzamida	Agente alquilante. Entrecruzamiento del ADN en células en ciclo y no en ciclo	Difusión	Fase I	BE Potente local/distante
Citocromo P 450 Humano, Conejo, Ratón	Ciclofosfamida	Entrecruzamiento del ADN en células en ciclo y no en ciclo	Difusión	No	BE Potente local/distante

GDETP del inglés, *gene-directed enzyme prodrug therapy*, BE del inglés, *bystander effect*

El sistema de terapia de suicidio génico HSVtk/GCV ha sido el más ampliamente investigado hasta el momento. El primer estudio realizado fue publicado en el año 1986 cuando se logró la activación del pro-fármaco derivado del aciclovir, GCV (9-([2-hidroxi-1-(hidroximetil)etoxi]metil)guanina), mediante la expresión del gen *HSVtk* en líneas celulares de fibroblastos murinos [35].

Desde entonces ha sido evaluado en combinación con diferentes pro-fármacos basados en guanósina (ganciclovir y aciclovir) los cuales se desarrollaron inicialmente como agentes virales [36]. La HSVtk convierte estos pro-fármacos no tóxicos, análogos de nucleósidos, en compuestos fosforilados tóxicos, los cuales

inhiben posteriormente la ADN polimerasa reduciendo la síntesis de ADN e induciendo la muerte celular.

El pro-fármaco mas comúnmente utilizado es el GCV, el cual es un análogo acíclico del nucleósido natural 2'deoxi-guanosina [37]. El GCV es un sustrato altamente específico de la HSVtk, con una actividad catalítica aproximadamente cien veces más eficiente que la Tk de mamífero [38]. El GCV fosforilado inicialmente por la Tk es convertido a GCV monofosfato, el cual sufre una segunda fosforilación mediada por la guanilato quinasa celular y finalmente, por la acción de otras quinasas celulares, es convertido en el compuesto citotóxico GCV trifosfatado (GCV-TP) [39] (Figura 2).

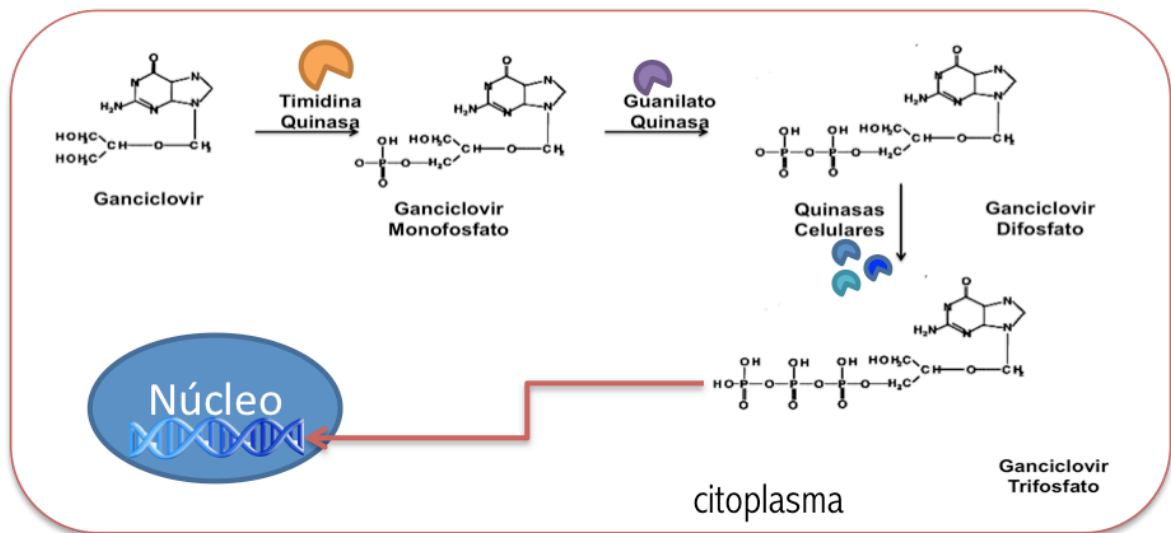


Figura 2. Activación del GCV mediante fosforilación.

El pro-fármaco GCV es fosforilado inicialmente por la HSV/Tk generando GCV monofosforilado, el cual es convertido por la acción de quinasas celulares a GCV difosfato y posteriormente, al compuesto tóxico, GCV trifosfato

La acción citotóxica del GCV-TP se deriva de su similitud estructural con el sustrato de la ADN polimerasa, el nucleosido 2'deoxi-guanosina trifosfato. De esta manera, una vez unido a la ADN polimerasa, el GCV-TP puede inhibirla o incorporarse a la cadena de ADN [40]. Adicionalmente, las hebras de ADN con GCV-terminal son sustratos pobres para el alargamiento de la cadena de ADN [41],

lo cual impide su elongación [42, 43, 44] y finalmente conduce a la muerte celular. Este tipo de muerte se cree que generalmente se produce por apoptosis inducida a través de una vía independiente de p53 [45, 46, 47]. Sin embargo, se ha reportado que en ciertos tipos de células los mecanismos de muerte celular pudieran ser diferentes [48, 49, 50].

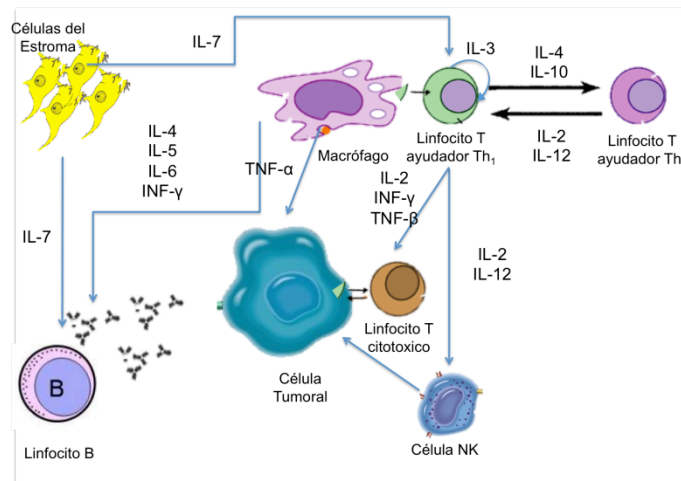
1.4 Respuesta Inmune Antitumoral

La teoría de la “vigilancia inmunológica”, propuesta inicialmente por Mcfarlane Burnet y Lewis Thomas, plantea que el sistema inmune reconoce las células tumorales como no-propias y las rechaza. Varias observaciones en humanos y en modelos experimentales con ratones inmunodeficientes (entre ellos los denominados ratones desnudos, *nu/nu*) apoyan esta teoría [51]. Sin embargo, pareciera que este concepto es válido fundamentalmente en células transformadas por virus [52], en las cuales se podrían expresar antígenos virales, mientras que por el contrario, otros tipos de células transformadas podrían expresar los denominados antígenos tumorales, los cuales tendrían una inmunogenicidad muy baja.

Por otra parte, se cree que las células transformadas, independientemente de su mecanismo de transformación, presentan diversos tipos de evasión de la respuesta inmune, que adicionalmente los mecanismos inmunológicos de protección podrían ser rebasados por la velocidad de crecimiento tumoral.

Entre los posibles mecanismos de evasión se proponen la ausencia de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I, la activación de una respuesta inflamatoria local que impide el reclutamiento de las células efectoras del sistema inmune con actividad antitumoral o la presencia de factores que inhiben la activación de la respuesta inmune [53, 54].

Desde el punto de vista teórico, una respuesta inmune celular eficiente contra tumores estaría determinada por la concurrencia de varios factores: (i) la expresión de una serie de moléculas inmunorreguladoras tanto en las células presentadoras de antígeno como en los linfocitos, (ii) una presentación eficiente de los antígenos tumorales en las moléculas CMH clase II y clase I para la activación eficiente de linfocitos T CD4+ y CD8+, respectivamente, (iii) probablemente, una activación apropiada de linfocitos B y (iv) migración y reclutamiento de células



efectoras al sitio de localización del tumor e iniciación de actividad citotóxica ejercida por las células NK (del inglés, *natural killer*) y los linfocitos T CD8+. El proceso es finalizado con la fagocitosis de células tumorales llevada a cabo por los macrófagos [55] (Figura 3).

Figura 3. Representación esquemática de los mecanismos de la respuesta inmune antitumoral. Modificado de [55]

Estos mecanismos funcionarían siempre y cuando existiera en las células tumorales sustancias que pudieran ser presentadas y reconocidas como antígenos. Aunque no están claramente definidos, se ha propuesto que los patrones de expresión de estos antígenos tumorales difieren entre los distintos tipos de tumores y que podrían clasificarse de manera general como:

- Antígenos específicos de tumor (TSA, del inglés *tumor-specific antigens*): Se expresan exclusivamente en células tumorales y evocan fácilmente

respuestas inmunitarias.

- Antígenos característicos de tumor o antígenos de tumor único: Son TSA que se expresan únicamente en uno o en unos pocos tumores clonales y reflejan mutaciones peculiares, características de estas clonas tumorales solamente.
- Antígenos asociados a tumores (TAA, del inglés *tumor-associated antigens*): Se expresan tanto en células tumorales como en algún tipo específico o estadio de diferenciación de células normales; frecuentemente son incapaces de inducir una respuesta inmune específica por cuanto han sido sometidos a los mecanismos normales de tolerancia inmunológica a lo propio.
- Antígenos virales: Son proteínas extrañas que se expresan en tumores y son producidas por virus oncogénicos.

Estos antígenos tumorales pueden ser reconocidos por células T o por anticuerpos. Los antígenos tumorales reconocidos por células T CD8+ representan los blancos principales de la respuesta inmune antitumoral, y son presentados por moléculas MHC clase I; en este caso las células tumorales se comportan como células presentadoras de antígenos (CPA) durante la fase efectora de la respuesta inmune y de esta manera pueden ser reconocidas por los linfocitos T citotóxicos.

Sin embargo, la generación de células T específicas contra antígenos tumorales requieren de su pre-activación por CPA profesionales tanto en el contexto de las moléculas MHC clase I como MHC clase II para activar simultáneamente tanto linfocitos T CD8+ como T CD4+. Estos últimos son esenciales para una activación eficiente de los linfocitos T CD8+.

Lo anterior plantea la necesidad de una fuente de antígeno apropiada para las CPA profesionales (especialmente las células dendríticas). Los linfocitos T CD4+ pueden ser activados por antígenos tumorales provenientes de células tumorales muertas y fagocitadas. De esta manera, los antígenos pueden ser procesados y presentados en las moléculas CMH clase II por la vía clásica. Por otra parte, la presentación de antígenos que no tienen origen endógeno, en las moléculas CMH clase I de las células dendríticas requiere del mecanismo de presentación cruzada.

Los dos mecanismos anteriores se han estudiado en detalle en modelos de respuesta inmune antiviral y explican como se pueden generar los linfocitos T CD8+ activados que eliminan específicamente células infectadas por virus. De estos modelos se ha podido determinar que el tipo de muerte celular asociado a las infecciones virales determina el tipo de respuesta inmune en los diferentes tipos de infecciones virales.

La muerte celular por apoptosis se considera un evento poco inmunogénico, mientras que procesos de muerte celular por mecanismos diferentes a la apoptosis parecen estar asociados a una mejor respuesta inmune antiviral. Esto último parece ser debido a que la apoptosis es el mecanismo natural de remoción de células propias y de generación de tolerancia y a que adicionalmente, esta forma de muerte celular genera poca o ninguna reacción inflamatoria.

Por el contrario, la muerte celular por necrosis u otros mecanismos diferentes a la apoptosis se acompaña de una reacción inflamatoria y se asocia a la inducción de una buena respuesta inmune contra antígenos intracelulares.

Los diferentes tipos de virus han desarrollado estrategias de supervivencia dentro del hospedero y de evasión de la respuesta inmune; uno de ellos es el bloqueo de

la muerte celular por medio de proteínas antiapoptóticas. Sin embargo, pareciera que una respuesta evolutiva del sistema inmune contra este mecanismo es la inducción de un programa de muerte celular diferente a la apoptosis y cercano a la necrosis. Con esto se garantizaría la destrucción de las células infectadas y la generación de un ambiente tisular apropiado para la inducción de una respuesta inmune apropiada contra antígenos intracelulares. Un buen ejemplo de esto, como se discutirá más adelante, son los modelos de infecciones con virus codificadores de inhibidores de proteasas tipo serpinas (SPI) las cuales funcionan como inhibidores de caspasas y bloqueadores de la inflamación al mismo tiempo.

Lo anterior permite plantear que la generación de una respuesta inmune contra antígenos tumorales mediada por linfocitos T citotóxicos es posible si se generan las condiciones apropiadas para la presentación de antígenos tumorales. De hecho, se sabe que los tumores pueden ser destruidos mediante células T citotóxicas específicas del antígeno tumoral, como ha sido probado en modelos animales y estudios en humanos, siendo posible verificar respuestas clonales de células T CD8+ específicas de tumor. Sin embargo, una observación interesante es que este tipo de respuestas no siempre son lo suficientemente fuertes y eficaces como para erradicar el tumor.

No obstante, a pesar de la complejidad del sistema y sus dificultades para estudiar sus mecanismos, es claro que éste tiene una función antitumoral fundamental y que su actividad puede ser ineficaz en ciertas circunstancias y los tumores pueden presentarse en sujetos inmunocompetentes. Por lo tanto, el concepto de inmunovigilancia a la luz de los conocimientos actuales podría retomarse como un procedimiento de activación inmunológica contra antígenos tumorales [⁵⁶], para el reconocimiento y eliminación de células que sufren transformación tumoral. Consecuentemente, diversas circunstancias asociadas a inmunosupresión, incrementan la probabilidad de aparición de tumores [⁵⁷] y aun más, en individuos inmunológicamente competentes, ciertos tipos de respuesta inmune (por ejemplo procesos autoinmunes) podría contribuir a la progresión del tumores [⁵⁸].

1.5 HSVTk/GCV y respuesta inmune específica antitumoral

El sistema HSVTk/GCV posee algunas características interesantes al compararse con los otros sistemas de GDEPT; entre ellas se destacan, la baja cinética de activación del pro-fármaco [⁵⁹, ⁶⁰], sus limitados mecanismos de toxicidad celular [⁶¹], ausencia de generación de la resistencia a los medicamentos [⁶², ⁶³] y la amplia y segura utilización clínica del GCV [⁶⁴].

Una limitación importante radica en el hecho de que, aunque el pro-fármaco puede difundirse a través de todas las células blanco, el GCV-TP, posee una alta carga electrónica debida a los grupos fosfato, y por lo tanto es insoluble en las membranas lipídicas, lo que significa que no puede difundirse ni fuera de la célula ni hacia las células vecinas para ejercer sus efectos tóxicos. No obstante, en el sistema HSVTk/GCV el BE se observa tanto *in vitro* como *in vivo* debido a que este se lleva a cabo mediante la difusión a través de las uniones *gap* [⁶⁵].

Se ha sugerido como un mecanismo adicional del BE, la fagocitosis de vesículas apoptóticas producidas por las células tratadas con el sistema HSVTk/GCV.

Por otro lado, se cree que otro mecanismo que potencia el BE *in vivo* es la contribución del sistema inmune del huésped, puesto que en algunos modelos la eliminación completa de las células tumorales requiere un sistema inmune intacto. Varios estudios han mostrado que existe una infiltración dramática de células CD4+ y CD8+ en la masa de células tumorales de animales tratados con el sistema HSV-TK/GCV [⁶⁶].

Está claro, que este efecto es mediado por una respuesta inmune anti-tumoral específica, la cual es dependiente de células CD8+ y requiere la presencia de células CD4+ al momento del tratamiento para el desarrollo de memoria inmunológica [⁶⁷].

Este sistema, y esta observación en particular, es de gran interés debido a que la mayoría de los tumores generan metástasis las cuales no serían afectadas directamente por los procedimientos de terapia con suicidio génico y debido a que este mecanismo podría ser la base para un método de generación de vacunas antitumorales. Sin embargo, una de las limitaciones de este método podría ser la baja inmunogenicidad de algunos antígenos tumorales específicos.

1.6 Muerte Celular

La muerte celular puede ocurrir mediante dos mecanismos principales, una forma programada de muerte, denominada apoptosis y otra forma no regulada, conocida como necrosis [68]. En condiciones normales, la rata de proliferación o mitosis debe mantenerse en equilibrio con la destrucción o apoptosis celular y un desequilibrio puede conducir al desarrollo de patologías importantes. Por lo tanto, los procesos de apoptosis en un organismo están regulados con mucha precisión.

1.6.1 Apoptosis y Necrosis

Desde el punto de vista morfológico los procesos de apoptosis y necrosis se asocian a alteraciones en la anatomía celular, muy características de cada uno de ellos. En la tabla 2 se presenta un cuadro comparativo de estas características [69, 70].

Durante la apoptosis, las células pierden el contacto intercelular y se desprenden ordenadamente del tejido sano; se presenta una condensación marcada tanto del núcleo como del citoplasma, lo cual provoca una disminución significativa del tamaño celular.

A nivel mitocondrial se presenta una pérdida de potencial de membrana mitocondrial (PMM ó $\Delta\psi_m$) y de transición de permeabilidad mitocondrial (PT) y se

libera citocromo c hacia el citoplasma [71, 72]. Esto último, podría deberse a la apertura de los poros especializados de PT [73]. La envoltura nuclear y el nucleolo se rompen, la cromatina se condensa y se separa intra-nucleosomalmente en fragmentos regulares con longitudes de ~180 pares de bases [74]. La membrana plasmática forma invaginaciones y prominencias de morfología compleja que culminan con la formación de vesículas y finalmente la célula se fragmenta en pequeños cuerpos apoptóticos que pueden contener orgánulos condensados.

La muerte celular apoptótica induce cambios en la membrana plasmática que permite que los cuerpos apoptóticos sean reconocidos y fagocitados. Después de la pérdida del PT en la mitocondria las moléculas de fosfatidil serina cambian su orientación moviéndose desde la cara citoplasmática hacia la superficie extracelular de la membrana [75], debido a la disminución de la actividad de un aminofosfolípido-translocasa dependiente de ATP y a la actividad dependiente de las concentraciones intracelulares de calcio de una proteína conocida como “scramblase” [76].

Adicionalmente, las citoquinas proinflamatorias interleuquina (IL)-1 α y β (IL-1 α/β), así como la IL-18, que normalmente se encuentran en formas no transformadas en el citosol, pueden ser procesadas y liberadas al espacio extracelular durante la apoptosis [77]. Por último, las células apoptóticas son rápidamente reconocidas por la células fagocíticas, fagocitadas y degradadas en los lisosomas.

Aunque el proceso de apoptosis ha sido considerado como inmunológicamente silencioso, en la actualidad se sabe que los péptidos contenidos en los cuerpos apoptóticos fagocitados, pueden ser presentados por las células dendríticas [78, 79] y pueden inducir algún tipo de respuesta inmune. El desarrollo de este proceso y los cambios morfológicos ocurren en menos de 24h después de haberse iniciado el proceso apoptótico.

Es importante destacar que, durante todo el proceso, las membranas plasmáticas de las células que mueren y de los cuerpos apoptóticos individuales se mantienen intactos sin que se produzca salida del material intracelular fragmentado y condensado en los cuerpos apoptóticos.

Tabla 2. Cuadro comparativo de las características cito-morfológicas en los procesos de muerte celular mediados por apoptosis o por necrosis

CARACTERÍSTICA	APOPTOSIS	NECROSIS
Posibles Causas	Moderado estrés oxidativo Deficiencia de factores de crecimiento Radiación Inducción de receptores de muerte	Estrés oxidativo severo Isquemia Hipertermia Hipoxia Altas concentraciones de sustancias tóxicas
Numero de Células	Células individuales o pequeños grupos de células	Células en grupos de grandes cantidades
Volumen Celular	Encogimiento celular	Hinchamiento celular, citólisis
Efecto en la Membrana Plasmática	Membrana celular intacta	Membrana celular comprometida
Efecto en Citoplasma	Retenido en cuerpos apoptóticos	Liberado al espacio extracelular
Efecto en el núcleo	Condensación de la cromatina	Fragmentación del núcleo y cromatina
Procesos de inflamación Celular	No hay presencia de inflamación	Inflamación usualmente presente
Características Bioquímicas	Se requiere ATP Liberación de Caspasas	No se requiere ATP Liberación de enzimas lisosomales

Por otro lado, a diferencia de la condensación y la reducción de tamaño que sufren las células apoptóticas, las células necróticas inicialmente absorben agua y se hinchan. Esto hace que finalmente la membrana plasmática se rompa y se libere al espacio extracelular el contenido citoplasmático. Las organelas también se hinchan y los núcleos no se condensan ni se procesa la cromatina como sucede en las células apoptóticas. Mas adelante ocurre degradación del DNA con generación de fragmentos de muy diversos tamaños [80, 81].

Este último proceso en la necrosis es mediado por un mecanismo dependiente de proteasas de serina mediante el cual se activan endonucleasas [78], mientras que el procesamiento del DNA en la apoptosis es dependiente de proteasas de cisteína [82]. Al igual que en la apoptosis, la necrosis también puede conducir a la liberación de IL-1 α / β ; sin embargo en este caso solo se procesa IL-1 α y los mecanismos de procesamiento y liberación de IL-1 son diferentes [74].

1.6.2 Mecanismos de muerte celular no-apoptóticos

Nuevas evidencias experimentales sugieren que la apoptosis no es el único mecanismo de “suicidio” celular, sino que las células pueden elegir uno de entre varios posibles mecanismos de muerte.

Algunos estudios han mostrado en modelos *in vivo* que a lo largo del desarrollo embrionario se puede observar un proceso de muerte celular con características morfológicamente distintas a la apoptosis, cuando la maquinaria enzimática que media este proceso está alterada debido a deficiencias genéticas inducidas de antemano por ej., mediante la selección o silenciamiento de genes codificadores de caspasas [⁸³].

Aunque usualmente se ha pensado que los mecanismos de muerte celular no apoptótica son un recurso de ayuda, alternativo a los mecanismos de muerte celular programada, que solo son relevantes cuando esta maquinaria no está disponible, recientemente se han descrito y dilucidado las vías moleculares de mecanismos específicos de muerte celular no apoptótica. Estas formas de muerte celular no apoptótica se han clasificado como: muerte celular tipo II, necroptosis y muerte necrótica mediada por PARP1 (poli (ADP-ribosa) polimerasa-1).

1.6.2.1 Muerte Celular Tipo II

En este tipo de muerte se observa al interior de las células una acumulación de vesículas encerradas en una doble membrana, estas vesículas son características del llamado proceso de autofagia fisiológico de la célula normal, es por esto que a este tipo de muerte se le suele denominar autofagia [⁸⁴]. En condiciones normales, este tipo de autofagia ejerce un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis intracelular eliminando los orgánulos dañados o disfuncionales y las proteínas mal plegadas que pueden ser perjudiciales para la supervivencia [⁸⁵]. Adicionalmente, en condiciones de privación de nutrientes, la autofagia promueve

la supervivencia celular degradando el contenido intracelular en mal estado, lo que genera bloqueos en la producción de energía y en la síntesis de proteínas. La autofagia está regulada por un gran grupo de genes *ATG* (genes relacionados con autofagia), que son evolutivamente conservados [86] (Figura 4a).

El mecanismo de este tipo de muerte celular se ha visto asociado a la actividad del complejo LC3-III (complejo III Fosfatidilinositol Quinasa-3), la cual puede ser inhibida por la proteína BCL2 (linfoma de células B-2) y por del supresor tumoral UVRAG (proteína del gen asociado a la resistencia a radiación UV). Adicionalmente, la vía de señalización activada por la privación de nutrientes induce a la autofagia a través de la inhibición de la proteína mTOR (proteína blanco de la actividad de rapamicina de mamífero) para permitir la formación de las estructuras PAS (sitios de ensamblaje de fagóforos) a partir de las cuales se forma el auto fagosoma [87] debido a que mTOR es un importante inhibidor de esta vía y ejerce su función en respuesta al estímulo de factores de crecimiento y nutrientes.

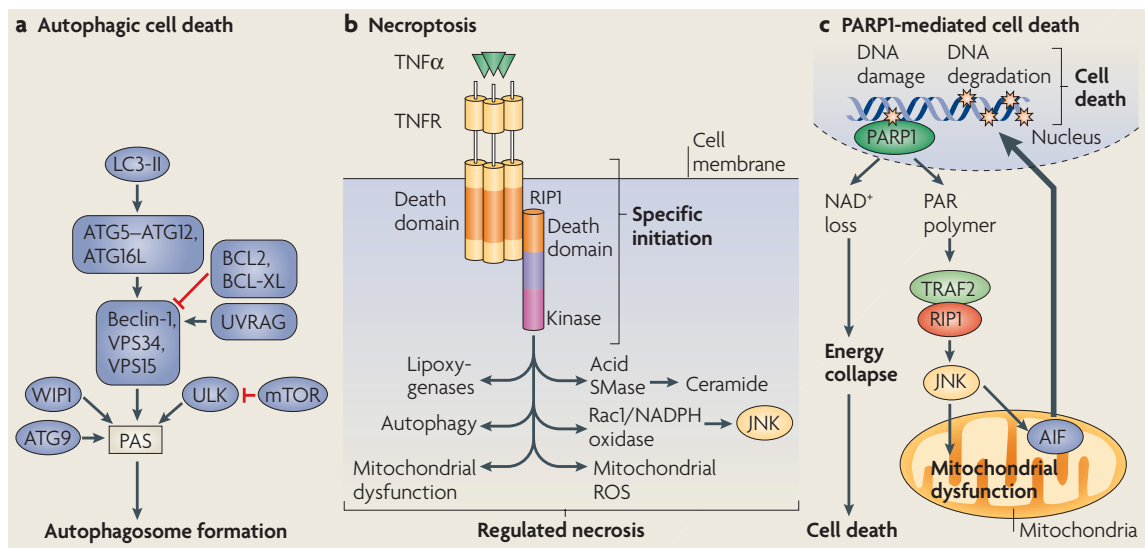


Figura 4. Mecanismos moleculares de otros tipos de muerte celular no-apoptótica. Modificada con autorización de Cold Spring Harbor Laboratory Press [89]

La autofagia podría contribuir a la muerte celular inducida por virus. Por ej., el VIH-1 induce la acumulación de la proteína BECLIN-1 y muerte en células T CD4+ vecinas no infectadas cuando la proteína de la envoltura VIH-1 (env) interactúa con el receptor de quimiocinas CXCR4 [88, 89]. Esto podría indicar que la autofagia no es solo un mecanismo autónomo de muerte celular sino que podría ser un mecanismo fisiopatológico de muerte celular inducida por virus.

Se ha postulado que la autofagia podría ser el mecanismo de la muerte celular tipo II, la cual asumiría el papel de mecanismo de muerte celular en reemplazo de la apoptosis cuando los mecanismos de esta vía no se encuentran disponibles [90]. También pudiera ser posible que la autofagia sea un mecanismo de muerte celular normal inducida a niveles bajos en condiciones fisiológicas y que se incremente en respuesta al estrés celular en condiciones deficientes de apoptosis, esta vía podría ser mediada por BCL2, puesto que BECLIN-1 tiene un dominio BH3 e interactúa con BCL2 [91]. Lo anterior reflejaría la existencia de un mecanismo de regulación convergente de la apoptosis y la muerte celular tipo II [92]. Por otro lado, moléculas proapoptóticas de la familia de BCL2, tales como BNIP3 y Bik, pueden inducir la activación de este tipo de muerte [93, 94], lo cual sugiere que el tipo de muerte celular tipo II puede ser inducida de una manera similar al de la apoptosis.

1.6.2.2 Necroptosis

Se ha propuesto que este tipo de muerte representa un tipo de necrosis programada cuyo descubrimiento surgió después de observar, en diversos tipos de experimentos, que bajo estímulos apoptóticos (tales como tratamientos con ligandos de receptores celulares con dominios de muerte), en condiciones de deficiencia de caspasas, las células tratadas sufrían un tipo de muerte celular que morfológicamente no correspondía a los tipos de muerte convencionales [95, 96, 97] [98, 99, 100].

Aunque la necroptosis puede ser activada por los mismos estímulos que inducen apoptosis, sus características morfológicas son similares a las de la necrosis patológica: edema de los organelos, rápida disfunción mitocondrial, permeabilización de la membrana plasmática y la falta de fragmentación nuclear; todo esto indica que se trata de un mecanismo de muerte diferente [101, 102].

Estudios recientes demuestran que en el inicio de la necroptosis inducida por el Factor de Necrosis Tumoral alfa (FNT α) se produce a nivel de su receptor el reclutamiento y la activación de un complejo de señalización intracelular que involucra la molécula adaptadora RIP1 (receptor-interacting protein kinase) conformando un complejo de señalización de una vía diferente a la de inducción de activación de las vías de sobrevivencia o de apoptosis que usualmente activa el FNT α , según las dosis y las condiciones de la célula. De manera notoria, esta vía es activada también en presencia de inhibidores de caspasa 8 la cual inicia la fase final de la apoptosis y es un inactivador de RIP1 [103] [102] (Figura 4b). Otra evidencia que permite diferenciar la necroptosis de la apoptosis, en el modelo de FNT, se basa en la identificación de una serie de moléculas denominadas necrostatinas, específicamente necrostatin1, las cuales inhiben específicamente la necroptosis pero no la apoptosis inducida por TNF, a través de la inhibición de RIP1 [104, 105]. Adicionalmente, RIP1 se transloca a la mitocondria ocasionando una ruptura de la asociación translocasa-ADP-ATP (ANT) con la ciclofilina D [106] lo que podría explicar la rápida disfunción mitocondrial que se asocia con necroptosis [101].

Dada la similitud de muchos de los aspectos observables durante la ejecución de los procesos de necroptosis y necrosis, la principal diferencia entre estos dos mecanismos podría estar en el método de activación, que en la necroptosis estaría regulado por mecanismos y vías de señalización internos, mientras que en la necrosis respondería a un estrés abrumador.

1.6.2.3 Muerte Necrótica mediada por PARP1

PARP1 (del inglés poly(ADP-ribose) polymerase-1) es una enzima nuclear que tiene un papel clave en el mantenimiento de la estabilidad del genoma. PARP1 es activada rápidamente cuando se dan rupturas del ADN y es la encargada de reclutar los factores reparadores del ADN, uniendo ADP-ribosa con las proteínas asociadas a la cromatina. La pérdida de PARP1 conduce a un aumento de la sensibilidad al daño del ADN [107] y su sobreactivación puede conducir a un mecanismo de muerte independiente de caspasas [108].

Este mecanismo puede ser visto como una extensión de la función de vigilancia del genoma por PARP1, el cual puede mediar la muerte celular asociada a daño de ADN, en dos diferentes pero muy importantes escenarios (Figura 4c). En células con altos índices mitóticos, alteraciones del ADN causados por ej., por agentes alquilantes, PARP1 promueve el agotamiento de NAD⁺ citosólico, lo cual conduce a la muerte necrótica por "colapso energético" en células glicolíticas [109]. Por otra parte, en células en estado vegetativo, como las neuronas, cuando son sometidas a condiciones que causan daño agudo, la muerte neuronal se asocia a la translocación del polímero-poli(ADP-ribosas) al citosol, lo cual conduce a la translocación de la proteína AIF (del inglés, *apoptosis inducing factor*) de la mitocondria al núcleo, donde media la muerte celular.

1.7 Proteína B13R

La inducción de apoptosis en células infectadas por microorganismos intracelulares es un mecanismo de defensa del hospedero que previene la replicación intracelular de los microorganismos y conduce a la activación de caspasas, las cuales pueden mediar algunas actividades proinflamatorias. Sin embargo, se ha reportado que varios tipos de virus portan genes codificadores de proteínas inhibitoras de caspasas. Se han identificado en varias especies de virus, diversos inhibidores que funcionan en diferentes niveles de la vía de

señalización de la apoptosis; los llamados inhibidores de proteasas tipo serpinas (SPI) actúan como pseudo sustratos de estas proteasas, inhibiendo así la función de las caspasas. Entre éstos están por ej., la proteína modificadora de la respuesta de citoquinas (crmA) del virus de la viruela bovina, SPI-1 y SPI-2 del virus vaccinia y SPIs del virus electromelia [¹¹⁰]. El gen SPI2 del virus vaccinia (VV) codifica para el polipéptido intracelular B13R de 38 kDa, el cual no es esencial para la replicación del virus *in vitro*. B13R tiene un 92% de identidad de aminoácidos con la proteína CrmA, la cual inhibe la enzima convertidora de interleucina (IL)-1 β (ICE) o caspasa-1 [¹¹¹]. El gen SPI-2 se transcribe tempranamente durante la infección y la proteína codificada muestra similitud con la superfamilia de los inhibidores de proteasa de serina (serpinas) [¹¹²]. Se ha reportado que SPI-2 esta involucrado en la inhibición de los mecanismos de apoptosis activados por TNF α o el ligando del receptor Fas (FasL). La unión del TNF o FasL soluble a los receptore TNFR1 o Fas, respectivamente, disparan la cascada de las caspasas conduciendo al clivaje proteolítico de las proteínas blanco [¹¹¹].

Estas caspasas producen en última instancia el fenotipo de células apoptóticas, incluyendo la fragmentación nuclear, la pérdida de adherencia de la célula (en células adherentes) y la contracción de la célula [¹¹³]. Las células apoptóticas son fagocitadas antes de que arrojen su contenido al espacio extracelular y sin inducir una respuesta inflamatoria fuerte. Aunque crmA/SPI-2 es un potente inhibidor de caspasa-1, la enzima prototipo de la familia de las caspasas, es probable que el bloqueo de la apoptosis mediado por SPI-2 sea debido a la inhibición de otra caspasa, porque la caspasa-1 (y las caspasas relacionadas a la caspasa-1) está predominantemente implicada en inflamación y en la activación de citoquinas asociadas a la actividad inflamatoria [¹¹⁴].

Un blanco adicional de SPI-2 es la caspasa 8, la cual está implicada en la progresión a apoptosis inducida por diferentes factores [¹¹⁵]. El VV a través del

SPI-2, bloquea también la vía de la apoptosis inducida por FNT e incrementa la sensibilidad a la necrosis [¹¹⁶] (Li and Beg, 2000). Finalmente, células que expresan altas concentraciones de SPI-2 al ser tratadas con TNF a altas concentraciones, cambian su mecanismo de muerte celular mediante apoptosis por necrosis. Esta observación permite postular la hipótesis de que la inducción de muerte celular por un mecanismo irreversible, usualmente mediado por apoptosis, como es el tratamiento con el sistema HSV-tk/GC en presencia de la proteína B13R pudiera inducir de todas maneras muerte celular pero a través de un mecanismo diferente probablemente del tipo necroptosis o muerte necrótica mediada por PARP1.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Evaluar el efecto de la proteína antiapoptótica B13R sobre los mecanismos de muerte celular inducidos por el tratamiento con el sistema de terapia génica HSVtk/GCV en líneas celulares tumorales

2.2 Objetivos Específicos

1. Desarrollar un vector para la expresión de la secuencia de DNA que codifica para la proteína recombinante de fusión, constituida por la proteína B13R del *virus vaccinia*, fusionada con las proteínas Timidin Quinasa del virus del herpes simple y GFP
2. Evaluar el mecanismo de muerte celular inducido por el tratamiento de líneas celulares con el sistema HSV/Tk/GCV en presencia de la proteína B13R.

3.2 Cultivo celular y transfección

La evaluación de los plásmidos se realizó mediante ensayos de transfección transitoria y cotransfección. Las líneas celulares COS7 y HEK-293T fueron cultivadas y mantenidas en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen) suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF) al 10% en una atmósfera de 5% de CO₂ y a una temperatura de 37°C. Para cada transfección se sembraron aproximadamente 3 x10⁵ células en platos de 6 pozos. Luego de 24h de cultivo (70-80% confluencia), las células fueron transfectadas usando FUGENE-HD (ROCHE, California) a una relación de 2:7 (µg vector reportero: µl FUGENE) siguiendo las indicaciones del fabricante. En cada ensayo se usó el plásmido pEGFPN3 como control positivo de la transfección.

3.3 Tinción con GIEMSA

Células HEK-293T fueron sembradas en platos de 6 pozos con una laminilla previamente incluida en el fondo de cada pozo. Posteriormente, las células fueron transfectadas con el plásmido pEGFP-SPI2-Tk, y con los plásmidos control pLNC-Tk y pCI-SPI2 y tratadas con GCV (50µg/µl). Después de 48h de tratamiento se removió la laminilla de cada uno de los pozos, se dejó secar y se lavaron dos veces con PBS 1X evitando remover las células. Posteriormente, las laminillas se incubaron en formaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron nuevamente con PBS 1X una vez para retirar el exceso de formaldehído y se incubaron con metanol a -20°C por 5 minutos. Finalmente fueron lavadas una vez más con PBS 1X, se adicionó solución de tinción de GIEMSA y se incubó alrededor de 15 minutos. El exceso de colorante fue removido por lavado con buffer de GIEMSA, se secaron las laminillas a temperatura ambiente durante 10min y se observaron al microscopio.

3.4 Microscopía confocal

Células COS7 fueron transfectadas con el plásmido pGFP-SPI2. Después de 48h de la transfección, las células fueron lavadas con PBS y se fijaron con paraformaldehído 3% durante 12min; luego se lavaron dos veces con PBS y se

incubaron durante 15 minutos en una solución tampón de bloqueo (0,1% TritonX 100; 0,1% BSA en PBS). Posteriormente, se realizaron nuevamente lavados con PBS durante 5min cada uno, y luego fueron contrastadas con una dilución 1:2000 de aglutinina de germen de trigo, conjugada con tetrametilrodamina (Molecular Probes Inc, Holanda) y 1:3000 de Hoechst (SIGMA -ALDRICH) en PBS, durante 10min en la oscuridad. Finalmente, se lavaron cuatro veces con PBS durante 5min cada lavado y se visualizaron por microscopía de fluorescencia con un microscopio Leica DMRXA (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) equipado con una cámara CCD (Modelo S / N 370 KL 0565, Cooke Corporation) y conjuntos de filtros para DAPI/Hoechst, Cy3 y Cy5. Las imágenes fueron obtenidas utilizando el software Slidebook 2.1 (Intelligent imágenes Innovations Inc)

3.5 Citometría de flujo

Células HEK-293T fueron transfectadas con 2µg de cada uno de los plásmidos construidos, pGFPN-Tk, pGFP-SPI2 y pGFP-SPI2-Tk. Después de 48h de transfección se evaluó el porcentaje de células GFP positivas cuantificadas por citometría de flujo usando un citómetro CyFlow Partec System con filtros para la expresión de GFP (emisión 507 nm; excitación 488 nm). Células HEK-293T no transfectadas fueron usadas como control negativo.

3.6 Electroforesis SDS-PAGE y análisis de electroinmunoensayo

Células HEK-293T fueron transfectadas con el plásmido construido, pEGFP-SPI2-Tk y el plásmido pEGFP-N3 usado como control. Luego de 48h de cultivo, las células fueron tripzinizadas, lavadas con PBS 1X, sedimentadas por centrifugación a 1500 rpm, 4°C durante 10min y lisadas durante 20 minutos utilizando solución tampón RIPA (150 mM NaCl, 4% CHAPS, 0,5% de deoxicolato de Sodio, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8 y cóctel de inhibidores de proteasa (todos los reactivos fueron obtenidos de SIGMA)); el proceso de lisis fue realizado en frío. Las muestras se mezclaron por agitación y los restos celulares se eliminaron a partir

del extracto de células centrifugando a 13.000 rpm, 4°C durante 10min. La concentración de las proteínas se determinó utilizando Quick Start Bradford protein Assay (Biorad) con curva de estándares de BSA.

Aproximadamente 35µg de lisado de proteína total contenidas en bufer Laemmli 2X fueron separadas por SDS-PAGE con 10% de acrilamida (BioRad) en una solución tampón de corrido (24.7 mM TrisBase, 1.44% glicina y 0.1% SDS). La calidad del gel se evaluó con colorante azul brillante de Coomassie R-250 (Biorad). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,20 micras de tamaño de poro (Amersham ECL Hybond) en una solución tampón de transferencia (25 mM TrisBase, glicina 192 mM y el 15% de metanol) durante 16 horas, a 40V en hielo. El proceso de transferencia fue evaluado con el colorante PonceauS reversible 0,1% (Merck). Las membranas fueron bloqueadas con leche en polvo descremada al 5% de solución tampón PBS-T (1.37M NaCl, 27mM KCl, 43mM Na₂HPO₄·7H₂O, 14mM KH₂PO₄ y 0,05% de Tween 20) durante 3h a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron con PBS-T tres veces durante 15 minutos cada lavado y se incubaron bajo agitación durante toda la noche a 4°C en una dilución 1:4000 de anticuerpo anti-GFP suero policlonal de conejo (Invitrogen). Al día siguiente, las membranas fueron lavadas 3-4 veces con PBS-T e incubadas con anticuerpo anti-policlonal de cabra (Cytomation Dako) a una dilución de 1:2000 durante 2-3 horas a temperatura ambiente. La detección de la proteína se realizó usando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal Pico West (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La membrana fue expuesta a una película de rayos X.

3.7 Evaluación de apoptosis

3.7.1 Expresión de la fosfatidil serina

Células HEK-293T fueron transfectadas con el plásmido fusión construidos pEGFP-SPI2-Tk, y los plásmidos control pLNC-Tk y pCI-SPI2 y tratadas con GCV (50µg/µl). Después de 48h de tratamiento las células fueron lavadas con PBS 1X, tripsinizadas, e incubadas durante 20min con Anexina V 568 y 7AAD (Invitrogen)

de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se tomaron aproximadamente 2×10^5 células y se centrifugaron durante 5min a 1500rpm. El pellet fue disuelto en 10 μ l de Anexina y 2 μ l de 7AAD e incubado durante 30min protegido de la luz. Transcurrido el tiempo de incubación las células fueron lavadas dos veces con PBS y analizadas por citometría de flujo. Se evaluó el porcentaje de fluorescencia verde y roja usando un citometro FACS CANTO II con filtros para la expresión de fluorescencia Anexina positiva (emisión 507nm; excitación 488nm) y 7AAD positivas (emisión 650nm; excitación 530nm). Células HEK-293T no transfectadas fueron usadas como control negativo.

3.7.2 Potencial de membrana mitocondrial

Células HEK-293T fueron transfectadas con el plásmido de fusión construido pEGFP-SPI2-Tk, y los plásmidos control pLNC-Tk y pCI-SPI2 y tratadas con GCV (50 μ g/ μ l). Transcurridas 48h de tratamiento, las células fueron incubadas con una sonda JC-1 1 μ M (Invitrogen) adicionada al medio de cultivo, e incubadas durante 30min a 37°C, 5% de CO₂. Posteriormente, las células fueron lavadas dos veces con PBS, tripzinizadas, resuspendidas en PBS-SBF y analizadas inmediatamente por citometría de flujo usando un FACS CANTO II con filtros para la expresión de fluorescencia verde y fluorescencia naranja (emisión 500nm; excitación 490nm). Células HEK-293T no transfectadas fueron usadas como control negativo. La pérdida del potencial de membrana se observó como ausencia de fluorescencia naranja.

3.7.3 Actividad de Caspasa-3

Células HEK-293T fueron transfectadas con el plásmido de fusión construido pEGFP-SPI2-Tk, y los plásmidos control pLNC-Tk y pCI-SPI2 y tratadas con GCV (50 μ g/ μ l). Transcurridas 48h de tratamiento las células fueron lavadas una vez con PBS y centrifugadas durante 5min a 1500rpm y luego se procedió al análisis de la actividad de la Caspasa 3 utilizando el reactivo PhiPhiLux-G2D2 (Oncoimmunin, Inc). El pellet fue resuspendido en 70 μ l del sustrato e incubadas a 37°C durante una hora. Luego de la incubación, las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas con solución tampón de dilución. Se evaluó el porcentaje de

fluorescencia verde y roja mediante citometría de flujo usando un FACS CANTO II con filtros para la expresión de fluorescencia Anexina V positiva. Células HEK-293T no transfectadas fueron usadas como control negativo

4. RESULTADOS

4.1 El vector pEGFP-SPI2-Tk expresa una proteína de fusión con localización y características específicas

La caracterización del plásmido pEGFP-SPI2-Tk, que porta la secuencia que codifica para la proteína recombinante de fusión constituida por la proteína B13R fusionada con las proteínas Tk y GFP, mostró la expresión de una proteína fluorescente verde en células HEK-293T transfectadas transitoriamente, tanto en la observación por microscopía fluorescente como en el análisis por citometría de flujo.

El análisis por electroinmunotransferencia de extractos de proteínas totales de estas células permitió identificar con anticuerpos específicos contra GFP, una proteína de aproximadamente 116 KD correspondiente a la sumatoria del peso de las tres proteínas (Figura 5). Estas observaciones muestran que el vector pEGFP-SPI2-Tk expresa eficientemente la proteína de fusión B13-TK-GFP.

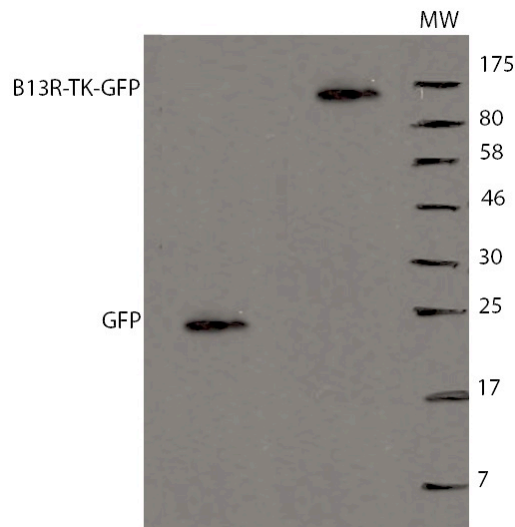


Figura 5. Niveles de las proteínas GFP y B13R-Tk-GFP en extractos de proteínas totales de células HEK-293T transfectadas con los plásmidos pEGFPN3 y pEGFP-SPI2-Tk.

Las proteínas fueron detectadas por electro-inmunoensayo con un anticuerpo específico contra GFP

La funcionalidad de los vectores pEGFP-Tk y pGFP-SPI2, los cuales expresan las proteínas reporteras TK-GFP y B13R-GFP, respectivamente, fue evaluada en células HEK-293T transfectadas transitoriamente con los respectivos vectores. El análisis por citometría flujo mostró porcentajes de células expresando fluorescencia verde del 50.75% y 85.14% en células transfectadas con los vectores pEGFP-Tk y pGFP-SPI2, respectivamente. Las células transfectadas con el vector pGFP-N3, usado como control, mostraron un 95.24% de células GFP positivas (Figura 6).

Luego de confirmada su actividad como sistema reportero, los vectores pEGFP-Tk y pEGFP-SPI2 fueron utilizados posteriormente como controles positivos de las actividades de las proteínas Tk y B13R.

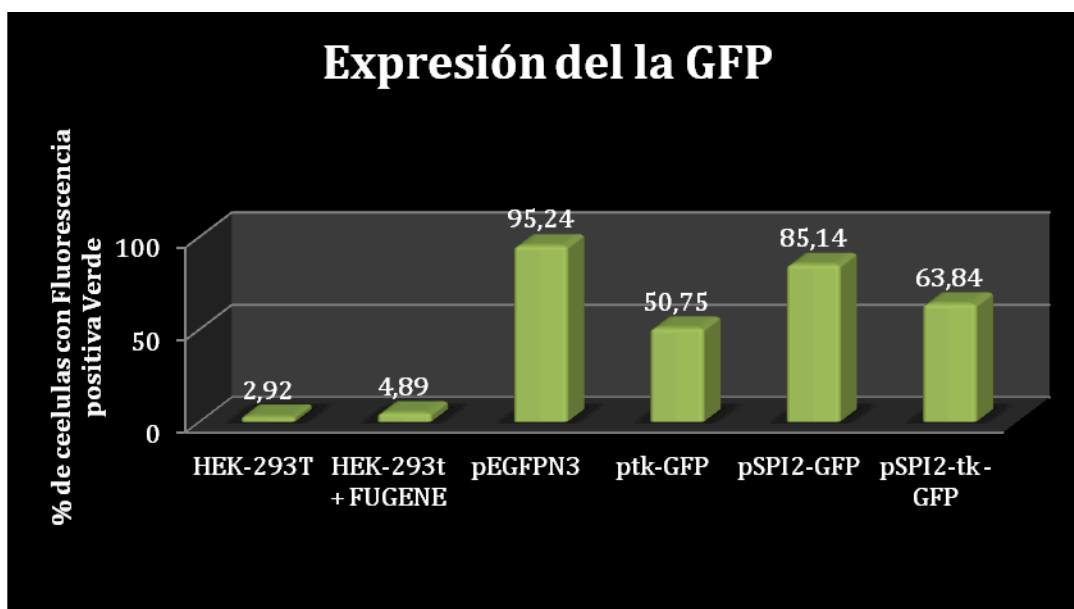


Figura 6. Niveles de expresión de GFP en células HEK-293T transfectadas con diferentes plásmidos reporteros.

La gráfica representa el porcentaje de células con intensidades de fluorescencia verde superiores a los niveles de autofluorescencia de células sin transfectar (HEK-293T); las células fueron transfectadas con los plásmidos reporteros pEGF-Tk, pEGFP-SPI2 y pEGFP-SPI2-Tk; como control positivo de la eficiencia de la transfeccion se utilizaron células transfectadas con pEGFPN3. Las determinaciones se realizaron por cytometria de flujo luego de 48h de la transfeccion.

Adicionalmente, la evaluación de la proteína B13R-GFP mediante microscopía confocal digital de células cos7 transfectadas transitoriamente con el plásmido pEGFP-SPI2 mostró una proteína fluorescente verde localizada exclusivamente en el citoplasma celular a diferencia de lo observado en las células transfectadas con el plásmido pEGFPN3 en las cuales se observa después de las 48h localización de la GFP a nivel nuclear y citoplasmático. Esta observación demuestra que la secuencia codificadora de la proteína B13R-GFP expresa una proteína fluorescente diferente a la GFP nativa (Figura 7)

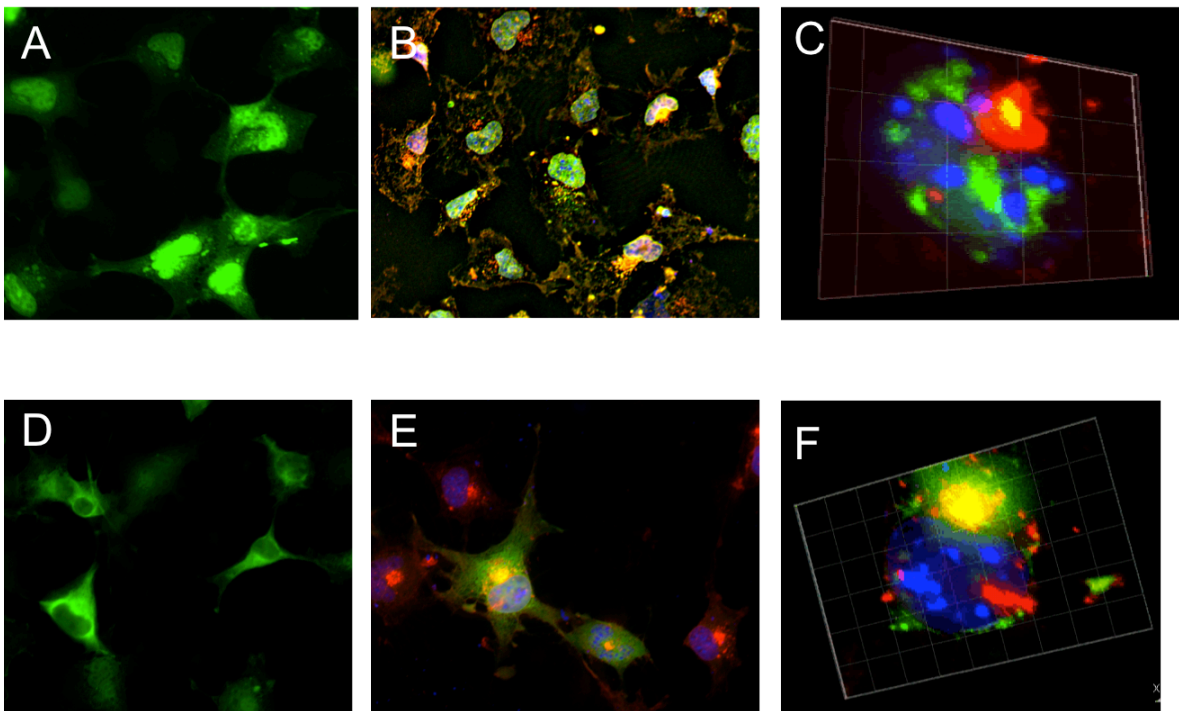


Figura 7. Localización de la proteína de fusión EGFP-B13R y la proteína EGFP nativa en células Cos7.

Las células fueron transfectadas con los plásmidos pEGFP (panel superior) y pEGFP-SPI2 (panel inferior); luego de 48h de cultivo, las células fueron visualizadas por microscopía de epifluorescencia (A y D) y microscopía confocal digital (B, E, C y F); sin deconvolución (B y E) y con deconvolución (C y F) para demostrar la presencia de GFP a nivel intranuclear y la exclusión de esta localización de la proteína de fusión. Las membranas y los núcleos celulares fueron marcadas con la fluorescencia de contraste roja (WGA-rodamina) y azul (Hoechst), respectivamente.

4.2 El sistema HSVtk/GCV en presencia de la proteína B13R induce un tipo de muerte celular con características morfológicas diferentes a las de la apoptosis en células HEK-293T

Para determinar el mecanismo de muerte celular inducida por la proteína de fusión B13R-Tk y tratamiento con GCV, se evaluaron inicialmente los cambios morfológicos en células HEK-293T transfectadas transitoriamente con los plásmidos que expresan los genes que codifican para la proteína HSVtk fusionada con B13R (pEGFP-SPI2-Tk) o para la proteína HSVtk sola (pLNCTk). La observación de las células bajo microscopia de luz mostro algunas diferencias morfológicas según el sistema utilizado (Figura 8).

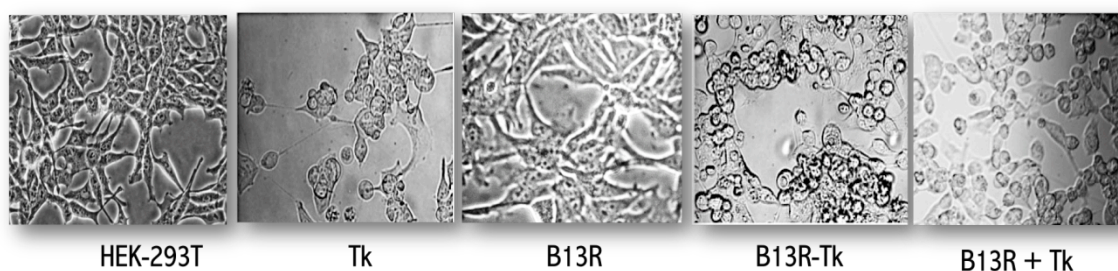


Figura 8. Aspecto morfológico de células HEK-293T luego del tratamiento con el sistema HSVtk/GCV, en presencia o ausencia de la proteína B13R. Las células fueron transfectadas con los plásmidos pLNC-Tk, pCI-SPI2, pEGFP-SPI2-Tk o co-transfectadas con los plásmidos pLNCTk y pCI-SPI2 y fueron observadas bajo microscopio de luz (magnificación 200X) luego de 48h de tratamiento con GCV (50ug/ml)

En las células transfectadas con el plásmido pLNC-Tk se observó mejor conservación de la adherencia celular así como una morfología alargada propia de las células HEK-293T; adicionalmente, se visualizaron pequeños cuerpos apoptóticos (Fig 8). Por el contrario, en las células transfectadas con el plásmido pEGFP-SPI2-Tk se observó una alteración marcada de la morfología, un proceso de muerte desordenado en el que se observaron células con edema de todo el cuerpo celular y un rápido desprendimiento de la placa de cultivo (Fig 8). Como era de esperarse, cuando las células fueron co-transfectadas con plásmidos que expresan los genes que codifican para las proteínas Tk y B13R de manera independiente, se observaron cambios morfológicos similares pero más claros que los observados con el plásmido que expresa la secuencia que codifica para la proteína fusionada (Fig 8). Las células sin transfectar y tratadas con GCV no

mostraron cambios en su morfología, así como tampoco las células transfectadas con el plásmido pCI-SPI2 que expresan la proteína B13R en presencia de GCV.

Los cambios morfológicos celulares inducidos por el tratamiento de células HEK-293T con el sistema HSVtk/GCV en presencia de B13R, se evaluaron adicionalmente por microscopía de luz utilizando tinción de Giemsa (Figura 9).

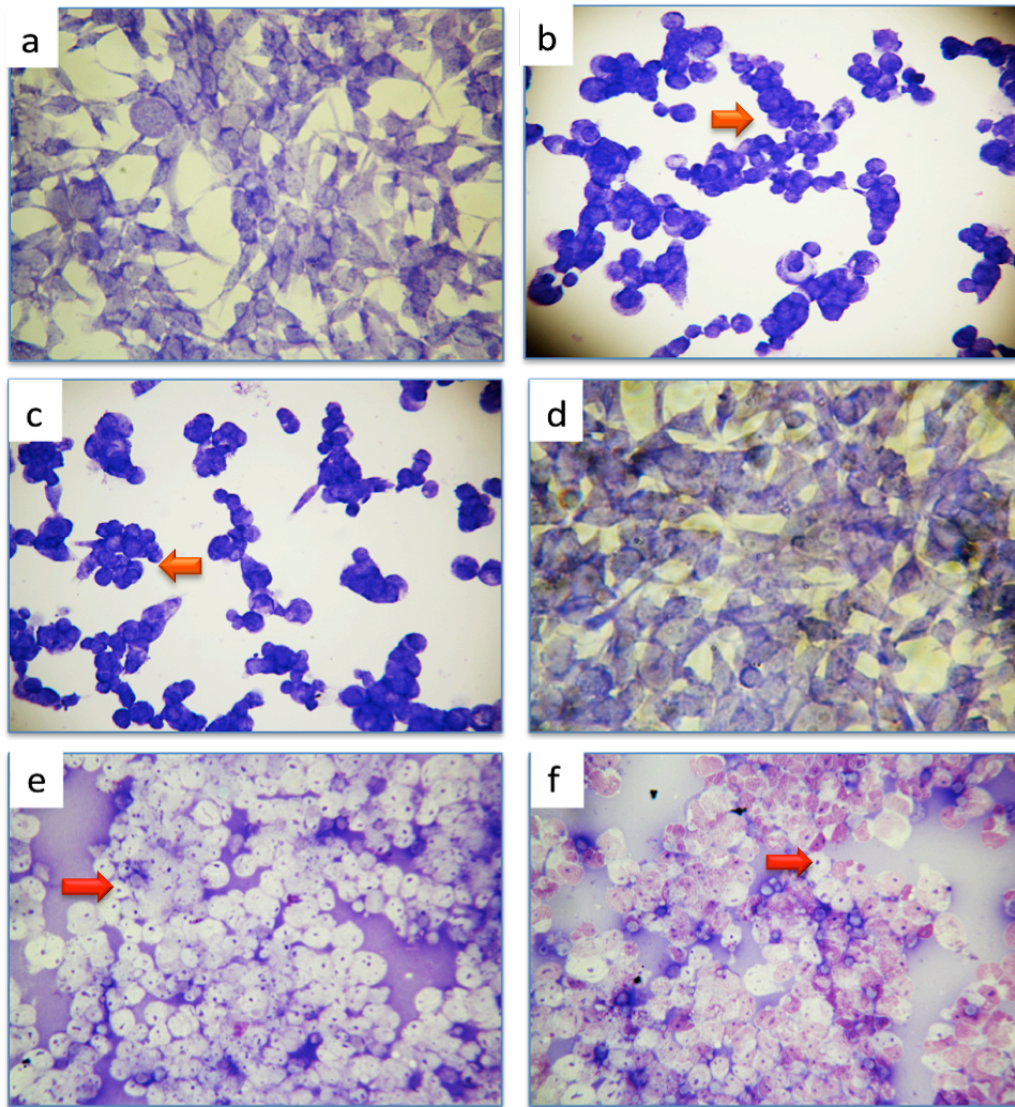


Figura 9. Características morfológicas asociadas al proceso de muerte celular en células HEK-293T luego del tratamiento con el sistema HSVtk/GCV, en presencia o ausencia de la proteína B13R.

Las células fueron transfectadas con los plásmidos pLNC-tk (c), pCI-SPI2 (d), pEGFPN3-SPI2-Tk (f) o cotransfectadas con los plásmidos pLNC-Tk y pCI-SPI2 (e) y coloreadas con GIEMSA luego de haberse sido tratadas por 48h con GCV. Como controles negativo y positivo de apoptosis, se utilizaron células no transfectadas (a) y células tratadas con taxol (b), respectivamente

En este caso, se analizaron células sin transfectar (Figura 9a) y se compararon con células transfectadas con los vectores pCI-SPI2 (Figura 9d), células cotransfectadas con los plásmido pLNC-Tk+pCI-SPI2 (Figura 9e) y células transfectadas con el plásmido pEGFPN3-SPI2-Tk (Figura 9f); como control positivo de muerte celular inducido por apoptosis se evaluaron células tratadas con taxol (Figura 9b).

En las células transfectadas con el plásmido pLNC-tk (Figura 9c) se visualizaron pequeños grupos de células y ocasionalmente células individuales mostrando una morfología ovalada o casi esférica y una clara disminución del tamaño celular con poco o casi nulo componente citoplasmático, en comparación con la morfología alargada normal de esta línea celular de fibroblastos (Fig 9a). Estas células adquirieron una coloración intensa de azul oscuro, probablemente debido a la condensación de la cromatina. La membrana celular parece estar intacta dado que no se observó ninguna coloración en los espacios extracelulares que pudiera indicar salida de componentes del espacio intracelular. Adicionalmente, se observó sobre la membrana plasmática de algunas células la formación de vesículas redondeadas de color azul intenso compatibles con la estructura de cuerpos apoptóticos. Una morfología celular similar se observó en las células tratadas con el inductor de apoptosis Taxol (Figura 9b).

Por otro lado, en las células transfectadas con el plásmido pEGFP-SPI2-Tk (Figura 9f) se observó la conformación de grupos con mayor número células y, a diferencia de lo observado en las células transfectadas con el plásmido pLNC-Tk o las células con apoptosis inducida por Taxol, las células presentaron una morfología redondeada y de mayor tamaño, características compatibles con edema celular. Adicionalmente, en estas células no se observó la coloración intracelular azul debida a la tinción de los núcleos y ribosomas ni tampoco una coloración de azul intenso asociada a condensación de la cromatina. Por el contrario, el citoplasma de estas células presentó un aspecto blanquecino con algunas coloraciones rojas-rosadas posiblemente debida a la superposición de coloraciones secundarias producto de la oxidación del azul de metileno las cuales

usualmente tiñen núcleos degradados y dispersos en el citoplasma. Así mismo, en este caso, los espacios intercelular presentaron una coloración con rangos entre el azul, violeta y rosado, lo cual sugiere la presencia de material nuclear, así como contenido citoplasmático, los cuales pudieran haber sido liberados al espacio extracelular. Estas observaciones sugieren un compromiso en la integridad y la permeabilidad de la membrana de estas células, así como también la fragmentación y liberación del núcleo y cromatina al espacio extracelular.

Cambios similares a los observados en las células transfectadas con el plásmido pGFP-SPI2-Tk se observaron en las células co-transfectadas con los plásmidos pLNC-Tk y pCI-SPI2 (Figura 9e).

El cultivo de células transfectadas con el plásmido pCI-SPI2 y tratadas con GCV (figura 9d) mostró una morfología similar a la observada en células sin transfectar y tratadas con GCV. En estos cultivos se observaron células alargadas con una coloración violeta claro en el citoplasma y de azul oscuro en los núcleos, sin ningún tipo de coloración en los espacios intercelulares.

4.3 El sistema HSVTk/GCV en presencia de la proteína B13R induce una muerte celular tardía, asociada a cambios en la expresión de la fosfatidil serina en la membrana citoplasmática de células HEK-293T

Para determinar las diferencias en los cambios en la membrana celular asociados a los mecanismos de muerte celular inducidos por GCV en células HEK-293T transfectadas con los plásmido pEGFP-SPI2-Tk ó pLNC-Tk, células sometidas a los diversos tratamientos fueron marcadas con Anexina V y con 7AAD simultáneamente, con el fin de determinar la expresión de fosfatidil serina en la membrana celular y la integridad de la misma (Figura 10).

Después de 48h de tratamiento con GCV las células transfectadas con el plásmido pLNC-Tk mostraron un porcentaje de células positivas para Anexina V más alto que las células transfectadas con el plásmido pGFP-SPI2-Tk (77.2 y 60%

respectivamente), mientras que el porcentaje de células doblemente positivas, Anexina V⁺/7AAD⁺ fue más alto en las células transfectadas con el plásmido pGFP-SPI2-Tk (9.2 y 20% respectivamente).

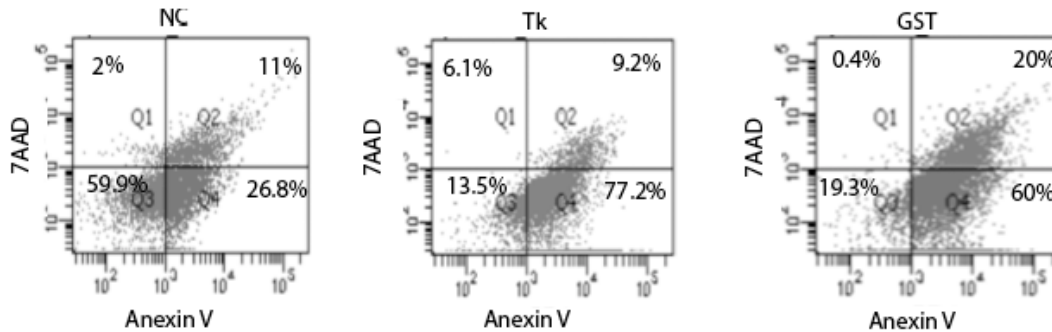


Figura 10. Expresión de fosfatidil serina e integridad de la membrana plasmática de células HEK-293T luego del tratamiento con el sistema HSVTk/GCV, en presencia o ausencia de la proteína B13R.

Las células fueron transfectadas con los plásmidos pLNC-Tk (Tk) o pEGFP-SPI2-Tk (GST) y tratadas con GCV. Luego de 48h de tratamiento, las células fueron teñidas con una combinación de Anexina V (marcada con un fluorocromo naranja) y el reactivo 7AAD (fluorocromo rojo); la intensidad de fluorescencia de los respectivos marcadores fue determinada por citometría de flujo. Como control negativo se utilizaron células sin transfectar (NC). La gráfica representa uno de dos experimentos con comportamientos similares.

Por otra parte el porcentaje de células muertas fue ligeramente más alto en las células transfectadas con el plásmido pLNC-Tk que en las transfectadas con el pGFP-SPI2-Tk (86.5 y 80% respectivamente). Por lo anterior, se puede concluir que del total de células muertas después del tratamiento con GCV un porcentaje más alto de las células transfectadas con el plásmido pGFP-SPI2-Tk pasan del estadio de células Anexina V⁺/7AAD⁻ al estadio de células doblemente positivas en comparación a las células transfectadas con el plásmido pLNC-Tk (89.25 y 74.57% Anexina V⁺/7AAD⁻ y 10.64 y 24.94% doblemente positivas, respectivamente).

Lo anterior indica que aunque las células transfectadas con el plásmido que expresa la proteína antiapoptótica B13R mueren más lentamente, estas pierden la integridad de su membrana plasmática más rápidamente, lo cual sugiere un mecanismo de muerte celular diferente, pero asociado a la expresión de fosfatidil serina en la cara externa de la membrana plasmática.

4.4 El sistema HSVtk/GCV en presencia de la proteína B13R inhibe la actividad proteolítica tipo caspasa 3 en células HEK-293T

Con el fin de evaluar la actividad catalítica de la caspasa-3 en células transfectadas con el plásmido fusión pEGFP-SPI2-Tk y tratadas con GCV, se usó el sustrato fluorescente DEVDGI el cual es escindido preferencialmente por proteasas tipo Caspasa 3. La escisión de DEVDG, relacionado con la presencia de la Caspasa 3 fue mucho menor en células que expresaban la proteína de fusión B13R-Tk en comparación con las células que expresaban Tk, con porcentajes de 20.3 y 47.8% respectivamente.

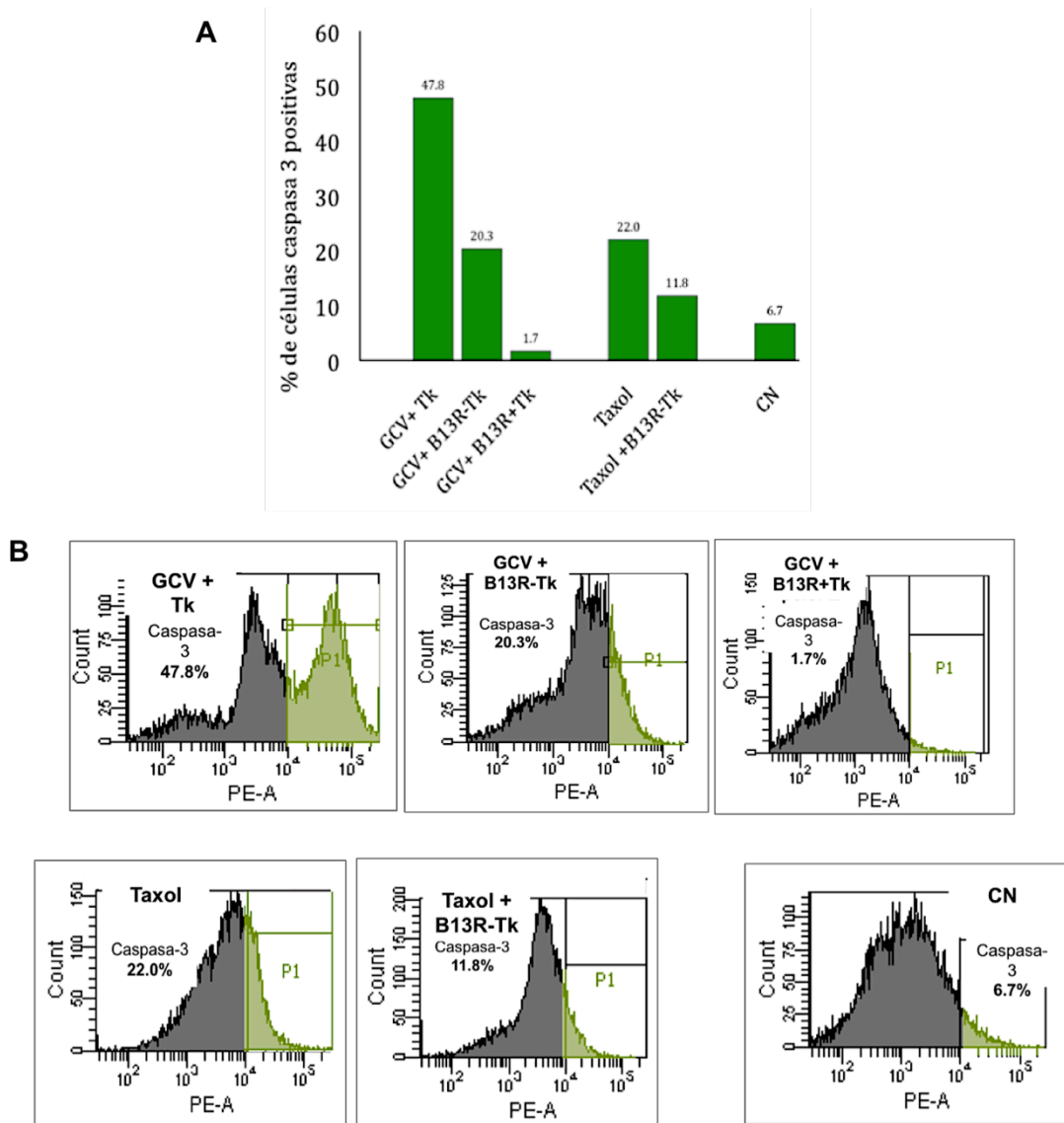


Figura 11. Inhibición de caspasa-3 en células HEK-293T luego del tratamiento con el sistema HSVTk/GCV, en presencia o ausencia de la proteína B13R.

Las células fueron transfectadas con los plásmidos pLNC-Tk (GCV+Tk), pEGFP-SPI2-Tk (GCV+B13R-Tk), o co-transfectadas con los plásmidos pCI-SPI2 y pLNC-Tk (GCV+B13R+Tk) y tratadas con GCV. Como control positivo de la expresión de caspasa-3 y de la actividad inhibitoria de caspasas de la proteína de fusión B13R-Tk en otro sistema, se utilizaron células tratadas con taxol y transfectadas con plasmido pEGFP-SPI2-Tk (Taxol+B13R-Tk; Taxol: células tratadas con taxol y sin transfectar). Como control negativo, se utilizaron células sin tratamientos y sin transfección (CN). Después de 48h de tratamiento con GCV o 6h con taxol, las células fueron marcadas con un sustrato específico que emite fluorescencia verde luego de la escisión por caspasa-3. Los niveles de fluorescencia fueron determinados mediante citometría de flujo. La gráfica de barras (A) representa el porcentaje de células positivas para caspasa-3; los histogramas (B) muestran la intensidad de la fluorescencia y el porcentaje de células que exhiben niveles positivos de fluorescencia (intensidades superiores al nivel de autofluorescencia de las células HEK-293T; datos no mostrados).

Dado que las células co-transfectadas con los plásmidos portadores de cada una de las proteínas pCI-SPI2 y pLNC-Tk mostraron un porcentaje de 1.7% podría atribuirse un significativo valor del porcentaje de sustrato escindido a la pérdida de expresión que se da en la proteína fusión por tratarse de una proteína triple B13R-Tk-GFP (Figura 11).

4.5 El sistema HSVTk/GCV en presencia de la proteína B13R induce pérdida del PMM en menor proporción a la observada en un proceso de apoptosis en células HEK-293T

Los cambios en el PMM de células tratadas con el sistema HSVTk/GCV en presencia o ausencia de la proteína B13R fueron detectados mediante el uso de la sonda fluorescente JC-1, cual ha demostrado ser un ensayo de alta especificidad [117]. JC-1 forma agregados fluorescentes rojos en células que poseen un potencial de membrana mitocondrial normal; la pérdida de este potencial resulta en una disminución de la fluorescencia roja y una ganancia de la fluorescencia verde debido al estado monomérico del JC-1.

En células HEK-293T sin tratar, se observó un porcentaje de 5.7 en células con fluorescencia roja positiva. Como se muestra en la figura 12, la sonda JC-1

responde a los estímulos apoptóticos en células tratadas con Taxol y en células transfectadas con pLNC-Tk con porcentajes de 93.6 y 95.0 de fluorescencia verde, respectivamente lo que corresponde a una pérdida del PPM. Por otro lado, si bien las células que expresan en conjunto la proteína apoptótica Tk junto con la proteína B13R, que se cree es inhibidora de caspasas, expresan también altos porcentajes de fluorescencia asociada a la pérdida del PPM, estas son considerablemente menores a las células sometidas a estímulos apoptóticos, conservando porcentajes de hasta 20 y 25% en la fluorescencia asociada a MMP normal

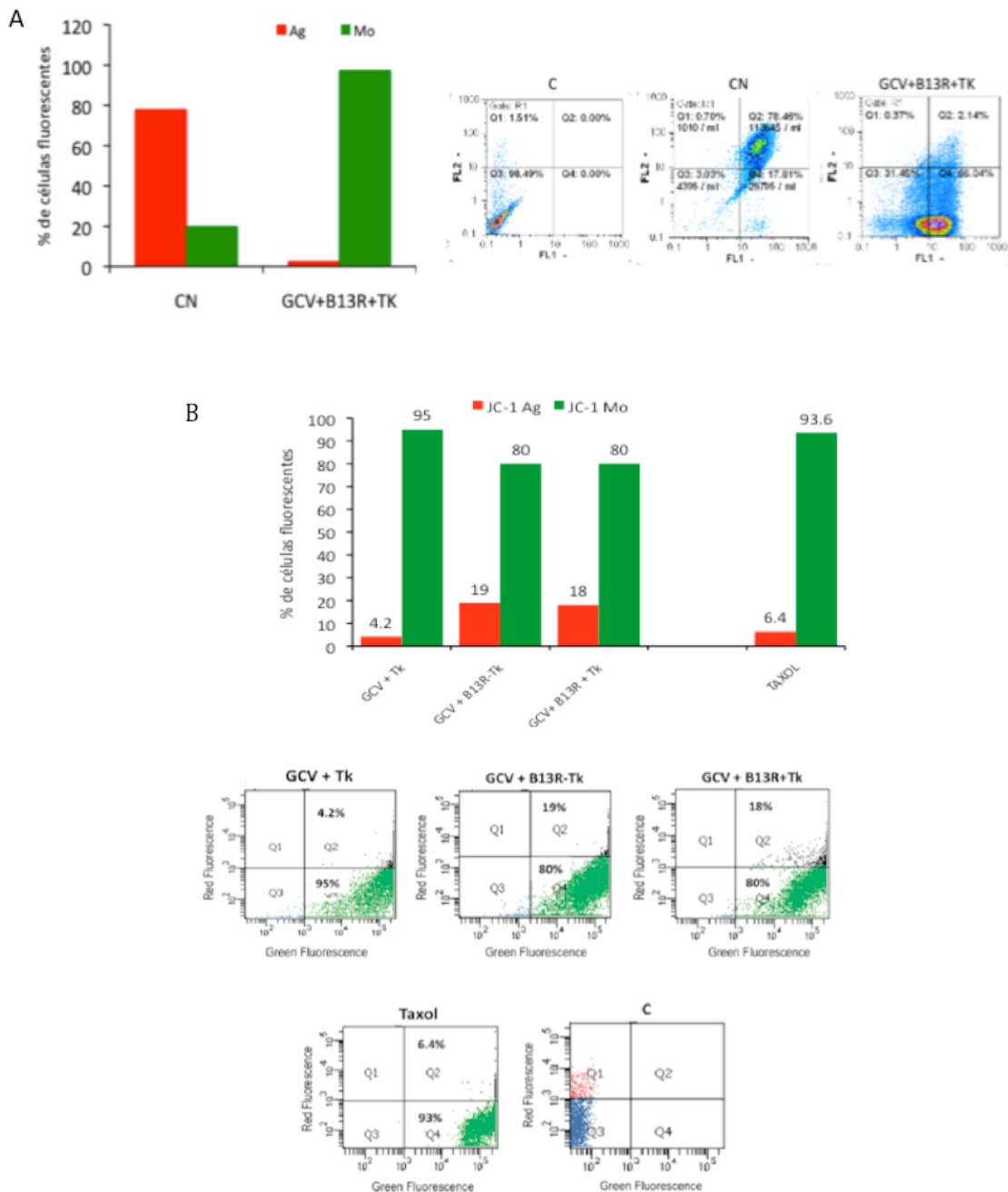


Figura 12. Cambios en el potencial de membrana mitocondrial (PMM) en células HEK-293T luego del tratamiento con el sistema HSVTk/GCV, en presencia o ausencia de la proteína B13R.

Las células fueron transfectadas con los plásmidos pLNC-Tk (GCV+Tk), pEGFP-SPI2-Tk (GCV+B13R-Tk), o co-transfectadas con los plásmidos pCI-SPI2 y pLNC-Tk (GCV+B13R+Tk) y tratadas con GCV. Como control positivo de apoptosis en otro sistema, se utilizaron células tratadas con taxol. Como control de la integridad del PMM, se utilizaron células sin ningún tratamiento ni transfección (CN). Después de 48h de tratamiento con GCV o 6h con taxol, las células fueron marcadas con la sonda fluorescente JC-1 la cual forma agregados fluorescentes rojos (JC-1 Ag) en células que poseen un PMM normal y cambia a fluorescencia verde (JC-1 Mo) en la medida en que se pierde el PMM. Los niveles de fluorescencia fueron determinados mediante citometría de flujo tomando como referencia de fluorescencia negativa, células sin ningún tratamiento y sin marcaje con la sonda JC-1 (C). En un experimento piloto (A) para evaluar la eficiencia de la sonda, se marcaron células sin ningún tratamiento (CN) y células co-transfectadas con los plásmidos pCI-SPI2 y pLNC-Tk y tratadas con GCV (GCV+B13R+Tk). En un segundo experimento (B), se evaluaron las células sometidas a todos los tratamientos a estudiar. Las gráficas de barras representan los porcentajes de células con niveles altos de fluorescencia roja y bajos de fluorescencia verde (JC-1 agregado) y porcentajes de células con niveles bajos de fluorescencia roja y altos de fluorescencia verde (JC-1 monomero); las gráficas de puntos muestran la intensidad y el porcentaje de células con las diferentes fluorescencias (fluorescencia roja: JC-1 agregado, eje Y; fluorescencia verde JC-1 monomero, eje X)

5. DISCUSION

En general, los mecanismos de muerte celular y sus manifestaciones morfológicas dependen de múltiples factores tales como el tipo de células, el metabolismo energético, la vía de señalización y el estímulo exterior además de otros factores ambientales. Contrario a lo aceptado hace algunos años, existen varias formas intermedias de muerte celular con características morfológicas tanto de apoptosis como de necrosis. Sin embargo, las vías de señalización que conducen a la fase final de muerte celular en estas formas intermedias aun no están bien definidas. Por ejemplo, podría darse el caso de procesos de muerte celular en los que entra en funcionamiento una vía alterna en la cual se activan las proteasas lisosomales; en este caso la condensación de la cromatina sería baja y la fragmentación de los núcleos por lo general no se llevaría a cabo y por lo tanto no se observarían las características morfológicas típicas de la apoptosis.

Esta claramente documentada actualmente la actividad antiapoptótica de muchas especies de virus, la cual es ejercida por diversos mecanismos, pero uno de los más estudiados es el de los inhibidores de caspasas tales como la proteína B13R del virus de la vaccinia. En gran medida estas observaciones han llevado al descubrimiento y elucidación de otros tipos de muerte celular intermedia entre la necrosis y la apoptosis. Así por ej., parece ser que la proteína B13R hace que células sometidas a estímulos apoptóticos, utilizando muchos de los mediadores de la apoptosis, cambien la vía de señalización al final de la fase efectora, al bloquear la actividad de la caspasa 8 e impedir la capacidad supresora de esta caspasa sobre RIP1.

Actualmente, parece estar claramente documentado que RIP1 y RIP3 en estas condiciones, inducen muerte celular por necroptosis. Este tipo de muerte celular parece estar involucrado en muchos mecanismos fisiopatológicos, incluyendo la fisiopatología de las infecciones causadas por virus con actividad anti-apoptótica.

Aunque la mayoría de los enfoques de los trabajos de investigación en este campo tratan de buscar métodos para la inhibición de este tipo de muerte celular, con fines terapéuticos, bajo el enfoque del concepto de terapia génica mediante genes suicidas, creemos que el desarrollo de un sistema de inducción controlada de necroptosis pudiera ser de utilidad tanto para el estudio experimental de procesos fisiopatológicos, como para su posible aplicación en la eliminación de células no deseadas por este mecanismo. Un aspecto poco explotado del manejo controlado de este tipo de muerte celular es su impacto sobre el sistema inmune. La remoción de células muertas se realiza por fagocitosis y este proceso es el primer paso para la activación de una respuesta inmune específica, si ésta es requerida. Una pregunta para resolver en este caso es, ¿qué sucede con el sistema inflamatorio o el sistema inmune cuando las células mueren por muerte necrótica programada?

Aunque se han reportado muchas excepciones y casos especiales de muerte celular y respuesta inmune, el concepto aceptado es que la apoptosis causa poca reacción inflamatoria y que induce tolerancia inmunológica, mientras que la necrosis causa inflamación y activación de la respuesta inmune, debido a que este proceso está asociado a la liberación de múltiples componentes celulares con actividad proinflamatoria y con gran capacidad de activar la fagocitosis y otros mecanismos de la respuesta inmune innata. En el caso de las infecciones con virus vaccinia, éstas se asocian a una respuesta inmune antiviral secundaria a procesos de muerte celular tipo necrosis inducida por el virus ya que infecciones con el virus vaccinia en ratones deficientes de RIP3 se asocian a falla en el control de la replicación viral. Esta noción es fortalecida por la observación de que algunos virus que codifican para proteínas anti-apoptóticas también producen inhibidores de RIP1, para bloquear un proceso de muerte celular necrótica que podría inducir una buena respuesta inmune antiviral^[118].

Finalmente, se ha sugerido que la necroptosis pudiera ser un mecanismo evolutivo de muerte celular para estimular el sistema inmune frente a la infección^[119].

Hasta ahora no se ha explorado el efecto que podría tener sobre el sistema inmune la muerte de células tumorales por diferentes tipos de muerte no apoptótica, especialmente la necrosis. Creemos que el sistema que hemos desarrollado utiliza dos mecanismos virales para la inducción de muerte celular no apoptótica en forma regulada y que podría ser útil para dilucidar este interrogante en estudios posteriores.

El sistema de inducción de muerte celular HSVtk/GCV ha sido ampliamente estudiado y es claro que la vía extrínseca de la apoptosis es su principal mecanismo de muerte celular. Este sistema induce muerte celular apoptótica asociada a un arresto del ciclo celular [¹²⁰], acumulación de p53, incremento de la expresión de CD95 y receptor del TNF en la superficie celular. La agregación de CD95 independiente de CD95-L conduce a la formación del complejo de señalización inductor de muerte el cual contiene la proteína con dominio de muerte (FAAD) y caspasa-8 [¹²¹].

En nuestros experimentos encontramos que las células transfectadas con el vector pLNC-Tk y tratadas con GCV muestran a las 48 horas una morfología típica de apoptosis, similar a la observada en células tratadas con Taxol. En estos dos sistemas hay también un alto porcentaje de células que expresan fosfatidil serina y se puede observar una proporción importante de células con actividad de caspasa 3 y pérdida del PMM, lo cual sugiere que el mecanismo de muerte celular en estos dos sistemas es preferencialmente apoptosis.

Sin embargo, las células que expresan las proteínas HSVtk y B13R al ser tratadas con GCV presentan cambios morfológicos diferentes a los característicos de las células apoptóticas, pero no tan claramente característicos de la morfología de las células necróticas. Aunque es claro que la presencia de la proteína B13R modifica el mecanismo de muerte celular inducido por el sistema HSVtk/GCV, con las observaciones que hemos podido obtener hasta ahora no podemos definir claramente el tipo de muerte celular inducido por este nuevo sistema. Aunque existen muchas evidencias experimentales que demuestran que estímulos

apoptóticos primarios en presencia de B13R y otros inhibidores de caspasa 8 desencadenan un mecanismo de muerte por necrosis [122], ésta se ha descrito asociada a un fenotipo aponecrotico que se caracteriza por la coexistencia de núcleos fragmentados y orgánulos degenerados [123], que no permite clasificar su morfología en forma definitiva como muerte celular necrótica.

Adicionalmente, la morfología de las células que mueren por necrosis es diversa, presentándose dos tipos principales de muerte celular necrótica: la autofagia y la desintegración no lisosomal, cada una de ellas con una morfología y anatomía subcelular diferente [124]. Sin embargo, en este trabajo solo se realizó microscopía de luz convencional de células frescas y después de la tinción con GIEMSA lo cual permite el estudio y el análisis de la anatomía subcelular. No obstante, las diferencias microscópicas observadas en células tratadas con el sistema HSVtk/GCV en presencia o ausencia de la proteína B13R es clara, especialmente en lo referente a la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y el aspecto morfológico general de las células. Lo anterior es compatible con un cambio también claro en el mecanismo de muerte celular el cual tampoco podemos definir claramente con los datos obtenidos hasta el momento.

Por otra parte, las células tratadas con el sistema HSVtk/GCV en presencia de la proteína B13R, además de las claras diferencias morfológicas, presentaron diferencia en algunos de los marcadores moleculares, con respecto a las células tratadas en ausencia de B13R; en estas células también hay expresión de fosfatidil serina, pero en un porcentaje más bajo y hay un incremento ligero en el número de células sin expresión de fosfatidil serina y en el compartimento de células con expresión de fosfatidil serina y pérdida de integridad de la membrana, esto sugiere una actividad disminuida de caspasas y una progresión más rápida hacia necrosis en las células que iniciaron la activación de la vía apoptótica mediada por el sistema HSVtk/GCV. Adicionalmente, como es de esperarse la actividad de caspasas es muy alta en las células tratadas con HSVtk/GCV pero es dramáticamente disminuida cuando las células expresan la proteína B13R especialmente en los experimentos de cotransfección en los cuales tanto Tk como

B13R tiene 100% de funcionalidad. La actividad bloqueadora de caspasa también es evidente, pero en menor medida, cuando B13R está presente como la proteína de fusión B13R-Tk, lo que se explica por la pérdida de la eficiencia funcional que sufren las proteínas de fusión. Sin embargo, la proteína de fusión B13R-Tk también mostró actividad inhibitoria de caspasas en células tratadas con taxol. Aunque el mecanismo de muerte celular inducido por taxol es apoptosis inducida por la vía de la mitocondria, esta vía también es dependiente de caspasas y esta observación demuestra que la proteína de fusión B13R-Tk, tiene un efecto inhibitorio de caspasas en las dos vías de inducción de apoptosis.

Finalmente, el sistema HSVTk/GCV se asocia claramente a una pérdida de la integridad del PPM, pero esta característica se ve ligeramente disminuida en las células tratadas en presencia de B13R, lo cual podría estar relacionado con una inducción más lenta de la activación de la vía de apoptosis iniciada por HSVTk-GCV y es compatible con el efecto bloqueador de caspasa de B13R.

En su conjunto, estos datos indican que nuestro nuevo sistema de inducción de muerte celular por una vía de apoptosis que se asocia al daño del DNA inducido por GCV en la presencia de la proteína inhibidora de caspasas, B13R, induce un tipo de muerte celular diferente a la apoptosis caracterizado por: (i) una clara diferencia morfológica, (ii) una actividad de caspasas muy baja, (iii) compromiso del PPM disminuido con respecto al proceso clásico de apoptosis, (iv) expresión de fosfatidil serina en la membrana y (v) pérdida de la integridad de la membrana plasmática. Este tipo de muerte celular probablemente es una de las formas de muerte celular por necrosis programada. Considerando los reportes que documentan la función de la B13R como inhibidora de caspasas y sobre el efecto de los estímulos apoptóticos en presencia de inhibidores de caspasas tipo SPI, es muy probable que la muerte celular inducida en nuestro sistema, sea necroptosis. Esto podría corroborarse mediante estudios de la actividad de RIP1 y RIP3 y su actividad de quinasa.

Finalmente, creemos que hemos desarrollado un sistema de inducción de muerte celular con estímulo apoptótico en presencia de inhibidores de caspasas el cual es muy versátil y fácilmente reproducible y pudiera utilizarse para estudios del efecto de la inhibición de apoptosis mediada por virus codificadores de caspasa y especialmente de nuestro interés, el efecto de las distintas formas de muerte celular sobre el sistema inmune y su respuesta ante las diferentes formas de muerte de células tumorales.

6. CONCLUSIONES

- El vector que expresa la secuencia de DNA que codifica para la proteína recombinante de fusión constituida por la proteína B13R, fusionada con las proteínas Tk y GFP, induce un mecanismo de muerte celular diferente a la apoptosis en células HEK-293T.
- La presencia de la proteína B13R en el sistema de terapia de suicidio génico, HSVTk/GCV inhibe dramáticamente la actividad de la caspasa-3 y en menor proporción la pérdida del PMM en comparación con la muerte por apoptosis en células HEK-293T.
- Aunque el efecto ejercido por la presencia de la proteína B13R en células HEK-293T tratadas con el sistema HSVTk/GCV, no confirió características típicas de muerte celular por necrosis, si permiten sugerir la ocurrencia de un mecanismo de muerte celular mas cercano a las formas de necrosis, denominado necroptosis, el cual corresponde a una necrosis programada.
- La modificación en el mecanismo de muerte celular observada mediante la presencia de la proteína B13R en el sistema HSVTk/GCV, presenta nuevas posibilidades para su aplicación en enfoques experimentales de tratamiento con terapia génica.

7. PERSPECTIVAS

- Aunque el sistema de muerte celular presentado en este trabajo ofrece una gran potencial para posibles aplicaciones en estudios experimentales de terapia génica, se requiere identificar y verificar el mecanismo de muerte celular inducido mediante métodos finos de biología molecular y celular
- El diseño del vector conteniendo los genes para la proteína de fusión, es susceptible de mejoramiento, ya que el sistema reportero con GFP, reduce substancialmente la eficiencia de la expresión y la función de la proteína de interés. Se requiere la generación de un vector conteniendo únicamente las dos proteínas de interés, Tk y B13R
- Una vez elucidado el mecanismo de muerte celular, futuros ensayos de inmunización, permitirían comparar la respuesta inmune generada por la muerte de células tumorales mediante el sistema tradicional HSVtk/GCV y el sistema HSVtk/GCV en presencia de la proteína B13R.

8. BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ GLOBOCAN 2008 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008 <http://globocan.iarc.fr/>
- ² Moolten. F. L. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res.*1986, 46: 5276-5281.
- ³ Gagandeep, S., Brew, R., Green, B., Christmas, S. E., Klatzmann, D., Poston, G. J., and Kinsella, A. R. Prodrug-activated gene therapy: involvement of an immunological component in the “bystander effect.” *Cancer Gene Ther.*1996.3: 83–88
- ⁴ Ming Li and Amer A. Beg. Induction of Necrotic-Like Cell Death by Tumor Necrosis Factor Alpha and Caspase Inhibitors: Novel Mechanism for Killing Virus-Infected Cells. *Journal of Virology.* 2000. 74 (16): 7470–7477
- ⁵ Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADASCIID: Initial trial results after 4 years. *Science* 1995. 270, 475–80
- ⁶ Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000. 288, 669-672.
- ⁷ Blomberg P, Smith CI. Gene therapy of monogenic and cardiovascular disorders. *Expert Opin Biol Ther* 2003. 3, 941-949.
- ⁸ Anas El-Aneed. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release.* 2004. 94,1-14
- ⁹ Statham S, Morgan RA. Gene therapy clinical trials for HIV. *Curr Opin Mol Ther* 1999. 1,430-436.
- ¹⁰ Nielsen LL, Maneval DC. P53 tumor suppressor gene therapy for cancer. *Cancer Gene Therapy.*1998. 5(1):52-63
- ¹¹ Guilian Niu, Richard Heller, Robyn Catlett-Falcone, Domenico Coppola. Gene Therapy with Dominant-negative Stat3 Suppresses Growth of the Murine Melanoma B16 Tumor in Vivo. *Cancer Research.* 1999. 59,5059 –5063
- ¹² Yang J, Xie SX, Huang Y et al. Prostate-targeted biodegradable nanoparticles loaded with androgen receptor silencing constructs eradicate xenograft tumors in mice.. *Nanomedicine.* 2012.1-13

-
- ¹³ Pittella F, Miyata K, Maeda Y et al. Pancreatic Cancer Therapy by Systemic Administration of VEGF siRNA Contained in Calcium Phosphate/Charge-Conversional Polymer Hybrid Nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2012.
- ¹⁴ Seth P. Vector-mediated cancer gene therapy: an overview. *Cancer Biology and Therapy*. 2005. 4(5):512-7
- ¹⁵ Daniel Portsmouth, Juraj Hlavaty and Matthias Renner. Suicide genes for cancer therapy. *Molecular Aspects of Medicine*. 2007. 4–41
- ¹⁶ Nüesch JP, Lacroix J, Marchini A, Rommelaere J. Rodent Parvoviruses: Mechanisms Of Oncolysis And Prospects For Clinical Cancer Treatment. *Clinical Cancer Research*. 2012
- ¹⁷ Klyushnenkova, Elena N. Kouivaskaia, Diana V. Parkins, Christopher et al. A Cytomegalovirus-based Vaccine Expressing a Single Tumor-specific CD8+ T-cell Epitope Delays Tumor Growth in a Murine Model of Prostate Cancer. *Journal of Immunotherapy*. 2012. 35,5 :390–399
- ¹⁸ Marais, R., Spooner, R. A., Light, Y., Martin, J., and Springer, C. J. Gene-directed enzyme prodrug therapy with a mustard prodrug/carboxypeptidase G2 combination. *Cancer Res*. 1996. 56, 4735–4742.
- ¹⁹ Bridgewater, G., Springer, C. J., Knox, R., Minton, N., Michael, P., and Collins, M. Expression of the bacterial nitroreductase enzyme in mammalian cells renders them selectively sensitive to killing by the prodrug CB1954. *Eur. J. Cancer* . 1995. 2362–2370.
- ²⁰ Saukkonen, K., Hemminki, A.,. Tissue-specific promoters for cancer gene therapy. *Expert Opin. Biol. Ther*. 2004.4 (5), 683–696.
- ²¹ Yakkundi, A., McErlane, V., Murray, M., McCarthy, H.O., Ward, C., Hughes, C.M., Patterson, L.H., Hirst, D.G., McKeown, S.R., Robson, T. Tumor-selective drug activation: a GDEPT approach utilizing cytochrome P450 1A1 and AQ4N. *Cancer Gene Ther*. 2006.13 (6), 598–605.
- ²² Schepelmann, S.; Springer, C. J. Viral vectors for gene-directed enzyme prodrug therapy. *Curr. Gene Ther.*, 2006. 6(6), 647-670.
- ²³ Kassis, A. I.; Korideck, H.; Wang, K.; Pospisil, P.; Adelstein, S. J. Novel prodrugs for targeting diagnostic and therapeutic radionuclides to solid tumors. *Molecules*. 2008. 13(2), 391-404.
- ²⁴ Saukkonen, K.; Hemminki, A. Tissue-specific promoters for cancer gene therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2004. 4(5), 683-696.

-
- ²⁵ Dilber, M.S., Abedi, M.R., Christensson, B., Bjorkstrand, B., Kidder, G.M., Naus, C.C., Gahrton, G., Smith, C.I. Gap junctions promote the bystander effect of herpes simplex virus thymidine kinase in vivo. *Cancer Res.* 1997. 57 (8), 1523–1528
- ²⁶ Fick, J., Barker 2nd, F.G., Dazin, P., Westphale, E.M., Beyer, E.C., Israel, M.A. The extent of heterocellular communication mediated by gap junctions is predictive of bystander tumor cytotoxicity in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995. 92 (24), 11071–11075.
- ²⁷ Vrionis, F.D., Wu, J.K., Qi, P., Waltzman, M., Cherington, V., Spray, D.C. The bystander effect exerted by tumor cells expressing the herpes simplex virus thymidine kinase (HSVtk) gene is dependent on connexin expression and cell communication via gap junctions. *Gene Ther.* 1997. 4 (6), 577–585.
- ²⁸ Yamasaki, H., Enomoto, K., Fitzgerald, D.J., Mesnil, M., Katoh, F., Hollstein, M. Role of intercellular communication in the control of critical gene expression during multistage carcinogenesis. *IARC Sci. Publ.* 1988. (92), 57–75.
- ²⁹ Yamasaki, H., Krutovskikh, V., Mesnil, M., Tanaka, T., Zaidan-Dagli, M.L., Omori, Y. Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis. *CR Acad. Sci. III* 1999. 322 (2–3), 151–159.
- ³⁰ Yamasaki, H., Omori, Y., Krutovskikh, V., Zhu, W., Mironov, N., Yamakage, K., Mesnil, M. Connexins in tumour suppression and cancer therapy. *Novartis Found. Symp.* 1999. 219 241-54; discussion 254-60.
- ³¹ Wu JK, Cano WG, Meylaerts SA, Qi P, Vrionis F, Cherington V. Bystander tumoricidal effect in the treatment of experimental brain tumors. *Neurosurgery* 1994. 35: 1094-1102; discussion 1102-3.
- ³² Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN. The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res.* 1993. 1;53(21):5274-83
- ³³ Kianmanesh, A.R., Perrin, H., Panis, Y., Fabre, M., Nagy, H.J., Houssin, D., Klatzmann, D. A "distant" bystander effect of suicide gene therapy: regression of nontransduced tumors together with a distant transduced tumor. *Hum. Gene Ther.* 1997. 8 (15), 1807–1814.
- ³⁴ Pierrefite-Carle, V., Baque, P., Gavelli, A., Mala, M., Chazal, M., Gugenheim, J., Bourgeon, A., Milano, G., Staccini, P., Rossi, B.,. Cytosine deaminase/5-fluorocytosine-based vaccination against liver tumors: evidence of distant bystander effect. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999. 91 (23), 2014–2019.

-
- ³⁵ Moolten, F. L. (1986). "Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy." *Cancer Res* 46(10): 5276-81.
- ³⁶ De Clerq, E. Guanosine analogues as anti-herpes virus agents. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2000. 19:1531-1541
- ³⁷ Faulds D and Heel R. C. Ganciclovir: A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections. 1990. *Drugs*. 39:597-638
- ³⁸ Elion, G.B., Furman, P.A., Fyfe, J.A., de Miranda, P., Beauchamp, L., Schaeffer, H.J. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977. 74 (12), 5716–5720.
- ³⁹ Fillat, C., Carrio, M., Cascante, A., Sangro, B. Suicide gene therapy mediated by the Herpes Simplex virus thymidine kinase gene/Ganciclovir system: fifteen years of application. *Curr. Gene Ther.* 2003. 3 (1), 13–26.
- ⁴⁰ Mesnil M. Tanaka T, Yamasaki H. Bystander effect in herpes simplex virus-thymidine kinase/ganciclovir cancer gene therapy: role of gap-junctional intercellular communication. *Cancer Research*. 2000. 1;60(15):3989-99.
- ⁴¹ Frank, K. B., Chiou, J. F., and Cheng, Y. C. Interaction of herpes simplex virus- induced DNA polymerase with 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine triphosphate. *J. Biol. Chem.* 1984.259: 1566–1569,
- ⁴² Mar, E. C., Chiou, J. F., Cheng, Y. C., and Huang, E. S. Inhibition of cellular DNA polymerase α and human cytomegalovirus-induced DNA polymerase by the triphosphates of 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine. *J. Virol.* 1985. 53: 776 –780,
- ⁴³ Cheng, Y., Grill, S. P., Dutschman, G. E., Nakayama, K., and Bastow, K. F. Metabolism of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine, a new anti-herpes virus compound, in Herpes simplex virus-infected cells. *J. Biol. Chem.* 1983. 258: 12460– 12464
- ⁴⁴ Smee, D. F., Boehme, R., Chernow, M., Binko, B. P., and Matthews, T. R. Intracellular metabolism and enzymatic phosphorylation of 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine and acyclovir in herpes simplex virus infected and uninfected cells. *Biochem. Pharmacol.*, 34: 1049–1056, 1985.
- ⁴⁵ Freeman, S. M., Abboud, C. N., Whartenby, K. A., Packman, C. H., Koeplin, D. S., Moolten, F. L., and Abraham, G. N. The bystander effect: tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res*. 1993. 53: 5274–5283

-
- ⁴⁶ Hamel, W., Magnelli, L., Chiarugi, V. P., and Israel, M. A. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated apoptotic death of bystander cells. *Cancer Res.* 1996. 56: 2697–2702
- ⁴⁷ Wallace, H., MacLaren, K., Al-Shawi, R., and Bishop, J. O. Ganciclovir-induced ablation of non-proliferating thyrocytes expressing herpes thymidine kinase occurs by p53-independent apoptosis. *Oncogene*, 1996. 13: 55–61.
- ⁴⁸ Kaneko, Y., and Tsukamoto, A. Gene therapy of hepatoma: bystander effects and non-apoptotic cell death induced by thymidine kinase and ganciclovir. *Cancer Lett.* 1995. 96: 105–110.
- ⁴⁹ Srivastava D, Joshi G, Somasundaram K, Mulherkar R. Mode of cell death associated with adenovirus-mediated suicide gene therapy in HNSCC tumor model. *Anticancer Research.* 2011.;31(11):3851-7.
- ⁵⁰ Tomicic MT, Bey E, Wutzler P, Thust R, Kaina B. Comparative analysis of DNA breakage, chromosomal aberrations and apoptosis induced by the anti-herpes purine nucleoside analogues aciclovir, ganciclovir and penciclovir. *Mutat Research.* 2002 .29;505(1-2):1-11.
- ⁵¹ Grossman Z, Herberman RB. 'Immune surveillance' without immunogenicity. *Immunol Today* 1986;7:128-131
- ⁵² Klein G, Klein E. Surveillance against tumors--is it mainly immunological? *Immunology Letters.* 2005 Aug 15;100(1):29-33.
- ⁵³ Sell S. *Immunology, immunopathology and immunity.* Amsterdam: Elsevier, 1987:825
- ⁵⁴ Boon T. Teaching the immune system to fight cancer. *Sci Am* 1983; 266(3):32-39
- ⁵⁵ Barrera-Rodríguez R, Peralta-Zaragoza O, Madrid-Marina V. Molecular basis of cancer immunology. *Salud Publica Mex* 1995; 37:344-353
- ⁵⁶ Ichim CV. Revisiting immunosurveillance and immunostimulation: Implications for cancer immunotherapy. *J Transl Med* 2005;3:8
- ⁵⁷ Burnet M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* 1957:779-786
- ⁵⁸ Prehn RT. The immune reaction as a stimulator of tumor growth. *Science* 1972;176:170-171
- ⁵⁹ Ardiani A, Sanchez-Bonilla M, Black ME. Fusion enzymes containing HSV-1

thymidine kinase mutants and guanylate kinase enhance prodrug sensitivity in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther* 2010; 17: 86 - 96.

⁶⁰ Willmon CL, Krabbenhoft E, Black ME. A guanylate kinase/HSV-1 thymidine kinase fusion protein enhances prodrug-mediated cell killing. *Gene Ther* 2006; 13: 1309 - 1312.

⁶¹ Wei SJ, Chao Y, Hung YM, Lin WC, Yang DM, Shih YL et al. S- and G2-phase cell cycle arrests and apoptosis induced by ganciclovir in murine melanoma cells transduced with herpes simplex virus thymidine kinase. *Exp Cell Res* 1998; 241: 66 - 75.

⁶² Garin MI, Garrett E, Tiberghien P, Apperley JF, Chalmers D, Melo JV et al. Molecular mechanism for ganciclovir resistance in human T lymphocytes transduced with retroviral vectors carrying the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Blood* 2001; 97: 122 - 129.

⁶³ Deschamps M, Mercier-Lethondal P, Certoux JM, Henry C, Lioure B, Pagneux C et al. Deletions within the HSV-tk transgene in long-lasting circulating gene- modified T cells infused with a hematopoietic graft. *Blood* 2007; 110: 3842 - 3852.

⁶⁴ Noble S, Faulds D. Ganciclovir. An update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Drugs* 1998; 56: 115 - 146.

⁶⁵ van Dillen, I.J., Mulder, N.H., Vaalburg, W., de Vries, E.F., Hospers, G.A., 2002. Influence of the bystander effect on HSV-tk/GCV gene therapy. A review. *Current Gene Therapy*. 2 (3), 307–322.

⁶⁶ Shigeki Kuriyama, Hirohisa Tsujinoue, and Hitoshi Yoshiji. Immune Response to Suicide Gene Therapy. *Methods in Molecular Medicine. Suicide Gene Therapy*. Humana Press.

⁶⁷ Xiangling Wang, Chunyan Ji, Daoxin Ma, Jianqiang Zhao, Ming Hou, Haiqing Yu, & Shaolei Zang. Antitumor effects of cytosine deaminase and thymidine kinase fusion suicide gene under the control of mdr1 promoter in mdr1 positive leukemia cells. *Leukemia & Lymphoma*, August 2007; 48(8): 1600-09

⁶⁸ Duvall E, Wyllie AH. 1986. Death and the cell. *Immunology*. 7:115–19

⁶⁹ Engin Ulukaya, Ceyda Acilan and Yusuf Yilmaz. Apoptosis: why and how does it occur in biology? *Cell Biochemistry and Function*. 2011; 29: 468–480

-
- ⁷⁰ Elmore, S Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicology Pathology* 2007. 35 (4): 495-516
- ⁷¹ Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275:1132–3
- ⁷² Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, et al. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275:1129–32
- ⁷³ Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, et al. 1996. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 183:1533–44
- ⁷⁴ Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. 1984. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 142:67–77
- ⁷⁵ Martin SJ, Reutelingsperger CPM, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RCAA, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 1995.182:1545–56
- ⁷⁶ Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, et al. 1997. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *Journal of Biology Chemistry.* 272:26159–65
- ⁷⁷ Hogquist KA, Nett MA, Unanue ER, Chaplin DD. 1991. Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8485–89
- ⁷⁸ Bellone M, Iezzi G, Rovere P, Galati G, Ronchetti A, et al. 1997. Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. *J. Immunol.* 159:5391–99
- ⁷⁹ Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392:86–89
- ⁸⁰ Bicknell GR, Cohen GM. 1995. Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 207:40–47
- ⁸¹ Dong Z, Sikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA. 1997. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death: involvement of serine but not cysteine proteases. *Am. J. Pathol.* 151:1205–13

-
- ⁸² Didenko VV, Hornsby PJ. Presence of double-strand breaks with single-base 30 overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. 1996. *J. Cell Biol.* 135:1369–76
- ⁸³ Alexei Degterev and Junying Yuan. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology.* 2008. 9(5):378-90.
- ⁸⁴ Clarke, P. G. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* 1990.181, 195–213
- ⁸⁵ Yuan, J. Inducing autophagy harmlessly. *Autophagy.* 2007.4, 249–250
- ⁸⁶ Mizushima, N. Autophagy: process and function. *Genes Development.* 2007. 21, 2861–2873
- ⁸⁷ Yu, L. et al. Regulation of an ATG7–beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science.* 2004.304, 1500–1502
- ⁸⁸ Espert, L. et al. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J. Clin. Invest.* 2006.116, 2161–2172
- ⁸⁹ Pattingre, S., Espert, L., Biard-Piechaczyk, M. & Codogno, P. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie.* 2007.90, 313–323
- ⁹⁰ Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A. & Kroemer, G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Review Molecular Cell Biology.* 2007.8, 741–752
- ⁹¹ Oberstein, A., Jeffrey, P. D. & Shi, Y. Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. *Journal of Biology Chemical.* 2007.282, 13123–13132
- ⁹² Pattingre, S. et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.* 2005.122, 927–939
- ⁹³ Tracy, K. & Macleod, K. F. Regulation of mitochondrial integrity, autophagy and cell survival by BNIP3. *Autophagy.* 2007.3, 616–619
- ⁹⁴ Rashmi, R., Pillai, S. G., Vijayalingam, S., Ryerse, J. & Chinnadurai, G. BH3-only protein BIK induces caspase-independent cell death with autophagic features in Bcl-2 null cells. *Oncogene.* 2007. 27, 1366–1375
- ⁹⁵ Khwaja, A. & Tatton, L. Resistance to the cytotoxic effects of tumor necrosis factor α can be overcome by inhibition of a FADD/caspase-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 1999.274, 36817–36823

-
- ⁹⁶ Matsumura, H. et al. Necrotic death pathway in Fas receptor. *J. Cell Biol.* 2000.151, 1247–1256
- ⁹⁷ Vercammen, D. et al. Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J. Exp. Med.* 1998. 188, 919–930
- ⁹⁸ Chan, F. K. et al. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *J. Biol. Chem.* 2003. 278, 51613–51621
- ⁹⁹ Degterev, A. et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chem. Biol.* 2005 .1, 112–119
- ¹⁰⁰ Holler, N. et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature Immunol.* 2000. 1, 489–495
- ¹⁰¹ Festjens, N., Vanden Berghe, T. & Vandenabeele, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006 .1757, 1371–1387
- ¹⁰² Zong, W. X. & Thompson, C. B. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 2006. 20, 1–15
- ¹⁰³ Zheng, L. et al. Competitive control of independent programs of tumor necrosis factor receptor-induced cell death by TRADD and RIP1. *Mol. Cell Biol.* 2006 .26, 3505–3513
- ¹⁰⁴ Wang, K. et al. Structure-activity relationship analysis of a novel necroptosis inhibitor, Necrostatin-5. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007 .17, 1455–1465
- ¹⁰⁵ Jagtap, P. G. et al. Structure-activity relationship study of tricyclic necroptosis inhibitors. *J. Med. Chem.* 2007. 50, 1886–1895
- ¹⁰⁶ Temkin, V., Huang, Q., Liu, H., Osada, H. & Pope, R. M. Inhibition of ADP/ATP exchange in receptor- interacting protein-mediated necrosis. *Mol. Cell Biol.* 2006. 26, 2215–2225
- ¹⁰⁷ Suzuki, S. et al. Nur77 as a survival factor in tumor necrosis factor signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2003. 100, 8276–8280
- ¹⁰⁸ Oei, S. L., Keil, C. & Ziegler, M. Poly(ADP-ribosylation) and genomic stability. *Biochem. Cell Biol.* 2005. 83, 263–269

-
- ¹⁰⁹ Zong, W. X., Ditsworth, D., Bauer, D. E., Wang, Z. Q. & Thompson, C. B. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev.* 2004 .18, 1272–1282
- ¹¹⁰ Anna M. Gram, Joost Frenkel and Maaïke E. Rensing. Inflammasomes and viruses: cellular defence versus viral offence. *Journal of General Virology*. 2012. Epub ahead of print
- ¹¹¹ Susan Kettle, Antonio Alcamí, AnuKhanna, Robert Ehret, Christian Jassoy and Geoffrey L. Smith. Vaccinia virus serpin B13R (SPI-2) inhibits interleukin-1β-converting enzyme and protects virus-infected cells from TNF- and Fas-mediated apoptosis, but does not prevent IL-1β-induced fever. *Journal of General Virology*. (1997), 78, 677–685.
- ¹¹² Dobbstein M, Shenk T. Protection against Apoptosis by the Vaccinia Virus SPI-2 (B13R) Gene Product. *Journal of Virology*. 1996 Sept; 70 (9): 6479-85
- ¹¹³ Haga, I.R. and A.G. Bowie, Evasion of innate immunity by vaccinia virus. *Parasitology*, 2005. 130 Suppl: p. S11-25. 11. Zimmermann, K.C., C. Bonzon, and D.R. Green, *The machinery of programmed cell death*. *Pharmacol Ther*, 2001. **92**(1): p. 57-70.
- ¹¹⁴ Barry, M., et al., Apoptosis regulator genes encoded by poxviruses. *Prog Mol Subcell Biol*, 2004. 36: p. 19-37
- ¹¹⁵ Zhou, Q., et al., Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem*, 1997. 272(12): p. 7797-800
- ¹¹⁶ Ming Li and Amer A. Beg. Induction of Necrotic-Like Cell Death by Tumor Necrosis Factor Alpha and Caspase Inhibitors: Novel Mechanism for Killing Virus-Infected Cells. *Journal of Virology*. 2000. 74 (16): 7470–7477
- ¹¹⁷ Cossarizza, A., Baccarani-Contri, M., Kalashnikova, G., and Franceschi, C. *Biochemical. Biophysics. Research. Commun* 1993. 197, 40–45
- ¹¹⁸ Claudia Mack, Albert Sickmann, David Lembo and Wolfram Brune. Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein. *PNAS*. 2008. (26), 8: 3094–3099
- ¹¹⁹ Dana E Christofferson and Junying Yuan. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Current Opinion in Cell Biology*. 2010. 22, 2: 263–268
- ¹²⁰ Sung-Jen Wei, Yee Chao, Yi-Mei Hung, et al. S- and G2-phase Cell Cycle Arrests and Apoptosis Induced by Ganciclovir in Murine Melanoma Cells

Transduced with Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase. *Experimental Cell Research*. 1998. 241,1; 66–75

¹²¹ Hristian Beltinger, Simone Fulda, Thomas Kammertoens, Eric Meyer, Wolfgang Uckert, And Klaus-Michael Debatin. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases. *PNAS*. 1999, 96; 8699–8704

¹²² U. Ziegler and P. Groscurth. Morphological Features of Cell Death. *Physiology* 19:124-128, 2004

¹²³ Formigli L, Papucci L, Tani A, et al. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 182: 41-49, 2000.

¹²⁴ Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol* 181: 195_213, 1990.