

**APROXIMACIONES A UNA TERAPIA CONTRA LA
CAQUEXIA MEDIANTE UN ADENOVIRUS PARA LA
TRANSFERENCIA GÉNICA DE UN DOMINANTE
NEGATIVO DE AP-1**

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Con la finalidad de analizar el papel de la proteína c-Jun y la actividad del factor de transcripción AP-1 en el bloqueo de la diferenciación producida por la citoquina TNF- α *in vitro*, así como su papel en el desarrollo de la caquexia en el modelo de hepatoma ascítico Yoshida AH-130 *in vivo*, utilizamos un adenovirus recombinante que contiene el cDNA de un dominante negativo para AP-1 llamado Tam67 (AdCMVTam67), para sobreexpresar esta proteína en la línea celular C2C12 y en músculo esquelético de ratas Wistar. Los objetivos principales de este capítulo son:

1. La construcción, desarrollo y purificación de adenovirus recombinante para el TAM-67, para su utilización en células musculares en cultivo y la transferencia génica *in vivo* al músculo esquelético de ratas Wistar.
2. Analizar el efecto de la sobreexpresión del AdCMVTam67 en la miogénesis y la regulación de MyoD de los mioblastos de la línea celular C2C12 tratadas con TNF- α .
3. Intentar revertir la caquexia y analizar la regulación de MyoD mediante la transferencia génica del AdCMVTam67 en el músculo esquelético de ratas portadoras del hepatoma ascítico Yoshida AH-130.

Para el desarrollo de estos objetivos, utilizamos un modelo de células musculares en cultivo, las células C2C12, provenientes de músculo de ratón. Para los estudios se necesita un modelo de células en diferenciación que permita determinar si esta citoquina puede bloquear la diferenciación, además de analizar la regulación de MyoD en presencia del AdCMVTam67. Este es un modelo especialmente importante, dado que es representativo de los mecanismos implicados en la regeneración del músculo y que han sido relacionados directamente con el desarrollo de la caquexia. Las células fueron infectadas cuando aún eran mioblastos indiferenciados, y se estimuló su diferenciación 48 horas después de la infección; en este mismo momento, fueron tratadas con el TNF- α . Finalmente las células fueron recogidas 24 horas después del tratamiento.

Para el desarrollo de la segunda parte de este capítulo, utilizamos un modelo de transferencia génica mediante adenovirus, inyectados directamente en el músculo GSN de ratas Wistar, a las que posteriormente se les implantó el tumor Yoshida AH-130, y que fueron sacrificadas a día 4 de crecimiento tumoral, donde la actividad del factor de transcripción AP-1 se encuentra aumentada en este modelo tumoral.

1. Utilización del adenovirus AdCMV-TAM67 en células musculares.

El Tam67 es una isoforma mutante de c-Jun, que actúa como un dominante negativo de AP-1 (Ludes-Meyers *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Dhar *et al.*, 2004). Este dominante negativo ha sido ampliamente utilizado para el estudio de los estímulos que hacen que una célula normal se transforme a un fenotipo maligno (Ludes-Meyers *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Dhar *et al.*, 2004). Tam67 tiene deletado el fragmento comprendido entre los aminoácidos 3 y 122, ambos incluidos; este segmento de la proteína corresponde a su dominio de transactivación, por lo que esta proteína no puede transactivarse.

Para la obtención de este adenovirus, se procedió como se indica en la sección de materiales y métodos. Para el análisis de la sobreexpresión de este dominante negativo, se infectaron células C2C12 a día 3 de diferenciación y se recogieron a los 2, 4 y 6 días posteriores a la infección (DPI). Por otra parte, se analizó morfológicamente la formación de miotubos y se determinó MyoD por Western blot para descartar la posibilidad de que el virus pudiera interferir con la miogénesis. Al mismo tiempo, se probaron distintas m.o.i. (*multiplicity of infection*) que es la cantidad de virus necesarios para infectar una célula; de esta manera, se pudieron establecer las condiciones de infección para la línea celular C2C12 (figura 1). Para los trabajos con la línea celular C2C12 se utilizó una m.o.i. de 100. Además, se pudo comprobar que la sobreexpresión de este dominante negativo no alteró la correcta diferenciación de las células ni modificó la expresión de MyoD (figura 1).

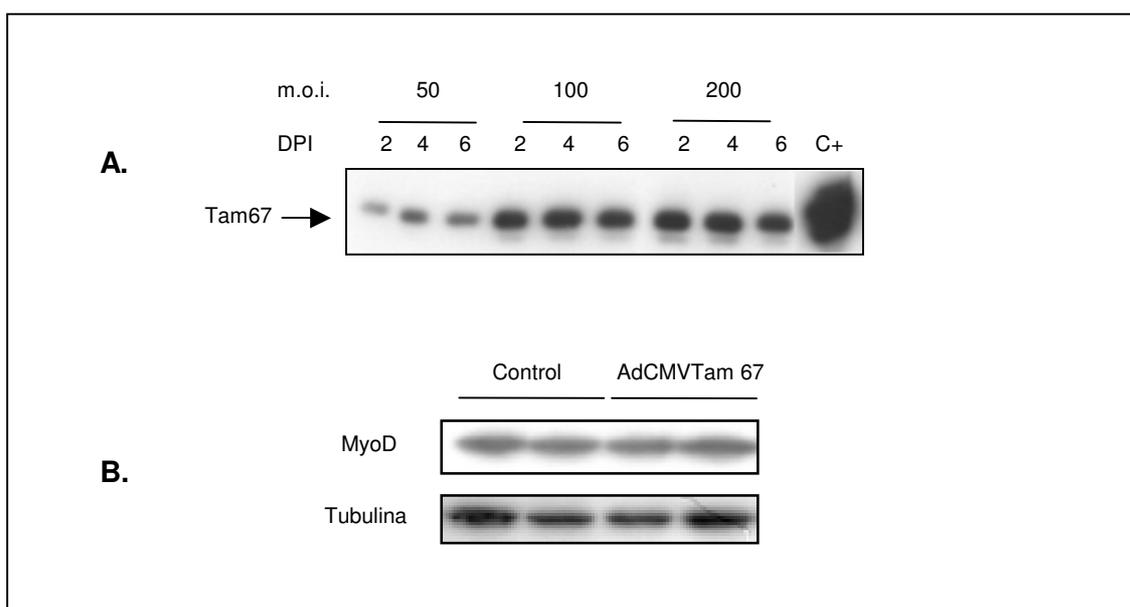


Figura 1. Sobreexpresión del dominante negativo de AP-1 mediante un vector adenovirico. Panel A: Western blot representativo de los niveles del dominante negativo Tam67 en la línea celular C2C12, infectadas a día 3 de diferenciación con tres m.o.i. (*multiplicity of infección*) diferentes 50, 100 y 200, y recogidas a los 2, 4 y 6 días posteriores a la infección. Panel B: Western blot representativo de los niveles de MyoD en la línea celular C2C12, infectadas a día 3 de diferenciación con una m.o.i. de 100 y recogidas a las 48 horas posteriores a la infección. C+, control positivo de células Hek 293.

Con la finalidad de comprobar morfológica y visualmente qué porcentaje de células son infectadas a 100 m.o.i. (la concentración elegida para los ensayos), procedimos a infectar de la misma manera células de la línea C2C12 a día 3 de diferenciación con un adenovirus que contenía la GFP (*green fluorescent protein*), el AdCMVGFP. Las células fueron fijadas a las 48 horas posteriores a la infección y observadas en un microscopio de fluorescencia. Los resultados demostraron que a 100 m.o.i., el porcentaje de células infectadas es de un 90-100% (figura 2). Baqué *et al.* (1994, 1996) demuestran que los adenovirus son útiles en la transferencia de DNA a células musculares en cultivo, tanto de la línea celular derivada de ratón C2C12 (Baqué *et al.*, 1994) como en cultivos primarios de músculo humano (Baqué *et al.*, 1996), llegando en ambos casos a transfectar el 100% de las células.

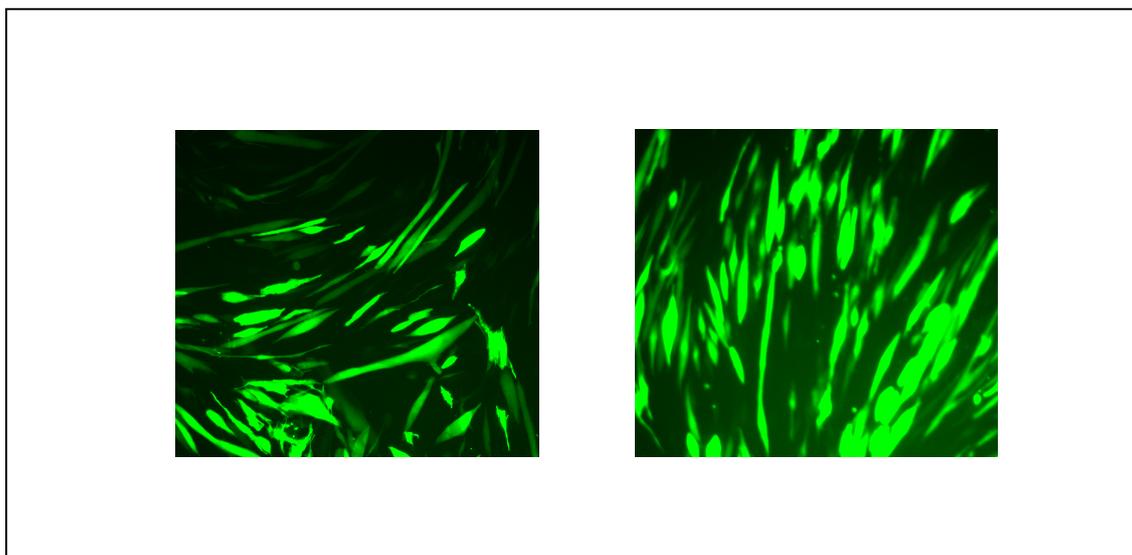


Figura 2. Infección con el AdCMVGFP en miotubos de la línea celular C2C12. Imágenes representativas de la infección con el AdCMVGFP en la línea celular C2C12, a tres días de diferenciación, con una m.o.i. de 100 y fijadas 48 horas después de la infección.

2. Regulación del factor miogénico MyoD en mioblastos de la línea celular C2C12 tratadas con TNF- α .

El TNF- α es una citoquina que desde hace mucho tiempo se relaciona con el proceso y desarrollo de la caquexia (Costelli *et al.*, 1993). En los últimos años los esfuerzos se han centrado en descubrir cuál es el efecto del TNF- α sobre las células musculares, mediante cultivos celulares. Los estudios demuestran que esta citoquina es capaz de detener la progresión de la miogénesis mediante la inhibición de MyoD, y que este efecto podría estar mediado por una activación de NF- κ B (Guttridge *et al.*, 2000). Hemos podido confirmar que TNF- α (a una concentración de 10 ng/ml) es capaz de detener la miogénesis y disminuir significativamente los niveles del factor de transcripción MyoD (figura 3).

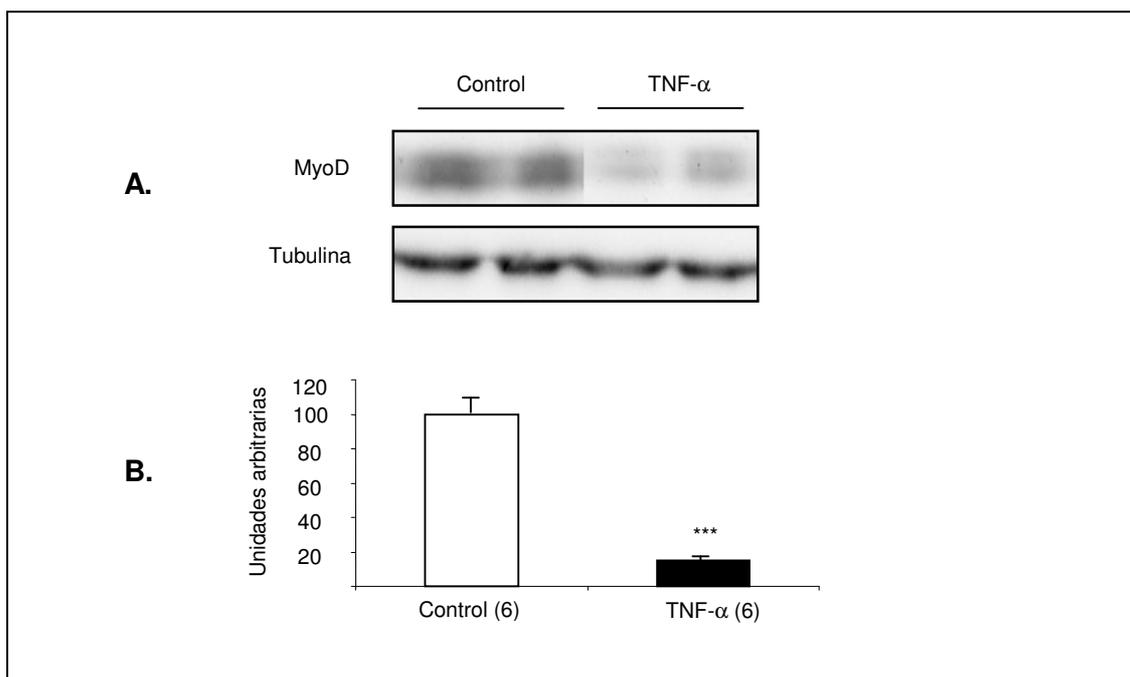


Figura 3. Niveles de MyoD en células tratadas con TNF- α 10 ng/ml. Panel A: Western blot representativo de la expresión de MyoD células de la línea celular C2C12 en diferenciación. La carga de proteína es corregida con la expresión de la tubulina. Panel B: Análisis densitométrico de la expresión de MyoD. Los resultados se presentan como porcentaje del control y están expresados como la media \pm s.e.m. significatividad estadística de las diferencias: ***, $p < 0,001$. Los resultados son representativos de tres experimentos realizados por separado bajo las mismas condiciones experimentales. El tamaño muestral se indica entre paréntesis.

3. Efecto de la sobreexpresión de AdCMVTam67 en mioblastos de la línea celular C2C12 tratados con TNF- α .

3.1. Utilización de adenovirus para la infección de mioblastos en cultivo.

La sobreexpresión del Tam67 en células indiferenciadas mediante el uso de estrategias de transfección transitorias no nos dió buenos resultados, ya que sólo obtuvimos un máximo de 5% de células transfectadas. Este hecho nos obligó a buscar un nuevo método que fue la sobreexpresión por medio de un vector viral, (el AdCMV-TAM67), que nos permite tener niveles de células infectadas superiores a los obtenidos con transfecciones transitorias. En la figura 4 podemos ver imágenes representativas de mioblastos de la línea celular C2C12 infectados con el AdCMVGFP con una m.o.i. de 100 y observados al microscopio de fluorescencia 24 horas después de inducir la diferenciación. Este mismo ensayo lo realizamos para una m.o.i. inferior 50 y una mayor 200.

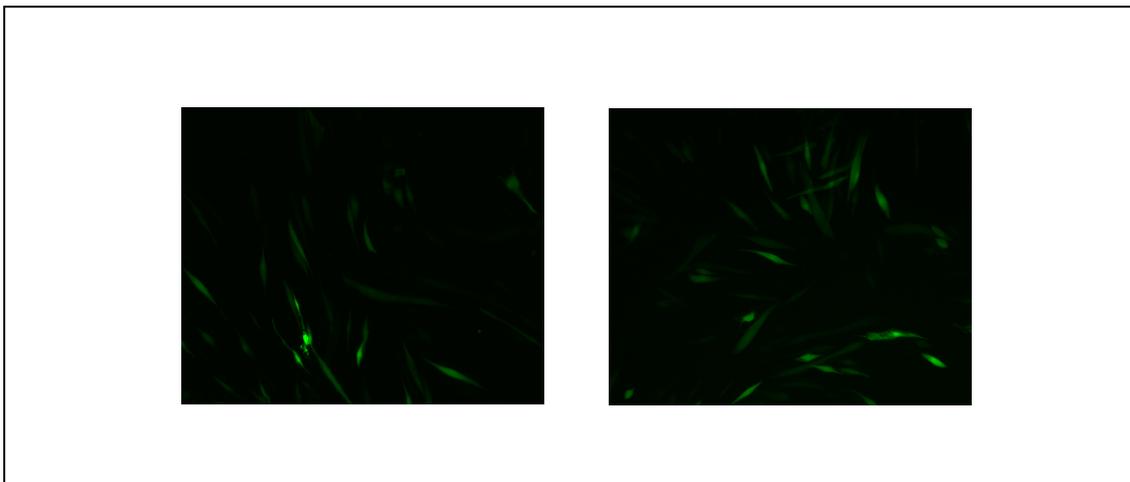


Figura 4. Infección con el AdCMVGFP en mioblastos de la línea celular C2C12. Imágenes representativas de la infección con el AdCMVGFP en mioblastos de la línea celular C2C12. Las células fueron infectadas 48 horas antes de inducir la diferenciación con una m.o.i. de 100. Las células fueron fijadas y observadas al microscopio 24 horas después de inducir la diferenciación.

Los resultados obtenidos con el AdCMVGFP demuestran que los adenovirus son menos eficientes en la infección de mioblastos comparativamente con la eficiencia que se logra al infectar miotubos de la misma línea celular. Si aumentamos la m.o.i. a 200, en la infección de los mioblastos las células no evolucionan correctamente en su diferenciación, y si por el contrario la disminuimos, no logramos una eficiencia visible por medio del microscopio.

3.2. Efecto de la sobreexpresión del AdCMVTam67 en mioblastos de la línea celular C2C12 tratados con TNF- α .

Son muchos los trabajos que demuestran que el TNF- α adicionado al medio de cultivo produce una inhibición del programa de diferenciación (Salía *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1998; Guttridge *et al.*, 2000; Langen *et al.*, 2001; Coletti *et al.*, 2002; Langen *et al.*, 2004). Así, gran parte de estos estudios proponen al factor de transcripción NF- κ B como la molécula clave en el efecto del TNF- α en las células musculares en cultivo (Li *et al.*, 1998; Guttridge *et al.*, 2000; Langen *et al.*, 2001; Coletti *et al.*, 2002; Langen *et al.*, 2004). Por otra parte, existen evidencias de una interacción entre miembros de la familia Jun/Fos y los factores bHLH, habiéndose demostrado una interacción directa proteína-proteína entre c-Jun y MyoD, y que esta interacción es de carácter inhibitorio (Su *et al.*, 1991; Bengal *et al.*, 1992; Finker *et al.*, 1993). Por esta razón, nos interesó determinar si AP-1 estaba involucrado en este proceso.

El experimento comenzó con la infección de los mioblastos, 48 horas antes de inducir la diferenciación, con los adenovirus AdCMV β -Gal y AdCMVTam67; de esta forma, los grupos experimentales fueron: células no infectadas (N.I.), células infectadas con el AdCMV β -Gal (Ad β -Gal) y células infectadas con el AdCMVTam67 (AdTam67). Al cambiar el medio de proliferación por el de diferenciación, cada grupo fue dividido en controles y tratadas con TNF- α 10 ng/ml. Las células fueron recogidas para su análisis 24 horas después de inducir la diferenciación.

3.2.1. Niveles del dominante negativo Tam67 en los mioblastos de la línea celular C2C12 tratadas con TNF- α .

Con el fin de confirmar que la infección de los mioblastos había funcionado correctamente, procedimos a determinar los niveles de expresión del Tam67 por la técnica de Western blot. Los resultados demostraron que la infección había funcionado de forma correcta, aunque los niveles eran muy inferiores a los obtenidos para los miotubos (figura 5). Esto concuerda con las imágenes de los mioblastos infectados con el AdGFP (figura 4).

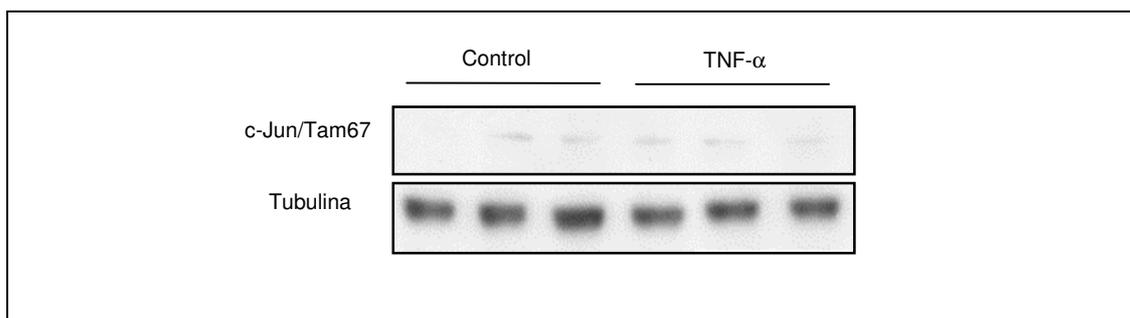


Figura 5. Niveles del dominante negativo de AP-1 Tam67 en mioblastos de la línea celular C2C12 tratadas con TNF- α 10 ng/ml. Western blot representativo de los niveles de la proteína Tam67 en mioblastos de la línea celular C2C12 en diferenciación. La carga de proteína es corregida con la expresión de la tubulina.

3.2.2. Niveles del factor miogénico MyoD.

MyoD un factor de transcripción clave en el proceso de diferenciación y regeneración del músculo esquelético (Lassar *et al.*, 1994; Black y Olson, 1998). Este factor de transcripción ha sido involucrado en el desarrollo de la caquexia, por un mecanismo mediado por NF- κ B (Guttridge *et al.*, 2000). TNF- α es capaz de activar tanto la expresión de c-jun como la actividad de unión al DNA de AP-1 (Brenner *et al.*, 1989); este factor de transcripción está implicado en la diferenciación de las células musculares en cultivo (Park *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1992; Henderson y Stein, 1994; Pedraza-Alva *et al.*, 1994; Lehtinen *et al.*, 1996; Stewart *et al.*, 2004).

La adición de TNF- α al medio de diferenciación de los mioblastos produjo una fuerte inhibición de los niveles de MyoD (figura 3 y 6). La sobreexpresión del dominante negativo para AP-1 bloqueó la regulación negativa sobre MyoD que ejerce el TNF- α en los mioblastos de la línea celular C2C12 (figura 6). Sorprendentemente, encontramos que las células infectadas con el Ad β -Gal presentaban niveles muy elevados de MyoD, superiores a los de las células no infectadas control, pero el efecto del TNF- α en los niveles de MyoD en las células infectadas con el Ad β -Gal tratadas con TNF- α era significativamente menor con respecto a sus controles, en la misma proporción que las células no infectadas.

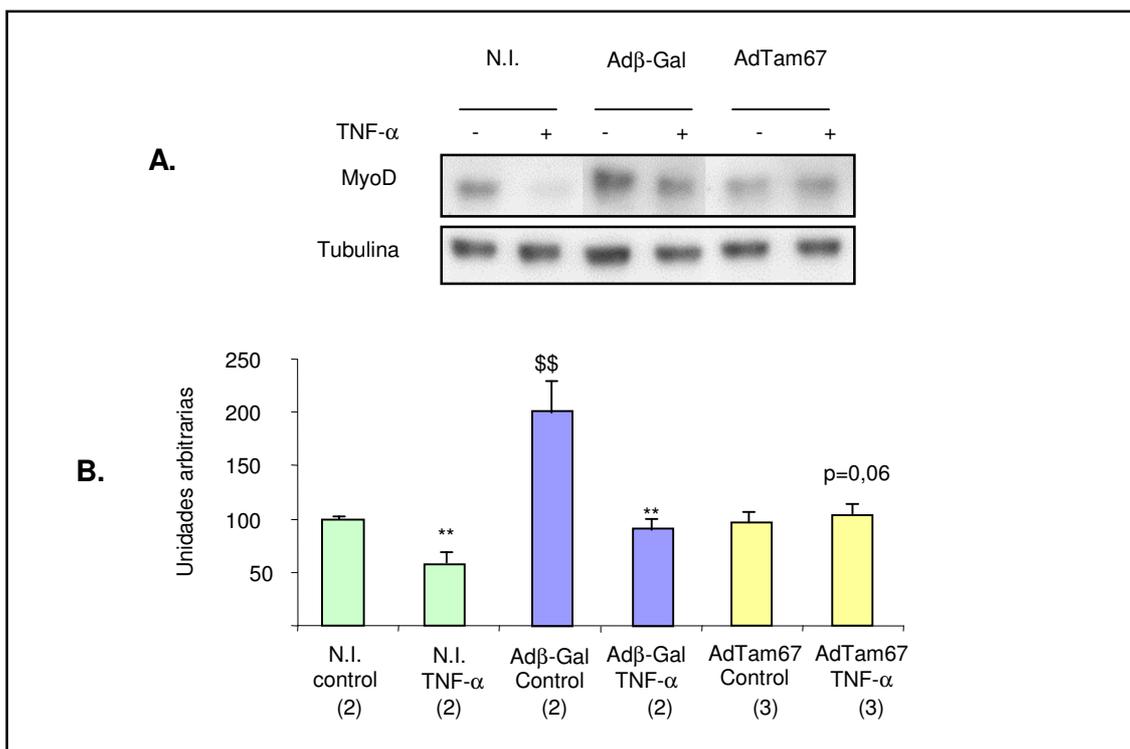


Figura 6. Niveles de MyoD en células tratadas con TNF-α 10 ng/ml. Panel A: Western blot representativo de los niveles de MyoD en mioblastos de la línea celular C2C12 en diferenciación. La carga de proteína es corregida con la expresión de la tubulina. Panel B: Análisis densitométrico de la expresión de MyoD. Los resultados se presentan como porcentaje del control y están expresados como la media \pm s.e.m. significatividad estadística de las diferencias: **, $p < 0,01$ para las comparaciones entre controles y tratadas con TNF-α, y \$\$, $p < 0,01$ para las comparaciones entre los grupos control. El tamaño muestral se indica entre paréntesis.

3.2.3. Niveles de la ciclina D1.

En nuestro grupo se ha demostrado que el TNF-α tiene un efecto dependiente de la concentración utilizada, donde concentraciones por encima de 10 U/ml producen un aumento de la concentración total de proteína (Álvarez *et al.*, 2001). Al cambiar el medio de proliferación por el de diferenciación, las proteínas involucradas en la proliferación celular disminuyen, para que las células puedan salir del ciclo celular y entrar en el programa de diferenciación. Guttridge *et al.* (1999) demostraron una disminución de los niveles de la ciclina D1 en células de la línea celular C2C12, como un mecanismo regulador de la entrada al programa de diferenciación, además de proponer que este mecanismo es dependiente de NF-κB (Guttridge *et al.*, 1999). Otros estudios han demostrado que la adición de TNF-α al medio de diferenciación produce un aumento de la ciclina D1, proteína importante en la proliferación celular (Langen *et al.*, 2004). Guttridge *et al.* (2000) determinaron que TNF-α, además de inhibir el programa de diferenciación, disminuye los niveles de p21 (*cyclin-dependent kinase inhibitor p21*), un inhibidor de las ciclinas que regulan la proliferación.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran que TNF-α aumenta los niveles de la ciclina D1 en las células tratadas con TNF-α, y que la sobreexpresión del AdCMVTam67 revierte por completo esta activación, e incluso se observa que los AdTam67 controles sin TNF-α muestran niveles más bajos que los controles N.I. y los Adβ-Gal (figura 7).

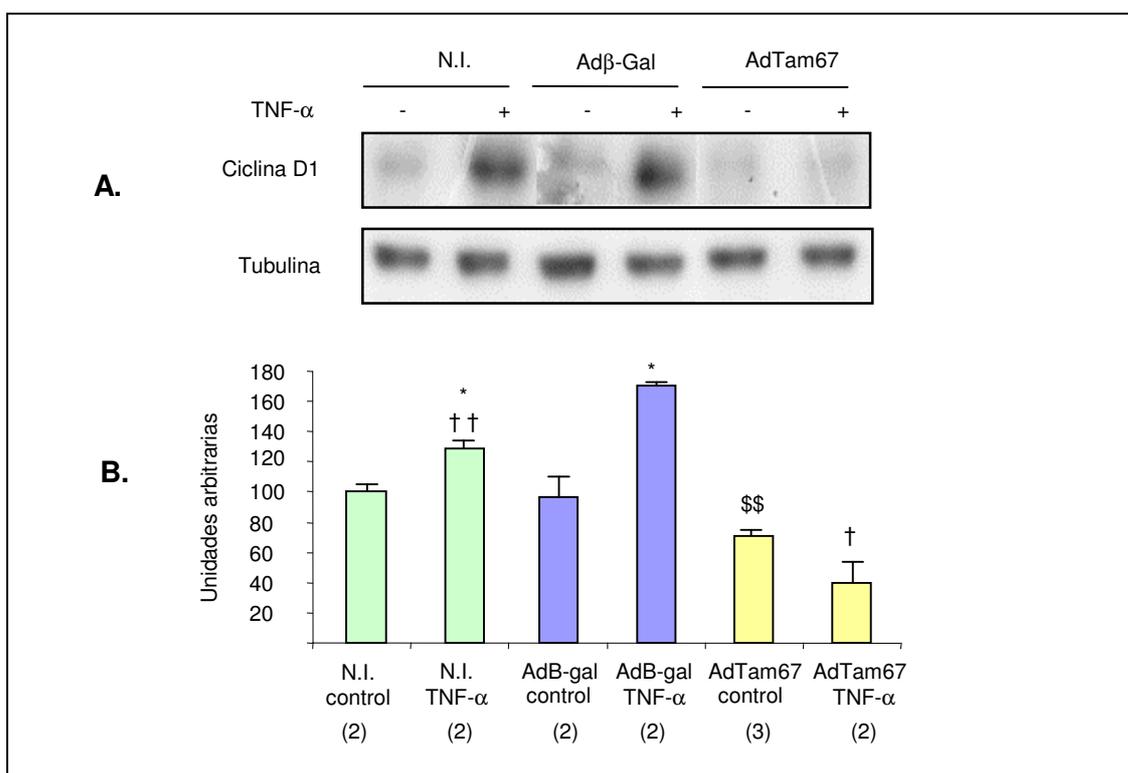


Figura 7. Niveles de la ciclina D1 en células tratadas con TNF- α 10 ng/ml. Panel A: Western blot representativo de los niveles de la ciclina D1 en mioblastos de la línea celular C2C12 en diferenciación. La carga de proteína es corregida con la expresión de la tubulina. Panel B: Análisis densitométrico de la expresión de la ciclina D1. Los resultados se presentan como porcentaje del control y están expresados como la media \pm s.e.m. Significatividad estadística de las diferencias: *, $p < 0,05$ para las comparaciones entre controles y tratadas con TNF- α , †, $p < 0,05$; ††, $p < 0,01$ para las comparaciones entre las células tratadas con TNF- α de los distintos grupos y \$\$, $p < 0,01$ para las comparaciones entre los grupos control. El tamaño muestral se indica entre paréntesis.

3.2.3. Niveles de la proteína MHC.

La proteína MHC (*miosin heavy chain*) es un marcador de células musculares diferenciadas. El tratamiento con TNF- α reduce los niveles de esta proteína (Li *et al* 1998; Guttridge *et al.*, 2000; Li y Reid, 2001). Por esta razón, decidimos analizar los niveles de la proteína MHC en los mioblastos tratados con TNF- α y estimulados a diferenciación y que sobreexpresan el AdTam67.

Los resultados que obtuvimos demuestran claramente que la administración de TNF- α al medio de diferenciación produce una importante disminución en los niveles de esta proteína y, asimismo encontramos que las células infectadas con el AdTam67 presentaban niveles muy elevados de MHC tanto en los controles como en los tratados con TNF- α (figura 8).

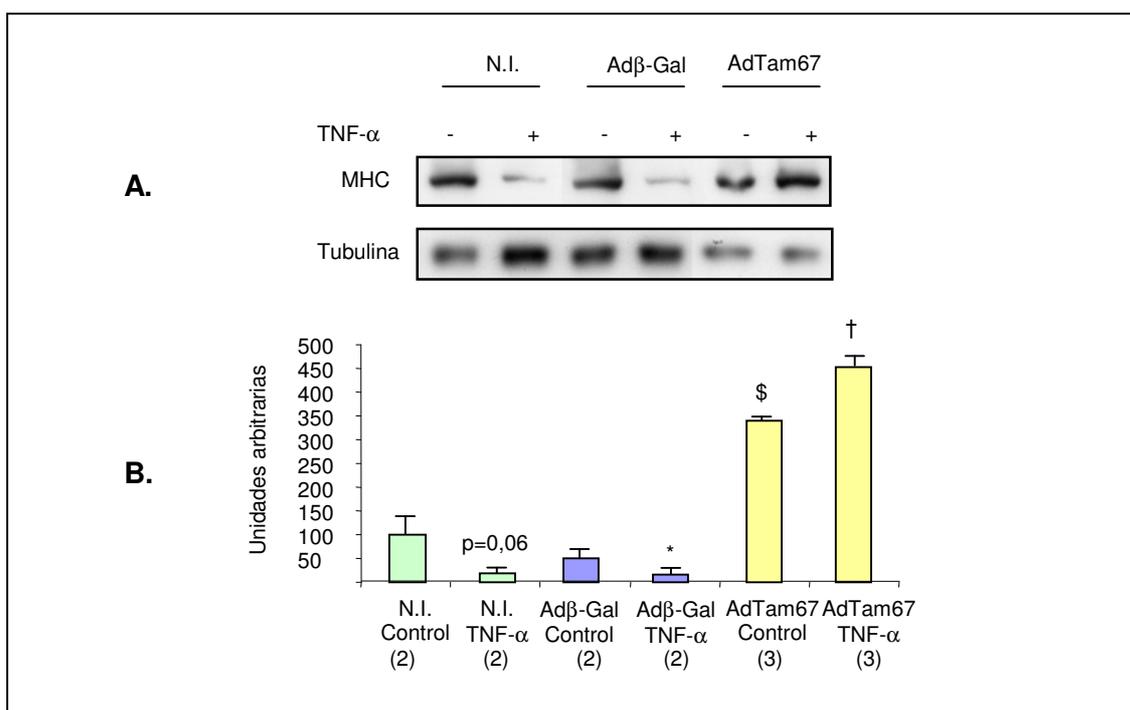


Figura 8. Niveles de la proteína MHC en células tratadas con TNF-α 10 ng/ml. Panel A. Western blot representativo de los niveles de MHC en mioblastos de la línea celular C2C12 en diferenciación. La carga de proteína es corregida con la expresión de la tubulina. Panel B. Análisis densitométrico de la expresión de MHC. Los resultados se presentan como porcentaje del control y están expresados como la media \pm s.e.m. *, $p < 0,05$ para las comparaciones entre controles y tratadas con TNF- α , †, $p < 0,05$; para las comparaciones entre las células tratadas con TNF- α de los distintos grupos y \$\$, $p < 0,01$ para las comparaciones entre los grupos control. El tamaño muestral se indica entre paréntesis.

4. Transferencia génica de un dominante negativo para AP-1 *in vivo* mediante adenovirus para intentar revertir la caquexia.

La caquexia es una de las principales causas de muerte entre los enfermos con cáncer (Warren, 1932). Por esta razón, muchos esfuerzos están orientados a la búsqueda de una terapia que contrarreste las alteraciones que causa (Argilés *et al.*, 1997 y 2004). No existen datos sobre terapias génicas dirigidas y enfocadas al músculo esquelético en la caquexia cancerosa. Kawamura *et al.* (1999) inyectando intratumoralmente oligonucleótidos con la secuencia de unión para NF- κ B, lograron revertir en parte la caquexia en un modelo tumoral de ratón.

Con los datos obtenidos en los modelos tumorales inductores de caquexia presentados en los capítulos I y II, además de los resultados *in vitro* con el AdTam67, decidimos realizar una aproximación a una terapia génica contra la caquexia dirigida al músculo esquelético, usando como vector un adenovirus e intentando bloquear la actividad de AP-1. El procedimiento se llevó a cabo como se explica en el apartado de materiales y métodos.

La utilización de adenovirus en la terapia génica *in vivo* ha resultado con éxito en tres tejidos: (1) en las células β de los islotes pancreáticos (Antinozzi *et al.*, 1999), (2) en el hígado (Herz *et al.*, 1993; Trinh *et al.*, 1999) y (3) en el músculo esquelético (Ragot *et al.*, 1993; Jiménez-Chillarón *et al.*, 1999 y 2002).

Como primer punto, decidimos comprobar que la administración de los adenovirus a ratas Wistar de 3 días de vida se mantenía durante el tiempo suficiente como para poder realizar el protocolo de implantación del hepatoma ascítico Yoshida AH-130. Para esto, utilizamos el AdGFP, siendo la cantidad de adenovirus por animal de 5×10^8 virus, inyectado en un volumen de 10 μ l en el músculo GSN. A los 15 días de la inoculación, se procedió a anestésiar y extraer los músculos GSN y soleus de los animales para ser observados bajo la lupa de fluorescencia; de la misma manera se procedió con los animales al cabo de un mes tras a la inoculación del virus. Los resultados se pueden ver en la figura 9.

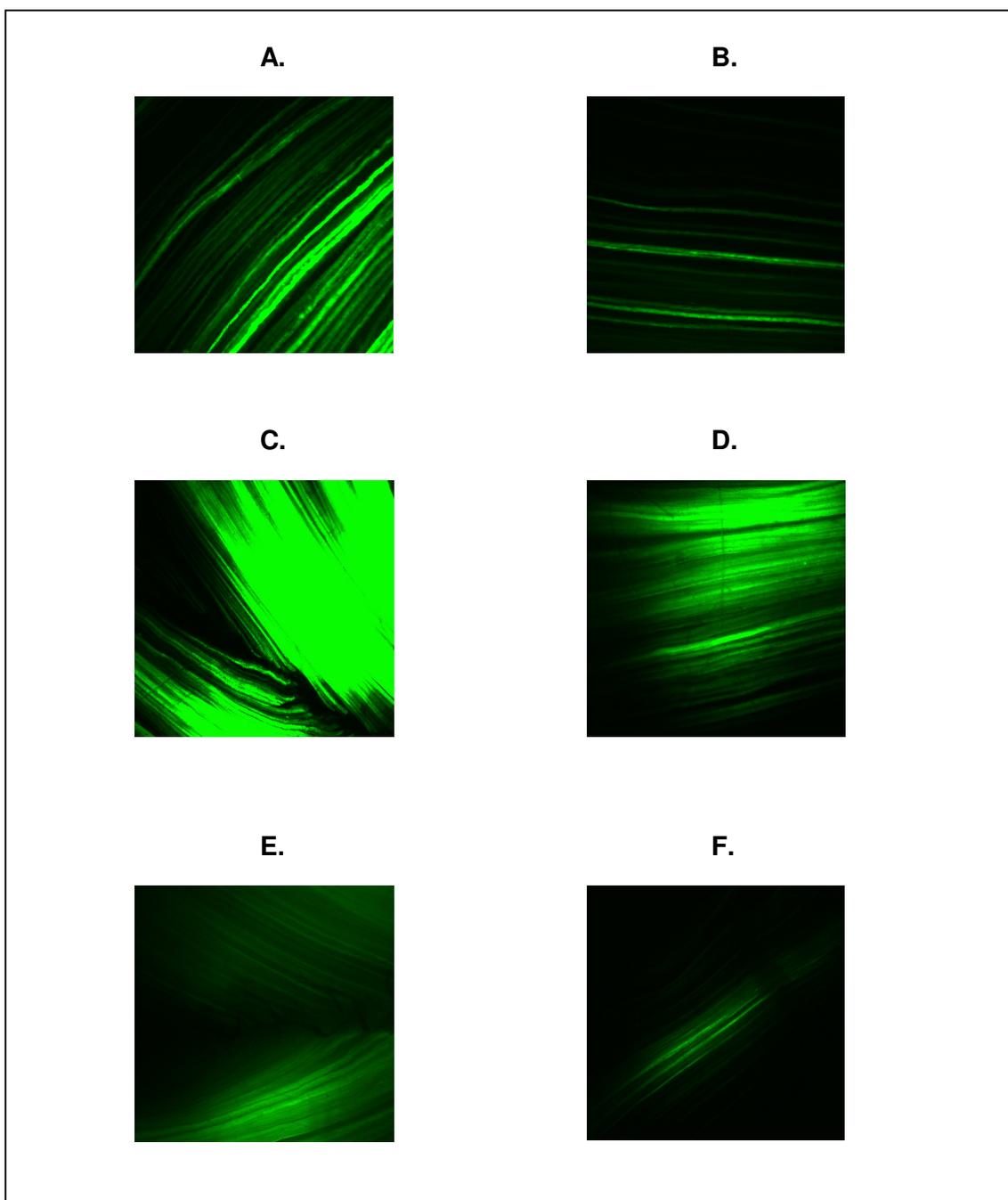


Figura 9. Transferencia génica del AdCMVGFP en los GSN de ratas Wistar. Imágenes representativas de la transferencia génica con el AdCMVGFP en ratas Wistar macho con 3 días de vida. A. Imagen de un músculo GSN a los 15 días después de la inoculación del virus. B. Músculo soleus adyacente al GSN a los 15 días después de la inoculación. C. D. E. Imágenes de los músculos GSN un mes después de la inoculación del virus. F. Músculos soleus un mes después de la inoculación del virus.

Los resultados obtenidos demuestran que la proteína transferida al músculo de las ratas es estable por lo menos hasta los 30 días posteriores a la inoculación del adenovirus. Además, se demuestra que la transferencia es localizada, ya que no se observa fluorescencia en los músculos GSN de la pata no inyectada, ni en los músculos adyacentes excepto en soleus.

4.1. Transferencia génica de un dominante negativo para AP-1 mediante adenovirus en el músculo esquelético de ratas portadoras del hepatoma ascítico Yoshida AH-130.

Para este experimento se requerían ratas Wistar macho de tres días de edad. En este momento se inyectaba el adenovirus y se esperaba hasta que los animales eran destetados (21 días), más tres días de adaptación a sólo comer pienso. En la tabla 1 se puede ver los pesos iniciales de los animales en el momento de inocular el tumor. No se observaban diferencias en los pesos de los animales, independiente de la camada y del grupo experimental al que pertenecían.

Los animales con tres días de vida fueron separados de la madre, anestesiados e inyectados con los adenovirus. Los grupos experimentales fueron:

- 1) AdTam67 Tumor
- 2) AdGFP Tumor
- 3) AdTam67/AdGFP Tumor
- 4) AdTam67/AdGFP Control
- 5) No infectados Tumor
- 6) No infectados Control

Los animales del grupo AdTam67 Tumor recibieron el adenovirus del Tam67 en el músculo GSN de la pata derecha. Los animales del grupo AdGFP Tumor recibieron el adenovirus de la GFP en el GSN de la pata izquierda. Los animales de los grupos AdTam67/AdGFP control y tumor recibieron en el GSN de la pata derecha el adenovirus Tam67 y en el GSN de la pata izquierda el de la GFP. Los animales de los grupos no infectados no recibieron ninguno de los adenovirus. En la tabla 1 se presentan los pesos iniciales y finales de los distintos grupos experimentales.

	Peso inicial (g)	Peso final (g)
AdTam67 Tumor (3)	61,3±1,3	81,2±3,0
AdGFP Tumor (2)	61,9±1,3	84,1±2,6
AdTam67/AdGFP Tumor (3)	57,2±0,8	78,5±1,9
AdTam67/AdGFP Control (2)	58,4±0,8	78,9±1,0
N.I. Tumor (2)	60,9±1,1	81,2±1,3
N.I. Control (3)	58,5±0,3	79,2±1,0

Tabla 1. Peso inicial y final de los animales del experimento de transferencia génica. Los datos están presentados como media \pm s.e.m. El tamaño muestral se indica entre paréntesis.

Terminado el periodo de adaptación fue implantado el tumor a los animales correspondientes. La cantidad de células tumorales inoculadas fue 4×10^7 células en un volumen de 1 ml (para más detalle, ver sección de materiales y métodos). A los 4 días de crecimiento tumoral, los animales fueron anestesiados para rápidamente extraer los músculos GSN, soleus y tibialis; éstos fueron rápidamente pesados y congelados en nitrógeno líquido. En la tabla 2 se pueden observar los pesos medios de los músculos GSN separados por grupos y por extremidad. Los resultados demostraron que el tumor había causado una disminución en el peso medio de los músculos GSN de un 14% si comparáramos controles y tumores no infectados. En ambos grupos de animales inyectados con adenovirus, el porcentaje de pérdida de peso en los músculos GSN es sólo de un 4%; esto se debe principalmente a la gran variabilidad que tenían ambos grupos en los pesos de los músculos.

	GSN	
	Izquierda	Derecha
AdTam67 Tumor (mg)	594±11	576±2
AdGFP Tumor (mg)	<u>554±37</u>	601±2
AdTam67/AdGFP Tumor (mg)	<u>551±4</u>	566±5
AdTam67/AdGFP Control (mg)	<u>576±58</u>	591±17
N.I. Tumor (mg)	562±2*	559±4*
N.I. Control (mg)	659±11	657±22

Tabla 2. Efecto del hepatoma ascítico Yoshida AH-130 en los músculos GSN a día 4 de crecimiento tumoral. Los datos están presentados como media \pm s.e.m. El tamaño muestral es de 2 para todos los grupos. GSN = *gastrocnemius*. Significatividad estadística de las diferencias: *, $p < 0,05$ control vs tumor. El AdGFP siempre fue inyectado en la pata izquierda (datos subrayados) y el AdTam67 en la pata derecha (datos en negrita).

4.1.1. Niveles de las proteínas transferidas a las células musculares *in vivo* mediante adenovirus.

Con el fin de confirmar que la transferencia génica había funcionado correctamente, determinamos los niveles de las proteínas GFP y c-Jun/Tam67 en los GSN de los animales transfectados. Los resultados demostraron que ambas proteínas habían sido transferidas de forma correcta, aunque los niveles de expresión mostraron una gran variabilidad entre los individuos, además de que los niveles de proteína fueron mucho más bajos que los obtenidos para los ensayos *in vitro* (figura 10).

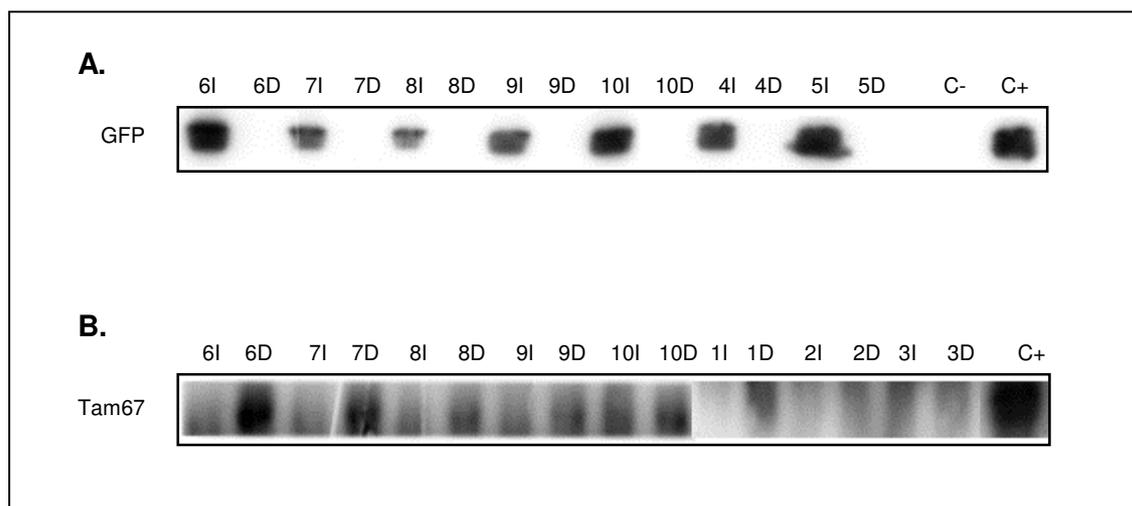


Figura 10. Niveles del dominante negativo de AP-1 Tam67 y la GFP en los músculos GSN de los animales transfectados. Panel A: Western blot representativo de los niveles de la proteína GFP en GSN. Panel B: Western blot representativo de los niveles de la proteína Tam67 en GSN. C+, C2C12 infectadas con los mismos adenovirus a día tres de diferenciación y recogidas a las 48 horas después de la infección. Para el control de la GFP se cargaron 10 μ g de proteína total y para el Tam67 se cargaron 4 μ g de proteína total. Para la determinación de los niveles de ambas proteínas en los músculos GSN *in vivo*, se cargaron 50 μ g de proteína total. Los carriles están representados por el número del animal en el experimento y la letra D para la extremidad derecha o la letra I para la extremidad izquierda.

4.1.2. Efecto de la sobreexpresión del AdTam67 sobre la regulación de MyoD en el músculo esquelético *in vivo*.

Con los resultados obtenidos *in vitro*, que demuestra un efecto (ya sea directo o indirecto) de AP-1 en la regulación de MyoD, y dada la importancia de este factor de transcripción en el desarrollo de la miogénesis, así como en la regeneración del músculo después de un daño (Lassar *et al.*, 1994; Black y Olson. 1998), quisimos analizar la regulación de MyoD *in vivo* cuando bloqueamos la transactivación del factor de transcripción AP-1.

Los resultados obtenidos confirmaron la disminución del factor miogénico MyoD en los músculos GSN de los animales portadores de tumor a día 4 de crecimiento tumoral (figura 11). Esta disminución se observaba tanto en los animales portadores de tumor que no habían recibido ningún adenovirus, como también en los animales transfectados con el AdGFP, pero esta disminución no era tan importante en los animales transfectados con el AdTam67 (figura 11). La presencia del dominante negativo en los GSN de estos animales previene en parte la disminución de MyoD (Figura 11).

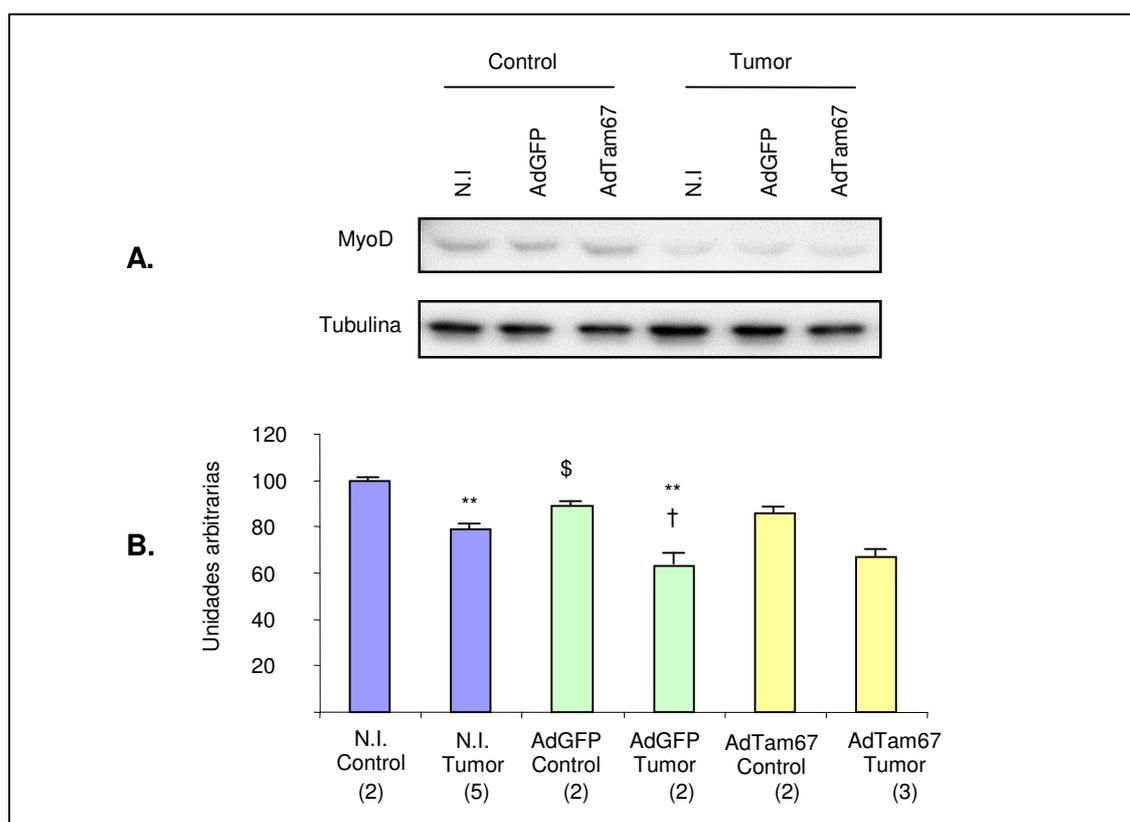


Figura 11. Niveles del factor miogénico MyoD en los músculos GSN de los animales sometidos a la transferencia génica. Panel A: Western blot representativo de los niveles de MyoD en los músculos GSN. La carga de proteína es corregida con la expresión de la tubulina. Panel B: Análisis densitométrico de la expresión de MyoD. Los resultados se presentan como porcentaje del control y están expresados como la media \pm s.e.m. Significatividad estadística de las diferencias: **, $p < 0,01$ para las comparaciones entre controles y tumores; †, $p < 0,05$; para las comparaciones entre los grupos de animales portadores de tumor y \$, $p < 0,05$ para las comparaciones entre los grupos control. El tamaño muestral se indica entre paréntesis.

DISCUSIÓN

1. Utilización del AdTam67 en células musculares en cultivo.

Los resultados demuestran que la utilización del AdTam67 en la línea celular C2C12 derivada de ratón es factible, y que utilizando una m.o.i. de 100 podemos llegar a niveles de un 100% de las células transfectadas (figura 1). Este dato ha sido confirmado con la sobreexpresión del AdGFP en el mismo modelo (figura 2).

También hemos podido demostrar que la sobreexpresión de este dominante negativo en miotubos de la línea celular C2C12 no produce cambios en los niveles de expresión de MyoD bajo condiciones de diferenciación normales (figura 1).

2. Regulación del factor miogénico MyoD en mioblastos de la línea C2C12 tratados con TNF- α .

Son muchos los trabajos que coinciden en el hecho que TNF- α es capaz de detener la miogénesis *in vitro* (Salía *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1998; Guttridge *et al.*, 2000; Langen *et al.*, 2001; Coletti *et al.*, 2002; Langen *et al.*, 2004;), y que una de sus dianas de acción es la inhibición de la expresión de MyoD (Guttridge *et al.*, 2000) o una desestabilización en la vida media de esta proteína (Langen *et al.*, 2004). MyoD es un factor de transcripción clave en la diferenciación y regeneración muscular. Nuestros resultados confirman estos datos, ya que encontramos que el tratamiento con TNF- α en mioblastos en diferenciación reduce de manera muy importante los niveles del factor MyoD (figura 3).

3. Efecto de la sobreexpresión del AdTam67 en los mioblastos tratados con TNF- α .

La eficiencia de células musculares transformadas por los adenovirus es de un 100%, tanto en miotubos de la línea celular C2C12 como en células musculares humanas en cultivo primario (Baque *et al.*, 1994 y 1996). Dicha eficiencia disminuye considerablemente al utilizar células indiferenciadas. El porcentaje de células transfectadas es mucho menor tanto si lo observamos al microscopio utilizando el AdGFP (figura 4), así como los niveles de proteína utilizando el AdTam67 (figura 5). Esto supone un problema, ya que al aumentar la m.o.i. y aumentar así el porcentaje de células infectadas, se vuelve tóxico para las células; de este modo, hemos comprobado que con m.o.i. superiores a 200 las células mueren.

Pese a estas limitaciones, hemos determinado que la sobreexpresión del AdTam67 revierte el fenotipo ocasionado por el tratamiento con TNF- α en los mioblastos de la línea celular C2C12. Esto no coincide con los datos existentes hasta el momento, ya que sólo se pensaba en NF- κ B como el responsable de la respuesta al tratamiento con TNF- α (Li *et al.*, 1998; Guttridge *et al.*, 2000; Langen *et al.*, 2001; Coletti *et al.*, 2002; Langen *et al.*, 2004). Recientemente, Stewart *et al.* (2004) han implicado a la cascada de señalización de las JNK en el efecto del TNF- α . Coletti *et al.* (2002) han demostrado en cultivos de células musculares que la activación de NF- κ B producida por el TNF- α es más un mecanismo compensatorio que un mecanismo catabólico. Estos datos se refuerzan con el hecho que NF- κ B es reconocido desde hace ya varios años como un factor de transcripción antiapoptótico y protector de la vida celular (Amer y Baltimore, 1996). Por otra parte, son numerosos los trabajos que implican al factor de transcripción AP-1 en la regulación de la miogénesis (Li *et al.*, 1992; Bengal *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1992; Henderson y Stein, 1994; Pedraza-Alva *et al.*, 1994; Lehtinen *et al.*, 1996; Stewart *et al.*, 2004;).

Los resultados obtenidos demuestran que la utilización del AdTam67 en los mioblastos tratados con TNF- α revierte la pérdida de MyoD observada en las células tratadas con TNF- α (figura 5). Está descrito que miembros de la familia Jun/Fos pueden inhibir la actividad de MyoD por un mecanismo que implica la interacción proteína-proteína entre el dominio LZ (*leucine zipper domain*) de c-Jun y el dominio HLH (*helix loop helix*) de MyoD (Bengal *et al.*, 1992). La inhibición de c-Jun por parte de su dominante negativo (AdTam67) puede en parte liberar a MyoD para que ejerza su actividad en el programa de diferenciación miogénica.

La regulación de la progresión del ciclo celular y la salida de éste para llevar a cabo el programa de diferenciación, es un mecanismo muy complejo que involucra muchísimos cambios de expresión y niveles de proteína de diversos factores reguladores. Para una correcta progresión del programa de diferenciación muscular, primero debe ocurrir una serie de cambios en los factores reguladores del ciclo celular, con lo que se produce un bloqueo del ciclo celular; esto produce una activación de los factores miogénicos bHLH y MEF2, que son los que terminarán por completar el programa de diferenciación muscular (Olson, 1992; Lassar *et al.*, 1994; Walsh y Perlman, 1997). Todo este proceso está regulado por un equilibrio entre las actividades de las cdk (*cyclin-cyclin-dependent kinase*) y sus inhibidores. La eliminación del medio rico en factores de crecimiento produce una disminución en la expresión de las ciclinas A y D1, además de las quinasas cdk2 y cdc2, sumado a una activación en la síntesis de los inhibidores de cdk p18 y p21. Todo esto produce una estabilización de la proteína p27 (Walsh y Perlman, 1997). Esta regulación termina por disminuir los niveles de la proteína del retinoblastoma (pRb) fosforilada, con lo que las células se mantienen en el estado G1 por inhibición de la actividad del factor de transcripción formado por el complejo E2F-DP1. Todo ello conduce a la salida de las células musculares indiferenciadas del ciclo celular, paso crítico en la activación de los factores miogénicos y el término del programa de diferenciación miogénica (Walsh y Perlman, 1997). La ciclina D1, una proteína involucrada en la proliferación celular, se ha descrito que debe disminuir para la correcta evolución del ciclo celular en células de la línea C2C12, y que este mecanismo regulador de la diferenciación está mediado por NF- κ B (Guttridge *et al.*, 1999). Nuestros resultados confirman un aumento en los niveles de la ciclina D1 en las células tratadas con el TNF- α , siendo este aumento totalmente bloqueado por la presencia del dominante negativo de AP-1 (figura 6). La participación de AP-1 en la regulación de la proliferación celular está ampliamente estudiado (revisado por Shaulian y Karin, 2002). Existen evidencias que demuestran que AP-1, y específicamente c-Jun, participa directamente en la regulación de la proliferación mediante dos mecanismos: primero actuando directamente sobre el promotor de la ciclina D1, activando su expresión y actividad (Brown *et al.*, 1998; Wisdom *et al.*, 1999; Shaulian y Karin, 2001), y como segundo mecanismo está la inhibición que produce c-Jun sobre la expresión de p21 una de las proteínas inhibidoras de las quinasas cdk (Xiong *et al.*, 1993; El-Deiry *et al.*, 1993).

Los resultados obtenidos para la proteína MHC, un marcador clásico de células musculares diferenciadas, nos permiten asegurar que los mioblastos que sobreexpresan el dominante negativo de AP-1 (Adtam67) presentan niveles muy superiores (tanto en controles como en las células tratadas con TNF- α) a los de las células no infectadas y las células infectadas con el Ad β -Gal.

Todos estos datos y los resultados obtenidos para MyoD, ciclina D1 y MHC nos permiten proponer que parte del efecto que tiene la sobreexpresión del dominante negativo de AP-1 (AdTam67) en los mioblastos tratados con TNF- α es la normalización del programa miogénico, mediado principalmente por la salida efectiva de las células del ciclo celular y su correcta entrada y desarrollo del programa de diferenciación a cargo de los factores miogénicos bHLH.

4. Una terapia génica contra la caquexia *in vivo*.

Los resultados obtenidos para transferencia génica en músculo esquelético *in vivo*, son muy alentadores. En las pruebas realizadas con el AdGFP, observamos que la expresión de la proteína GFP se mantiene a través del tiempo, y que además se acumula (figura 9). Lamentablemente, los resultados obtenidos sobre los niveles de la proteína transferida por el AdTam67 no demuestran ser tan alentadores, ya que comparados con los niveles de la proteína GFP, son inferiores tanto *in vivo* como con los controles de infecciones *in vitro* (figura 10). Otro inconveniente de este procedimiento es la alta variabilidad que presentan los niveles de la proteína transferida independientemente de cual sea (figura 10).

A pesar de lo anterior, hemos podido determinar que los músculos GSN inyectados con el AdTam67 presentan una tendencia a ser más grandes que los GSN inoculados con el AdGFP (tabla 2). A pesar de que no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y tumor para los GSN inyectados con ambos adenovirus, este dato puede ser producto sólo de la gran variabilidad que existe entre los integrantes de cada grupo (tabla 2).

Los resultados observados para el factor miogénico MyoD en los músculos GSN de los animales controles e inyectados con los adenovirus, indican que mientras los grupos de animales no infectados y los infectados con el adenovirus de la GFP presentan una importante y significativa pérdida en los niveles de MyoD entre los GSN de los animales control y los GSN de los animales portadores de tumor, los GSN inyectados con el AdTam67 aunque sí presentan una disminución ésta no llega a ser significativa (figura 11).

En resumen, podemos decir que la estrategia para la transferencia génica *in vivo* mediante vectores adenovíricos del músculo esquelético de ratas recién nacidas es posible y es una buena herramienta en el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la caquexia. Los resultados nos permiten proponer un mecanismo de regulación de los niveles de MyoD *in vivo* mediado por AP-1. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el capítulo I, donde AP-1 era el único factor de transcripción que presentaba una regulación diferencial en el músculo esquelético de las ratas portadoras de tumor, y con los resultados del capítulo II, donde la inhibición de la transactivación de AP-1 mediante el uso del SP100030 revertía en parte la caquexia principalmente por un mecanismo que involucra una recuperación de MyoD y una inhibición génica del mRNA de la enzima conjugadora E2 del sistema proteolítico dependiente de ATP y ubiquitina.