

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La búsqueda de mejores tratamientos para los tumores malignos impulsa la investigación de nuevos medicamentos, combinaciones de agentes quimioterapéuticos, incrementos de dosis, utilización de citocinas, regímenes mejorados de radioterapia y cirugías más sofisticadas, entre otros recursos. Sin embargo estas formas de tratamiento no superan algunos obstáculos biológicos críticos, como la actividad localizada en el tumor o la carencia de efectos en células normales, y no podrían conducir a un avance radical en el mejoramiento del tratamiento del cáncer. La terapia génica ofrece el potencial para superar algunas de esas barreras fundamentales y para disminuir la morbilidad asociada al tratamiento.

La terapia génica puede definirse como la modalidad de tratamiento en la cual se introduce material genético a las células para modificarlas o añadirles nuevas funciones. Este tipo de terapia involucra la transferencia de material genético foráneo a las células con el propósito de corregir o aminorar los defectos genéticos en algunas enfermedades hereditarias, inhibir agentes

infecciosos o destruir células cancerosas (Eck y Wilson, 1996). De forma muy general, la terapia génica requiere la identificación y aislamiento de genes terapéuticos útiles y la transferencia y expresión subsecuente de estos genes en las células receptoras o células blanco (Bank A, 1995). En la actualidad la terapia génica está siendo ensayada para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades hereditarias y adquiridas, entre ellas el cáncer (Eck y Wilson, 1996).

A continuación se describen las ventajas potenciales de la terapia génica antineoplásica. En las terapias convencionales, como la quimioterapia, una célula o un tejido se altera con la modificación del metabolismo y de la fisiología celular al nivel de la expresión de proteínas. En contraste, en la terapia génica, el cambio en el patrón de expresión de genes en las células transducidas podría modificar la cantidad y la función de los productos proteicos preexistentes o la generación de nuevas proteínas para lograr el efecto terapéutico deseado. Adicionalmente, la transferencia génica se puede realizar en un contexto limitado local-regional, produciendo una alta concentración de moléculas terapéuticas en el área de interés, evitando la difusión del agente activo al sistema y disminuyendo los efectos indeseables de los agentes convencionales.

Otra ventaja de la terapia génica es su potencial para lograr una actividad terapéutica de más alta especificidad de acción que la obtenida con la

quimioterapia, gracias al control de los mecanismos regulatorios de la expresión génica. Por otro lado, la existencia de diversos sistemas de transferencia de genes (vectores) para la modificación genética de largo plazo o permanente de células o tejidos, permitiría intervenciones terapéuticas o preventivas definitivas (Eck y Wilson, 1996). Finalmente, el emplear al organismo para producir proteínas potencialmente terapéuticas en solo ciertos tejidos, tiene ventajas prácticas, pues se evitan las limitaciones asociadas con la manufactura, estabilidad y duración del efecto, después de la administración de los medicamentos (Eck y Wilson, 1996).

El cáncer surge como la culminación de una sucesión de pasos que involucran alteraciones de diferentes genes de las células somáticas y modificaciones importantes en el microambiente que rodea al tumor. Por estas razones, esta enfermedad representa un gran reto para la terapia génica, pues es difícil hacer una elección del gen terapéutico ideal para lograr la destrucción del tejido neoplásico (Rabkin y cols., 1996) y por esto se han generado varias estrategias de terapia génica antitumoral.

Las estrategias de terapia génica antineoplásica se pueden agrupar en las siguientes categorías: inmunopotenciación, corrección fenotípica (inactivación de oncogenes o reemplazo de genes supresores de tumor), la quimioterapia molecular, el incremento de la resistencia a drogas para proteger la médula ósea de altas dosis de quimioterapia y esquemas de terapia

potenciadora, en la cual la terapia génica sensibiliza a las células tumorales para ser destruidas en forma más eficiente por un agente antineoplásico o por radioterapia (Cusack y Tanabe, 1998).

La terapia génica suicida (también denominada terapia de citotoxicidad condicionada) ha sido extensamente investigada para el tratamiento de tumores primarios y diseminados. Entre los diversos sistemas de esta modalidad, el esquema de la enzima timidín cinasa del virus herpes simplex (*HSV-tk*) y la subsecuente administración de ganciclovir (GCV) ha sido exitoso en el tratamiento de tumores en modelos animales de cáncer refractario a las modalidades terapéuticas convencionales en humanos (Culver y cols., 1992 y Chen y cols., 1994) y por otro lado, ha mostrado tener una baja toxicidad sistémica (Rojas-Martínez y cols., 1999). Esta estrategia se basa en la conversión del GCV (un análogo de nucleósidos purínicos) en su intermediario activo, GCV monofosfato, en células transducidas con el gen *HSV-tk*. La prodroga fosforilada conduce a la muerte celular al detener la síntesis de ADN (Reid y cols., 1988). Adicionalmente, las células no transducidas son afectadas por la exportación de la sustancia activa (efecto testigo) (Freeman y cols., 1993) o por la estimulación del sistema inmune en respuesta a las células afectadas por el sistema *HSV-tk/GCV* (Barba y cols. 1994 y Yamamoto y cols. 1997). Debido a que la respuesta terapéutica depende de varios mecanismos, la efectividad puede ser susceptible a las diferencias en el microambiente tumoral.

Los modelos animales experimentales para probar tratamientos antineoplásicos se pueden dividir en dos grupos, de acuerdo al sitio anatómico de donde se deriva el tumor que se desea estudiar. En el modelo ortotópico, el tumor se genera en el tejido u órgano de donde deriva la malignidad a analizar (por ejemplo, implantación de hepatoma en el hígado). En el modelo heterotópico, el tumor se crea en un espacio u órgano diferente al sitio donde se genera el tumor en forma natural (por ejemplo, la implantación subcutánea de tumores de diverso origen diferentes a los cánceres que afectan la piel y el espacio dérmico). La elección del modelo a utilizar frecuentemente se basa en la disponibilidad de tumores o líneas celulares y animales, y en la conveniencia del investigador.

En la terapia génica para el cáncer se han empleado varios modelos animales para evaluar la efectividad de la terapia con el sistema *HSV-tk/GCV*. En algunos casos, animales implantados con tumores subcutáneos de próstata (Eastham y cols. 1996) y mesotelioma (Smythe y cols., 1995), buenos ejemplos de modelos heterotópicos, han sido tratados con este sistema. Glioblastomas implantados en cerebro (Culver y cols., 1992 y Chen y cols., 1994) o tumores primarios de glándula mamaria inducidos por transgénesis (Sacco y cols., 1996) o sustancias químicas (Wei y cols., 1998), han sido ejemplos de modelos ortotópicos tratados con el sistema *HSV-tk/GCV*. Tanto los modelos heterotópicos como ortotópicos han generado resultados exitosos que han sido utilizados como base para la implementación de estudios de terapia génica con

el sistema *HSV-tk/GCV* en fase clínica. Por ejemplo, los resultados favorables obtenidos con el sistema *HSV-tk/GCV* en los estudios de tumores cerebrales en rata (Ram y cols., 1993), sirvieron para sustentar un ensayo en fase clínica I para el tratamiento de glioblastoma (Ram y cols., 1997), el cual demostró actividad antitumoral en 5 de 15 pacientes con tumores de menos de 1.4 ml de volumen. También se pueden mencionar los estudios de Eastham y cols. En cáncer de próstata (Eastham y cols., 1996), que sirvieron de base a estudios de fase clínica I en pacientes con recurrencia de este tipo de tumor después de radioterapia y que mostró respuestas positivas en 3 de los 18 sujetos seleccionados. Esta respuesta fue evidenciada por una caída de los niveles de antígeno prostático específico que fue sostenida durante un periodo de un año (Herman y cols. 1999).

Sin embargo, los efectos del microambiente tumoral en el modelo preclínico pueden afectar significativamente el valor pronóstico de los estudios clínicos y estos efectos no han sido estudiados aun en este tipo de terapia. Entre los factores microambientales que afectarían la efectividad terapéutica están la arquitectura tisular, la respuesta local del tejido, el patrón de vascularización y la vigilancia inmunológica. El propósito de esta tesis es estudiar la eficacia de la estrategia del sistema *HSV-tk/GCV* en los microambientes ortotópico y heterotópico, usando un modelo preclínico de cáncer mamario.

CAPITULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS.

Los efectos de la terapia génica para el cáncer con el sistema *HSV-tk/GCV*, pueden variar en diferentes microambientes tumorales. Es posible que la respuesta antineoplásica para los tumores mamarios TM40D cambie en los diferentes sitios de implantación tumoral del modelo animal.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. Objetivo General:

Analizar la eficacia del sistema suicida HSV-tk/GCV en tumores mamarios TM40D de localización ortotópica y heterotópica en un modelo murino.

2.2.2. Objetivos Específicos:

- 1. Determinar la sensibilidad de las células TM40D al sistema *HSV-tk/GCV* en condiciones de cultivo de tejidos.**
- 2. Determinar el crecimiento tumoral natural de tumores TM40D implantados en los modelos orto y heterotópico.**
- 3. Hacer un escalamiento de dosis de vector para determinar la dosis antitumoral más efectiva.**

- 4. Determinar los efectos del sistema *HSV-tk/GCV* en los modelos orto y heterotópico, mediante el análisis de los siguientes parámetros obtenidos de la observación de los dos grupos experimentales (ratonas tratadas con el gen *HSV-tk* y *GCV* como grupo de tratamiento y ratonas tratadas con el gen β -gal y *GCV* como grupo control):**
 - a. Curva de crecimiento tumoral.**
 - b. Análisis histopatológico.**
 - c. Análisis de linfocitos citotóxicos (LCT).**
 - d. Supervivencia.**

CAPÍTULO III

ESTRATEGIA GENERAL

Los parámetros claves de la tesis se estudiaron con las siguientes estrategias:

- 3.1. SUSCEPTIBILIDAD DE LA LÍNEA TUMORAL TM40D AL SISTEMA HSV-tk/GCV.** La susceptibilidad de la línea tumoral mamaria TM40D al vector adenoviral y al sistema de toxicidad condicionada HSV-tk/GCV fue probada en condiciones de cultivo de tejidos, en un ensayo comparativo realizado en un formato de 8 x 12 pozos y en el cual se usaron células HeLa como control. Las células fueron transducidas con dosis incrementadas del vector adenoviral Adv-RSV-tk y tratadas con GCV. Tres días después del tratamiento se hizo un ensayo colorimétrico con un agente REDOX para determinar la actividad metabólica y calcular la sobrevida de las células. Una vez demostrada la susceptibilidad de las células cancerosas al vector y al sistema suicida, se procedió a los estudios *in-vivo* en modelos murinos.

- 3.2. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO NATURAL DE LOS IMPLANTES TUMORALES ORTOTÓPICOS Y HETEROTÓPICOS:** Para determinar el efecto terapéutico en las ratonas, se establecieron curvas de crecimiento de referencia en animales implantados en el espacio subcutáneo (heterotópico) y en la glándula mamaria número 4 (ortotópico).

3.3. ESCALAMIENTO DE DOSIS: Como en el experimento anterior se determinó que el crecimiento era más agresivo en el espacio ortotópico, el escalamiento de la dosis de vector más efectiva se realizó en este modelo. El objetivo de este experimento fue determinar las dosis tóxicas del vector y la dosis máxima tolerada que tuviera efecto antineoplásico. Las ratonas fueron tratadas durante 14 días consecutivos con GCV y se realizaron curvas de crecimiento tumoral para determinar la dosis más efectiva.

3.4. EFICACIA DEL SISTEMA *HSV-tk/GCV* EN LOS MODELOS ORTO Y HETEROPTÓPICO. La línea tumoral TM40D se implantó en dos grupos de ratonas: Uno en el espacio subcutáneo y el otro en la glándula mamaria. Cuando el crecimiento de los tumores permitió la manipulación experimental, los animales en cada modelo de implantación fueron divididos en dos grupos: Un grupo de ratonas recibió una inyección intratumoral con el vector adenoviral Adv-RSV-*tk* y al grupo restante se le administró el vector AdV-CMV- β gal, no funcional desde el punto de vista terapéutico, pero apto para servir como control del grupo de tratamiento. Todas las ratonas fueron tratadas con GCV durante los 14 días subsecuentes a la transducción y se realizaron curvas de crecimiento tumoral. Una vez concluida la observación, las ratonas se sacrificaron, los tumores y algunos de los bazos se disecaron y extrajeron para análisis de patología y para realizar pruebas de linfocitos citotóxicos anti-TM40D.

3.5. ANÁLISIS DE SOBREVIDA. En este estudio, se repitió el experimento anteriormente descrito, pero los animales no se sacrificaron y se determinó la supervivencia de cada animal hasta que estuviera en muy malas condiciones generales o cuando el tumor alcanzaba un diámetro mayor a 2.5 cm, difícil de ser tolerado por la ratona. Con los datos de supervivencia de

cada animal se realizó una curva de Kaplan-Meyer para analizar la eficacia de la terapia génica para prolongar la supervivencia en cada modelo de implantación.

3.6. PRUEBA DE LINFOCITOS CITOTÓXICOS ANTI-TM40D. Para determinar la generación de respuesta celular inmune inducida por la terapia génica en contra de la línea tumoral, los esplenocitos extraídos de los bazo fueron aislados y cultivados en medio RPMI 1640 enriquecido para seleccionar la población de linfocitos citotóxicos. Después de la cosecha, los linfocitos obtenidos se mezclaron en diferentes proporciones con células blanco TM40D mantenidas en cultivo. Estas células blanco habían sido previamente irradiadas y tratadas con ^{51}Cr . Después de un breve tiempo de cocultivo, los sobrenadantes recolectados se analizaron para determinar la actividad citotóxica mediante la medición de la radiactividad presente en el medio recolectado.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ORIGEN DE LOS REACTIVOS:

4.1.1. Células Tumorales: La línea celular de tumor mamario de ratón TM40D fue derivada de transplantes repetidos de las líneas celulares de mama FSK en glándulas mamarias de ratonas BALB/c (Kittrell y cols., 1992). Las células se mantuvieron en condiciones de cultivo utilizando medio α -MEM (Life-Technologies, Gaithersburg, MD, EUA) suplementado con suero bovino de ternera al 10% (HyClone, Logan, UT, EUA) a temperatura de 37°C y una atmósfera con 5% de CO₂. Para la implantación en el modelo *in-vivo*, las células fueron recolectadas de cultivos en monocapa mediante un tratamiento con tripsina al 0.25% (Life-Technologies, Gaithersburg, MD, EUA), lavado con solución amortiguadora de fosfatos (PBS por las siglas en inglés y cuya composición es: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄·7H₂O y 1.4 mM KH₂PO₄, pH ~ 7.3), cosecha, centrifugación a 500 xg durante 2.5 min, cuantificación y resuspensión final en PBS.

4.1.2. Vectores adenovirales: Se utilizaron vectores adenovirales portando un gen terapéutico (efector) y un gen control. El vector efector *AdV-RSV-tk* (ver figura 1) contiene el gen *HSV-tk* del virus herpes simplex tipo I con la secuencia promotora de la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (RSV), contenidas ambas dentro del esqueleto genómico del

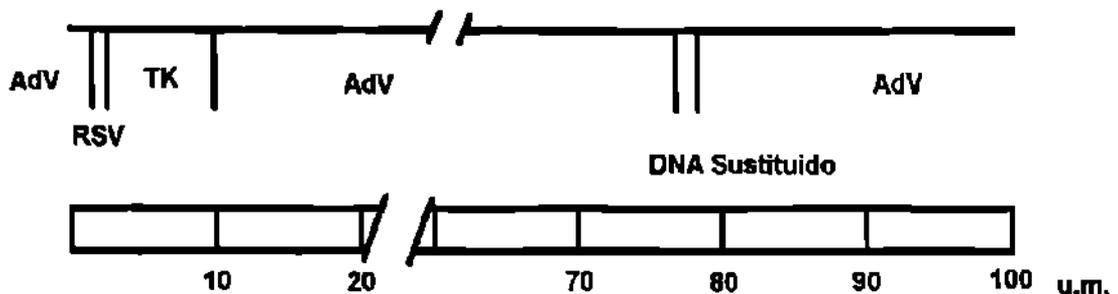


Figura 1. Genoma del vector *AdV-RSV-tk*. Representación de la estructura genómica del vector terapéutico utilizado. El gen terapéutico *HSV-tk* sustituye las regiones requeridas para la replicación adenoviral E1A y E1B. El gen está regulado por la secuencia promotora del virus del Sarcoma de Rous (RSV). El genoma del vector *AdV*, de 36 kpb, se divide convencionalmente en 100 unidades de mapa (u.m.).

adenovirus humano tipo 5 (Chen y cols., 1994). El vector control *AdV-CMV- β -gal* tiene el mismo esqueleto genómico, pero en lugar del gen *HSV-tk*, contiene el gen *lac-Z* dirigido por el promotor inmediato-temprano del citomegalovirus humano (HCMVIE). Los vectores fueron producidos y cuantificados en el Laboratorio de Vectores de Terapia Génica del Baylor College of Medicine en Houston, TX, EUA (Nyberg-Hoffman y cols., 1997).

4.2. MÉTODOS:

4.2.1. Susceptibilidad de la línea tumoral TM40D al sistema HSV-tk/GCV. Se realizó un ensayo comparativo en un formato de 8 x 12 pozos (Corning Inc., Corning, NY, EUA) y en el cual se usaron células HeLa (ATCC, Rockville, MD, EUA) como control. Las células TM40D y las células control se sembraron en formatos separados a una densidad de 3×10^4 células/cm² (confluencia de aproximadamente 50%). Las columnas fueron transducidas con dosis incrementadas del vector adenoviral AdV-RSV-tk en forma aritmética, abarcando un rango de $\sim 5 \times 10^5$ a 3×10^9 p.v./ml (razón máxima: 30,000 p.v./célula). Después de 12 horas de la siembra, el formato fue dividido en dos áreas de tres filas. El área superior fue tratada con la forma comercial de GCV, Cimevene® (Sintex Corporation, Palo Alto, CA, EUA), utilizada en todos los estudios de este proyecto; mientras que la zona inferior de tres filas fue tratada con medio de cultivo α -MEM suplementado con suero bovino de ternera al 10%. La primera columna de células no fue tratada con el vector ni con GCV, para servir como referencia de máxima sobrevivencia y sólo fue adicionada con medio de cultivo cada vez que se hacía un tratamiento. Tres días después del tratamiento con GCV, se hizo un ensayo colorimétrico con el agente REDOX Alamar Blue® (Alamar Biosciences Inc., Sacramento, CA, EUA), que determina la actividad metabólica en cada pozo de células y permite determinar la supervivencia en cada columna (Lancaster y Fields, 1996). Un área de 3 pozos en el margen del formato sólo se había llenado con

medio para servir como blanco de lectura del experimento después de la adición del agente REDOX. La absorbancia se midió en un aparato para análisis de ELISA tipo Microplate Autoreader® (Bio-Tek Instruments Inc., Burlington, VE, EUA) a una longitud de onda de 570 nm con referencia a 600 nm. Los datos de absorbancia de los dos tipos celulares tratados se determinaron en triplicado, fueron promediados y se determinó el error estándar para cada medición. El índice de sobrevivencia se calculó dividiendo la absorbancia de cada dosis probada entre la absorbancia obtenida en las células no tratadas con el vector ni con GCV. Los índices obtenidos fueron utilizados para la construcción de la gráfica de susceptibilidad al vector adenoviral y al sistema *HSV-tk/GCV* en condiciones *in-vitro*. Las dosis letales 50 en cultivo (TCLD₅₀ en inglés), la dosis en la cual el 50% de las células aun se mantienen vivas, fue calculada para cada línea celular a partir de la gráfica.

4.2.2. Implantación de los tumores ortotópicos y heterotópicos.

Tumores orto y heterotópicos fueron generados en 238 ratonas vírgenes BALB/c de 5 y 6 semanas de edad (Harlan Inc., Indianápolis, IN, EUA). En 147 ratonas se generaron tumores ortotópicos y en las restantes 91 se produjeron tumores heterotópicos. Adicionalmente, se implantaron tumores heterotópicos en 5 ratones machos C57BL/6 (Harlan Inc., Indianápolis, IN, EUA) para los ensayos de linfocitos citotóxicos. Para los procedimientos de implantación, las ratonas fueron sometidas a anestesia

general mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital (Nembutal®, Abbott Laboratories, Chicago, IL, EUA) a una dosis de 50 mg/kg de peso.

En el caso de los tumores ortotópicos, a las ratonas se les practicó una incisión paramedial en el hemiabdomen izquierdo seguida por una incisión inguinal. Posteriormente se hacía una disección cuidadosa del tejido subcutáneo para exponer la glándula mamaria número 4. A continuación, la glándula mamaria fue inyectada con un volumen de 20 μ l que contenía un total de 5,000 células TM40D suspendidas en PBS (figura 2). Las inyecciones se realizaron con una jeringa graduada en microlitros (Hamilton Co., Reno, NV, EUA) utilizando una aguja 27-G.

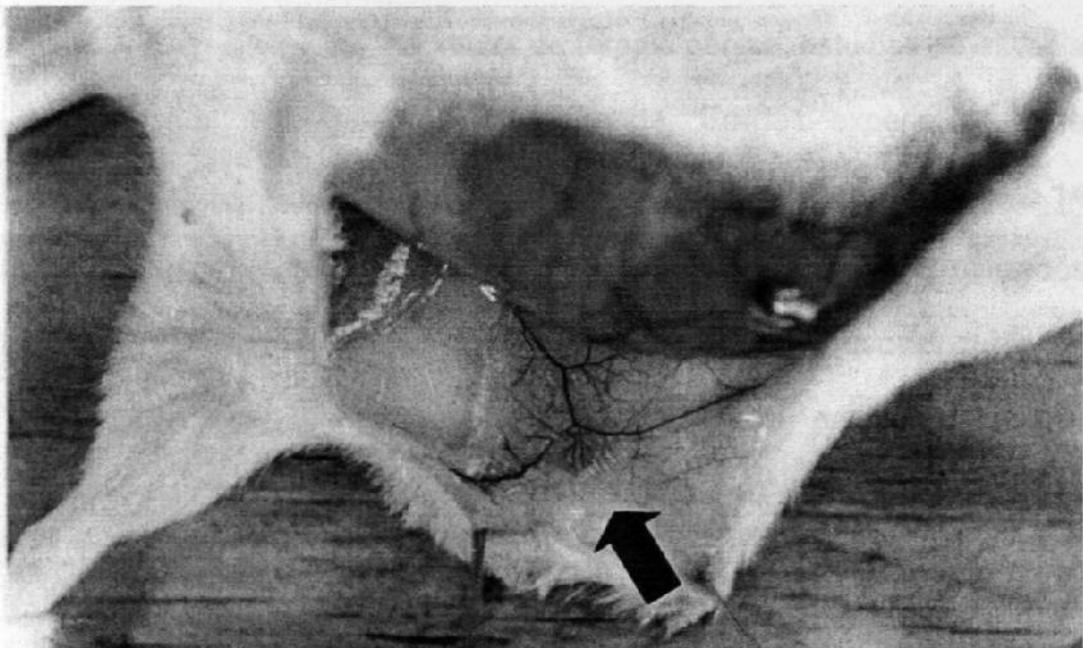


Figura 2. Cirugía para la implantación del tumor en la glándula mamaria número 4: La glándula está localizada en el flanco inferior abdominal, cerca de la región inguinal. El parénquima glándular está albergado en el interior del cojinete de tejido graso (señalado por la flecha), adherido al tejido subcutáneo. Obsérvese la rica vascularización del órgano.

Después de la inyección, se afrontaron los planos y se cerraron las heridas quirúrgicas con ganchos Autodlip® de 9 mm (Clay Adams, Sparks, MD, EUA). En el caso de los tumores heterotópicos, las ratonas anestesiadas fueron afeitadas en el flanco dorsal izquierdo y en el espacio subcutáneo de esta porción se realizó una inyección con el mismo número de células usado en el modelo ortotópico. Estas células fueron inyectadas en un volumen de 50 μ l, utilizando jeringas desechables de 1 ml adaptadas con una aguja 30-G.

4.2.3. Administración del vector de terapia génica y tratamiento con GCV. Este tipo de tratamientos se realizó en tres fases experimentales: Escalamiento de la dosis del vector de terapia génica, estudios de eficacia antineoplásica y análisis de la sobrevida. En los experimentos de escalamiento de la dosis de vector se utilizaron 47 ratonas, incluyendo 14 animales cuyos tumores fueron inyectados con PBS para ser utilizados como control de no tratamiento. Los experimentos de escalamiento de dosis para AdV-RSV-*tk* fueron realizados en el modelo ortotópico utilizando un rango de dosis entre 1×10^9 a 1×10^{11} p.v., incrementadas en una escala logarítmica decimal (dosis por encima de 1×10^{12} p.v. son tóxicas para este roedor, según la observación personal del tesista). En las fases de eficacia antineoplásica y análisis de la sobrevida, se utilizaron los vectores AdV-RSV-*tk* (vector terapéutico) y AdV-CMV- β gal (vector

control). Todos los vectores fueron administrados mediante inyección intratumoral de un bolo de 20 μ l de suspensión del vector, aproximadamente dos semanas después de la implantación tumoral (volumen tumoral promedio de 40 mm³). En el caso del modelo ortotópico, la administración del vector requirió el mismo procedimiento quirúrgico descrito para la implantación del tumor.

El tratamiento con GCV se inició 24 h después de la administración de los vectores. Este medicamento se aplicó mediante inyección intraperitoneal cada 12 h durante 14 días consecutivos a una dosis por aplicación de 20 mg/kg de peso y suspendida en agua bidestilada libre de pirógenos a 4 mg/ml.

4.2.4. Análisis del crecimiento tumoral. En los estudios de crecimiento de los tumores orto y heterotópicos implantados, de escalamiento de dosis del vector y de eficacia antineoplásica, se determinó el crecimiento de los tumores en los animales en una observación realizada cada 4 días de la siguiente manera. Se medían las longitudes de los diámetros mayor y menor del tumor con un calibrador tipo Vernier. Con estos dos valores se determinaba un diámetro promedio (DP) para cada observación puntual, como se indica en la fórmula 1:

Fórmula 1: (diámetro mayor + diámetro menor)/2= DP

En los estudios de crecimiento de los implantes, se construyó una curva de crecimiento relativo entre los días 8 y 32 post-implantación. El límite inferior de 8 días se debe a que tan sólo en este día había una masa tumoral medible, mientras que el límite superior de 32 días estuvo impuesto por el día máximo en que se conservaron todos los animales vivos para mantener los grupos íntegros durante el experimento. En el caso del estudio de escalamiento de dosis, las curvas se construyeron con los datos proporcionados por estos promedios. En el análisis del crecimiento tumoral de los implantes, los datos recolectados en cada observación ($DP_{\text{día } x}$) se dividieron por el valor del DP al día de la transducción ($DP_{\text{día } 0}$) y se multiplicaron por 100 para obtener el índice de crecimiento relativo o ICR (ver fórmula 2). Los valores del ICR de cada tumor en cada punto de la observación se promediaron para cada grupo de implantación y se determinaron los errores estándares.

Fórmula 2: $(DP_{\text{día } x} / DP_{\text{día } 0}) \times 100 = \text{ICR}$

Para los estudios de eficacia antineoplásica, se agruparon y promediaron los ICR de los animales pertenecientes a los grupos tratados con el vector terapéutico y con el vector control en cada modelo de implantación. A este ICR se le restó 1 para obtener la proporción neta de crecimiento tumoral o PNCT (ver fórmula 3) en cada punto de la observación y se determinaron los promedios y errores estándares para

cada grupo. Con estos datos se construyeron las curvas de crecimiento para analizar la eficacia del tratamiento.

Fórmula 3: $ICR_{día\ x} - 100 = PNCT$

4.2.5. Análisis de sobrevida. En esta fase se trataron grupos experimentales constituidos por 11 ratonas cada uno para el modelo ortotópico y grupos de 10 ratonas cada uno para el modelo heterotópico. Se utilizaron los mismos procedimientos quirúrgicos descritos previamente. También se administró el mismo tratamiento con GCV. Estos animales se dejaron en observación para determinar el máximo periodo de vida después de la administración de los vectores. Aunque algunos fueron encontrados muertos, la mayoría de los animales se sacrificaron cuando el tumor alcanzaba un diámetro mayor de 2.5 cm o cuando el animal presentaba signos de mal estado general como inactividad o lentitud de movimiento, poca reacción a los estímulos, caquexia, enjorobamiento, etc. Con los datos obtenidos se construyó una gráfica de Kaplan-Meier para estudiar los efectos del tratamiento en la sobrevida.

4.2.6. Análisis histopatológico de los tumores. En los estudios de la eficacia antineoplásica, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical 24 días después de la transducción con el vector adenoviral, debido a que para este día los animales comenzaban a

mostrar signos de mal estado general, principalmente en los grupos controles. Los tumores fueron disecados del cadáver, fijados en formaldehído al 10% y enviados al Departamento de Medicina Comparativa del Baylor College of Medicine para elaboración de laminillas de histología teñidas con hematoxilina y eosina. Las laminillas obtenidas fueron enviadas con tan sólo una identificación de clave al patólogo Dr. Kerby Oberg para la interpretación de los hallazgos en forma ciega, quien además realizó la toma de las microfotografías más relevantes después de haber concluido el análisis de los resultados.

4.2.7. Estudios de linfocitos citotóxicos (LCT) anti-TM40D. Estos estudios se realizaron siguiendo lineamientos previamente descritos (Mule J, 1992). En algunas ratonas utilizadas en los estudios de eficacia antitumoral, se extrajeron los bazos de 5 ratonas de cada grupo de implantación y de tratamiento, inmediatamente después del sacrificio en la campana de flujo laminar en condiciones de estricta antisepsia. Como control no tratado se utilizaron 5 bazos obtenidos de ratonas de la misma edad no implantadas con el tumor y no tratadas con vectores de terapia génica. Como controles positivos se utilizaron 5 machos de la cepa C57BL/6 implantados subcutáneamente con la línea TM40D. Después del sacrificio, los animales fueron rasurados en la región dorsal abdominal izquierda y la piel fue lavada con solución PBS y etanol al 70%. Se utilizaron instrumentos quirúrgicos esterilizados y cajas de Petri con medio

de cultivo RPMI 1640 para la extracción, el depósito y el procesamiento de los bazos obtenidos.

Para el aislamiento de los esplenocitos, los 5 bazos de cada grupo experimental fueron depositados en la misma caja de Petri, lavados con solución de sales balanceada de Hanks (Life Technologies, Gaithersburg, MD, EUA), suspendidos en medio RPMI 1640 y macerados finamente con la superficie plana superior externa del émbolo de una jeringa estéril de 5 cm³. El macerado fue cuidadosamente depositado en tubos cónicos de 15 ml que contenían Histopaque 1083® (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, EUA) y centrifugados durante 10 min a 800 xg, eliminando el frenado al final del proceso de separación. El paquete linfocitario fue delicadamente recuperado del tubo cónico y se sembró en medio de activación, el cual estaba constituido de medio de cultivo RPMI 1640 enriquecido con 10% de suero bovino fetal (HyClone, Logan, UT, EUA) y 1 U/ml de interleucina murina IL-2 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, EUA). Antes de la siembra, al final de la resuspensión de las células por pipeteo repetitivo, se tomó una alícuota pequeña para el conteo de las células en un hemocitómetro y se sembraron a una concentración inicial de 2×10^6 células/ml. Los linfocitos fueron mantenidos en la incubadora durante 24 h con una atmósfera de 37°C, 5% CO₂ y humedad relativa de 90%. Las células fueron cosechadas y contadas nuevamente, para la realización del estudio de LCT.

El día previo al ensayo también se realizó una resiembra de células TM40D que serían utilizadas como células blanco a una confluencia aproximada del 60-70%. El día del ensayo las células fueron cosechadas, contadas (estimación de un mínimo de 2×10^6 células totales para realizar el ensayo), centrifugadas a 400 xg durante 5 min y resuspendidas en 3 gotas de suero bovino fetal dentro del tubo cónico. El [^{51}Cr] dicromato sódico (ICN Pharmaceuticals Inc, Costa Mesa, CA, EUA) fue resuspendido en medio RPMI 1640 a una concentración de $2.5 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$. Las células blanco fueron tratadas con $80 \mu\text{l}$ de [^{51}Cr] dicromato sódico preparado utilizando una jeringa desechable de 1 ml. Las células fueron incubadas durante 90 min utilizando las condiciones de atmósfera mencionadas en el párrafo anterior. Posteriormente las células fueron lavadas dos veces con medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal, contabilizadas y resuspendidas a una concentración final de 5×10^4 células/ml. Al final del marcaje, las células efectoras (los linfocitos) y las células blanco (TM40D marcadas) fueron mezcladas en proporciones de 50:1, 25:1, 12.5:1 y 6.25:1 en un formato de 8 x 12 pozos para cultivo celular de fondo redondo. Tres pozos fueron llenados con células TM40D sin linfocitos (cpm espontáneas) y otros 3 pozos fueron llenados con células TM40D tratadas con el detergente Tritón al 1% (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) para referencia del valor de lisis total (cpm máximas). Las células se regresaron a la incubadora con las mismas condiciones de

atmósfera y fueron incubadas durante 4 h. Al final de la incubación, las células fueron centrifugadas a 400 xg durante 5 min y se recuperó el sobrenadante en un segundo plato de formato 8 x 12 de fondo redondo, para la realización de las mediciones de emisión radiactiva en cámara de centelleo y calcular los porcentajes de lisis mediante la fórmula 4 (Mule J, 1992).

Fórmula 4:

$$(\text{cpm muestra} - \text{cpm espontáneas}) / (\text{cpm máximas} - \text{cpm espontáneas}) \times 100 = \% \text{ de citotoxicidad}$$

4.2.8. Análisis estadístico de las curvas de crecimiento tumoral, del escalamiento de dosis, de la eficacia antineoplásica y de sobrevida.

Para el estudio del crecimiento natural de los implantes en los dos modelos experimentales, se utilizó la prueba *t* de Student y se realizó un análisis de regresión lineal. En los estudios de escalamiento de dosis se empleó el análisis de varianza tipo ANOVA, mientras que en los estudios de eficacia antineoplásica se utilizó nuevamente la prueba *t* de Student. Para los estudios de sobrevida, se determinó el máximo periodo de sobrevida y el valor de sobrevida 50 (SV₅₀) a partir de la gráfica de Kaplan-Meier; es decir, el día en el que el 50% de los animales en cada grupo de tratamiento aún sobrevivía.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

- 5.1. SUSCEPTIBILIDAD DE LA LÍNEA TUMORAL TM40D AL SISTEMA *HSV-tk/GCV*.** Las dos líneas celulares ensayadas mostraron susceptibilidad al vector adenoviral y al sistema *HSV-tk/GCV*. Las dosis letales 50 en cultivo (TCLD₅₀) fueron 6.1×10^7 y 2.1×10^7 p.v./ml para la línea TM40D y para la línea control HeLa, respectivamente. Se observó un patrón de comportamiento muy similar entre las dos líneas celulares, que muestra que las células HeLa son más sensible al tratamiento en una ventana de dosis entre 1.2×10^7 y $.1 \times 10^8$ p.v./ml. Después de este punto, las gráficas de toxicidad se entrecruzan, pero esto ocurre a una dosis muy alta (3.3×10^8 p.v./ml), que corresponde aproximadamente a 3.3×10^4 p.v./célula (ver figura 3).
- 5.2. CRECIMIENTO NATURAL DE LOS TUMORES ORTOTÓPICOS Y HETEROTÓPICOS.** La velocidad de crecimiento de los tumores fue constante durante el periodo de tiempo observado, como lo muestra el

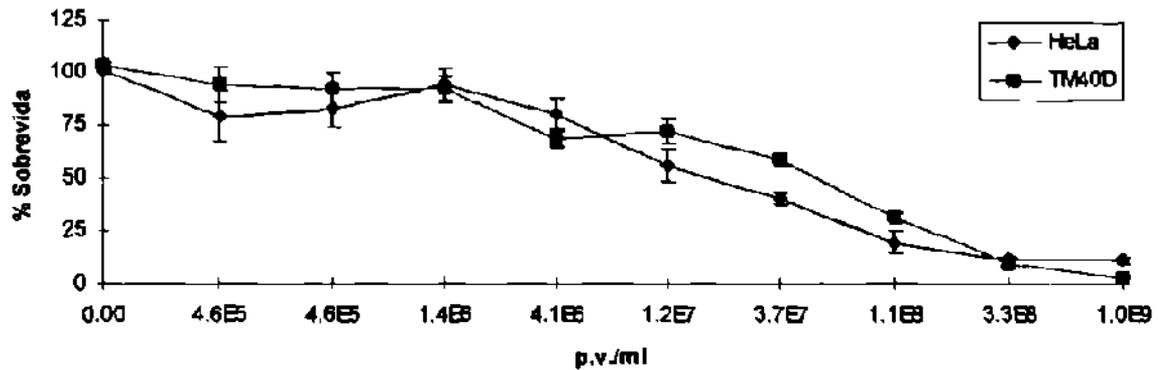


Figura 3. Sobrevida de la línea TM40D tratada con el sistema *HSV-*tk*/GCV* en condiciones de cultivo de tejidos: Se observan las curvas de sobrevida de las líneas celulares TM40D y HeLa (referencia), tres días después de haber sido tratadas con dosis incrementadas del vector AdV-RSV-*tk* y 10µg/ml de GCV. La sobrevida se estimó a partir de las lecturas de absorbancia de los pozos a 570 nm y comparando éstas con el estándar de absorbancia medido en células de las líneas celulares mencionadas, que no fueron tratadas con el vector, ni con GCV.

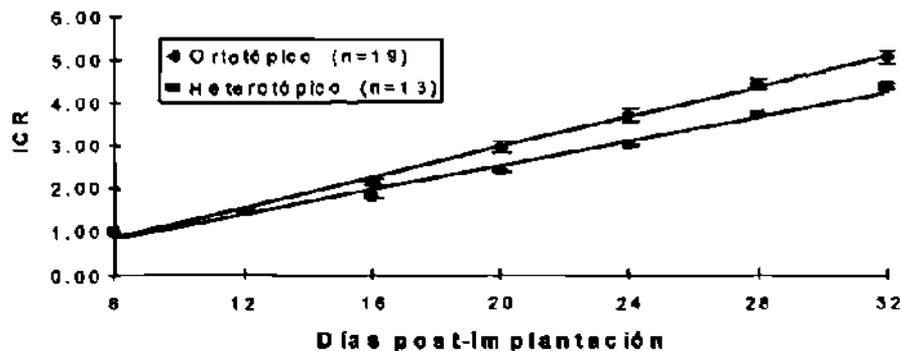


Figura 4. Comparación del crecimiento de los tumores implantados TM40D en los sitios ortotópico y heterotópico: La gráfica representa el crecimiento de los tumores a partir del día 8 post-implantación. Los tumores ortotópicos (diamantes), mostraron un crecimiento significativamente más acelerado que los heterotópicos (cuadros).

análisis de regresión lineal en la gráfica correspondiente (ver figura 4). Este análisis permite determinar que los tumores ortotópicos mostraron un tiempo de doblaje de tamaño de 5.9 días, mientras que los tumores subcutáneos mostraron un tiempo de doblaje de 7.6 días. Los tumores ortotópicos crecieron 1.24 veces más rápidamente que los tumores heterotópicos. Al final de la observación (día 24 post-transducción), la diferencia de tamaños entre los tumores de los dos modelos era significativa para un valor de $p=0.006$.

5.3. ESCALAMIENTO DE DOSIS. La dosis más efectiva para lograr un efecto de inhibición del crecimiento tumoral y libre de efectos tóxicos observables en tumores ortotópicos fue de 3×10^{11} p.v. (1.5×10^9 p.v./kg de peso) aplicadas intratumoralmente (ver figura 5). Esta dosis mostró diferencia significativa en comparación con las restantes ($p=0.05$). No se observó inhibición total del crecimiento ni regresión tumoral. Con base en este estudio, se seleccionó la dosis 1×10^{11} p.v. (5×10^8 p.v./kg de peso) para llevar a cabo los experimentos comparativos de los efectos de la terapia génica en los modelos ortotópico y heterotópico.

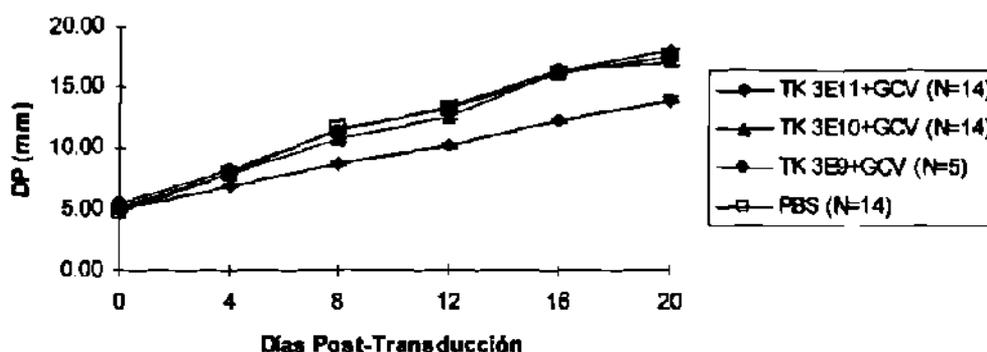


Figura 5. Escalamiento de dosis: Se observan las curvas de crecimiento tumoral en términos de diámetros promedios (DP) de tumores ortotópicos inyectados con dosis incrementadas del vector AdV-RSV-*tk*. Un grupo fue inyectado con PBS como control de no tratamiento. Obsérvese que la dosis de 3.3×10^{11} p.v. es significativamente diferente de todas las otras dosis analizadas, las cuales no difieren en efectividad con las del grupo PBS.

5.4. EFICACIA DEL SISTEMA HSV-*tk*/GCV EN LOS MODELOS ORTO Y HETEROPTÓPICO.

5.4.1. Curvas de crecimiento tumoral. Las curvas de crecimiento después de la transducción con el vector, muestran que en el modelo ortotópico hubo una inhibición inicial del crecimiento tumoral que mostró una mayor diferencia entre los grupos en el día 8 post-transducción. Esta diferencia se prolongó hasta el día 16, después del cual, se perdió la diferencia significativa entre los grupos terapéutico y de control (figura 6).

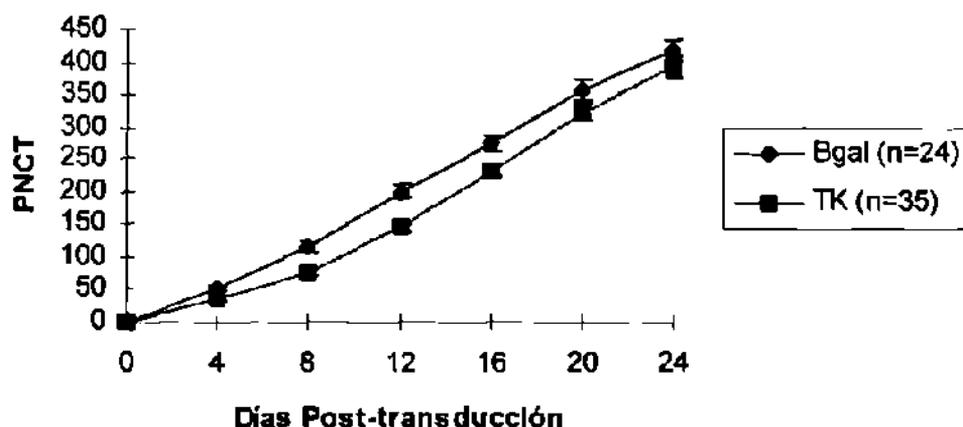


Figura 6. Efecto del sistema *HSV-*tk*/GCV* en el modelo ortotópico: La supresión del crecimiento tumoral fue evidente y significativamente diferente ($p < 0.05$) en el grupo de tratamiento (cuadros) durante los 16 días posteriores a la inyección del vector terapéutico.

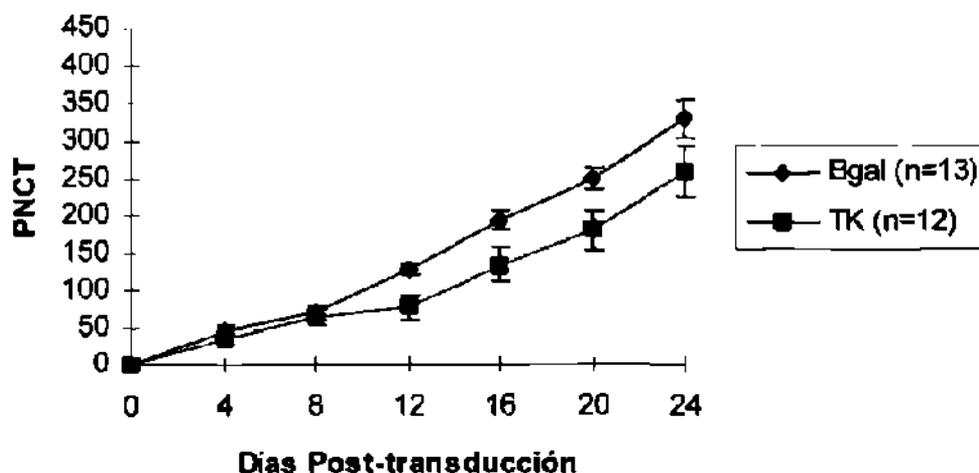


Figura 7. Efecto del sistema *HSV-*tk*/GCV* en el modelo heterotópico: La supresión del crecimiento tumoral en el grupo terapéutico (cuadros) solo fue evidente después del día 8 post-transducción. Después de este punto, el crecimiento tumoral fue reducido, en comparación con el control ($p < 0.05$).

En el modelo heterotópico no se observó un efecto inicial de inhibición tumoral. Este efecto comienza a notarse en el día 12 después de la transducción, día en el cual se observa también la máxima diferencia entre los dos grupos. A partir de entonces, se mantiene una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos terapéutico y control, la cual disminuye en el último punto de la observación (ver figura 7).

5.4.2. Análisis histopatológico de los tumores. Los tumores implantados en la glándula mamaria mostraron una celularidad incrementada con respecto a los tumores heterotópicos (ver figuras 8A y 8B). En los tumores ortotópicos (figura 8A) fue frecuente la observación de necrosis focal acompañada de hemorragia, lesiones sugestivas de isquemia focal de un tumor de crecimiento rápido. El tumor viable era denso y carecía de un infiltrado celular inflamatorio significativo. Aún en algunos ganglios linfáticos mamaris que ocasionalmente fueron engolfados por la neoplasia, tan sólo se observó una pobre respuesta, evidenciada por la presencia de pocos centros germinales en el ganglio (ver figura 8C). También se observó que estos tumores estimulaban el crecimiento vascular. Vasos de tamaño moderado (50-100 μm de diámetro) fueron observados en los márgenes del tumor y también se observaron numerosos capilares infiltrando la neoplasia (ver figura 8A).

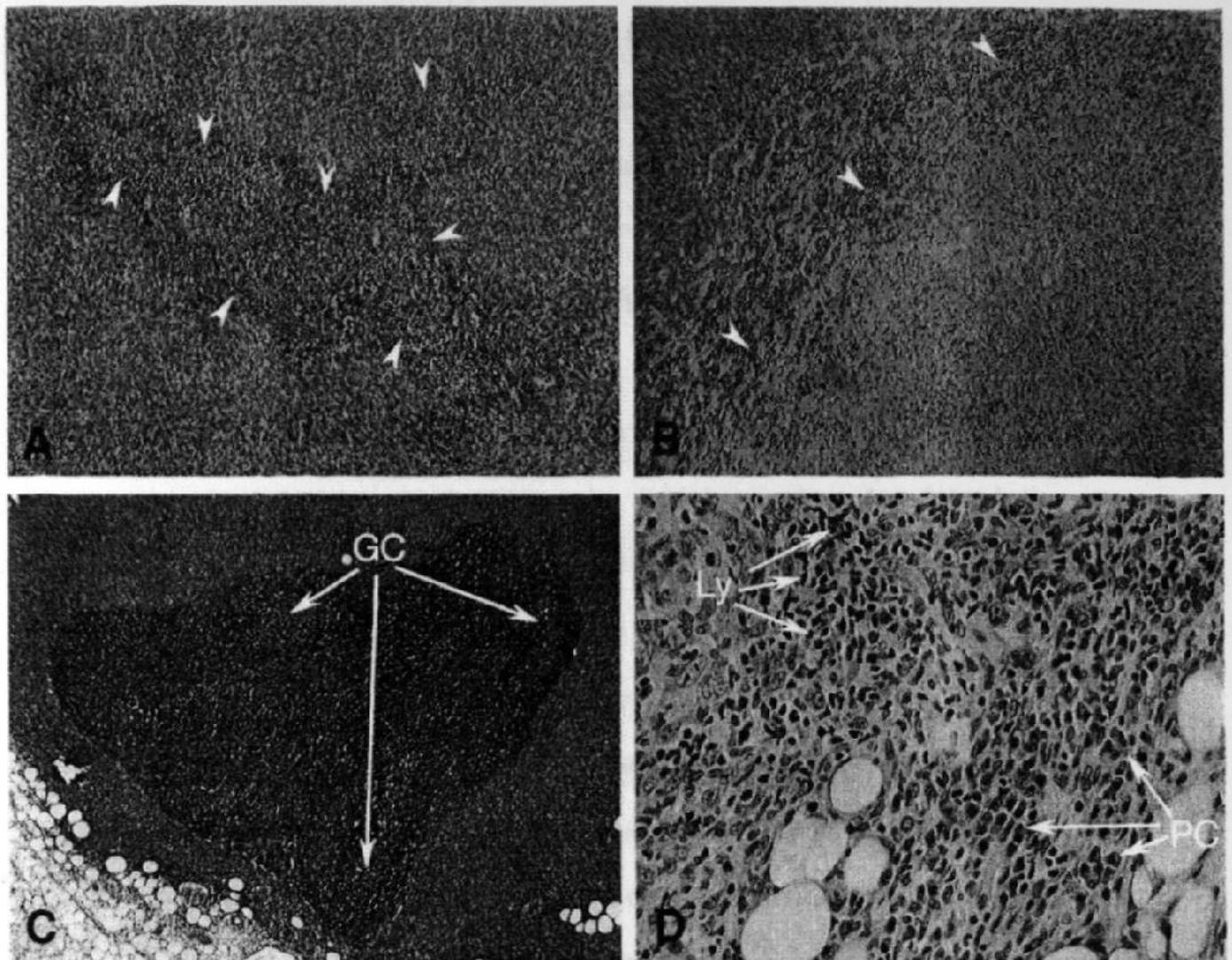


Figura 8. Análisis histopatológico de los tumores ortotópicos y heterotópicos tratados con el sistema *HSV-tk/GCV*: Los tumores ortotópicos muestran lesiones de necrosis focal (A), mientras que los tumores heterotópicos (B) muestran un patrón de necrosis periférica extensa acompañada de infiltración de linfocitos y células plasmáticas (D). Aunque en el modelo ortotópico, algunos nódulos linfoides mamarios fueron invadidos por el crecimiento tumoral (C), la activación de linfocitos no es evidente, como lo demuestra la presencia de escasos centros germinales. A, B y C: Magnificación 60X. D: magnificación 250X. Las flechas blancas señalan los bordes de necrosis. GC: Centros germinales, PC: Células plasmáticas, Ly: Linfocitos.

En contraste, las masas subcutáneas demostraron una necrosis más extensa en la periferia del tumor (ver figura 8B). Numerosos linfocitos infiltrantes y grupos de células plasmáticas estaban presentes en los márgenes viables de la neoplasia. Los tumores heterotópicos eran menos densos y presentaban vasos de tamaño moderado, principalmente en la periferia (ver figuras 8B y 8D).

5.4.3. ANALISIS DE SOBREVIDA. Este estudio no mostró ventajas de supervivencia para los grupos que recibieron el vector terapéutico en ninguno de los dos modelos (ver figura 9). Se observa un mayor tiempo de supervivencia para los animales implantados con los tumores subcutáneos que se prolonga hasta el día 40 post-transducción, en comparación con los animales del modelo ortotópico, cuya supervivencia llega hasta el día 32 post-transducción. Los SV_{50} para el modelo heterotópico fueron 36 días para el grupo tratado con el sistema HSV-tk/GCV y 40 días para el grupo tratado con el vector control. En el caso del modelo ortotópico, los SV_{50} fueron de 24 días para ambos grupos experimentales.

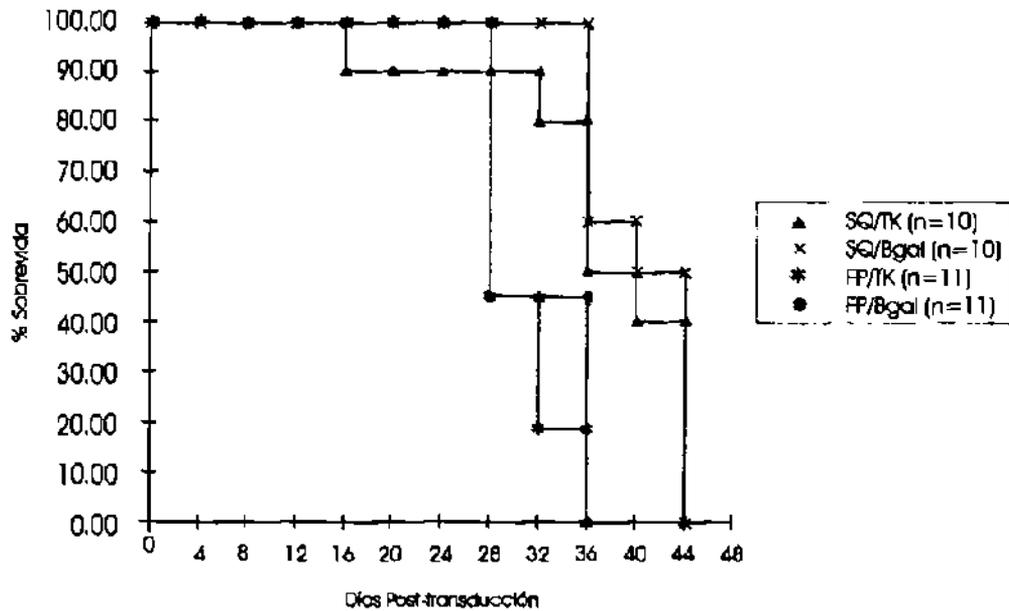


Figura 9. Análisis de supervivencia: Gráfica de Kaplan-Meier, mostrando simultáneamente la supervivencia en los modelos ortotópico y heterotópico. No se observa ningún efecto de incremento de la supervivencia en el grupo terapéutico con respecto al grupo control, en los dos modelos representados en la gráfica.

5.5. PRUEBA DE LINFOCITOS CITOTÓXICOS ANTI-TM40D. Este análisis no demostró la activación de la respuesta celular inmune en contra de la línea tumoral TM40D en los grupos tratados con el sistema *HSV-tk/GCV* en los dos modelos de implantación tumoral (ver figura 10). El estudio muestra que hubo una leve respuesta en los animales utilizados como controles positivos del experimento (ratones C57BL/6), pero el resto de la actividad citolítica permanece cerca de la línea de base en todas las diluciones ensayadas en los distintos grupos.

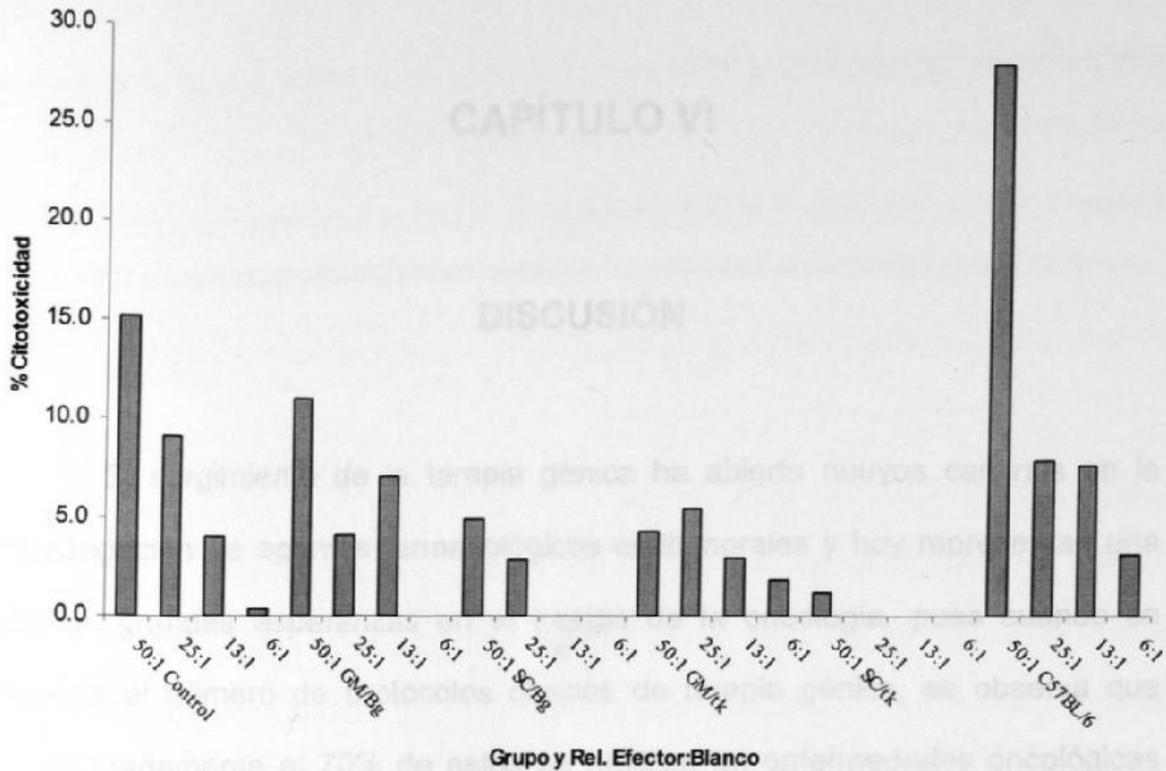


Figura 10. Análisis de linfocitos citotóxicos en los modelos ortotópico y heterotópico tratados con el sistema HSV-tk/GCV: La gráfica muestra la actividad linfocítica citotóxica en los dos modelos de implantación, el control no inmunizado (ratones BALB/c no implantados) y el control positivo (ratones C57BL/6 implantados con tumor). La única actividad linfocítica relevante se observa en el control positivo en los pozos de relación 50:1 (linfocito:blanco).

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

El surgimiento de la terapia génica ha abierto nuevos caminos en la investigación de agentes farmacológicos antitumorales y hoy representan una de las grandes esperanzas en el campo de la oncología, pues cuando se analiza el número de protocolos clínicos de terapia génica, se observa que aproximadamente el 70% de estos se realizan en enfermedades oncológicas (Roth y Cristiano 1997). La terapia génica ofrecería algunas ventajas sobre los agentes tradicionales. Por ejemplo, la transducción se puede realizar mediante inyección intratumoral directa (terapia *in-vivo*); las células transducidas se convierten en fábricas de la molécula terapéutica, cuya producción se puede limitar a un tipo celular particular como las células malignas, los linfocitos infiltrantes de tumor o las células endoteliales de la vasculatura tumoral, etc. y el tiempo de expresión puede ser controlado mediante la elección de un vector de vida media corta, el tratamiento *ex-vivo* de un tipo celular particular o mediante la regulación de la expresión génica (Gómez-Navarro y cols. 1999). Otra ventaja es la concentración del producto en el órgano o tejido blanco y el control de la diseminación del agente a los sistemas de circulación sistémica, lo cual evitaría muchos de los efectos colaterales de los agentes

quimioterapéuticos. Sin embargo, la terapia génica se realiza principalmente con vectores virales que son agentes biológicos. Esta naturaleza, determina nuevos e importantes efectos de farmacodinamia y toxicología, algunos de los cuales tienen antecedentes en los virus atenuados utilizados como vacunas, pero en el campo de la oncoterapia, muchos de estos fenómenos están por descubrirse.

Las características terapéuticas de los vectores y genes de terapia génica, como la eficacia, la duración de los efectos, la distribución del agente, la toxicidad y efectos colaterales relacionados, etc, deben probarse, como cualquier otro medicamento, en estudios preclínicos en un modelo animal, generalmente roedores, antes de iniciar protocolos de investigación clínica. El problema fundamental de esta tesis es determinar si el sitio de localización ortotópico o heterotópico de un tumor en un modelo animal, afecta la eficacia de la terapia génica antineoplásica. La observación que el modelo elegido puede afectar la eficacia terapéutica de un agente antitumoral tiene algunos antecedentes en la literatura, principalmente para los agentes quimioterapéuticos, como se discutirá adelante, pero no tiene antecedentes en el área de la terapia génica. La determinación detallada de los factores que producen esta diferencia es por el momento complicada, debido a que aun no existe un cuadro completo de las interacciones entre el tumor y su microambiente y mucho menos, entre tumor, microambiente y agente biológico terapéutico. Sin embargo, en esta tesis se ha realizado un esfuerzo por determinar algunos de estos factores, como la descripción morfológica en el

sitio de tratamiento y la respuesta inmunológica mediada por linfocitos citotóxicos.

Los pasos del desarrollo de esta tesis han sido esencialmente, 1) la selección de un tipo celular maligno que demuestra ser susceptible al tratamiento de terapia génica en condiciones de cultivo de tejidos, 2) la observación del crecimiento natural de los implantes tumorales ortotópicos y heterotópicos en un modelo murino inmunocompetente de cáncer de mama, 3) la determinación de la eficacia antitumoral del sistema *HSV-tk/GCV* mediante la observación de crecimiento tumoral y estudios de histopatología e inmunología y 4) análisis de sobrevivencia. La discusión de esta tesis se organizó según los resultados obtenidos en cada paso.

Susceptibilidad de la línea celular TM40D al sistema *HSV-tk* mediado por un vector adenoviral. La demostración simultánea de la susceptibilidad de la línea celular neoplásica TM40D al vector adenoviral y al sistema *HSV-tk/GCV* en condiciones de cultivo de tejidos, permite predecir la actividad terapéutica con estos agentes en contra de una masa tumoral de crecimiento rápido en condiciones *in-vivo*, como ocurre en varios ensayos exitosos en modelos animales reportados para esta terapia, como por ejemplo, los ensayos con células C₆ de glioblastoma de rata (Chen y cols. 1994), las células prostáticas malignas RM1 de ratones C57BL/6 (Eastham y cols. 1996), etc.

Comparación del crecimiento tumoral entre los modelos ortotópico y heterotópico. Los tumores del modelo ortotópico crecieron 1.24 veces más rápidamente que los tumores implantados en el espacio subcutáneo. La diferencia en la velocidad de crecimiento puede reflejar el impacto de varios factores. Primero, la glándula mamaria está albergada dentro de un estroma de tejido adiposo. El tejido adiposo cuenta con abundante vascularización que proporciona abundantes nutrientes y óptima oxigenación para favorecer el crecimiento tumoral. Adicionalmente, las células estromales y glandulares sanas pueden proveer factores paracrinos que estimularían el crecimiento neoplásico (Miller y Bukowski, 1994). Los tumores heterotópicos, particularmente en el espacio subcutáneo, frecuentemente producen efectos adversos para el crecimiento tumoral, tal como la formación de una cápsula fibrosa alrededor del tumor (Kyriazis y Kyriaziz, 1980), que pueden inhibir el crecimiento tumoral, acelerar la necrosis y disminuir la actividad metastásica del implante (de Vore y cols., 1980).

Adicionalmente, la temperatura de la glándula mamaria ricamente vascularizada puede ser muy similar a la temperatura corporal del animal, en comparación con la temperatura de los tumores que crecen en el espacio subcutáneo, la cual es potencialmente más baja.

Finalmente, la glándula mamaria ofrece un ambiente con una actividad inmune particular denominada "inmunoprivilegio". Se ha reportado que una baja actividad del sistema de defensa en esta glándula puede favorecer el

crecimiento de tumores en el ratón y en la especie humana (Stewart y Hepner, 1997). El tejido subcutáneo está frecuentemente expuesto al ataque de agentes externos, no es un tejido inmunoprivilegiado y está equipado con abundantes macrófagos tisulares.

Aunque a la fecha no se puede precisar un mecanismo particular, los dos microambientes experimentales difieren en su capacidad de permitir el crecimiento de los implantes realizados con las células neoplásicas TM40D. Algunos reportes previos también han demostrado el crecimiento preferencial de los tumores mamarios en el ambiente ortotópico (Miller, 1981a, Miller y cols., 1981b, Price, 1996), así como el de otros tipos de tumores no mamarios (McLemore y cols., 1988, Hall y Thompson, 1997).

Eficacia del tratamiento con el sistema HSV-tk/GCV en los tumores orto y heterotópicos. En los tumores ortotópicos transducidos con el vector HSV-tk, se observó una supresión del crecimiento tumoral durante el periodo de tratamiento con GCV y resultó en un máximo de supresión de 33.1% en el día 8 en comparación con los tumores transducidos con el gen *Lac Z*. Poco tiempo después de haberse completado el tratamiento con GCV, los tumores comenzaron a crecer aceleradamente y para el día 20 post-transducción, los tumores alcanzaban el tamaño de los tratados con el vector control y no se observaba un beneficio terapéutico. Los hallazgos histopatológicos en este grupo experimental también reflejaron masas tumorales de crecimiento

expansivo con rica vascularización y áreas de necrosis central, acordes con la observación del crecimiento de la neoplasia.

En contraste, la supresión del crecimiento en los tumores heterotópicos transducidos con el adenovirus *HSV-tk* inicialmente fue menor a la observada en el grupo control. Sin embargo, 6 días después de iniciarse el tratamiento con GCV, el crecimiento de estos tumores fue cercano a un 60% del crecimiento observado en los tumores transducidos con el adenovirus β -gal y este crecimiento fue casi nulo entre los días 8 y 12 en el grupo de tratamiento. Aunque la supresión del crecimiento fue sostenida hasta el día 12, posteriormente las curvas de crecimiento tumoral en los dos grupos se vuelven casi paralelas y de esta manera, se sostiene un efecto significativamente diferente entre los grupos hasta el final del periodo de observación. Los hallazgos histopatológicos mostraron focos de necrosis en la periferia de los tumores tratados e infiltración de células inflamatorias, un patrón no observado en el modelo ortotópico.

La diferencia de eficacia del tratamiento entre los dos modelos era un evento esperado. Sin embargo, se anticipaba que la rica vascularización de los tumores implantados en la glándula mamaria facilitaría el acceso y la distribución del GCV al interior del tumor y que se observaría una mejor respuesta terapéutica. Ya que se observó una respuesta diferente, es factible mencionar que otros mecanismos pudieron afectar la respuesta terapéutica.

Se han propuesto tres mecanismos de acción terapéutica para el sistema *HSV-tk/GCV* que incluyen la inhibición de la división celular por bloqueo de la síntesis de ADN, el efecto testigo y la estimulación del sistema inmune en contra del tumor. Puede haber diferentes explicaciones basadas en estos tres mecanismos. Aunque la vascularización de los tumores heterotópicos puede haber sido más limitada, la encapsulación puede aumentar el efecto testigo debido a un aislamiento y potenciación relativos de la actividad del sistema. La inmunopotenciación pudo haber jugado algún papel, pero los datos de los estudios de linfocitos citotóxicos sugieren que por lo menos esta respuesta no ocurrió en ninguno de los dos modelos experimentales y los análisis histopatológicos revelaron poca actividad de las células del sistema inmune, particularmente en los tumores implantados en la glándula mamaria, en los que ganglios linfáticos invadidos no se observan activados.

Algunos estudios realizados en modelos ortotópicos y heterotópicos para probar la eficacia de agentes quimioterapéuticos han demostrado diferencias dependientes del sitio de implantación. Por ejemplo, se ha reportado una respuesta disminuida de la ciclofosfamida en tumores murinos subcutáneos en comparación con la respuesta de las metástasis pulmonares experimentales (Smith y cols., 1985). También hay un reporte de una respuesta menor con ácido flavono-acético en tumores subcutáneos de adenocarcinoma de colón en comparación con la respuesta observada en animales con ascitis tumoral intraperitoneal (modelo ortotópico) (Bibby y cols., 1989). Adicionalmente, los modelos heterotópicos han sido utilizados también como modelos de

enfermedad metastásica para probar los efectos de la terapia génica (Caruso y cols., 1993, Chen y cols., 1995, Lechanteur y cols., 1997, etc.). Las metástasis tienden a ser más agresivas y responden menos a la terapia que los tumores primarios. Sin embargo, los datos de esta tesis y los de otros autores (de Vore y cols., 1980) demuestran que la agresividad no es un sinónimo de localización heterotópica. Estas observaciones sugieren que la adaptación del tumor o la progresión para iniciar la fase de invasión son más importantes para contribuir a la agresividad del cáncer.

Estudios de supervivencia. Aunque se determinó una diferencia en el crecimiento de los tumores tratados en el modelo heterotópico durante el periodo viable de observación, el análisis de la curva de Kaplan-Meier muestra que la terapia no ofreció ninguna ventaja para la supervivencia del grupo de tratamiento y solo refleja una mayor supervivencia para el modelo heterotópico, probablemente debida a un crecimiento menos acelerado de la masa tumoral. Es posible que el paralelismo de las curvas de crecimiento en el modelo heterotópico se haya perdido después del periodo de observación, como lo sugiere la tendencia de crecimiento en el grupo de tratamiento en los dos últimos puntos de la observación y esto explique la pérdida del beneficio terapéutico en este parámetro.

El desarrollo de esta tesis permite plantear que la elección del modelo tumoral tiene efectos sutiles sobre el análisis final de la eficacia de un agente de terapia génica a nivel observacional. Los resultados obtenidos sugieren que

debe incrementarse la investigación en el área, la cual debería aplicarse a las diferentes estrategias experimentales antineoplásicas en este tipo de terapia, a los diferentes tipos de vectores y a los diferentes tipos de genes terapéuticos. También se sugiere que los estudios preclínicos deben hacer algún énfasis sobre el tipo de modelo a escoger, principalmente en los casos en que la investigación pretenda pasar a la fase clínica.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIÓN

El presente trabajo demuestra que hay diferencias de eficacia terapéutica para el sistema *HSV-tk/GCV* mediado por terapia génica en tumores mamarios ortotópicos y heterotópicos generados con la línea celular TM40D. Los análisis histopatológicos revelan tumores de estructura diferente, con patrones de necrosis distintos y la presencia de células inflamatorias en los tumores tratados del modelo heterotópico y poca actividad celular en los centros germinativos de tumores ortotópicos tratados. El ensayo de linfocitos citotóxicos para analizar el efecto inmunológico, no revela diferencias en ninguno de los modelos. La sobrevida tampoco se incrementa en los animales tratados con el sistema *HSV-tk/GCV* en los dos modelos analizados.

Los resultados obtenidos, principalmente en las curvas del análisis del crecimiento de la neoplasia, revelan la importancia de utilizar modelos de implantación tumoral apropiados para examinar la eficacia potencial de las modalidades de terapia génica para el cáncer. Aunque existe un buen número de evidencias sobre la diferencia de efecto con agentes quimioterapéuticos en

diversos modelos de implantación tumoral y metástasis, las observaciones realizadas en este trabajo implican que estas diferencias también pueden observarse con los agentes de terapia génica anticancerosa, pues la eficacia puede depender de varios factores presentes en el microambiente tumoral.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Eck SL** y **Wilson JM**. Gene-based therapy. En: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Hardman JG y Limbird LE (editores). Novena edición. McGraw-Hill, Inc. Nueva York, EUA. p.p. 77-101. 1996.
2. **Cusack JC Jr.** y **Tanabe KK**. Cancer gene therapy. *Surg Oncol Clin N Am* 7:421-469. 1998.
3. **Bank A**. Gene therapy of cancer. *Med Oncol* 12:143-147. 1995.
4. **Rabkin SD**, **Mineta T**, **Miyatake S**, **Yazaki T**. Gene therapy: targeting tumor cells for destruction. *Hum Cell* 9:265-276. 1996.
5. **Culver KW**, **Ram Z**, **Wallbridge S**, **Ishii H**, **Oldfield EH**, **Blaese RM**. In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256:1550-1552. 1992.
6. **Chen SH**, **Shine HD**, **Goodman JC**, **Grossman RG**, **Woo SL**. Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3054-3057. 1994.
7. **Rojas-Martínez A**, **Wide PR**, **Montgomery CA**, **Chen SH**, **Woo SLC**, **Aguilar-Córdova E**. Distribution, persistency, toxicity, and lack of replication of an E1-A-deficient adenoviral vector after intracardiac delivery in the cotton rat. *Cancer Gene Ther* 5:365-370. 1998.
8. **Reid R**, **Mar EC**, **Huang ES**, **Topal MD**. Insertion and extension of acyclic, dideoxy, and ara nucleotides by herpesviridae, human alpha and human beta polymerases. A unique inhibition mechanism for 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine triphosphate. *J Biol Chem* 263:3898-3904. 1988.
9. **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* 53:5274-5283. 1993.
10. **Barba D**, **Hardin J**, **Sadelain M**, **Gage FH**. Development of anti-tumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4348-4352. 1994.

11. **Yamamoto S**, Suzuki S, Hoshino A, Akimoto M, Shimada T. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated killing of tumor cell induces tumor-specific cytotoxic T cells in mice. *Cancer Gene Ther* 4:91-96. 1997.
12. **Eastham JA**, Chen SH, Sehgal I, Yang G, Timme TL, Hall SJ, Woo SL, Thompson TC. Prostate cancer gene therapy: herpes simplex virus thymidine kinase gene transduction followed by ganciclovir in mouse and human prostate cancer models. *Hum Gene Ther* 7:515-523. 1996.
13. **Smythe WR**, Hwang HC, Elshami AA, Amin KM, Eck SL, Davidson BL, Wilson JM, Kaiser LR, Albelda SM. Treatment of experimental human mesothelioma using adenovirus transfer of the herpes simplex thymidine kinase gene. *Ann Surg* 222:78-86. 1995.
14. **Sacco MG**, Benedetti S, Duflot-Dancer A, Mesnil M, Aranda S, Vezzoni P, Finocchiaro G. Partial regression, yet incomplete eradication of mammary tumors in transgenic mice by retrovirally mediated HSVtk transfer "in-vivo". *Gene Ther* 3:1151-1156. 1996.
15. **Wei MX**, Bougnoux P, Sacre-Salem B, Peyrat MB, Lhuillery C, Salzman JL, Klatzmann D. Suicide gene therapy of chemically induced mammary tumor in rat: efficacy and distant bystander effect. *Cancer Res* 58:3529-3532. 1998.
16. **Ram Z**, Culver KW, Waldbridge S, Blaese RM, Oldfield EH. In situ retroviral-mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats. *Cancer Res* 53:83-88. 1993.
17. **Ram Z**, Culver KW, Oshiro EM, Viola JJ, de Vroom HL, Otto E, Long Z, Chiang Y, McGarrity GJ, Muul LM, Katz D, Blaese RM, Oldfield EH. Therapy of malignant brain tumors by intratumoral implantation of retroviral vector-producing cells. *Nat Med* 3:1354-1361. 1997.
18. **Herman JR**, Adler HL, Aguilar-Córdova E, Rojas-Martínez A, Woo S, Timme TL, Wheeler TM, Thompson TC, Scardino PT. In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: A phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 10:1239-1249. 1999.
19. **Kittrell FS**, Oborn CJ, Medina D. Development of mammary preneoplasias in vivo from mouse mammary epithelial cell lines in vitro. *Cancer Res* 52:1924-1932. 1992.
20. **Nyberg-Hoffman C**, Shabram P, Li W, Giroux D, Aguilar-Cordova E. Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. *Nat Med* 3: 808-811. 1997.
21. **Lancaster MV** y Fields RD. Antibiotic and cytotoxic drug susceptibility assays using resazurin and poisoning agents. *US Patent No. 5,501,959*. 1996.

22. **Mule J.** En: *Current Protocols in Immunology*. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W y Coico R (editores), *John Wiley & Sons Inc.* EUA. p.p. 7.7,7-18. 1991.
23. **Roth JA, Cristiano RJ.** Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst* 89:21-39. 1997.
24. **Gómez-Navarro J, Curiel DT, Douglas JT.** Gene therapy for cancer. *Eur J Cancer* 35:867-885. 1999.
25. **Miller FR, Bukowski J.** Growth factors in mouse mammary cell interactions in vitro. *Anticancer Res* 14, 2033-2038. 1994.
26. **Kyriazis AA, Kyriazis AP.** Preferential sites of growth of human tumors in nude mice following subcutaneous transplantation. *Cancer Res* 40:4509-4511. 1980.
27. **de Vore P, Houchens DP, Ovejera AA, Dill GS Jr, Hutson, TB.** Collagenase inhibitors retarding invasion of a human tumor in nude mice. *Exp Cell Biol* 48:367-373. 1980.
28. **Stewart TH, Heppner GH.** Immunological enhancement of breast cancer. *Parasitology* 115, Suppl: S141-153. 1997.
29. **Miller, FR.** Comparison of metastasis of mammary tumors growing in the mammary fat pad versus the subcutis. *Invasion Metastasis* 1:220-226. 1981^a.
30. **Miller FR, Medina D, Heppner GH.** Preferential growth of mammary tumors in intact mammary fat pads. *Cancer Res* 41:3863-3867. 1981^b.
31. **Price JE.** Metastasis from human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 39:93-102. 1996.
32. **McLemore TL, Eggleston JC, Shoemaker RH, Abbott BJ, Bohlman ME, Liu MC, Fine DL, Mayo JG, Boyd MR.** Comparison of intrapulmonary, percutaneous intrathoracic, and subcutaneous models for the propagation of human pulmonary and nonpulmonary cancer cell lines in athymic nude mice. *Cancer Res* 48:2880-2886. 1988.
33. **Hall SJ, Thompson TC.** Spontaneous but not experimental metastatic activities differentiate primary tumor-derived vs. metastasis-derived mouse prostate cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis* 15:630-638. 1997.
34. **Smith KA, Begg AC, Denekamp J.** Differences in chemosensitivity between subcutaneous and pulmonary tumors. *Eur J Cancer Clin Oncol* 21:249-256. 1985.

35. **Bibby MC**, Phillips RM, Double JA. Influence of site on the chemosensitivity of transplantable murine colon tumors to flavone acetic acid (LM975, NSC 347512). *Cancer Chemother Pharmacol* 24:87-94. 1989.
36. **Caruso M**, Paris Y, Gagandeep S, Houssin D, Salzamann JL, Klatzmann D. Regression of established macroscopic liver metastases after in situ transduction of a suicide gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7024-7028. 1993.
37. **Chen SH**, Chen XH, Wang Y, Kosai K, Finegold MJ, Rich SS, Woo SL. Combination gene therapy for liver metastasis of colon carcinoma in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2577-2581. 1995.
38. **Lechanteur C**, Princen F, Lo Bue S, Detroz B, Fillet G, Gielen J, Bours V, Merville MP. HSV-1 thymidine kinase gene therapy for colorectal adenocarcinoma-derived peritoneal carcinomatosis. *Gene Ther* 4:1189-1194. 1997.

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Nombre: Augusto Rojas Martínez

Nacimiento: Bogotá, Colombia. Junio 18 de 1962

Teléfono: (8) 329 41 73 Ext. 2828

Fax: (8) 333 77 47

Correo electrónico: arojas@ccr.dsi.uanl.mx

Educación:

Médico Cirujano

Institución: Escuela Colombiana de Medicina

Fecha: 1985

Maestría en Genética

Institución: Universidad de Guadalajara

Fecha: 1991

Candidato a Doctor en Ciencias

Institución: Universidad Autónoma de Nuevo León

Fecha: 2000

Estudios Postdoctorales

Centro de Terapia Génica y Celular, Baylor College of Medicine, Houston Texas 1993-1998.

Experiencia profesional:

Adscripción Actual

Profesor Tiempo Completo de la Facultad de Medicina, UANL.

Fecha de Ingreso: 01-Enero-1999

Disciplina: Medicina. Sub-disciplina: Biología Molecular e Ingeniería Genética

Líneas de investigación:

- Terapia génica del cáncer
- Diagnóstico molecular de enfermedades

Antecedentes Laborales:

- División de Genética de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia
1986-1987.
- Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. de 1988-1992

Experiencia Docencia/Investigación:

- Departamento de Neurología, Baylor College of Medicine, Houston, Texas
1992-1993.
- Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. de
Enero de 1999 a la fecha.

Tesis dirigidas en proceso: 3 de maestría

Membresía

Asociación Americana de Terapia Génica.

Artículos publicados con arbitraje

Rojas-Martínez A, Oberg KC, Kittrell F, Medina D, Aguilar-Cordova E. Differential effects of HSV-*tk* gene therapy in orthotopic and heterotopic mammary tumors. Enviado para publicación en *Anticancer Research*, 2000.

Restrepo CM, Pineda L, Rojas-Martínez A, Gutiérrez CA, Morales A, Gómez Y, Villalobos MC, Borjas L, Delgado W, Myers A, Barrera-Saldaña HA. CFTR mutations in three Latin American countries. *Am J Med Genet* 91:277-279. 2000.

Trask TW, Trask RP, Aguilar-Córdova E, Shine HD, Wyde PR, Goodman JC, Hamilton WJ, Rojas-Martínez A, Chen SH, Woo SLC, Grossman RG. Phase I study of adenoviral delivery of the HSV-*tk* gene and ganciclovir administration in patients with recurrent malignant brain tumors. *Molecular Therapy* 1:195-203. 2000.

Hasenburg A, Tong XW, Rojas-Martínez A, Nyberg-Hoffman C, Kieback CC, Kaplan AL, Kaufman RH, Ramzy I, Aguilar-Cordova E, Kieback DG. Thymidine kinase (TK) gene therapy of solid tumors: valacyclovir facilitates outpatient treatment. *Anticancer Res* 19:2163-2165. 1999.

Herman JR, Adler HL, Aguilar-Córdova E, Rojas-Martínez A, Woo S, Timme TL, Wheeler TM, Thompson TC, Scardino PT. In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: A phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 10:1239-1249. 1999.

Rojas-Martínez A, Wyde PR, Montgomery CA, Chen SH, Woo SCL, Aguilar-Córdova E. Distribution, persistency, toxicity, and lack of replication of an E1A-Recombinant adenoviral vector after intracardiac delivery in the cotton rat. *Cancer Gene Ther* 5:365-370. 1998.

Villalobos-Torres MC, Rojas-Martínez A, Villarreal-Castellanos E, Cantú JM, Sánchez-Anzaldo FJ, Saiki RK, and Barrera-Saldaña HA. Analysis of 16 cystic fibrosis mutations in Mexican patients. *Am J Med Genet* 69:380-382. 1997.

Rojas-Martínez A, Villalobos-Torres MC, Ortiz de Luna RI, Pompa-Garza MT, and Barrera-Saldaña HA. Molecular detection of carriers of hemophilia A in Mexican families. *Rev Inv Clin* 48:125-127. 1996.

Rivera-Pérez JA, Rojas-Martínez A, Charles-García F, Barrera-Saldaña HA. Análisis molecular de la hemofilia A en familias del noreste de México. *Rev Inv Clin* 45:23-28. 1993.

Barrera-Saldaña HA, Rojas-Martínez A, Vázquez-Alemán RM. Diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias. *Gaceta Médica de México* 128:613-621. 1992.

Rojas-Martínez A, Vázquez-Alemán RM, Gustincich S, Cantú JM, Barrera-Saldaña HA. Genética Molecular de la Fibrosis Quística: El alelo Δ -F508 en familias mexicanas. *Bol Hosp Inf Mex* 49:335-340. 1992.

Rojas-Martínez A, García-Cruz D, García AR, Sánchez-Corona J, Rivas F. Poland Moebius syndrome in a boy and Poland syndrome in his mother. *Clin Genet* 40:225-228. 1991.

Rojas-Martínez A, Sánchez-Corona J, García-Cruz O, González-Martínez A, Nazaré Z, García-Cruz D. A sporadic case of Weaver syndrome in a female. *Dysmorphology and Clinical Genetics* 5:23-26. 1991.

Rojas-Martínez A, García-Cruz D, Medina C, Moller M, Restrepo CM, Rivera H. Tandem duplication of proximal 5q. *Ann Genet* 33:228-230. 1990.

Herman JR, Adler HL, Aguilar-Córdova E, Rojas-Martínez A, Woo S, Timme TL, Wheeler TM, Thompson TC, Scardino PT. In situ gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: A phase I clinical trial. *Hum Gene Ther* 10:1239-1249. 1999.

Rojas-Martínez A, Wyde PR, Montgomery CA, Chen SH, Woo SCL, Aguilar-Córdova E. Distribution, persistency, toxicity, and lack of replication of an E1A-Recombinant adenoviral vector after intracardiac delivery in the cotton rat. *Cancer Gene Ther* 5:365-370. 1998.

Villalobos-Torres MC, Rojas-Martínez A, Villarreal-Castellanos E, Cantú JM, Sánchez-Anzaldo FJ, Saiki RK, and Barrera-Saldaña HA. Analysis of 16 cystic fibrosis mutations in Mexican patients. *Am J Med Genet* 69:380-382. 1997.

Rojas-Martínez A, Villalobos-Torres MC, Ortiz de Luna RI, Pompa-Garza MT, and Barrera-Saldaña HA. Molecular detection of carriers of hemophilia A in Mexican families. *Rev Inv Clin* 48:125-127. 1996.

Rivera-Pérez JA, Rojas-Martínez A, Charles-García F, Barrera-Saldaña HA. Análisis molecular de la hemofilia A en familias del noreste de México. *Rev Inv Clín* 45:23-28. 1993.

Barrera-Saldaña HA, Rojas-Martínez A, Vázquez-Alemán RM. Diagnóstico molecular de enfermedades hereditarias. *Gaceta Médica de México* 128:613-621. 1992.

Rojas-Martínez A, Vázquez-Alemán RM, Gustincich S, Cantú JM, Barrera-Saldaña HA. Genética Molecular de la Fibrosis Quística: El alelo Δ -F508 en familias mexicanas. *Bol Hosp Inf Mex* 49:335-340. 1992.

Rojas-Martínez A, García-Cruz D, García AR, Sánchez-Corona J, Rivas F. Poland Moebius syndrome in a boy and Poland syndrome in his mother. *Clin Genet* 40:225-228. 1991.

Rojas-Martínez A, Sánchez-Corona J, García-Cruz O, González-Martínez A, Nazaré Z, García-Cruz D. A sporadic case of Weaver syndrome in a female. *Dysmorphology and Clinical Genetics* 5:23-26. 1991.

Rojas-Martínez A, García-Cruz D, Medina C, Moller M, Restrepo CM, Rivera H. Tandem duplication of proximal 5q. *Ann Genet* 33:228-230. 1990.

ANEXO I

PUBLICACIÓN DERIVADA DE ESTA TESIS

**Differential Effects of HSV-*tk* Gene
Therapy in Orthotopic and Heterotopic Mammary Tumors**

(Experimental study)

**Augusto Rojas-Martinez¹, Kerby C. Oberg⁴, Francis Kittrell⁵,
Daniel Medina⁵, and Estuardo Aguilar-Cordova^{1, 2, 3}**

The Center for Cell and Gene Therapy¹, Texas Children's Cancer Center², Department of
Pediatrics³, Department of Pathology⁴ and, Department of Cell Biology.⁵
Baylor College of Medicine

Keywords: Cancer Gene Therapy, Mammary Carcinoma, Animal Models, Clinical Trials.

Running Title: Site-specific differences of gene therapy

Submission date: January 27th, 2000.

Correspondence: Estuardo Aguilar-Cordova, Ph.D.
Feigin Center, Suite 1170
Texas Children's Hospital
1102 Bates St. -MC 3-2374
Houston, TX 77030-2399

ABSTRACT

The microenvironment effects on tumor responsiveness to gene therapy were analyzed by comparing TM40D mammary tumor cells implanted into syngeneic mice subcutaneously (heterotopic model) or into the mammary gland (orthotopic model). These sites, although morphologically and embryologically similar, are physiologically different. Animals were separated into 3 groups: 1) a treatment group (HSV-*tk*/GCV), 2) an adenoviral control group and 3) a sham operated group. Tumor growth was measured and tumors histologically analyzed to determine the effects of treatment in the two microenvironments. Although both models, resulted in transient tumor growth suppression (33.1%, orthotopic and 39.4%, heterotopic) tumor growth rate and responsiveness to therapy were significantly different. Histologically, the two models displayed different patterns of tumor necrosis, vascularity and immune response. These data indicate that tumor microenvironment may impact the efficacy of gene therapy.

INTRODUCTION

Delivery of genes through viral vectors that generate tumor toxicity is being explored for the treatment of primary and disseminated tumors. Among the strategies for cancer gene therapy, the Herpes simplex virus thymidine kinase gene (HSV-*tk*) followed by ganciclovir (GCV) has been successful in the treatment of tumors in animal models that are refractory to conventional modalities in humans (1, 2). This strategy is based on the conversion of the nucleoside analog GCV into its active intermediate, GCV monophosphate, in cells transfected by HSV-*tk*. The phosphorylated prodrug leads to tumor cell death by halting the synthesis of DNA (3). In addition, untransfected tumor cells can also be affected by exported activated GCV (bystander effect) (4) or through the stimulation of the immune system in response to transfected tumor cells (5, 6). Since therapeutic effectiveness relies on several mechanisms, it may be uniquely susceptible to perturbations in the tumor microenvironment.

Several animal models have been employed to evaluate the effectiveness of HSV-*tk*/GCV therapy. Subcutaneous implantation of prostate (7) and mesothelioma (8) are examples of heterotopic models. Surgical implantation of glioblastoma into brain (9) and chemical (10) or transgenic (11) induction of mammary cancer are examples of orthotopic models. The choice of model utilized is often based on availability and convenience and both heterotopic and orthotopic models have successfully supported the initiation of clinical trials. However, the microenvironment of the preclinical model may significantly affect prognostic value of the clinical outcome.

Among the microenvironmental factors that may influence the therapeutic outcome are stromal architecture, local tissue response, patterns of vascularization, and immune-surveillance. The purpose of this study was to compare the efficacy of the HSV-*tk*+GCV strategy in orthotopic and heterotopic microenvironments using a mammary tumor model.

MATERIALS AND METHODS.

Tumor cells: The mouse mammary tumor cell line TM40D was derived from transplantation of the FSK mammary cell lines into mammary fat pads of syngeneic female BALB/c mice (12). Cells were maintained in α -MEM medium (Life Technologies, Gaithersburg, MD) supplemented with 10% bovine calf serum at 37°C in a 5% CO₂ air atmosphere. Cells for injection into mice were harvested from monolayer cultures by treatment with 0.25% trypsin (Life Technologies, Gaithersburg, MD), washed once and suspended in PBS buffer for injection.

Adenoviral vectors. The AdV-RSV-*tk* contains the HSV-1 thymidine kinase gene (HSV-*tk*) driven by the Rous sarcoma virus (RSV) long terminal repeat in an adenovirus type 5 backbone (2). The control vector (AdV-CMV- β -gal) has the same backbone, but contains the *E. coli lac-Z* gene driven by the human cytomegalovirus immediate-early promoter (HCMVIE). Vectors were produced and quantified in the Baylor College of Medicine Gene Vector Laboratory as described (13).

Orthotopic and Heterotopic tumor implantation. Five to six week old BALB/c females (Harlan Sprague Dawley, Inc. Indianapolis, IN) were used to create the orthotopic and heterotopic tumors. For orthotopic tumors (n=78), mice were placed under general anesthesia with pentobarbital (Nembutal[®], Abbott Laboratories, Chicago, IL) at 50 mg/kg. A right abdominal paramedial incision followed by an inguinal incision was performed to expose the left fat pad No. 4 (mammary gland). The mammary gland was injected with 5×10^4 TM40D cells using an injection volume of 20 μ l as described (14). Heterotopic tumors (n=38) were injected subcutaneously in the right flank with 5×10^4 cells in 50 μ l.

Vector delivery and GCV treatment. AdV-RSV-*tk*, AdV-CMV- β -gal or phosphate buffered saline were delivered by intra-tumor injection (20 μ l) with an average tumor volume of 40 mm³. Animals received GCV intraperitoneally at 20 mg/kg b.i.d. for 6 days using an injection volume of 100 μ l.

Data analysis. The size of each tumor was calculated every four days as the average of the largest and smallest diameters. The animals were sacrificed when any length reached 2.5 cm or if the animals were visibly ill. The mean diameter of the tumor was compared with its value at the time of vector delivery to determine its relative growth ratio. Student's T-test was used for statistical analyses of treated versus control groups. Tumor density, vascularity, necrosis/apoptosis, and immune response were assessed while blinded to the treatment protocol.

RESULTS/DISCUSSION

Comparison of tumor growth following orthotopic and heterotopic implantation.

Orthotopic tumors grew 1.24 times faster than their heterotopic counterparts. Growth rates for the tumors in both locations were constant over the period studied (Fig. 1 A).

Orthotopic tumors exhibited increased tumor cellularity compared to heterotopic tumors (Figure 2A and B). In orthotopic tumors, focal necrosis accompanied by hemorrhage was observed suggesting focal ischemia, likely from rapid tumor growth (Figure 2A). The surrounding viable tumor was dense and lacked significant inflammatory cell infiltrate. Even though occasional mammary lymph nodes had been engulfed by the expanding tumor, little response was mounted as evidenced by the minimal number of germinal centers present (Figure 2C). This tumors stimulated vascular growth. Moderate sized (50-100 μ m) vessels were seen at

the tumor margin (Figure 2C) with numerous capillaries percolating throughout the tumor.

In contrast, subcutaneous tumors demonstrated more extensive necrosis around the tumor periphery. Numerous infiltrating lymphocytes and clusters of plasma cells were present at the viable tumor margin (Figure 2B and D). Furthermore, the tumor was less dense throughout and had fewer moderate sized vessels at its periphery. These data indicate that vascular access, the mechanism of necrosis, and immune response are different at the two locations.

Microenvironment is also likely to impact other parameters that are important for the biologic response to therapy. Even in systemic therapeutic approaches, such as chemotherapy, differences correlated to the site of tumor implantation have been demonstrated. For example, decreased response to cyclophosphamide was found in murine tumors growing in the subcutis in comparison with the response of lung metastases (15). Similarly, treatment of disseminated colon adenocarcinoma was found to be more responsive than subcutaneous implants when treated with flavone acetic acid (16). Gene therapy differs from chemotherapy on the possibility to deliver the therapeutic agent directly into the tumor mass, exerting a more local effect. Considering this difference, the selection of the appropriate tumor model may be even more important for accurate correlation with therapeutic outcomes. Hence, in developing preclinical models for gene therapy it is not only important to consider the cell type, but also the *in-vivo* site.

Efficacy of HSV-tk+GCV therapy on orthotopic and heterotopic tumors.

Treatment of orthotopic tumors with HSV-tk and GCV resulted in a significant reduction of tumor growth rate (33.1% at day 8). After completing of the GCV infusion, tumor growth resumed and by day 20 the treated tumor size approximated that of controls. Thus, no long term therapeutic benefit was realized (Fig. 1B). In the heterotopic model, inhibition of tumor growth was not observed until after the GCV delivery was completed (day 8). In this model, maximal

suppression of growth rate (39.4%) was achieved by day 12 and although tumor growth continued, tumor size remained significantly less than controls for the duration of the experiments. Although survival following therapy in the heterotopic model was greater (TD₅₀ 39) than in the orthotopic model (TD₅₀ 29), neither reached a difference that was significant from their model specific controls (data not shown).

The basis for the difference in therapeutic responsiveness in these two sites is likely related to the mode of therapy. Three mechanisms have been proposed for the action of HSV-*tk*/GCV therapy: 1) direct inhibition of DNA synthesis, 2) bystander effect and 3) immune stimulation. Several parameters of the microenvironment are likely to affect the efficacy of these mechanisms. For example, the site of implantation affected tumor architecture, vascularization and growth rate. In turn, tumor architecture may impact vector distribution and the bystander effect. Vascularization affects drug delivery and host immune response. Growth rate directly affects the DNA synthesis and thus the cytotoxicity of the nucleotide analog. In this report, we demonstrated differences in tumor growth, morphology, immune response and effect of HSV-*tk*/GCV therapy in orthotopic and heterotopic mammary tumors models. Our results highlight the importance of utilizing an appropriate site-specific cancer models to examine the efficacy of gene therapy modalities.

REFERENCES.

1. Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM. *In-vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* 256: 1550-1552, 1992.
2. Chen SH, Shine HD, Goodman JC, Grossman RG, Woo SL. Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer *in-vivo*. *Proc Natl Acad USA* 9: 3054-3057, 1994.
3. Reid R, Mar EC, Huang ES, Topal MD. Insertion and extension of acyclic, dideoxy, and ara nucleotides by herpesviridae, human alpha and human beta polymerases. A unique inhibition mechanism for 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine triphosphate. *J Biol Chem* 263: 3898-3904, 1988.
4. 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* 53: 5274-5283, 1993.
5. Barba D, Hardin J, Sadelain M, Gage FH. Development of anti-tumor immunity following thymidine kinase-mediated killing of experimental brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4348-4352, 1994.
6. Yamamoto S, Suzuki S, Hoshino A, Akimoto M, Shimada T. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated killing of tumor cell induces tumor-specific cytotoxic T cells in mice. *Cancer Gene Ther* 4: 91-96, 1997
7. Eastham JA, Chen SH, Sehgal I, Yang G, Timme TL, Hall SJ, Woo SL, Thompson TC. Prostate cancer gene therapy: herpes simplex virus thymidine kinase gene transduction followed by ganciclovir in mouse and human prostate cancer models. *Hum Gene Ther* 7: 515-523, 1996.

8. Smythe WR, Hwang HC, Elshami AA, Amin KM, Eck SL, Davidson BL, Wilson JM, Kaiser LR, Albelda SM. Treatment of experimental human mesothelioma using adenovirus transfer of the herpes simplex thymidine kinase gene. *Ann Surg* 222: 78-86, 1995.
9. Ram Z, Culver KW, Walbridge S, Blaese RM, Oldfield EH. In situ retroviral mediated gene transfer for the treatment of brain tumors in rats. *Cancer Res* 53: 83-88, 1993.
10. Wei MX, Bougnoux P, Sacre-Salem B, Peyrat MB, Lhuillery C, Salzmann JL, Klatzmann D. Suicide gene therapy of chemically induced mammary tumor in rat: efficacy and distant bystander effect. *Cancer Res* 58: 3529-3532, 1998.
11. Sacco MG, Benedetti S, Duflot-Dancer A, Mesnil M, Aranda S, Vezzoni P, Finocchiaro G. Partial regression, yet incomplete eradication of mammary tumors in transgenic mice by retrovirally mediated HSV-*tk* transfer "in-vivo". *Gene Ther* 3: 1151-1156, 1996.
12. Kittrell FS, Oborn CJ, Medina D. Development of mammary preneoplasias *in-vivo* from mouse mammary epithelial cell lines in vitro. *Cancer Res* 52: 1924-1932, 1992.
13. Nyberg-Hoffman C, Shabram P, Li W, Giroux D, Aguilar-Cordova E. Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. *Nat Med* 3: 808-11, 1997.
14. Cardiff RD, Aguilar-Cordova E. Proto-neoplasia revisited: the molecular biology of mouse mammary hyperplasia. *Anticancer Res* 8: 925-33, 1988.
15. Smith KA, Begg AC, Denekamp J. Differences in chemosensitivity between subcutaneous and pulmonary tumours. *Eur J Cancer Clin Oncol* 21: 249-256, 1985.
16. Bibby MC, Phillips RM, Double JA. Influence of site on the chemosensitivity of transplantable murine colon tumours to flavone acetic acid. *Cancer Chemother Pharmacol* 24: 87-94, 1989.

FIGURE LEGENDS:

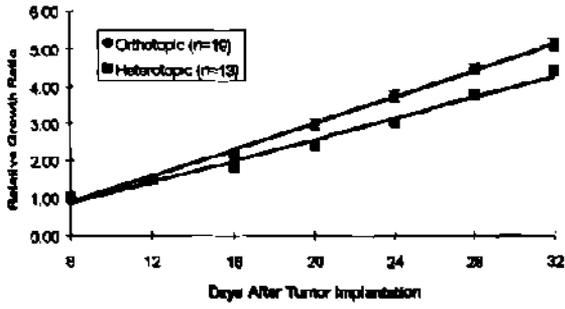
Figure 1. Relative tumor growth rate in untreated TM40D tumors and during HSV-*tk*/GCV treatment in the orthotopic and heterotopic models. A) Comparison of TM40D tumor growth at orthotopic and heterotopic sites: The graph represents tumor growth seven days after implantation (vector delivery day). Orthotopic tumors (diamonds), showed a significantly faster growth rate than their counterparts (squares). B) Effect of HSV-*tk*/GCV treatment in the orthotopic model: Tumor growth suppression was evident and statistically significant ($p < 0.05$) for 16 days after vector delivery. Beyond that time period, the difference between treated and control tumor size was no longer significant. C) Effects of the HSV-*tk*/GCV treatment in the heterotopic model: Tumor growth suppression was not evident until 8 days after treatment. Thereafter (days 12-24) tumor size is significantly reduced ($p < 0.05$) compared to that of the controls.

Figure 2. Comparison of Necrosis, Vascularity and Immune Response in Orthotopic and Heterotopic Tumors.

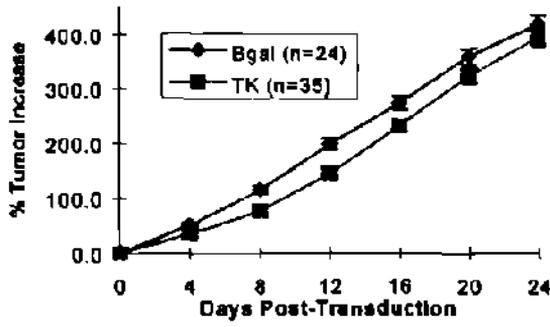
Focal regions of necrosis were more common in orthotopic tumors (A), while in heterotopic (subcutaneous) locations (B), the tumors displayed more extensive peripheral necrosis accompanied by a lymphocytic and plasma cell infiltrate (D). Although occasional mammary lymph nodes were engulfed by tumor in the orthotopic model (C), lymphocyte activation was not evident (note the infrequent compact germinal centers). A, B and C magnification 60X, D - 250 X. White arrows indicate the border of necrosis, GC-germinal centers, PC-plasma cells, Ly-lymphocytes.

Figure 1.

A)



B)



C)

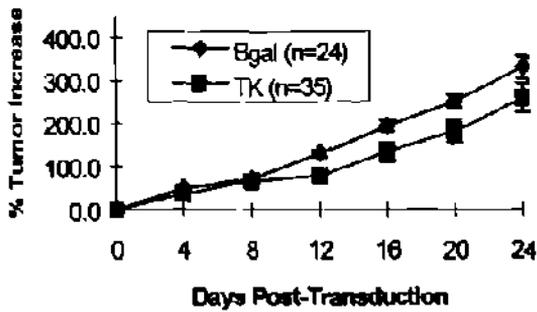


Figure 2.

