

Universitat de Barcelona

Facultat de Biologia

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Cèl·lules mare mesenquimàtiques humanes derivades de teixit adipós per a la teràpia cel·lular. Seguiment *in vivo* mitjançant procediments d'imatge no invasius.

Marta Vilalta Colomer

2008

Universitat de Barcelona

Facultat de Biologia

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Memòria presentada per la Llicenciada en Biologia Marta Vilalta Colomer, per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona, pel programa de Doctorat de Biotecnologia del departament de Bioquímica i Biologia Molecular (Bienni 2002-2004).

La present Tesi doctoral: “Cèl·lules mare mesenquimàtiques humanes derivades de teixit adipós per a la teràpia cel·lular. Seguiment *in vivo* mitjançant procediments d’imatge no invasius.” ha estat realitzat en Centre d’Investigació Cardiovascular (Institut Català de Ciències Cardiovasculars-Consell Superior d’Investigacions Científiques, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau) sota la direcció del Dr. Jerónimo Blanco Fernández i amb la tutoria de la Dra. Neus Carbó Carbó.

La Doctoranda:

Marta Vilalta Colomer

El director:

Jerónimo Blanco Fernández

La tutora:

Neus Carbó Carbó

I. TAULA DE CONTINGUTS

I. TAULA DE CONTINGUTS	7
II. ABREVIATURES	15
III. INTRODUCCIÓ	23
1 EI CÀNCER	25
1.1 Incidència	25
1.2 Definició	26
1.3 Característiques de les cèl·lules canceroses	27
1.4 Classificació i nomenclatura	29
1.4.1 Els carcinomes	29
1.4.2 Els sarcomes	29
1.4.3 Els gliomes	30
1.4.4 Les leucèmies	30
1.4.5 Els tumors de les línies germinals	30
1.4.6 Els tumors blàstics	30
1.5 Causes	31
1.5.1 Oncogens	31
1.5.2 Gens supressors de tumors	31
1.5.3 Agents carcinògens:	32
1.5.3.1 Genotòxics:	32
1.5.3.2 No genotòxics:	33
1.6 Factors de risc	33
1.6.1 La contaminació ambiental	34
1.6.2 L'edat	34
1.6.3 El tabac	34
1.6.4 La dieta	34
1.6.5 L'alcohol	35
1.6.6 Riscos laborals	35
1.6.7 Obesitat i sedentarisme	35
1.7 Tractaments	35
1.7.1 Cirurgia	35
1.7.2 Radioteràpia	36
1.7.3 Quimioteràpia	37
1.7.4 Teràpies dirigides	37
1.7.5 Immunoteràpia	38

1.7.6	Teràpia hormonal	38
1.7.7	Inhibició de l'angiogènesi	39
1.7.8	Nous assajos clínics	39
1.7.9	Teràpia gènica	39
2	LA TERÀPIA GÈNICA	40
2.1	Mètodes d'introducció de gens en les cèl·lules	41
2.1.1	Vectors no virals	41
2.1.1.1	Mètodes químics	41
2.1.1.2	Mètodes físics	42
2.1.2	Vectors virals	42
2.1.2.1	Els lentivirus	43
2.2	Estratègies de la teràpia gènica anticancerosa	48
2.2.1	Teràpia gènica citotòxica	48
2.2.1.1	Avantatges de la teràpia citotòxica	48
2.2.2	Tipus de gens suïcides	50
2.2.3	La timidina quinasa	51
2.2.4	L'efecte adjacent (o <i>bystander</i>).	52
3	TERÀPIA BASADA EN VEHICLES CEL·LULARS	54
3.1	Les cèl·lules mesenquimàtiques (MSC)	54
3.1.1	Cèl·lules mesenquimàtiques de la medul·la òssia (BMSC)	55
3.1.2	Cèl·lules mesenquimàtiques de teixit adipós (AMSC)	58
3.1.3	Bioseguretat de les cèl·lules mesenquimàtiques com a vehicles cel·lulars per a la teràpia gènica	60
4	INTERACCIONS TUMOR-HOSTE	62
4.1	El microentorn tumoral	62
4.1.1	L'estroma	62
4.1.1.1	Els fibroblasts	62
4.1.1.2	Cèl·lules immunològiques	63
4.1.1.3	Les cèl·lules vasculares	63
4.1.1.4	La matriu extracel·lular	63
4.2	La participació de les cèl·lules mare mesenquimàtiques en els tumors	64
5	MONITORATGE DE LES CÈL·LULES <i>IN VIVO</i>	66
5.1	Tècniques d'imatge en medicina nuclear	68
5.1.1	MRI	69

5.1.2	PET	69
5.1.3	CT	70
5.1.4	Ultrasons	70
5.2	Tècniques òptiques d'imatge	71
5.2.1	Fluorescència	71
5.2.2	Bioluminescència (BLI)	73
5.2.2.1	Les luciferases de les cuques de llum	74
5.2.2.2	Les luciferases amb substrat coelenterazina	75
5.2.2.3	Aplicacions d'imatge de bioluminescència	76
5.2.2.4	Avantatges i inconvenients de les luciferases	77
IV.	OBJECTIUS	81
V.	MATERIAL I MÈTODES	85
1	CÈL·LULES	87
1.1	Tipus cel·lulars	87
1.1.1	293T	87
1.1.2	hAMSC	87
1.1.3	PC-3	88
1.1.4	U-87 MG	88
1.1.5	HPAC	89
1.1.6	435-P	89
1.1.7	CL1	89
1.2	Congelació cel·lular	90
1.3	Diferenciació cel·lular	90
1.3.1	Diferenciació adipogènica	90
1.3.2	Diferenciació osteogènica	91
1.3.3	Diferenciació condrogènica	91
1.3.3.1	Diferenciacions en dues dimensions:	91
1.3.3.2	Diferenciacions en tres dimensions	91
1.4	Tincions de cèl·lules diferenciades <i>in vitro</i>	92
1.4.1	Tinció <i>Oil Red O</i>	92
1.4.2	Tinció de <i>Von Kossa</i>	93
1.4.3	Tinció de Blau de Toluïdina	94
2	MARCATGE CEL·LULAR	96

2.1	Construccions plasmídiques	96
2.1.1	Construcció PLox-G·PLuc	96
2.1.2	Construcció hrl-mrfp-ttk	96
2.1.3	Construcció PLox-Col2A1·PLuc	97
2.2	Producció de partícules víriques	97
2.3	Titulació de partícules víriques	98
2.4	Transducció cel·lular	98
2.5	Selecció de les cèl·lules transduïdes	99
3	Models animals <i>in vivo</i>	100
3.1	Ratolins	100
3.1.1	Ratolins BALB/c nu/nu	100
3.1.2	Ratolins SCID	100
3.2	Implantació de cèl·lules humanes AMSC en ratolins nu/nu	100
3.3	Producció de tumors humans en ratolins nu/nu i SCID	101
3.4	Inoculació conjunta de cèl·lules tumorals i hAMSC en ratolins	101
3.5	Implantació de càmeres DBM (matriu d'os desmineralitzat, demineralized bone matrix)	101
4	Bioluminescència no invasiva	103
4.1	Quantificació de fotons a partir de les imatges	104
4.2	Estimació del nombre de cèl·lules a partir de la quantificació de fotons	104
VI.	RESUM GLOBAL	107
VII.	PUBLICACIONS	121
1	PRIMERA PUBLICACIÓ	123
2	SEGONA PUBLICACIÓ	125
3	TERCERA PUBLICACIÓ	127
4	QUARTA PUBLICACIÓ	129
VIII.	BIBLIOGRAFIA	131

II. ABREVIATURES

ADN	Àcid desoxiribonucleic
α -MEM	Medi mínim essencial (<i>Minimum essential medium Eagle alpha modification</i>)
ARN	Àcid ribonucleic
ADP	Adenosina 5'-difosfat
AMSC	Cèl·lules mare mesenquimàtiques derivades de teixit adipós (<i>Adipose tissue derived mesenchymal stem cells</i>)
ATP	Adenosina 5'-trifosfat
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BMSC	Cèl·lules mare mesenquimàtiques de medul·la òssia (<i>Bone marrow mesenchymal stem cells</i>)
BLI	Imatges de bioluminescència (<i>Bioluminescence imaging</i>)
cADN	ADN còpia
CAF	Fibroblast associat al càncer (<i>Cancer-associated fibroblast</i>)
CCD	Dispositiu de càrrega acoblada (<i>Charged couple device</i>)
CD	Grup de diferenciació (<i>Cluster of differentiation</i>)
CD9	Ajuda al desenvolupament, activació, creixement i adhesió cel·lular
CD10	Marcador per identificar leucèmia en nens
CD11	Membre de la família del receptor de la integrina
CD13	Enzim de les membranes de l'intestí prim, placenta i túbuls renals proximals
CD14	Detecta les molècules antigèniques de la superfície de bacteris i fongs
CD18	Important per l'adhesió i senyalització en el sistema hematopoètic
CD19	Regula el desenvolupament, activació i diferenciació de les cèl·lules B
CD29	Involucrat en l'adhesió endotelial i limfocitària. Important en el transport de limfòcits
CD31	Actua com un antigen minoritari en trasplants de cèl·lules mare amb HLA idèntic
CD34	Mitjança la unió de les cèl·lules mare a la medul·la òssia o directa a les cèl·lules de l'estroma
CD40	Té un paper clau en la regulació de la immunitat mitjançada per cèl·lules i anticossos
CD49 (d)	Paper en les interaccions cèl·lula-cèl·lula

CD49 (e)	Funció d'adhesió
CD44	De la família de les glicoproteïnes de superfície. Important en l'adhesió en les cèl·lules epitelials i en el manteniment de l'orientació de les cèl·lules
CD45	Regulador essencial de les cèl·lules activades mitjançant antigen receptor T i B
CD54	Implicat en l'adhesió dels neutròfils en el lloc d'inflamació de l'endoteli
CD55	Protegeix contra una activació inapropiada del complement
CD56	Regula les interaccions entre neurones i neurones i múscul
CD59	Regula el complement per mitjà de la lisi cel·lular
CD73	Catalitza la desfosforilació dels ribo i desoxiribonucleòtids cap als nucleòsids corresponents
CD79 (a)	Codifica per la proteïna Ig- α del receptor d'antigen B
CD71	Essencial pel transport de ferro en les cèl·lules proliferants
CD80	Té un paper crític en les respostes autoimmunes i de trasplantaments
CD86	Té un paper crític en les respostes autoimmunes i de trasplantaments
CD90	Mitjança l'adhesió dels glòbuls blancs a les cèl·lules endotelials activades
CD105 (SH2)	Mitjança la resposta cel·lular del TGF- β
CD106 (VCAM-1)	Juga un paper important en la migració dels glòbuls blancs (<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>)
CD117	Protoncogèn activat en tumors GIST
CD133	Localitzat en les microvellositats i altres protuberàncies de la membrana
CD144	Proteïna d'adhesió cel·lular
CD166 (ALCAM)	Involucrada en l'extensió neuronal, hematopoesi i angiogènesi embrionària. (<i>Activated leukocyte cell adhesion molecule</i>)
CGH	Hibridació comparativa de genòmic (<i>Comparative genomic hybridization</i>)
C-kit	Receptor de la tirosina quinasa important pel desenvolupament de les cèl·lules mare hematopoètiques
CMV	Citomegalovirus
CNS	Sistema nerviós central (<i>Central nervous system</i>)
Col2A1	Col·lagen tipus II específic de cartílag humà

CT	Tomografia computeritzada (<i>Computed tomography</i>)
CZN	Coelenterazina
DBM	Matriu d'os desmineralitzada (<i>Demineralized bone matrix</i>)
DDT	Diclorodifeniltricloroetà
dGTP	Desoxiguanosina trifosfat
DMEM	Medi modificat amb alta glucosa (<i>Dulbecco's modified eagle media-high glucose</i>)
ECM	Matriu extracel·lular (<i>Extracellular matrix</i>)
EGFP	GFP optimitzada per mamífers (<i>Enhanced GFP</i>)
EHV	Virus de l'herpes equina (<i>Equine herpes virus</i>)
<i>Env</i>	Gen que codifica per la glicoproteïna de superfície i la proteïna de transmembrana del virió
FACS	Separació de cèl·lules activada per fluorescència (<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>)
FMT	Tomografia mitjançada per fluorescència (<i>Fluorescence mediated tomography</i>)
<i>Gag</i>	Grup específic d'antigen, codifica per proteïnes estructurals internes del virus
GCV	Ganciclovir
GFP	Proteïna verda fluorescent (<i>Green fluorescent protein</i>)
hAMSC	AMSC humanes
HeBS	Tampó salí d'Hepes (<i>Hepes-buffered saline</i>)
HEK	Ronyó embrionari humà (<i>Human embryonic kidney</i>)
Hepes	Àcid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfònic
HLA	Una part important del sistema immunitari humà (<i>Human leukocyte antigen</i>).
HSV	Virus de l'herpes (<i>Herpes simplex virus</i>)
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
IRES	Lloc d'entrada intern del ribosoma (<i>Internal ribosomal entry sites</i>)
IV	Intravenós
Kcal	Kilocaloria
LTR	Repetició terminal llarga (<i>Long terminal repeat</i>)
MLV	Virus de la leucèmia murina (<i>Murine Leukemia Virus</i>)
MOI	Multiplicitat d'infecció

mRFP	Proteïna monomèrica fluorescent vermella (<i>Monomeric red fluorescent protein</i>)
MRI	Imatges de ressonància magnètica (<i>Magnetic resonance imaging</i>)
MSC	Cèl·lules mare mesenquimàtiques (<i>Mesenchymal stem cells</i>)
MyD88	Molècula adaptadora en les vies de senyalització de IL-1.
Nef	Facilita l'infecció en les cèl·lules quiescents i augmenta l'infectivitat dels virions
Nm	Nanòmetres
NPC	Complex de porus nuclear (<i>Nuclear porus complex</i>)
PBS	Tampó de fosfat salí (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PET	Tomografia per emissió de positrons (<i>Positron emission tomography</i>)
PFA	Paraformaldehid
pH	Potencial d'hidrogen
PHC	Contatge total de fotons (<i>Photon counts</i>)
PIC	Complex de preintegració
PLuc	Luciferasa de <i>Photinus pyralis</i>
Pol	Codifica per enzims de la transcripció reversa
PolyA	Senyal de poliadenilació
P/S	Penicil·lina/estreptomicina
Rev	Regula el transport de l'ARN i empalmament
RFP	Proteïna vermella fluorescent (<i>Red fluorescent protein</i>)
RLuc	Luciferasa de <i>Renilla reniformis</i>
RPM	Revolució per minut
RRE	Element de resposta a rev
RT	Transcriptasa reversa
RTC	Complex de transcripció reversa
SBF	Sèrum boví fetal
SC	Subcutani
SCID	Immunodeficiència combinada greu (<i>Sever combined immunodeficiency</i>)
SIN	Autoinactivador (<i>Self-inactivating</i>)
SPECT	CT d'emissió d'un sol fotó
STRO-1	Marcador que identifica les cèl·lules progenitores de medul·la òssia formadores de colònies (<i>fibroblast colony-forming units</i> (CFU-F))

SV40	Estimulador del promotor del virus dels simis (<i>Simian virus early enhancer promoter</i>)
<i>Tat</i>	Gen que activa la transcripció
TGF- β	Factor de creixement transformant (<i>Transforming growth factor-beta</i>)
TK	Timidina quinasa
tTK	Timidina quinasa truncada
TU	Unitats transfectants
VEGF	Factor de creixement de l'endoteli vascular (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
<i>Vif</i>	Afecta l'infectivitat de les partícules víriques
VIH	Virus de la immunodeficiència humana
<i>Vpr</i>	Encarregat de la localització nuclear
Vpu	Gen que codifica per les proteïnes de membrana integrals i promociona l'alliberació dels virions
VSV-G	<i>G glycoprotein of vesicular stomatitis virus</i>
VZV	Virus de la Varicel·la (<i>Varicela zoster virus</i>)

III. INTRODUCCIÓ

“

S

1 EL CÀNCER

1.1 Incidència

Actualment, el càncer causa el 13% de la mortalitat humana mundial. Aquesta xifra situa aquesta malaltia com la segona causa de mort al món, amb un 29%, només precedida per les malalties cardiovasculars. Segons la Societat Americana del Càncer, durant l'any 2007 van morir 7,6 milions de persones com a conseqüència d'aquesta malaltia en tot el món. Les estimacions de les noves incidències de tipus de càncer, així com les estimacions de la mortalitat per a l'any 2007 als Estats Units, es troben resumides a les següents taules ¹:

HOMES		DONES	
Pròstata	29%	Mama	26%
Pulmons i bronquis	15%	Pulmons i bronquis	15%
Còlon i recte	10%	Còlon i recte	11%
Bufeta de l'orina	7%	Cos uterí	6%
Limfoma no hodgkinià	4%	Limfoma no hodgkinià	4%
Melanoma de la pell	4%	Melanoma de la pell	4%
Ronyó i pelvis renal	4%	Tiroides	4%
Leucèmia	3%	Ovari	3%
Cavitat oral i faringe	3%	Ronyó i pelvis renal	3%
Pàncrees	2%	Leucèmia	3%

Taula 1- Estimació dels deu tipus de càncer ordenats segons l'aparició de nous casos als Estats Units durant l'any 2007

HOMES		DONES	
Pulmons i bronquis	31%	Pulmons i bronquis	26%
Pròstata	9%	Mama	15%
Còlon i recte	9%	Còlon i recte	11%
Pàncrees	6%	Pàncrees	6%
Leucèmia	4%	Ovari	6%
Fetge i conducte biliar hepàtic	4%	Leucèmia	4%
Esòfag	4%	Limfoma no hodgkinià	3%
Bufeta de l'orina	3%	Cos Uterí	3%
Limfoma no hodgkinià	3%	Cervell i altres òrgans del sistema nerviós	2%
Ronyó i pelvis renal	3%	Fetge i conducte biliar hepàtic	2%

Taula 2- Estimació dels deu tipus de càncer ordenats segons la mortalitat als Estats Units durant l'any 2007

1.2 Definició

El terme càncer, quan hom s'hi refereix de manera genèrica, engloba més de 100 malalties que poden afectar qualsevol part del cos. A més, a part dels humans, hi ha diferents formes de càncer que poden afectar altres animals i algunes plantes.

El càncer es defineix com una patologia cel·lular en la qual una sola cèl·lula, o un grup de cèl·lules, pateix algun canvi en el seu material genètic i adquireix capacitats especials diferents de les cèl·lules normals. Una cèl·lula anormal, també denominada transformada, i aïllada que no prolifera més que les cèl·lules veïnes normals no implica cap dany. En canvi, si prolifera de manera anormal, donarà lloc a un tumor o neoplasma, que és una massa creixent de cèl·lules anormals. Quan aquestes cèl·lules es mantenen agrupades en una massa única, normalment encapsulades, no envaeixen els teixits circumdants, no migren cap a altres òrgans i creixen de forma limitada es diu que el tumor és benigne. Aquests tumors, per tant, solen ser nocius per a la salut. Un tumor es considera cancerós només si és maligne, i això passa quan les cèl·lules tenen l'habilitat de créixer de manera il·limitada, d'envair els teixits circumdants (Figura 1) i de propagar-se cap a altres òrgans. Aquest últim procés de propagació es coneix amb el nom de metàstasi.

A part d'una gran acumulació de cèl·lules, allò que distingeix els neoplasmes és una organització alterada del teixit. Majoritàriament, els tumors mantenen les estructures que caracteritzen l'òrgan d'origen; per tant, com tots els òrgans normals, els neoplasmes també contenen un parènquima (les cèl·lules distintives d'un òrgan) i un teixit de suport o estroma. Per a un desenvolupament i una funcionalitat corrents, els teixits requereixen una arquitectura normal on el parènquima i l'estroma operin coordinadament a través d'interaccions recíproques ².

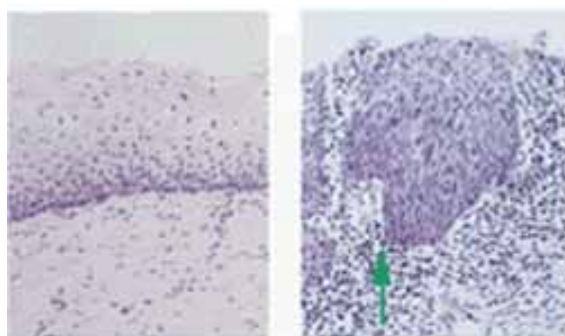


Figura 1- Secció d'un epiteli cervical normal (esquerra) i d'un tumor cervical que comença a ser invasiu (fletxa) (dreta) (Extreta de Biologia Molecular de la Cèl·lula, Alberts, B. et al)

Per això, un dels principals objectius en la investigació del càncer és aclarir els mecanismes d'interacció entre les cèl·lules tumorals i l'estroma que afavoreix la progressió dels tumors.

1.3 Característiques de les cèl·lules canceroses

Les cèl·lules canceroses es caracteritzen per diverses propietats ³⁻⁵(Figura 2) entre les que destaquen les que afecten a la maquinària del cicle cel·lular i és per això que molts gens reguladors d'aquest cicle s'han de considerar protooncogenes o gens supressors de tumors.

Autosuficiència en els senyals de creixement mitògens. Molts dels oncogenes coneguts actuen mimetitzant els senyals de creixement mitògens, necessaris perquè les cèl·lules puguin passar d'un estat quiescent (G_0) a un estat proliferant actiu (G_1), on té lloc la síntesi de tots els components imprescindibles per a la replicació.

Resistència als senyals exògens d'inhibició del creixement. En els teixits normals hi ha molts senyals d'inhibició del creixement que operen per mantenir l'homeòstasi del teixit i la quiescència de les cèl·lules. Aquests senyals actuen de manera que indueixin a passar a un estat de quiescència o bé a un estat postmitòtic, on s'adquireix una diferenciació específica. Les cèl·lules canceroses evadeixen aquests senyals i continuen el seu creixement ⁶.

Capacitat d'evasió dels senyals de mort programada o apoptosi. L'apoptosi és un dels principals mecanismes de mort cel·lular, essencial durant el desenvolupament i per a l'homeòstasi en tots els organismes multicel·lulars. El creixement dels tumors no depèn, doncs, només de l'augment en la fracció de cèl·lules en proliferació, sinó també de la disminució de la fracció de cèl·lules que pateixen la mort cel·lular programada ⁷.

Potencial de replicació il·limitat. La majoria de cèl·lules dels mamífers tenen unes estructures especials, els telòmers, que consisteixen en seqüències repetides de nucleòtids que protegeixen els extrems dels cromosomes. Com a resultat de l'asimetria en la replicació de les cadenes d'ADN, els telòmers s'erosionen contínuament. La replicació cel·lular redueix progressivament la mida dels telòmers fins a una llargària crítica en la qual les cèl·lules paren de dividir-se, de manera que entren en senescència o envelliment cel·lular ⁸, i això provoca la mort de les cèl·lules. A diferència de la majoria de cèl·lules somàtiques, moltes cèl·lules tumorals, amb la finalitat de mantenir un creixement indefinit, no només han d'activar senyals mitogèniques i inhibir l'apoptosi, sinó que també han d'evitar el límit dels seus telòmers i garantir, fins a cert punt, el contingut dels seus cromosomes. Això ho aconsegueixen mitjançant l'expressió de l'enzim telomerasa que fa que puguin mantenir l'ADN

telomèric⁹. L'evolució maligna entre les cèl·lules tumorals, per tant, acaba seleccionant aquelles que han adquirit immortalitat mitjançant mecanismes que restauren l'activitat telomerasa^{10,11}.

Capacitat angiogènica. La mida dels tumors està limitat per l'eficient subministre d'oxigen i nutrients. L'estrès fisiològic que provoca l'anòxia indueix, en tumors incipients, la selecció de cèl·lules que expressen factors proangiogènics¹².

Invasió de teixits i metastasi. La capacitat de les cèl·lules canceroses per envair òrgans llunyans es coneix amb el nom de metastasi i constitueix una de les majors causes de mort per càncer (el 90%)¹³, degut a la gran complicació que n'esdevé l'eradicació. Aquest complex procés implica l'habilitat de les cèl·lules de dissociar-se del tumor primari, d'envair els teixits adjacents i de viatjar a òrgans distals on fundaran noves colònies. Per tot això, cal que aquestes cèl·lules entrin al torrent sanguini o als vasos limfàtics, sobrevisquin el transport, surtin de la circulació i finalment proliferin i formin un tumor secundari. Tret que es compleixin tots els passos de la cascada metastàtica, la metastasi no es desenvoluparà. Aquest procés és molt ineficient i menys d'un 0,1% de les cèl·lules que entren a la circulació formen tumors secundaris detectables clínicament¹⁴.

Guany d'instabilitat genòmica. Totes les capacitats de les cèl·lules canceroses s'adquireixen directament o indirecta a través de canvis en el seu genoma. Aquests processos de mutacions múltiples, que se sap que són presents en els genomes de les cèl·lules tumorals, són molt improbables de trobar al llarg de tota la vida. Així, doncs, les cèl·lules tumorals han d'adquirir un augment de mutabilitat perquè tingui lloc el procés de progressió del tumor. Això s'explica sobretot per la disfunció de certs mecanismes, com són els de reparació de l'ADN i els de detecció d'errors en els punts de control del cicle cel·lular. Aquest sol ser el cas, per tant, dels gens supressors de tumors¹⁵.

Anaplàsia. Els tumors malignes tenen tendència a estar menys diferenciats, ja que perden algunes de les característiques específiques de les cèl·lules normals de les quals s'originen. Això es coneix com a anaplàsia⁵. Aquest procés es deu al fet que, quan una cèl·lula progressa dins el cicle cel·lular, els gens necessaris per a la diferenciació són reprimits. Per tant, l'anaplàsia de molts tumors es deu, en part, a les mutacions responsables de l'activació autònoma del cicle cel·lular.

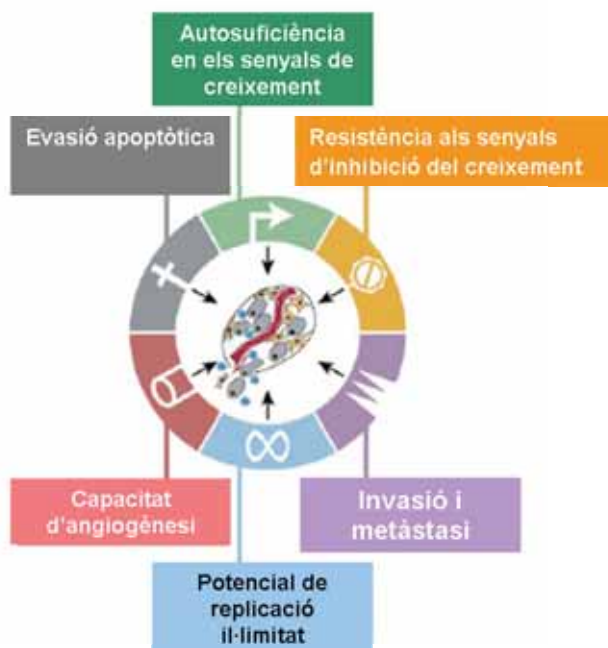


Figura 2.- Capacitats adquirides per les cèl·lules canceroses en la majoria de càncers a través de diferents mutacions (Adaptada de Hanahan, D et al., 2000)

1.4 Classificació i nomenclatura

Els diferents tipus de càncers es classifiquen segons el teixit del qual s'originen. Dins d'aquestes principals categories, hi ha diverses subdivisions en funció del tipus cel·lular específic, la localització dins el cos i l'estructura del tumor. Molts dels noms utilitzats avui dia vénen, però, per tradició i no tenen una base racional moderna.

1.4.1 Els carcinomes

Són càncers procedents de cèl·lules epitelials i inclouen, entre d'altres, el càncer de pell, de boca, de mama, d'estómac, de pròstata, de pulmó i de còlon. Aquests tipus de càncer solen ser els més comuns, amb una freqüència del 90%, i això es deu probablement al fet que l'epiteli és un dels teixits més proliferants del cos i que està exposat amb molta freqüència a diversos danys físics i químics ².

1.4.2 Els sarcomes

Són originaris del teixit connectiu o múscul (teixit mesenquimàtic o mesoderma) i generalment reben el nom del teixit del qual procedeixen. Aquests tipus de càncer afecten gent de totes les edats, però són molt poc freqüents, amb una incidència de

l'1%. Entre els sarcomes de teixit tou, més comuns en adults que en nens, els tumors d'estroma gastrointestinal (GIST) són els més habituals.

1.4.3 Els gliomes

Són tumors del sistema nerviós central (CNS, *central nervous system*) que provenen de les cèl·lules glials. Solen afectar el cervell, però també es poden trobar a la medul·la espinal o en d'altres parts del CNS, com per exemple als nervis òptics. Els gliomes no metastatitzen a través del torrent sanguini, però ho poden fer a través del líquid cèrebrospinal i causar metàstasi a la columna espinal.

1.4.4 Les leucèmies

Són càncers de la sang o de la medul·la òssia i es caracteritzen per la proliferació anormal d'algunes cèl·lules sanguínies, generalment dels leucòcits. Es classifiquen en:

Leucèmies agudes, quan hi ha un gran creixement de les cèl·lules sanguínies immadures. Aquest tipus predomina sobretot en els infants i es divideix en:

- Leucèmies mieloides o mieloblàstiques, quan afecta a les cèl·lules de la medul·la òssia que formen els glòbuls vermells, certs tipus de glòbuls blancs i les plaquetes.
- Leucèmies limfoides o limfoblàstiques, quan afecta a les cèl·lules de la medul·la òssia que formen els limfòcits.

Leucèmies cròniques, si les cèl·lules afectades són relativament madures. Aquestes són més característiques de l'edat adulta i solen ser més lentes i benignes que les agudes. Aquests càncers són una part de l'extens grup de malalties anomenades neoplasmes hematològics.

1.4.5 Els tumors de les línies germinals

Aquests tumors procedeixen de les cèl·lules totipotents i se solen trobar als testicles o als ovaris, en el cas dels adults, i en la columna vertebral, en el cas dels nens.

1.4.6 Els tumors blàstics

S'assemblen al teixit embrionari o immadur i són molt comuns en nens.

1.5 Causes

La majoria dels càncers són causats per alguna mutació del material genètic de les cèl·lules transformades. En un humà, cada gen té una probabilitat de mutació espontània de 10^{-6} vegades durant cada replicació i s'estimen unes 10^{16} divisions cel·lulars durant tota la vida ². Caldria esperar que algunes d'aquestes mutacions alteressin a gens involucrats en la regulació de la divisió cel·lular i que, com a conseqüència, això provoqués desordres en les restriccions de la proliferació cel·lular. Des d'aquest punt de vista, doncs, ens hauríem de preguntar perquè el càncer és tan poc freqüent.

Una simple mutació, però, no és suficient per convertir una cèl·lula sana en cancerosa, ja que si fos així no seriem organismes viables, i hi ha moltes evidències que indiquen que es necessiten alhora múltiples mutacions juntes en una sola cèl·lula perquè es produeixi aquest procés ¹⁶. Estudis epidemiològics sobre la incidència del càncer han determinat que són necessàries entre tres i set mutacions independents, que tinguin lloc a l'atzar i que alhora siguin poc probables perquè una cèl·lula normal es transformi en cancerosa ¹⁷. Totes aquestes mutacions solen afectar sobretot dues categories importants de gens: per una banda, els oncogens i, per l'altra, els gens supressors de tumors.

Quan parlem de nombres baixos de mutacions, fem referència a les leucèmies; en canvi, quan són nombres alts, són carcinomes.

1.5.1 Oncogens

Són gens normals que ocupen posicions reguladores estratègiques que, quan es desregulen, s'expressen inapropiadament, ja sigui en un nivell molt alt o de manera alterada, i promouen el fenotip maligne de les cèl·lules canceroses. Alguns oncogens actuen a través d'hormones que afecten la transducció de senyals de la cèl·lula, mentre que d'altres formen part del mateix sistema de transducció de senyals o dels receptors de les cèl·lules i dels teixits pròpiament dits.

1.5.2 Gens supressors de tumors

Aquests gens, en el seu estat normal, inhibeixen la divisió cel·lular, la supervivència o d'altres propietats de les cèl·lules canceroses. En general, són factors de transcripció que normalment són activats per estrès cel·lular o dany en l'ADN. La seva inhibició es deu a canvis, que tan poden ser mutacions com modificacions epigenètiques, que augmenten la probabilitat de supervivència de les cèl·lules amb

dany genètic, cosa que fa que es promogui el càncer. Un exemple de gen supressor és el p53, que és activat per hipòxia i radiació ultraviolada, entre d'altres. Aquest gen té un paper clau en la regulació del cicle i la divisió cel·lular, així com en l'apoptosi.

1.5.3 Agents carcinògens:

Una de les evidències que demostra que les alteracions en el material genètic i el càncer van unides és la correlació que existeix entre la carcinogènesi (aparició de càncer) i la mutagènesi. Aquesta correlació és clara per a tres classes d'agents anomenats carcinògens.

Els agents carcinògens es defineixen com qualsevol substància o agent físic (radioisòtop o radiació) que està directament implicat/ada en promoure el càncer o en facilitar-ne la propagació. Es caracteritzen per provocar danys en el genoma o disrupcions dels processos metabòlics cel·lulars. No tothom desenvolupa càncer després de l'exposició a un determinat carcinogen; fet que implica l'existència d'interaccions força complexes entre aquests carcinògens i el genoma hoste.

Els agents carcinògens es divideixen en genotòxics i no genotòxics.

1.5.3.1 Genotòxics:

Són aquells agents que causen danys genètics o mutacions irreversibles en l'unir-se a l'ADN i inclouen:

Agents químics: Normalment causen canvis locals en la seqüència de nucleòtids i solen actuar durant la replicació. Entre aquests agents, hi trobem ¹⁸:

- Anàlegs de base, que mimetitzen les bases de l'ADN, com per exemple el 5-BrUracil.
- Agents alquilants, que introdueixen un grup alquil en diferents posicions del genoma. En són un exemple el fum dels cigarrets, els tractaments quimioteràpics i els agents químics industrials.
- Agents intercalants, que provoquen danys o pèrdues de nucleòtids, ja que s'introdueixen entre els parells de bases de l'ADN. El bromur d'etidi i les dioxines són agents d'aquest tipus.

Agents físics: La majoria de radiacions corpusculars, en les quals la radiació es transmet en forma de partícules subatòmiques, es consideren carcinògenes, però la seva malignitat depèn del tipus, l'exposició, la penetració i la capacitat de ionització. En són un exemple les radiacions alfa, beta i de neutró.

En canvi, les radiacions electromagnètiques, en les quals l'energia es propaga en forma d'ona o fotó, no sempre són carcinògenes i depenen de la seva energia. Per

exemple, les de menor freqüència i que són no ionitzants, com les ones de ràdio, les microones o els raigs infraroigs no ho són, però les de major freqüència i ionitzants com els raigs ultraviolats, els raigs X o la radiació gamma generalment es mostren carcinògenes en dosis altes (Figura 14).

Les radiacions provoquen una ionització de l'aigua, cosa que dona lloc als radicals lliures, que són molt reactius, i provoquen, ja sigui de manera directa o indirecta, lesions que normalment són a l'ADN i produeixen alteracions cromosòmiques estructurals.

Agents biològics: És el cas de certs virus oncogènics que introdueixen ADN nou dins del genoma cel·lular i poden, per tant, iniciar carcinogènesi. Aquests virus representen el 10-15% dels casos de càncer detectats als països desenvolupats i el 25% dels casos detectats a l'Àfrica i inclouen tant virus d'ADN com d'ARN. D'altres virus poden provocar una situació d'inflamació crònica en determinats òrgans (p. e. el virus de l'hepatitis) i, per tant, una alta possibilitat de desenvolupar-hi càncer ¹⁹. Alguns paràsits i bacteries també s'han descrit com a cofactors i/o carcinògens ja que causen inflamació que pot produir l'aparició de tumors ^{20,21}.

D'altres modificacions genètiques, que no són causades per cap dels tres tipus d'agents genotòxics, també poden ocórrer per errors adquirits a l'atzar durant la replicació de l'ADN o es poden heretar i, per tant, són presents en totes les cèl·lules des del naixement.

1.5.3.2 No genotòxics:

Són aquells que no interaccionen directament amb l'ADN cel·lular, però actuen promovent el creixement degut a mecanismes d'acció molt diversos. Alguns actuen com a mitògens i estimulen la divisió cel·lular de manera no selectiva (p. e. el diclorodifeniltricloroetà (DDT)); d'altres provoquen mecanismes d'immunosupressió. Dins dels carcinògens no genotòxics s'inclouen algunes hormones i alguns compostos orgànics.

1.6 Factors de risc

Hi ha diferents interpretacions que expliquen l'augment en la incidència del càncer. La primera considera que els contaminants de l'ambient tenen una contribució mínima en les incidències totals d'aquesta malaltia i que els factors de més risc són l'edat i les mutacions en determinats gens. Al contrari, hi ha qui diu que la contribució dels factors exògens de l'ambient és molt més important i que, per tant, l'exposició involuntària als agents físics, químics i/o biològics que envolten cada individu és el que

té un paper més important en l'aparició d'aquesta malaltia ^{22,23}. Aquesta última interpretació és el resultat de l'observació que tant l'ambient com la creixent incidència de càncer han canviat en el mateix període de temps i que l'augment de casos de càncer s'observa en tot el ventall d'edats ²⁴. Ambdues interpretacions, però, són molt importants.

1.6.1 La contaminació ambiental

Substàncies com els biocides i els pesticides, els additius i els contaminants del menjar, els metalls i els metal·loides, les medicines i els cosmètics, els virus i les radiacions són factors de risc que poden ser mutagènics, carcinògens, promotors o cocarcinògens.

1.6.2 L'edat

Aquest és el factor de risc més important en el càncer, ja que dues terceres parts de tots els càncers succeeixen en persones majors de 65 anys. Tot i això, no es pot considerar l'edat un factor de risc exclusiu que contribueixi a la iniciació del càncer, però cal tenir en compte que molts factors ambientals són mutagènics i, per tant, amb l'edat hi ha més temps d'exposició a aquests factors.

1.6.3 El tabac

El fum i el quitrà del tabac, que contenen molts compostos mutàgens i que es defineixen com a carcinògens complets, provoquen el 25-30% de la mortalitat total per càncer als països desenvolupats. El tabac provoca sobretot càncer als pulmons i al tracte aerodigestiu superior.

1.6.4 La dieta

Hi ha estudis que demostren que una dieta rica en calories i greixos animals i pobra en fibra és un factor que fomenta la incidència d'alguns càncers (com per exemple còlon, pròstata, endometri i mama), ja que generen radicals lliures mutagènics. Paral·lelament, una alta ingesta de fruites i vegetals té un efecte protector gràcies als antioxidants naturals. La dieta representa un 3% de la mortalitat per càncer als països occidentals ²⁵.

1.6.5 L'alcohol

No es considera un mutagen per se, sinó que es classifica com a cocarcinogen; és a dir, una molècula que activa o augmenta l'acció d'un carcinogen, tant si és un mutagen com un promotor. Gràcies a la disminució del consum d'alcohol en la població els darrers 20 anys, actualment, se li atribueix una mortalitat per càncer del 4% als països desenvolupats, i encara té més incidència en homes que no pas en dones.

1.6.6 Riscos laborals

Representen entre un 2% i un 10% de tots els càncers. A Europa hi ha, per exemple, uns 32 milions de persones exposades a agents químics carcinògens perillosos a la seva feina.

1.6.7 Obesitat i sedentarisme

Representen un 3% i un 2% de la mortalitat per càncer, respectivament, i poden contribuir a la generació de càncer a través d'una acumulació de carcinògens químics ambientals en el teixit adipós. Així, doncs, l'obesitat s'associa amb alguns càncers i amb l'empijorament de la mortalitat per aquesta malaltia ²⁶.

1.7 Tractaments

L'objectiu principal de totes les teràpies que s'utilitzen actualment per tractar el càncer és el d'extreure el tumor sense danyar la resta del cos. Això, a vegades, es pot fer mitjançant cirurgia, però la capacitat invasora del càncer cap als teixits adjacents i la seva difusió en òrgans distals limita molt aquest mètode. L'ús d'altres mètodes com la quimioteràpia i la radiació està limitat per la toxicitat que provoquen en d'altres teixits del cos ¹⁴. S'escull entre els múltiples tractaments en funció del tipus, la localització i el grau del tumor, així com també de l'estat de la malaltia i del pacient.

Com que quan es parla de càncer es fa referència a tota una classe de malalties, és molt improbable que es trobi una sola manera de fer-hi front.

1.7.1 Cirurgia

L'objectiu d'aquest tractament és el de l'extracció total del tumor si aquest no ha metastatitzat en d'altres llocs del cos abans de la cirurgia. Tot i això, el millor tractament després d'una detecció precoç de tumors sòlids segueix sent la cirurgia.

L'eliminació total del tumor, però, sol ser normalment impossible, ja que fins i tot els tumors més petits localitzats tenen potencial metastàtic; així, doncs, en el 50% dels pacients, l'eliminació quirúrgica dels tumors primaris no és curativa. Si durant la cirurgia es deixa alguna cèl·lula cancerosa, aquesta pot tornar a créixer i això es coneix com a recurrència del càncer.

De totes maneres, tot i que l'objectiu de la cirurgia és l'excisió del tumor, de vegades s'ha d'extreure el mateix òrgan afectat, si això és possible. A més, la cirurgia és necessària per saber l'estat del càncer, si ha metastatitzat cap als nòduls limfàtics propers i l'extensió de la malaltia.

1.7.2 Radioteràpia

Coneguda també com a teràpia amb raigs X o irradiació, la radioteràpia es basa en l'ús de les radiacions ionitzants (com els raigs X o γ) per matar les cèl·lules canceroses i intentar disminuir els tumors. Aquesta radiació fereix i destrueix les cèl·lules en l'àrea tractada, danyant-ne el material genètic i fent que no es puguin ni dividir ni créixer. El dany genètic que sol provocar aquest tipus de radiació és a través dels radicals lliures.

La radiació malmet, però, tant les cèl·lules canceroses com les normals, tot i que amb els últims avanços tecnològics s'ha millorat molt la definició dels volums que es volen irradiar i els efectes d'aquesta teràpia es poden enfocar sobre focus concrets. Tanmateix, les cèl·lules irradiades normals diferenciades es poden recuperar dels efectes i funcionar correctament després de la irradiació, ja que són capaces de reparar el seu ADN, mentre que les cèl·lules canceroses, que generalment estan indiferenciades i es divideixen molt més, tenen una deficiència en l'habilitat de reparar aquests danys subletals. El dany a l'ADN s'hereta a través de les divisions cel·lulars i es va acumulant a les cèl·lules canceroses, de manera que això provoca que morin per apoptosi o bé que es reproduïxin molt més lentament. També pot ser que els danys n'alterin el procés d'apoptosi i, si això passa, s'aconsegueix precisament l'efecte contrari, que és el de més carcinogènesi i malignització.

La radioteràpia es pot fer servir gairebé per a tots els tipus de tumors sòlids, que inclouen els càncers de cervell, mama, cèrvix, laringe, pulmó, pàncrees, pròstata, pell, estómac, úter o alguns sarcomes de teixit tou. També s'utilitza per tractar leucèmies i limfomes. És força útil quan acompanya la cirurgia, ja que ajuda a eliminar les cèl·lules que delimitaven el tumor extret quirúrgicament i que no són susceptibles de ser eliminades mitjançant aquesta tècnica. Una de les majors limitacions de la radioteràpia, però, és que les cèl·lules dels tumors sòlids esdevenen deficientes en

oxigen i, com més hipòxic sigui el tumor, més resistent esdevé a les radiacions, ja que és l'oxigen el que fa que el dany de la radiació sigui permanent a l'ADN.

L'objectiu d'aquesta teràpia, per tant, és danyar tantes cèl·lules canceroses com sigui possible i, alhora, evitar els màxims danys en el teixit circumdant. Per això, es fa el tractament amb moltes fases, cosa que permet que el teixit sa es refaci entre les dosis. La dosi de les radiacions dependrà de factors com la radiosensibilitat de cada tipus de càncer i de si hi ha teixits o òrgans propers que es puguin malmetre durant el procés. Així, doncs, aquesta teràpia no és possible sense efectes col·laterals.

1.7.3 Quimioteràpia

Es basa en la utilització de productes químics citotòxics, també coneguts com agents antineoplàstics, que destrueixen preferentment les cèl·lules canceroses. Normalment, són drogues que afecten les cèl·lules en estat de divisió, interferint en la replicació cel·lular. N'hi ha de dos tipus: els que actuen sobre l'ADN cel·lular i els que actuen sobre els components citoplasmàtics essencials per a la divisió cel·lular. Així, doncs, la quimioteràpia no és només específica de les cèl·lules canceroses, però l'avantatge que tenen les cèl·lules sanes, que es divideixen menys, és que poden reparar el dany al seu ADN, mentre que les canceroses no tenen aquesta habilitat. És per això que els agents quimioterapèutics que s'accepten són aquells que tenen certa especificitat; és a dir, que les dosis emprades suposin més beneficis per a la destrucció de les cèl·lules tumorals que no pas efectes secundaris tòxics sobre les cèl·lules normals. Aquesta alta toxicitat moltes vegades n'impedeix l'ús a les dosis adequades per a la curació, ja que tots els teixits normals que es repliquen molt, com per exemple els precursors hematopoètics de la medul·la òssia i els epitelis, queden molt afectats.

Degut a la freqüent aparició de resistències als fàrmacs, és una bona estratègia utilitzar més d'un fàrmac a la vegada i així també augmentar-ne l'eficàcia i reduir-ne les dosis per tal d'evitar els límits de toxicitat.

La quimioteràpia, igual que la radioteràpia, s'utilitza com a adjuvant abans o després de la cirurgia. En alguns tipus concrets de càncer, s'utilitza com a teràpia primària.

1.7.4 Teràpies dirigides

Es tracta d'utilitzar agents específics per a les proteïnes desregulades de les cèl·lules canceroses. Generalment, són inhibidors de dominis enzimàtics de les proteïnes mutades, sobreexpressades o crítiques a les cèl·lules tumorals ²⁷.

També existeix la teràpia amb anticossos monoclonals on l'agent terapèutic és un anticòs que s'uneix específicament a una proteïna de membrana de la cèl·lula cancerosa. Amb això es pretén activar el sistema immunològic de l'hoste perquè ataquí al tumor. Els anticossos també poden ser radioactius i, per tant, matar a les cèl·lules canceroses ²⁸.

D'altres teràpies inclouen petits pèptids, amb radioisòtops associats, que es poden unir als receptors de superfície o a la matriu extracel·lular afectada del voltant del tumor i matar a la cèl·lula tumoral.

Així mateix, també s'utilitza la teràpia fotodinàmica, on s'utilitzen drogues fotosensibles, no tòxiques, que poden activar-se amb una irradiació i provocar la generació de radicals lliures al passar l'energia de la llum a l'oxigen molecular del teixit que provoca la mort cel·lular. També pot ser que la mort cel·lular es produeixi per danys en els vasos sanguinis o per una resposta immunològica. Aquesta teràpia sol ser útil per eliminar traces de teixits malignes després de la cirurgia de tumors molt grans ²⁹.

1.7.5 Immunoteràpia

Aquesta teràpia inclou una sèrie d'estratègies per tal d'induir el sistema immunològic del mateix pacient perquè actuï contra el tumor. Es pot fer de manera activa o bé passiva ²⁸.

L'activa consisteix en la immunització amb material extret del tumor amb l'objectiu de produir una reacció immunològica capaç d'endarrerir el creixement del tumor o bé d'eliminar-lo. Recentment, s'ha intentat augmentar l'especificitat mitjançant tractaments amb citocines.

La passiva consisteix en la transferència al pacient de cèl·lules o anticossos capaços de mitjançar respostes immunes de manera directa o indirecta. Així, doncs, les vacunes per generar les respostes immunològiques específiques són l'objectiu de molts estudis. Els trasplantaments al·logènics de la medul·la òssia són un exemple d'aquest tipus de teràpia, ja que les cèl·lules immunològiques del donant solen tenir atracció cap al tumor, amb el fenomen que es coneix com efecte de rebuig del tumor per part de l'hoste. Per això, solen ser molt millors els trasplantaments al·logènics que no pas els autòlegs, tot i que els efectes secundaris són molt més severos.

1.7.6 Teràpia hormonal

Algunes hormones, com els estrògens i els andrògens, actuen com a promotors tumorals i augmenten la proliferació de les cèl·lules canceroses en certs tipus de

càncers hormonodependents ³⁰ (com, per exemple, els de pròstata i els de mama) ³¹. Així, doncs, eliminant o inhibint l'acció d'aquestes hormones, bé sigui disminuint els nivells sistèmics d'hormona o bloquejant els receptors d'aquesta l'hormona en les cèl·lules tumorals, es poden aconseguir resultats beneficiosos.

Fins ara, els tractaments antihormonals només tenen efectes transitoris ja que després d'un període d'inhibició, les cèl·lules canceroses es tornen resistents, segurament a causa de mutacions en els receptors hormonals.

1.7.7 Inhibició de l'angiogènesi

L'objectiu és privar el tumor dels vasos sanguinis que necessita per poder viure (rebre oxigen, nutrients, senyals d'altres òrgans, etc.) i metastatitzar-se. S'utilitzen inhibidors naturals de l'angiogènesi o bé agents que inhibeixen la unió dels factors angiogènics als seus receptors en les cèl·lules endotelials.

1.7.8 Nous assajos clínics

L'objectiu d'aquests assajos és obtenir informació de la seguretat i eficiència de nous fàrmacs i noves tècniques (p. e. de cirurgia o de radiació). Aquests assajos només es poden fer quan s'han obtingut resultats satisfactoris de la qualitat del producte, de la seva seguretat en l'àmbit no clínic i amb l'aprovació del comitè ètic de cada país. Per tant, aquests estudis es porten a terme al final d'un llarg procés de recerca, començant al laboratori i passant per l'experimentació animal per acabar veient si són efectius en éssers vius. Se sol començar amb estudis petits amb voluntaris sans o pacients i se segueix amb estudis a gran escala on es compara el nou producte amb el tractament que s'estava portant a terme.

No hi ha cap garantia per al pacient del funcionament d'aquests assajos i també li poden aportar nous riscos.

1.7.9 Teràpia gènica

D'entre totes les estratègies terapèutiques anticanceroses que s'han desenvolupat en els últims anys, s'han de destacar tant la teràpia gènica com la teràpia cel·lular, a les quals s'han dedicat molts esforços. (Vegeu el capítol 2)

2 LA TERÀPIA GÈNICA

La teràpia gènica es defineix com la introducció de material genètic a les cèl·lules d'un pacient amb la intenció d'aconseguir un benefici terapèutic. Generalment, se sol realitzar a les mateixes cèl·lules tumorals, però d'altres vegades també es realitza en cèl·lules del sistema immunològic que es pretén estimular.

El que es transfereix és un o més gens i seqüències reguladores que controlen la seva expressió. Aquesta modalitat terapèutica ha estat possible com a conseqüència del desenvolupament, durant els últims anys, de tècniques molt eficients per la transferència de gens. Aquestes tècniques s'han pogut optimitzar gràcies als avanços en el coneixement dels mecanismes moleculars en el desenvolupament dels tumors i a tot l'ampli estudi sobre vector virals i no virals utilitzats per a la transferència de l'ADN ^{32,33}.

La transferència gènica es pot portar a terme de manera *ex vivo*, quan les cèl·lules extretes del pacient, i que es mantenen en cultiu, reben el material genètic i, posteriorment, són introduïdes de nou al pacient. D'altra banda, també es pot fer una transferència *in vivo*, quan el material genètic s'introdueix directament a les cèl·lules del pacient sense necessitat d'extreure-les. Si se segueix aquesta última estratègia, és difícil aconseguir modificar un nombre suficient de cèl·lules que permeti un benefici terapèutic (Figura 3).

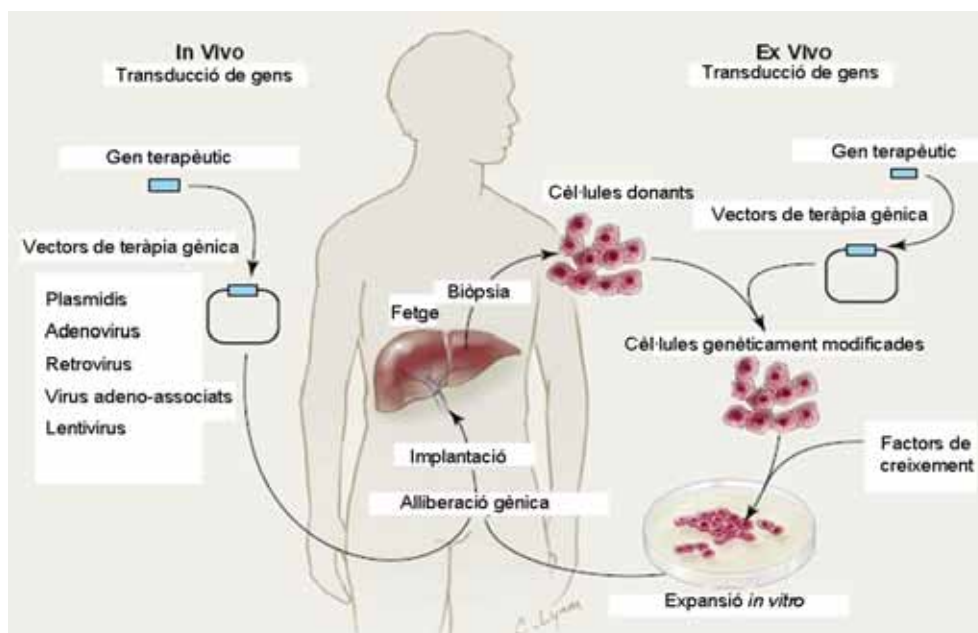


Figura 3- Exemple de teràpia gènica. Aquesta pot ser *ex vivo*, on les cèl·lules (per exemple, del fetsge) són extretes, cultivades, modificades i implantades de nou o *in vivo* quan es fa la transferència gènica directament sobre les cèl·lules d'interès (Adaptada de Kaji, EH. et al. 2001).

2.1 Mètodes d'introducció de gens en les cèl·lules

Tant si la teràpia gènica es realitza de manera *ex vivo* com *in vivo*, cal utilitzar uns vehicles, anomenats **vectors**, que permetin la introducció de gens exògens a les cèl·lules receptores. Per tal que un vector sigui adequat per a la teràpia gènica, ha de presentar una sèrie de característiques ^{34,35}:

- Ha de proporcionar un alt nivell de transducció del teixit desitjat o de la població cel·lular diana.
- Ha de permetre la incorporació i, a ser possible, l'expressió regulada dels gens necessaris durant un temps convenient.
- Ha de ser específic pel tipus cel·lular diana.
- No ha de ser reconegut pel sistema immunològic.
- No ha d'induir una resposta inflamatòria.
- Ha de ser estable i de fàcil obtenció.
- No ha de ser oncogènic.

Es poden utilitzar tant vectors virals com no virals per a la introducció del material genètic a les cèl·lules. Aquesta introducció pot ser, a la vegada, que sigui només d'expressió transitòria o permanent.

2.1.1 Vectors no virals

La manera més simple d'alliberar l'ADN és mitjançant un plasmidi d'ADN amb promotors d'expressió eucariòtics. Per augmentar l'eficiència de transfecció, s'utilitzen diferents mètodes químics i físics.

2.1.1.1 Mètodes químics

Aquests mètodes es basen en la formació de complexos d'ADN amb diferents substàncies com per exemple liposomes; vesícules formades per monocapes o bicapes de fosfolípids -l'interior de les quals es pot omplir amb drogues o ADN-, conjugats sintètics associats a receptors o el fosfat càlcic que fan que l'ADN precipiti formant un complex que li permet l'entrada a la cèl·lula. Aquests processos es coneixen com a lipofecció, transferència dirigida per receptors o transfecció, respectivament ³⁶. Un problema associat a aquests mètodes es la possible degradació de l'ADN als endosomes abans d'arribar al nucli.

2.1.1.2 Mètodes físics

Entre aquests mètodes trobem l'electroporació, que consisteix en l'ús de corrents elèctrics amb la finalitat de generar, transitòriament, porus a la membrana cel·lular per els quals s'introdueixen els complexos d'ADN, i la biolística, que es basa en l'injecció de projectils que consisteixen en partícules d'un metall pesat recobertes d'ADN.

Aquests mètodes, tot i que eviten la resposta immunològica, tenen un rendiment amb molt baixa eficiència, ja que no són els millors sistemes d'entrada de material a la cèl·lula, i perquè l'ADN no està protegit i es degrada molt fàcilment.

2.1.2 Vectors virals

Els virus són capaços d'evitar moltes barreres en el procés d'introducció d'ADN foraster en el genoma cel·lular, i és per això, que són vehicles ideals molt utilitzats per a la teràpia gènica.

Aquesta estratègia consisteix en substituir gens vírics necessaris per a la seva replicació per gens amb utilitat terapèutica. Com que aquests virus modificats no poden produir noves partícules per ells mateixos, s'han creat línies cel·lulars de cèl·lules empaquetadores que expressen les proteïnes necessàries per a la seva replicació i al seu empaquetament en partícules víriques. La introducció del genoma viral modificat dins de les cèl·lules empaquetadores té com a resultat la producció de partícules de virus capaces d'infectar qualsevol cèl·lula desitjada, però incapaç de replicar-se.

Hi ha molts tipus de vectors virals entre els quals trobem:

Els retrovirus. Són virus d'ARN de doble cadena que poden integrar-se dins del genoma de l'hoste i, per tant, són molt apropiats quan es necessita una expressió prolongada del gen foraster. El màxim inconvenient és la integració accidental i a l'atzar en els cromosomes hostes, que pot provocar efectes no desitjats, com l'activació de certs protooncogens o la supressió d'alguns gens supressors. Així mateix, aquests vectors necessiten que la cèl·lula estigui en divisió per tal de poder integrar-se.

Els adenovirus. Són virus d'ADN de doble cadena sense envolta que poden transferir una gran quantitat del gen d'interès a les cèl·lules desitjades. Aquests virus no s'integren en el genoma de l'hoste i això fa que siguin efectius per a una transfecció de poca durada, però amb molta expressió. Poden infectar tant cèl·lules en divisió com quiescents, però solen produir una reacció immune que pot ser perillosa, cosa que en limita la utilitat.

Els vectors adenoassociats. Són virus d'ADN que es poden integrar al genoma de l'hoste i infecten cèl·lules quiescents o en divisió. Aquests virus infecten amb molta eficàcia i de manera estable. Tanmateix, tenen molt poca capacitat d'introduir ADN exogen i, a més, són difícils de produir.

Els virus pox. Són virus d'ADN que es repliquen en el citoplasma i tenen l'avantatge que són fàcils d'aïllar i construir.

Els herpesvirus. Són virus d'ADN que poden infectar cèl·lules quiescents i empaquetar gran quantitat d'ADN, tot i que provoquen citotoxicitat i la seva expressió és transitòria.

Vectors VIH-1. Són una subclasse dels retrovirus que s'anomenen **lentivirus** i tenen la capacitat d'infectar tant cèl·lules en divisió com quiescents. (Vegeu apartat 2.1.2.1 Els lentivirus)

Vectors vírics modificats. Hi ha molt d'interès en el desenvolupament de vectors virals modificats que transfectin, o s'expressin, només a les cèl·lules tumorals. En general, aquest objectiu es pot aconseguir mitjançant la transducció o la transcripció, ja sigui potenciant l'infectabilitat de les cèl·lules tumorals o utilitzant promotors d'expressió específica en les cèl·lules d'interès.

En la Taula 3 es resumeixen els aspectes més importants dels diferents virus:

Tipus de virus	Avantatges	Inconvenients	Capacitat
Retrovirus	Expressió estable.	No infecten cèl·lules quiescents.	Fins a 8 kb
Adenovirus	Elevada eficiència, infecten cèl·lules quiescents.	Tenen expressió transitòria i provoquen resposta immunitària.	Fins a 35 kb
Adenoassociats	Infecten cèl·lules quiescents i són molt estables.	Poca capacitat per l'ADN exogen i producció ineficaç.	Fins a 4,8 kb
Herpesvirus	Poden infectar les cèl·lules quiescents.	Citotoxicitat produïda pel vector i expressió transitòria.	Fins a 150 kb
Lentivirus (HIV-1)	Infecten tot tipus de cèl·lules.	L'eficiència d'empaquetament és inversament proporcional a la mida de l'insert.	Fins a 12kb

Taula 3- Avantatges, inconvenients i capacitat dels diferents tipus de vectors virals utilitzats en teràpia gènica.

2.1.2.1 Els lentivirus

Els lentivirus són un grup de la família dels *retroviridae* entre els quals s'inclou el del VIH (virus de la immunodeficiència humana). Són capaços de travessar la membrana nuclear abans d'integrar-se al genoma de l'hoste i, per aquesta raó, tenen la capacitat d'infectar les cèl·lules que no es divideixen³⁷. La seva habilitat d'integrar-se al genoma fa que els gens exògens no es perdin durant la divisió cel·lular. Aquests virus copien el seu genoma d'ARN en un d'ADN intermediari gràcies a un enzim víric

anomenat transcriptasa reversa (RT). Aquest ADN és translocat al nucli mitjançant el complex del porus nuclear (NPC) i és integrat en el genoma, el qual rep el nom de provirus. Seguidament, aquest es transcriu i es tradueix, de manera que s'expressen les proteïnes víriques (Figura 4).

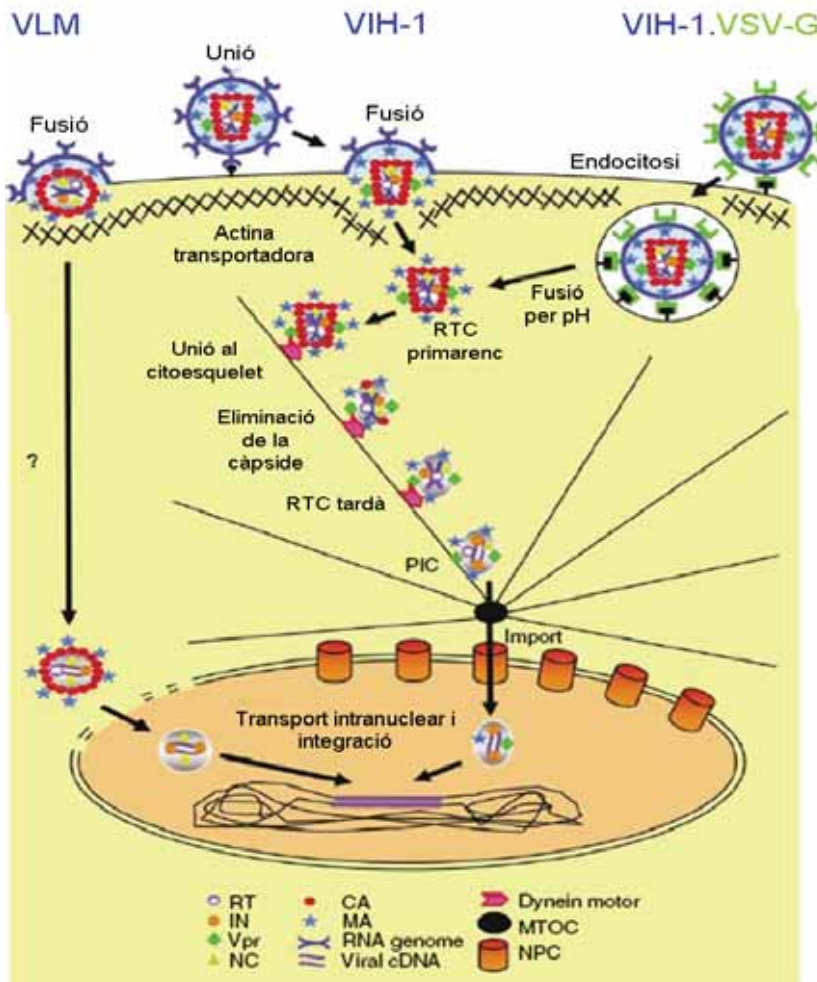


Figura 4- Exemples d'integració al genoma del MLV (virus de la leucèmia murina), del VIH-1 i del VIH-1 modificat amb la proteïna dependent de pH, VSV-G. Primer hi ha una unió i una fusió a la membrana o endocitosi per part del VIH-1.VSV-G. Tant per al VIH com per al VIH-1.VSV-G es forma un complex de transcripció reversa (RTC) que s'uneix al citoesquelet a través dels motors de dineïna i es mouen al llarg dels microtúbuls fins al nucli, on el complex de preintegració (PIC) és importat dins del nucli a través dels NPC, i s'integra dins del genoma. En el cas del VLM, l'RTC es manté fins al nucli amb la càpsida. Aquesta càpsida es disgrega en arribar al nucli, on podrà entrar durant la mitosi, quan hi ha una dissolució temporal de l'envolta nuclear i és, per tant, quan es pot integrar l'ADN en el genoma. (Adaptada d'Anderson, JL et al. 2005)

A més, els lentivirus també tenen la capacitat de limitar el reconeixement per part del sistema immunològic i permeten unes infeccions llargues en l'hoste ³⁸⁻⁴¹.

2.1.2.1.1 Vectors derivats del VIH per a la teràpia gènica ⁴²:

Els vectors derivats del VIH més primerencs no s'entenen com un vehicle per alliberar gens, sinó com a eines per a l'estudi de la biologia del VIH. Consistien en els genomes virals gairebé intactes (Figura 5) amb poques deletions en el gen *env* (que codifica per la glicoproteïna de superfície i la proteïna transmembrana del virió) i amb la inserció de gens reporters en lloc seu. El gen *env* era introduït amb un plasmidi separat. La titulació d'aquests virus era molt baixa i hi havia un alt risc de producció de partícules competents per a la replicació.

Degut a l'interès de la utilització de vectors derivats del VIH per a la teràpia gènica s'han desenvolupat nous vectors més segurs.

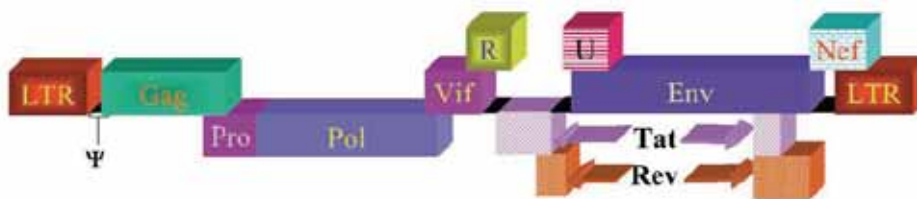


Figura 5- Organització genòmica del VIH. A partir d'aquesta estructura bàsica es van fer deletions per obtenir les diferents generacions de vectors (Daly, G. et al., 2000).

Primera generació

La primera generació de vectors lentivírics per a l'alliberació de gens implicava un sistema d'expressió de tres plasmidis^{43,44}. Amb això es va aconseguir que fos molt improbable que hi hagués una recombinació i es produïssin partícules competents per a la replicació (Figura 6). Constava de:

Una construcció empaquetadora, amb múltiples atenuacions del provirus del VIH per tal d'eliminar les seqüències d'actuació en *cis* imprescindibles per a l'empaquetament, la transcripció reversa i la integració dels transcrits derivats del plasmidi d'empaquetament.

Una construcció d'envolta, on el gen *VSV-G* (*G glycoprotein of vesicular stomatitis virus*) podia estar expressat a partir del promotor del citomegalovirus (CMV) o a partir de la repetició terminal llarga (LTR, *long terminal repeat*) del virus de la leucèmia murina (MLV, *Murine Leukemia Virus*). La proteïna VSV-G de l'envolta confereix una alta estabilitat a les partícules, i permet que es puguin emmagatzemar durant períodes llargs i que es puguin concentrar per ultracentrifugació. A més, la VSV-G s'uneix a fosfolípids de la membrana cel·lular i permet que els virus entrin amb més facilitat.

Una construcció de transferència, que conté les seqüències d'activació en *cis* del VIH necessàries per a l'empaquetament, la transcripció reversa i la integració del genoma víric. Aquestes seqüències són el senyal d'empaquetament, la regió 5' del gen *gag* (de **grup específic antigen** i que codifica per les proteïnes estructurals internes del virus ja siguin de la matriu, de la càpside o de la nucleocàpside) i el fragment derivat d'*env* que inclou l'element de resposta *rev* (RRE) -que regula el transport de l'ARN i l'empalmament- entre els LTR virals. Aquests fragments que inclou l'RRE se sap que potencien el procés d'empaquetament. A més, té llocs únics de restricció que permet la clonació d'ADN heterogeni.

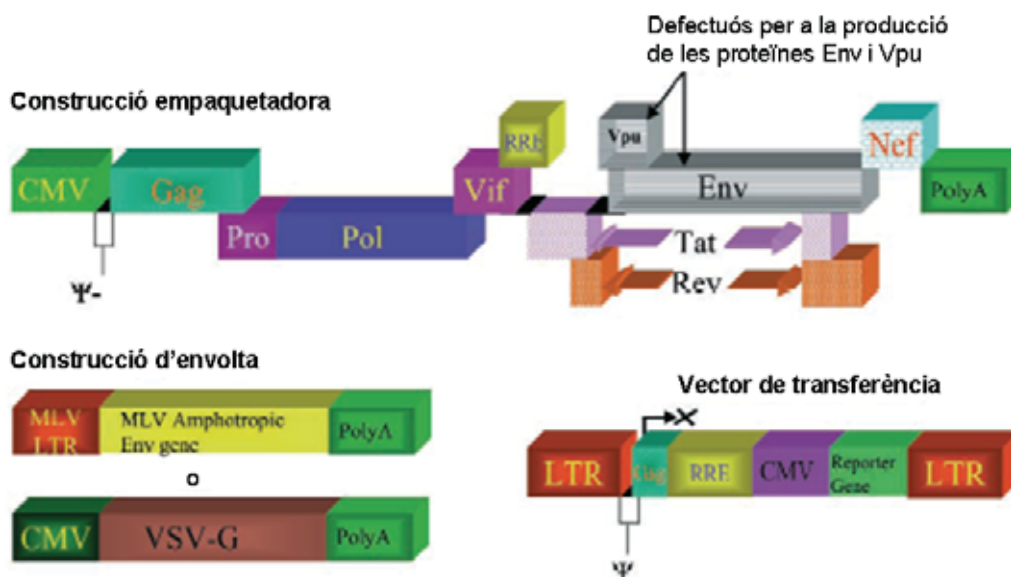


Figura 6- Construcció empaquetadora, construcció d'envolta i vector de transferència de la primera generació de vectors virals per a la teràpia gènica. Els gens deletats es mostren de color gris. (Adaptada de Daly, G. et al., 2000)

Segona generació

En la segona generació de vectors lentivírics es va demostrar que la majoria de gens *-vif* (que afecta l'infectivitat de les partícules víriques), *vpu* (que codifica per les proteïnes de membrana integrals, promocionant l'alliberació dels virions), *vpr* (encarregat de la localització nuclear) i *nef* (que facilita l'infecció en les cèl·lules quiescent, augmentant l'infectivitat dels virions)- de la construcció empaquetadora eren prescindibles i que el gen *gag* era suficient perquè es produís aquest procés ⁴⁵.

Tercera generació

En aquesta generació ⁴⁶ es partia del canvis de les anteriors, però es va mutar el gen *tat* (que activa la transcripció), veient que aquest era també dispensable, i es va substituir el 5'LTR amb un promotor activament constitutiu. A més, el gen *rev* s'expressava des d'un plasmidi diferent, amb la qual cosa es convertia així en un sistema d'expressió de quatre plasmidis. En aquesta generació quedaven, doncs, només tres dels nou gens presents en el genoma del virus parental: *gag*, *pol* (que codifica pels enzims de transcripció reversa -RT- que conté l'ADN polimerasa amb activitats associades ARNasa H i la integrasa) i *rev*. Tot això eliminava la possibilitat que un virus natiu es pogués reconstituir a través de la recombinació.

Vectors SIN

A partir d'aquests coneixements, es va millorar el sistema, eliminant del vector els elements transcripcionals del VIH, i es van crear els vectors autoinactivadors (SIN, *self-inactivating*), en els quals s'introduïa una delecció en la regió U3 del 3'LTR de

l'ADN utilitzat per produir el vector d'ARN. Durant la transcripció reversa, aquesta deleció es transfereix al 5'LTR de l'ADN províric, i amb això s'aconsegueix que les seqüències localitzades adjacents al lloc d'integració del vector no s'expressin de manera aberrant, ja sigui per culpa de l'activitat del promotor del 3'LTR o a través d'un efecte potenciador. Amb aquests vectors SIN, també s'evita una interferència transcripcional entre l'LTR i el promotor intern que condueix l'expressió del transgèn.

Els vector derivats del VIH toleren grans delecions de la regió U3 i, fins i tot, una eliminació total del promotor viral sense que hi hagi cap pèrdua en la seva funcionalitat ⁴⁷⁻⁵¹. També es va demostrar que aquests vectors podien produir fins al doble de titulació que els vectors dels quals derivaven ⁵². Els vectors SIN, doncs, són els més segurs pels requeriments de les aplicacions clíniques ⁵³.

2.1.2.1.2 Producció de partícules víriques

Les partícules víriques s'obtenen mitjançant una transfecció transitòria de les diferents construccions a la línia cel·lular humana embrionària de ronyó (HEK) 293T. Aquesta línia cel·lular és una sublínea de les cèl·lules 293 transformades amb adenovirus i que contenen l'antigen del *simian virus early enhancer promoter* (SV40 *large T*), que permet una replicació episomal dels plasmidis amb l'origen de replicació i el promotor primarenc SV40 ^{54,55}. Aquesta línia es caracteritza per tenir molta facilitat per ser transfectada i això permet l'obtenció d'uns títols vírics molt alts. La producció òptima de les partícules víriques es entre les 48-72 hores després de la transfecció i se solen concentrar mitjançant ultracentrifugació. Alguns factors que poden afectar la producció són la mida de la càrrega genètica i el tipus d'envolta que s'utilitza ⁵⁶.

2.1.2.1.3 Bioseguretat

La bioseguretat del vectors lentivírics és de gran importància quan s'utilitzen com a eines per a l'alliberació de gens *in vivo*. Les màximes preocupacions en aquest camp són els errors en el procés de la transducció i les mobilitzacions del vector o d'elements del VIH a d'altres cèl·lules, la mutagènesi per inserció i la transmissió a la línia germinal.

S'ha treballat en el disseny de vectors virals amb elements que després de la integració produeixin els mínims canvis de regulació. Aquests vectors cal que siguin vectors SIN, que tinguin separadors a cada extrem del vector per neutralitzar l'efecte dels elements dels promotors del vector sobre els elements cromosòmics pròxims ⁵⁷ i que incloguin regions d'ancoratge esquelet/matriu per tal de dirigir els elements potenciadors cap al corresponent promotor ⁵⁸.

Els vectors lentivírics s'han utilitzat molt àmpliament per a l'expressió de transgens^{53,59}.

2.2 Estratègies de la teràpia gènica anticancerosa

S'han descrit múltiples estratègies de teràpia gènica anticancerosa³²:

- La destrucció de les cèl·lules tumorals mitjançant l'expressió de gens amb productes tòxics, o que siguin capaços d'activar drogues que ho siguin. Aquests gens es denominen gens suïcides.
- L'estimulació de la resposta immunològica contra el tumor, potenciant els mecanismes del sistema immunològic o modificant les cèl·lules canceroses per fer-les més immunogèniques o més susceptibles a la seva destrucció.
- La reversió dels fenotips de les cèl·lules canceroses, inhibint l'expressió d'oncogens o augmentant la dels gens supressors de tumors.
- L'expressió de molècules que afecten l'angiogènesi, la invasió tumoral i la metastasi.
- L'augment de la sensibilitat de les cèl·lules canceroses a la quimioteràpia i a la radioteràpia.
- L'augment de la protecció de les cèl·lules mesenquimàtiques dels efectes de la quimioteràpia o radioteràpia.

2.2.1 Teràpia gènica citotòxica

Consisteix en l'ús de gens que codifiquen per proteïnes que causen la mort directament, **gens tòxics**, o bé gens que codifiquen per enzims que no són tòxics *per se*, però que catalitzen la conversió d'una prodroga no tòxica en un agent citotòxic, i que s'anomenen **gens suïcides**⁶⁰.

Aquests gens es poden introduir en vehicles cel·lulars, capaços d'alliberar el producte tòxic a l'entorn o bé directament a les cèl·lules que es volen tractar. En una teràpia antitumoral, els vehicles cel·lulars modificats genèticament s'injecten dins o a prop del tumor diana, o bé el gen suïcida s'introdueix directament a les cèl·lules canceroses.

2.2.1.1 Avantatges de la teràpia citotòxica

La teràpia citotòxica confereix molts avantatges a la quimioteràpia clàssica per diversos motius:

- Les prodrogues utilitzades no tenen cap efecte en les cèl·lules humanes que no han estat modificades.
- La localització de l'agent citotòxic en les cèl·lules tumorals evita el tractament sistèmic i permet que les concentracions de l'agent tòxic en els tumors puguin ser molt superiors que en d'altres òrgans.
- Les combinacions de gen/prodroga poden ser específiques de certs tumors.
- L'ús d'aquestes combinacions permet el transport intercel·lular del producte gènic o de la droga activada, cosa que provoca la mort addicional de les cèl·lules veïnes. Aquest fenomen s'anomena efecte adjacent (*bystander*).

Així, doncs, per una combinació idònia de gen/prodroga calen diferents propietats tant del gen com de la prodroga.

2.2.1.1.1 Propietats desitjables del gen suïcida

Les propietats que han de tenir els gens en aquesta combinació són les següents:

- Absència d'aquest gen en el genoma humà o expressió a més baixos nivells en òrgans sans, per a minimitzar la toxicitat.
- Exhibició d'una gran activitat catalítica una vegada expressats en els tumors, fet que permeti que la concentració de la prodroga sigui baixa.
- Que sigui necessari i suficient per l'activació total de la prodroga.
- Que sigui monomèric i permeti, així, una fàcil modificació i posterior utilització dels vectors d'expressió.

2.2.1.1.2 Propietats desitjables de la prodroga.

La prodroga que combina amb el gen ha de tenir les següents característiques:

- Una gran afinitat amb l'enzim suïcida i molt baixa amb els enzims endògens.
- Habilitat per penetrar en els tumors sòlids i en les cèl·lules tumorals.
- No ha de presentar toxicitat abans de la seva activació.
- La forma tòxica ha de ser capaç de difondre's, cosa que permet l'efecte adjacent.
- Ha de tenir una vida mitjana prou llarga per maximitzar l'efecte adjacent, però sense causar toxicitat.
- La seva acció ha de ser independent de la fase del cicle cel·lular.

Així, doncs, actualment, encara és difícil trobar una combinació perfecte de gen/prodroga per a la teràpia gènica citotòxica.

2.2.2 Tipus de gens suïcides

Hi ha molts tipus de gens suïcides que, en combinació amb les seves prodrogues, es poden utilitzar per a aquest tipus de teràpia. Les més utilitzades es troben resumides a la següent taula (Taula 4).

Enzim	Origen	Prodroga	Droga alliberada	Comentaris
Timidina Quinasa	<i>Herpes simplex virus (HSV)</i> , <i>Equine herpes virus (EHV)</i>	Aciclovir (ACV), Ganciclovir (GCV)	Formes trifosforilades	Efecte adjacent per contacte cel·lular
Timidina Quinasa	<i>Varicella zoster virus (VZV)</i>	6-metaloixipurina arabinosida (ara-M), 5-(2-bromovinil)-2'-desoxiuridina (BVDU)	Formes monofosforilades	Efecte adjacent
Citosina desaminasa	<i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i>	5-fluorocitosina (5-FC)	5-fluorouracil (5-FU)	Efecte adjacent, no necessita contacte cel·lular
Citocrom P450	Rata, humana, conill	Ciclofosfamida (CPA), ifosfamida (IFO)	Formes hidrogenades	Efecte adjacent, no necessita contacte cel·lular
Nitroreductasa	<i>E. coli</i>	CB1954	N-acetoxi derivats	Efecte adjacent, no necessita contacte cel·lular
Fosforilasa del nucleòsid purina	<i>E. coli</i>	6-metilpurina-2-desoxiribosa (MeP-dR), Arabinofuranosil-2-fluororadenina monofosfat (F-araA)	6-metilpurina (MeP), 2-fluoroadenina (F-Ade)	Efecte adjacent, no necessita contacte cel·lular
Carboxipeptidasa A1	Humana, rata	Pèptids metotrexats	Metotrexat	Efecte adjacent, no necessita contacte cel·lular
Transferasa uracil fosforibosil (UPRT)	<i>E. coli</i> , <i>S. cerevisiae</i>	5-FU	5-fluorodesoxiuridina (5-FdUMP)	Efecte adjacent per contacte cel·lular
Xantina-guanina fosforibosiltransferasa (XGPT)	<i>E. coli</i>	6-Tiopurines (6-TX, 6-TG)	Nucleòsid 6-Tiopurina	Efecte adjacent present, permet selecció positiva
Nucleòtid pirimidina fosforilasa (PyNPase)	Humana	5-desoxi-5-fluorouridina (5-DFUR)	5-FU	Efecte adjacent, no necessita contacte cel·lular
Beta-glucuronidasa	<i>E. coli</i> , humana, ratolí	prodroga doxorubicina auto-immolativa	Doxorubicina	Efecte adjacent, no necessita contacte cel·lular
Carboxilesterasa (CE)	Humana, conill	Irinotecan, Capecitabine, Paclitaxel-2-etilcarbonat	SN-38, 5-FU, Paclitaxel	
Beta-galactosidasa	<i>E. coli</i>	Prodrogues auto-immolatives dels antibiòtics antraciclina (Daun02)	Antibiòtics antraciclina (daunomycin)	
Beta-lactamasa	<i>E. coli</i>	Prodrogues auto-immolatives del cephem	Agents alquilants, alcaloides, vinca, antibiòtics	

Taula 4- Tipus de gens suïcides, amb el seu corresponent origen, prodroga que l'acompanya, la droga alliberada i les altres característiques. (Adaptada de Portsmouth, D. 2007)

D'entre tots aquests gens suïcides, un dels més utilitzats per a la teràpia citotòxica és el de la timidina quinasa.

2.2.3 La timidina quinasa

La timidina quinasa (TK) és una proteïna present en la majoria de cèl·lules vives que es troba de dues maneres diferents a les cèl·lules dels mamífers; la TKI, que es troba en forma soluble, i la TKII, que es troba a les mitocondries. Té un paper clau en la síntesi de l'ADN i, per tant, en la divisió cel·lular, ja que forma part de la única reacció per fosforilar la timidina abans d'introduir-la a la cadena d'ADN naixent. Normalment, la timidina es troba present en els fluids corporals y s'obté a través de la ingesta d'aliments. Aquesta fosfotransferasa catalitza la següent reacció:



Tot i que la TK eucariòtica és molt restrictiva amb els substrats que pot fosforilar, la TK del virus *herpes simplex* (HSVTK) té una especificitat catalítica molt més relaxada, fet que fa que exhibeixi unes 1000 vegades més eficiència en el procés de fosforilació del ganciclovir (GCV) ⁶¹, un anàleg sintètic del nucleòtid 2'-desoxiguanosina, que és el pas limitant en la conversió d'aquesta prodroga cap als seus metabòlits citotòxics. Un cop fosforilat, el GCV passa a la seva forma més activa (di i trifosfat) mitjançant les quinases endògenes. L'efecte d'aquests metabòlits tòxics és inhibir les polimerases de l'ADN de la cèl·lula i competir amb la desoxiguanosina trifosfat (dGTP) per a la incorporació en l'ADN naixent durant la divisió cel·lular (Figura 7). D'aquesta manera, doncs, només les cèl·lules que tinguin la HSVTK són susceptibles a aquesta prodroga.



Figura 7- El GCV trifosforilat competeix amb la desoxiguanosina i s'incorpora en l'ADN naixent. Les bases nitrogenades que conformen l'ADN es troben representades: adenina (A) en rosa, citosina (C) en taronja, timina (T) en verd i guanina (G) en vermell.

Totes aquestes propietats proveeixen la base tant per al desenvolupament de teràpies antiherpètiques com per a l'aplicació de l'HSVTK com a gen suïcida en la teràpia gènica anticancerosa.

Un dels inconvenients de la TK com a gen suïcida és que la forma tòxica del GCV (trifosfat) està molt carregada i, per tant, és bastant insoluble als lípids de membrana. Això vol dir que no té una gran facilitat per difondre's fora de la cèl·lula ni cap a les cèl·lules veïnes per produir el seu efecte tòxic. Tot i això, s'ha observat un efecte adjacent quan s'utilitza la combinació HSVTK/GCV.

Per tal d'intentar millorar la sensibilitat de la HSVTK, s'han fet molts estudis que inclouen tant la identificació de nous substrats amb més eficiència com la modificació de l'enzim per un substrat determinat. Mitjançant mutacions del gen HSVTK s'han aconseguit mutants amb una especificitat major per al GCV, de manera que s'augmenta la mort cel·lular entre 20 i 43 vegades sense que es produeixi un increment de la toxicitat. N'és un exemple el mutant SR39 de la HSVTK, el qual té més habilitat per passar de la prodroga a l'agent citotòxic, ja que s'ha demostrat la seva capacitat de prevenir el creixement del tumor quan s'administra GCV a una concentració 10 vegades inferior a la normal (5mg/kg)⁶²⁻⁶⁵. Aquest mateix mutant, amb el senyal de localització nuclear truncat (tTK), presenta una major localització en el citoplasma i, com a conseqüència, també una major activitat⁶⁶.

2.2.4 L'efecte adjacent (o *bystander*).

Aquest efecte s'ha observat gràcies al fet que les cèl·lules que expressen un gen citotòxic són capaces de causar la mort de les cèl·lules veïnes (Figura 8). En el cas de la HSVTK, perquè això tingui lloc, cal el contacte entre cèl·lules i, per tant, han sorgit moltes hipòtesis de com té lloc aquest fenomen.

S'ha descrit que pot ocórrer mitjançant les unions gap^{67,68}, que són unions entre els citoplasmes de certs tipus cel·lulars que permet el pas lliure de molècules i ions entre cèl·lules. El diàmetre d'aquestes unions (2 nm) és teòricament suficient per permetre el pas del GCV fosforilat des del citoplasma de la cèl·lula que expressa HSVTK al de la que no l'expressa.

També hi ha hipòtesis que expliquen aquest efecte mitjançant vesícules apoptòtiques que continguin el GCV fosforilat o bé el mateix enzim HSVTK⁶⁹ i que siguin fagocitades per les cèl·lules veïnes^{70,71}, on més fosforilacions tindran lloc pels enzims cel·lulars endògens.

Altres estudis demostren que pot ser que aquest efecte es produeixi per la transferència d'hidrolases o d'enzims similars que potenciïn l'apoptosi, així com també

per l'efecte del sistema immunològic de l'hoste que tingui un paper mediador en l'efecte adjacent a través de l'alliberació de citocines ^{72,73}

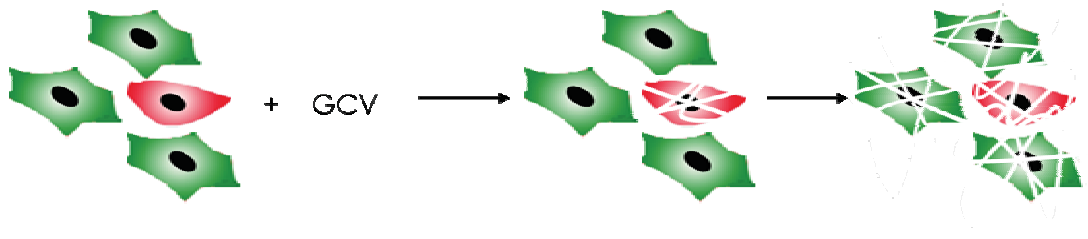


Figura 8- Esquema de l'efecte Adjacent. Una cèl·lula (vermella) que expressa un gen suïcida es mor quan s'administra la prodroga (GCV). Gràcies a això i a causa de l'alliberació dels productes de la lisi cel·lular al medi o al fet que l'enzim que fosforila la prodroga passa a les cèl·lules veïnes (verdes), aquestes també moren.

3 TERÀPIA BASADA EN VEHICLES CEL·LULARS

Les cèl·lules dels mamífers també s'han emprat com a vehicles per a l'alliberació de gens. Aquestes cèl·lules tenen un gran potencial ja que, a diferència dels virus, poden sobrepassar les barreres fisiològiques perquè, en el cas de les cèl·lules autòlogues, no són detectades i degradades pel sistema immunològic i la seva utilització no provoca la toxicitat deguda a les altes dosis dels vectors. La transferència de les cèl·lules genèticament modificades al cos representa una nova proposta de vector per a l'alliberació de gens que venç molts dels inconvenients dels vectors viral i no virals i que aparella la teràpia cel·lular amb l'alliberació de gens ^{35,74,75}.

Les cèl·lules emprades per a la teràpia cel·lular poden presentar certs tropismes que fan que es localitzin en determinats teixits o òrgans i poden arribar a regions força inaccessibles per a altres mitjans de transferència gènica, com per exemple els llocs on s'han desenvolupat els tumors.

S'han emprat diversos tipus cel·lulars somàtics, com per exemple els fibroblasts, hepatòcits, cèl·lules del mesoteli, mioblasts, cèl·lules neuronals i endotelials. La seva dificultat, tant per a l'aïllament com per a l'expansió *in vitro*, és la limitació més important a l'hora d'utilitzar aquestes cèl·lules madures diferenciades. Les cèl·lules hematopoètiques totipotents també s'han utilitzat, però la seva baixa transducció en limita l'ús.

Pel que fa al càncer, les primeres cèl·lules que s'utilitzaren van ser els limfòcits infiltrants en tumors, els quals modificats genèticament, s'utilitzaren en assajos clínics en teràpia gènica humana anticancerosa. Tot i això, aquestes cèl·lules es localitzaven molt poc en tumors després de la reinjecció, i requerien una expansió molt costosa *in vitro*. Això va fer que hi hagués la necessitat de trobar diferents tipus cel·lulars alternatius que fossin útils com a vectors per a l'alliberació gènica, entre els quals trobem les cèl·lules humanes mesenquimàtiques.

3.1 Les cèl·lules mesenquimàtiques (MSC)

Entre les cèl·lules mare humanes, que es defineixen com a cèl·lules que tenen l'habilitat d'autorenovar-se i de diferenciar-se en un rang de cèl·lules especialitzades (potencial multilínia), podem trobar les embrionàries i les adultes.

Les cèl·lules mare embrionàries, que provenen de la massa cel·lular interna del blastocist, tenen un gran potencial com a cèl·lules troncales. Tot i això, són difícils de cultivar, es diferencien espontàniament, tenen una elevada tendència a patir canvis cromosòmics *in vivo* ^{76,77} i el seu ús comporta seriosos problemes ètics i polítics.

Les cèl·lules mare adultes es troben en la majoria de teixits i òrgans de l'organisme i actuen com un sistema de reparació del cos, substituint les cèl·lules especialitzades i, alhora, mantenint el procés de regeneració dels òrgans, com la sang, la pell o els teixits intestinals ⁷⁸. La majoria de les cèl·lules mare adultes són restringides a llinatge i, per tant, són multipotents i no totipotents. Entre les cèl·lules mare adultes més utilitzades per a la teràpia cel·lular trobem les de la medul·la òssia i les del teixit adipós.

3.1.1 Cèl·lules mesenquimàtiques de la medul·la òssia (BMSC)

A la medul·la òssia humana trobem dos tipus de poblacions de cèl·lules mare adultes ⁷⁹: per una banda, hi ha les cèl·lules mare hematopoètiques, responsables del manteniment de la producció de les cèl·lules sanguínies al llarg de la vida; per altra banda, trobem les cèl·lules mesenquimàtiques (MSC, *mesenchymal stem cells*) ⁸⁰, responsables dels teixits no hematopoètics, que es caracteritzen per ser adherents al plàstic, tenir forma de fibroblast i capacitat per diferenciar-se a diferents llinatges dels teixits mesenquimàtics, que inclouen os, cartílag, greix, tendó, múscul i estroma de la medul·la (Figura 9) ⁸¹⁻⁸⁵. També s'ha descrit que aquestes cèl·lules, un cop diferenciades, poden desdiferenciar-se, de manera que tornen al seu estat mesenquimàtic multipotent, i transdiferenciar-se cap a un altre teixit ⁸⁶⁻⁸⁸.

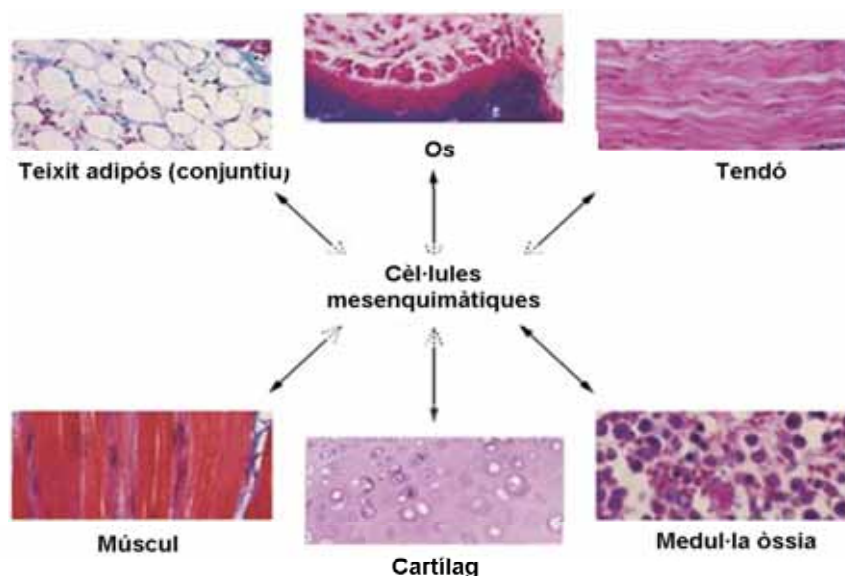


Figura 9- Les cèl·lules mesenquimàtiques amb condicions apropiades es poden diferenciar cap a múltiples llinatges, incloent teixits ectodèrmics (nervis o tendons), mesodèrmics (os, cartílag, teixit adipós i múscul) i endodèrmics (cèl·lules hepàtiques i pancreàtiques). Les fletxes es presenten bidireccionals, ja que hi ha estudis que confirmen que són capaces de desdiferenciar-se i transdiferenciar-se. (Adaptada de Chen, F.H, 2006)

Per les seves característiques, les BMSC, s'han utilitzat en teràpies cel·lulars basades en l'alliberació de cèl·lules per si mateixes, siguin o no siguin modificades, i en diferents models per regenerar o promoure la regeneració de diferents teixits mesenquimàtics ^{89,90}. Actualment, però, se sap que almenys part de l'habilitat d'aquestes cèl·lules en la reparació dels teixits es deu a la secreció de factors que potencien la regeneració de les cèl·lules danyades, a l'estimulació de la proliferació i diferenciació de les cèl·lules troncales progenitores endògenes presents en la majoria de teixits ^{91,92}, a la inducció de l'angiogènesi ⁹³, a la disminució de les reaccions immunològiques i inflamatòries ⁹⁴, a la reducció de l'apoptosi ⁹⁵ i, potser també, a la transferència mitocondrial ⁹⁶. Per tant, és l'alteració del microambient per part d'aquestes cèl·lules el que contribueix a la reparació tissular efectiva i no només la seva capacitat de diferenciació ⁸⁸.

Així mateix, aquests cèl·lules tenen una sèrie de característiques -com són el seu fàcil aïllament, el fet de poder-se cultivar i expandir *in vitro* amb mínims requeriments, el fet de tenir una gran habilitat per a la transducció *ex vivo* amb vectors virals, una gran plasticitat per diferenciar-se amb estímuls exògens, la capacitat d'inserció després de la reintroducció, una alta capacitat metabòlica i maquinària eficient per l'expressió de les proteïnes terapèutiques i l'habilitat per ser alliberades sistemàticament o de manera local- que les fan prometedores com a vehicles cel·lulars ⁷⁵.

S'ha vist també que les BMSC tenen l'habilitat d'acumular-se en llocs de dany tissular o en òrgans afectats, en llocs d'inflamació i en tumors, quan s'administren *in vivo* ⁹⁷. Per això, aquestes cèl·lules s'utilitzen en la medicina regenerativa i en els tractaments de rebuig per evitar respostes autoimmunes durant els trasplantaments ⁹⁸, ja que tenen funció immunosupressora perquè suprimeixen la proliferació de limfòcits durant la resposta a antígens al·logènics i xenogènics i no expressen molècules coestimuladores. La supressió del sistema immunològic es deu als factors solubles procedents de l'activació de les MSC que es produeix en presència de cèl·lules immunològiques ⁹⁹.

Les BMSC han esdevingut molt importants per a l'alliberació dirigida d'agents anticancerosos ^{100,101} amb capacitat de migrar i implantar-se en l'arquitectura tumoral com a fibroblast, tant de tumors invasius com metastàtics ¹⁰²⁻¹⁰⁵, així com en tumors microscòpics ¹⁰⁶ (Figura 10). Aquesta característica de migració cap als tumors depèn de factors com la ruta d'administració, la natura de les cèl·lules tumorals, la localització del tumor primari i el tipus de cèl·lules mesenquimàtiques injectades. Moltes vegades, però, aquesta migració no és completament específica dels tumors i les BMSC colonitzen altres òrgans on no hi ha presència de cèl·lules tumorals ⁹⁹.

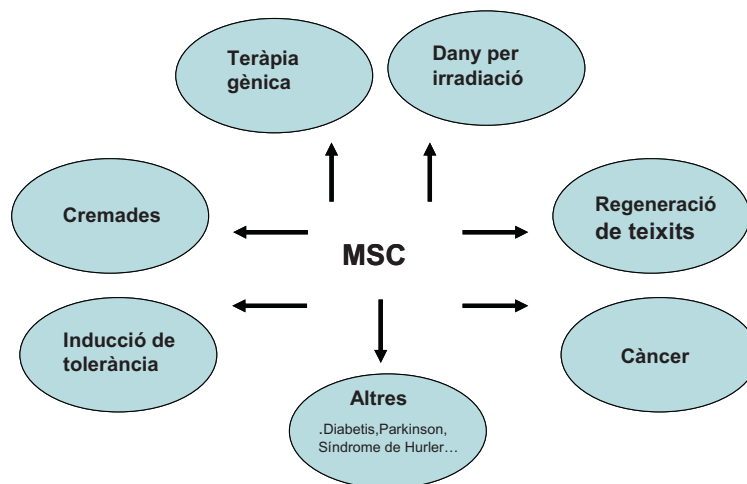


Figura 10- Les MSC es poden utilitzar en molts tipus de teràpies, per exemple en la regeneració de teixits, en danys produïts per cremades o irradiació, per evitar respostes autoimmunes, així com per a la teràpia gènica i en malalties com el càncer.

L'ús clínic de les BMSC presenta, però, problemes, com són el dolorós procés per extreure la medul·la òssia i el baix nombre de cèl·lules que s'obté de l'aïllament (aproximadament 1 cèl·lula MSC per 10^5 cèl·lules de medul·la òssia⁸¹). Això ha fet que s'investiguessin fonts alternatives per a l'obtenció d'aquestes MSC.

A més de la medul·la òssia, s'han trobat aquests tipus de cèl·lules o similars en d'altres teixits com: el múscul esquelètic ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹, el teixit adipós ^{110,111}, el cordó umbilical ^{112,113}, la membrana sinovial ¹¹⁴, el sistema circulatori ¹¹⁵, la polpa dental ^{115,116}, el líquid amniòtic ¹¹⁷, així com també en òrgans fetals com són la sang, el fetge, la medul·la òssia, el cervell i els pulmons ^{118,119}. Per tant, aquestes cèl·lules sembla que resideixen en el teixit connectiu de molts òrgans ¹²⁰, tot i que no totes aquestes poblacions tenen el mateix potencial de diferenciació ¹²¹.

No existeix una caracterització fenotípica ben conservada i l'expressió d'aquestes molècules pot variar entre espècies, així com també del teixit d'origen de les cèl·lules, el mètode d'aïllament i de creixement ¹²² (Taula 5).

Marcadors cel·lulars i gens expressats	Marcadors cel·lulars i gens no expressats
CD105 (SH2)	CD45
CD73 (SH3/4)	CD34
CD44	CD14
CD90	CD11
CD71	CD80
STRO-1	CD86
CD106 (VCAM-1)	CD40
CD166 (ALCAM)	CD31(PECAM-1)
CD29	CD18 (LFA-1)
ICAM-1	CD56 (Adhesió neuronal)

Taula 5- Expressió de marcadors cel·lulars de les cèl·lules mesenquimàtiques aïllades a partir de la medul·la òssia humana.

3.1.2 Cèl·lules mesenquimàtiques de teixit adipós (AMSC)

El teixit adipós, així com la medul·la òssia, deriva del mesènquima i conté estroma de suport que s'aïlla de manera molt fàcil. Entre l'estroma trobem les cèl·lules mesenquimàtiques derivades del teixit adipós (AMSC), que tenen un potencial multi-linatge molt similar al de les cèl·lules de la medul·la òssia i no en difereixen morfològicament d'aquestes ¹²³ (Figura 11). Els avantatges d'aquestes cèl·lules són la seva fàcil obtenció per mètodes menys invasius, mitjançant una escissió local o una liposucció, i la seva gran abundància, ja que la concentració de les MSC en el teixit adipós és un ordre de magnitud més elevat que les BMSC ¹¹⁰.

Estudis comparatius entre aquestes dues poblacions d'un mateix pacient demostren que les AMSC tenen una capacitat proliferant superior sense necessitat de procediments especials ^{124,125}, no s'observen diferències en la senescència cel·lular i tenen un potencial de diferenciació *in vitro* molt similar ^{111,126}.

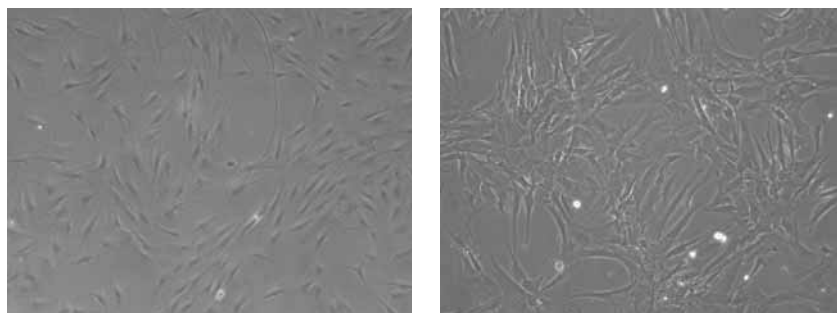


Figura 11- Imatges de cèl·lules mesenquimàtiques de teixit adipós (esquerra) i de medul·la òssia (dreta).

Factors com l'edat del donant, el tipus de teixit adipós (blanc o marró), la localització d'aquest teixit (subcutani o visceral), el tipus de cirurgia emprada, les condicions de cultiu, l'exposició al plàstic, la densitat de sembra i el medi de cultiu utilitzat poden influir tant en la proliferació com en la capacitat de diferenciació de les AMSC ¹²⁷.

Les AMSC expressen una sèrie de marcadors d'antigen (marcadors CD) similars als de les BMSC ^{111,128}, per tant, són immunofenotípicament semblants. Aquests marcadors es troben resumits en la Taula 6.

Marcadors cel·lulars i gens expressats	CD9	CD49 (e)	CD105 (SH2)	Fibronectina
	CD10	CD54	CD106	Endomucina
	CD13	CD55	CD146	ASMA
	CD29	CD59	CD166	Vimentina
	CD44	CD73 (SH3/4)	HLA I	Collagen-1
	CD49 (d)	CD90		
Marcadors cel·lulars i gens no expressats	CD11b	CD34	CD117	c-kit
	CD14	CD45	CD133	MyD88
	CD19	CD79α	CD144	STRO-1
	CD31	CD80	HLA-DR	Lin
				HLA I

Taula 6- Marcadors cel·lulars expressats a les AMSC expandides *in vitro*. Marcats en negreta trobem els marcadors mínims que una cèl·lula progenitora mesenquimàtica ha d'expressar i que no ha d'expressar ja que són del llinatge hematopoètic ¹²⁷.

S'ha trobat que les AMSC expressen el CD49d –que no expressen les BMSC- i que les BMSC expressen el CD106 (VCAM-1) a nivell molt més elevat que no pas les AMSC ¹²¹.

Totes aquestes característiques fan que les AMSC tinguin un gran potencial per a substituir les BMSC en la medicina regenerativa i com a vehicles d'alliberació gènica, ja que són fàcilment infectables tant per adenovirus, retrovirus com pels lentivirus ¹²⁹. S'ha descrit, a més, una expressió de transgens a llarg termini després de la seva diferenciació, utilitzant vectors lentivírics.

Tanmateix, però, per aconseguir una teràpia gènica efectiva s'ha d'aconseguir l'alliberació del producte terapèutic en la cèl·lula diana apropiada. Això fa que la biologia única de les cèl·lules progenitores mesenquimàtiques les predetermini com a agents molt valuosos per a aquest tipus de teràpia. L'habilitat migratòria, molt àmpliament descrita per a les BMSC envers determinats tipus de tumors després de la seva administració sistèmica, també s'ha descrit per a les AMSC en càncer de còlon ¹³⁰, fet que ha posat l'atenció sobre aquestes cèl·lules com a possibles candidates de teràpies cel·lulars autòlogues.

3.1.3 Bioseguretat de les cèl·lules mesenquimàtiques com a vehicles cel·lulars per a la teràpia gènica

L'ús clínic de les cèl·lules mesenquimàtiques ha d'estar precedit d'estudis determinats que garanteixin la seva bioseguretat.

Per a l'aplicació d'aquestes cèl·lules com a agent terapèutic, cal una expansió *in vitro*, durant la qual, les cèl·lules poden patir alguna transformació oncogènica, que se sol produir associada amb aberracions cromosòmiques, un augment en l'activitat telomerasa i l'expressió elevada del gen *c-myc*. Hi ha estudis que demostren que a causa de l'expansió *ex vivo*, les BMSC de ratolí acumulen una gran inestabilitat cromosòmica i generen sarcomes quan són implantades posteriorment en animals ^{131,132}. Aquestes cèl·lules de ratolí són molt susceptibles de patir transformacions i només calen pocs passatges cel·lulars perquè tingui lloc aquest procés ¹³³.

Tot i que les MSC d'humanes tenen moltes coses en comú amb les murines, s'ha observat que les primeres són molt més resistents a aquestes transformacions i han calgut expansions molt extenses, tant per a les BMSC com per a les AMSC, perquè generessin sarcomes un cop trasplantades ^{134,135}, tot i que hi ha estudis que demostren que per a les BMSC aquestes transformacions no tenen lloc malgrat un llarg cultiu *in vitro* ¹³⁶.

Degut a la persistència d'aquesta controvèrsia seria necessari obtenir una evidència addicional de la bioseguretat i, a ser possible, desenvolupar uns procediments d'expansió que la garantissin abans de la seva utilització clínica.

4 INTERACCIONS TUMOR-HOSTE

Estudis recents de les interaccions entre el tumor i l'hoste revelen que: ¹³⁷

- Els tumors no són només masses autònomes, sinó que funcionen com a òrgans, tot i que defectuosos, formats per molts tipus cel·lulars interdependents que contribueixen al desenvolupament d'aquest tumor i al de la metastasi.
- Les interaccions entre el tumors i el seu microentorn són bidireccionals i dinàmiques.
- Els tumors i el seu estroma coevolucionen durant la seva iniciació i progressió.

4.1 El microentorn tumoral

El microentorn tumoral, format per cèl·lules no canceroses i pel seu estroma (Figura 12), s'ha definit com el factor de més influència pel que fa al creixement del càncer. Aquest microentorn està implicat en la regulació del creixement cel·lular i la determinació del potencial metastàtic.

4.1.1 L'estroma

L'estroma està format per diferents tipus de cèl·lules que inclouen fibroblast/miofibroblast, cèl·lules glials, epitelials, de greix, immunològiques, vasculars i de múscul llis, que es troben conjuntament amb la matriu extracel·lular (ECM) i les molècules extracel·lulars. Totes aquestes cèl·lules no són malignes per si soles, però per l'efecte de l'entorn, per les interaccions entre elles i directament o indirecta per les cèl·lules canceroses, adquireixen un fenotip anormal i alteren les seves funcions. En teixits sans el microambient tissular ajuda a prevenir el creixement tumoral i és quan l'estroma del tumor es danya (a causa de l'edat, els carcinògens o la pressió) que recolza la progressió del tumor ¹³⁸.

Així mateix, l'estroma proporciona una matriu estructural per a les cèl·lules canceroses; per tant, cada vegada més, les estratègies terapèutiques actuals es focalitzen en les molècules úniques del microentorn del tumor, fet que portarà a noves estratègies de modificació de l'ambient en el tumor ^{139,140}.

4.1.1.1 Els fibroblasts

Els fibroblasts són el principal component cel·lular de l'estroma del tumor. En alguns tumors, constitueixen una proporció més gran de cèl·lules que les mateixes canceroses. Els fibroblasts adquireixen un fenotip activat en els tumors i s'anomenen

fibroblasts associats al càncer (CAF, *cancer-associated fibroblasts*). Els CAF estan activats permanentment, sense tornar al seu fenotip normal ni patir apoptosi i eliminació.

Hi ha diferents teories per explicar l'origen dels CAF; unes diuen que poden venir dels mateixos fibroblasts residents de l'òrgan, mentre que d'altres diuen que s'originen a partir de precursors derivats de la medul·la òssia que s'activen ja sigui per l'entorn o per un subgrup de cèl·lules activades i reclutades preferentment pels tumors^{100,101}.

Aquestes cèl·lules s'associen a diverses activitats que promouen el creixement del càncer i les metàstasis i que inclouen l'angiogènesi, la transició de cèl·lula epitelial a mesenquimàtica i una inestabilitat genètica progressiva. A més, també poden desregular les respostes immunes contra el tumor.

4.1.1.2 Cèl·lules immunològiques

Algunes cèl·lules immunològiques són reclutades, per tots els tumors. Aquest és el cas dels monòcits, que solen ser presents en zones de necrosi i hipòxia, dels macròfags, que influeixen en el comportament de les cèl·lules endotelials i dels neutròfils, que són estimuladors de l'angiogènesi. Altres tipus de cèl·lules immunològiques com els eosinòfils i els supressors mieloides es troben només en certs tipus de tumors.

4.1.1.3 Les cèl·lules vasculares

Les cèl·lules vasculares formen el nou sistema sanguini necessari per a l'aportació de nutrients al tumor. Aquest nou sistema vascular es forma com a conseqüència de la secreció del factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) per part de les cèl·lules canceroses i de l'estroma, i adquireix una distribució irregular, diferent dels esquemes jeràrquics normals d'arterioles, vènules i capil·lars. Sovint forma derivacions arteriovenoses.

4.1.1.4 La matriu extracel·lular

Les molècules extracel·lulars, entre les quals trobem les citocines i els factors de creixement, són secretades tant per les cèl·lules de l'estroma com per les mateixes cèl·lules canceroses. Per exemple, trobem el factor de creixement transformant (TGF- β , *transforming growth factor-beta*) i el VEGF. També hi ha secreció d'enzims de degradació i remodelatge per tal que les cèl·lules tumorals puguin perdre la seva unió entre elles i puguin envair els teixits del voltant. Així, doncs, les cèl·lules de l'estroma tenen una contribució decisiva en la creació d'un entorn d'inflamació crònica i

tolerància immunològica; per tant, permeten que les cèl·lules canceroses estiguin exposades a diversos factors de creixement, mentre se n'evita l'eliminació per part del sistema immunològic.

Les condicions del microentorn dels tumors, com són l'estrès oxidatiu, la hipòxia, la manca de nutrients i el baix pH, poden contribuir a la inestabilitat genètica, ja que provoquen danys en el seu ADN i promocionen el desenvolupament d'un fenotip mutador. El microentorn que es troba en un teixit sa serveix, contràriament, per prevenir el creixement d'un possible tumor.

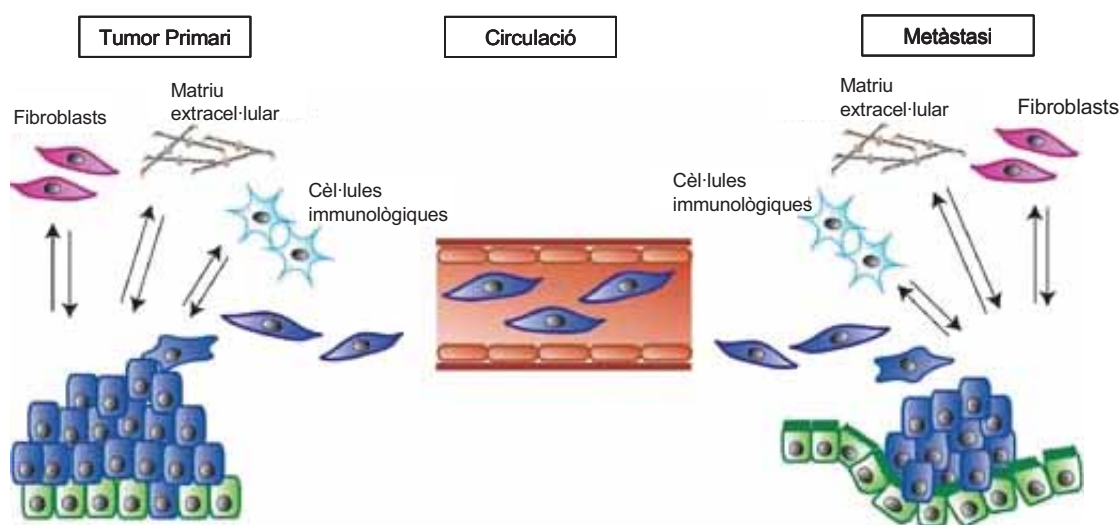


Figura 12- El microentorn del tumor està associat amb la progressió del càncer. Un cop han arribat al lloc de la metàstasi a través de la circulació sanguínia o limfàtica, les cèl·lules canceroses tornen al seu estat epitelial per formar nous nòduls tumorals

4.2 La participació de les cèl·lules mare mesenquimàtiques en els tumors

Se sap que les MSC es guien (autogüen) selectivament cap a llocs on hi ha lesió, independentment del teixit o de l'òrgan on tingui lloc. Això s'ha demostrat tant en danys cerebrals ¹⁴¹ i llocs de cicatrització (reparació de danys) com en processos de regeneració de teixits.

Els tumors es poden considerar com a “ferides que mai no es curen” ¹⁴². Les MSC presenten una habilitat migratòria cap als tumors o als teixits sans que hagin estat prèviament irradiats, cosa que demostra que els tumors es comporten de manera similar a les ferides, ja que secreten nivells alts de factors paracrins i potencien la regulació dels receptors de les quimiocines en les MSC després de la irradiació ^{143,144}.

Hi ha molts factors implicats en la migració de les MSC cap als llocs de ferida, però no es té gaire informació dels factors que fan que vagin cap als tumors. En la

reparació de lesions, així com en càncer, les cèl·lules que normalment es divideixen amb poca freqüència pateixen una inducció que les porta a una ràpida proliferació: l'ECM és envaïda; els teixits connectius són remodelats; les cèl·lules epitelials i de l'estroma migren i es formen nous capil·lars sanguinis. S'especula, per tant, que molts dels factors involucrats en la reparació del dany són també desregulats en el microambient tumoral per iniciar així el procés de migració ¹⁴⁵.

Actualment hi ha moltes evidències que demostren que les MSC proliferen selectivament als tumors i contribueixen a la formació de l'estroma que hi està associat. Una explicació biològica del reclutament de les MSC per part del tumor podria ser un esforç de l'hoste per intentar disminuir el creixement de les cèl·lules del tumor i millorar la supervivència ^{138,146}.

És degut a totes aquestes propietats que aquestes cèl·lules s'han utilitzat com a vehicles alliberadors d'agents antitumorals amb una finalitat similar a la de "Cavall de Troia", que utilitza aquest reclutament com una eina terapèutica. Actualment, per tant, molts estudis es basen en l'avaluació de la viabilitat, la seguretat i el sentit pràctic d'utilitzar aquestes cèl·lules.

S'han observat variacions entre les interaccions de les MSC i diferents tipus de cèl·lules canceroses ¹⁰² i s'han descrit casos on les MSC inhibeixen el creixement del tumor ¹⁴⁷, casos en els quals en promouen el desenvolupament ¹⁴⁸-degut probablement a la seva activitat immunosupressora ¹⁴⁹- i finalment, casos en els que aquestes MSC no produeixen cap efecte. Així mateix, també s'ha descrit que en determinats tipus de càncer, aquestes cèl·lules són capaces de promoure més metàstasis ¹⁵⁰. La seva acció, per tant, és molt difícil d'interpretar, ja que moltes vegades tenen efectes oposats *in vitro* i *in vivo*. Un altre paràmetre crític sembla que és també la proporció entre les MSC i les cèl·lules canceroses, de manera que tenen un comportament diferent segons la quantitat de MSC inoculades.

Per altra banda, també s'ha observat que les cèl·lules tumorals poden modificar tant el creixement com la migració de les MSC, per tant, per utilitzar les MSC com a vehicles en la teràpia anticancerosa cal l'estudi del comportament d'aquestes cèl·lules amb els diferents tipus de cèl·lules canceroses ⁹⁹.

5 MONITORATGE DE LES CÈL·LULES *IN VIVO*

Dels diferents gens reporters, que són gens que codifiquen per proteïnes de fàcil detecció, els que tenen propietats òptiques (p. e. fluorescència i bioluminescència) són una alternativa de baix cost per a l'anàlisi a temps real d'expressió gènica, així com també per al monitoratge de les cèl·lules *in vivo*.

Actualment, la teràpia amb cèl·lules mare és molt prometedora, tant per a la teràpia gènica com per a la regeneració tissular, però es té molt poca informació de com es comporten aquestes cèl·lules *in vivo*. Per al seu seguiment i estudi es necessita una plataforma d'imatge que hauria de complir una sèrie de característiques ¹⁵¹.

- Biocompatibilitat, seguretat i no toxicitat.
- Capacitat de detectar una sola cèl·lula.
- Ha de permetre el comptatge del nombre de cèl·lules.
- No hi pot haver un procés de dilució del reporter amb la proliferació cel·lular.
- Ha de ser un procediment no invasiu per als subjectes vius.

Avui dia, les tècniques d'imatge utilitzades en medicina es consideren indispensables en la recerca del càncer, i és per això que en les últimes dècades hi ha hagut un gran augment del nombre de tecnologies d'imatge. S'espera que aquestes tecnologies ajudin, en un futur, a la visualització de l'expressió i l'activitat de diverses molècules, cèl·lules i processos biològics que estan involucrats en el comportament dels tumors i en les respostes a certes drogues terapèutiques ¹⁵². Les tècniques d'imatge molecular no invasives a temps real *in vivo* en animals models petits ha esdevingut un pont essencial entre les dades *in vitro* i la seva traducció en les aplicacions clíniques.

Els sistemes d'imatge es poden agrupar segons l'energia utilitzada per obtenir la informació visual (raigs X, positrons, fotons o ones acústiques), segons la resolució espacial que aconsegueixen (macroscòpica, mesoscòpica o microscòpica) o bé segons el tipus d'informació que s'obté (anatòmica, fisiològica, cel·lular o molecular). Els sistemes d'imatges macroscòpics que donen informació anatòmica i fisiològica són actualment molt utilitzats en clínica i preclínica. Exemples d'aquest tipus d'imatge són la tomografia computeritzada (CT), les imatges de ressonància magnètica (MRI) i els ultrasons. Per altra banda, hi ha els sistemes que donen informació molecular, dels quals només alguns es troben en ús clínic o preclínic, com la tomografia d'emissió de positrons (PET), la CT d'emissió d'un sol fotó (SPECT), la fluorescència de reflectància, la tomografia mitjançada per fluorescència (FMT), la microscòpia de fibra

òptica, les imatges de dominis de freqüència òptica, la bioluminescència, la microscòpia confocal d'escaneig per làser i la microscòpia multifotó.

A la següent figura (Figura 13) es troben resumits els diferent tipus de sistemes d'imatge utilitzats en oncologia:

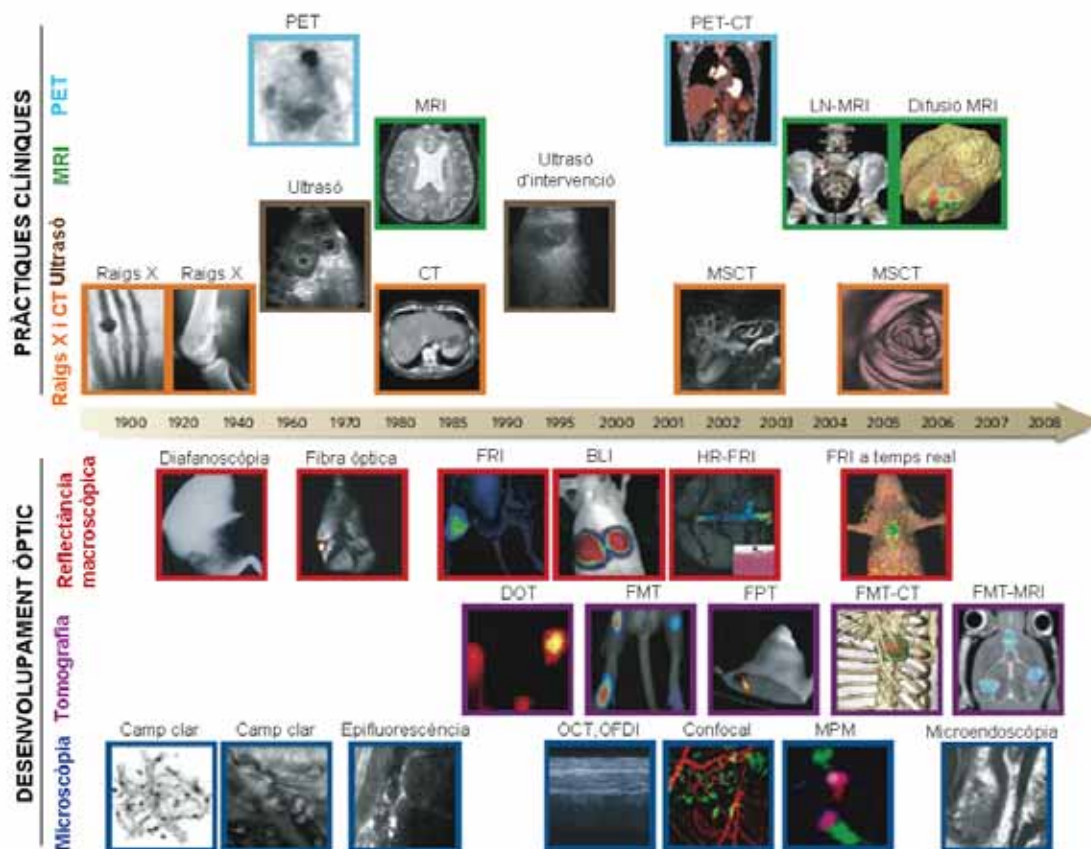


Figura 13- Tecnologies d'imatge utilitzades en oncologia al llarg del temps. Moltes de les tècniques macroscòpiques (sota la línia de temps) s'utilitzen de manera rutinària en clínica i hi ha hagut molts avenços per obtenir informació anatòmica i fisiològica. (Adaptada de Weissleder, R. et al. 2008)

Per aconseguir que aquestes tecnologies d'imatge s'adaptin àmpliament i perquè siguin complementàries a d'altres tipus de mesures moleculars, els resultats obtinguts de la seva lectura han de complir certs criteris; han de ser quantitatius, amb alta resolució, longitudinals (que permetin les imatges al llarg del temps), exhaustius, normalitzables, digitals i sensibles a les pertorbacions moleculars del sistema.

La quantificació és absoluta en aquelles tècniques on els senyals són independents de la posició a la mostra (p. e. CT, FMT, MRI i PET) i la informació és quantificable de manera intrínseca. La quantificació és relativa, en canvi, quan s'obté a partir de la informació d'imatges on el senyal és dependent tant de la fondària com del tipus de mostra, però es pot validar experimentalment. En aquest últim grup, hi trobem la bioluminescència (BLI), la fluorescència reflectant i la microscòpia multifotó.

Cada tecnologia té els seus avantatges i les seves limitacions (Taula 7), per això estan emergint les plataformes que combinen diferents tecnologies. Amb l'ús de dues o tres modalitats de construccions traçadores es poden sobrepassar moltes de les limitacions que implica una sola tècnica. Hi ha estudis on es combinen el PET, la fluorescència i la bioluminescència ¹⁵³.

Tècnica	Resolució	Fondària	Temps	Quantitatiu	Més d'un canal	ús en animals	ús clínic
MRI	10-100 µm	Sense límit	Minuts a hores	Sí	No		Sí
CT	50 µm	Sense límit	Minuts	Sí	No	Pulmons i ossos	Sí
Ultrasò	50 µm	cm	Segons a minuts	Sí	No	Vascular i imatges per intervenció	Sí
PET	1-2 mm	Sense límit	Minuts a hores	Sí	No	Modalitat d'imatge versàtil amb molts traçadors	Sí
SPECT	1-2 mm	Sense límit	Minuts a hores	Sí	No	Anticossos, proteïnes i pèptids marcats	Sí
Fluorescència	2-3 mm	<1 cm	Segons a minuts	No	Sí	Processos en malalties basats en superfície	Sí
FMT	1 mm	<10 cm	Minuts a hores	Sí	Sí	Imatges quantitatives	En desenvolupament
BLI	Varis mm	cm	Minuts	No	Sí	Expressió gènica, i migració cel·lular	No

Taula 7- Avantatges i inconvenients de les diferents tècniques d'imatge segons la seva resolució, el seu límit de fondària, el temps, si és quantitatiu, si utilitza o pot utilitzar més d'un canal, si es pot utilitzar amb animals i si té una aplicació en la clínica. (Adaptada de Massoud, T.F., 2003)

5.1 Tècniques d'imatge en medicina nuclear

Aquestes tècniques es basen en la detecció i anàlisi de la distribució que adopta a l'interior del cos un radioisòtop administrat a través d'una injecció. Hi ha múltiples tècniques que proporcionen diferent informació ¹⁵⁴⁻¹⁵⁶.

5.1.1 MRI

L'MRI és una tècnica d'imatge mèdica, no invasiva, utilitzada en radiologia que visualitza l'estructura i funció del cos. Es basa en el fet que els nuclis atòmics d'un nombre senar de protons, en estar sotmesos a un camp magnètic potent, absorbeixen selectivament ones de radiofreqüència.

Els nuclis habitualment detectats en aquesta tècnica són els protons dels nuclis d'hidrogen que es troben en abundància a les molècules aquoses del cos humà. Quan s'envien ones de determinada radiofreqüència (no ionitzants) a un cos col·locat a l'interior d'un potent iman, el moment magnètic dels seus protons, alineats per efecte del camp magnètic, poden absorbir aquesta energia si coincideix amb la requerida per un canvi de nivell quàntic del protó. Quan el moment magnètic dels protons es torna a alinear espontàniament, emeten una ona electromagnètica (de radiofreqüència) de la mateixa energia que l'absorbida, que es pot detectar mitjançant una antena i un amplificador de ràdio. Això permet l'anàlisi de la capacitat de magnetització de la mostra.

Com que els protons de l'aigua dels diferents teixits del cos estan associats a diferents macromolècules, que apantallen els efectes dels camps magnètics externs, les energies absorbides i emeses pels protons, són diferents a les de l'aigua pura. L'anàlisi d'aquestes diferències, mitjançant un procediment de rastreig, genera informació que permet reconstruir una imatge de l'estat de magnetització de l'aigua en diferents parts de la mostra i permet detectar anormalitats en els diferents teixits. La injecció intravenosa d'agents de contrast és molt útil per visualitzar diverses condicions neurològiques, desordres en els músculs i articulacions, detectar anormalitats al cor i als vasos sanguinis i avaluar tumors.

Tot i que no provoca efectes nocius, una de les limitacions més importants és que és molt menys sensible que les tècniques amb radioisòtops com el PET, que pot detectar 10^{-12} molècules/L de substrat radioactiu, o com la BLI, que detecta en el rang del femtomol (10^{-15}).

5.1.2 PET

Aquesta tècnica d'imatge mèdica, no invasiva, proporciona una imatge tridimensional o un mapa amb l'activitat metabòlica dels diferents teixits del cos; és a dir, el PET no avalua la morfologia dels teixits directament, sinó el seu metabolisme. Es basa en detectar i analitzar la distribució que adopta a l'interior del cos un radioisòtop administrat a través d'una injecció.

Per a generar imatges, s'administra la substància traçadora (generalment una molècula biològicament activa) unida a un isòtop que emet positrons. La interacció d'un electró i un positró emès resulta en la neutralització d'ambdós i en l'alliberació de dos raigs gamma d'alta energia, que viatgen en direccions oposades. La detecció simultània d'aquests raigs gamma per detectors oposats, permet establir una direcció d'emissió. El còmput de múltiples d'aquestes direccions permet generar una imatge tridimensional de la posició de l'isòtop emissor.

Una de les molècules més utilitzades per PET és la fluorodesoxiglucosa (FDG), un sucre que té un període d'espera d'una hora i que, unit a un traçador, permet la possibilitat de quantificar el consum de glucosa. Així, doncs, permet detectar teixits neoplàstics, ja que una característica important d'aquests teixits és el seu elevat consum de glucosa. Per tant, el PET permet localitzar focus de creixement cel·lular anormal a l'organisme, així com exploracions en cardiologia, neurologia i psicobiologia.

Una de les màximes limitacions del PET es deu a l'alt cost del manteniment dels ciclotrons necessaris per a produir radioisòtops de vida curta i a la necessitat de tenir a l'abast els aparells de síntesi química per produir els isòtops units a les molècules d'interès, que degut a la vida mitja tant curta dels traçadors, s'han de generar en el mateix lloc de la utilització.

5.1.3 CT

Es basa en el còmput d'una imatge tridimensional (tomogràfica) a partir de múltiples imatges de raigs X, preses a diferents angles, 360°C, al voltant d'un espècimen. Aquesta tècnica s'ha utilitzat en el diagnòstic de patologies com tumors cerebrals, embòlies, hidrocefàlies, etc.

Són proves fàcils de realitzar que ofereixen imatges amb molta nitidesa, però a vegades necessiten substàncies de contrast intravenós i, com que s'utilitza radiació ionitzant, se n'han de tenir en compte els efectes.

5.1.4 Ultrasons

S'utilitzen molt en clínica pel seu baix cost, així com la seva disponibilitat i seguretat, i per això s'han fet servir per obtenir imatges del cos durant els últims 50 anys. La generació d'imatges mitjançant aquest procediment es base en l'anàlisi d'ones d'ultrasons que són refractades quan passen per diferents teixits. Permet visualitzar estructures normals i patològiques a temps real. També s'han utilitzat àmpliament per veure els fetus. Aquest sistema també ha tingut èxit en models de ratolí.

5.2 Tècniques òptiques d'imatge

5.2.1 Fluorescència

La fluorescència és la propietat que tenen algunes substàncies per emetre llum quan són exposades a radiacions de tipus ultraviolada o raigs X. Aquestes molècules (fluoròfors) són capaces d'absorbir fotons d'una determinada longitud d'ona i d'emetre, entre 10^{-9} a 10^{-6} segons més tard, energia amb una longitud d'ona major (de més baixa energia). La diferència d'energia entre els fotons absorbits i emesos es converteix en vibracions moleculars o calor. Normalment, els fotons absorbits es troben dins el rang de la ultraviolada i la llum emesa, en canvi, dins el rang del visible, però això depèn de la corba d'absorbància i del mateix fluoròfor. Aquest fenomen es va conèixer a mitjan del segle XIX i es va adaptar per microscòpia al segle XX.

Un exemple molt conegut de fluoròfor és la proteïna verda fluorescent (GFP, *green fluorescent protein*) obtinguda a partir de la medusa *Aequorea victoria*, que emet a 509 nm (llum verda) quan s'excita amb llum ultraviolada (395 nm). Hi ha una variant, l'EGFP (*enhanced GFP*), que té un sistema d'expressió més optimitzat per mamífers i un espectre d'excitació desplaçat cap a longituds d'ones més llargues (488 nm), fet que fa que s'obtingui més fotoestabilitat i un augment en la seva intensitat d'emissió de 35 vegades respecte a la nativa ^{154,157}. També se n'han fet mutants que varien en la seva emissió, i en trobem de grogues, cian i blaves.

Un altre fluoròfor àmpliament utilitzat és la proteïna vermella fluorescent (RFP, *red fluorescence protein*) clonada a partir del corall *Dicosoma* (DsRed) que permet moltes possibilitats d'utilitzar-la conjuntament amb la GFP, però amb la limitació de trobar-se en forma de tetràmer. Per tant, no són útils per veure localització cel·lular, ja que solen formar agregats intracel·lulars. La versió monomèrica de la proteïna vermella (mRFP1), que es va treure mitjançant una combinació de mutacions del tetràmer, supera les limitacions respecte al tetràmer inicial, ja que en ser un monòmer madura 10 vegades més ràpid i té emissió mínima quan s'excita a longituds d'ona òptimes per a la GFP. Això fa, per tant, que la mRFP1 sigui molt adient per a les construccions de fusions multicolors en combinació amb la GFP. Tot i això, aquesta variant té l'inconvenient de produir només el 25% de la fluorescència que emeten altres variants ¹⁵⁸. Actualment s'estan emprant anàlegs no naturals d'aquest monòmer per tal de millorar-ne les característiques ^{159,160}.

El camp de les proteïnes fluorescentes continua molt actiu, ja que encara no existeix cap candidat que sigui òptim per a totes les aplicacions. Actualment, s'estan millorant tant les variants de la medusa com les del corall ¹⁶¹.

L'aplicació més important de les proteïnes fluorescentes és com a traçadors biològics. S'introdueixen en forma de gen per mitjà dels vectors i les proteïnes corresponents permeten el seguiment, molt sensible i precís, de la localització, proliferació i capacitat d'expressió gènica de les cèl·lules marcades, mitjançant l'ús de procediments de microscòpia fluorescent i confocal. La seva sensibilitat de detecció es troba entre el rang del nano i del picomolar.

L'avantatge principal d'aquests traçadors és el seu elevat rendiment quàntic (fotons produïts/ fotons absorbits) i el fet que no necessiten substrats enzimàtics. El principal inconvenient fa referència a la baixa penetració de la llum ultraviolada i, en general, de baixa freqüència a través dels teixits, degut a l'absorció per proteïnes, àcids nucleics i altres substàncies. Aquest problema s'agreuja pel fet que degut a l'abundància de molècules autofluorescents en els teixits, l'emissió fluorescent està contaminada amb un soroll de fons significatiu. Com a conseqüència, fins ara, no han estat possibles els procediments d'imatge no invasius utilitzant la fluorescència i, per tant, queda limitada als procediments histològics. Els reporters fluorescentes dins l'espectre d'infraroig, però, són molt interessants perquè a aquestes longituds d'ona augmenta la penetració en els teixits i disminueix l'autofluorescència no específica (Figura 14) ¹⁶².

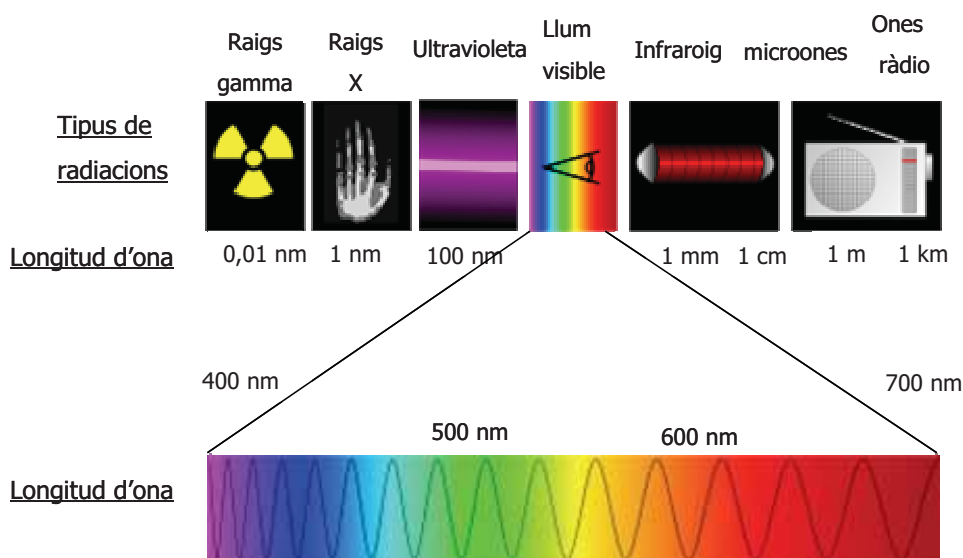


Figura 14- L'espectre electromagnètic des dels raigs gamma fins a les ones ràdio, de menor a major longitud d'ona, respectivament.

5.2.2 Bioluminescència (BLI)

La bioluminescència és l'emissió de llum com a resultat d'una reacció quimioluminescent, generalment catalitzada per enzims anomenats luciferases, en la qual hi ha una conversió d'energia química a llum visible amb un espectre d'emissió que va dels 400 nm als 620 nm ¹⁶³ (Figura 14), que va acompanyada de la modificació (freqüentment oxidació) d'un substrat anomenat luciferina. Per fer això, la luciferina s'ha d'injectar al cos de l'animal i arribar fins a l'òrgan on es produeix l'expressió de la luciferasa. Algunes luciferines requereixen la presència d'un cofactor perquè es produeixi aquesta oxidació (p. e. calci o ATP) ¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ (Figura 15).

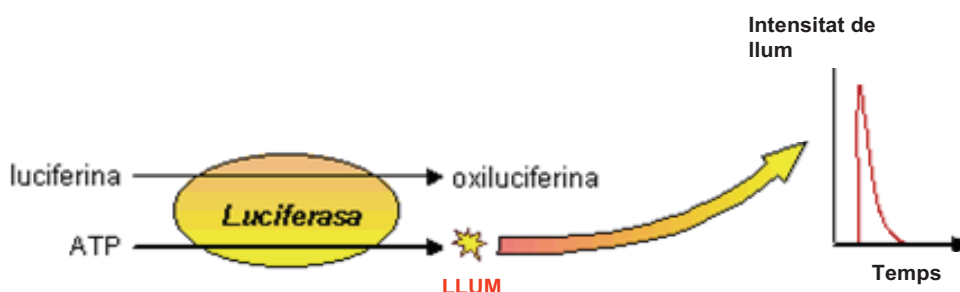


Figura 15- Els substrats (luciferines) són oxidats per les luciferases, amb l'ajuda, en determinats casos, de cofactors com l'ATP. Durant la reacció en què l'ATP passa a ADP s'alliberen fotons de llum que es troben en el rang del visible. Aquesta emissió de llum té una certa intensitat durant un període curt de temps que sol durar minuts.

Els complexos que contenen una luciferasa, una luciferina i que normalment requereixen O^2 s'anomenen també fotoproteïnes.

Les luciferases es troben molt àmpliament distribuïdes en el regne animal. Entre les seqüències de moltes d'aquestes luciferases no existeix homologia i no hi ha activitat creuada entre els seus substrats. A la Figura 16 trobem resumides les luciferases del regne animal que es troben des dels bacteris fins alguns peixos.

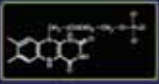
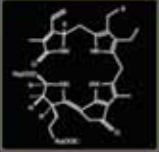
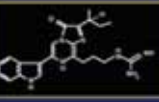
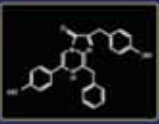


	Bacterià Luciferina + Luciferasa	Bacteris, Alguns peixos Alguns calamars
	Dinoflagel·lats Luciferina + Luciferasa	Dinoflagel·lats Alguns crustacis
	Vargula Luciferina + Luciferasa	Alguns crustacis Alguns peixos
	Coelenterazina Luciferina + Luciferasa Fotoproteïna	Alguns peixos Calamars Cnidaris Alguns crustacis
	Cuques de llum Luciferina + Luciferasa	Cuques de llum
	Altres o desconeguts	Cucs nemertins Bivalves Larvas Lapes Cucs de terra Etc...

Figura 16- Sistemes bàsics de luciferina-luciferasa que es troben en el regne animal. Els més emprats són el de les cuques de llum i el sistema de la coelenterazina.

Les luciferases més àmpliament utilitzades són:

5.2.2.1 Les luciferases de les cuques de llum

Es troba exclusivament en aquests insectes (*Photinus* o *Luciola*). D'aquestes luciferases, una de les més utilitzades és la de *Photinus pyralis* (PLuc), que va ser purificada i caracteritzada el 1978. El seu cADN va ser clonat i expressat en *E.coli* per Wet et al. al 1985. Aquesta luciferasa necessita ATP com a cofactor, i és per això que s'ha utilitzat molt per determinar la presència d'aquest nucleòtid en el medi. El seu espectre d'emissió és de 550 a 570 nm, amb un pic d'activitat que dura entre 15 i 25 minuts després de la injecció del substrat i es detecta llum fins a 2 o 3 hores després. El fet que la relació entre la concentració del substrat i la llum emesa sigui lineal, juntament amb l'existència de detectors de fotons amb una resposta també lineal en un rang de 7 ordres de magnitud, fan que aquest reporter sigui molt convenient per a la BLI¹⁶⁷ ja que permet detectar en el rang de femtomols de luciferasa.

Més recentment, s'ha desenvolupat, també, una luciferasa vermella a partir de l'escarabat saltador *Pyrophorus plagiophalamus* (LPy), que emet llum a 613 nm. Aquest escarabat, procedent del Carib, té diferents tipus d'òrgans que emeten llum: uns òrgans situats al cap que emeten en verd i un altre òrgan ventral que emet entre taronja i groc¹⁶⁸. L'avantatge d'aquesta luciferasa és que emet a longitud d'ones entre

el vermell i l'infraroig proper (entre 600-900 nm) on l'atenuació dels fotons al travessar el teixit és menor ¹⁶⁹(Figura 20).

5.2.2.2 Les luciferases amb substrat coelenterazina

Una de les luciferases més conegudes que utilitzen coelenterazina (CZN) és la de *Renilla reniformis* (RLuc) i el seu cADN va ser aïllat per Lorenz et al. el 1991. La proteïna comparteix homologia amb la proteïna calmodulina d'unió al calci i l'activitat està controlada per la concentració de Ca^{2+} . El seu espectre d'emissió es troba entre 418 i 475 nm i la cinètica de producció de llum és molt ràpida; s'inicia als 10 segons i baixa ràpidament durant els 10 minuts següents a la injecció del substrat ¹⁶³. La reacció de la RLuc és molt més simple que no pas la de la PLuc ja que no necessita cofactors com l'ATP, per tant, la RLuc sembla que causaria menys pertorbació a la cèl·lula. La seva ràpida cinètica també li donaria avantatges en experiments on no es vol un senyal gaire persistent al llarg del temps.

Les limitacions d'aquesta luciferasa es deuen sobretot al seu espectre d'emissió, ja que només un 3% dels fotons emesos són de longitud d'ones superior a 600 nm. Per això, s'han desenvolupat variants de RLuc amb un espectre d'emissió desplaçat cap al vermell que en millora l'ús en animals ¹⁶⁹.

En la Figura 17 trobem representats els espectres d'emissió de les tres luciferases més utilitzades.

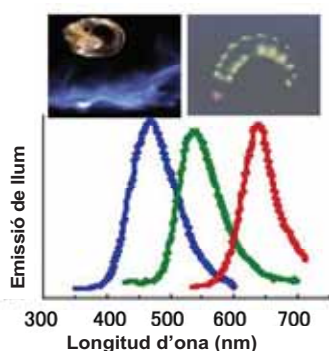


Figura 17- Espectre d'emissió de les diferents luciferases. En verd trobem la de *Photinus pyralis*, en blau la de *Renilla reniformis* i en vermell la de *Pyrophorus plagiophalamus*.

Gràcies al fet que els diferents tipus de luciferases són tan diferents entre elles i que no hi ha activitat creuada entre la RLuc i la PLuc pels seus respectius substrats, s'ha pogut desenvolupar procediments per utilitzar ambdues luciferases en el mateix animal ¹⁶³. Així, doncs, emprant múltiples gens reporters, per luciferases que emeten a diferents longituds d'ona i amb substrats específics diferents, es pot estudiar simultàniament diferents processos moleculars en un mateix model animal.

5.2.2.3 Aplicacions d'imatge de bioluminescència

Les luciferases han tingut moltes aplicacions generals com a traçadors a múltiples nivells ¹⁶⁵. S'han utilitzat, per exemple, en la determinació de les concentracions d'ATP i de Ca^{2+} lliure en fluids biològics per a detectar la contaminació en l'ambient o en el menjar. Així mateix, i degut a la capacitat de la llum per travessar els teixits vius, les luciferases han trobat un nínxol d'aplicació especial com a traçadors per generar imatges de bioluminescència que permeten monitorar l'activitat d'entitats biològiques específiques en animals vius ^{170,171} (Figura 18).

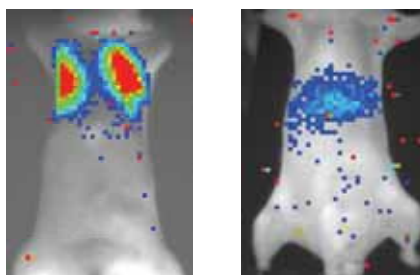


Figura 18- Visualització de cèl·lules que expressen la luciferasa PLuc a pulmons (esquerra) i al fetge (dreta).

El marcatge de diferents soques bacterianes amb gens de les luciferases ha permès analitzar la seva capacitat de creixement i el seu metabolisme, així com els mètodes de distribució en els diferents hostes. A més, s'ha pogut seguir la proliferació, biodistribució i seguretat de les cèl·lules utilitzades en procediments de teràpia cel·lular amb animals vius. En l'àmbit de la oncologia, s'han utilitzat procediments d'imatge bioluminescent no invasiva per a monitorar la proliferació i dispersió metastàtica de les cèl·lules tumorals marcades amb luciferasa ¹⁷²⁻¹⁷⁴ (Figura 19). A més, l'ús de promotors específics de teixit ha permès, en alguns casos, estudiar l'expressió localitzada de determinats gens ¹⁷⁵.

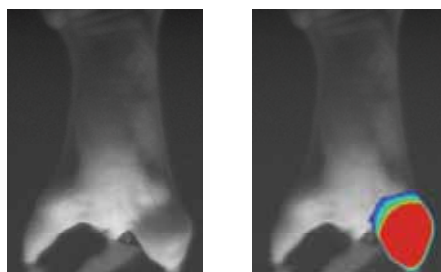


Figura 19- Visualització de cèl·lules tumorals que expressen la luciferasa PLuc. A l'esquerra podem veure un camp clar de la imatge i, a la dreta, la imatge composta del camp clar a la qual s'ha superposat la imatge dels fotons de llum obtinguts.

5.2.2.4 Avantatges i inconvenients de les luciferases

La utilització de les luciferases com a gens reporters es veu beneficiada pel fet que els fotons poden passar a través dels teixits i en els mamífers no existeixen reaccions endògenes de llum, per tant, l'activitat del marcador es pot mesurar sobre un fons totalment fosc. L'existència d'instruments d'alta sensibilitat i amb una resposta lineal permeten detectar des de cèl·lules úniques, *in vitro*, a petites poblacions d'unes 500 cèl·lules en animals vius, a més d'un animal alhora. A més, quan aquests gens reporters s'integren en els cromosomes s'evita la seva dilució quan les cèl·lules es divideixen i les luciferases passen a servir com a marcadors de llinatge cel·lular a més de servir pel monitoratge d'expressió genètica.

Els principals inconvenients de les luciferases són la necessitat d'utilitzar un substrat i el fet que els teixits vius absorbeixen llum visible, fet que limita la profunditat a la que es poden detectar les cèl·lules marcades en animals vius. Aquesta absorció de llum depèn del tipus de teixit, així, per exemple, la pell i el múscul tenen la transmissió de llum més elevada i són gairebé independents de la longitud d'ona; en canvi, òrgans amb un contingut vascular molt alt, com el fetge o la melsa, tenen la mínima emissió, ja que la llum és absorbida per l'oxihemoglobina i la desoxihemoglobina (Figura 20). La reducció del senyal de bioluminescència és d'unes 10 vegades per cada centímetre de fondària, i això varia una mica en funció del tipus de teixit; per tant, la màxima fondària que permet la BLI és de 2-3 cm¹⁷⁶. Un altre problema és que les imatges obtingudes són de dues dimensions i, per tant, hi ha manca d'informació de profunditat. Amb càmeres amb dispositiu de càrrega acoblat (CCD, *Charged couple device*) rotatòries o múltiples visions del mateix animal se solucionaria aquest problema i es podria obtenir una imatge volumètrica. L'altre inconvenient és la falta d'equivalència d'aquesta tècnica en humans, cosa que no li permet un ús clínic.

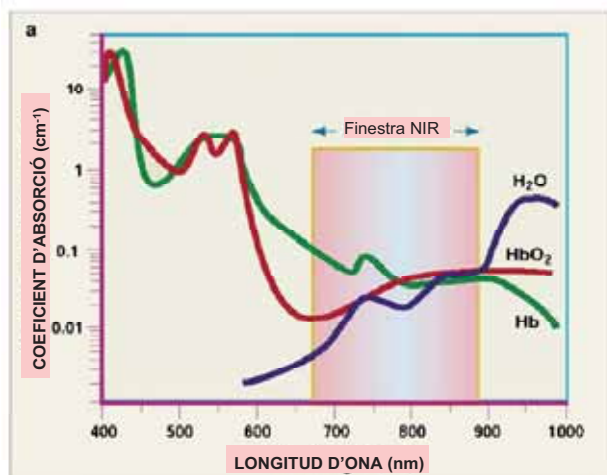


Figura 20- Coeficient d'absorció de llum en els teixits. El coeficient d'absorció depèn de la longitud d'ona i del percentatge de composició d'aigua (H₂O), l'hemoglobina (Hb) i l'hemoglobina oxidada (HbO₂) dels teixits. L'espectre d'emissió de l'infraroig proper (NIR, *near-infrared*) va de 700-900 nm. (Adaptada de Rome C. et al. 2007)

5.2.2.4.1 Els lluminòmetres

Per mesurar la llum generada per les luciferases es poden utilitzar instruments d'extraordinària sensibilitat, com lluminòmetres, basats en tubs fotomultiplicadors, que permeten detectar la presència de molt pocs fotons, i produeixen una resposta lineal en un rang de 6 o més ordres de magnitud. Degut a que la quantitat de fotons produïts és proporcional a la quantitat de traçador expressat per les cèl·lules, és possible quantificar el nombre de cèl·lules segons els fotons. Aquests aparells s'utilitzen per la mesura de la quantitat de llum (activitat de la luciferasa) en homogeneïtzats dels teixits hostes, cosa que permet determinar amb gran rapidesa i sensibilitat el nombre total de cèl·lules marcades que contenen i s'evita, així, haver de recórrer a mètodes histològics.

5.2.2.4.2 Les càmeres CCD

Per a tècniques d'imatge òptiques, tant per fluorescència com per bioluminescència, d'un subjecte viu es necessiten fer imatges dels fotons que emeten diferents parts del cos. És per això que s'han produït aparells molt sensibles que permeten detectar nivells molt baixos de llum visible. Els detectors CCD són el component principal d'aquestes càmeres, i estan essencialment constituïts per matrius bidimensionals de fotodetectors d'estat sòlid, fabricats mitjançant procediments similars als dels circuits integrats. Aquests detectors són extremadament sensibles a la llum visible i a l'infraroig proper i constitueixen l'element fotosensible sobre el que un objectiu projecta una imatge del subjecte de l'anàlisi. Aquestes càmeres, per tant, converteixen la llum dels fotons de longitud d'ones entre 400 a 1000 nm en electrons. Els fotons entrants són llegits per la càmera CCD, amplificats i registrats per poder ser digitalitzats.

Aquests detectors estan fets de cristalls de silicó, tallats a trossos en làmines primes per integrar-los als circuits. L'energia tèrmica en les làmines de silicó provoca una producció constant d'electrons que contamina la senyal d'interès. Aquest soroll tèrmic baixa en un factor de 10 per cada 20°C de descens de temperatura; per això, els CCD treballen en un rang de temperatura que va dels -80°C als -120°C. Els detectors CCD es troben ubicats dins d'una caixa fosca, on s'hi col·loca la mostra a analitzar, i estan acoblats a una unitat criogènica refrigeradora. La informació obtinguda és processada i analitzada posteriorment per un sistema informàtic (Figura 21) ¹⁵⁴.

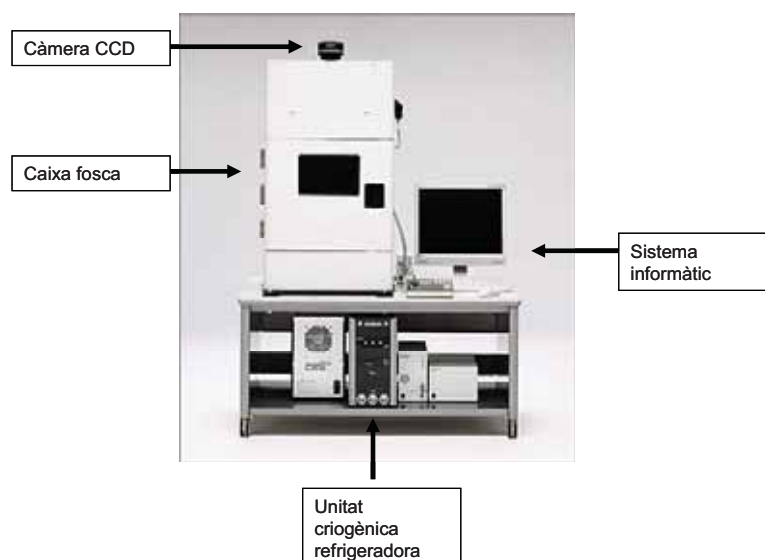


Figura 21- Sistema d'anàlisi d'imatges de bioluminescència per models d'animals petits. El sistema consta d'una càmera d'alta sensibilitat CCD, unida a una caixa fosca on es col·loca l'animal anestesià, d'una unitat criogènica refrigeradora que permet arribar a temperatures tan baixes com -80°C i d'un sistema informàtic que permet analitzar les dades a partir dels fotons de llum captats.

Així, doncs, els gens reporters, incloses les luciferases i la GFP, tenen propietats úniques i complementàries que fan que siguin molt útils en determinades aplicacions. Les luciferases són uns indicadors transcripcionals a temps real gràcies a la seva mitjana de vida relativament curta, contràriament a la GFP, que té una vida molt llarga. La GFP, en canvi, es pot utilitzar per a imatges cel·lulars de més alta resolució que les imatges de BLI. La combinació, per tant, d'aquests gens reporters en un únic vector ha proporcionat eines addicionals per a l'anàlisi de les cèl·lules canceroses tant *in vivo* com *in vitro*.

IV. OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat estudiar el comportament *in vivo* de les cèl·lules mesenquimàtiques derivades del teixit adipós implantades en animals vius durant períodes llargs de temps. En particular ens interessava estudiar l'efecte d'aquestes cèl·lules en convivència amb cèl·lules tumorals i la possibilitat d'utilitzar-les com a vehicles per a la teràpia gènica en tumors i en la reparació de teixits.

Per portar a terme aquest estudi, els objectius concrets que es van plantejar van ser:

Objectiu 1. Desenvolupament d'un sistema de marcatge permanent, amb diferents gens traçadors, que ens permetés tant una selecció cel·lular com un monitoratge no invasiu *in vitro* i *in vivo* de les cèl·lules sotmeses a estudi. Aquest sistema, a més, havia de ser capaç de marcar tot tipus de cèl·lules, entre elles cèl·lules amb una taxa de divisió baixa.

Objectiu 2. Desenvolupament d'un sistema de seguiment no invasiu, de les cèl·lules mesenquimàtiques de teixit adipós, marcades amb gens traçadors, implantades en animals immunodeprimits, a temps real i durant un període extens de temps, mitjançant un sistema d'imatge, que permetés determinar-ne la distribució en l'animal, proliferació i possible transformació.

Objectiu 3. Seguiment, en el mateix animal i de manera simultània, de cèl·lules mesenquimàtiques de teixit adipós i de cèl·lules tumorals, marcades amb diferents gens traçadors, convivint en el mateix ambient tumoral, mitjançant un sistema d'imatge no invasiu.

Objectiu 4. Determinació del possible ús de les cèl·lules mesenquimàtiques de teixit adipós com a vehicles suïcides, tant *in vitro* com *in vivo*, per a una teràpia gènica citotòxica en un model de tumor concret.

Objectiu 5. Estudi *in vivo* dels efectes de les cèl·lules mesenquimàtiques de teixit adipós en el creixement de diferents tipus de tumors i l'efecte que aquests mateixos produïen a aquestes cèl·lules.

Objectiu 6. Desenvolupament d'un procediment d'imatge no invasiu per a la detecció de canvis en l'expressió d'un gen reporter bioluminescent dirigit per un promotor específic de teixit, que participi en processos de diferenciació cel·lular, oncogènesi i teràpia cel·lular.

V. MATERIAL I MÈTODES

1 CÈL·LULES

1.1 Tipus cel·lulars

1.1.1 293T

La línia cel·lular humana 293T (Figura 22), que deriva del ronyó embrionari i expressa constitutivament l'antigen SV40 large T s'obtingué a partir de l'*American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, EUA). Aquesta línia, que és altament transfectable, es va utilitzar al llarg d'aquesta tesi com a empaquetadora de virus, mitjançant transfeccions transitòries.

Les cèl·lules 293T es mantenen a 37°C i a una concentració del 5% de CO₂. El seu medi de creixement era:

- *Dulbecco's modified eagle media-high glucose* (DMEM) 4500 glucosa (Sigma, Steinheim, Alemanya)
- 2 mM L-glutamina (Sigma)
- 50 u/ml penicil·lina/estreptomicina (P/S) (Sigma)
- 10% sèrum boví fetal (SBF) (Sigma)
- 25 mM Hepes (Sigma)

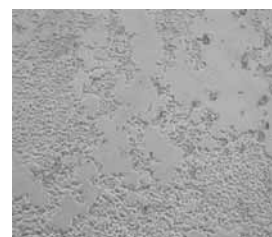


Figura 22- Fotografia d'un cultiu cel·lular de la línia 293T en placa.

El medi utilitzat durant l'etapa de producció de virus, després d'una transfecció transitòria, era el mateix medi de creixement però sense SBF.

1.1.2 hAMSC

Les hAMSC (Figura 23) s'obtingueren de pacients, normalment dones, amb un índex de massa corporal superior a 25, sotmeses a una liposucció subdèrmica de maluc. El lipoaspirat es va rentar amb PBS 1X i es va incubar amb 1 volum de col·lagenasa I (Sigma) durant 30 minuts a 37°C amb agitació. La inactivació de la col·lagenasa es va fer mitjançant 1 volum de DMEM amb un 10% d'SBF. Aquesta digestió es va centrifugar a 450 g i el precipitat es va rentar amb 50 ml de solució de Ringer; després es va recompondre amb 10 ml de clorur d'amoni 0,16 M i es va deixar a temperatura ambient durant 10 minuts per tal de lisar els eritròcits. Es van afegir 50 ml de lactat de Ringer i es va centrifugar a 450 g. Aquests rentats es van repetir fins que ja no es van detectar traces de color vermell.

Després dels rentats, el precipitat es va recompondre amb 5 ml de lactat de Ringer, es va filtrar a través d'una malla de niló de 70 μm i es va centrifugar a 450 g. Novament, el precipitat es va recompondre amb lactat de Ringer i es va comptar la viabilitat cel·lular mitjançant blau de tripà.

Aquestes cèl·lules es van sembrar a una densitat de 5000 cèl·lules/cm₂ i es van mantenir a 37°C a una concentració del 5% de CO₂. El seu medi de creixement, que es canviava 3 vegades a la setmana, era el següent:

- DMEM 4500 glucosa
- 2 mM L-glutamina
- 50 u/ml P/S
- 10% SBF

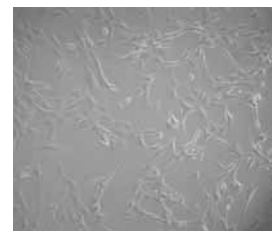


Figura 23- Fotografia d'un cultiu cel·lular d'hAMSC al passatge 3.

Les hAMSC que s'utilitzaren per transduir amb lentivirus es trobaven al passatge 3.

1.1.3 PC-3

La línia cel·lular PC-3 (Figura 24), obtinguda a l'ATCC, es va iniciar a partir de les metàstasis en l'os que provenien d'un adenocarcinoma de pròstata de grau IV d'un home caucàsic de 62 anys. Aquesta línia és independent d'androgen i presenta gairebé una triploïdia, amb un nombre aproximat de 62 cromosomes. Les PC-3 es van mantenir a 37°C i amb un 5% de CO₂. El seu medi de creixement contenia:

- 1:1 Barreja de DMEM 4500 glucosa i medi HAM's F-12 (sigma)
- 2 mM L-glutamina
- 50 u/ml P/S
- 10% SBF

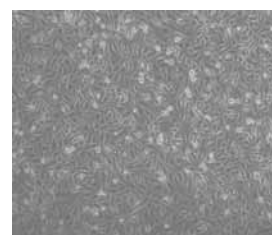


Figura 24- Fotografia d'un cultiu cel·lular de PC3.

1.1.4 U-87 MG

Les cèl·lules U-87 MG (ATCC) (Figura 25) són derivades d'un glioblastoma humà maligne. La majoria de cèl·lules tenen hipoploïdia -amb un nombre total de 44 cromosomes-, tot i que n'hi ha que mostren hiperploïdia. Aquestes cèl·lules es van mantenir a 37° i amb un 5% de CO₂. El seu medi de creixement contenia:

- 1:1 Barreja de DMEM 4500 glucosa i medi HAM's F-12
- 2mM L-glutamina
- 50 u/ml P/S
- 10% SBF

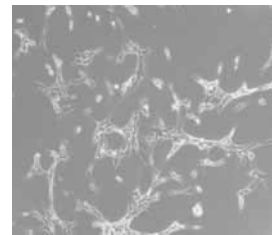


Figura 25- Fotografia d'un cultiu cel·lular de la línia tumoral U-87 MG.

1.1.5 HPAC

Aquesta línia deriva d'un adenocarcinoma de pàncrees humà, i les seves cèl·lules mostren un cariotip amb 61 cromosomes (ATCC) (Figura 26). Aquestes cèl·lules es van mantenir a 37° i amb un 5% de CO₂. El seu medi de creixement contenia:

- 1:1 Barreja de DMEM 4500 glucosa i medi HAM's F-12
- 2 mM L-glutamina
- 50 u/ml P/S
- 10% SBF

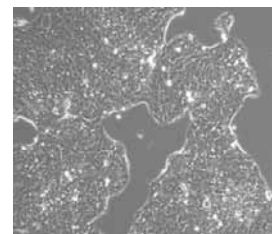


Figura 26- Fotografia d'un cultiu cel·lular de HPAC.

1.1.6 435-P

La línia MDA-MB 435 (435-P) (Figura 27) és una línia cel·lular humana de càncer de mama, cedida per la doctora A. Sierra ¹⁷⁷ (Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, Barcelona). Aquestes cèl·lules es van mantenir a 37°C amb un 5% de CO₂. El seu medi de creixement contenia:

- 1:1 Barreja de DMEM 4500 glucosa i medi HAM's F-12
- 2 mM L-glutamina
- 50 u/ml P/S
- 10% SBF



Figura 27- Fotografia d'un cultiu cel·lular de la línia tumoral 435P.

1.1.7 CL1

CL1 és una línia cel·lular bipotent del llinatge condrogenitor que es va aïllar de la tibia de ratolins adults i es diferencia al llinatge condrogènic i adipogènic

espontàniament. Aquesta línia va ser cedida pel doctor H. Kitamura^{178,179} (Fuji-Gotemba research laboratories, Japó) (Figura 28). Es va fer créixer a 37°C amb el 5% de CO₂ i el seu medi de creixement contenia:

- *Minimum essential medium Eagle alpha modification* (α -MEM) (Sigma)
- 2 mM L-glutamina
- 50 u/ml P/S
- 10% SBF

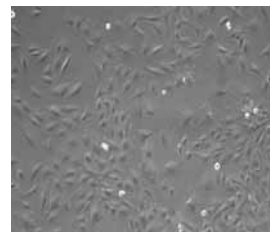


Figura 28- Fotografia d'un cultiu cel·lular de la línia bipotent CL1.

1.2 Congelació cel·lular

El medi de congelació contenia:

- 90% de SBF
- 10 % dimetil sulfòxid (DMSO)

Abans de recompondre els precipitats cel·lulars, el medi de congelació es deixava a 4°C durant 15 minuts. La concentració cel·lular anava de $0,5-5 \times 10^6$ cèl·lules/ml i es feien alíquotes amb criotubs que es posaven a les caixes de criocongelació a -80°C. Després d'unes 48 hores, les cèl·lules es guardaven en nitrogen líquid per a una conservació llarga.

1.3 Diferenciació cel·lular

1.3.1 Diferenciació adipogènica

Per diferenciar les hAMSC al llinatge adipogènic, aquestes cèl·lules es van sembrar a una densitat de $8 \times 10^4/\text{cm}^2$ el dia anterior a l'inici de la diferenciació. El medi que es va utilitzar per a aquest procés, i que es canviava cada tres dies durant tres setmanes, constava de:

- DMEM
- 20% de SBF
- 0,5 mM d'isobutimetilxantina (IBMX) (Sigma)
- 60 μM d'indometacina (Sigma)

- 10^{-6} M de dexametasona (Sigma)
- 100 nM de risoglitazona (Caiman Chemica, Ann Arbor, EUA)

1.3.2 Diferenciació osteogènica

Les cèl·lules es van sembrar a $1,5 \times 10^4$ cèl·lules/cm² i el medi de diferenciació era:

- DMEM
- 10% SBF
- 2 mM de β -glicerolfosfat (Sigma)
- 50 μ g/ml d'àcid L-ascòrbic (Sigma)
- 10^{-7} M dexametasona
- 0.15 mM sodi fosfat dibàsic (Sigma)

Aquesta diferenciació va durar tres setmanes, durant les quals es va canviar el medi cada tres dies.

1.3.3 Diferenciació condrogènica

1.3.3.1 Diferenciacions en dues dimensions:

La línia cel·lular CL1 es va diferenciar en pla, utilitzant plaques de 6 pous, amb el medi de cultiu complementat cada dos dies, durant dues setmanes, amb 0,5 ng/mm² de TGF- β 1 (Prepotech, London, Regne Unit).

Les hAMSC es van diferenciar en plaques de 6 pous amb l'addició del medi ¹⁸⁰:

- 1:1 Barreja de DMEM 4500 glucosa i medi HAM's F-12
- 10% SBF
- 2 mM L-glutamina
- 10 ng/ml de TGF- β 1
- 100 nM de dexametasona
- 6,25 g/ml d'insulina
- 50 nM d'àcid ascòrbic-2-fosfat
- 110 mg/l de piruvat de sodi

1.3.3.2 Diferenciacions en tres dimensions

Les hAMSC i les hBMSC es van diferenciar utilitzant la tècnica del microprecipitat o micropellet. Es van centrifugar $2,5 \times 10^5$ cèl·lules amb medi complet en tubs de 15 ml a 350 g durant 5 minuts i es va deixar a 37°C i al 5% de CO₂ amb el

tap del tub una mica desenroscat per tal de permetre l'intercanvi de gasos. Al cap de 24 hores, amb uns cops secs i lleugers es va desenganxar el precipitat del tub i s'hi va afegir medi complet. El medi es va anar canviant cada tres dies durant tres setmanes.

El medi complet contenia:

- DMEM
- 1 mM de dexametasona
- 0,1M de piruvat de sodi (Sigma)
- 17 mM d'àcid L-ascòrbic
- 35 mM de prolina (Sigma)
- 2 µl/ml d'insulina-transferrina-seleni (ITS) (Cambrex)

Per completar el medi s'afegia BMP-2 (Prepotech) a 100 ng/ml o TGF-β1 a 10 ng/ml.

1.4 Tincions de cèl·lules diferenciades *in vitro*

1.4.1 Tinció *Oil Red O*

Aquesta tinció es va emprar per detectar la diferenciació al llinatge adipogènic, ja que el colorant *Oil Red O* és molt soluble en lípids i s'utilitza per detectar triglicèrids, àcids grassos i lipoproteïnes. Aquest colorant dona una tinció vermellosa (Figura 29).

El procediment que es va seguir va ser:

- Es van rentar les cèl·lules amb PBS 1X i es van fixar amb paraformaldehid (PFA) (Sigma) al 4% durant 1 hora.
- Es van rentar les cèl·lules fixades amb isopropanol (Panreac) al 60% durant 1 minut.
- Es van tenyir amb solució *Oil Red O* (60 ml de la solució estoc, que és una solució saturada d'*Oil Red O* en isopropanol 100%, amb 40 ml d'aigua destil·lada).
- Es van rentar dues vegades amb isopropanol 60% durant 1 minut.
- Es van rentar amb aigua destil·lada durant 5 minuts.
- Es van tenyir els nuclis mitjançant hematoxilina de Mayer (Sigma) durant 2-3 minuts.
- Es va rentar amb aigua corrent durant 3 minuts i seguidament amb aigua destil·lada 3 minuts més.

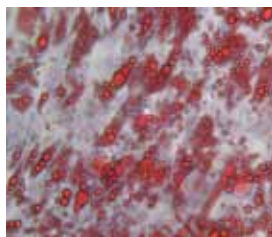


Figura 29- Fotografia d'un cultiu d'hAMSC diferenciat a teixit adipós i tenyit amb *Oil Red O*.

1.4.2 Tinció de *Von Kossa*

Aquesta tinció s'utilitza per visualitzar dipòsits o sals de calci. Es base en la substitució dels ions de calci (en forma de fosfats o carbonats) per ions de plata, de manera que el nitrat de plata passa a fosfat o carbonat de plata i aquest compost, quan s'exposa a una llum forta, es redueix i adquireix una tonalitat negra (Figura 30). Es va utilitzar aquesta tècnica per tenyir les cèl·lules diferenciades cap al llinatge osteogènic. El procediment va ser:

- Es van rentar les cèl·lules amb PBS 1X i es van fixar amb PFA al 4% durant 1 hora.
- Es van rentar les cèl·lules fixades 3 vegades amb aigua destil·lada durant 5 minuts.
- Es van deshidratar les cèl·lules amb una seqüència de 3 minuts amb etanol al 70%, 3 minuts en etanol al 90% i 3 minuts en etanol al 100%.
- Es van deixar assecar les cèl·lules durant 2-3 minuts.
- Es van rehidratar les cèl·lules amb una seqüència de 3 minuts en etanol al 100%, 3 minuts en etanol al 90% , 3 minuts en etanol al 70%. Finalment, es van deixar 5 minuts en aigua destil·lada.
- Es van tenyir amb nitrat de plata al 2% (Sigma) durant 1 hora sota una font llumínica de 70 W.
- Es van rentar les cèl·lules 3 vegades durant 5 minuts amb aigua destil·lada.
- Es va parar la reacció de nitrat de plata afegint-hi tiosulfat de sodi al 5% (Panreac, Castellar del Vallès, Espanya) durant 5 minuts.
- Es van tenyir els nuclis amb hematoxilina de Mayer durant 2-3 minuts.
- Es va rentar amb aigua destil·lada dues vegades durant 5 minuts.



Figura 30- Fotografia d'un cultiu d'hAMSC diferenciat al llinatge osteogènic i tenyit amb *Von Kossa*.

1.4.3 Tinció de Blau de Toluïdina

El blau de toluïdina és un colorant que produeix metacromàsia, que fa referència al canvi de coloració que pateixen alguns elements histològics respecte la resta de teixit del qual formen part, degut a les seves propietats bàsiques. S'utilitza per tenyir proteoglicans i glicosaminoglicans en teixits com el cartílag i, per això, es va utilitzar per detectar diferenciació al llinatge condrogènic (Figura 31). A més produeix una contratinció blava dels nuclis. El procediment que es va utilitzar va ser el següent:

- Es van rentar el microprecipitats amb PBS 1X i es van fixar durant 24 hores amb PFA al 4%.
- Un cop transcorregut aquest temps, es van rentar amb PBS 1X i es van incloure amb 50 µl d'agarosa de baixa fusió (FMC BioProducts, Rockland, EUA) al 1,5% en PBS 1X.
- L'agarosa solidificada es va incloure amb parafina mitjançant un processador de teixits (Shandon Citadle 2000, Thermo Scientific, Waltham, EUA) i posteriorment es van fer els blocs de parafina amb un dispensador (Leica).
- Es van fer talls de 5 µm dels blocs amb el micròtom (Leica) i els talls es van posar uns minuts a un bany a 42°C abans de col·locar-los sobre els portaobjectes prèviament silanitzats (portaobjectes rentats amb etanol al 70%, tractats durant 4 minuts amb una proporció 1:24 de silane i acetona, rentats amb acetona i, seguidament, amb aigua destil·lada i mantinguts durant 12 hores a 37°C).
- Els portaobjectes es van desparafinar amb xil·lol durant 15 minuts.
- Es van rehidratar amb una seqüència de 3 minuts en etanol al 100%, 3 minuts en etanol al 90%, 3 minuts en etanol al 70%. Finalment, es van deixar 5 minuts en aigua destil·lada.

- Es van tenyir amb Blau de Toluïdina (Sigma) a l'1% (1 g de Blau de Toluïdina, 20 ml d'alcohol de 96%, 80 ml d'aigua destil·lada i 1 ml d'àcid acètic glacial) durant 5 minuts.
- Es van rentar amb aigua destil·lada i seguidament amb dioxan (Fluka).
- Es van rentar amb etanol al 96%.
- Es van deshidratar amb etanol al 95% durant 2 minuts i, tot seguit, amb etanol absolut durant 2 minuts.
- Es van rentar amb xil·lol durant 5 minuts.
- Es van muntar utilitzant histomount (National Diagnostics, Atlanta, EUA).



Figura 31- Fotografia d'un microprecipitat d'hAMSC diferenciat al llinatge osteogènic i tenyit amb Blau de Toluïdina.

2 MARCATGE CEL·LULAR

2.1 Construccions plasmídiques

El marcatge estable de cèl·lules amb proteïnes bioluminescents i fluorescents es va fer mitjançant vectors vírics. Com que la majoria de cèl·lules utilitzades no es dividien amb gran rapidesa, el sistema que es va emprar va ser el sistema lentivíric.

Per a totes les construccions es va partir de l'esquelet lentivíric de transferència SIN, Plox/Twgf_p cedit pel doctor D. Trono (École Polytechnique, Fédérate de Lausanne), d'on es va extreure el fragment *XhoI-KpnI*, al qual es va clonar un polilligador amb diferents dianes de restricció que feien més fàcils les clonacions posteriors.

2.1.1 Construcció PLox-G·PLuc

El fragment, que contenia el gen de la proteïna EGFP dirigida pel promotor constitutiu SV40 i el gen PLuc sota el control del promotor CMV, es va clonar entre les dianes de restricció *Clal* i *BamHI* del polilligador del vector PLox i es va obtenir aquesta construcció (Figura 32).



Figura 32- Esquema del vector lentivíric PLox-G·Luc. La part que s'integra al genoma (de color gris) és la que va del LTR fins a l'altre LTR dividit en U3, LoxP i U3.

2.1.2 Construcció hrl-mrfp-ttk

La construcció hrl-mrfp-ttk, cedida pel Dr. S. Gambhir (Standford University, EUA), contenia el gen reporter RLuc, el gen de la mrfp1 i el gen truncat de la TK, dirigits per un mateix promotor CMV^{66,151} i que s'expressaven en forma d'una proteïna quimera (Figura 33).

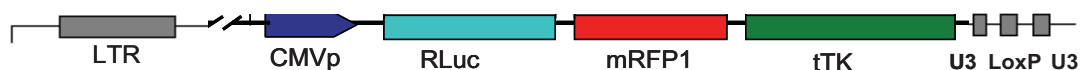


Figura 33- Esquema del vector lentivíric hrl-mrfp-ttk. La part integrada al genoma és la que va de LTR a LTR.

2.1.3 Construcció PLox-Col2A1-PLuc

Aquest vector, amb el promotor del col·lagen humà tipus II específic de cartílag (Col2A1) i el gen PLuc, es va clonar mitjançant dos passos. El promotor Col2A1 es va obtenir del pGL2-0.387kbE715(+)^{US 181} i es va clonar en el vector comercial pSP-Luc+. El fragment Col2A1-PLuc es va clonar en els llocs de restricció *SpeI* i *SmaI* del polil·ligador del vector lentivíric PLox (Figura 34).

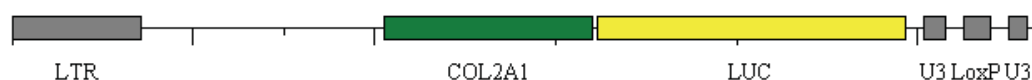


Figura 34- Esquema del vector lentivíric PLox-Col2A1-PLuc. La part integrada al genoma és la que va de LTR a LTR.

2.2 Producció de partícules víriques

Per a la producció de partícules víriques de les diferents construccions, el protocol que es va seguir al llarg d'aquesta tesi va ser el següent:

- 3 x 10⁶ cèl·lules 293T es van sembrar en plaques de 10 cm², prèviament tractades amb 5 µg/ml de poli-D-lisina (Sigma) per tal de mantenir-les més adherents al plàstic.
- 24 hores després i 2 hores abans de la transfecció de les cèl·lules es va fer un canvi de medi i s'hi van afegir 9 ml de medi fresc.
- El vector de transferència (pLOX SIN), amb els diferents gens clonats, el plasmidi d'envolta pMD-G-VSV-G *env* i el plasmidi d'empaquetament pCMVDR8.2 es van barrejar amb una proporció de 20 µg, 5 µg i 15 µg, respectivament, amb H₂O estèril fins un volum final de 450 µl.
- A la mescla d'ADN i H₂O se li va afegir 50 µl de clorur de calci (Sigma) 2,5 M, prèviament escalfat a temperatura ambient.
- Mitjançant una pipeta Pasteur, es va afegir aquesta barreja gota a gota a 500 µl de *HEPES-buffered saline* (HeBS) 2X (pH 7) a temperatura ambient i en agitació, i es va deixar immòbil durant 20 min.
- La barreja final es va afegir, també gota a gota, sobre la placa sembrada amb les 293T mentre s'anava movent lleugerament.
- La precipitació es va deixar durant 16 hores a 37°C i al 5% de CO₂.

- Un cop transcorregut aquest temps, es va treure el medi de precipitació, es van rentar les cèl·lules amb PBS 1X i es va afegir medi de cultiu sense SBF.
- 48 hores després, es va recollir el medi i es va centrifugar a 1200 rpm durant 10 minuts per eliminar les restes cel·lulars i el sobrenedant es va filtrar mitjançant un filtre de 0,45 µm. Posteriorment, es va ultracentrifugar a 26.000 rpm a 4°C durant 90 minuts amb un rotor SW41.Ti en una ultracentrífuga L-100xp (Beckman Coulter, Fullerton, EUA) per tal de concentrar els virus.
- El precipitat obtingut es va recompondre amb PBS 1X (amb Mg²⁺) i es va congelar amb alíquotes a -80°C.

2.3 Titulació de partícules víriques

La titulació de partícules víriques es va fer mitjançant un assaig immunoabsorbent lligat a enzims (ELISA) de l'antigen p24 del VIH (EIA, Beckman Coulter).

- Alíquotes de les mostres i dels controls es van dipositar en una placa de 96 pous juntament amb el tampó de lisi, i es van incubar durant 1 hora a 37°C. Es va aspirar el medi i es van rentar els pous amb el tampó de rentat 6 vegades durant 30 segons.
- Es va afegir 200 µl de reactiu de biotina anti-VIH-1 humà reconstituït, a excepció del pou utilitzat com a blanc, i es va deixar 1 hora a 37°C. Seguidament es va aspirar el medi i es van rentar els pous 6 vegades durant 30 segons amb el tampó de rentat.
- S'afegiren 200 µl de SA-HRPO (conjugat d'estreptavidina i peroxidasa de rave) a tots els pous a excepció del blanc i es van incubar a 37°C durant 30 minuts. Es van rentar els pous, tal com s'havia fet prèviament.
- Finalment, es va afegir el reactiu TMB (que contenia tetrametilbenzidina i peròxid d'hidrogen) i es va incubar a la foscor durant 30 minuts mentre reaccionava amb els complexos de peroxidasa. Es va parar la reacció mitjançant l'addició d'àcid CSR-1 (4NH₂SO₄).
- L'absorbància de la coloració es va mesurar amb un espectrofotòmetre a 450/570 nm, Els resultats s'obtingueren amb pg/ml de quantitat de proteïna VIH-1 p24. En les nostres condicions de transfecció, obtinguérem que 10 ngr de p24 corresponien a 10⁶ unitats transfectants (TU).

2.4 Transducció cel·lular

Per marcar les cèl·lules desitjades de manera permanent mitjançant les partícules lentivíriques es va seguir sempre el següent procediment:

- Les cèl·lules hAMSC es van sembrar a 5000 cèl·lules/cm² i les línies tumorals a 1000 cèl·lules/cm² en pous de plaques de 12.
- Al medi de les cèl·lules, que contenia *polybrene* (*hexadimethrine bromide*) (Sigma) a una concentració final de 10 µg/ml, s'hi van afegir els virus concentrats per tal d'obtenir una MOI (Multiplicitat d'infecció, partícules víriques infeccioses/cèl·lula) de 21 (2×10^6 TU/ml) amb un volum final de 500 µl.
- El medi de transducció es va deixar durant 48 hores i es van netejar les cèl·lules amb PBS 1X, es va afegir medi nou i es van deixar créixer les cèl·lules.
- L'eficiència de transducció vírica es va determinar per la detecció de les proteïnes fluorescents mitjançant microscòpia de fluorescència o per citometria de flux.

2.5 Selecció de les cèl·lules transduïdes

Les cèl·lules que eren positives per fluorescència, es van seleccionar mitjançant la separació de cèl·lules activada per fluorescència (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*), tant en el cas de les cèl·lules marcades amb el PLox-G·PLuc (fluorescència verda) com amb el hrl-mrfp-ttk (fluorescència vermella). La selecció va anar de l'11% al 5% mes marcat depenent de la capacitat proliferant del tipus cel·lular.

3 MODELS ANIMALS *IN VIVO*

3.1 Ratolins

Els animals que es van utilitzar al llarg d'aquesta tesi van ser ratolins immunodeprimits, els quals es van mantenir sempre estabulats en un ambient lliure de patògens.

Tots els procediments amb animals aplicats al llarg dels diferents estudis van ser aprovats pel comitè ètic del Centre d'Investigació Cardiovascular (CIC) i per la Generalitat de Catalunya.

3.1.1 Ratolins BALB/c nu/nu

Aquests ratolins, també coneguts com a ratolins nus per la seva falta de pelatge, són ratolins homozigots per una mutació recessiva del gen *FOXN1*, que provoca que tinguin el timus deteriorat o eliminat, fet que fa que el seu sistema immunitari estigui deprimat degut al reduït nombre de limfòcits T madurs. Aquests ratolins permeten la implantació de cèl·lules de diferents teixits i òrgans d'animals d'altres espècies –procés que es defineix com a xenoempelt- sense que hi hagi una resposta de rebuig.

Les femelles nu/nu tenen les glàndules mamàries molt subdesenvolupades, i això fa que no puguin alletar de manera efectiva les cries. Per això els mascles es reproduïen amb femelles heterozigotes.

3.1.2 Ratolins SCID

Els ratolins SCID (Immunodeficiència combinada greu, *Severe Combined Immunodeficiency*) es caracteritzen per la incapacitat de poder donar una resposta immune apropiada a causa de l'absència o defectuositat dels limfòcits T i B, degut a una mutació recessiva en el cromosoma 16, responsable de la ineficient activitat de l'enzim *Prkdc* (proteïna quinasa, ADN activat, polipèptid catalític) involucrat en la reparació de l'ADN. El sistema immunològic no madura i aquests ratolins no poden combatre infeccions ni rebutjar tumors o trasplantaments.

3.2 Implantació de cèl·lules humanes AMSC en ratolins nu/nu

Per tal de poder avaluar la biodistribució, seguretat i supervivència de les hAMSC es van desenvolupar dos models animals amb ratolins BALB/c nu/nu de 6 setmanes.

Es va portar a terme un model ectòpic intramuscular (IM), en el qual es van inocular les cèl·lules humanes a les cuixes dels ratolins, i un model ectòpic intravenós (IV), en el qual es van injectar les mateixes cèl·lules per la vena caudal. El procediment constava dels següents passos:

- Es van tripsinitzar les cèl·lules, de manera que es van recompondre a una concentració de 5×10^5 cèl·lules G·Luc-hAMSC en 50 μ l de DMEM 4500 glucosa i es van guardar en gel fins que es van inocular als animals.
- Els animals es van anestesiar mitjançant una injecció intraperitoneal (IP) amb 100 mg/kg de ketamina (Merial, Duluth, EUA) i 3,3 mg/kg de xilacina (Henry Schein, Melville, EUA)
- Per al model IM, es van immobilitzar els animals i es van injectar 50 μ l de la suspensió cel·lular amb una punció IM a cada cuixa.
- Per al model IV, es van inocular 5×10^5 cèl·lules amb 150 μ l de DMEM per la vena caudal de l'animal immobilitzat.

3.3 Producció de tumors humans en ratolins nu/nu i SCID

La producció de tumors ectòpics es va realitzar segons el mateix protocol d'implantació IM de cèl·lules humanes en ratolins de l'apartat anterior. Al cap de 2-3 setmanes es podia observar l'aparició del tumor a les cuixes.

Les cèl·lules tumorals de pròstata que es van inocular estaven marcades amb RLuc (RLuc-PC3) per a alguns estudis i amb PLuc (G·PLuc-PC3) per a d'altres.

Les cèl·lules tumorals U-87, HPAC i 435-P estaven totes marcades amb la PLuc.

3.4 Inoculació conjunta de cèl·lules tumorals i hAMSC en ratolins

Per produir tumors ectòpics, amb presència de cèl·lules hAMSC, es van utilitzar ratolins nu/nu o SCID, segons l'experiment, i es va seguir el mateix protocol d'implantació IM de cèl·lules humanes en ratolins de l'apartat 3.2, amb la diferència que el volum inoculat en cada cuixa va ser de 100 μ l.

3.5 Implantació de càmeres DBM (Matriu d'os desmineralitzat, demineralized bone matrix)

Amb la finalitat de seguir el procés de diferenciació a os *in vivo* es va fer un model utilitzant càmeres DBM. Aquestes càmeres, construïdes i cedides pel doctor J.A. Andrades^{182,183} (Universidad de Màlaga, Màlaga), es van implantar dorsalment al

llarg de l'esquena de ratolins SCID. Es van implantar 2 DBM per ratolí (Figura 35). El procediment que es va seguir va ser el següent:

- Els animals es van anestesiàr mitjançant una injecció IP amb 100 mg/kg de ketamina i 3,3 mg/kg de xilacina.
- Es va administrar analgèsia (0,05 mg/kg de buprenorfina (Schering-Plough, Kenilworth, EUA)) mitjançant una injecció subcutània (SC).
- Els animals es van immobilitzar d'esquena amunt, es va depilar la zona on es volien implantar els DBM i s'hi va aplicar antisèptic (povidone-iodine, Braun, Melsugnen, Alemanya).
- Es va realitzar una incisió a la pell de l'esquena i es va introduir de manera subcutània el material, mitjançant unes pinces.
- Seguidament es va cosir la pell amb sutures de seda trenades 5-0 (Mersilk, Ethicon, New Brunswick, EUA).
- Els implants es van deixar durant una setmana perquè hi hagués formació de vasos al seu contorn i es van inocular amb 1×10^6 cèl·lules (CL1 i hAMSC) recompostes en 15 μ l de DMEM dins de la càmera DBM per una de les membranes laterals utilitzant una xeringa d'1 ml.



Figura 35- Fotografia dorsal d'un ratolí SCID amb un DBM implantat subcutàniament.

4 BIOLUMINESCÈNCIA NO INVASIVA

Les cèl·lules marcades amb proteïnes bioluminescents i seleccionades per FACS es van poder seguir *in vivo* al llarg del temps gràcies a la BLI. Ja que les luciferases tenen substrats específics, les luciferines, s'han d'administrar a l'animal en el moment de realitzar la mesura. El protocol que es va utilitzar va ser el següent: (Figura 36)

- Els animals es van anestesiar mitjançant una injecció IP amb 100 mg/kg de ketamina i 3,3 mg/kg de xilacina.
- El substrat de la PLuc, la luciferina, es va administrar IV en tots els procediments, a excepció de l'estudi corresponent al cinquè objectiu d'aquesta tesi, el qual es va fer de manera IP. El substrat de la RLuc, la CZN, es va administrar en tots els casos de manera IV a través de la vena caudal dels ratolins.
- El ratolí es va immobilitzar sobre una peça de metacrilat de color negre i es va col·locar a una determinada distància de l'objectiu de la càmera (HFP-Schneider Xenon 0,95/25 mm) d'alta eficiència ORCA-2BT (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japó). Es va fer servir la mateixa distància en cada estudi, però diferent entre els diversos estudis. La distància emprada depenia tant de l'àrea de l'animal on es volia detectar presència de cèl·lules com de la intensitat del senyal que produïen aquestes cèl·lules. Per a tots els estudis, l'objectiu de la càmera es trobava a la màxima obertura.
- Es va prendre una imatge del camp clar durant 125 milisegons i amb un *binning* 2 x 2 (tècnica que aboca el contingut de diferents píxels dels sensor CCD i col·loca el resultat d'aquesta suma en un sol píxel de la imatge final, en aquest cas matrius de 2 x 2 píxels adjacents).
- Immediatament després, i sense moure la posició de l'animal, es va prendre una imatge amb foscor total on es captaven els fotons de llum emesos per les cèl·lules implantades en el ratolí. El temps i el *binning* utilitzats eren diferents per a cada procediment i depenien, tant de la quantitat de cèl·lules com dels fotons emesos per cada una d'aquestes cèl·lules. Així, doncs, per detectar cèl·lules hAMSC, es van prendre imatges de 5 minuts a *binning* 8 x 8, ja que aquestes cèl·lules no proliferaven, mentre que per detectar la llum de tumors molt avançats es van fer imatges de milisegons a *binning* 1 x 1.
- Es va realitzar aquest procediment cada setmana fins que es va finalitzar cada estudi.

4.1 Quantificació de fotons a partir de les imatges

La quantificació dels fotons detectats en cada imatge es va fer mitjançant el programa d'anàlisi d'imatge Wasabi (Hamamatsu Photonics). Els resultats es van expressar com a comptes fotònics (PHCs, *photon counts*). El procediment emprat va ser:

- Mitjançant el programa Wasabi, es va marcar l'àrea d'on es volia fer el càlcul de fotons totals i es van extreure de la memòria de la imatge els PHC captats. Així, doncs, es va obtenir un nombre total de PHC de l'àrea d'estudi.
- De la mateixa manera, es va extreure el nombre del total de PHC d'una àrea de la mateixa imatge on no hi hagués senyal detectable. Això és el que es va anomenar soroll de fons.
- El càlcul net de PHC de l'àrea que es volia estudiar es va fer aplicant la següent fórmula:

(PHC totals de l'àrea d'estudi)- [(mitjana de PHC del soroll de fons) X (nombre total de píxels de l'àrea d'estudi)]

- En els estudis on va ser necessari, es van normalitzar tots els valors de PHC obtinguts durant l'experiment respecte als del dia inicial.

4.2 Estimació del nombre de cèl·lules a partir de la quantificació de fotons

Per tal de poder extrapolar dels resultats de la quantificació total dels PHC, amb un nombre determinat de cèl·lules, es van fer corbes estàndard *in vivo* per als diferents tipus cel·lulars utilitzats al llarg de tota la tesi. Així, doncs, es van inocular IM per a cada tipus cel·lular des de 5×10^2 fins a 1×10^6 cèl·lules recompostes en DMEM, es va injectar el substrat IV corresponent per a cada luciferasa i es van obtenir les imatges.

Es van calcular els PHC totals de cada imatge, generats pel total de cèl·lules inoculades en cada punt. La representació gràfica del nombre de cèl·lules inoculades i dels PHC totals corresponents obtinguts per a cada punt va donar com a resultat una pendent de la corba estàndard que va permetre que es pogués determinar el nombre de cèl·lules que corresponien a un nombre determinat de PHC.

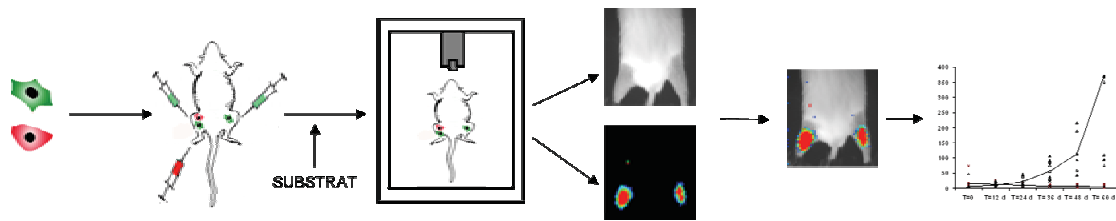


Figura 36- Esquema general del procediment de BLI. El ratolí amb les cèl·lules implantades s'anestesia, se li inocula el substrat per una determinada luciferasa i es fa una foto amb llum clara i una amb fosc total per captar el fotons de llum que provenen de les cèl·lules. Les dues imatges es superposen i alhora se'n obtenen dades que permeten una quantificació exacte tant del procés com de la quantitat de cèl·lules que hi ha en cada moment.

VI. RESUM GLOBAL

Els últims anys, s'han utilitzat les MSC, tant en models com en assajos clínics, per a múltiples aplicacions terapèutiques, entre les qual trobem teràpies regeneratives^{89,184}, tractaments per a malalties de rebuig^{98,185} i teràpies gèniques dirigides^{186,187}. Entre d'altres propietats, s'ha descrit que aquestes cèl·lules potencien l'establiment hematopoètic¹⁸⁸, milloren els problemes de rebuig durant els trasplantaments⁹⁸ i participen en la funcionalitat del sistema immunitari¹⁸⁹. A més, aquestes cèl·lules tenen una gran capacitat proliferant i migratòria, i això fa que siguin bones candidates per a la teràpia gènica mitjançada per cèl·lules. Per això, i gràcies al fet de poder expressar eficientment gens exògens, sense que això provoqui cap efecte en les seves propietats com a cèl·lules mare¹⁹⁰, les MSC s'han modificat genèticament en diferents estudis, per tal que alliberessin agents citotòxics¹³⁰, estimulessin el sistema immunològic¹⁰⁰ o bloqueguessin l'angiogènesi. S'han trobat cèl·lules amb característiques similars a les BMSC en molts d'altres òrgans i teixits, on se sap que tenen una funció de manteniment tissular. En el teixit adipós, s'han trobat MSC amb propietats molt similars a les de la medul·la òssia pel que fa referència als marcadors de superfície¹⁰², a la capacitat de diferenciació als llinatges adipogènic, condrogènic i osteogènic^{110,111} i a l'habilitat de migració cap als tumors¹³⁰. Aquesta capacitat migratòria de les MSC, però, actualment està molt subjecta a controvèrsia, tant pel que fa a l'eficiència d'aquest procés com en l'especificitat⁹⁹.

Una altra consideració important en la utilització d'aquestes cèl·lules és la de la seva bioseguretat, ja que, per exemple, s'ha demostrat que l'expansió *in vitro* de les BMSC de ratolí fa que es produeixin transformacions, que finalitzen amb una producció de sarcomes, després de la implantació d'aquestes cèl·lules en animals¹³¹, a causa d'una gran inestabilitat cromosòmica¹³². Tot i que en molts casos aquestes cèl·lules de ratolí es van expandir molt àmpliament, un estudi en va demostrar la capacitat tumorígena després de només 4 passatges¹³³. D'altra banda, però, diferents estudis van demostrar que les MSC humanes eren molt més resistents a patir una transformació^{133,134,136}. Tot i això, com que l'objectiu principal de tots aquests estudis era el de determinar els efectes de llargs períodes de cultiu *in vitro*, cap no en va seguir els efectes *in vivo* d'un cultiu implantat en l'animal durant un llarg període de temps.

Així doncs, prèviament a la utilització clínica de les cèl·lules mesenquimàtiques com a agents de teràpia cel·lular, cal donar resposta a múltiples preguntes relacionades amb el seu comportament un cop implantades en animals vius, com per exemple la bioseguretat, la capacitat per sobreviure una vegada implantades, la interacció amb les cèl·lules tumorals o el mètode més òptim per a la seva utilització.

Ateses les dificultats que presenta l'anàlisi del comportament de petites poblacions de cèl·lules implantades en animals vius, es va decidir optar per procediments que permetessin observar paràmetres importants del seu comportament com són la capacitat de proliferació, la distribució i l'expressió gènica, de manera no invasiva, sensible i eficaç.

Per poder-ho dur a terme, abans, i com a primer objectiu d'aquesta tesi, va ser necessari desenvolupar un sistema de monitoratge de les cèl·lules que no fos invasiu i que en permetés el seguiment al llarg del temps. Els sistemes no invasius i a temps real de l'expressió gènica, tant en cèl·lules com en organismes, compleixen, en cert grau, un objectiu important, ja que permeten l'observació amb la mínima pertorbació del sistema. Com que en els mamífers no existeixen reaccions luminescents endògenes que contribueixin amb un soroll de fons i existeixen aparells de gran sensibilitat, es va decidir utilitzar gens de fotoproteïnes (luciferases i proteïnes fluorescents) com a traçadores pel monitoratge no invasiu i a temps real del nombre de cèl·lules, distribució i activitat gènica ¹⁶⁵.

Tot i que la manera més simple de transferir dos gens en una mateixa cèl·lula seria la de marcar-la amb dos vectors separats, resultaria molt difícil assegurar la cotransducció d'aquests dos vectors en una mateixa cèl·lula. Per això, s'han desenvolupat moltes estratègies per expressar dos transgens a partir del mateix vector. Una d'aquestes estratègies, àmpliament utilitzada, és la d'emprar un lloc d'entrada intern del ribosoma (IRES, *internal ribosomal entry sites*) que permeti la síntesi proteica del segon gen d'una construcció bicistrònica. Malgrat que hi ha estudis que han demostrat l'expressió eficient de dos o més transgens a partir d'un sol vector utilitzant IRES ^{66,175,191,192}, estudis d'altres grups conclouen que en construccions bicistròniques, l'expressió del gen dependent d'IRES, és molt inferior a la del primer gen, dirigit per un promotor ^{193,194}.

El vector construït per a aquest treball, per tant, va consistir en el gen de la luciferasa PLuc dirigit per un promotor d'expressió constitutiu CMV i en el gen de la EGFP expressat per un promotor més dèbil, però també constitutiu, SV40. En utilitzar dos promotors diferents, evitàvem efectes de recombinació entre les seqüències repetides en el mateix vector i ens asseguràvem que hi hagués una expressió efectiva de tots dos transgens tal i com ja s'havia demostrat en estudis anteriors ¹⁹⁴. A més, per tal de poder infectar tant les cèl·lules en divisió com les cèl·lules no proliferants i que el vector tingués el màxim de bioseguretat, es va fer la construcció a partir d'un esquelet lentivíric SIN. Aquests vectors SIN ja s'havien descrit com a vectors molt segurs per a aplicacions clíniques, ja que un cop integrats, el promotor víric del LTR quedava inactiu i, per tant, l'expressió del transgèn era controlada només pel promotor intern ^{47,53,195}.

Aquest vector lentivíric, doblement marcat, ens va proporcionar avantatges tant per treballar amb bacterïes, com amb cèl·lules i animals. La utilització d'un gen reporter fluorescent ens va permetre un enriquiment, mitjançant una selecció per FACS, de les cèl·lules marcades, així com la detecció d'una sola cèl·lula a través de la microscòpia de fluorescència dels talls histològics. Els gens bioluminescents, per altra banda, ens van permetre, a través de la BLI, la detecció d'un baix nombre de cèl·lules en cultiu *in vitro* i un seguiment de la supervivència, proliferació, migració i diferenciació de les cèl·lules implantades en models animals. A nivell bacterià, a més, ens va permetre seleccionar els clons d'*Escherichia coli* positius per a aquesta construcció.

Per assolir el segon objectiu d'aquesta tesi, les hAMSC que volíem sotmetre a estudi es van marcar mitjançant aquest vector i, per FACS, es va seleccionar el 5% amb una expressió més alta d'EGFP. Les cèl·lules seleccionades i marcades amb els dos gens reporters van demostrar que mantenien la capacitat de diferenciació a adipogènesi, condrogènesi i osteogènesi, i que, per tant, mantenien les característiques de cèl·lules mesenquimàtiques, fet que coincidia amb estudis previs¹²⁹. A més, també vam observar que, un cop diferenciades, les hAMSC mantenien l'expressió dels gens reporters i no mostraven diferències significatives en la capacitat de proliferació en comparació amb cèl·lules sense marcar.

Com ja podíem esperar, les cèl·lules marcades (G·PLuc-hAMSC) implantades per via sistèmica en els pulmons dels ratolins es van detectar, mitjançant la BLI, amb més sensibilitat que no pas les cèl·lules implantades intramuscularment en les cuixes. Així mateix, aquestes cèl·lules implantades en l'animal es detectaven amb molta menys sensibilitat que les mateixes cèl·lules en cultiu, on una sola cèl·lula es podia detectar per BLI. Aquesta reducció en el senyal era degut a l'absorció de la llum pels teixits i coincidia amb estudis anteriors on s'havia observat que la transmissió de llum depenia del tipus de teixit, del seu contingut vascular i de la fondària on es trobaven implantades les cèl·lules¹⁷⁶.

Un cop implantades intramuscularment en els ratolins nus, i mitjançant BLI, vam detectar que el 75% de les cèl·lules G·PLuc-hAMSC es perdien durant la primera setmana, fet que ens va fer pensar que era degut a la interacció amb el microentorn extracel·lular poc favorable en el qual es van implantar. Aquest efecte coincidia amb un treball paral·lel on van veure que determinades cèl·lules tumorals implantades morien fins a 3 dies després de la injecció i feren la hipòtesi que era degut a la mala unió amb la matriu extracel·lular i a factors de creixement¹⁴⁸. Passada, però, aquesta crisi inicial, les G·PLuc-hAMSC es van mantenir estables al llarg de les 32 setmanes de monitoratge, temps durant el qual es va detectar una senyal més o menys constant de fotons. Aquests resultats demostraven, per tant, que les hAMSC un cop implantades

no proliferaven i es mantenien en un estat estable. A més, al cap de 8 mesos de monitoratge, no es va detectar presència de tumors en cap dels animals implantats, i les cèl·lules recuperades a partir d'explants dels músculs on s'havien implantat les hAMSC i sotmeses a una hibridació comparativa de genòmic (CGH, *comparative genomic hybridization*) no presentaven desequilibris cromosòmics. Tot i les limitacions d'aquesta tècnica per detectar mutacions puntuals, microdeleccions, microduplicacions, inversions i translocacions equilibrades tampoc no es van veure híbrids entre cèl·lules humanes i murines. Histològicament, les G-PLuc-hAMSC implantades als músculs es van detectar enmig de les fibres musculars sense cap estat de diferenciació morfològicament aparent. Per altra banda, i coincidint amb altres treballs fet amb AMSC humanes i BMSC murines respectivament ^{130,196}, també vam detectar hAMSC al fetge de tots els ratolins monitorats des del moment inicial fins al final de l'estudi, cosa que demostrava que aquestes cèl·lules migraven, o bé es quedaven retingudes, en determinats òrgans.

Les hAMSC injectades a través de la vena caudal, en canvi, van demostrar un patró de distribució diferent, començant als pulmons i acabant al cap d'una setmana al fetge, on es van mantenir durant els 8 mesos de l'assaig. Aquesta filtració de cèl·lules en els pulmons havia estat prèviament descrita tant per les BMSC humanes ¹⁰⁴ i murines ¹⁹⁶ com per les hAMSC ¹³⁰ injectades intravenosament en ratolins, i està d'acord amb el fet que les injeccions intravenoses amb un nombre més elevat de $0,5 \times 10^6$ cèl·lules hAMSC produïen la mort del ratolí per asfíxia i que amb la utilització d'una substància vasodilatadora de manera prèvia a la injecció IV de les MSC, que inhibia l'agregació i adhesió de les plaquetes i augmentava el diàmetre dels capil·lars pulmonars, es reduïa considerablement el nombre de cèl·lules retingudes als pulmons ¹⁹⁶. Les cèl·lules que havien quedat retingudes es morien, possiblement a causa de l'estrès oxidatiu dels pulmons, mentre que les que es recirculaven migraven cap al fetge. Dels resultats d'aquest estudi, es podia concloure, doncs, que les hAMSC podien ser candidates segures com a vehicles per a diferents tipus de teràpies.

El tercer objectiu d'aquesta tesi va ser comprovar el comportament de les cèl·lules hAMSC implantades conjuntament amb cèl·lules tumorals i determinar si aquestes dues poblacions podien viure conjuntament durant un determinat període de temps. Per dur a terme aquest objectiu, un tipus cel·lular de càncer de pròstata humà, PC-3, es va marcar constitutivament amb la RLuc, que ja havia permès prèviament el monitoratge de dues poblacions cel·lulars en el mateix animal ¹⁶³. Tot i que no hi havia solapament de substrats entre la RLuc i la PLuc, vam observar que la PLuc tenia una cinètica d'acció duradora, i es podia detectar hores després de la seva inoculació, -en tumors molt grans, s'arribava a detectar al cap de 24 hores- i que la RLuc, en canvi,

tenia la seva activitat màxima segons després d'haver-la inoculat, i es perdia al cap de pocs minuts. Aquests resultats, per tant, coincidien amb estudis previs de les dues luciferases ¹⁶³. Així doncs, l'ordre de detecció de les luciferases va ser sempre en dies consecutius, per evitar solapament dels senyals.

Les G-PLuc-hAMSC inoculades conjuntament amb les cèl·lules tumorals RLuc (RLuc-PC3) implantades en ratolins nus es van seguir durant 6 setmanes, durant les quals es va observar un creixement normal del tumor. Alhora, però, es va detectar una pèrdua del 60% de les hAMSC durant les primeres setmanes i, passat aquest període, es mantingueren estables fins al final de l'experiment. Això coincidia amb els nostres resultats previs de supervivència de les hAMSC en les cuixes dels ratolins nus. A més, aquests resultats ens indicaven que les PC-3 no potenciaven el creixement de les hAMSC, contràriament al que s'havia descrit en altres treballs per a altres tipus de cèl·lules tumorals com les MDA 231 de mama ¹⁰⁰. Paral·lelament, vam poder observar un lleuger augment, tot i que no era significatiu, de les cèl·lules tumorals RLuc-PC3 en aquells ratolins amb tumors implantats conjuntament amb cèl·lules hAMSC en comparació als ratolins amb tumors controls. Aquest efecte potenciador dels tumors PC-3, estava en concordança amb altres estudis anteriors on s'havia demostrat que la capacitat immunosupressora de les MSC potenciava el creixement de les cèl·lules murines de melanoma ¹⁴⁹. És possible que a dosis superiors de hAMSC, l'efecte sobre el creixement dels tumors PC-3 fos diferent, com era el cas de les MSC murines inoculades en tumors Renca, les quals tenien efectes proliferants o antiproliferants sobre els tumors depenent de la dosi ¹⁹⁷. Els resultats del nostre estudi, doncs, demostraven que les cèl·lules hAMSC podien viure entre els tumors PC-3 durant llargs períodes de temps sense que això tingués efectes significatius sobre el creixement d'aquest tumor.

El següent objectiu que ens havíem plantejat era el de determinar si les cèl·lules hAMSC podien ser útils com a vehicles cel·lulars suïcides, per tal de dur a terme una teràpia gènica citotòxica. Amb aquesta finalitat es van marcar les cèl·lules hAMSC amb el vector hrl-mrfp-ttk. Aquesta construcció permetia l'expressió d'una proteïna quimèrica, que a més de ser un traçador amb activitat RLuc i fluorescència vermella, tenia activitat timidina quinasa, que és citotòxica en presència del substrat GCV. Això permetia que aquestes cèl·lules es poguessin utilitzar com a agents terapèutics.

Les hrl-mrfp-ttk-AMSC van demostrar ser efectives *in vitro*, ja que cultivades conjuntament amb cèl·lules tumorals PC-3 van produir una mortalitat del 90% en aquestes últimes quan s'afegia GCV al cultiu, com ja s'havia demostrat en estudis previs ⁶⁷.

Gràcies a aquesta informació es va desenvolupar un model de teràpia que es va basar en ratolins nus, en els quals es van implantar cèl·lules G·PLuc-PC-3 soles en una pota i una barreja de cèl·lules G·PLuc-PC-3 i hrl-mrfp-ttk-hAMSC, amb una proporció de 1:4, respectivament, a la pota contralateral. D'aquesta manera, vam aconseguir reduir la variabilitat entre animals i sotmetre ambdues poblacions (tumors sols i barrejats) al mateix ambient fisiològic i al mateix tractament. Mitjançant la BLI vam poder fer el seguiment paral·lel de les dues poblacions cel·lulars a temps real durant el desenvolupament dels tumors i al llarg del tractament. Vam observar que el tractament amb GCV era efectiu i es produïa la mort de les cèl·lules suïcides i una disminució progressiva de la llum PLuc, emesa a partir de les cèl·lules tumorals. A causa de la mort de totes les cèl·lules suïcides, es van fer inoculacions addicionals de hrl-mrfp-ttk-hAMSC per mantenir l'efecte terapèutic. Així, doncs, al final del tractament, que es va determinar per raons ètiques atesa la gran mida dels tumors controls, es va aconseguir una notable disminució del 98.5% en els tumors conjunts en comparació amb els tumors sols.

Paral·lelament, en els grups d'animals controls, amb el mateix tipus d'implantació de cèl·lules a les potes, però tractats amb aigua, es va observar un creixement normal dels tumors sense cèl·lules i un lleuger increment en el creixement dels tumors barrejats, tot i que no era significatiu, cosa que confirmava els nostres resultats previs.

Els resultats obtinguts gràcies a aquest model van demostrar que: a) les cèl·lules hAMSC autòlogues podien ser vehicles efectius d'alliberació de productes de gens citotòxics i produir un efecte adjacent a les cèl·lules tumorals veïnes; b) que una teràpia efectiva requeriria una dosi relativament gran de cèl·lules terapèutiques, possiblement difícil d'aconseguir mitjançant la migració de les cèl·lules administrades sistèmicament; c) que la inoculació directe de les AMCS com a vehicles de gens citotòxics, per tant, podria ser una opció en situacions especials quan no és possible la cirurgia o bé per tractar els contorns dels tumors, un cop extrets, per eliminar les cèl·lules tumorals residuals existents i d) que l'estratègia de monitoratge a temps real dels dos tipus cel·lulars, que va permetre determinar el nombre de cèl·lules suïcides necessàries per aconseguir un determinat grau de teràpia, permetia també el desenvolupament de teràpies antitumorals controlant altres paràmetres, com els tipus de cèl·lules terapèutiques, gens suïcides/agents, dosis i protocols d'administració.

Mitjançant el model de marcatge de dos tipus cel·lulars i monitoratge per BLI, també vam intentar detectar migració de les cèl·lules hAMSC injectades per la vena caudal cap als tumors PC-3 implantats en les cuixes del animals immunodeprimits. En cap cas, i en contradicció amb estudis d'altres grups ¹³⁰, no vam obtenir una evidència de migració de les cèl·lules injectades cap als tumors. En un estudi concret,

observaven, per mitjà de tècniques histològiques, la migració de cèl·lules hAMSC en tumors subcutanis després de la inoculació sistèmica d'aquestes cèl·lules. Això es correlacionava amb els nostres resultats, ja que, tot i que hi hagués migració de cèl·lules en el nostre model concret, mitjançant la tècnica de BLI, ens trobàvem sota el llindar mínim de detecció de fotons a causa de la poca quantitat de cèl·lules que hi migraven. D'aquí vam concloure que, per al nostre objectiu concret, aquest sistema d'alliberació de cèl·lules als tumors no era el més adequat per obtenir un efecte terapèutic desitjat. Per aquest fet, els estudis que es van fer en l'assaig per determinar si les hAMSC podien ser vehicles cel·lulars citotòxics, sempre es van fer amb inoculacions cel·lulars directe als tumors.

Un altre objectiu d'aquesta tesi també va ser el de veure els efectes que les hAMSC produïen en el creixement dels diferents tumors i alhora comprovar si els tumors exercien algun tipus d'efecte sobre les mateixes cèl·lules hAMSC. Per això, i partint del model *in vivo* de detecció de dues poblacions cel·lulars marcades amb diferents luciferases, es va fer un model on s'utilitzaren una bateria de tipus tumorals diferents amb i sense presència de hAMSC. Els resultats van ser molt diferents entre els diferents tipus cel·lular, de manera que vam trobar línies tumorals humanes, les 435 P (de càncer de mama) i les PC-3 (d'adenocarcinoma de pròstata), en les quals les hAMSC provocaven un augment significatiu en el creixement del tumor, una línia, la U-87 MG (de glioblastoma), en la qual les hAMSC provocaven una disminució de la proliferació del tumor i una última línia, la HPAC (d'adenocarcinoma de pàncrees), que no patia cap canvi significatiu si estava o no creixent amb presència de les hAMSC. Aquests resultats podrien ser deguts a una activitat immunosupressora ^{147,149} o modificadora de la capacitat de l'angiogènesi ¹⁹⁸, que afectés també la proliferació del tumor.

L'efecte d'inhibició observat en el creixement del tumor U-87 MG coincidia amb un estudi previ on es veia que les MSC humanes derivades de la pell inhibien l'angiogènesi en un model de tumor xenoempelt ¹⁹⁸; en canvi, estava en contradicció amb un estudi on es veia que les hAMSC potenciaven el creixement de tumors inoculats a partir d'aquesta línia de manera subcutània i intracranial ¹⁴⁸.

Amb aquest mateix estudi, vam poder observar que les cèl·lules tumorals també produïen efectes diferents a les hAMSC injectades. Així, doncs, en el cas de les línies U-87 MG, 435 P i HPAC, les hAMSC patien un augment en la proliferació durant la primera setmana i després anaven disminuint de manera més o menys progressiva fins mantenir-se estables. Les PC-3, en canvi, no produïen cap increment en la proliferació i es veia una pèrdua de les hAMSC des de l'inici de la inoculació fins al final de l'experiment. Tot i que hi ha estudis que apunten al fet que la TK procedent del

virus d'herpes provoca una resposta immunològica en humans ¹⁹⁹, n'hi ha un que apunta que, perquè això passi, el sistema immunològic ha de ser totalment competent ²⁰⁰. En els nostres models d'animals immunodeprimits, per tant, la pèrdua de cèl·lules per part del sistema immunitari seria pràcticament inexistent.

Aquest model, doncs, podria ser d'utilitat per determinar de manera ràpida i a temps real les interaccions que es produirien entre un tipus de tumor i la cèl·lula vehicle per al desenvolupament de teràpies antitumorals.

Un altre objectiu paral·lel i relacionat amb la utilització de cèl·lules mesenquimàtiques per a la teràpia cel·lular va ser determinar si, a més la proliferació i distribució de les hAMSC, també era possible detectar, mitjançant BLI, canvis en l'expressió de certs gens indicadors de la inducció de la diferenciació cel·lular. El gen elegit va ser Col2A1, que és un gen clau en el pas de la diferenciació de cartílag a os. Aquest gen té interès per tal de monitorar de manera no invasiva la diferenciació de les hAMSC utilitzades per a la reparació de teixit connectiu, cartílag i os. Per això, el promotor d'aquest gen es va clonar dirigint la luciferasa PLuc en un vector lentivíric, que es va utilitzar per marcar les cèl·lules hAMSC, a més d'una línia de cèl·lules mesenquimàtiques murines anomenada CL1.

Els nostres resultats van demostrar que en la línia murina CL1, que es diferencia espontàniament a condrocit i adipòcit i que es pot diferenciar selectivament a condrocit amb l'addició de TGF- β 1, l'expressió de PLuc detectada per BLI augmentava significativament durant el procés de diferenciació en comparació amb els cultius controls paral·lels. Aquest augment en la producció de llum anava acompanyat d'un augment en l'expressió del gen COL2A1, així com del Sox9, en concordança amb tots els estudis que demostraven que el Sox9 intervenia en la condrogènesi ²⁰¹⁻²⁰³. La diferenciació a condrocit també es va poder demostrar *in vitro*, per mitjà de la detecció de l'activitat de la luciferasa en els lisats cel·lulars diferenciats.

En experiments similars, però utilitzant cèl·lules AMSC humanes, transduïdes amb la construcció COL2A1-PLuc, la diferenciació a condrocit mitjançant el tractament amb medi de diferenciació, va donar lloc també a un increment en la producció de llum, acompanyat d'un canvi fenotípic a condrocit i augments estadísticament significatius en l'expressió de ARNm dels gens COL2A1 i Sox9.

Aquests resultats demostraven que: a) en la nostra construcció COL2A1-PLuc la luciferasa s'expressava de manera dirigida pel promotor COL2A1 humà, en correlació amb l'expressió del gen del COL2A1 i el gen Sox9 ¹⁸¹ i que, a més, la integració de la construcció reportera en el genoma cel·lular no era obstacle per l'expressió regulada i b) el promotor humà servia com a traçador de l'expressió de gens tant en cèl·lules humanes com murines, ja que hi ha força homologia entre ambdós promotors ¹⁸¹. En

conclusió, doncs, vam veure que podiem utilitzar la construcció COL2A1·PLuc com a traçadors de l'expressió del gen COL2A1.

Finalment, vam utilitzar un sistema osteoinductiu, prèviament establert, que consistia en matrius d'os desmineralitzat (DBM) per demostrar la utilització dels procediments de BLI en la detecció de la diferenciació cel·lular. En aquestes càmeres s'indueix os de nova formació en etapes seqüencials que inclouen formació de condroblasts, amb la formació de les proteïnes de matriu específiques de cartílag, abans de passar a condrocits hipertròfics, moment en el qual es comença a formar os endocondral ^{182,204,205}.

A diferència dels experiments *in vitro*, on l'activitat específica de la luciferasa es podia mesurar fàcilment amb relació de llum/ng d'ADN, això no es podia aconseguir amb les cèl·lules implantades. En aquests experiments, per tal de poder relacionar els canvis en l'expressió de PLuc amb canvis en l'expressió gènica per cèl·lula, vam marcar les cèl·lules CL1 i hAMSC amb dos gens reporters diferents. Per una banda, es van marcar amb la construcció COL2A1·PLuc, que ens mostrava l'expressió de COL2A1 i, per altra banda, amb una construcció que constitutivament, a partir d'un promotor CMV, expressava la RLuc (CMV·RLuc) i que ens permetia quantificar el nombre de cèl·lules. Així, la correlació entre PLuc/RLuc, ens reflectia els canvis en l'expressió gènica/cèl·lula.

Les càmeres implantades subcutàniament en animals immunodeprimits es van sembrar, per inoculació, amb cèl·lules CL1 o hAMSC, doblement marcades, i els canvis d'expressió gènica, durant les sis setmanes posteriors, es van monitorar mitjançant la BLI. Mentre que per a les CL1 el rang dinàmic $(\text{PLuc/RLuc})_{t_0}/(\text{PLuc/RLuc})_{t_i}$ va augmentar progressivament fins arribar a les 256 vegades al final de l'estudi, les hAMSC van demostrar un rang dinàmic més discret, entre la primera i quarta setmana, d'unes 3 vegades, cosa que estaria amb concordança amb estudis on conclouen que les AMSC tenien menys potencial de diferenciació al llinatge condrogènic que MSC derivades d'altres teixits ^{126,206}, i al fet que dins de les càmeres DBM al cap d'unes quatre setmanes es donés el pas a condrocits hipertròfics i, per tant, l'inici de l'ossificació endocondral, moment en què es deixava d'expressar col·lagen. Els canvis en el rang dinàmic observat amb BLI *in vivo* es va verificar mitjançant tincions histològiques de les càmeres en diferents punts de l'estudi. Així, doncs, per al cas de CL1, es va detectar presència de cartílag, gràcies a tinció d'Alcian Blue, al llarg de tot l'estudi, cosa que estava en concordança amb l'expressió creixent de llum i amb els estudis on demostren que les CL1 només eren capaces de produir adipogènesi i condrogènesi ^{178,179}. Semblaria que aquestes CL1 es quedarien aturades en aquest estadi, mentre que en les càmeres injectades amb

hAMSC, en canvi, es va veure presència de cartílag fins a la quarta setmana, moment en què predominaria el procés de formació d'os nou, en detriment de l'expressió de cartílag, tal com ja s'havia descrit per a aquest tipus de material amb BMSC²⁰⁷, el qual es va poder detectar l'última setmana.

Conclusions

El sistema desenvolupat en aquesta tesi, basat en el seguiment no invasiu de cèl·lules que expressen gens reporters de la luciferasa implantades en animals vius, ens ha permès concloure que:

1. El vector lentivíric construït, que contenia un gen bioluminescent i un gen fluorescent, va demostrar múltiples avantatges, ja que va permetre la selecció dels clons bacterians mitjançant BLI, la selecció cel·lular per FACS, el seguiment *in vivo* de les cèl·lules implantades en animals mitjançant BLI i l'anàlisi histològic per fluorescència.
2. Les hAMSC, marcades amb el vector lentivíric i seleccionades, seguien demostrant capacitat de cèl·lula mare en demostrar adipogènesi, condrogènesi i osteogènesi. Aquestes cèl·lules continuaven expressant tant el gen de la EGFP com de la PLuc després de la seva diferenciació.
3. Les hAMSC marcades i seleccionades van demostrar un límit de detecció d'una sola cèl·lula per a un cultiu *in vitro*, que va disminuir en implantar-les *in vivo*, a causa d'una reducció del senyal per part dels teixits de l'animal.
4. Les hAMSC marcades i mantingudes en l'animal durant 8 mesos van demostrar que no proliferaven després de la seva implantació, que es mantenien estables, que no formaven tumors i que no presentaven desequilibris cromosòmics greus. A més, en tots els casos, es van detectar cèl·lules marcades al fetge de l'animal, on es van mantenir estables fins als 8 mesos. Les hAMSC, per tant, podien ser candidates segures per a teràpies autòlogues mitjançades per cèl·lules.
5. Les hAMSC marcades inoculades per la vena caudal dels ratolins nus es quedaven retingudes als pulmons durant una setmana, d'on acabaven desapareixent.

6. La luciferases PLuc i la RLuc van demostrar ser molt específiques per al seu substrat, sense que hi hagués activitat creuada, i una cinètica molt diferent entre elles, cosa que ens va permetre poder detectar dues poblacions cel·lulars a temps real i en el mateix animal. El substrat de la RLuc mostrava senyals no específics si s'administrava mitjançant sistemes diferents a l'intravenós. Amb la utilització de dues luciferases diferents, per tant, es va poder fer un seguiment *in vivo*, no invasiu i a temps real de dues poblacions diferents de cèl·lules en el mateix animal.
7. Les hAMSC marcades van demostrar que podien viure en tumors PC3 durant un període llarg de temps, que no proliferaven i que es mantenien estables després de la pèrdua inicial de cèl·lules.
8. Les hAMSC marcades amb el gen suïcida TK van demostrar la seva efectivitat *in vitro* i *in vivo* quan s'administrava la prodroga corresponent. Així mateix, es va observar que aquestes cèl·lules produïen la mort de les cèl·lules veïnes mitjançant un efecte adjacent arribant a una disminució tumoral de fins un 98,5%.
9. El model de visualització *in vivo*, de les hAMSC suïcides inoculades conjuntament amb les cèl·lules tumorals, ens va permetre determinar el nombre necessari de cèl·lules suïcides per aconseguir un determinat efecte adjacent en les cèl·lules tumorals gràcies al monitoratge *in vivo* per BLI de les dues poblacions cel·lulars. Aquest model, doncs, podria ser de gran utilitat per determinar dosis entre cèl·lules, nous tipus cel·lular, agents i protocols d'administració en les noves teràpies antitumorals.
10. Una mateixa població cel·lular es podia marcar i monitorar utilitzant dues luciferases diferents: una amb un promotor específic de teixit i l'altra amb un promotor constitutiu integrats permanentment en el genoma.
11. Mitjançant la BLI es van poder detectar canvis específics de teixit en l'expressió d'un gen involucrat en la diferenciació de les cèl·lules CL1 i hAMSC.
12. El procediment de la BLI ens va permetre monitorar els canvis en l'expressió gènica i la diferenciació de cèl·lules CL1 i hAMSC implantades en animals vius.

VII. PUBLICACIONES

1 PRIMERA PUBLICACIÓ

Biodistribution, long term survival and safety of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells transplanted in nude mice by high sensitivity non-invasive bioluminescence imaging.

Biodistribució, llarga supervivència i seguretat de les cèl·lules humanes mesenquimàtiques derivades de teixit adipós trasplantades en ratolins nus i monitorades per bioluminescència no invasiva i d'alta sensibilitat.

Marta Vilalta ¹, Irene R. Décano¹, Juli Bagó¹, David Gould², Mònica Santos³, Mariano García-Arranz⁴, Ramon Ayats⁵, Carme Fuster³, Yuti Chernajovsky², Damián García-Olmo⁴, Nuria Rubio¹ and Jerónimo Blanco¹

1. Centre d'investigació Cardiovascular (CSIC-ICCC), Hospital de Sant Pau, Barcelona 08025, Spain
2. Bone and Joint Research Unit, Barts and The London, Queen Mary's School of Medicine and Dentistry, Charterhouse Square, London EC1M 6BQ, UK.
3. Unitat de Biologia Cel·lular i Genètica Mèdica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193, Spain
4. Unidad de Terapia Celular, Hospital Universitario La Paz, 28046 Madrid, Spain.
5. Departament d'Hematologia, Hospital de Sant Pau, Barcelona 08025, Spain.

Stem Cells Dev. 2008 Oct;17(5):993-1003

Les cèl·lules mare mesenquimàtiques de medul·la òssia (MSC) de ratolí acumulen, amb força freqüència, anormalitats cromosòmiques, es transformen en oncogèniques i generen sarcomes quan es trasplanten en ratolins. Tot i que les MSC humanes semblen molt més resistents, també s'han observat transformacions oncogèniques en cèl·lules cultivades un cop passada la fase de senescència.

La teràpia cel·lular per a la regeneració de teixits, mitjançant l'ús de MSC humanes autòlogues, requereix el trasplantament de cèl·lules que prèviament s'hagin expandit *in vitro*. Una qüestió important que cal determinar, per tant, és si la

transformació oncogènica és una conseqüència necessària dels processos d'expansió d'aquestes cèl·lules.

Per determinar-ho, en aquest estudi vam analitzar la capacitat de proliferació, la colonització específica d'òrgans i la capacitat oncogènica de les cèl·lules mare mesenquimàtiques de teixit adipós humà (hAMSC). Aquestes cèl·lules es van marcar alhora amb una proteïna fluorescent i una proteïna bioluminescent, i es van implantar en ratolins immunodeprimits durant un període prolongat de temps (8 mesos). Durant aquest temps les cèl·lules marcades es van monitorar mitjançant un procediment d'imatge bioluminescent (BLI) no invasiu.

Els nostres resultats van demostrar que el fetge era l'òrgan diana preferit per a la colonització de les hAMSC després d'implantar-les tant de manera intramuscular com intravenosa. A més, les cèl·lules implantades tenien tendència a mantenir-se estables, no proliferaven ràpidament després de la implantació i no es van detectar ni anormalitats cromosòmiques ni formació de tumors durant els 8 mesos de residència d'aquestes cèl·lules en els teixits de l'hoste.

Semblaria, doncs, que les hAMSC, a diferència de les cèl·lules mesenquimàtiques murines, podrien ser candidates segures per a procediments de teràpia cel·lular, ja que en els nostres estudis no van demostrar una predisposició detectable a la transformació oncogènica després del seu cultiu *in vitro* i de la seva implantació en ratolins.

2 SEGONA PUBLICACIÓ

Human adipose tissue derived mesenchymal stromal cells as vehicles for tumor bystander effect. A model based on bioluminescence imaging.

Cell-based bystander therapy bioluminescence model.

Cèl·lules mare mesenquimàtiques humanes de teixit adipós com a vehicles per a un efecte adjacent en tumors. Un model basat en procediments d'imatge de bioluminescència.

Model bioluminescent de teràpia adjacent mitjançada per cèl·lules.

Marta Vilalta¹, Irene R. Dégano¹, Juli Bagó¹, Elisabeth Aguilar¹, Sanjiv S Gambhir²,
Nuria Rubio¹, Jerónimo Blanco¹

¹ Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, CIBER-BBN, Barcelona, Spain

² Department of Radiology the Bio-X Program, Stanford University, Us

Gene Ther. 2008 Dec 18. [Epub ahead of print]

Les cèl·lules mare mesenquimàtiques de teixit adipós (AMSC) comparteixen trets comuns, inclòs el potencial de diferenciació i els marcadors de superfície cel·lular, amb les seves homòlogues de la medul·la òssia. Per la seva gran disponibilitat, abundància i facilitat d'aïllament, les AMSC podrien ser vehicles autòlegs molt útils per a la teràpia localitzada en tumors.

En aquest estudi vam posar a punt un model per al desenvolupament de teràpies tumorals basat en l'ús de les AMSC com a vehicles cel·lulars per obtenir un efecte adjacent en les cèl·lules tumorals que es pogués monitorar de manera no invasiva i contínua mitjançant la bioluminescència. Les AMSC expressaven la luciferasa de *Renilla* i un gen suïcida, la timidina quinasa, mentre que les cèl·lules tumorals, cèl·lules de pròstata humanes, expressaven la luciferasa de *Firefly*. L'efecte adjacent produït en

les cèl·lules tumorals era mediat pel ganciclovir. Aquest model, doncs, incloïa un procediment d'imatge bioluminescent pel monitoratge no invasiu i a temps real d'ambdues poblacions de cèl·lules, les AMSC i les tumorals.

Per mitjà d'aquest estudi, vam demostrar que les AMSC sobreviuen en els tumors per llargs períodes de temps, vam optimitzar la relació entre les AMSC i les cèl·lules tumorals per a la teràpia i vam determinar-ne l'efecte terapèutic a temps real.

El tractament de ratolins que tenien tumors de pròstata conjuntament amb cèl·lules terapèutiques AMSC amb la prodroga ganciclovir produïa un efecte de mort cel·lular adjacent, de manera que el nombre de cèl·lules tumorals es reduïa un 98,5% respecte als tumors controls, on no hi havia presència d'AMSC. Així, doncs, les AMSC podien ser útils com a vehicles d'alliberació en la teràpia localitzada, amb força potencial per a l'aplicació clínica, com per exemple en tumors inoperables i en els contorns de la cirurgia després de la resecció del tumor.

Aquesta aproximació, que és molt útil per avaluar l'eficiència de models terapèutics, podria facilitar la selecció de tipus de cèl·lules, dosis, agents terapèutics i protocols per al tractament de tumors específics amb teràpies basades en cèl·lules.

3 TERCERA PUBLICACIÓ

Non-invasive monitoring of mesenchymal stromal cells chondrogenic differentiation by dual luciferase bioluminescence imaging for connective tissue repair.

Monitoratge no invasiu de la diferenciació condrogènica de les cèl·lules mare mesenquimàtiques per a la reparació de teixit connectiu mitjançant bioluminescència de dues luciferases.

Marta Vilalta¹, Irene R. Décano¹, Yuti Chernajovsky², David Gould², Danièle Noël³, Christian Jorgensen³, José Antonio Andrades⁴, José Becerra⁴, Nuria Rubio¹, Jerónimo¹ Blanco

1. Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, CIBER-BBN, Barcelona, Spain
2. Bone and Joint Research Unit, Barts and The London, Queen Mary's School of Medicine and Dentistry, Charterhouse Square, London EC1M 6BQ, UK.
3. INSERM U844, UM1, Montpellier, F-34091, and Université Montpellier 1, UFR Médecine, Montpellier, F-34000, and Inserm U896, Montpellier, F-34298
4. Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

Article en revisió a la revista *Biomaterials*.

El monitoratge no invasiu, mitjançant la bioluminescència, dels canvis d'expressió de determinats gens facilitaria l'estudi dels factors de regulació que participen en la diferenciació cel·lular que té lloc *in vivo*, i el desenvolupament de combinacions de cèl·lules mare amb diferents esquelets per a la teràpia cel·lular.

En aquest estudi vam demostrar que la línia cel·lular murina de medul·la òssia (CL1) i les cèl·lules mare mesenquimàtiques derivades de teixit adipós (hAMSC) es podien transduir permanentment amb el gen reporter de la luciferasa de *Firefly* (PLuc)

dirigit a partir del promotor específic de teixit procollagen II (COL2A1). Durant la diferenciació condrogència d'aquests dos tipus cel·lulars marcats hi havia una inducció de l'expressió de PLuc que anava acompanyada d'un canvi fenotípic, característic dels condrocits. A més, paral·lelament, es produïa un augment en l'expressió del gen COL2A1 i del factor de transcripció SOX9.

Per tal de poder fer un seguiment *in vivo* no invasiu, les CL1 i les hAMSC es van marcar per duplicat. Es va utilitzar la construcció COL2A1·PLuc com a marcador de la diferenciació cel·lular i una construcció amb el gen de la luciferasa de *Renilla* (RLuc) expressat a partir del promotor constitutiu CMV (CMV·RLuc) que ens indicava la proliferació d'aquestes cèl·lules sembrades en matrius d'os desmineralitzat (DBM) implantades subcutàniament en ratolins immunodeprimits SCID.

La bioluminescència no invasiva va permetre monitorar els ratolins amb els implants i vam observar canvis importants (en les CL1) i moderats (en les hAMSC) en la relació d'expressió entre PLuc/RLuc durant un període de 6 setmanes. Aquest resultat ens indicava els diferents patrons de diferenciació condrogència de les cèl·lules implantades d'acord amb els resultats de les anàlisis histològiques dels talls dels DBM.

Aquest model, doncs, facilitaria el desenvolupament de combinacions entre cèl·lules progenitores i esquelets per la reparació de teixits, així com l'anàlisi de factors que modulen l'activitat de determinats gens durant la diferenciació cel·lular.

4 QUARTA PUBLICACIÓ

Tumor growth modulation of human adipose tissue derived mesenchymal stromal cells monitored by non invasive bioluminescence imaging.

Monitoratge de la modulació del creixement tumoral degut a les cèl·lules mare mesenquimàtiques derivades de teixit adipós mitjançant procediments d'imatge no invasius de bioluminescència.

Marta Vilalta¹, Irene R. Dégano¹, Juli Bagó¹, Elisabeth Aguilar¹, Núria Rubio¹, Jerónimo Blanco¹.

¹Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, CIBER-BBN, Barcelona, Spain

Article en preparació. Pendent d'enviar.

L'ús de les cèl·lules mare mesenquimàtiques de medul·la òssia (BMSC) i de les derivades de teixit adipós (AMSC) com a vehicles alliberadors, degut a la seva capacitat de migració als tumors, requereix l'estudi tant de la capacitat de supervivència d'aquestes cèl·lules en el tumors com de la seva habilitat per promoure o inhibir el creixement tumoral.

En aquest estudi vam utilitzar un marcatge de doble bioluminescència per tal de monitorar, de manera no invasiva i a temps real, el comportament de les cèl·lules tumorals i mesenquimàtiques implantades conjuntament durant el desenvolupament del tumor. Les línies tumorals humanes de glioma U-87MG, de càncer de mama 435-P, de pàncrees HPAC i de pròstata PC-3 es van marcar mitjançant una transducció lentivírica per tal que expressessin la luciferasa de *Photinus pyralis* (PLuc) i es van implantar intramuscularment en les cuixes dels ratolins SCID conjuntament amb hAMSC que expressaven la luciferasa de *Renilla reniformis* (RLuc).

Els nostres resultats van demostrar que les hAMSC tenien un comportament relativament constant en els quatre tipus de tumors diferents, amb una fase inicial on el nombre de cèl·lules es va mantenir estable o va patir un creixement, seguit d'una segona fase de disminució progressiva. Per altra banda, les cèl·lules tumorals, tenien comportaments molt diferents amb presència de les hAMSC, de manera que els

tumors 435-P de mama i PC-3 de pròstata patien una estimulació i proliferaven, mentre que en els tumors HPAC de pàncrees no s'observava cap efecte i els tumors U-87 de glioma patien una inhibició del seu creixement.

Aquesta estratègia facilitaria la comprensió de les interaccions entre el tumor i l'estroma i ajudarien al desenvolupament de teràpies cel·lulars mitjançades per cèl·lules.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 2007; **57**: 43-66.
2. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, K. R, J.D. W. *Molecular Biology of The Cell*. 1994; **Third Edition**.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; **100**: 57-70.
4. Soto AM, Sonnenschein C. The somatic mutation theory of cancer: growing problems with the paradigm? *Bioessays* 2004; **26**: 1097-1107.
5. Williams JL. Malignancy: an evolving definition of a cancer cell. *Clin Lab Sci* 2002; **15**: 37-43.
6. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; **81**: 323-330.
7. Symonds H, Krall L, Remington L, Saenz-Robles M, Lowe S, Jacks T *et al*. p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* 1994; **78**: 703-711.
8. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB *et al*. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 1992; **11**: 1921-1929.
9. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; **33**: 787-791.
10. Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)* 1997; **62**: 1180-1190.
11. Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1989; **9**: 3088-3092.
12. Hanahan D, Christofori G, Naik P, Arbeit J. Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur J Cancer* 1996; **32A**: 2386-2393.
13. Sporn MB. The war on cancer. *Lancet* 1996; **347**: 1377-1381.
14. Muñoz A (ed). *Càncer. Genes y Nuevas Terapias*. Alberto Muñoz, Editorial Hélice: Madrid, 1997.
15. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; **396**: 643-649.
16. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; **9**: 138-141.

17. Armitage P, Doll R. The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *Br J Cancer* 1954; **8**: 1-12.
18. McGregor D. Mutagenic chemicals: their significance. *Biotherapy* 1998; **11**: 169-180.
19. Tabor E, Kobayashi K. Hepatitis C virus, a causative infectious agent of non-A, non-B hepatitis: prevalence and structure--summary of a conference on hepatitis C virus as a cause of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; **84**: 86-90.
20. Shacter E, Beecham EJ, Covey JM, Kohn KW, Potter M. Activated neutrophils induce prolonged DNA damage in neighboring cells. *Carcinogenesis* 1988; **9**: 2297-2304.
21. Yamashina K, Miller BE, Heppner GH. Macrophage-mediated induction of drug-resistant variants in a mouse mammary tumor cell line. *Cancer Res* 1986; **46**: 2396-2401.
22. Irigaray P, Newby JA, Clapp R, Hardell L, Howard V, Montagnier L *et al*. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. *Biomed Pharmacother* 2007; **61**: 640-658.
23. Belpomme D, Irigaray P, Hardell L, Clapp R, Montagnier L, Epstein S *et al*. The multitude and diversity of environmental carcinogens. *Environ Res* 2007; **105**: 414-429.
24. Newby JA, Busby CC, Howard CV, Platt MJ. The cancer incidence temporality index: an index to show temporal changes in the age of onset of overall and specific cancer (England and Wales, 1971-1999). *Biomed Pharmacother* 2007; **61**: 623-630.
25. McGregor D. Diets, food components and human cancer. *Biotherapy* 1998; **11**: 189-200.
26. Irigaray P, Newby JA, Lacomme S, Belpomme D. Overweight/obesity and cancer genesis: more than a biological link. *Biomed Pharmacother* 2007; **61**: 665-678.
27. Green MR. Targeting targeted therapy. *N Engl J Med* 2004; **350**: 2191-2193.
28. Waldmann TA. Immunotherapy: past, present and future. *Nat Med* 2003; **9**: 269-277.
29. Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 380-387.
30. Ames BN, Gold LS. The causes and prevention of cancer: the role of environment. *Biotherapy* 1998; **11**: 205-220.

31. Henderson BE, Ross RK, Pike MC. Toward the primary prevention of cancer. *Science* 1991; **254**: 1131-1138.
32. Seth P. Vector-mediated cancer gene therapy: an overview. *Cancer Biol Ther* 2005; **4**: 512-517.
33. Chillón MB, A. La teràpia gènica. *Treballs de la SCB* 2000; **50**: 141-149.
34. Blaese M, Blankenstein T, Brenner M, Cohen-Haguenauer O, Gansbacher B, Russell S *et al.* Vectors in cancer therapy: how will they deliver? *Cancer Gene Ther* 1995; **2**: 291-297.
35. Kaji EH, Leiden JM. Gene and stem cell therapies. *JAMA* 2001; **285**: 545-550.
36. Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987; **7**: 2745-2752.
37. Lewis PF, Emerman M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol* 1994; **68**: 510-516.
38. Daly G, Chernajovsky Y. Recent developments in retroviral-mediated gene transduction. *Mol Ther* 2000; **2**: 423-434.
39. Anderson JL, Hope TJ. Intracellular trafficking of retroviral vectors: obstacles and advances. *Gene Ther* 2005; **12**: 1667-1678.
40. Sinn PL, Sauter SL, McCray PB, Jr. Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety, and production. *Gene Ther* 2005; **12**: 1089-1098.
41. Kumar M, Keller B, Makalou N, Sutton RE. Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 2001; **12**: 1893-1905.
42. Trono D (ed). *Lentiviral Vectors*. Springer-Verlag Berlin: Hidelberg, 2002.
43. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH *et al.* In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996; **272**: 263-267.
44. Coffin John M HSH, Varmus Harold E. Retroviruses. In: Press CSHL (ed), 1997.
45. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 1997; **15**: 871-875.
46. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D *et al.* A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 1998; **72**: 8463-8471.

47. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L *et al.* Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 1998; **72**: 9873-9880.
48. Salmon P, Oberholzer J, Occhiodoro T, Morel P, Lou J, Trono D. Reversible immortalization of human primary cells by lentivector-mediated transfer of specific genes. *Mol Ther* 2000; **2**: 404-414.
49. Salmon P, Kindler V, Ducrey O, Chapuis B, Zubler RH, Trono D. High-level transgene expression in human hematopoietic progenitors and differentiated blood lineages after transduction with improved lentiviral vectors. *Blood* 2000; **96**: 3392-3398.
50. Mitta B, Rimann M, Ehrenguber MU, Ehrbar M, Djonov V, Kelm J *et al.* Advanced modular self-inactivating lentiviral expression vectors for multigene interventions in mammalian cells and in vivo transduction. *Nucleic Acids Res* 2002; **30**: e113.
51. Mitta B, Weber CC, Rimann M, Fussenegger M. Design and in vivo characterization of self-inactivating human and non-human lentiviral expression vectors engineered for streptogramin-adjustable transgene expression. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**: e106.
52. Iwakuma T, Cui Y, Chang LJ. Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. *Virology* 1999; **261**: 120-132.
53. Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 11382-11388.
54. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; **36**: 59-74.
55. Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, Griffiths JC, Romano G, Kingsman SM *et al.* A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* 1995; **23**: 628-633.
56. Sena-Esteves M, Tebbets JC, Steffens S, Crombleholme T, Flake AW. Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes. *J Virol Methods* 2004; **122**: 131-139.
57. Ramezani A, Hawley TS, Hawley RG. Performance- and safety-enhanced lentiviral vectors containing the human interferon-beta scaffold attachment region and the chicken beta-globin insulator. *Blood* 2003; **101**: 4717-4724.

58. Cockrell AS, Kafri T. HIV-1 vectors: fulfillment of expectations, further advancements, and still a way to go. *Curr HIV Res* 2003; **1**: 419-439.
59. Worsham DN, Schuesler T, von Kalle C, Pan D. In vivo gene transfer into adult stem cells in unconditioned mice by in situ delivery of a lentiviral vector. *Mol Ther* 2006; **14**: 514-524.
60. Portsmouth D, Hlavaty J, Renner M. Suicide genes for cancer therapy. *Mol Aspects Med* 2007; **28**: 4-41.
61. Noble S, Faulds D. Ganciclovir. An update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Drugs* 1998; **56**: 115-146.
62. Black ME, Newcomb TG, Wilson HM, Loeb LA. Creation of drug-specific herpes simplex virus type 1 thymidine kinase mutants for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 3525-3529.
63. Gambhir SS, Bauer E, Black ME, Liang Q, Kokoris MS, Barrio JR *et al.* A mutant herpes simplex virus type 1 thymidine kinase reporter gene shows improved sensitivity for imaging reporter gene expression with positron emission tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 2785-2790.
64. Ray P, Wu AM, Gambhir SS. Optical bioluminescence and positron emission tomography imaging of a novel fusion reporter gene in tumor xenografts of living mice. *Cancer Res* 2003; **63**: 1160-1165.
65. Black ME, Kokoris MS, Sabo P. Herpes simplex virus-1 thymidine kinase mutants created by semi-random sequence mutagenesis improve prodrug-mediated tumor cell killing. *Cancer Res* 2001; **61**: 3022-3026.
66. Ray P, De A, Min JJ, Tsien RY, Gambhir SS. Imaging tri-fusion multimodality reporter gene expression in living subjects. *Cancer Res* 2004; **64**: 1323-1330.
67. Mesnil M, Piccoli C, Tiraby G, Willecke K, Yamasaki H. Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 1831-1835.
68. Bi WL, Parysek LM, Warnick R, Stambrook PJ. In vitro evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV tk retroviral gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993; **4**: 725-731.
69. Dagher SF, Conrad SE, Werner EA, Patterson RJ. Phenotypic conversion of TK-deficient cells following electroporation of functional TK enzyme. *Exp Cell Res* 1992; **198**: 36-42.
70. Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL *et al.* The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 1993; **53**: 5274-5283.

71. Cotter TG, Lennon SV, Glynn JG, Martin SJ. Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumour and normal cells. *Anticancer Res* 1990; **10**: 1153-1159.
72. Ramesh R, Marrogi AJ, Munshi A, Abboud CN, Freeman SM. In vivo analysis of the 'bystander effect': a cytokine cascade. *Exp Hematol* 1996; **24**: 829-838.
73. Gagandeep S, Brew R, Green B, Christmas SE, Klatzmann D, Poston GJ *et al*. Prodrug-activated gene therapy: involvement of an immunological component in the "bystander effect". *Cancer Gene Ther* 1996; **3**: 83-88.
74. Bordignon C, Carlo-Stella C, Colombo MP, De Vincentiis A, Lanata L, Lemoli RM *et al*. Cell therapy: achievements and perspectives. *Haematologica* 1999; **84**: 1110-1149.
75. Pereboeva L, Komarova S, Mikheeva G, Krasnykh V, Curiel DT. Approaches to utilize mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles. *Stem Cells* 2003; **21**: 389-404.
76. Draper JS, Smith K, Gokhale P, Moore HD, Maltby E, Johnson J *et al*. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2004; **22**: 53-54.
77. Draper JS, Moore HD, Ruban LN, Gokhale PJ, Andrews PW. Culture and characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 2004; **13**: 325-336.
78. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; **226**: 507-520.
79. Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res* 2003; **34**: 565-571.
80. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA *et al*. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974; **2**: 83-92.
81. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; **284**: 143-147.
82. Fridenshtein A, Chailakhian RK, Lalykina KS. [Fibroblast-like cells in cultures of guinea pig hematopoietic tissue]. *Tsitologiya* 1970; **12**: 1147-1155.
83. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; **98**: 2615-2625.

84. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 7841-7845.
85. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D *et al*. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; **8**: 315-317.
86. Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J* 2004; **18**: 980-982.
87. Kashofer K, Bonnet D. Gene therapy progress and prospects: stem cell plasticity. *Gene Ther* 2005; **12**: 1229-1234.
88. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 2007; **25**: 2896-2902.
89. Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD *et al*. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* 2001; **97**: 1227-1231.
90. Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 1994; **56**: 283-294.
91. Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD *et al*. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 17438-17443.
92. Prockop DJ, Gregory CA, Spees JL. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100 Suppl 1**: 11917-11923.
93. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 2007; **25**: 2648-2659.
94. Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K *et al*. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 11002-11007.
95. Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, Hsu SC, Prockop DJ. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt

- pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells* 2007; **25**: 2363-2370.
96. Spees JL, Olson SD, Whitney MJ, Prockop DJ. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 1283-1288.
97. Ozawa K, Sato K, Oh I, Ozaki K, Uchibori R, Obara Y *et al.* Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J Autoimmun* 2008; **30**: 121-127.
98. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M *et al.* Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; **363**: 1439-1441.
99. Lazennec G, Jorgensen C. Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells* 2008; **26**: 1387-1394.
100. Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN *et al.* Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 2004; **96**: 1593-1603.
101. Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 2002; **62**: 3603-3608.
102. Hamada H, Kobune M, Nakamura K, Kawano Y, Kato K, Honmou O *et al.* Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy. *Cancer Sci* 2005; **96**: 149-156.
103. Xin H, Kanehira M, Mizuguchi H, Hayakawa T, Kikuchi T, Nukiwa T *et al.* Targeted delivery of CX3CL1 to multiple lung tumors by mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2007; **25**: 1618-1626.
104. Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J *et al.* Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* 2005; **65**: 3307-3318.
105. Komarova S, Kawakami Y, Stoff-Khalili MA, Curiel DT, Pereboeva L. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Mol Cancer Ther* 2006; **5**: 755-766.
106. Hung SC, Deng WP, Yang WK, Liu RS, Lee CC, Su TC *et al.* Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 7749-7756.

107. Schultz SS, Lucas PA. Human stem cells isolated from adult skeletal muscle differentiate into neural phenotypes. *J Neurosci Methods* 2006; **152**: 144-155.
108. Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg* 1999; **65**: 22-26.
109. Alessandri G, Pagano S, Bez A, Benetti A, Pozzi S, Iannolo G *et al.* Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages. *Lancet* 2004; **364**: 1872-1883.
110. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; **7**: 211-228.
111. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 4279-4295.
112. Kim JW, Kim SY, Park SY, Kim YM, Kim JM, Lee MH *et al.* Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. *Ann Hematol* 2004; **83**: 733-738.
113. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; **109**: 235-242.
114. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001; **44**: 1928-1942.
115. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 2001; **153**: 1133-1140.
116. Liu H, Gronthos S, Shi S. Dental pulp stem cells. *Methods Enzymol* 2006; **419**: 99-113.
117. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R *et al.* Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 2003; **102**: 1548-1549.
118. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001; **98**: 2396-2402.
119. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV *et al.* Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 14720-14725.
120. Young HE, Mancini ML, Wright RP, Smith JC, Black AC, Jr., Reagan CR *et al.* Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev Dyn* 1995; **202**: 137-144.

121. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; **24**: 1294-1301.
122. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007; **25**: 2739-2749.
123. Musina RA, Bekchanova ES, Sukhikh GT. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Bull Exp Biol Med* 2005; **139**: 504-509.
124. Nakagami H, Morishita R, Maeda K, Kikuchi Y, Ogihara T, Kaneda Y. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thromb* 2006; **13**: 77-81.
125. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M *et al.* Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003; **174**: 101-109.
126. Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, Hui JH, Lee EH, Lim B. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells* 2007; **25**: 750-760.
127. Schaffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* 2007; **25**: 818-827.
128. De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P *et al.* Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett* 2003; **89**: 267-270.
129. Morizono K, De Ugarte DA, Zhu M, Zuk P, Elbarbary A, Ashjian P *et al.* Multilineage cells from adipose tissue as gene delivery vehicles. *Hum Gene Ther* 2003; **14**: 59-66.
130. Kucerova L, Altanerova V, Matuskova M, Tyciakova S, Altaner C. Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *Cancer Res* 2007; **67**: 6304-6313.
131. Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, Panoskaltsis Mortari A, McElmurry RT, Bell S *et al.* Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2007; **25**: 371-379.

132. Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V *et al.* Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 2006; **24**: 1095-1103.
133. Aguilar S, Nye E, Chan J, Loebinger M, Spencer-Dene B, Fisk N *et al.* Murine but not human mesenchymal stem cells generate osteosarcoma-like lesions in the lung. *Stem Cells* 2007; **25**: 1586-1594.
134. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC *et al.* Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005; **65**: 3035-3039.
135. Burns JS, Abdallah BM, Guldberg P, Rygaard J, Schroder HD, Kassem M. Tumorigenic heterogeneity in cancer stem cells evolved from long-term cultures of telomerase-immortalized human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 2005; **65**: 3126-3135.
136. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A *et al.* Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 2007; **67**: 9142-9149.
137. Mohla S. Tumor microenvironment. *J Cell Biochem* 2007; **101**: 801-804.
138. Hall B, Dembinski J, Sasser AK, Studeny M, Andreeff M, Marini F. Mesenchymal stem cells in cancer: tumor-associated fibroblasts and cell-based delivery vehicles. *Int J Hematol* 2007; **86**: 8-16.
139. Li H, Fan X, Houghton J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem* 2007; **101**: 805-815.
140. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 2001; **1**: 46-54.
141. Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H *et al.* Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther* 2004; **11**: 1155-1164.
142. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986; **315**: 1650-1659.
143. Klopp AH, Spaeth EL, Dembinski JL, Woodward WA, Munshi A, Meyn RE *et al.* Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2007; **67**: 11687-11695.
144. Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 2008; **15**: 730-738.

145. Hall B, Andreeff M, Marini F. The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. *Handb Exp Pharmacol* 2007; 263-283.
146. Wu XZ, Chen D, Xie GR. Bone marrow-derived cells: roles in solid tumor. Minireview. *Neoplasma* 2007; **54**: 1-6.
147. Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira, II *et al*. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 2006; **203**: 1235-1247.
148. Yu JM, Jun ES, Bae YC, Jung JS. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells Dev* 2008; **17**: 463-474.
149. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J *et al*. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003; **102**: 3837-3844.
150. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW *et al*. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007; **449**: 557-563.
151. Cao F, Lin S, Xie X, Ray P, Patel M, Zhang X *et al*. In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation* 2006; **113**: 1005-1014.
152. Weissleder R, Pittet MJ. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* 2008; **452**: 580-589.
153. Blasberg RG. In vivo molecular-genetic imaging: multi-modality nuclear and optical combinations. *Nucl Med Biol* 2003; **30**: 879-888.
154. Massoud TF, Gambhir SS. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light. *Genes Dev* 2003; **17**: 545-580.
155. Koo V, Hamilton PW, Williamson K. Non-invasive in vivo imaging in small animal research. *Cell Oncol* 2006; **28**: 127-139.
156. Ottobriani L, Ciana P, Biserni A, Lucignani G, Maggi A. Molecular imaging: a new way to study molecular processes in vivo. *Mol Cell Endocrinol* 2006; **246**: 69-75.
157. Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. Improved green fluorescence. *Nature* 1995; **373**: 663-664.
158. Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA *et al*. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 7877-7882.

159. Goulding A, Shrestha S, Dria K, Hunt E, Deo SK. Red fluorescent protein variants with incorporated non-natural amino acid analogues. *Protein Eng Des Sel* 2008; **21**: 101-106.
160. Jach G, Pesch M, Richter K, Frings S, Uhrig JF. An improved mRFP1 adds red to bimolecular fluorescence complementation. *Nat Methods* 2006; **3**: 597-600.
161. Shaner NC, Patterson GH, Davidson MW. Advances in fluorescent protein technology. *J Cell Sci* 2007; **120**: 4247-4260.
162. Shah K, Jacobs A, Breakefield XO, Weissleder R. Molecular imaging of gene therapy for cancer. *Gene Ther* 2004; **11**: 1175-1187.
163. Bhaumik S, Gambhir SS. Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 377-382.
164. Edinger M, Hoffmann P, Contag CH, Negrin RS. Evaluation of effector cell fate and function by in vivo bioluminescence imaging. *Methods* 2003; **31**: 172-179.
165. Greer LF, 3rd, Szalay AA. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence* 2002; **17**: 43-74.
166. Wilson T, Hastings JW. Bioluminescence. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; **14**: 197-230.
167. Wu JC, Sundaresan G, Iyer M, Gambhir SS. Noninvasive optical imaging of firefly luciferase reporter gene expression in skeletal muscles of living mice. *Mol Ther* 2001; **4**: 297-306.
168. Almond B HE, Stecha P, Garvin D, Paguio A, Butler B, Beck M, Wood M, and, Wood K. Introducing Chroma-Luc™ Technology. *Promega Notes*; **2003**: 4.
169. Loening AM, Wu AM, Gambhir SS. Red-shifted Renilla reniformis luciferase variants for imaging in living subjects. *Nat Methods* 2007; **4**: 641-643.
170. Roman I, Vilalta M, Rodriguez J, Matthies AM, Srouji S, Livne E *et al.* Analysis of progenitor cell-scaffold combinations by in vivo non-invasive photonic imaging. *Biomaterials* 2007; **28**: 2718-2728.
171. Degano IR, Vilalta M, Bago JR, Matthies AM, Hubbell JA, Dimitriou H *et al.* Bioluminescence imaging of calvarial bone repair using bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2008; **29**: 427-437.
172. El Hilali N, Rubio N, Blanco J. Noninvasive in vivo whole body luminescent analysis of luciferase labelled orthotopic prostate tumours. *Eur J Cancer* 2004; **40**: 2851-2858.
173. Shah K. Current advances in molecular imaging of gene and cell therapy for cancer. *Cancer Biol Ther* 2005; **4**: 518-523.

174. Contag CH, Jenkins D, Contag PR, Negrin RS. Use of reporter genes for optical measurements of neoplastic disease in vivo. *Neoplasia* 2000; **2**: 41-52.
175. De A, Lewis XZ, Gambhir SS. Noninvasive imaging of lentiviral-mediated reporter gene expression in living mice. *Mol Ther* 2003; **7**: 681-691.
176. Rome C, Couillaud F, Moonen CT. Gene expression and gene therapy imaging. *Eur Radiol* 2007; **17**: 305-319.
177. Martin B, Sanz R, Aragues R, Oliva B, Sierra A. Functional Clustering of Metastasis Proteins Describes Plastic Adaptation Resources of Breast-Cancer Cells to New Microenvironments. *J Proteome Res* 2008.
178. Kitamura H, Okazaki M. AG-041R, a novel indoline-2-one derivative, stimulates chondrogenesis in a bipotent chondroprogenitor cell line CL-1. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; **13**: 287-296.
179. Kitamura H. Establishment of a bipotent cell line CL-1 which differentiates into chondrocytes and adipocytes from adult mouse. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; **12**: 25-37.
180. Lin Y, Luo E, Chen X, Liu L, Qiao J, Yan Z *et al.* Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *J Cell Mol Med* 2005; **9**: 929-939.
181. Ghayor C, Herrouin JF, Chadjichristos C, Ala-Kokko L, Takigawa M, Pujol JP *et al.* Regulation of human COL2A1 gene expression in chondrocytes. Identification of C-Krox-responsive elements and modulation by phenotype alteration. *J Biol Chem* 2000; **275**: 27421-27438.
182. Becerra J, Andrades JA, Ertl DC, Sorgente N, Nimni ME. Demineralized bone matrix mediates differentiation of bone marrow stromal cells in vitro: effect of age of cell donor. *J Bone Miner Res* 1996; **11**: 1703-1714.
183. Nimni ME, Bernick S, Ertl D, Nishimoto SK, Paule W, Strates BS *et al.* Ectopic bone formation is enhanced in senescent animals implanted with embryonic cells. *Clin Orthop Relat Res* 1988: 255-266.
184. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M *et al.* Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999; **5**: 309-313.
185. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnies H *et al.* Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006; **81**: 1390-1397.

186. Knowles MR, Hohneker KW, Zhou Z, Olsen JC, Noah TL, Hu PC *et al.* A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1995; **333**: 823-831.
187. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D *et al.* Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 1994; **6**: 335-341.
188. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK *et al.* Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; **11**: 389-398.
189. El-Badri NS, Maheshwari A, Sanberg PR. Mesenchymal stem cells in autoimmune disease. *Stem Cells Dev* 2004; **13**: 463-472.
190. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 2001; **7**: 259-264.
191. Zhu Y, Feuer G, Day SL, Wrzesinski S, Planelles V. Multigene lentiviral vectors based on differential splicing and translational control. *Mol Ther* 2001; **4**: 375-382.
192. Reiser J, Lai Z, Zhang XY, Brady RO. Development of multigene and regulated lentivirus vectors. *J Virol* 2000; **74**: 10589-10599.
193. Mizuguchi H, Xu Z, Ishii-Watabe A, Uchida E, Hayakawa T. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Mol Ther* 2000; **1**: 376-382.
194. Yu X, Zhan X, D'Costa J, Tanavde VM, Ye Z, Peng T *et al.* Lentiviral vectors with two independent internal promoters transfer high-level expression of multiple transgenes to human hematopoietic stem-progenitor cells. *Mol Ther* 2003; **7**: 827-838.
195. Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 2002; **295**: 868-872.
196. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 2001; **169**: 12-20.
197. Djouad F, Bony C, Apparailly F, Louis-Plence P, Jorgensen C, Noel D. Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. *Transplantation* 2006; **82**: 1060-1066.

198. Pisati F, Belicchi M, Acerbi F, Marchesi C, Giussani C, Gavina M *et al.* Effect of human skin-derived stem cells on vessel architecture, tumor growth, and tumor invasion in brain tumor animal models. *Cancer Res* 2007; **67**: 3054-3063.
199. Berger C, Flowers ME, Warren EH, Riddell SR. Analysis of transgene-specific immune responses that limit the in vivo persistence of adoptively transferred HSV-TK-modified donor T cells after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2006; **107**: 2294-2302.
200. Traversari C, Markt S, Magnani Z, Mangia P, Russo V, Ciceri F *et al.* The potential immunogenicity of the TK suicide gene does not prevent full clinical benefit associated with the use of TK-transduced donor lymphocytes in HSCT for hematologic malignancies. *Blood* 2007; **109**: 4708-4715.
201. Okazaki K, Sandell LJ. Extracellular matrix gene regulation. *Clin Orthop Relat Res* 2004: S123-128.
202. Zhao Q, Eberspaecher H, Lefebvre V, De Crombrughe B. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn* 1997; **209**: 377-386.
203. Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 2336-2346.
204. Harakas NK. Demineralized bone-matrix-induced osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 1984: 239-251.
205. Chakkalakal DA, Strates BS, Garvin KL, Novak JR, Fritz ED, Mollner TJ *et al.* Demineralized bone matrix as a biological scaffold for bone repair. *Tissue Eng* 2001; **7**: 161-177.
206. Hui JH, Li L, Teo YH, Ouyang HW, Lee EH. Comparative study of the ability of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, periosteum, and adipose tissue in treatment of partial growth arrest in rabbit. *Tissue Eng* 2005; **11**: 904-912.
207. Andrades JA, Santamaria JA, Nimni ME, Becerra J. Selection and amplification of a bone marrow cell population and its induction to the chondro-osteogenic lineage by rhOP-1: an in vitro and in vivo study. *Int J Dev Biol* 2001; **45**: 689-693.

