

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



EFECTIVIDAD DEL SISTEMA HSV-*tk*/GCV MEDIADO  
POR TERAPIA GENICA EN TUMORES MAMARIOS  
ORTOTOPICOS Y HETEROTOPICOS

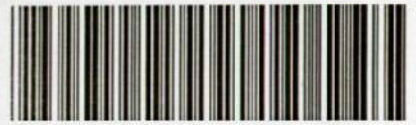
POR

MCP Y MC AUGUSTO ROJAS MARTINEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Biología  
Molecular e Ingeniería Genética

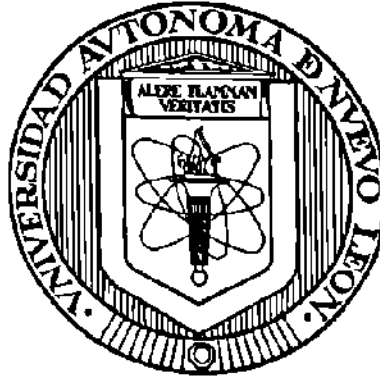
Monterrey, N. L. Mayo, 2000

TD  
RC280  
.B8  
R65  
2000  
c.1



1080125930

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTIVIDAD DEL SISTEMA *HSV-tk/GCV* MEDIADO POR TERAPIA GÉNICA  
EN TUMORES MAMARIOS ORTOTÓPICOS Y HETEROTÓPICOS**

**POR**

**MCP y MC AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Biología Molecular e  
Ingeniería Genética**

**Monterrey, N.L. Mayo, 2000**

TD

RC280

.B8

RG5

2000



**EFFECTIVIDAD DEL SISTEMA HSV-1k/GCV MEDIADO POR TERAPIA GÉNICA  
EN TUMORES MAMARIOS ORTOTÓPICOS Y HETEROTÓPICOS**

Aprobación de la Tesis:



---

**Dr. C. ESTUARDO AGUILAR CÓRDOVA**

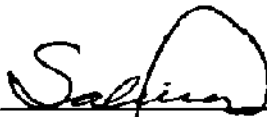
Director de Tesis



---

**Dr. HUGO A. BARRERA SALDAÑA**

Co-director de Tesis



---

**Dr. MARIO CESAR SALINAS CARMONA**



---

**Dra. HERMINIA MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**



---

**Dra. AGNÈS REVOL DE MENDOZA**



---

**Dr. ROBERTO MERCADO LONGORIA**

Subdirector

de Investigación y Estudios de Postgrado

*El trabajo experimental de esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Vectores de Terapia Génica, en el Centro para Terapia Celular y Génica, del Baylor College of Medicine, en Houston, Texas; bajo la dirección del **Dr. Carlos Estuardo Aguilar Córdova**, y siguiendo la normatividad del programa de posgrado del que forma parte el Doctorado en Ciencias con Especialidad en **Biología Molecular e Ingeniería Genética**, de la UANL, el **Dr. Hugo A. Barrera Saldaña** fungió como co-director.*

***DEDICATORIA:***

***A Rocío y a mis hijos David, Arturo e Isabel.***

***A Papá, quien me infundió el gusto por la ciencia. Hoy siento la alegría de darle una pequeña retribución.***

***A Mamá y a mis hermanos.***

***A mi suegra y mi cuñado.***



## **AGRADECIMIENTOS:**

Al Dr. Estuardo Aguilar Córdova, mi asesor. Con él aprendí la terapia génica desde las cosas más básicas a las técnicas refinadas, justo en los albores de esta nueva metodología. También me re-enseñó que hacer ciencia es echar la mente al vuelo, trabajar y tener capacidad de sorprenderse con los resultados.

Al Dr. Hugo Barrera, quien a la entrada del siglo XXI quiere comunicar que en México todavía se pueden construir pirámides en el medio de la selva, sin usar vehículos de ruedas para arrastrar el carruaje.

A Rocío, quien en los momentos de flaqueza, busca serenidad y me ayuda a reconciliarme conmigo mismo para seguir adelante. Además, es una mujer ejemplar, que en medio de su doctorado, procreo a nuestros tres motivos más importantes para vivir. Solo horas después de haber concluido responsablemente con el trabajo, se retiró a la sala de partos en las tres magníficas ocasiones.

A mis padres, quienes me enseñaron que todo lo bueno significa sacrificio, pero que siempre hay recompensas. A mi suegra, la Sra. Dora López Vda. de Ortiz, mi cuñado, el Sr. Andrés Ortiz López y a mi hermana, la Srta. Sandra Patricia Rojas Martínez, quienes sacrificaron muchas cosas para ayudarnos con nuestros hijos y nuestros estudios. Con estas dos familias, la de Colombia y la de México, siento una gran deuda. También hago esta dedicatoria a mis tíos, particularmente a Laura, María del Carmen, Oliverio y Amparo, por todo el apoyo que me dieron cuando lo necesité.

A los profesores Jairo Arrieta, Emilia Federici, José María Cantú, Horacio Rivera y Massimo Pandolfo, quienes me suministraron una valiosa guía para seguir un camino, me proporcionaron abundante ilustración y me dieron aliento oportuno para la consecución de los logros académicos que he alcanzado.

Al Dr. Kerby Oberg, invaluable sacrificado amigo y científico, quien me ayudó a interpretar muchos de los resultados de este trabajo y al a Sra. Francis Kittrell, quien me enseñó las manipulaciones quirúrgicas y el manejo de los roedores.

A mis compañeros y amigos, Ramón y Anna Brugada, Han Xian, Cassey Hoffman-Nyberg, Hope Taub, Wei Li, Felipe Amaya, Madhu Chikara y Julie, quienes me ofrecieron toda su amistad y todo el apoyo técnico para la realización de este trabajo.

A mis amigos, Ramón y Anna Brugada, Diego, Manuel y Gabriela González, Felipe y Catalina Amaya, Marisela, Francisco y Morela Brito, por todos los momentos de alegría en Houston.

A la honorable comisión de tesis, también constituida por los doctores Mario Cesar Salinas, Agnès Revol y Herminia Martínez, por sus sugerencias, su apoyo y su amistad.

A todos mis compañeros, profesores y estudiantes del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por sus sugerencias y apoyo para la culminación de esta tesis.

# Í N D I C E

<b>CONTENIDO:</b>	<b>PÁGINA:</b>
LISTA DE FIGURAS .....	IX
NOMENCLATURA .....	X
RESUMEN .....	XII
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>7</b>
2.1 HIPÓTESIS .....	7
2.2 OBJETIVO .....	7
2.2.1. Objetivo General .....	7
2.2.2. Objetivos Específicos .....	7
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>ESTRATEGIA GENERAL .....</b>	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
4.1 ORIGEN DE LOS REACTIVOS .....	12
4.2 MÉTODOS .....	14
4.2.1. Susceptibilidad de la línea tumoral TM40D al sistema <i>HSV-<math>\theta</math>/GCV</i> .....	14
4.2.2. Implantación de los tumores ortotópicos y heterotópicos .....	15
4.2.3. Administración del vector de terapia génica y tratamiento con GCV .....	17

4.2.4. Análisis del crecimiento tumoral .....	18
4.2.5. Análisis de sobrevida .....	20
4.2.6. Análisis histopatológico de los tumores .....	20
4.2.7. Estudios de linfocitos citotóxicos (LCT) anti TM40D .....	21
4.2.8. Análisis estadístico de las curvas de crecimiento tumoral de los implantes, del escalamiento de dosis, de eficacia antineoplásica y de sobrevida .....	24
 <b>CAPÍTULO V</b>	
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
5.1. SUSCEPTIBILIDAD DE LA LÍNEA TUMORAL TM40D AL SISTEMA <i>HSV-TK/GCV</i> .....	25
5.2. CRECIMIENTO DE LOS IMPLANTES ORTOTÓPICOS Y HETEROTÓPICOS ..	25
5.3. ESCALAMIENTO DE DOSIS .....	27
5.4. EFICACIA DEL SISTEMA HSV-TK/GCV EN LOS MODELOS ORTO Y HETEROTÓPICO .....	28
5.4.1. Curvas de crecimiento tumoral .....	28
5.4.2. Análisis histopatológico de los tumores .....	30
5.4.3. Análisis de sobrevida .....	32
5.4.4. Prueba de linfocitos anti-TM40D .....	32
 <b>CAPÍTULO VI</b>	
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>35</b>
 <b>CAPÍTULO VII</b>	
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>44</b>
 <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>46</b>
 <b>RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO .....</b>	<b>50</b>
 <b>ANEXO I: PUBLICACIÓN DERIVADA DE ESTA TESIS .....</b>	<b>53</b>
 <b>ANEXO II: PUBLICACIONES ASOCIADAS A ESTA TESIS .....</b>	<b>66</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b>	GENOMA DEL VECTOR AdV-RSV- <i>tk</i> .....	<b>13</b>
<b>FIGURA 2:</b>	CIRUGÍA PARA LA IMPLANTACIÓN DEL TUMOR EN LA GLÁNDULA MAMARIA NÚMERO 4.....	<b>16</b>
<b>FIGURA 3:</b>	SOBREVIDA DE LA LÍNEA TM40D TRATADA CON EL SISTEMA <i>HSV-<i>tk</i>/GCV</i> EN CONDICIONES DE CULTIVO DE TEJIDOS.....	<b>26</b>
<b>FIGURA 4:</b>	COMPARACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LOS TUMORES IMPLANTADOS TM40D EN LOS SITIOS ORTOTÓPICO Y HETEROTÓPICO.....	<b>26</b>
<b>FIGURA 5:</b>	ESCALAMIENTO DE DOSIS.....	<b>28</b>
<b>FIGURA 6:</b>	EFFECTO DEL SISTEMA <i>HSV-<i>tk</i>/GCV</i> EN EL MODELO ORTOTÓPICO.....	<b>29</b>
<b>FIGURA 7:</b>	EFFECTO DEL SISTEMA <i>HSV-<i>tk</i>/GCV</i> EN EL MODELO HETEROTÓPICO.....	<b>29</b>
<b>FIGURA 8:</b>	ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE LOS TUMORES ORTOTÓPICOS Y HETEROTÓPICOS TRATADOS CON EL SISTEMA <i>HSV-<i>tk</i>/GCV</i> .....	<b>31</b>
<b>FIGURA 9:</b>	ANÁLISIS DE SOBREVIDA.....	<b>33</b>
<b>FIGURA 10:</b>	ANÁLISIS DE LINFOCITOS CITOTÓXICOS EN LOS MODELOS ORTOTÓPICO Y HETEROTÓPICO TRATADOS CON EL SISTEMA <i>HSV-<i>tk</i>/GCV</i> .....	<b>34</b>

## NOMENCLATURA

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AdV-CMV-βgal	Vector adenoviral portando el gen <i>Lac Z</i>
Adv-RSV-tk	Vector adenoviral portando el gen <i>timidfn cinasa</i>
α-MEM	Medio esencial mínimo tipo alfa.
ANOVA	Análisis de varianza (en inglés)
BALB/c	Cepa endogámica de ratón albino
βgal o β-gal	Gen de β-galactosidasa (gen <i>LacZ</i> )
C57BL/6	Cepa endogámica de ratón negro
cm <sup>2</sup>	Centímetros cuadrados
cm <sup>3</sup>	Centímetros cúbicos
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
cols.	Colaboradores
cpm	Cuentas por minuto
<sup>51</sup> Cr	Isótopo de cromo de peso atómico 51
DP	Diámetro promedio
DP <sub>día 0</sub>	Diámetro promedio al día de la transducción adenoviral
DP <sub>día X</sub>	Diámetro promedio a cualquier día de observación
E	10 exponente (Logaritmo base 10)
EUA	Estados Unidos de América
FSK	Línea celular de epitelio mamario murino (cepa BALB/C)
g	Gramos
°C	Grados centígrados
GCV	Ganciclovir
h	Horas
HCMVIE (ó CMV)	Promotor temprano del citomegalovirus humano
HeLa	Línea celular humana de cáncer de cuello uterino
HSV-tk	Gen timidin cinasa del virus herpes simplex tipo I
ICR	Índice de crecimiento relativo
IL-2	Interleucina 2
kg	Kilogramo
kpb	miles de pares de bases
LCT	Linfocitos citotóxicos
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
mm <sup>3</sup>	Milímetros cúbicos
μCi	MicroCuries
μg	Microgramos
μm	Micrómetros
ng	Nanogramos
μl	Microlitros
nm	Nanómetros.
p	Valor de probabilidad

p.v.	Partículas de vector
PBS	Solución salina de fosfatos (en inglés)
pH	Potencial de hidrogeniones
PNCT	Proporción neta de crecimiento tumoral
%	Por ciento
REDOX	Agente óxido-reductor
RPMI 1640	Medio de cultivo para leucocitos
RSV	Promotor del virus del sarcoma de Rous
SV <sub>50</sub>	Dosis con sobrevida de 50 por ciento
TCLD <sub>50</sub>	Dosis de cultivo de tejidos con sobrevida de 50 por ciento (en inglés)
TM40D	Línea celular de cáncer mamario murino (cepa BALB/C)
U	Unidades
u.m.	Unidad de mapa del genoma de adenovirus (36 kpb = 100 u.m.)
x	Veces ó multiplicación
xg	Gravedades (Centrifugación)

# RESUMEN

Augusto Rojas Martínez  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Medicina

Fecha de Graduación. Mayo del 2000

**Título del Estudio: EFECTIVIDAD DEL SISTEMA *HSV-tk/GCV* MEDIADO POR TERAPIA GÉNICA EN TUMORES MAMARIOS ORTOTÓPICOS Y HETEROTÓPICOS**

**Número de páginas: 49**

**Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.**

**Propósito y método del estudio:** El advenimiento de la terapia génica ha generado una nueva línea de investigación en la lucha contra el cáncer. En la actualidad hay decenas de ensayos clínicos explorando esta modalidad terapéutica en contra de diversos tipos de tumores. El análisis de los tratamientos para el cáncer, como los medicamentos quimioterapéuticos, generalmente se inicia con un estudio en modelos preclínicos que incluyen estudios en cultivos celulares y en modelos animales. En cuanto a los modelos animales, los tumores generados para las pruebas pueden implantarse en el órgano de donde deriva originalmente el tumor (modelo ortotópico), pero debido a dificultades técnicas, muchas veces los tumores son implantados en un sitio más accesible para determinar la evolución y los efectos del tratamiento (modelo heterotópico), como el espacio subcutáneo. Sin embargo, factores del microambiente que rodea la neoplasia pueden generar diferencias en la efectividad del agente antineoplásico. Esta posibilidad no había sido examinada hasta la fecha en los estudios preclínicos de terapia génica.

En este estudio se analizaron los efectos del microambiente en la respuesta tumoral a la terapia génica con el sistema de toxicidad condicionada denominado timidín quinasa del virus herpes simplex I/ganciclovir (*HSV-tk/GCV*), en un modelo murino implantado con células singénicas de tumor mamario TM40D. Las células se implantaron en el espacio subcutáneo (modelo heterotópico) y en la glándula mamaria número 4 (modelo ortotópico) de ratonas BALB/c. Estos sitios, aunque están relacionados morfológica y embriológicamente, tienen características fisiológicas diferentes. Los animales fueron separados en dos grupos: Un grupo de tratamiento tratado con el sistema *HSV-tk/GCV* y un grupo de control para efectos del vector con el gen *lac Z* de *Escherichia coli* que es farmacológicamente inactivo ( $\beta$ -gal/*GCV*). Se analizaron las curvas de crecimiento de los tumores durante el tratamiento y la sobrevida postterapéutica en los dos modelos experimentales. Una vez sacrificadas las ratonas, se estudió la histología de los tumores y la respuesta citotóxica de linfocitos extraídos del bazo en contra de las células implantadas.

**Contribuciones y conclusiones:** Aunque se observó una supresión transitoria del crecimiento tumoral en ambos modelos de implantación (33.1 y 39.4% en los modelos ortotópico y heterotópico, respectivamente) la tasa de crecimiento tumoral y la respuesta a la terapia fueron significativamente diferentes. Histológicamente, los dos modelos mostraron patrones de necrosis, vascularidad y respuesta tisular inmune diferentes. La respuesta citotóxica linfocitaria y la sobrevida no mostraron diferencias significativas. Los datos sugieren que el microambiente del tumor puede afectar la eficacia de la terapia génica.

Firma del Director:

  
Dr. Estuardo Aguilar Córdova

Firma del Co-director:

  
Dr. Hugo A. Barrera Saldaña