

Estudio de las Propiedades Terapéuticas del gen E1a.

Francisco José Cimas Felipe

Tutora: María José Ruiz Hidalgo
Director: Ricardo Sánchez Prieto



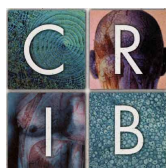
CENTRO REGIONAL DE
INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS



UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA
FACULTAD DE MEDICINA DE ALBACETE
Departamento de Ciencias Médicas



Universidad de Castilla-La Mancha
Facultad de Medicina de Albacete



Centro Regional de Investigaciones Biomédicas

Memoria de la Tesis Doctoral:

Estudio de las Propiedades Terapéuticas del gen E1a

Presentada por:

Francisco José Cimas Felipe

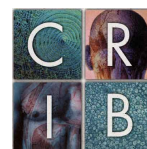
para optar al Grado de Doctor con Mención de Doctorado
Internacional.

Dirigida por:

Dr. Ricardo Sánchez Prieto

y tutorizada por:

Dra. María José Ruiz Hidalgo



El Dr. **Ricardo Sánchez Prieto**, investigador del programa INCRECYT y director del Laboratorio de Oncología Molecular del Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, en la Facultad de Medicina de Albacete de la Universidad de Castilla-La Mancha.

CERTIFICA:

Que la presente tesis doctoral titulada *Estudio de las Propiedades Terapéuticas del gen E1a* ha sido realizada bajo mi dirección y supervisión por Francisco José Cimas Felipe en el Laboratorio de Oncología Molecular del Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, en la Facultad de Medicina de Albacete de la Universidad de Castilla-La Mancha.

Que consideramos que esta memoria reúne la calidad y el rigor científico necesarios para ser defendida en la Universidad de Castilla-La Mancha como requisito para que Francisco José Cimas Felipe aspire al Grado de Doctor con Mención Internacional.

Para que así conste a los efectos oportunos, firmo la siguiente autorización:

Albacete, a 24 de julio de 2016

Dr. Ricardo Sánchez Prieto

Director de Tesis

Francisco José Cimas Felipe ha sido beneficiario de tres becas de investigación del proyecto Papel de la Señalización Intracelular Mediada por Proteínas Quinasas en los Fenómenos de Quimio y Radioresistencia y financiado en su totalidad por la Fundación Leticia Castillejo Castillo de Cuenca.

Durante el curso 2010-2011, Francisco se matriculó en el Programa Oficial de Postgrado del Máster Universitario en Biomedicina Experimental de la Universidad de Castilla-La Mancha, donde realizó el periodo de docencia e investigación para obtener el título de Máster Universitario que reconoce el grado de suficiencia investigadora, requisito para realizar la labor de investigación en la que se basa la presente tesis doctoral.

En el transcurso de su tesis doctoral, realizó una estancia en el laboratorio del Dr. Pier Paolo Pandolfi en el Beth Israel Deaconess Medical Center de Boston, EE.UU., adscrito a la Harvard Medical School de la misma ciudad entre abril y julio de 2015 y por la cual, este trabajo opta a la mención de Doctorado Internacional. Dicha estancia fue financiada por la Cátedra UCLM-ENRESA.

Este trabajo ha sido cofinanciado por el Ministerio Español de Economía y Competitividad (SAF2012-30862) y (SAF2015-64215) y por la Fundación Leticia Castillejo Castillo.

Contenido

Summary.....	15
Introducción	16
Objectives	46
Material y Métodos	47
Resultados	61
Discusión.....	81
Conclusions.....	98
Bibliografía.....	99

Tablas

TABLA 1. ENSAYOS CLÍNICOS O PRE-CLÍNICOS CON E1A.....	45
TABLA 2. LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS EN ÉSTE TRABAJO.	47
TABLA 3. VECTORES EMPLEADOS EN ÉSTE TRABAJO CON SUS CORRESPONDIENTES INSERTOS.....	48
TABLA 4. COMPONENTES DE LA SOLUCIÓN A PARA LA TRANSFECCIÓN CON FOSFATO CÁLCICO.	49
TABLA 5. COMPONENTES DE LA SOLUCIÓN B PARA LA TRANSFECCIÓN CON FOSFATO CÁLCICO.....	50
TABLA 6. VECTORES EMPLEADOS EN ÉSTE TRABAJO CON SUS CORRESPONDIENTES INSERTOS.....	54
TABLA 7. CEBADORES EMPLEADOS EN ÉSTE TRABAJO CON SUS SECUENCIAS DIRECTA E INVERSA.	55
TABLA 8. COMPUESTOS QUÍMICOS UTILIZADOS EN ÉSTE ESTUDIO.	56
TABLA 9. CEBADORES DE GENOTIPADO EMPLEADOS EN ÉSTE TRABAJO CON SUS SECUENCIAS DIRECTA E INVERSA.....	58
TABLA 10. LEYENDA DE SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA.	60

Figuras

FIGURA 1. NUEVAS TERAPIAS EN CÁNCER DIRIGIDAS CONTRA FENÓMENOS ESPECÍFICOS FUNDAMENTALES PARA LA BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS TUMORALES 21

FIGURA 2. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL GENOMA DE LOS ADENOVIRUS..... 32

FIGURA 3. ESQUEMA DE LOS DOMINIOS CONSERVADOS DE E1A, LAS ISOFORMAS QUE LOS PORTAN Y LAS PROTEÍNAS CON QUE INTERACCIONAN 33

FIGURA 4. MAPA DE REGIONES FUNCIONALES DE E1A. 38

FIGURA 5. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL SISTEMA DE EXPRESIÓN INDUCIBLE DEL SISTEMA DE EXPRESIÓN DEL GEN E1A..... 58

FIGURA 6. PROTOCOLO DE CARCINOGENESIS QUÍMICA DMBA-TPA..... 60

FIGURA 7. E1A INDUCE RADIOSENSIBILIDAD EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE GLIOBLASTOMA 61

FIGURA 8. E1A INDUCE EL ARRESTO CELULAR EN FASE G2/M EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE GLIOBLASTOMA..... 62

FIGURA 9. E1A INDUCE UNA RESPUESTA APOPTÓTICA EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE GLIOBLASTOMA. 62

FIGURA 10. CHK1 ES UNA NUEVA DIANA DE E1A A NIVEL TRANSCRIPCIONAL 63

FIGURA 11. LA INTERFERENCIA DE CHK1 ES CAPAZ DE REVERTIR LAS ALTERACIONES EN EL CICLO CELULAR EN CÉLULAS U87MG CON EXPRESIÓN DE E1A 63

FIGURA 12. C-MYC INCREMENTA LOS NIVELES DE CHK1 EN CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA..... 64

FIGURA 13. LA INTERFERENCIA DE C-MYC DISMINUYE LOS NIVELES CHK1 Y REVIERTE EL BLOQUE EN FASE G2/M EN CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA CON EXPRESIÓN DE E1A 65

FIGURA 14. LA SOBREPRESIÓN DE C-MYC MIMETIZA LOS EFECTOS BIOLÓGICOS DE EN CUANTO AL INCREMENTO DE CHK1, LA RADIOSENSIBILIDAD Y LA DISTRIBUCIÓN DEL CICLO CELULAR EN LA LÍNEA U87MG..... 66

FIGURA 15. LOS EFECTOS DE LA EXPRESIÓN DE E1A SON COMUNES EN DIFERENTES LÍNEAS DE GLIOBLASTOMA..... 67

FIGURA 16. E1A PROMUEVE SENSIBILIDAD AL CDDP EN NSCLC 68

FIGURA 17. E1A PROMUEVE QUIMIOSENSIBILIDAD A CDDP EN NSCLC A TRAVÉS DE LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS 69

FIGURA 18. LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS DE E1A CORRELACIONA CON UN INCREMENTO EN LOS NIVELES BASALES DE AUTOFAGIA..... 70

FIGURA 19. LA SENSIBILIDAD A CDDP CORRELACIONA CON UNA BAJA EXPRESIÓN BASAL DE MKP1 EN LÍNEAS DE NSCLC 71

FIGURA 20. LA INTERFERENCIA DE MKP1 MEDIA RESISTENCIA A CDDP EN NSCLC. H460 INFECTADAS CON LENTIVIRUS PORTANDO SHRNA CONTROL O SHRNA MKP1 72

FIGURA 21. CÉLULAS H460 RESISTENTES POR CO-CULTIVO MUESTRAN MENORES NIVELES DE MKP1 72

FIGURA 22. LA EXPRESIÓN DE E1A INCREMENTA LOS NIVELES DE PROTEÍNA DE MKP1 EN NSCLC... 73

FIGURA 23. EL INCREMENTO DE MKP1 PROVOCADO POR E1A MEDIA LA SENSIBILIDAD ASOCIADA A CDDP..... 74

FIGURA 24. EL INCREMENTO DE MKP1 MEDIA LA SENSIBILIDAD A CDDP ASOCIADA A E1A A TRAVÉS DE P38 MAPK 75

FIGURA 25. E1A ES CAPAZ DE BLOQUEAR LA TUMOROGÉNESIS EN UN MODELO DE XENOTRANSPLANTE DE HCT116 EN RATONES DESNUDOS 76

FIGURA 26. E1A ES CAPAZ DE BLOQUEAR LA TUMOROGÉNESIS EN UN MODELO SINGÉNICO DE CÉLULAS B16-F10 Y RATONES C57BL/6..... 77

FIGURA 27. ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LOS ANIMALES TRANSGÉNICOS 78

FIGURA 28. E1A ACTÚA COMO SUPRESOR TUMORAL EN EL CONTEXTO DE CARCINOGENESIS QUÍMICA DMBA-TPA..... 80

FIGURA 29. MODELO DE MECANISMO DE INDUCCIÓN DE RADIOSENSIBILIDAD POR E1A EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE GLIOBLASTOMA 86

FIGURA 30. MODELO DE MECANISMO DE INDUCCIÓN DE QUIMIOSENSIBILIDAD POR E1A EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE NSCLC 91

Abreviaturas

AP1: Proteína activadora 1	DE: Desviación estandar
ASK1: Kinasa reguladora de señal apoptótica 1	DMBA: 7,12-Dimetilbenzantraceno
ATF: Factor activador de transcripción	DMEN: " Medio de Eagle modificado por Dulbecco
ATG: Proteína relacionada con autofagia	DMSO: Dimetilsulfóxido
ATM: Proteína mutada en Ataxia Telangiectasia	DNA: Ácido desoxirribonucleico
ATR: Proteína relacionada con Ataxia Telangiectasia y RAD3	dNTPs: Desoxirribonucleotidos
BAX: proteína X asociada a BCL2	DTT: Ditiotreitól
BCA: ácido bicinconínico	DUSP: Fosfatasa de especificidad dual
BCL: Proteína del linfoma de células B 2	E1A: Transcrito 1A de la región Temprana
BCR/ABL: Proteína de fusión entre BCR y ABL	E1B: Transcrito 1B de la región temprana
BSA: Albúmina Sérica Bovina	EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
CAR: Receptores tipo coxsackievirus-adenovirus	ECL: Sustrato quimioluminiscente potenciado
CBP: Proteína de unión a CREB	EGF: Factor de crecimiento epidérmico
CD: Cluster de diferenciación	EGFR: Receptor del EGF
cDDP: cis-diaminodicloroplatino	ERK: Kinasa regulada por señales extracelulares
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario	EV: Vector vacío
CHK1: Kinasa de punto de control 1	FBS: Suero fetal bovino
CR: Región conservada	FDA: Agencia Estadounidense del Medicamento
CRIB: Centro Regional de Investigaciones Biomedicas	G418: Geneticina
CtBP: Proteína de unión al extremo C-terminal	GFP: Proteína fluorescente verde
CMV: Citomegalovirus	GM-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos
CRISPR: Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas	HER-2: Factor de crecimiento epidérmico-2
	HNSCC: Carcinoma de célula escamosa de cabeza y cuello
	hTERT: Telomerasa transcriptasa inversa humana
	IgG: Inmunoglobulina G

Abreviaturas

IL: Interleukina	PCAF: Factor asociado a p300/CBP
ITR: Repeticiones invertidas terminales	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
JNK: Kinasa c-Jun NH2-terminal	PDGFRb: Factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo b
LB: Medio de crecimiento Luria Broth	PEA15: Proteína astrocítica 15
LC3: Cadena ligera 3 de la proteína asociada a microtúbulos	PI3K: Fosfatidil inositol 3 kinasa
LCT: Lisado celular total-	PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
LITR: Repetición terminal invertida izquierda	PP2A: Proteín fosfatsa 2A
MAPK: Proteína kinasa activada por mitógenos	PPM: Proteína fosfatasa dependiente de metales
MEF: Fibroblastos embrionarios murinos	pRb: Proteína del retinoblastoma
mIR: MicroRNA	PSA: Antígeno Prostático Específico-
MKK: MAP2 Kinasa	PTEN: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
MKP: Fosfatasa de MAPK	PVDF: Polivinilideno
MLP: Promotor genes tardíos de Adenovirus	Qip1: Importina alfa 3
MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol	qPCR: PCR cuantitativa
mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero	RAS: Proteína del sarcoma de rata
NF-kB: Factor de transcripción nuclear kB	RI: Radiación ionizante
NGF: Factor de crecimiento nervioso	RIP: Proteína de interacción con receptor
NIH: Agencia Nacional de Salud de EE.UU.	RITR: Repetición terminal invertida derecha
NLS: Secuencia de localización nuclear	SCID: Inmunodeficiencia combinada grave
NSCLC: Carcinoma pulmonar no microcítico	SDS-Page: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
OIS: Senescencia inducida por oncogenes	shRNA: Short Hairpin RNA
Ori: Origen de replicación	RNA: Ácido ribonucleico
Pb/kpb: Pares/kilo pares de bases	TAF: Factores asociados a TBP
PBS: Tampón fosfato salino	TBE: Tampón TRIS, borato y EDTA
	TBP: Proteína de unión a la caja TATA
	TBS: Tampón TRIS salino
	TPA: 12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato

VAA: Virus Adenoasociados

VEGFR2: Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2

VRG: Vector retroviral genómico

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

YY1: Proteína Ying-Yang 1

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a Adolfo, Rosa y todas las personas que con su esfuerzo hacen posible la labor de la Fundación Leticia Castillejo Castillo de Cuenca. Ha sido gracias a su apoyo, tanto económico como humano, con el que ésta tesis ha podido llevarse a cabo de principio a fin. Espero que éste trabajo sirva para que comprueben que su esfuerzo se materializa en nuevas vías para tratar el cáncer y les agradezco de corazón la oportunidad que me han brindado para iniciarme como investigador.

En segundo lugar, mi más sincera gratitud a Ricardo por haber creído en mí cuando nadie más lo hacía y confiar en mí para unirme a su grupo y permitirme desarrollar ésta tesis doctoral. Porque a pesar de lo mal que pintara la situación sus becarios han sido lo primero para él y nos ha procurado siempre la mejor de las situaciones aunque conllevara pasar muchas noches sin dormir. También a María José por su incansable papel como tutora desde el máster hasta ahora y a Antonio y Charo por acogerme como uno más en su laboratorio y apostar por mí en todo momento. Gracias por todo y espero poder devolveros esa confianza

A los que son y han sido mis compañeros: Pedro, Llanos, Miguel Ángel, Juan Luis, Laura, Leticia, Jesús, Marta, Raquel, Olga y Diego. Ellos me han enseñado lo que significa el compañerismo y les agradezco profundamente todo lo que he aprendido y la confianza que han depositado en mí al pedirme consejo o dejarme participar en sus proyectos. Y a Eva por haber sido mi compañera aún sin serlo. Nunca os olvidaré.

A todos nuestros colaboradores y amigos; Santiago, Javier y Teresa en Barcelona, Jesús y Luis en Madrid, Arkaitz en Bilbao, Mario en Siena, Aimé en París, Piet, Pilar, Carmen, Pepeja, Víctor, Jorge y Julián en la U.C.L.M. Muchas gracias a todos por el consejo, las revisiones, el duro trabajo y la confianza a la hora de dejarme ser parte de sus respectivos proyectos. A Miriam, Bea, Silvia y Juan por la confianza y por enseñarme y permitirme empezar a ejercer la docencia con ellos, ha sido un honor. Muchas gracias también a toda la gente del CHUA sin la que éste trabajo no hubiera sido posible. Lola, María, M^a José, Mónica y José por su entrega y ayuda siempre dispuesta en mi trabajo en el animalario y a Sebastía por su consejo. A Pier Paolo, Jlenia y Yu-Ru por darme la oportunidad de trabajar y aprender en Harvard.

A nivel personal, agradecer a mis amigos *Carlos* y *Abel* por haber estado ahí siempre a pesar de los cambios. A *Alberto*, *Jairo* y *Nacho*, por enseñarme que *la vida siempre se abre camino* y que *todos podemos conseguir lo que deseamos*. A *Pablo* e *Irene*, a *Cristina* y *Elena* por su amistad desde hace ya tantos años. A *Antonio*, por ser el hermano que nunca he tenido.

Y por último un agradecimiento que no se puede expresar con palabras. A toda mi familia, a todos mis abuelos, tíos y primos, a *Rosi* por ser un pilar fundamental en mi vida, a *Bibiano*, *Feli* y toda su familia por acogerme como a uno más, y en especial a mis padres por su amor incondicional y su apoyo a pesar de todos mis errores, a mi mujer y compañera *Elena* por creer y confiar en mí, por todo lo que me ha enseñado y darme la fuerza para seguir adelante aún en los momentos más difíciles y a mi hija *Ariadna*, para que cuando lea esto sepa que es lo mejor de mi vida.

Y a la memoria de mis tíos *León* y *Jesús* que me inspiraron a hacer ésta tesis.

Summary

E1A is an early adenoviral gene that takes control of cell machinery to promote viral infection. E1A is able to develop this role through its interaction with key proteins and pathways. E1A has been described as a gene with dual behaviour, acting as oncogene in some non-transformed models and as tumour suppressor in transformed cell lines. Because of these opposing roles, a key milestone towards establishing its potential therapeutic applications is to elucidate its biological properties.

In this regard, E1A role as a radiosensitizer and a chemosensitizer agent was evaluated, as well as its behaviour as a tumour suppressor in an inducible, skin-specific transgenic mouse model under chemical carcinogenesis treatment.

From the obtained data it can be concluded that E1A acts as a strong radiosensitizer and chemosensitizer agent, especially in cell lines that are refractory to treatment such as glioblastoma-derived or NSCLC-derived H1299 cell lines. When expressed in the skin of animals in an *in vivo* animal model, E1A acted as a safe gene and as tumour suppressor, reducing both the number and the sizes of the lesions derived from the chemical carcinogenesis assays.

Introducción

El siguiente trabajo se centra en el estudio de la proteína adenoviral E1A como posible herramienta terapéutica en cáncer. Por ello, se presenta a modo de generalidad qué es el cáncer y los diferentes abordajes terapéuticos disponibles, haciendo especial hincapié en aquellos en los que E1A podría desempeñar un papel. Además, se describen las características de E1A y lo que se sabe en la actualidad de su papel biológico.

1.1 El cáncer y su terapia

Se define cáncer como el conjunto de patologías que cursan con un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células del propio paciente, debido a la alteración en su patrón de expresión génica por agentes propios o ajenos al organismo en un proceso denominado transformación celular. El proceso de transformación celular está marcado por dos conjuntos de eventos fundamentales, siendo ambos mutaciones en genes clave. El primero es una mutación que inactiva o disminuye la expresión del producto de genes denominados supresores de tumores, genes especializados en controlar una proliferación moderada y regulada por el propio organismo mediante señales inhibitorias como el contacto intercelular (**Harris et al. 1969; Stanbridge 1976**). Otro ejemplo de supresores tumorales son las proteínas encargadas de controlar y reparar errores en el DNA durante su replicación y aquellas que detienen el ciclo celular hasta que dichos errores se han reparado. Un claro ejemplo de proteína supresora de tumores es p53, que se ha ganado por ello el sobrenombre de “guardián del genoma” (**Lane 1992**). El otro conjunto de eventos desencadenantes es la activación excesiva o desregulada de proto-oncogenes, genes encargados de promover la división celular, la progresión en ciclo o superar las señales inhibitorias de crecimiento y que al activarse en su forma transformante pasan a denominarse oncogenes (**Stehelin et al. 1976**). Éste tipo de moléculas son las que empujan a las células tumorales a proliferar incontroladamente e ignorar las señales de parada. Algunos de los más comunes y potentes son Ras y Myc cuyos productos activados son capaces de transformar células (**Parada et al. 1984**).

Cuando se produce éste proceso, las células transformadas desarrollan un crecimiento continuo e ilimitado, insensible a las señales inhibitorias y a los controles de división existentes en toda célula sana, provocando el acúmulo de mutaciones sucesivas lo que agudiza su malignización. Dichas mutaciones se consideran, en

general, de dos tipos; *driver*, aquellas mutaciones que confieren una ventaja selectiva a las células tumorales que las expresan y *passenger*, a aquellas que se van acumulando en el material genético de las células fruto de la desregulación y de errores en la reparación del genoma pero que no confieren propiedades transformantes al producirse. Para una revisión detallada ver (Stratton et al. 2009).

Esta proliferación incontrolada o carcinogénesis da lugar a lesiones tumorales locales y puede afectar a otros órganos del cuerpo, en el proceso de diseminación conocido como metástasis. Estas lesiones pueden ocasionar tumores sólidos si provienen de células adherentes o neoplasias hematológicas como las leucemias y los linfomas. Las células tumorales adquieren, además, diferentes habilidades que ayudan a la progresión de la enfermedad. Son capaces, por ejemplo, de estimular la generación de vasos sanguíneos *de novo* (angiogénesis) que ayudan a mantener el flujo de nutrientes y oxígeno. Pueden, además, modificar su patrón metabólico para adaptarse a unos requerimientos mayores con menos disponibilidad de oxígeno y nutrientes e incluso llevar a cabo respuestas de evasión al sistema inmune (Hanahan & Weinberg 2011).

El cáncer es una de las patologías más estudiadas a nivel mundial por sus efectos sobre la salud humana, su enorme prevalencia y sus altas tasas de mortalidad. De hecho, en 2012 se diagnosticaron 14,1 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo; se produjeron 8,2 millones de muertes a causa de dicha enfermedad y había 32,6 millones de personas conviviendo con ella tras haber sido diagnosticados en los cinco años previos (GLOBOCAN, 2012). De hecho, se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años. Según los datos de dicho informe GLOBOCAN, existe un importante número de tumores que son insensibles a los tratamientos actuales bien de forma natural o bien adquiriendo resistencias *de novo*, haciendo necesario el desarrollo de nuevas terapias que sustituyan a las clásicas que han demostrado ser insuficientes a la hora de frenar la enfermedad.

1.1.1 Terapias tradicionales

1.1.1.1 Cirugía

Históricamente, el cáncer se ha localizado y tratado cuando aparecía en su forma de tumor sólido macroscópico. Por tanto, el objetivo de cualquier intento terapéutico ha consistido en su eliminación mediante cirugía.

La cirugía es el tratamiento más común y efectivo además del primero empleado históricamente en el tratamiento de cáncer (Grange et al. 2002). La resección quirúrgica del tejido canceroso intenta extirpar físicamente la mayor cantidad de éste tejido posible y, cuando es posible, se elimina a su vez parte del tejido sano colindante como precaución frente a posibles infiltraciones.

Existen diferentes tipos de cirugía en función del objetivo perseguido y los métodos usados. Dado que la cirugía depende, en gran medida, de los órganos afectados y la disposición de tumor suele clasificarse en función de los elementos en los que se basa cada técnica. Para revisión general sobre cirugía del cáncer ver (Benjamin 2014).

En la mayoría de los casos la cirugía está guiada por la observación macroscópica de tejido, por lo que es común que sea incapaz de eliminar reductos de células tumorales. Los motivos para ello pueden ser bien que sean indetectables, se hayan desplazado a un tejido fuera del foco de observación, o bien porque comprometan la función de órgano en que se encuentran. Por tanto la cirugía se ha venido complementando con otros tratamientos como la quimioterapia y la radioterapia.

1.1.1.2 Quimioterapia

Se denomina quimioterapia al tratamiento con distintos fármacos químicos diseñados para ejercer un efecto tóxico sobre las células, especialmente sobre las tumorales. La quimioterapia más clásica poseía un efecto altamente inespecífico, ejerciendo un efecto citotóxico sobre todas las células del cuerpo, en especial aquellas en división. Sin embargo, los avances en el campo han servido para diseñar tratamientos cada vez más específicos contra las células tumorales que intentan minimizar los efectos deletéreos de la misma a la vez que incrementan su efecto en las células transformadas.

En general, existen diferentes grupos de fármacos quimioterápicos:

- Agentes alquilantes: Actúan induciendo daño al DNA mediante la incorporación de grupos alquilo a su molécula (Fu et al. 2012). Algunos ejemplos son el clorambucil y el melfalán.

- Análogos de nucleósido: Se trata de sustancias que mimetizan las características bioquímicas de los nucleósidos, lo que hace que se incorporen a los ácidos nucleicos durante su síntesis bloqueándola. Valga como ejemplo el 5-fluorouracilo, análogo de uracilo y que bloquea la síntesis de DNA y RNA al incorporarse en la célula (S. S. Cohen et al. 1958).
- Inhibidores de citoesqueleto: Son agentes que interaccionan con los microtúbulos, las estructuras proteicas que dan forma a la células y constituyen el uso mitótico que dirige y posibilita mecánicamente la división celular, impidiendo que dicha división pueda progresar con éxito (Jordan & Wilson 2004). Uno de los fármacos más usado en ésta categoría es el paclitaxel.
- Derivados del platino: La base molecular de efecto terapéutico de los derivados de platino se debe a su capacidad de formar aductos con moléculas de ácidos nucleicos mediante el ataque nucleofílico (Kelland 2007). Estos aductos son los causantes del bloqueo de la replicación y transcripción del material genético al aglutinar proteínas de reconocimiento de daño al DNA impidiendo el progreso del ciclo celular (Dasari & Tchounwou 2014). Si bien el cisplatino es el compuesto más utilizado en terapia y el primero aprobado históricamente, existen otros derivados como carboplatino, oxaliplatino o más recientemente el monoplato que han demostrado tener un importante potencial terapéutico tanto solos como combinados con otros quimioterápicos.
- Antibióticos antitumorales: Fármacos derivados antibióticos que producen daño al DNA de las células. El grupo más amplio es el de las antraciclinas, citoestáticos obtenidos a partir de cultivos del género *Streptomyces* como la doxorubicina o la daunorubicina y sus respectivos derivados. Éstas moléculas poseen un amplio espectro de acción. Por un lado, se comportan como agentes intercalantes que se incorporan en la molécula de DNA por lo que interfieren tanto en la replicación y transcripción como en su reparación. Además, generan radicales libres que pueden ocasionar rupturas en la molécula de DNA y alquilaciones, alteran el plegamiento helicoidal del DNA y pueden causar daño a las membranas celulares, entre otros efectos que contribuyen a su efecto antitumoral. Su principal desventaja es la acusada cardiotoxicidad que acarrear (Vejpongsa & Yeh 2014).

1.1.1.3 Radioterapia

La radioterapia consiste en el uso de radiación ionizante de alta energía para el tratamiento oncológico. Su base terapéutica es el efecto diferencial de reparación de las lesiones radioinducidas de las células normales en comparación con las células tumorales que se dividen más rápido y poseen alterada la maquinaria de división y ciclo celular (Good & Harrington 2013). El efecto de la radiación sobre ellas es más deletéreo que sobre las células sanas ya que poseen intactos los mecanismos de parada en ciclo y reparación de las mutaciones causadas por la radiación empleada. Ésta técnica se lleva empleando desde finales del siglo XIX, y se ha beneficiado de los avances de la electrónica e informática. Dichos avances han permitido conformar el haz de irradiación en función de la localización tumoral y anatomía de los pacientes, permitiendo además el guiado del haz de irradiación en función de las variaciones tumorales y movimientos, tanto voluntarios como involuntarios, de los pacientes (Q. Wu et al. 2009; E. Huang et al. 2002). Para ello se utilizan los últimos medios de imagen que permiten obtener imágenes simuladas de la distribución del tumor y, con ello, determinar las mejores distribuciones dosimétricas, así como imágenes del posicionamiento del paciente en relación con el tumor albergado (Baumann et al. 2008; K. Huang et al. 2012; Bos et al. 2005). El incremento en la potencia de cálculo informático también permite modular la intensidad de dosis de manera que esta “envuelve” con mayor exactitud el tumor, minimizando su impacto sobre el tejido sano colindante (Wolff et al. 2009). Simultáneamente se han incrementado todas las medidas de seguridad minimizando el riesgo de accidentes.

En cuanto a su clasificación, la radioterapia puede clasificarse en función de la distancia de la fuente de irradiación al tejido diana. Según ésta clasificación existen dos tipos de tratamientos radioterápicos:

- Braquiterapia: Se trata de la radioterapia de corto alcance donde la fuente de radioactividad se localiza dentro o en contacto con el tumor. Es típica de tumores ginecológicos donde la fuente radioactiva puede ser encapsulada y aplicarse directamente en el tumor.
- Teleterapia: En éste caso la fuente de irradiación se encuentra a cierta distancia del paciente desde donde es proyectada hacia el tumor en sesiones sucesivas hasta conseguir la remisión del tumor. En la actualidad, los modernos aceleradores de electrones emiten tanto rayos X de alta energía para tumores internos como electrones para el tratamiento de tumores superficiales.

A pesar de los avances desarrollados en los protocolos terapéuticos tradicionales en las últimas décadas, las tasas de supervivencia y curación para enfermos de cáncer parecen haberse estancado con las terapias tradicionales (GLOBOCAN, 2012), lo que ha desembocado en el desarrollo de toda una panoplia de nuevos abordajes terapéuticos dirigidos a atacar específicamente las causas y los mecanismos de resistencia y evasión del tumor.

1.1.2 Nuevas Terapias

Las últimas décadas en investigación biomédica han sido especialmente fructíferas a la hora de dilucidar los mecanismos que subyacen al fenómeno de transformación y desarrollo tumoral. El tumor depende de su microambiente y se adapta a unas condiciones ambientales cambiantes, modificando su metabolismo, evadiendo la respuesta inmune y potenciando la angiogénesis y la migración para colonizar nuevos nichos en el organismo. La comprensión del cáncer como un fenómeno biológico complejo ha hecho necesario el desarrollo de nuevas terapias que tratan de atajar estas características del cáncer y desarrollar terapias más efectivas y seguras de cara al paciente (Fig. 1).

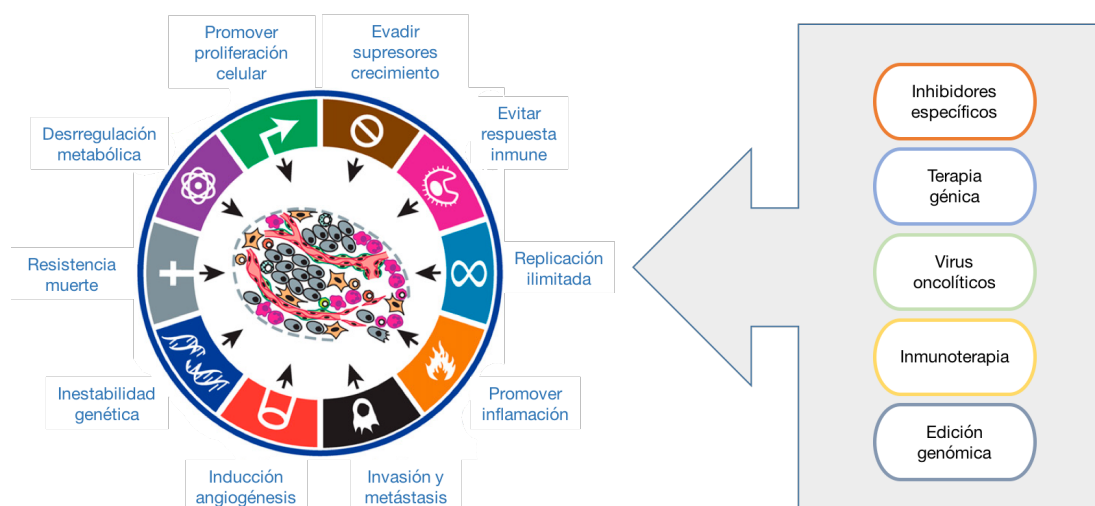


Figura 1. Nuevas terapias en cáncer dirigidas contra fenómenos específicos fundamentales para la biología de las células tumorales. Abordajes como la terapia génica, los virus oncolíticos o la inmunoterapia (izquierda), algunos ya usados actualmente, en la clínica permiten bloquear mecanismos tumorales concretos (derecha) personalizando la terapia con resultados muy prometedores. Adaptado de (Hanahan & Weinberg 2011).

1.1.2.1 Inhibidores específicos

El tratamiento con inhibidores específicos se basa en un tipo de quimioterapia adaptada a la patología concreta del paciente que busca inhibir farmacológicamente la actividad de alguna enzima clave en el desarrollo de ese tumor, por lo que requiere un conocimiento profundo de las alteraciones presentes en el tejido transformado y su actividad. En los últimos años se han desarrollado multitud de inhibidores contra diferentes dianas y que buscan bloquear procesos clave para el desarrollo tumoral.

Un claro ejemplo es el cáncer de mama sensible a hormonas donde éstas células pueden ser sensibles a estrógenos o progesterona (**Dunnwald et al. 2007**). Así pues pueden aplicarse inhibidores de estrógenos directos como el tamoxifeno o derivados (**Sawka et al. 1997**) o el fulvestrant (**A. Howell et al. 2005**) u otros abordajes como el bloqueo de la producción de estrógeno con inhibidores de la aromatasas como nastrozol y letrozol (**Mauri et al. 2006**).

Además de inhibidores hormonales, un abordaje más general implica inhibir la transducción de señales proliferativas al interior de las células o bloquear el proceso de angiogénesis privando a las células tumorales del aporte extra de oxígeno y nutrientes que requieren. Históricamente, el imatinib (también conocido como STI571 o Gleevec) fue el primer inhibidor específico desarrollado con éste fin. Se trata de un inhibidor tirosin-kinasa dirigido a bloquear dicha actividad de la proteína quimérica BCR/ABL (**Buchdunger et al. 1996; Druker et al. 1996**) típica de la leucemia mieloide crónica. Existen ciertos inhibidores como el malato de sunitinib o el tosilato de sorafenib que actúan combinando ambos campos de actuación. El primero es capaz a su vez de bloquear la actividad tirosin-kinasa del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR2) y del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo b (PDGFRb), inhibiendo la angiogénesis (**Mendel et al. 2003**) y a la vez al oncogén c-KIT (**Abrams et al. 2003**), así como otros receptores con actividad tirosin-kinasa bloqueando la proliferación celular. Por el contrario el sorafenib, diseñado originalmente como un inhibidor de RAF (**Wilhelm & Chien 2002**), puede bloquear la actividad kinasa de RAF con consecuencias antiproliferativas y también a los receptores VEGFR2 y PDGFRb haciendo lo propio con la angiogénesis (**Wilhelm et al. 2004, Ahmad & Eisen 2004**).

Otros inhibidores afectan solamente una de las vías; como el Temsirolimus que actúa inhibiendo a mTOR y bloqueando el paso de las células a fase S (**Georger et al. 2001**), el trametinib que inhibe sólo MKK1 y 2 impidiendo la progresión del ciclo celular (**Gilmartin et al. 2011**) o el Venetoclax, inhibidor de BCL-2 (**Souers et al. 2013**). En la actualidad existen multitud de inhibidores que están siendo testados sólo o en

combinación con otros fármacos, como el caso del iressa (genfitinib) en combinación con metformina (Ko et al. 2013).

La terapia con inhibidores específicos supone un gran paso adelante en la efectividad de la quimioterapia en los pacientes al estar dirigida contra mutaciones específicas de su propia patología. Sin embargo, fenómenos como la heterogeneidad tumoral o su aplicación a nivel sistémico hacen que su efectividad se vea limitada y sea necesario el desarrollo de terapias que ataquen específicamente a la célula tumoral.

1.1.2.2 Inmunoterapia

La inmunoterapia es el uso de las moléculas del sistema inmune, principalmente anticuerpos, con fines terapéuticos induciendo o sustituyendo la respuesta inmune antitumoral natural de los pacientes o ayudando a bloquear vías de señalización claves en el desarrollo del tumor. La inmunoterapia es por tanto más específica que las terapias convencionales, con una mayor selectividad en sus dianas y reduciendo los efectos secundarios sobre los pacientes. Dada la variedad de moléculas y células de sistema inmune que poseen un fuerte efecto antitumoral, se clasifica la inmunoterapia en función de los elemento del sistema inmune que utiliza:

- **Anticuerpos monoclonales:** Se trata de anticuerpos diseñados frente a antígenos específicos de las células tumorales con diferentes objetivos. Los anticuerpos monoclonales pueden promover multitud de efectos. Un ejemplo es la inducción de apoptosis sobre las células en las que actúan o la señalización de dichas células para su destrucción por el sistema inmune. Algunos ejemplos son el rituximab contra el antígeno CD20 utilizado como tratamiento del linfoma no Hodgkin (Nguyen et al. 1999) o el alemtuzumab dirigido contra el CD52 y usado en leucemia linfocítica crónica (Fabian et al. 1993). Además, pueden bloquear receptores de membrana claves en el mantenimiento de la célula tumoral como receptores de proliferación y hormonales como el cetuximab (Prewett et al. 1996). Otros ejemplos son el panitumumab (X. D. Yang et al. 2001) contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR y el trastuzumab contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico-2 HER-2 (Baselga et al. 1998). Otras funciones que pueden desempeñar son bloquear o competir con las señales y receptores angiogénicos impidiendo la llegada de más nutrientes al tumor como el bevacizumab que se dirige al factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (H. X. Chen et al. 2001). Pueden incluso servir como vehículo para transportar diferentes moléculas terapéuticas a las células tumorales donde son

absorbidas y ejercen un efecto tóxico específico como en el caso del Y⁹⁰-ibritumomab tiuxetán (Wiseman et al. 1999) o Y¹³¹-tositumomab (Vose et al. 2000) que reconoce al antígeno CD20 para depositar itrio-90 radiactivo en los de linfocitos B de linfoma no Hodgkin (Kaminski et al. 2000). Se trata, por tanto, de una vía terapéutica con una amplia aplicabilidad y un gran potencial de futuro que ha dado sus frutos en fármacos aprobados para la clínica y con multitud de ensayos clínicos en desarrollo en la actualidad.

- Transferencia celular: La transferencia celular de linfocitos T es una técnica mediante la cual los propios linfocitos del paciente se extraen del cuerpo para su selección genética o su modificación con el objetivo de obtener poblaciones altamente efectivas en combatir al tumor. Éstas poblaciones celulares se multiplican *in vitro* y se inoculan en el paciente. Éste método, además de seleccionar los mejores clones, permite recuperar la población de células inmunes frente a tratamientos típicamente inmunosupresores como los antitumorales tradicionales al conservar *ex vivo* dichas células inmunes y devolverlas al paciente una vez ha terminado el tratamiento. Existe un primer tratamiento aprobado por la F.D.A. denominado Sipuleucel-T (Rini et al. 2006) (Small 2006) basado en la transferencia celular y que permite prolongar la vida de los pacientes afectados por tumores metastáticos de próstata entorno a los cuatro meses. Se caracterizan y aíslan las células presentadoras de antígenos que poseen indicios del antígeno de la fosfatasa ácida prostática para incubarlos *in vitro* con una proteína de fusión PAP-GM-CSF. Ésta proteína une dicha fosfatasa con el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos lo que potencia la presentación de antígeno. Por último, son inoculadas de vuelta en el paciente para potenciar la respuesta de sus linfocitos T (Tanimoto et al. 2010). Dada su naturaleza, ésta terapia puede ser considerada a su vez como un tipo de terapia génica *ex vivo*.
- Vacunas: Existen dos tipos de vacunas que se usan en el tratamiento del cáncer. Un primer grupo, las vacuna profilácticas, son vacunas similares a las vacunas tradicionales que inmunizan frente a patógenos que se han demostrado suponen un factor de riesgo en el desarrollo del cáncer, como el caso del virus del papiloma humano. Dicha inmunización evita que el patógeno infecte las células de su huésped y por tanto el posible desarrollo tumoral posterior (Frazer et al. 2007). El segundo grupo se denomina vacunas terapéuticas del cáncer y son aquellas vacunas dirigidas a educar al sistema inmune del paciente para que identifique y elimine de forma más efectiva las células tumorales que ya se han desarrollado. Éstas vacunas puede contener bien antígenos específicos asociados al tumor que sufre el paciente o

antígenos tumorales generales (Sioud 2007) y ayudan a su reconocimiento por el sistema inmune, evitando así los mecanismos específicos de evasión de las células tumorales (Rivoltini et al. 2005). Los antígenos utilizados pueden exponerse a la células inmunes de muy diferente forma, desde el uso de lisados celulares a la modificación de linfocitos para la transferencia celular. Además, pueden implementarse vacunas mediante la transducción del DNA o RNA (McNamara et al. 2015) a través de diferentes vectores para promover la expresión de antígenos tumorales durante el proceso de diferenciación linfocítica. Así se consigue que sean reactivos ante el tumor (Chiarella et al. 2007), lo que podría ser considerado un tipo específico de terapia génica preventiva.

- Citoquinas: Las citoquinas son moléculas de bajo peso molecular moduladoras del sistema inmune que pueden mediar una multitud de efectos antitumorales del sistema inmune. Por ejemplo, el interferón- α posee diferentes funciones terapéuticas, desde la activación de linfocitos y células dendríticas hasta la inhibición de crecimiento y la muerte tumoral (Jonasch & Haluska 2001; Sutlu & Alici 2009). Sirven además como adyuvantes en vacunas terapéuticas al ayudar en la activación y diferenciación de las células del sistema inmune, como la IL2 comercializada como Aldesleucina (Yufeng Li et al. 2009) o el GM-CSF comercializado como Sargramostim. La principal desventaja que presenta el uso de citoquinas es su alta toxicidad debido a las elevadas dosis no fisiológicas empleadas durante los ensayos clínicos, ya que de forma natural las citoquinas se encuentran presentes en los tejidos en concentraciones mucho menores a las terapéuticas (Rosenberg et al. 1989).

1.1.2.3 Virus oncolíticos

Se ha observado la existencia de diferentes virus que, al infectar, poseen un efecto especialmente deletéreo en las células tumorales debido a su oncotropismo. Éste efecto se debe a que diferentes mutaciones clave en la transformación tumoral afectan también al sistema inmune, como la hiper-activación del oncogén Ras que inhibe la autofosforilación de la proteína quinasa R lo que hace las células insensibles a respuestas mediadas por interferón facilitando la infección viral (Everts & van der Poel 2004). Los intentos de tratar tumores con partículas víricas se remontan a los orígenes de la oncología, cuando ya se observaban regresiones tumorales en pacientes aquejados de infecciones virales. A partir de estas observaciones, se inoculaban a los pacientes de cáncer diferentes tipos de virus para intentar reducir el tamaño tumoral. Para una revisión más detallada, ver (Sinkovics & Horvath 1993).

Algunos de estos virus naturalmente oncotrópicos son los reovirus, dependientes de la activación de Ras, o los parvovirus que dependen de un ciclo celular muy activo en la célula hospedadora. Sin embargo, el uso de virus oncolíticos no se restringe a aquellos que presentan oncotropismo natural, ya que ésta afinidad puede obtenerse artificialmente en otros tipos de virus mediante modificación genética. Éste es el caso del virus del herpes simple 1 en el que se muta a los genes de la ribonucleótido reductasa y la $\gamma_134.5$, que son los que le confieren neurovirulencia, lo que hace que lise sólo células en división. Otro ejemplo es el de los adenovirus, donde se utilizan promotores específicamente activos en tumores y se eliminan funciones que son dispensables para la infección de la célula tumoral (T.-C. Liu & Kirn 2008).

En el caso de adenovirus, y dado que los primeros genes virales que se expresan cuando el genoma viral llega al núcleo de la célula infectada son los de la región temprana *E1*, es especialmente importante el conocimiento y control de las proteínas que se transcriben de la misma, como el primer transcrito de la región temprana *E1a*. En éste sentido, profundizar en las funciones biológicas de E1A y otras proteínas adenovirales en diferentes contextos sanos y tumorales es fundamental para decidir su inclusión o no en los virus oncolíticos. Además, para otorgar afinidad por las células transformadas, el promotor de E1A, primera región transcrita, debe ser modificado con un promotor exógeno que se exprese específicamente en tumores, como el caso del promotor del gen del antígeno específico de próstata PSA citado anteriormente, y flanqueado por secuencias de DNA aislantes que mantengan su fidelidad al ser integrados en el genoma adenoviral (Alemany et al. 1999).

La terapia con virus oncolíticos presenta dos problemas principales. En primer lugar, la bioseguridad que debe llevar aparejada el uso de partículas infectivas en los pacientes requiere el desarrollo de partículas virales con una afinidad por las células tumorales y un efecto terapéutico lo más acusado posible. Deben contener la mínima cantidad de material genético viral para reducir efectos indeseados sin que se reduzca su capacidad oncolítica. Para ello se delecionan o modifican los genes virales o se incluyen genes exógenos que incrementen su eficiencia. El segundo gran inconveniente que presenta éste tipo de terapia es su bloqueo por parte del sistema inmune, que está preparado de forma natural para atajar las infecciones en el organismo. Para evitar éste rechazo por parte del sistema inmune se ensayan diferentes estrategias, como el uso de inmunosupresores que pueden ser a su vez quimioterápicos como la fosfamida, la inclusión de los viriones en envolturas que los protejan de su reconocimiento por el sistema inmune o incluso aprovechar ésta activación del sistema inmune para provocar un ataque inmunológico sobre las células tumorales (Prestwich et al. 2009). Históricamente, el primer ejemplo de adenovirus

oncolítico fue el denominado Onyx-015 (Heise et al. 1997), que se tratará más en profundidad en el apartado de E1A como agente terapéutico.

1.1.2.4 Terapia génica

La terapia génica consiste en introducir material genético en las células de paciente para conseguir un efecto terapéutico. El material puede ser DNA o RNA e introducirse de diferentes formas en el interior de la célula a tratar en función del tipo de vector utilizado. Dichos vectores pueden ser o no de naturaleza viral, aunque los más prometedores son aquellos de origen viral porque es posible dotarlos de una alta especificidad y eficiencia a la hora de incorporar el material genético terapéutico (Meissner et al. 2016).

Los vectores no virales más usado son los liposomas, fosfolípidos bipolares sintéticos que forman bicapas cuya composición molecular les confiere propiedades físico-químicas similares a las de las membranas celulares. Estas moléculas pueden englobar al DNA de interés al incubarse con éste. Al aplicar los complejos al paciente son internalizados por endocitosis y el DNA puede expresarse en las células diana consiguiendo una alta eficiencia (Felgner et al. 1987). Sin embargo, no es posible controlar la cantidad de DNA que llega a cada célula y es muy difícil modular su especificidad (Tseng et al. 1999), por lo que son apropiados en estrategias que, *a priori*, no requieren una alta especificidad o dirigidas a la modificación de células no transformadas como en inmunoterapia y tratamientos antiangiogénicos. Los liposomas pueden usarse también para el transporte de fármacos, no sólo material genético, al interior celular (W. Z. Zhou et al. 1999; Lentacker et al. 2009). Un claro ejemplo es el tratamiento del melanoma y otras lesiones de piel donde el acceso tópico a la lesión permite un tratamiento liposomal mucho más controlado e incluso preventivo (Torchilin 2005).

El uso de vectores virales es el sistema preferente para la inserción de DNA exógeno cuando se requiere una alta eficiencia y especificidad. Sirviéndose de la capacidad natural de algunos virus de infectar células transformadas se han desarrollado multitud de sistemas con alta eficiencia y una elevada especificidad. El diseño de estos vectores virales se lleva a cabo mediante la sustitución de los genes virales necesarios para la replicación por el gen terapéutico, manteniendo su capacidad infectiva y eliminando su capacidad replicativa, por lo que han de ser producidos en líneas celulares empaquetadoras que complementan las proteínas necesarias para su replicación, incrementando la seguridad del sistema.

Los tipos virales más empleados en la clínica son los siguientes:

- **Retrovirus:** Los retrovirus son virus RNA de cadena sencilla y polaridad positiva que tienen la capacidad de integrar su material genético dentro del genoma de la célula infectada. El genoma del retrovirus se divide en dos regiones, las secuencias control situadas en los dos extremos del genoma retroviral y necesarias para las etapas tempranas del ciclo viral, tales como, la iniciación de la transcripción inversa del RNA viral, la integración del cDNA resultante, la replicación viral y la encapsidación del RNA viral; y los genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*) situados en la zona central del genoma retroviral y encargados de codificar distintos componentes de la progenie viral (**Curtin 1984**).

Esta disposición modular facilita la obtención de vectores en los que se sustituye los genes estructurales por el gen terapéutico. Debido a la ausencia de los genes estructurales, el ciclo infectivo no puede llevarse a cabo. Dicha restricción impide la formación de nuevas partículas infectivas, evitando así la diseminación de retrovirus recombinantes. Estos vectores se utilizan en sistemas donde se necesita una expresión prolongada del gen de interés, como en el caso de patologías metabólicas o hematológicas, más que en terapia de cáncer donde se persigue eliminar las células tumorales por lo que no se requiere la expresión permanente del transgén. La producción de los vectores retrovirales se basa en la construcción de un vector retroviral genómico (VRG) que consiste en la clonación del DNA del vector retroviral en un plásmido bacteriano. La producción de retrovirus se realiza mediante la transfección del VRG en líneas celulares que complementan en trans las proteínas virales estructurales como, por ejemplo, la línea celular empaquetadora PA317 que expresa de forma constitutiva las proteínas *gag*, *pol* y *env* o la línea 293T Phoenix (Human Embryonic Kidney 293) donde se expresan de forma transitoria (**Hamid et al. 2003**).

A pesar de ser los primeros vectores virales utilizados en el tratamiento de la inmunodeficiencia combinada grave (SCID) (**Culver et al. 1992**), entre sus inconvenientes cabe destacar la activación de proto-oncogenes o la represión de genes supresores de tumores, entre otros efectos indeseados debidos a la mutagénesis insercional; su inestabilidad en el torrente circulatorio y la baja tasa de recuperación de viriones a partir del sobrenadante de las líneas empaquetadoras, para lo que se está desarrollando toda una serie de vectores retrovirales de nueva generación que sean capaces de superar éstas limitaciones (**Yi et al. 2011; Doi & Takeuchi 2015**).

- **Lentivirus**

Los lentivirus son un tipo de retrovirus más complejo que posee unos genes responsables del control de la transcripción y del transporte del RNA viral del núcleo al citoplasma. Gracias a estos genes los lentivirus pueden transportar de forma activa el DNA viral al núcleo de la célula infectada a través de los poros nucleares, permitiendo la transducción de células quiescentes (**Breckpot et al. 2007**). Los vectores lentivirales, al igual que los retrovirales, se generan sustituyendo los genes *gag*, *pol* y/o *env* por el gen terapéutico. En éste caso, las partículas virales se producen de forma transitoria mediante la cotransfección de un plásmido con la secuencia del vector lentiviral, otro con los genes estructurales *gag* y *pol* y un tercero con el gen *env* en la línea celular HEK293T. Una ventaja importante de los lentivirus es que pueden infectar células tanto en división como en reposo, permitiendo una mayor versatilidad en su uso como vectores. Su efectividad se está comprobando en diferentes modelos como el de cáncer de cabeza y cuello (**Kung 2013**).

- **Adenovirus**

Los adenovirus son virus DNA de cadena doble sin envuelta. Los vectores adenovirales se utilizan como virus defectivos, esto es, son deficientes en replicación y requieren de un sistema de complementación. En concreto, se trata de la línea celular HEK293, aprovechando su capacidad intrínseca de producir constitutivamente los elementos *E1* virales, permitiendo así suprimirlos en el vector adenoviral para evitar su replicación incontrolada (**Green & Seymour 2002**).

Entre las ventajas de éste vector viral destacan el tamaño de inserto de hasta 20 kb de DNA, a diferencia de retrovirus y lentivirus cuyo límite está en las 5 kb; además, poseen una alta efectividad en la transducción celular por la alta producción de viriones y son capaces de infectar células tanto en reposo como en división. Sin embargo, presentan el inconveniente de expresar varias proteínas virales que resultan inmunogénicas, lo que conduce a una liberación más rápida de los viriones de las células transducidas. Además, la transducción repetida no es satisfactoria normalmente, a menos que la exposición inicial esté acompañada de una modulación inmunológica para suprimir la respuesta inicial a las proteínas de la cápsula adenoviral. Debido a la falta de integración del vector, la expresión de los niveles disminuye en el curso de pocos días hasta varias semanas, haciendo necesaria la administración reiterada de vectores adenovirales. Esta administración reiterada genera respuestas inmunes que conllevan la inactivación del vector, por lo que se está investigando para modular dicha respuesta y obtener vectores menos inmunogénicos (**Choi & Yun 2013**).

- Virus adenoasociados

Los virus adenoasociados (VAA) son virus de DNA de cadena sencilla que necesitan la coinfección con adenovirus o virus del herpes simple para iniciar su ciclo de replicación viral. Además, la replicación del genoma del VAA y la formación de partículas virales requiere de la presencia de los genes *rep*, que codifica una replicasa y *cap*, cuyo producto es la proteína de la cápside. Estos virus infectan todo tipo de células y, generalmente, integran su material genético en el brazo largo del cromosoma 19 (Dyson, 1998). Esta integración específica permite la expresión estable del transgén y evita el riesgo de mutación insercional de los vectores virales enunciados anteriormente. Los vectores basados en los VAA se originan sustituyendo los genes *rep* y *cap*, implicados en la replicación del virus, por el gen terapéutico (Chengwen Li et al. 2005).

La producción de los vectores VAA se realiza en una línea celular empaquetadora que expresa de forma estable los genes *rep* y *cap*. Para ello, se transfecta un plásmido que contiene el DNA del vector VAA y otro plásmido que aporta los genes adenovirales indispensables para la replicación del VAA. La mayor desventaja de estos vectores es su ineficacia para transportar genes terapéuticos de un tamaño superior a las 4.7 kb (Luo et al. 2015).

1.1.2.5 Edición genómica

La edición genómica es el tipo de terapia de más reciente desarrollo, por lo que sólo puede ser evaluada teóricamente. Se trata de un método con una gran eficacia y un enorme rango de acción ya que permite, valiéndose del sistema genético de arqueobacterias CRISPR/Cas 9, una edición fina del genoma (Lander 2016). Dicha edición permite añadir, delecionar o modificar de forma totalmente específica cualquier secuencia de bases conocida del genoma de una especie *in vitro* e *in vivo* (Kleinstiver et al. 2016). Este efecto permitiría fácilmente reponer la forma fisiológica de genes supresores de tumores que hubieran mutado en las células tumorales, cortar de su genoma oncogenes o provocar la muerte celular a través de diferentes abordajes como la eliminación de genes imprescindibles para la vida. En la actualidad éste método se ha probado con éxito para revertir *in vivo* ciertas enfermedades metabólicas en modelos murinos (Yin et al. 2014). Sea como fuere, ésta herramienta puede permitir incorporar genes o partes de ellos al genoma de una especie de forma específica y dirigida, lo que hace aún más interesante el estudio de las propiedades biológicas de posibles genes terapéuticos.

1.2 E1A

Este trabajo se ha centrado principalmente en dilucidar el papel terapéutico del gen adenoviral *E1a*. E1A es el nombre que recibe una de las proteínas codificadas por *E1*, una de las cuatro unidades de transcripción temprana que posee el genoma de los adenovirus.

1.2.1 Adenovirus

La familia *Adenoviridae* son virus DNA de cadena doble y pertenecen, por tanto, al tipo I de la clasificación de Baltimore. El genoma de los adenovirus es lineal y está unido covalentemente en su extremo 5' a una proteína terminal. La familia consta de más de cien serotipos diferentes y clínicamente son los desencadenantes de diversas patologías respiratorias y gastrointestinales caracterizadas por cursar con inflamación y lisis de las células epiteliales infectadas (Volpers & Kochanek 2004). Se conoce, además, desde los años sesenta la capacidad de los adenovirus de transformación celular tanto en modelos murinos como en células humanas (MCALLISTER 1965), siendo uno de los modelos más estudiados para analizar los fenómenos de carcinogénesis vírica.

Tomando como referencia el serotipo 5, su genoma se compone de 35.938 pares de bases (NCBI Refseq. AC_000008) y se encuentra flanqueado por repeticiones terminales invertidas (I.T.R.) de entre 50 a 200 pares de bases que sirven a su vez como orígenes de replicación. Los viriones tienen un diámetro de entre 80 y 110 nm. Su cápside es icosaédrica y está compuesta por 252 capsómeros formados por 240 hexámeros y 12 pentámeros, con simetría 2-3-5. En ésta estructura, cada pentámero contiene una base que forma parte de la superficie de la cápside y una fibra proyectada hacia el exterior (Stewart et al., 1993) (Russell, 2009).

El proceso de infección se inicia mediante la interacción de su fibra proyectada de la cápside con los receptores celulares del tipo CAR (coxsackievirus/adenovirus) (Bergelson et al. 1997) y la entrada de los viriones por endocitosis está mediada por integrinas de membrana (Wickham et al. 1993). Una vez en el interior celular, el material genético viral (Fig. 2) se dirige al núcleo para continuar con el proceso. La primera etapa consiste en la transcripción de cuatro subunidades de transcripción temprana; comenzando por *E1*, que dará lugar a las proteínas E1A y E1B encargadas de modificar el patrón transcripcional de la célula, modificando su ciclo celular e induciendo la entrada en fase S mitótica siendo, además, las encargadas de promover la transcripción del resto de genes del virus. A continuación se transcribe la subunidad

E2 que da lugar a las proteínas *E2A* y *E2B* encargadas de la replicación del material genético del virus y de promover la siguiente tanda de expresión de genes virales en sinergia con los productos de *E1* (Hay et al. 1995). Las siguientes en expresarse son las proteínas derivadas de la región *E3*, encargadas de modular la respuesta inmune de las células (Lichtenstein et al. 2004) y *E4*, región responsable de modificar el balance replicativo de la célula, favoreciendo la replicación del material genético viral en perjuicio del celular. La replicación del DNA viral se lleva a cabo mediante la RNA polimerasa II de la célula huésped (Weigel & Dobbelstein 2000; Goodrum & Ornelles 1999; Halbert et al. 1985).

La siguiente fase del ciclo infectivo supone la expresión de otras dos unidades de transcripción tardía, IX y IVa2. La proteína IVa2 actúa como activador del promotor de genes tardíos (MLP) (Lutz & Kedinger 1996) mientras que la región IX es la responsable de codificar uno de los componentes de la cápside desempeñando una función vital en el proceso de encapsulación de los viriones (Lutz et al. 1997). Por último la unidad más tardía es procesada para generar 5 mRNAs: L1, L2, L3, L4 y L5. Sus correspondientes péptidos transcritos son componentes estructurales de la cápside e intervienen en el proceso de encapsulación del virus y su maduración. En función del serotipo correspondiente las partículas víricas pueden contener, además, en su material genético la información para uno o dos RNAs asociados a virus que son transcritos por la RNA polimerasa III; las proteínas VA. Dichas proteínas colaboran en la atenuación de la respuesta inmune de la célula hospedadora (Wold et al. 1994).

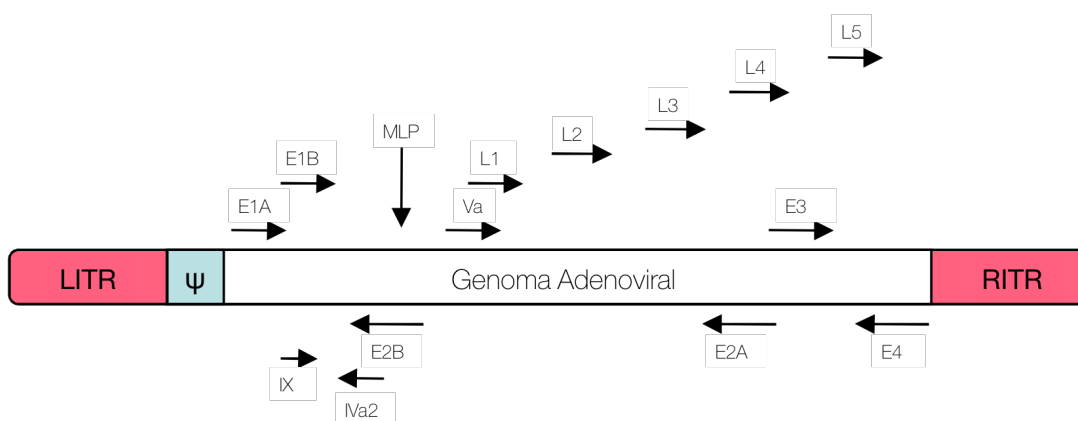


Figura 2. Representación esquemática del genoma de los adenovirus. En la figura se pueden observar los mRNA tempranos (*E1-E4*), los intermedios (*IX-IVa2*) y los tardíos (*L1-L5*) y también el promotor de genes tardíos (*MLP*). Además, aparecen marcadas en rojo las repeticiones invertidas en tándem (*LITR-RITR*) y en azul la señal de empaquetamiento viral Ψ . Adaptado de Callejas-Valera 2011.

1.2.2 E1A y su función

Profundizando en sus características bioquímicas, el gen adenoviral *E1A* puede verse sometido a un procesamiento alternativo dando lugar a distintas isoformas clasificadas según su diferente coeficiente de sedimentación medido en Svedbergs (13s, 12s, 11s, 10s y 9s). Dichos transcritos se traducen en proteínas homónimas de 289, 243, 217, 171 y 55 aminoácidos respectivamente, como se detalla en la Figura 3. Funcionalmente, las isoformas 13s y 12s son las más abundantes en las primeras etapas de la infección mientras que la 9s se encuentra enriquecida en los últimos estadios del proceso infeccioso. Mediante análisis comparativo entre serotipos humanos y de simio se han identificado las cuatro regiones principales de alta homología. Dichas regiones se denominan, basándose en la nomenclatura inglesa CR o *Conserved Region*, como CR1 entre los residuos 40-80, CR2 entre el 121-139, CR3 correspondiente a los aminoácidos entre las posiciones 140-188 y, la región CR4 con los residuos 240-288 (Stephens & Harlow 1987); y se corresponden a los principales sitios activos y de unión a las proteínas con las que interacciona (Pelka et al. 2008).

En general, las diferentes isoformas de E1A poseen una vida corta de entre 20 a 80 minutos debido a su naturaleza ácida. En cuanto a su secuencia destaca su alta carga en prolinas, la existencia de varias secuencias NLS de transporte al núcleo, con una primera secuencia unitaria altamente conservada $^{285}\text{KRPRP}^{289}$ ubicada en el extremo carboxilo terminal y que permite su internalización al núcleo por Qip1 (Lyons et al. 1987; Köhler et al. 2001). Se ha demostrado recientemente que ésta secuencia es parte, en realidad, de una secuencia más grande que la engloba, $^{258}\text{RVGGRRQAVECIEDLLNEPGQPLDLSCKRPRP}^{289}$ (M. J. Cohen et al. 2014). Existe además una segunda secuencia $\text{FV(X)7-26MXSLYXYM(X)}_4\text{MF}$ no canónica en el dominio CR3 específica sólo del serotipo 5 (Standiford & Richter 1992). Aún con esto, E1A puede encontrarse en el citoplasma donde también ejerce distintas funciones (Rowe et al. 1983).

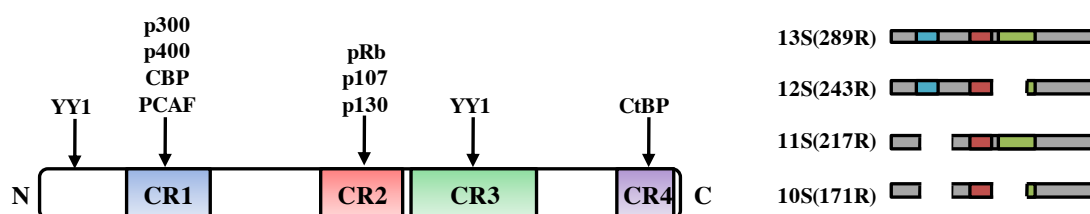


Figura 3. Esquema de los dominios conservados de E1A, las isoformas que los portan y las proteínas con que interaccionan. En el esquema de la izquierda aparecen los cuatro dominios funcionales CR de E1A en diferentes colores y algunas de las proteínas más importantes con las que interaccionan. A la derecha aparecen representadas en las cuatro isoformas principales de E1A. Adaptado de Callejas-Valera 2011.

En cuanto a su fosforilación, se lleva a cabo en una serie de serinas a lo largo de su secuencia: Ser-89, Ser-96, Ser-132, Ser-185, Ser-188 y Ser-219 (Tremblay et al. 1988; Smith et al. 1989; Dumont et al. 1993; Whalen et al. 1996). Dado que las mutaciones en estos residuos clave alteran las propiedades biológicas de E1A, se postula que dicha fosforilación puede ser una de las claves que le otorgan su función biológica. De hecho, se ha observado que la fosforilación de la Ser-185, controlada por la MAPK ERK1/2 y que puede ser inducida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), es clave en la capacidad transformante de E1A en colaboración con otros genes y en su capacidad de interactuar con algunas de sus dianas más importantes (Kukushkin et al. 2002) (Shifera & Hardin 2009). Otra posición clave en su secuencia es la Lys-285, residuo susceptible de acetilación y responsable de la unión a CtBP (Madison et al. 2002).

Dado que carece de actividad enzimática, la proteína E1A lleva a cabo sus funciones biológicas gracias a su interacción con proteínas celulares que median la expresión de genes implicados en el control de la homeostasis y el crecimiento celular (co-activadores, co-represores y proteínas reguladoras del ciclo celular) e incluso afectando al marcaje epigenético de la cromatina. Concretamente, E1A puede interactuar con más de 50 proteínas diana conocidas a través de las cuales es capaz de afectar a más de 17,000 promotores genómicos (Ferrari et al. 2008), entre los que destacan proteínas de unión a motivos TATA (TBP), factores asociados a las TBP (TAFs) y numerosos factores de transcripción como ATF-2 y c-jun; todos ellos elementos clave en la regulación de la transcripción génica. Además, se une a receptores nucleares de hormonas como la tiroidea y el ácido retinoico.

El hecho de que E1A sea capaz de unirse a tan diversas proteínas (Fig. 4) ha dado lugar a la observación de diferentes comportamientos biológicos debidos a su expresión. De hecho, puesto que no se ha encontrado ninguna capacidad enzimática intrínseca ni interacción con los ácidos nucleicos, se postula que el papel de E1A se ejerce exclusivamente a través de las proteínas con las que interactúa y que a ellas debe su función. De entre ellas, las principales proteínas descritas a las que se une E1A son p300/CBP, PCAF, CtBP, p400/TRRAP, pRb y su familia de proteínas y YY1.

A la hora de describir el efecto general de E1A en relación con el cáncer en las células en las que se expresa, se han encontrado papeles contradictorios. Si bien se describió al comienzo como un oncogén, capaz de producir transformación tumoral, pronto se observaron efectos contrarios que han llevado a postularlo como un efectivo supresor tumoral (Frisch & Mymryk 2002). Dado que el presente trabajo tratará de esclarecer este papel dual, conviene conocer cuáles son las rutas y hallazgos más importantes que justifican papeles tan dispares.

1.2.3 E1A como oncogén

Como ya se ha descrito, los adenovirus son un conocido factor de transformación celular. Dicha capacidad transformante de los adenovirus requiere, al menos, un 4,5% del total del genoma (Houweling et al. 1980) y se debe a la región temprana *E1* que contiene a los genes *E1A* y *E1b* (van den Elsen et al. 1983). Se ha demostrado transformación por *E1A* en cooperación con otros oncogenes como por ejemplo *c-H-Ras*. *Ras* puede llevar a cabo la transformación de ciertas líneas celulares en cultivo por sí sólo (Pulciani et al. 1985) si bien por lo general requiere de la colaboración de otros genes como *Myc* en el caso de células derivadas de cultivos primarios (Land et al. 1983). Ésta insuficiencia en el proceso de transformación es debida al fenómeno de defensa conocido como senescencia inducida por oncogenes (OIS), respuesta celular a la transformación por parte de oncogenes consistente en la parada irreversible del ciclo celular. Dicha respuesta está mediada por un aumento en los niveles de p16INK y p53 (Serrano et al. 1997).

Uno de los mecanismos a través del cual *E1A* es capaz de superar la OIS es mediante un mecanismo de acción bivalente sobre ERK1/2. Se ha descrito que *E1A* es capaz de incrementar transcripcionalmente los niveles de las fosfatasa nucleares MKP1 y MKP5, ambas pertenecientes a la familia de fosfatasa nucleares duales que defosforilan serina y treonina y que actúan como inhibidores de la función de las MAPKs al defosforilar sus formas activas. En éste caso dicho efecto en la defosforilación nuclear es especialmente importante ya que *E1A* disminuye los niveles de PEA15, exportador nuclear de ERK1/2, confinándolo en el núcleo donde estas fosfatasa lo inactivan (Callejas-Valera, 2008). Además, *E1A* es capaz de evitar dicho mecanismo de OIS a través de la unión a pRb y p300/CBP (Q. Deng et al. 2005).

pRb, conocida como la proteína del retinoblastoma, es un poderoso supresor tumoral cuya mutación es responsable de dicha patología. Se trata de una proteína reguladora capaz de unirse a la familia de factores de transcripción E2F celulares que regulan la entrada en fase S y bloquearlos (Trimarchi & Lees 2002). pRb es fosforilado por kinasas dependientes de ciclina (CDK) CDK4/6 y CDK2 en respuesta a un estímulo (Zarkowska & Mittnacht 1997) liberando a E2F, quien puede entonces colaborar en la transcripción de numerosos genes. La proteína *E1A* interacciona con pRb (Egan et al. 1989) (Whyte et al. 1988) así como con p107 y p130, miembros de su misma familia de proteínas y con funciones similares (Y Li et al. 1993). Dicha unión se lleva a cabo mediante el motivo LXCXE que posee una alta especificidad por el dominio CR2, siendo más débil con el CR1, y cuya unión propicia la liberación de E2F y la activación de la transcripción de sus dianas naturales (Fattaey et al. 1993; Ikeda & Nevins 1993).

CBP y p300, por su parte, son proteínas acetiltransferasas que acetilan a distintas histonas y factores de transcripción promoviendo la transcripción de sus promotores diana. Ambas proteínas poseen un motivo adaptador transcripcional o TRAM con el que E1A es capaz de interactuar a través de su dominio CR1 (O'Connor et al. 1999) lo que inhibe su actividad acetiltransferasa (Chakravarti et al. 1999; Hamamori et al. 1999). Dicha interacción es capaz de bloquear de forma efectiva la función biológica de estas proteínas, contribuyendo a la capacidad transformante de E1A, o redireccionar la acetilación hacia otras proteínas del ciclo como pRb cuyas consecuencias se analizarán más adelante. Se ha encontrado, además, que E1A es capaz de colaborar con p300 (Duyndam et al. 1999) en la activación de la transcripción de c-jun (Vries et al. 2001) lo que le permitiría controlar a su vez la familia de factores de transcripción AP-1 (Lee et al. 1996; Smits et al. 1996).

En relación con p300/CBP existe otra acetiltransferasa denominada PCAF que interactúa directamente con ella y que compite con E1A por su sitio de unión (X. J. Yang et al. 1996). Pronto se descubrió también que E1A era capaz de inhibir la transcripción dependiente de PCAF (Puri et al. 1997) al unirse a su sitio acetiltransferasa de forma similar a lo que hace con p300/CBP e inhibiendo su actividad (Chakravarti et al. 1999). El papel biológico de PCAF es considerado generalmente como supresor tumoral, pues se ha descrito que, además de actuar sobre las histonas regulando la condensación cromática, acetila específicamente p53 incrementando su afinidad por el promotor de p21 (Sakaguchi et al. 1998; L. Liu et al. 1999) y en modelos murinos es capaz de promover la acetilación de MyOD lo que conlleva la inducción de nuevo de p21 y desencadena la parada en ciclo (Puri et al. 1997; Sartorelli et al. 1999). Por tanto, la inhibición de PCAF por parte de E1A acentuaría su posible papel como oncogén.

E1A puede, además, cooperar con el oncogén *c-MYC*, al cual estabiliza (Tworkowski et al. 2008) y *SIS* para inducir transformación como se demostró en 1991 en fibroblastos de rata (Ragozzino et al. 1991). *c-MYC* es un factor de transcripción capaz a su vez de promover tumorigénesis por sí mismo en su forma activa (Adhikary & Eilers 2005). *SIS*, por su parte, es la cadena β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que produce su efecto mediante la unión incontrollada a su receptor. La capacidad transformante de E1A se lleva a cabo, en éste caso, mediante fenómenos como la estabilización, evitando la degradación por ubiquitinación de las proteínas con las que interactúa (Lohr et al. 2003). La capacidad de E1A para inducir este efecto depende de su unión a p300/YY1 (Kadeppagari et al. 2009) y p400 (Tworkowski et al. 2008).

La interacción con p400 es el ejemplo de que E1A puede interactuar a su vez con proteínas y complejos implicados en la estabilidad y conformación de la cromatina. Dicha proteína forma parte de grandes complejos de remodelación donde cada subunidad tiene una función específica. E1A es capaz de unirse a un motivo específico p400 cuando está unido a estos complejos a través de su dominio CR1; concretamente al motivo de p400 que se une a la helicasa TAP54, enzima a la que desplaza suprimiendo dicha función helicasa del complejo (Fuchs et al. 2001). Dado que ésta región del CR1 (los aminoácidos 26-35) es esencial para la transformación de fibroblastos embrionarios de rata, ésta propiedad de E1A le otorgaría parte de su posible papel oncogénico. Lo mismo aplica para la unión de E1A con otra de las proteínas implicadas en estos complejos de remodelación cromática, TRRAP, que actúa como andamiaje de éste tipo de complejos reclutando los elementos necesarios para la activación de la transcripción (McMahon et al. 2000) y donde la interacción con E1A bloquearía su capacidad de reclutar los factores de transcripción necesarios, modificando el patrón de transcripción de la cromatina.

Por último, la interacción de E1A con la proteína Ying-Yang 1 (YY1) podría a su vez justificar parte del posible papel oncogénico de E1A. YY1 es una proteína perteneciente a la familia Kruppel-GLI que actúa como represora o activadora de la transcripción del DNA a través de los dedos de zinc de tipo C2H2 presentes en su estructura. Descrita originalmente como represora de la región promotora P5 adenoasociada (Shi et al. 1991), posee una gran variedad de regiones activadoras e inhibitoras a lo largo de su secuencia (Thomas & Seto 1999), entre los que destacan un dominio activador en el extremo amino terminal de la proteína que estaría enmascarado en su estructura terciaria por dos pequeños dominios, entre los aminoácidos 397-414 y 370-397 y que sólo se expondría siendo activo bajo determinadas circunstancias (Bushmeyer et al. 1995). De ésta forma, YY1 se comporta como represor de la transcripción en condiciones basales modificando su función a activador cuando interactúa con E1A (Shi et al. 1991). Ésta interacción se lleva a cabo mediante dos dominios comprendidos entre los residuos 332-341 (Lee, Galvin, et al. 1995; Lee, See, et al. 1995) y uno más amplio entre los aminoácidos 54-260 de YY1 que interactúan con dos regiones de E1A, la primera entre los residuos 15-35 y una segunda, exclusiva de la isoforma 13s por encontrarse en el dominio CR3, entre los residuos 140-188, lo que confiere a la isoforma completa 13s una mayor afinidad por YY1 (Lewis et al. 1995). Se ha demostrado que la expresión de YY1 está incrementada en diversos tipos tumorales y su sobreexpresión disminuye considerablemente los niveles de p53 y FAS, lo que disminuye la respuesta apoptótica de las células y sugiere su posible papel como oncogén (Q. Zhang et al. 2011).

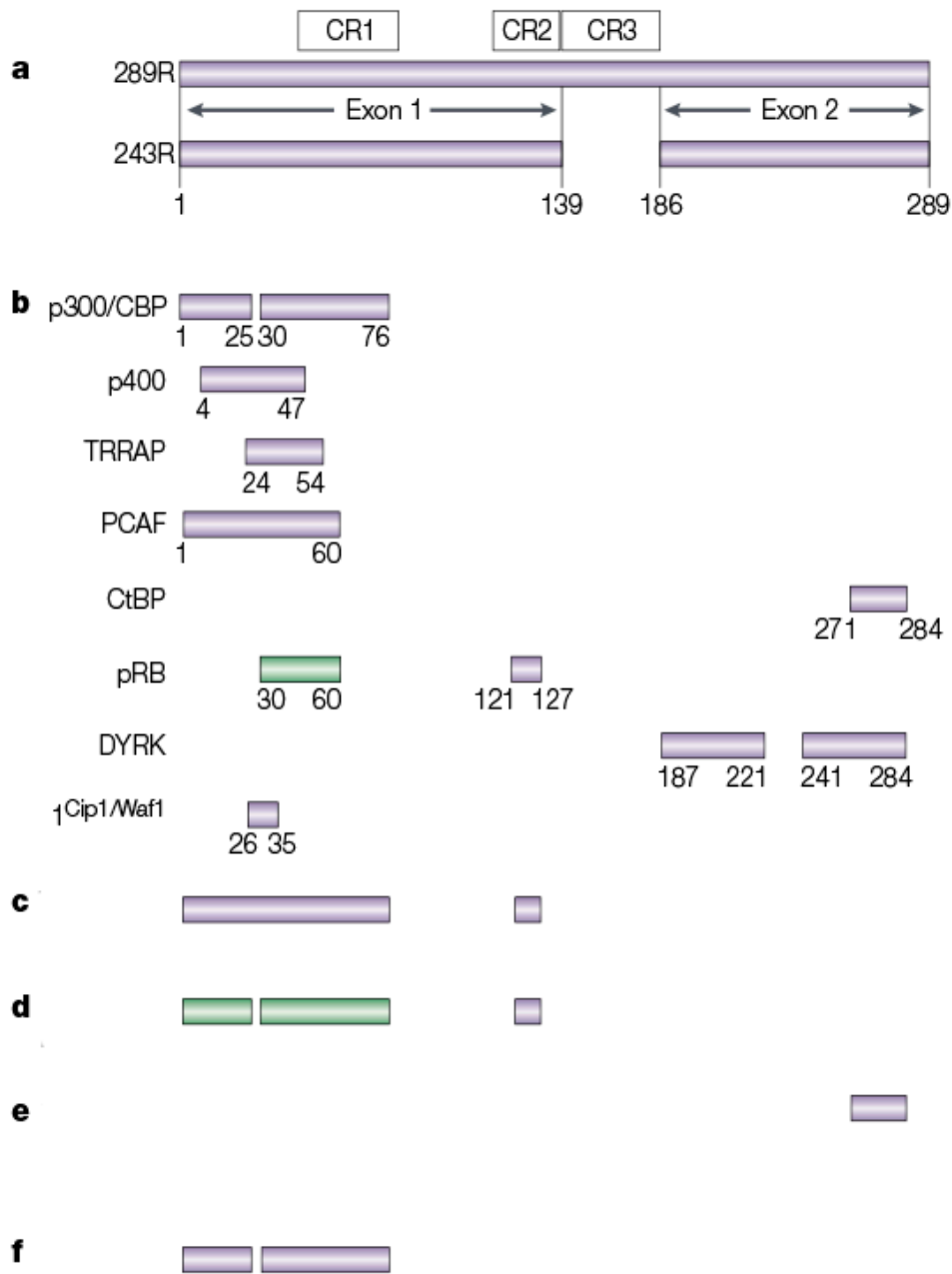


Figura 4. Mapa de regiones funcionales de E1A. A. Isoformas 13s (289R) y 12s (243R) de E1A. B. Sitios de unión a diversas proteínas celulares. Regiones representadas en verde secundarias en importancia. C. Región necesaria para la transformación en fibroblastos de rata en colaboración con Ras, la represión de genes de diferenciación y con acción supresora tumoral en células transformadas humanas. D. Región de inducción de síntesis de DNA. Regiones en verde accesorias. E. Región requerida para promover diferenciación epitelial, inducción de apoptosis y supresión tumoral. F. Región con efecto supresor tumoral in vivo. Adaptado de (Frisch & Mymryk 2002).

1.2.4 E1A como supresor de tumores

A pesar de los posibles efectos oncogénicos descritos, la naturaleza compleja del cáncer y las múltiples interacciones que E1A es capaz de ejercer con importantes proteínas implicadas en el control del ciclo celular le confiere, a su vez, propiedades de gen supresor tumoral (Frisch 1991; Chinnadurai 1992) (Fig. 4).

Desde un principio, se ha atribuido gran parte del efecto antitumoral de E1A a su capacidad de inducir apoptosis, tanto *in vivo* como *in vitro* (J. Deng et al. 1998). El hecho de que E1A se comporte como supresor de tumores en modelos celulares que tienen sobrepresado ERBB2 (Yu et al. 1993; Y. Zhang et al. 1995; J. Y. Chang et al. 1996; J. Y. Chang et al. 1997) se debe a la capacidad de E1A para reprimir la transcripción de dicho oncogén (H. Chen & Hung 1997) aunque también se ha observado en modelos que carecen de dicho oncogén y no presentan apoptosis por estabilización de p53 (Frisch & Dolter 1995). Estos mecanismos de inducción de apoptosis no son exclusivos, puesto que se ha descrito que E1A es capaz de promover señales pro-apoptóticas mediante la bajada en los niveles de EGFR en diferentes modelos de cáncer de hígado y carcinoma de célula escamosa de cabeza y cuello (HNSCC), de forma p53 independiente y a través de p400. Esto se puso en evidencia ya que formas mutantes de E1A defectivas para su unión p400 son incapaces de inducir mecanismos de muerte por apoptosis o de inhibir EGFR (Flinterman et al. 2003; Flinterman et al. 2007).

Como se ha descrito anteriormente, E1A media otras modificaciones de pRb como su acetilación vía su interacción con p300/CBP. Se ha descrito que la forma acetilada de pRb posee la capacidad de asociarse al complejo proteico MDM2-p53 (Chan et al. 2001), lo que bloquea la degradación de p53 conduciendo a una parada en ciclo celular y la muerte por apoptosis. Esto hace a las células que expresan E1A especialmente sensibles a estímulos proapoptóticos (Lowe & Ruley 1993). Éste efecto se ha descrito en fibroblastos embrionarios murinos (MEF) donde la estabilización de p53 está mediada por pRb y p300 a la vez (Samuelson & Lowe 1997), aunque posteriormente se ha observado una estabilización de p53 en mutantes defectivos de pRb, lo que indicaría la existencia de un mecanismo alternativo de estabilización diferente (Frisch & Mymryk 2002). Además, se ha encontrado una estabilización de p53 a través de MDM4 en la que dicha proteína interacciona con el dominio CR1 de E1A impidiendo su degradación (Zheng Li et al. 2004). La estabilización de p53 por E1A es, en todo caso, independiente de su fosforilación en la Ser-15, característica de su respuesta a daño al DNA (Kamijo et al. 1997), sino que está mediada por p19^{ARF} (de Stanchina et al. 1998).

E1A está implicado a su vez en la regulación de fenómenos tan complejos como la autofagia, que mantenida en el tiempo supone un efectivo mecanismo de muerte celular. La represión de pRb y el incremento de los niveles de E2F1 promoverían un incremento en la autofagia de las células, lo que se traduciría en el incremento de los niveles de Atg5 y LC3-II y un descenso de p62 típicos de una situación de autofagia (**Bagchi et al. 1990; Polager et al. 2008; Garcia-Garcia et al. 2012**). Además, éste incremento en los niveles de E2F1 supone una subida en diferentes microRNAs como miR-93 o miR106 que promueven la inhibición de p21 o miR-7 la de EGFR (**Tazawa et al. 2012**). Esto, combinado con el incremento en los niveles de DRAM debido a p53 haría que las células que expresen E1A poseyeran un marcado patrón autofágico que podría incluso desembocar en muerte por autofagia (**Tazawa, Kagawa & Fujiwara 2013a**).

Se ha demostrado también una disminución de la tumorigenicidad mediada a través de E1A en ciertas patologías como el cáncer de ovario, en modelos con bajos niveles de ERBB2 a través de un incremento en los niveles de PEA15, lo que se traduce en el secuestro de ERK1/2 en el citoplasma anulando su papel como factor de transcripción (**Bartholomeusz et al. 2005**) y mediando un efecto promotor de la muerte celular por autofagia a través de la interacción con la vía de señalización de ERK1/2 (**Bartholomeusz et al. 2008**). Curiosamente, se ha encontrado el fenómeno contrario, donde E1A es capaz de disminuir los niveles de PEA15 incrementados en un modelo de senescencia inducida por v-H-Ras lo que devuelve ERK1/2 a su localización nuclear y revertiendo así dicho fenómeno de senescencia (**Gaumont-Leclerc et al. 2004**). E1A es capaz, a su vez, de convertir diferentes líneas celulares como las HT1080 de fibrosarcoma o las A2058 de melanoma en células no tumorigénicas, obteniendo una morfología y un patrón de expresión típico de células epiteliales (**Frisch 1991**). Además, se ha propuesto que el descenso observado en la tumorigenicidad debida a E1A podría verse explicado por su capacidad para disminuir los fenómenos de angiogénesis y también de metástasis gracias a la inhibición de VEGF (**Z. Zhou et al. 2003**).

E1A puede actuar, a su vez, como supresor tumoral a través de otros fenómenos como la sensibilización a anoikis. Anoikis es un término derivado del griego que denomina la muerte celular por apoptosis desencadenada por la carencia de unión de la célula a la matriz extracelular mediada por integrinas, causando la muerte de las células que se desprenden de su matriz (**Frisch & Ruoslahti 1997**). Éste fenómeno es típico de las células epiteliales actuando como salvaguarda ante una posible migración y crecimiento de éstas células en matrices diferentes a las propias o en ausencia de adherencia. Como ya se ha abordado, E1A es capaz de modificar células transformadas hacia un fenotipo epitelial (**Frisch 1991**) haciéndolas más

sensibles a la anoikis (Frisch & Francis 1994) que jugaría un papel fundamental como mecanismo supresor tumoral ante defectos de anclaje. Molecularmente, éste mecanismo está mediado por la proteína de unión al extremo C-terminal (CtBP), represor de la transcripción que actúa en forma de homodímeros que se adhieren a los promotores diana, silenciándolos y reclutando a su vez otras enzimas como la proteína polycomb 2 que colabora en el silenciamiento mediante su actividad deacetilasa. CtBP se une al extremo carboxilo terminal de E1A a través de un motivo PXDLS (Schaeper et al. 1995) provocando la sensibilización las células que expresan E1A a anoikis (Grooteclaes & Frisch 2000).

1.2.5 E1A como agente terapéutico

Además de actuar *in vivo* como un supresor tumoral, E1A puede ser utilizado en la terapia contra el cáncer a diferentes niveles. Un claro ejemplo son los adenovirus oncolíticos, donde las partículas virales son las encargadas de infectar y lisar las células cancerosas (Wei, Wang, Chen, Li & Huang 2014a). La capacidad de E1A de modular el ciclo celular de la célula infectada le confiere también un papel decisivo en la determinación de la selectividad de dichos adenovirus oncolíticos. De éste modo, el dominio de unión a pRb de E1A posibilita la inducción de ciclo celular por lo que sería innecesario en células tumorales donde dicho ciclo ya se encuentra acelerado por mutaciones en pRb. Así, un adenovirus defectivo en dicho dominio de E1A sería capaz de infectar y lisar eficazmente células tumorales pero no células sanas. Ésta propuesta se ha llevado a cabo con la generación del denominado AdD24 defectivo en la unión a pRb del gen *E1a*, que replica selectivamente en células con un ciclo muy activo pero no en el resto de células del organismo, como en el caso de gliomas (Fueyo et al. 2000; Lamfers et al. 2007).

En éste sentido, se ha demostrado que diferentes virus oncolíticos poseen una potenciación de su capacidad oncolítica así como de su replicación y en la expresión de posibles transgenes que transporten al interior de células transformadas. Esta potenciación no se observa con E1B, lo que confiere a E1A un papel fundamental a la hora de diseñar nuevos abordajes terapéuticos con virus oncolíticos tanto *in vivo* como *in vitro* (Wei, Wang, Chen, Li & Huang 2014a), lo que ha permitido el diseño de virus carentes de E1B desde el principio del desarrollo de los virus oncolíticos como el Onyx-015 (Heise et al. 1997). Gracias a ésta característica, E1a es un gen clave en el desarrollo de diferentes tipos de virus oncolíticos al ubicarlo detrás de diferentes promotores, como bajo el de la survivina en los adenovirus Ad5/35E1apsurvivinE4 (Seo et al. 2014) o el promotor de la telomerasa hTERT en los adenovirus hTERT (T.-G. Huang et al. 2003) y combinado con genes como el de apoptina (G. Yang et al.

2014). De hecho, se ha observado una potente inducción de muerte no sólo por apoptosis, sino también mediada por autofagia en múltiples ensayos con adenovirus oncolíticos, siendo la presencia de E1A íntegro indispensable para orientar dicha autofagia hacia muerte celular en lugar de supervivencia (Tazawa, Kagawa & Fujiwara 2013a).

Por último, E1A posee además un importante papel quimio y radiosensibilizante que le hace una interesante herramienta como adyuvante en terapias clásicas a través de un abordaje de terapia génica. Se ha demostrado su efecto quimiosensibilizante frente a diferentes quimioterápicos clásicos de distintas categorías como paclitaxel, doxorubicina o cisplatino (Sanchez-Prieto et al. 1996) (Brader et al. 1997). Se ha propuesto que el bloqueo en la activación de la vía PI3K/AKT en presencia de E1A en el tratamiento con cisplatino podría justificar éste efecto (Guinea Viniestra et al. 2002; Liao & Hung 2003b), aunque se necesita clarificar si existen otras vías de quimiosensibilización. Por ejemplo, se ha observado que la quimiosensibilidad al paclitaxel ejercida por E1A se desencadena por una inducción de apoptosis mediada por Caspasa 3 (Ueno, 2000a) y dependiente de FOXO3a, desapareciendo al disminuir los niveles de dicho factor de transcripción (Su et al. 2011). Asimismo, los mutantes de E1A que carecen de unión a p400 son incapaces de promover apoptosis asociada a ciertos quimioterápicos que, como la doxorubicina, actúan mediando daño al DNA (Samuelson et al. 2005), aspecto que será relevante más adelante en éste estudio. Para una revisión en profundidad del estado actual de la cuestión, ver (Y.-W. Chang et al. 2014).

En cuanto a la radiosensibilización, se postula que la acusada sensibilización mediada por E1A se debe a la inactivación de NF- κ B (Shao et al. 1997). Dado su papel protector frente a apoptosis como factor de transcripción, su inhibición permite un incremento en la muerte celular en respuesta a radiación (Jung & Dritschilo 2001; Russo et al. 2001; Criswell et al. 2003). E1A es capaz de bloquear la degradación de I κ B, su inhibidor (Baeuerle 1998; J. T. Wu & Kral 2005), y por tanto disminuye la activación de NF- κ B cuando las células que expresan E1A son sometidas a radiación ionizante (Shao et al. 1999). Dicha sensibilización es AKT independiente, al contrario de lo que es típico en éste fenómeno, dado que aunque los niveles de AKT están disminuidos en células que expresan E1A la ruta puede activarse al exponerse a radiación (Shao et al. 2001). El descenso en los niveles de AKT en respuesta a agentes quimioterápicos o radiación en éstas células se ha correlacionado con la activación p38 MAPK a través de ASK1 y MKK3 (Liao & Hung 2003a) y la inducción de apoptosis; ya que mutantes de E1A incapaces de inhibir AKT carecen de ésta activación de p38 (Liao & Hung 2003a). Si bien ésta observación no ha podido ser reproducida en fibroblastos humanos no transformados en los que al expresar E1A se

da una alta sensibilidad a cisplatino que correlaciona con bajos niveles de AKT pero no así con activación de p38 (Guinea Viniegra et al. 2002), el descubrimiento de un mecanismo alternativo de modulación de AKT por parte de E1A podría justificarlo (Liao & Hung 2004). Ésta regulación se lleva a cabo mediante la fosfatasa PP2A, dado que E1A incrementa los niveles de su subunidad catalítica incrementando su actividad y provocando un acusado aumento de la sensibilidad a estímulos diferentes (Liao & Hung 2004).

En definitiva, la capacidad terapéutica de E1A no dependería exclusivamente de una ruta o fenómeno sino de la interacción de múltiples vías tan diferentes como la inducción de apoptosis, de anoikis o su capacidad para quimio y radiosensibilizar.

1.2.6 E1A y su expresión *in vivo*

A la hora de evaluar la eficacia y seguridad de E1A como agente terapéutico su expresión en modelos animales es un paso fundamental. Hasta la fecha se han desarrollado algunos de estos modelos en los que E1A se expresa bajo el control de promotores específicos de tejido, permitiendo estudiar así sus efectos en dicho entorno biológico.

El ojo y sus tejidos ha sido el marco donde se ha analizado más en profundidad el efecto de la expresión *in vivo* de éste gen adenoviral. Un primer abordaje consistió en expresarlo bajo el control de un fragmento del promotor del gen del pigmento rojo, dirigiéndolo a las células cónicas de la retina (Y. Wang et al. 1994). Esto permitió derivar diferentes líneas de éstos animales en las que se pudieron observar malformaciones oculares tales como fenotipo de ojo pequeño, displasia retinal o hiperplasia del epitelio pigmentario de la retina. Además se observaron unas proporciones no mendelianas a la hora de intentar producir líneas homocigotas para E1A lo que sugería letalidad embrionaria debida a los efectos deletéreos que la expresión de E1A promovería durante el desarrollo (Y. Wang et al. 1994). Sin embargo, no se produjo ningún caso de lesiones tumorales en ninguno de los animales analizados y seguidos hasta los 22 meses de edad (Y. Wang et al. 1994).

La expresión de diferentes isoformas de E1A se ha analizado, además, bajo el control del promotor de la α A-cristalina expresándose así en células que conforman la fibra de la lente del cristalino. En éste caso, entre las isoformas no se encontraba la proteína total o 13s sino las formas 12s y sus delecciones sin el dominio CR2 (Δ CR2) o sin el extremo amino terminal (Δ N). Esto permitió observar cómo la isoformas 12s y el mutante Δ CR2, a pesar de unirse a p300/CBP, eran incapaces de incrementar la

expresión de las β y γ -cristalinas. Este incremento era característico de los animales con expresión de ΔN en los que también se observaba un entrada en ciclo celular acompañada de un marcado patrón apoptótico y una falta de activación de p53, efectos no encontrados en el resto de isoformas expresadas. El modelo, además de profundizar en el papel de p300/CBP y pRb en la diferenciación del cristalino, servía para confirmar efectos deletéreos de E1A durante el desarrollo embrionario no sólo en el cristalino sino también en la piel como un efecto inespecífico de estos transgenes (Q. Chen et al. 2002).

La piel es precisamente el tejido en el que se ha modelizado también la expresión de una isoforma parcial de E1A *in vivo*. En éste caso se llevó a cabo bajo el control de un promotor mínimo de la citokeratina 5 que permitía estudiar su efecto en el crecimiento y diferenciación de los keratinocitos en la capa basal de la epidermis de ratones con fondo genético SENCAR. Los efectos fenotípicos que se observaron englobaban desde efectos sistémicos como un menor tamaño hasta una serie de malformaciones de la piel y el pelo de los animales como distrofia folicular, ausencia de la vaina interna en la raíz del cabello o pelo corto, quebradizo y deforme; así como calvas presentes desde el desarrollo temprano del pelo. Estos animales fueron expuestos posteriormente a un protocolo de carcinogénesis química con DMBA-TPA y no se encontró una potenciación sino un descenso leve de la tumorigénesis debida a E1A, y no se desarrollaron tumores esporádicos durante el transcurso del experimento. Sin embargo, los resultados derivados de éste trabajo no son del todo extrapolables a la función completa de E1A debido al uso de un mutante de delección que no une p300 (Missero et al. 1993).

Otras aproximaciones, como la expresión de las isoformas 12s y 13s de E1A en un modelo transgénico en pulmón han dado como resultado la obtención de animales con un marcado fenotipo distinto para cada isoforma. Se ha observado daño tisular mediado por apoptosis, un contexto proinflamatorio y la activación de p53 por daño al DNA con la expresión del 13s. Por el contrario, en el caso del 12s se detectó hiperplasia, lesiones nodulares y una baja activación de p53 y sus fenómenos apoptóticos asociados (Y. Yang, 2002)

Estas evidencias ponen de manifiesto la necesidad de contar con un modelo de expresión de E1A *in vivo* que evite los efectos deletéreos del gen durante el desarrollo y permita evaluar de forma inequívoca su viabilidad como agente terapéutico.

Ensayos clínicos o pre-clínicos con E1A			
Estudio	Inoculación	Resultados	Referencia
Seguridad y toxicidad en ratones	Inyección intraperitoneal en ratones de dosis únicas o repetidas de entre 7,5-150 μg	Sin resultados adversos	(Xing et al. 1997)
Seguridad del uso de E1A con liposomas	Inoculación de céls. SKOV3. Incubación de 5 días. Inyección intraperitoneal de E1A	Dosis mínima optimizada. Supresión tumoral sin CR2,3 Integración en pulmón y riñón.	(Xing et al. 1998)
Fase I, 16 pacientes recurrentes de cáncer de cabeza y cuello	Inyecciones intratumorales recurrentes de 120 μg de DNA por cm^3 tumoral	Sin toxicidad Transferencia eficiente	(Yoo et al. 2001)
Fase I, pacientes con cáncer de pecho u ovario avanzado	3 inyecciones semanales en la cavidad pleural de entre 1,8 a 7,2 μg DNA por cm^3 tumoral	Transferencia eficiente Disminución Her-2 Incremento apoptosis Disminución proliferación	(Hortobagyi et al. 2001)
Fase II, 24 pacientes con cáncer de cabeza y cuello no seccionable	3 inyecciones iniciales + 1 semanal. 30 μg de DNA por cm^3 tumoral	Buena tolerancia Respuesta completa 1 paciente/menor 2 pacientes Enfermedad estable 7 pacientes	(Villaret et al. 2002)
Fase I, 15 pacientes de cáncer de ovario recurrente	6 ciclos de 3 dosis semanales de 1.8/ 3.6/ 7.2 μg de DNA por m^2 tumoral	Transferencia efectiva Dosis limitada por dolor a 3.6 μg de DNA/ m^2	(Madhusudan et al. 2004)

Tabla 1. Ensayos clínicos o pre-clínicos con E1A. Se usó DNA de E1A en el interior de liposomas como vehículo en todos los casos. Adaptado de (Deissler & Opalka 2007)

Objectives

As indicated by previous studies, E1a is a gene with therapeutic potential. Its ability to induce different mechanisms including apoptotic cell death makes it a great target for application in cancer therapy using different approaches such as gene therapy or oncolytic adenoviruses. However, before it can be seriously considered for use in cancer therapy it is necessary to address some important issues. First, to elucidate whether or not E1A is able to sensitize refractory tumours to current cancer therapies in first-line treatment. Second, it is necessary to understand the mechanisms through which E1A is able to exert these functions and, finally, to make an assessment of its safety when it is expressed *in vivo*.

Therefore, the objectives in this work were:

- To elucidate the radiosensitizer potential of E1A in bad prognostic, radioresistant cells such as the glioblastoma-derived cell lines. If so, to describe the mechanisms through which E1A is able to confer radiosensitivity in these experimental models.
- To evaluate the putative chemosensitizer potential of E1A in NSCLC cell models to cisplatin. If so, to expose the mechanisms through which E1A is able to exert this effect.
- To develop an inducible, tissue specific transgenic mouse model in order to avoid E1A deleterious effect during development.
- To evaluate the safety of E1A expression *in vivo* in this mouse model.
- To clarify the oncogenic or tumour suppressor role of E1A expression *in vivo*.

Material y Métodos

3.1 Cultivos celulares

Líneas celulares	Linaje	Procedencia
A172	Glioblastoma	Dr. Manuel Guzmán, UCM.
LN-405	Glioblastoma	Dr. Manuel Guzmán, UCM.
T98G	Glioblastoma	ATCC
U87-MG	Glioblastoma	ATCC
H1299	NSCLC	ATCC
H23	NSCLC	Dr. R. Pio, Universidad de Navarra
H460	NSCLC	ATCC
H661	NSCLC	Dr. R. Pio, Universidad de Navarra
HCT116	Carcinoma colorrectal	ATCC
293T	Riñón embrionario	ATCC
B16-F10	Melanoma de ratón C57BL/6	ATCC

Tabla 2. Líneas celulares empleadas en éste trabajo.

Todas las células utilizadas en este trabajo se mantuvieron en condiciones de 5% CO₂ y 37°C. Las células, mantenidas en crioviales en nitrógeno líquido, fueron descongeladas para su utilización siguiendo el protocolo estándar y se cultivaron en placas del tipo p60 y p100.

Las líneas celulares usadas en éste trabajo (**Tabla 2**) se cultivaron en DMEN (Lonza) suplementado con 10% de FBS inactivado más antibióticos, penicilina (50000IU/ml), estreptomycin (500µg/ml), y glutamina (200mM) (Biowhittaker).

3.2 Plásmidos

Los plásmidos usados en el presente trabajo fueron:

Nombre	Inserto	Resistencia	Referencia
pcDNA3-Flag-Myc	Flag-Myc	Ampicilina, Puromicina	Cedido por Dr. Víctor Sánchez Arévalo. CNIO, España.
pcDNA3	Vacío	Ampicilina, Neomicina	Laboratorio del dr. Ricardo Sánchez Prieto
pcDNA3-E1a 13s	E1a 13s	Ampicilina, Neomicina	Laboratorio del dr. Ricardo Sánchez Prieto
pcDNA4-CHK1-flag	CHK1-Flag	Ampicilina, Zeocina	Addgene Plásmido #22894.
pLESIP	Vacío	Ampicilina, Puromicina	Cedido por Dr. J. Silvio Gutkind. NIDCR-NIH, Estados Unidos.
pLESIP-E1a13s	E1a 13s	Ampicilina, Puromicina	Laboratorio del dr. Ricardo Sánchez Prieto
pLKO.1-puro	RNAhc (shRNA) vacío.	Ampicilina, Puromicina	Sigma Aldrich, SHC001.
pLKO.1-puro-shMKP1	RNAhc (shRNA) contra MKP1.	Ampicilina, Puromicina	Sigma Aldrich, SHCLND-NM_004417.
pSAXS	Proteínas de empaquetamiento del genoma de lentivirus	Ampicilina	Cedido por Dr. J. Silvio Gutkind. NIDCR-NIH, Estados Unidos.
pVSV-G	VSV-G (proteína de la envuelta de lentivirus)	Ampicilina	Cedido por Dr. J. Silvio Gutkind. NIDCR-NIH, Estados Unidos.

Tabla 3. Vectores empleados en éste trabajo con sus correspondientes insertos.

3.3 Generación de células resistentes por cocultivo con cDDP

Para la generación de células H460 resistentes por cocultivo con cDDP se dispuso un panel de células H460 de ATCC en diferentes placas y se subcultivaron con dosis de entre 0.1 a 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante dos meses. Al final de éste periodo se seleccionó aquella sublínea que había sido capaz de crecer a la máxima dosis posible de 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.4 Ensayos de transfección e infección

En éste trabajo se llevaron a cabo dos modalidades diferentes de transfección:

3.4.1 Transfección mediante Lipofectamina 2000:

Las líneas celulares se transfectaron mayoritariamente usando la fórmula de liposomas comercial Lipofectamina 2000, según las instrucciones del fabricante (ThermoFisher). La cantidad total de DNA se normalizó mediante el correspondiente vector vacío. Para comprobar la eficacia de la transfección se usó como control la proteína verde fluorescente GFP. Las células fueron seleccionadas 36 horas después de la transfección con su dosis correspondiente de antibiótico puromicina o higromicina o fijadas y usadas para los diferentes abordajes experimentales.

3.4.2 Transfección mediante fosfato cálcico:

La transfección mediante fosfato cálcico es un tipo de transfección química que consiste en la formación de una solución que contenga complejos de fosfato cálcico a los que se adhiere el DNA y son incorporados en la célula por endocitosis. Se utilizó en las células empaquetadoras 293T para la producción de partículas lentivirales según el siguiente protocolo:

- Para una placa de 100mm, se añade a cada tubo 1ml de la solución "A" que se va a combinar con el DNA que queremos transfectar.

Solución A		
	P60	P100
DdH ₂ O	430 μl	860 μl
CaCl ₂ (2.0M)	62.5 μl	125 μl
DNA	5 μg	12 μg

Tabla 4. Componentes de la solución A para la transfección con fosfato cálcico.

- A continuación, se vierte gota a gota la solución “B” sobre la solución “A” en un agitador. La agitación favorece la formación de los precipitados de DNA y fosfato cálcico.

Solución B		
	P60	P100
Tampón HN (50mM HEPES; 280mM NaCl)	500µl	1000µl
NaH ₂ PO ₄ (70mM)	12.5µl	25µl

Tabla 5. Componentes de la solución B para la transfección con fosfato cálcico.

La mezcla se incuba 30 minutos y, pasado este tiempo, se añade sobre la placa a transfectar para su incubación durante 8 horas y posteriormente se retira el medio de transfección sustituyéndolo por medio fresco. A partir de entonces comienza la expresión de moléculas virales, por lo que las placas son incubadas en un laboratorio de bioseguridad para realizar los ensayos de transducción lentiviral.

3.5 Ensayos de transducción lentiviral

Las placas transfectadas por fosfato cálcico se incuban en un laboratorio de bioseguridad tipo P2 en las mismas condiciones de humedad, temperatura y CO₂ descritas anteriormente. El máximo de expresión se obtiene entre 36-48 horas desde el comienzo de la transfección, momento en el cual se recuperan las partículas víricas filtrando el sobrenadante con un filtro de 0,45 µm para su infección en fresco o congelación a -80°C para su preservación. En éste caso el medio de las células a infectar plantadas 24 horas antes al 60% de confluencia se retira y se incuban durante 16 horas junto con el virus y una concentración de 8 µg/mL de polybrene. Tras esto, se cambia el medio por medio fresco y tras 48 horas para permitir la expresión de transgén las células están listas para seleccionarlas con el fármaco correspondiente a la dosis determinada experimentalmente.

3.6 Ensayos de supervivencia y viabilidad

La técnica del cristal violeta se lleva a cabo retirando el medio de las células que se lavan posteriormente con PBS, tras lo que se incuban durante 10 minutos con una disolución de 0,5% de glutaraldehído en agua destilada para fijarlas. A continuación se retira el fijador, se repite el lavado con PBS y se incuban con cristal violeta (de Sigma-Aldrich, C3886) en una concentración de 10 mg/mL. Una vez teñidas, las placas se lavan en agua destilada y se recupera el colorante con una disolución de ácido acético al 10%. Para su evaluación se transfieren 200 μ l a placas transparentes de 96 pocillos y se mide su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Biokinetics (Bio-Tek Instruments, Inc. Winooski, VT, USA). Todas las incubaciones se llevan a cabo a temperatura ambiente en agitación suave.

La medición de viabilidad mediante MTT se realiza añadiendo reactivo de MTT (Bromuro de tetrazolio azul tiazolilo, de Sigma-Aldrich, M2128) a 5 mg/mL en PBS, sobre el medio de las células en cultivo en una proporción 1:10. Las células se incuban entonces durante 1 h a 37°C tras lo que se retira el medio de cultivo. El colorante de los cristales de formazano insolubles que se encuentra en el interior de las células se recupera con DMSO y se transfiere a placas transparentes de 96 pocillos para medir su absorbancia a 570 nm.

En ambos ensayos, cada condición se analiza por triplicado y se calcula su media. La absorbancia de las células se refiere a las de la condición control. Los resultados que se muestran corresponden a la media de 3 experimentos independientes.

3.7 Ensayo de actividad caspasa 3/7

El ensayo se lleva a cabo mediante un kit comercial CaspaseGlo de Promega (G8090) siguiendo las instrucciones del fabricante. El tiempo de incubación y las dosis celulares se calcularon previamente en un experimento con controles positivos.

Para la realización del ensayo se resuspendió el reactivo luminogénico, un pseudosustrato luminogénico de las caspasas 3 y 7 activas. Dichas enzimas activas son capaces de reconocer y escindir la molécula del reactivo liberando un componente que, en presencia de la enzima luciferasa (incluida en la mezcla del reactivo), emite luz. La mezcla resultante se añadió al medio de cultivo en una proporción 1:1 y se agitó la placa durante 30 s a 300 rev./min.

La mezcla resultante se incubó durante 30 min a temperatura ambiente en los que las caspasas 3 y 7 son capaces de reconocer y escindir la molécula del reactivo liberando un componente que, en presencia de la enzima luciferasa incluida en la mezcla del reactivo, emite luz. La luz emitida se cuantificó un luminómetro (BD 3096

de Beckton Dickinson). Cada condición se analizó por triplicado. A las unidades de luminiscencia de cada pocillo (obtenidas en el luminómetro) se les restó el valor de un control negativo sin células. Se calculó la media de cada condición y dichos valores se normalizan con respecto a los de los pocillos control sin tratar. Los resultados que se exponen en este estudio corresponden a la media de los resultados de 3 experimentos independientes.

3.8 Irradiación

Las células se irradiaron en el acelerador lineal de electrones Clinac Low Energy 600C de Varian del servicio de Radioterapia del C.H.U.A. a las dosis que se indican en cada experimento, con una energía nominal de 600 cGy/min, en un campo de radiación de 40 × 40 cm.

La densidad celular a la que se sembraron los experimentos se determinó mediante un experimento control. Los experimentos se plantaron 24 h antes de su tratamiento y los medios de cultivo se cambiaron por medio fresco 24 h después de la radiación. En los ensayos de supervivencia el medio se renovó cada 3 días hasta el fin del experimento 6 días tras de la irradiación y la supervivencia se midió por cristal violeta según el protocolo descrito anteriormente.

3.9 Citometría de flujo

Para el análisis del ciclo celular las células fueron tripsinizadas y lavadas con PBS, fijados en etanol de 70% frío en PBS y lavados en PBS frío. Posteriormente se incubaron con ioduro de propidio 10 µg/ml y 20 µg/ml de RNasa durante 20 min en oscuridad. Las células se plantaron en placas de seis pocillos y se transfectaron con Lipofectamina 2000 siguiendo el protocolo detallado anteriormente. Previamente a la irradiación, las células se plantaron veinticuatro horas antes y se recogieron a los tiempos indicados en cada experimento. Las muestras se analizaron en un citómetro BD FACS Canto II (Becton Dickinson) y los datos obtenidos se procesaron con el software FACSDiva (Becton Dickinson) y FlowJo (Tree Star Inc.).

3.10 Ensayos de interferencia

Los siRNA para Chk1 y c-Myc se adquirieron de Dharmacon (ON-TARGET plus SMART pool Human Chk1 Cat. L-003255-00, ON-TARGET plus SMART pool Human c-Myc Cat. L-003282-00 y ON-TARGET plus CONTROL pool Cat. D-001810-10-05) y se usaron según las recomendaciones del fabricante. Para los ensayos de transfección, las células se transfectaron usando Lipofectamina 2000 según el

protocolo citado anteriormente y su efectividad se comprobó por q-RT-PCR y Western Blott 48 h y 72 h tras la transfección respectivamente.

En el caso de MKP1 se llevó a cabo un abordaje de shRNA adquirido a Sigma-Aldrich (SHCLND-NM_004417) y usado según las recomendaciones del fabricante. Se testaron cinco clones diferentes usándose aquel con el que se consiguió una mayor eficiencia para silenciar dicho gen.

3.11 Inmunoblot

Las células se lavaron con PBS 1x y se recolectaron para la extracción de proteína en su correspondiente buffer de lisis (HEPES pH 7.5 25 mM, NaCl 300 mM, EDTA 0,2 mM, Triton X-100 1 %, SDS 0,1 %, ácido deoxicólico 0,5 %) con inhibidores de fosfatasas (200 mM NaF, 0.1 mM Na_3VO_4) y proteasas (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina, 1 mM PMSF, 1 mM DTT y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina). Posteriormente, se procedió a la centrifugación de las muestras durante 10 minutos a 4° C y 13000 rpm. A continuación se recogió el sobrenadante y se cuantificó su contenido en proteína mediante el método de BCA (BCA Protein Assay Kit, Pierce). Más tarde, se añadió a las diferentes muestras tampón de carga (Laemmli 5X: 15 ml H_2O , 2.5 ml Tris-HCL pH 6.8 1 M, 10 ml de Glicerol, 8 ml de SDS 10%, 2 ml de β -Mercaptoetanol, 500 μl de Azul de Bromofenol 0.5% en H_2O). Finalmente, las muestras se calentaron a 100°C durante 5 minutos.

Para separar las proteínas se usaron geles de poliacrilamida al porcentaje correspondiente en función de su peso molecular y se realizó la electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-Page). Se cargaron 50 μg de proteína y tras esto se llevó a cabo la separación según su peso molecular, para lo que se transfirieron a una membrana de PVDF aplicando un voltaje constante (15 V durante 50 mins.) en un transferidor semiseco.

Finalmente, se bloquearon las membranas con 5% de leche en polvo desnatada diluida en TBS con Tween 20 al 0.1% (TTBS). Después de tres lavados de 10 minutos con TTBS las membranas se incubaron con el anticuerpo primario durante 16 horas a 4°C. Las membranas se lavaron tres veces durante 10 minutos cada uno con TTBS e incubadas con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón o conejo (Santa Cruz Biotechnology) en función de su reactividad con actividad peroxidasa conjugada 1 hora a temperatura ambiente, dilución 1:2000 en TTBS. Para revelar las membranas se utilizó un kit comercial de quimio luminiscencia (ECL-Pierce) en un revelador LAS3000 de la marca comercial Fujifilm y cuantificadas con el software ImageJ del N.I.H.

3.12 Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en éste estudio fueron:

Clon	Marca comercial	No de catálogo	Dilución de uso
CHK1	Cell Signalling Tech.	#2360	1:1000 en 5% BSA en TBS-T
P-CHK1	Cell Signalling Tech.	#2348	1:1000 en 5% BSA en TBS-T
c-MYC	Santa Cruz Biotech.	sc-40	1:1000 en 5% BSA en TBS-T
MKP1	Santa Cruz Biotech.	sc-1199	1:1000 en 5% BSA en TBS-T
E1A (M73)	Santa Cruz Biotech.	sc-25	1:1000 en 0,5% BSA en TBS-T
ERK2	Santa Cruz Biotech.	sc-154	1:2000 en 0,5% BSA en TBS-T
P-ERK1/2	Cell Signalling Tech.	#4377	1:1000 en 5% BSA en TBS-T
LC3	Sigma-Aldrich	L8918	1:1000 en 5% BSA en TBS-T
p38 α	Santa Cruz Biotech	sc-535	1:1000 en 0,5% BSA en TBS-T
P-p38	Cell Signalling Tech.	#9215	1:1000 en 5% BSA en TBS-T
p62/SQSTM1	Santa Cruz Biotech	sc-28359	1:500 en 0,5% BSA en TBS-T
Tubulina α	Santa Cruz Biotech	sc-32293	1:3000 en 0,5% BSA en TBS-T

Tabla 6. Vectores empleados en éste trabajo con sus correspondientes insertos. TBS-T indica 0,1% detergente Tween-20 (de Sigma-Aldrich, P1379) en TBS.

3.13 Extracción de RNA, RT y qPCR

La extracción de RNA se llevó a cabo usando el kit comercial RNeasy Mini Kit (Cat. 74104, Qiagen) para muestras procedentes de cultivos celulares y el RNeasy Mini Kit (Cat. 74704, Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La retrotranscripción se llevó a cabo a partir de 1 µg de RNA mediante el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Cat. K1621 de ThermoFisher). El cDNA resultante se diluyó 1/10 en agua destilada de la que se usaron 4 µl para llevar a cabo los ensayos de qPCR para valorar los niveles de RNA de las muestras. La qPCR se realizó usando SYBR Green PCR Master Mix de Applied Biosystems (Cat. 4309155) en un termociclador ABIPrism 7500 FAST Sequence Detection System (Applied Biosystems) en presencia de sus cebadores específicos, detallados en la siguiente tabla, diseñados con el software Primer Express 3.0 y encargados a la compañía Bonsai Technologies. Los niveles de mRNA se analizaron por el método de $\Delta\Delta CT$.

Cebador	Directo	Inverso
CHK1	5'-GGCCCCTGAAAGAATAAACCC-3'	5'-CGAAGGATGGCCAACCTCAATC-3'
c-MYC	5'-GACCTGGAGCGGCTGACA-3'	5'-TACCATCAAAAGCTGAGATGAAACA-3'
MKP1	5'-AGCCACCATCTGCCTTGCTTA-3'	5'-CTGGCCCATGAAGCTGAAGTT-3'
DUSP5	5'-CGGAATATCCTGAGTGTTGCG-3'	5'-CACTTGGATGCATGGTAGGCA-3'
E1A	5'-TACCCGCCGTCCTAAAATGG-3'	5'-CAGTCTTCTGGGTGGCAGTGA-3'
GAPDH	5'-TCGTGGAAGGACTCATGACCA-3'	5'-AAGGACCGGAGTCACAGCTA-3'
P0	5'-AAGCGCGTCTGGCATTGTCT-3'	5'-CCGCAGGGGCAGCAGTGGT-3'

Tabla 7. Cebadores empleados en éste trabajo con sus secuencias directa e inversa.

3.14 Compuestos químicos

Los compuestos químicos, inhibidores y quimioterápicos utilizados en la realización de éste trabajo se detallan en la tabla siguiente:

Nombre comercial	Tipología	Marca comercial	No de catálogo	Disolvente
Cis-diaminodicloplatino (II) / CDDP	Fármaco quimioterapéutico basado en platino	Sigma-Aldrich	P4394	H ₂ O
Cloroquina	Inhibidor de la degradación lisosómica	Sigma-Aldrich	C6628	H ₂ O
G418	Antibiótico	Calbiochem/ Merck-Millipore	5.09290	H ₂ O
Hematoxilina de Harris	Tinte	Merck	1,09253,2500	-
PD98059	Inhibidor de MEK1/2	Selleckchem	S1177	DMSO
Puromicina	Antibiótico	Sigma	P8833	H ₂ O
Q-VD-OPh (QVD)	Inhibidor general de caspasas	R&D Systems	OPH001-01M	DMSO
Rapamicina	Inhibidor de mTOR	Calbiochem/ Merck-Millipore	553210	DMSO
SB203580	Inhibidor de isoformas α y β de p38	Selleckchem	S1076	DMSO

Tabla 8. Compuestos químicos utilizados en éste estudio.

3.15 Ensayos de xenotransplante

Los ensayos de xenotransplante se llevaron a cabo de acuerdo con la normativa y supervisión del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete (CHUA) y se realizaron en el animalario de dicho centro bajo supervisión veterinaria. Se generaron las células HCT116 y B16-F10 E1A y E.V. con expresión estable, por infección lentiviral con los vectores pLESIP y PLESIP E1a 13s siguiendo los protocolos indicados anteriormente. Posteriormente, se inyectaron cinco millones de células HCT116 E1A o E.V. en hembras BALB/c-Nude de la empresa Janvier Labs y un millón de células B16-F10 E1A o E.V. por individuo en hembras C57BL/6 en grupos experimentales formados por seis individuos. El seguimiento de las lesiones tumorales se llevó a cabo diariamente con un calibre y se calculó el volumen tumoral mediante la fórmula:

$$V = \frac{D \times d^2}{2}$$

Fórmula 1. Cálculo del volumen tumoral. Donde D: Diámetro mayor, d: Diámetro menor.

La eutanasia de los animales se realizó bajo supervisión veterinaria a término del experimento o siguiendo criterios de punto final.

3.16 Generación de animales transgénicos y genotipado

En el caso de la generación de los animales transgénicos, todos los ensayos con animales fueron llevados a cabo de acuerdo con la normativa y supervisión de *NIH-Intramural Animal Care and Use Committee (ACUC)* en el servicio de microinyección del N.I.H. en Bethesda, Maryland. El cDNA de la isoforma 13s de E1A se subclonó detrás de elemento de respuesta a tetraciclina Tet-O7 en un vector pBlueScript mediante los sitios de restricción BamH1/Not1. El DNA resultante, previa comprobación transitoria de su inducción, fue aislado y purificado para su microinyección en oocitos fertilizados de la cepa FVB/N. Los individuos fundadores resultantes fueron seleccionados mediante su genotipado para el gen *E1a* utilizando los cebadores descritos anteriormente.

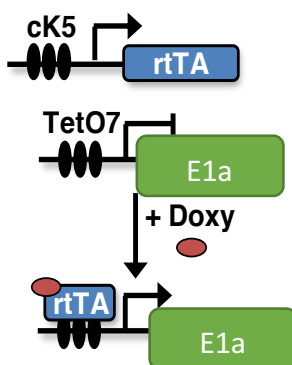


Figura 5. Representación esquemática del sistema de expresión inducible del sistema de expresión del gen E1a. El inductor por tetraciclina rtTA se expresa bajo el promotor de la citokeratina 5 en aquellos tejidos donde dicha proteína se expresa de forma natural, como los epitelios. Dicho inductor es capaz promover la transcripción a partir del promotor TetO7 bajo el que se regula la expresión de la isoforma 13s del gen E1a sólo en presencia de doxiciclina.

La misma cepa portando el transgén cK5-rtTA fue cedida por el Dr. Silvio Gutkind. Para la consecución de los dobles transgénicos (Fig. 5), hembras tet-E1A se cruzaron con machos cK5-rtTA y su descendencia fue seleccionada mediante genotipado por PCR a partir de una biopsia mínima del ápice de la cola del animal. El DNA se extrajo con el QIAamp DNA Mini Kit de Qiagen y el genotipado se llevó a cabo utilizando el kit REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix de Sigma-Aldrich (Cat. R2523) y visualizado por electroforesis en un gel de agarosa con RedSafe de Intron Biotech. (Cat. 21141). La PCR se llevó a cabo en un termociclador iCycler de BioRad usando los cebadores que se detallan en la Tabla 9 y siguiendo las siguientes condiciones:

1. Desnaturalización inicial: Durante 4 minutos a 95°C.
2. Desnaturalización, alineamiento y elongación: 35 ciclos consistentes en 95°C durante 30seg., 55°C durante 30seg. y 72°C durante un minuto.
3. Elongación final: 72°C durante cinco minutos para asegurar la terminación del mayor número de cadenas posibles. Posteriormente el resultado de la reacción se conserva a 4°C.

Cebador	Directo	Inverso
E1A Genotipado	5-GCAGGAAGGGATTGACTTACTC-3	5-CAAACCTCCTCACCCCTCTTCATC-3
rtTA Genotipado	5'- CCGGATCCACCATGCGCTAAGAGCCCCACG- 3'	5'- ATCTGAATGTACTTTTGCTCCATTGCGAT -3'

Tabla 9. Cebadores de genotipado empleados en éste trabajo con sus secuencias directa e inversa.

3.17 Análisis de la expresión y el fenotipo de animales transgénicos

Con respecto al mantenimiento y experimentación con los animales transgénicos, todos los procedimientos con animales fueron llevados a cabo de acuerdo con la normativa y supervisión del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Complejo Hospitalario Universitario de Albacete (CHUA) y llevados a cabo en el animalario de dicho centro bajo supervisión veterinaria. Para su análisis fenotípico, los animales fueron alimentados con pienso con doxiciclina LAB RODENT W/6000PPM DOXYCYCLINE de TestDiet durante 7 semanas desde su nacimiento. Los animales fueron monitorizados una vez a la semana anotándose su peso medido en una báscula de precisión y sus medidas con un calibre y se observó cualquier posible anormalidad morfológica que indicase diferencias fenotípicas. Se analizaron las proporciones mendelianas en los genotipos de la descendencia de los animales dobles transgénicos comparados con los del grupo control. En el momento de finalizar el experimento los animales sufrieron eutanasia bajo supervisión veterinaria y se tomaron biopsias de la piel y de múltiples epitelios del cuerpo para su análisis. La expresión del transgén fue analizada por qRT-PCR siguiendo el protocolo y con los cebadores ya señalados.

3.18 Preparación de los tejidos, histología e inmunohistoquímica

La expresión de E1A y el estado histológico de la piel fueron analizados a partir de las biopsias de piel obtenidas anteriormente, mediante técnicas inmunohistoquímicas. Las muestras de tejido se fijaron utilizando fijador Zinc Formalin Fixative de Sigma-Aldrich durante 24h y se conservaron en etanol al 70% en agua. Los tejidos fijados se embebieron en parafina y se cortaron en secciones de 4µm. El desparafinado se llevó a cabo mediante la solución EZ prep™ (10x). La recuperación antigénica con la solución (Cell Conditioning 1, Pre-diluido ph 8) y las muestras se bloquean con solución de peróxido de hidrógeno al 3%. Algunos de estos cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para su análisis anatomopatológico, cuantificando el espesor de la epidermis y la densidad de bulbos capilares. Otros se tiñeron con el anticuerpo anti-E1A M73 señalado anteriormente y diluido 1/50 en 0,5% B.S.A. en T.T.B.S. para comprobar su expresión. Los cortes histológicos se procesaron mediante el módulo de tinción Benchmark XT, utilizando el kit ultraView Universal DAB (Ventana Medical Systems) escanearon con un microscopio Scanscope Digital (Aperio, Vista, CA).

3.19 Carcinogénesis química

Se formaron dos grupos experimentales con animales de ambos sexos alimentados con pienso con doxiciclina desde el nacimiento. El grupo control estuvo compuesto por animales cK5-rtTA por genotipo y el grupo problema estuvo compuesto por animales cK5-rtTA/tet-E1A por genotipo. A las 7 semanas de vida los animales fueron rasurados y dos días después se les aplicó una solución de DMBA 0.5 µg/µl en acetona por vía tópica. Tras dos semanas, se comienza la aplicación tópica de TPA 0.0625 µg/µl en acetona dos veces por semanas hasta las 24 semanas de haber comenzado el experimento. Tras seis semanas de descanso, los animales se sometieron a eutanasia bajo supervisión veterinaria y se tomaron biopsias siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (Fig. 6).

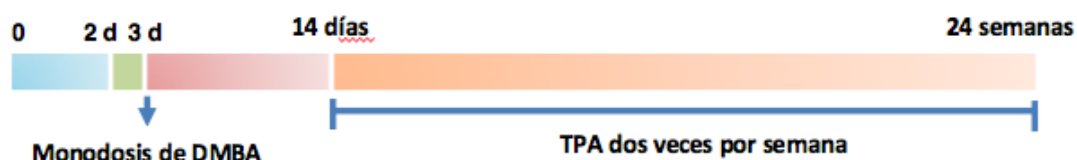


Figura 6. Protocolo de carcinogénesis química DMBA-TPA.

3.20 Análisis estadístico de los datos

Los resultados presentados en éste estudio se representan como la media aritmética ± D.E. (Desviación estándar, en inglés, Standard Error S.E.) de un conjunto de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó usando el software GraphPad Prism 6.01 (de GraphPad) y Excel perteneciente a la suite ofimática Office 2016 de Microsoft. La significación estadística se obtuvo mediante la prueba t de Student y se consignó mediante la siguiente clave:

Significación	Leyenda
$p \leq 0,05$	*
$p \leq 0,01$	**
$p \leq 0,001$	***

Tabla 10. Leyenda de significación estadística.

Resultados

4.1 E1A y su papel en radiosensibilidad

4.1.1 E1A induce radiosensibilidad en modelos celulares de glioblastoma multiforme

Con el fin de estudiar el potencial radiosensibilizante de E1A en un modelo de líneas celulares derivadas de glioblastoma compuesto por U87MG y T98G, dichas líneas celulares se infectaron con vectores lentivirales portadores de los vectores pLesip E1A 13s o vector vacío (E.V.) y se seleccionaron con puromicina. Se analizó la expresión de E1A en las células resultantes por western blot así como su viabilidad al ser sometidas a radiación ionizante (R.I.). Las células con expresión de E1A mostraron una alta radiosensibilidad en comparación con las células E.V. (Fig. 7)

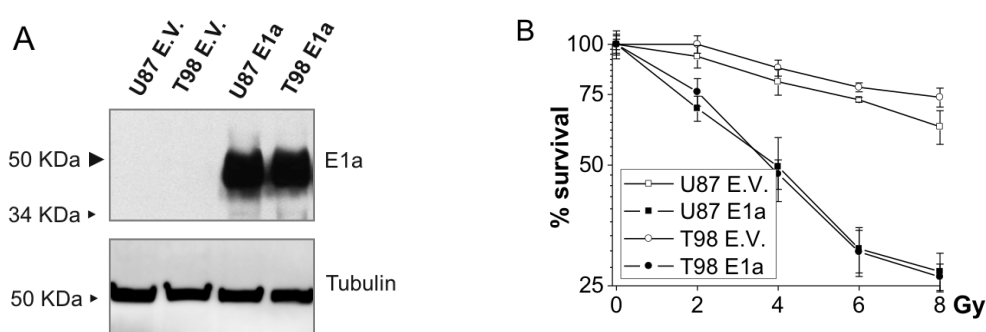


Figura 7. E1A induce radiosensibilidad en dos líneas celulares derivadas de glioblastoma. (A) las líneas U87MG y T98G se infectaron con un vector vacío (E.V.), representadas como U87 E.V. y T98 E.V., o E1A representadas como U87 E1A y T98 E1A, y se analizó su expresión por western blot usando 50 μ g de proteína procedentes de lisados celulares totales (LCT) y los niveles de tubulina como control de carga. (B) Se evaluó la viabilidad de dichas líneas por cristal violeta 6 días más tarde de estar expuestas a 0, 2, 4, 6 y 8 Grays (Gy) de R.I. Los datos mostrados representan la media \pm la desviación estándar (D.E.) de tres experimentos independientes.

A continuación, se analizó el ciclo celular de éstas líneas al ser un conocido marcador de radiosensibilidad (Pawlik & Keyomarsi 2004). Las líneas con expresión de E1A mostraron un incremento en el número de células en fase G2/M, especialmente significativo a tiempos tardíos, en comparación con sus controles. Además, se encontró un incremento en la actividad de las caspasas 3/7 representativo de una respuesta apoptótica que correlacionaría con la desregulación del ciclo celular en éstas líneas. A partir de aquí se evaluaron sólo las células U87MG dada la similitud en el comportamiento de ambas líneas (Fig 8, 9).

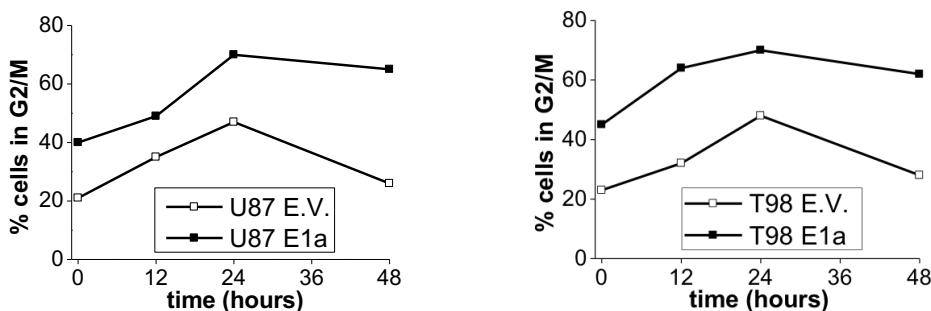


Figura 8. E1A induce el bloqueo del ciclo celular en fase G2/M en líneas celulares derivadas de glioblastoma. Se evaluó mediante citometría de flujo la fracción de células en fase G2/M de las líneas U87MG y T98G expresando E1A y sus controles tras estar expuestas ambas a 10 Gy los tiempos indicados en la figura. Experimento representativo de tres con similares resultados.

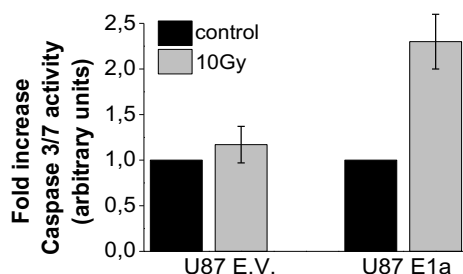


Figura 9. E1A induce una respuesta apoptótica en líneas celulares derivadas de glioblastoma. Se evaluó la actividad caspasa 3/7 24 h después de su tratamiento con 10 Gy. La figura es la media \pm D.E. de 3 experimentos independientes compuestos por triplicados de cultivos.

4.1.2 Chk1 es una nueva diana de E1A en células de glioblastoma

Dado que el efecto de E1A en el ciclo celular es especialmente significativo a tiempos tardíos tras la exposición a R.I. se descartó la vía de señalización de ATM por su característico efecto temprano tras la exposición a radiación (Xu et al. 2002). La vía de ATR, por su parte, promueve el bloqueo en ciclo celular y ejerce una respuesta a tiempos más tardíos (Yarden et al. 2002; Kaneko et al. 1999) por lo que sería un buen candidato para mediar el papel sensibilizador de E1A. Los niveles proteicos de Chk1, sustrato tradicional de ATR, se evaluaron por western blot en las células con expresión de E1A y se compararon con las E.V. en el modelo experimental U87MG. Se evaluaron tanto los niveles totales de Chk1 como su activación mediante fosforilación de la Ser 345 encontrándose ambos incrementados en las células con expresión de E1A (Fig. 10). A su vez se llevó a cabo un ensayo de qRT-PCR en éstas células para

dilucidar si ésta regulación se daba a nivel transcripcional, confirmándose al encontrar niveles incrementados de mRNA de Chk1 en las células con expresión de E1a.

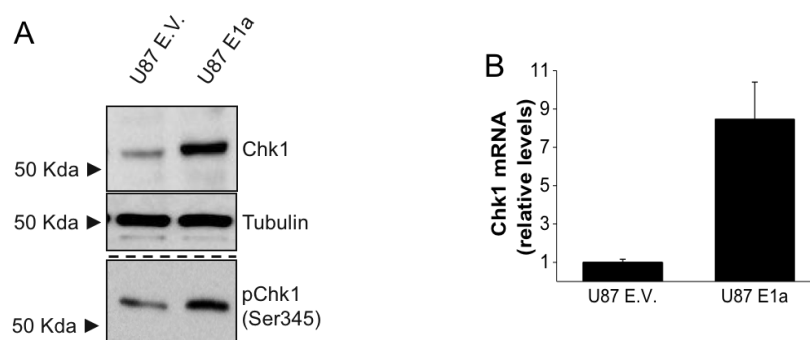


Figura 10. Chk1 es una nueva diana de E1A a nivel transcripcional. (A) Se midieron los niveles de proteína de Chk1 y Chk1 fosfo-Ser345 en células U87MG E.V. y E1A usando 50 μ g de LCT. Experimento representativo de tres. (B) Los niveles de mRNA de Chk1 se midieron por qRT-PCR usando 1 μ g de RNA total. La figura muestra los niveles relativos de mRNA de Chk1 en células U87MG expresando E1A referidas a los de las E.V. Los datos representan la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

A continuación, para esclarecer el papel de CHK1 en el bloqueo en fase G2/M debido al efecto de la expresión de E1A, se evaluó el ciclo celular por citometría de flujo. El porcentaje de células en fase G2/M se evaluó en células U87MG con expresión de E1a transfectadas con siRNA control o contra Chk1 y se compararon con las células E.V. La interferencia de Chk1 es capaz de revertir el bloqueo en fase G2/M en las células con expresión de E1A sugiriendo el papel clave de Chk1 como mediador de dicha respuesta. En conjunto, estos datos sugieren que Chk1 es una nueva diana de E1a a nivel transcripcional y sería responsable de las alteraciones en el ciclo celular debidas a la expresión de E1A en modelos derivados de glioblastoma (Fig. 11).

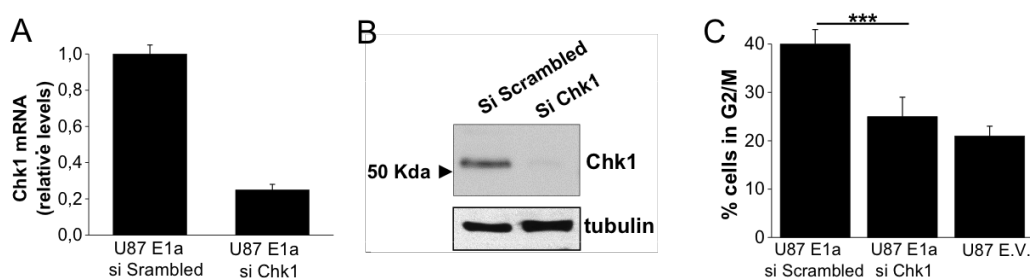


Figura 11. La interferencia de Chk1 es capaz de revertir las alteraciones en el ciclo celular en células U87MG con expresión de E1a. (A) Niveles relativos de mRNA de Chk1 medidos por qRT-PCR usando 1 μ g de RNA total. La figura muestra los niveles de mRNA de Chk1 en las células interferidas referidos al control. (B) Comprobación de la interferencia de Chk1 por western blot usando 50 μ g de LCT. (C) Porcentaje de células U87MG en fase G2/M. Se evaluó el ciclo celular de células con expresión de E1A y transfectadas con si-Chk1 o si-control, usando células U87 E.V. como control. Los datos de A y C son la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

4.1.3 c-Myc incrementa los niveles de Chk1 en células de glioblastoma modulando sus efectos sobre la regulación del ciclo celular.

Con el objetivo de encontrar las bases moleculares de la regulación transcripcional de Chk1 por parte de E1A se evaluó el papel de c-Myc en estos modelos experimentales. c-Myc se ha descrito como regulador de los niveles de mRNA de Chk1 (Höglund et al. 2011). Se evaluaron los niveles de proteína de c-Myc en células U87MG con expresión de E1A y se compararon con los E.V. mostrando un incremento en los niveles de proteína de c-Myc en aquellas células que expresan E1A, confirmando la observación previa que sugiere la estabilización de la proteína c-Myc por parte del gen adenoviral (Tworkowski et al. 2008) (Fig. 12).

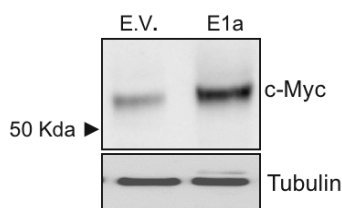


Figura 12. c-Myc incrementa los niveles de Chk1 en células de glioblastoma. Se compararon los niveles proteicos de c-Myc entre células U87MG E.V. and E1A usando 50 µg de LCT, utilizando tubulina como control de carga. Se muestra un experimento representativo de tres.

Para comprobar si los niveles de c-Myc controlaban de algún modo los de Chk1, se llevó a cabo un ensayo de interferencia de c-Myc por transfección de siRNA en células con expresión de E1a, observándose un descenso en los niveles de Chk1 cuando disminuyen los de c-Myc. El análisis de su ciclo celular reveló que la interferencia de c-Myc es capaz de revertir la parada en G2/M causada por E1A. En conjunto, estos datos sugieren que c-Myc es capaz de regular la expresión de Chk1, controlando de éste modo la progresión del ciclo celular en un contexto con expresión de E1A (Fig. 13).

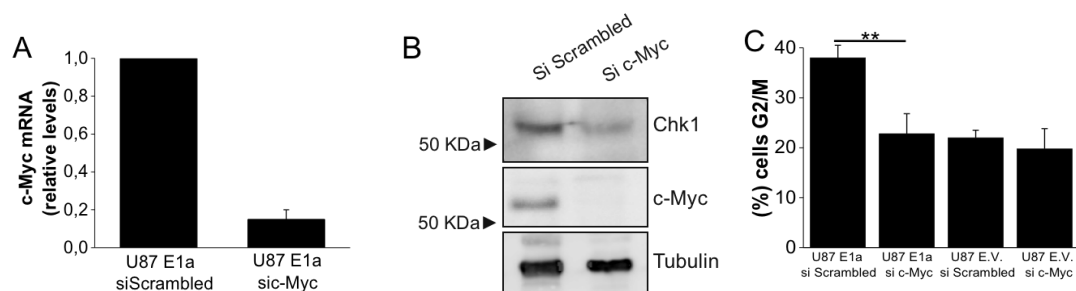


Figura 13. La interferencia de c-Myc disminuye los niveles Chk1 y revierte el bloque en fase G2/M en células de glioblastoma con expresión de E1A. (A) Se evaluaron los niveles de mRNA de c-Myc por qRT-PCR usando 1 μ g de RNA total. La figura muestra los niveles relativos de mRNA de c-Myc en las células con expresión de E1A y c-Myc interferido referidos a los de U87MG E1A si control. Los datos representados son la media \pm D.E. de tres experimentos independientes. (B) Se evaluó la expresión de Chk1 y c-Myc en las células U87MG E1A transfectadas con si Control o si c-Myc por western blot, usando 50 μ g de LCT y comparándolos con los de tubulina como control de carga. Experimento representativo de tres experimentos independientes. (C) Porcentaje de células en fase G2/M. Células U87 E.V. o E1A transfectadas con si Control o si c-Myc. Los datos son la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

Asimismo, se llevó a cabo la sobreexpresión de c-Myc en células U87MG para concluir si c-Myc era capaz de mimetizar el efecto de la expresión de E1A en cuanto a la radiosensibilidad y la distribución del ciclo celular. Las células U87MG se transfectaron con el plásmido pcDNA3-Flag-Myc y se evaluaron los niveles de proteínas de c-Myc y Chk1 por western blot, encontrando un incremento similar al provocado por E1A en los niveles de Chk1. Se evaluó además su radiosensibilidad, resultando ejercer una radiosensibilización acusada pero menor a la ejercida por E1A. En cuanto a la distribución del ciclo celular, c-Myc se mostró capaz de bloquear las células U87MG en fase G2/M de forma similar a como lo hace E1A (Fig. 14).

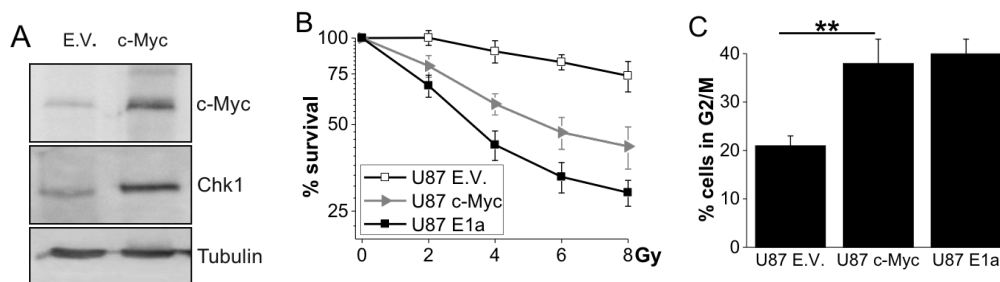


Figura 14. La sobreexpresión de c-Myc mimetiza los efectos biológicos de E1A en cuanto al incremento de Chk1, la radiosensibilidad y la distribución del ciclo celular en la línea U87MG. (A) Evaluación de la expresión de proteína de c-Myc y Chk1 en células U87MG transfectadas con pcDNA3-Flag-Myc por western blot usando 50 µg de LCT, midiendo los niveles de tubulina como control de carga. Se muestra un experimento representativo de tres. (B) Viabilidad de células U87MG sobreescribiendo c-Myc, E1a o E.V. evaluada por cristal violeta a 6 días tras el tratamiento con R.I. a 0, 2, 4, 6 y 8 Gy respectivamente. Los datos representan la media ± D.E. de tres experimentos independientes. (C) Medida del porcentaje de células en fase G2/M. La figura representa la media ± D.E. de tres experimentos independientes.

4.1.4 Los efectos de la expresión de E1A son comunes en diferentes líneas de glioblastoma.

Una vez dilucidado el mecanismo molecular de cómo E1A es capaz de promover radiosensibilidad en ciertas líneas de glioblastoma, se cuestionó la universalidad de dicho fenómeno dentro del linaje de glioblastoma. Para ello, se infectaron con lentivirus como los anteriores las líneas A172 y LN-405 y se seleccionaron con puromicina de forma similar a lo descrito anteriormente. Se evaluó la expresión por western blot de E1A, Chk1 y c-Myc en las células resultantes E1A y E.V. Asimismo se comprobó su viabilidad frente a R.I. y se analizó la distribución del ciclo celular a través del porcentaje de células en G2/M encontrando los mismos efectos descritos previamente en las líneas U87MG y T98G (Fig. 15) confirmando el papel radiosensibilizante de E1A a través del eje de señalización c-Myc-Chk1 en glioblastoma.

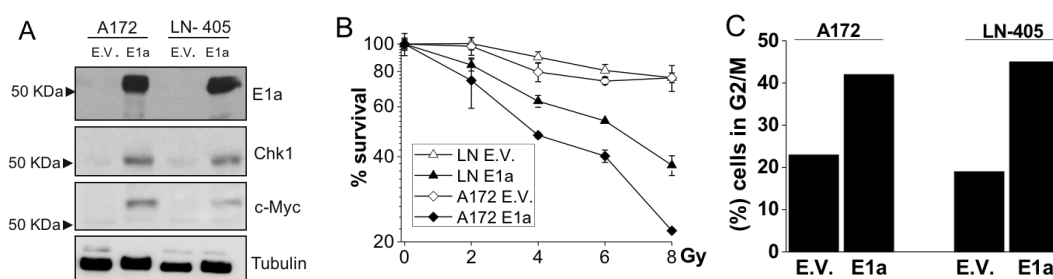


Figura 15. Los efectos de la expresión de E1A son comunes en diferentes líneas de glioblastoma. (A) Evaluación de la expresión de proteínas de E1A, c-Myc y Chk 1 se evaluó en células A172 y LN-405 con expresión de E1A o E.V. por western blot usando 50 μ g de LCT, evaluando los niveles de tubulina como control de carga. Experimento representativo de tres. (B) Viabilidad de las células A172 y LN-405 sobrexpresando E1a o E.V. evaluada por cristal violeta 6 días más tarde del tratamiento con 0, 2, 4, 6 y 8 Gy de R.I. Datos compuestos por la media \pm D.E. de tres experimentos independientes. (C) Distribución del ciclo celular evaluada por porcentaje de células en fase G2/M en la líneas celulares A172 and LN-405 sobrexpresando E1a o E.V. Los datos representados son la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

4.2 E1A y su papel en quimiosensibilidad

4.2.1 E1A promueve sensibilidad a cDDP en NSCLC

Se ha demostrado que E1A posee un fuerte potencial quimiosensibilizante en distintos modelos celulares (Sanchez-Prieto et al. 1996; Guinea Viniegra et al. 2002). Con el objetivo de descubrir el mecanismo molecular por el cual lo logra, se infectó un panel de cuatro líneas celulares no singénicas de carcinoma pulmonar no microcítico (NSCLC); H23, H661, H460 y H1299 con lentivirus portando pLesip E1A 13s o vector vacío y seleccionados con puromicina. Se evaluó la expresión de E1A por western blot y su viabilidad por cristal violeta en dos tipos diferentes de experimentos. En un primer abordaje, se trató las células con 0, 2, 4, 6, 8 y 10 μ g/ml de cDDP, su tratamiento de primera línea, durante 48h y se evaluó su viabilidad. A continuación, se expuso a las células a su dosis IC_{75} de cDDP calculada con los datos del experimento anterior y se evaluó en tiempos en un rango de 0 a 5 días. En ambos experimentos, la expresión de E1A es capaz de sensibilizar todas las líneas celulares al cisplatino, siendo éste efecto particularmente potente en las líneas naturalmente resistentes como la H1299 y menor o incluso apenas perceptible en líneas sensibles como H460 (Fig. 16). Además, estas viabilidades se corroboraron por la técnica MTT sin encontrar diferencias (datos no mostrados).

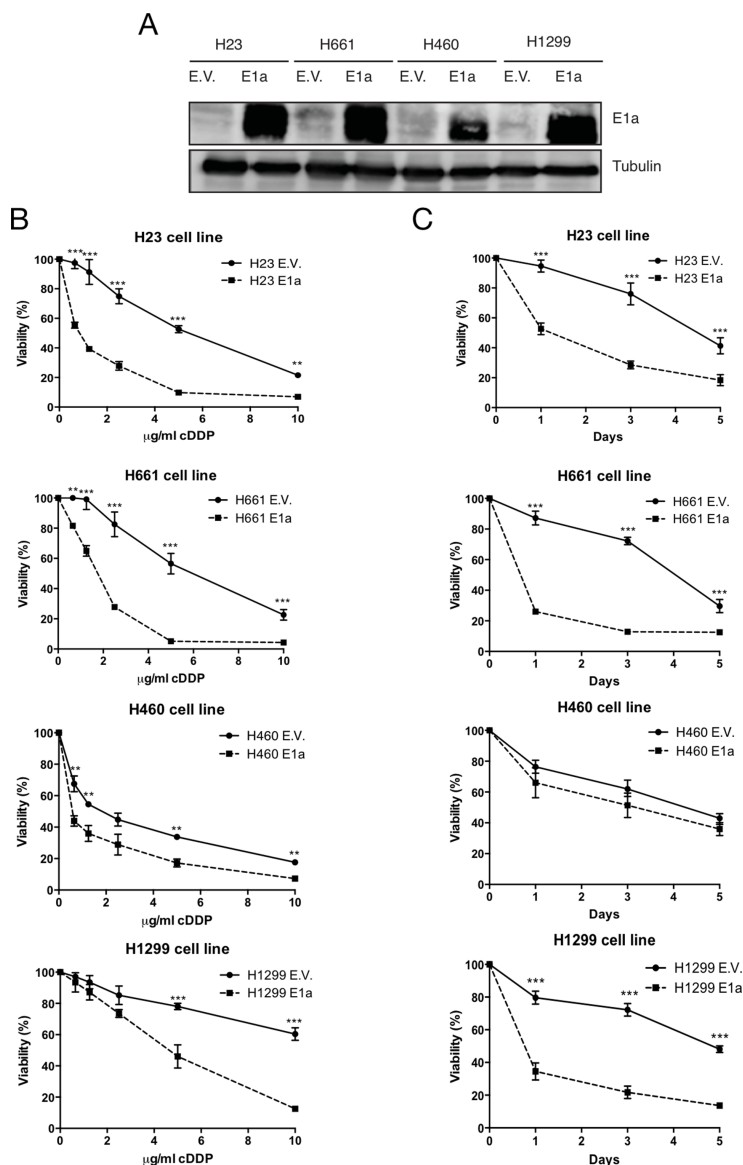


Figura 16. E1A promueve sensibilidad al cDDP en NSCLC. (A) Las líneas celulares H23, H661, H460 y H1299 se infectaron con lentivirus portando E1A o E.V. y su expresión se analizó western blot usando 50 µg de LCT y contrastado con los niveles de tubulina. Experimento representativo de tres experimentos independientes. (B) La viabilidad de las líneas celulares con E1A y E.V. se evaluó por cristal violeta al tratarse con 0, 2, 4, 6, 8 y 10 µg/ml de cDDP durante 48h. (C) Medida de la viabilidad celular por cristal violeta de las mismas líneas al someterse a la dosis de IC₇₅ de cDDP en un rango de 0 a 5 días. En (B) y (C), se representa la media ± D.E. de tres experimentos independientes.

4.2.2 E1A promueve sensibilidad al cDDP en NSCLC a través de la inducción de apoptosis

Es bien sabido que E1A es capaz de promover muerte celular por exposición a cDDP, por lo que se investigó el mecanismo causante. Como se ha demostrado antes en el caso de radiación, E1A suele mediar su efecto citotóxico a través de la inducción de apoptosis, por lo que se evaluó la actividad de las caspasas 3/7 en el modelo de NSCLC más resistente del panel, H1299, con y sin expresión de E1A. Se encontró un incremento significativo de dicha actividad en las células con expresión de E1A al tratarse con 6 µg/ml de cDDP. De hecho, la incubación con el inhibidor de caspasas Q-VD era capaz de revertir parcialmente el efecto quimiosensibilizador de E1A al tratar con 6 µg/ml de cDDP (Fig. 17).

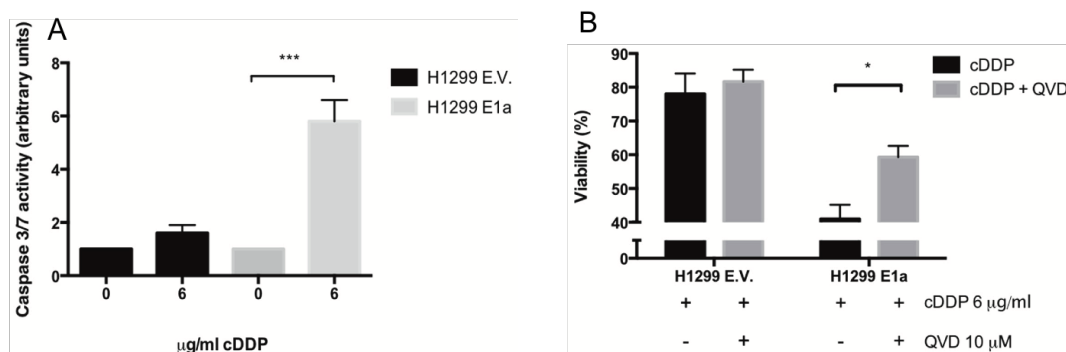


Figura 17. E1A promueve quimiosensibilidad a cDDP en NSCLC a través de la inducción de apoptosis. (A) La actividad de las caspasas 3/7 se evaluó en células H1299 infectadas con E.V. o E1a 13s y tratadas con 6 µg/ml de cDDP durante 24 h. Los datos mostrados se componen de la media \pm D.E. de tres experimentos independientes. (B) Las mismas células se co-trataron con Q-VD 10 µM o DMSO y su ratio de supervivencia se evaluó 48 horas más tarde usando un ensayo de MTT.

4.2.3 La inducción de apoptosis por parte de E1A correlaciona con un incremento de la autofagia basal

Se ha descrito que las células resistentes a cDDP derivadas de NSCLC son capaces de eludir la apoptosis, lo que correlaciona con la inducción de autofagia (García-Cano et al. 2015). Dado que E1A si es capaz de producir una fuerte inducción de apoptosis en éstas células, se estudió el flujo autofágico en células H1299 con expresión de E1A o E.V. Se encontró que E1A es capaz de bloquear la inducción de autofagia en respuesta al tratamiento con cDDP comparado con la respuesta de las células E.V. en términos de los niveles de proteína de LC3-II y p62. Así, se encontraron niveles similares en las células con E1A en estado basal que en las células E.V. tratadas con cDDP. Estos datos sugieren que éste gen adenoviral es capaz de incrementar los niveles basales de los mediadores del proceso autofágico. Más aún, se evaluó el flujo autofágico en ausencia de suero y bajo a incubación con cloroquina, la cual bloquea la degradación de proteínas autofágicas evitando que el pH del lisosoma pueda descender lo suficiente. En éstas condiciones, se observó un acúmulo de LC3-II sólo en las células E.V. y no en aquellas con expresión de E1A confirmando su bloqueo autofágico (Fig. 18). Estos datos apuntan que E1A puede promover un incremento en apoptosis a partir de la saturación en el flujo autofágico por incremento del nivel de autofagia basal en células resistentes a cDDP.

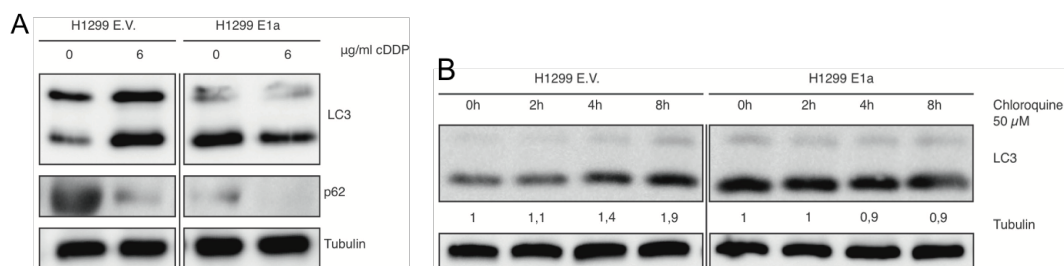


Figura 18. La inducción de apoptosis de E1A correlaciona con un incremento en los niveles basales de autofagia. (A) Análisis de los niveles de proteína de LC3 y p62 en células H1299 E.V o E1a tratadas con 6 µg/ml de cDDP durante 48 h. Se analizaron los niveles de proteína de LC3 y p62 con 50 µg de LCT y usando tubulina como control de carga. (B) Se trataron las mismas células en ausencia de suero con cloroquina a 50 µM durante los tiempos que se indican. Se analizaron los niveles de proteína de LC3-II y p62 usando 50 µg de L.C.T. y analizando la cantidad de tubulina como control de carga. Se cuantificaron los niveles de proteína de LC3-II y se refirieron al control de cada línea celular. Ambas figuras son un experimento representativo de tres independientes.

4.2.4 La sensibilidad a cDDP correlaciona con una baja expresión de MKP1 en NSCLC

Las fosfatasa de MAPKs son dianas conocidas de E1A y mediadores de su papel biológico en respuesta a fenómenos como la senescencia (Callejas-Valera, 2008). Así pues, se evaluaron los niveles de mRNA de dos fosfatasa clave, DUSP5 y MKP1, en el panel de NSCLC. Se encontró una correlación entre quimioresistencia y altos niveles de MKP1 mientras que no se encontró correlación alguna con DUSP5. Ésta correlación implica, como se esperaba, menores niveles de activación de MAPKs clave como ERK1/2 y p38 (Fig. 19). En conclusión, existe una correlación entre niveles basales más altos de MKP1 y una mayor quimiosensibilidad en líneas de NSCLC.

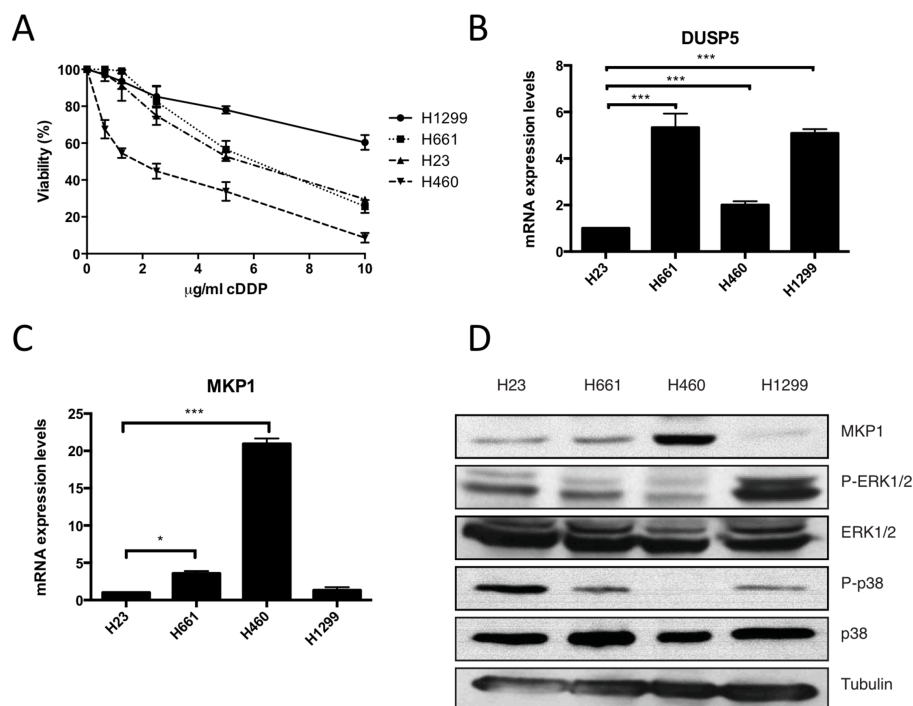


Figura 19. La sensibilidad a cDDP correlaciona con una baja expresión basal de MKP1 en líneas de NSCLC. (A) Viabilidad celular evaluada por cristal violeta en líneas H1299, H661, H23 y H460 incubadas con 0, 2, 4, 6, 8, y 10 µg/ml de cDDP durante 48 horas. Se representan los datos como la media \pm D.E. de tres experimentos independientes. (B) Niveles de expresión de mRNA de DUSP5 y MKP1 medidos a partir de 1 µg de RNA por qRT-PCR en las mismas líneas celulares. Los resultados se refieren a los valores de H23 y las barras indican la media y la D.E. de tres experimentos independientes. (C) Niveles de mRNA de MKP1 medios siguiendo el mismo abordaje. (D) Niveles de proteína de MKP1, P-ERK1/2, ERK-1/2, P-p38, p38 y tubulina analizados por western blot usando 50 µg de L.C.T. en los cuatro modelos experimentales. Experimento representativo de tres.

4.2.5 La inhibición de MKP1 media la resistencia al cDDP en NSCLC

Para comprobar el papel de MKP1 en la quimioresistencia a cDDP se interfirió la expresión de MKP1 en la línea celular H460 por presentar los mayores niveles basales. Se infectaron células H460 con lentivirus portando shRNA control o shRNA MKP1 y se seleccionaron con puromicina. Se evaluaron los niveles de mRNA y proteína de MKP1 por qRT-PCR y western blot para comprobar la eficiencia de la interferencia. A continuación, se evaluó la viabilidad de ambas líneas al tratarse con cDDP encontrando que la interferencia de MKP1 confiere resistencia al cDDP (Fig. 20).

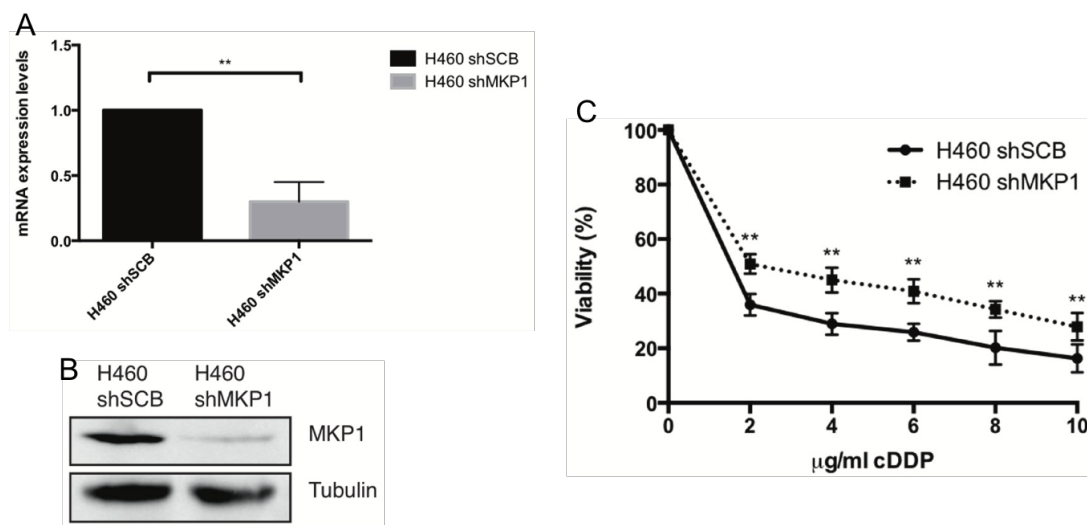


Figura 20. La interferencia de MKP1 media resistencia a cDDP en NSCLC. H460 infectadas con lentivirus portando shRNA control o shRNA MKP1. (A) La interferencia se comprobó por qRT-PCR usando 1 μg de RNA total. La figura representa la media ± D.E. de tres experimentos independientes. (B) Análisis por western blot de los niveles de proteína de MKP1 en dichas células usando 50 μg de LCT y usando tubulina como control de carga. Experimento representativo de tres independientes. (C) Viabilidad por cristal violeta de las células H460 sh control (shSCB) y shMKP1 tratadas a las dosis indicadas de cDDP durante 48 horas. Aparecen representadas la media ± D.E. de tres experimentos independientes.

Se desarrolló, además, un modelo celular de H460 resistentes por cocultivo (representadas como cDDP-R) mediante su cultivo con dosis crecientes de cDDP. Ésta resistencia adquirida en la línea celular sensible correlaciona con menores niveles de expresión de proteína de MKP1 al evaluarse por *western blot*. Además, como comprobación, se evaluó la viabilidad de dichas células, mostrando un incremento significativo a 2, 4, 6, 8, y 10 μg/ml de cDDP durante 48 horas (Fig. 21). Estos datos implican un papel clave de MKP1 en la regulación de la sensibilidad a cDDP de células sensibles de NSCLC a través de un incremento en sus niveles durante el proceso de desarrollo de resistencia al fármaco.

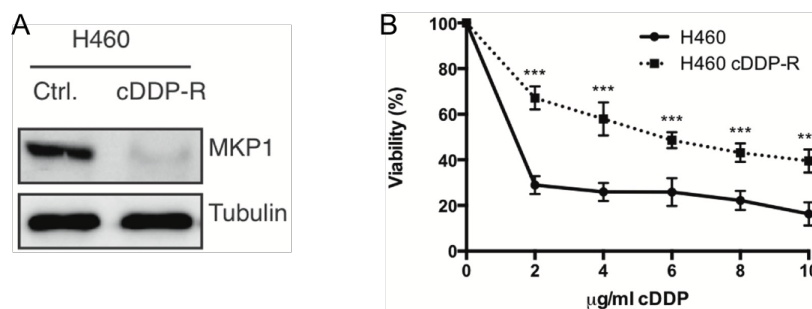


Figura 21. Células H460 resistentes por co-cultivo muestran menores niveles de MKP1. (A) Se evaluaron por western blot los niveles de proteína de MKP1 en células H460 resistentes por co-cultivo (cDDP-R) y H460 (Ctrl.) cargando 50 μg de LCT y controlando su carga con tubulina. Experimento representativo de tres independientes. (B) Viabilidad por cristal violeta de las células H460 y cDDP-R tratadas a las dosis indicadas de cDDP durante 48 horas. Aparecen representadas la media ± D.E. de tres experimentos independientes.

4.2.6 La expresión de E1A incrementa los niveles de proteína de MKP1 en NSCLC

Dado el papel de MKP1 en quimiosensibilidad a cDDP en NSCLC, se analizó la relación entre E1A y dicha fosfatasa en el panel de líneas celulares. Así, las cuatro líneas se infectaron con lentivirus portando pLesip E1A 13s o E.V. y se seleccionaron con puromicina. La expresión de E1A provocó un incremento en los niveles de MKP1 que resultó inversamente proporcional a de los niveles basales de cada línea celular. De éste modo, las células con una expresión mayor de MKP1 como H460 obtuvieron un incremento o prácticamente nulo de MKP1 al sobreexpresar E1A. Los niveles de p38 total y activado se evaluaron como control de la actividad fosfatasa de MKP1 (Fig. 22).

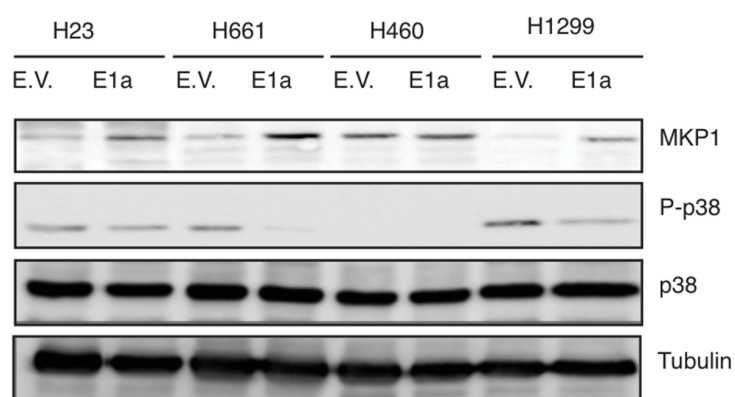


Figura 22. La expresión de E1A incrementa los niveles de proteína de MKP1 en NSCLC. Evaluación de los niveles de proteína de MKP1, P-p38 y p38 por western blot en el panel de líneas derivadas de NSCLC expresando E1A o E.V. usando 50 µg de LCT.

4.2.7 El incremento de MKP1 media la sensibilidad a cDDP provocada por E1a a través de p38 MAPK

A raíz de la correlación previa entre la expresión de E1A, la subida en los niveles de MKP1 y el efecto quimiosensibilizador observado en modelos celulares derivados de NSCLC, el papel del eje E1A-MKP1 en la quimiosensibilidad al cDDP en NSCLC había de ser esclarecido. Para ello se desarrolló un ensayo de interferencia de MKP1 en células H1299 transfectadas con la construcción pCDNA3 E1a 13s y seleccionadas con G418. Se seleccionó ésta línea celular por ser el modelo de NSCLC más resistente y donde el efecto sensibilizador de E1A es mayor dado el mayor incremento de MKP1. Se realizó un ensayo de interferencia por infección con lentivirus conteniendo shRNA MKP1 y se seleccionó con puromicina.

Resultados

La interferencia de MKP1 se evaluó a nivel de mRNA por qRT-PCR y a nivel de proteínas por western blot comprobando una interferencia efectiva (Fig. 23A y 23B). Los niveles de proteína totales y activos de ERK-1/2 y p38 se analizaron por western blot como prueba de la funcionalidad de MKP1, encontrándose que la interferencia de MKP1 era capaz de recuperar los niveles de activación basales de p-38 y ERK1/2 (Fig. 23B). A continuación, se analizó la viabilidad de las tres líneas celulares al cDDP observándose que la interferencia de MKP1 en las células con E1A prácticamente restauraba la resistencia natural de las células a la de los niveles de H1299 E.V. bloqueando la quimiosensibilidad inducida por E1A a cDDP (Fig. 23C).

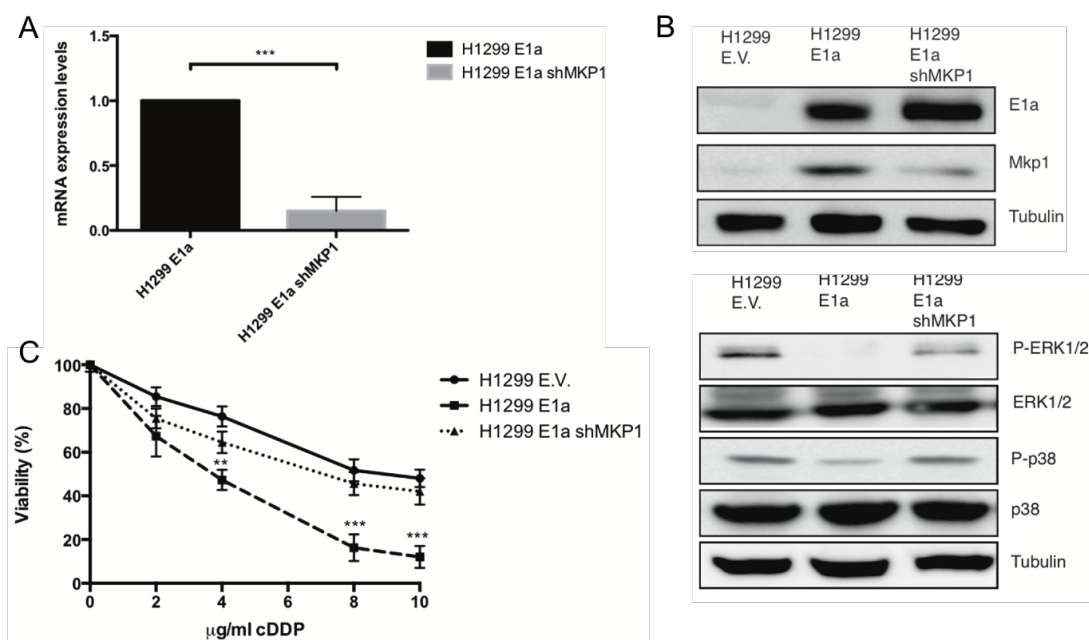


Figura 23. El incremento de MKP1 provocado por E1a media la sensibilidad asociada a cDDP. (A) La interferencia de MKP1 se evaluó por qRT-PCR partiendo de 1 µg de RNA total y referida a H1299 E1A. Datos calculados como la media \pm D.E. de tres experimentos independientes. (B) Análisis por western blot de los niveles de proteína de E1A, MKP1, P-ERK1/2, ERK-1/2, P-p38 y p38 en E.V., E1A y las células interferidas a partir de 50 µg de LCT y evaluando su control de carga por tubulina. Experimento representativo de tres. (C) Viabilidad por cristal violeta de las células H1299 E.V., E1A y E1A shMKP1 tratadas con las dosis indicadas de cDDP durante 48 horas. Se representa la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

Dado que tanto p38 como ERK1/2 se ven afectadas por el incremento de MKP1 provocado por E1A en el modelo experimental de H1299, se desarrolló un abordaje farmacológico para dilucidar cuál de las MAPK podría ser responsable de la quimiosensibilidad mediada por E1A. Para ello se trataron células H1299 E.V. y E1A tratados con SB203580, inhibidor selectivo de las isoformas p38 α y β (Cuenda et al. 1995); o PD98059 (Dudley et al. 1995), inhibidor selectivo de MEK1/2 y por tanto de la activación de ERK1/2, evaluándose la sensibilidad de estas células al cDDP.

Se encontró que la inhibición de ERK1/2 no modificaba significativamente la respuesta a cDDP, independientemente de la expresión de E1a. Sin embargo, la inhibición de p38 promueve un incremento en la sensibilidad de las células E.V. que no se observaba en las células con expresión de E1A (Fig. 24). Así pues, puede concluirse que la inhibición de p38 MAPK debida al incremento en los niveles de MKP1 es la mediadora del efecto quimiosensibilizante mediado por E1A en células de NSCLC.

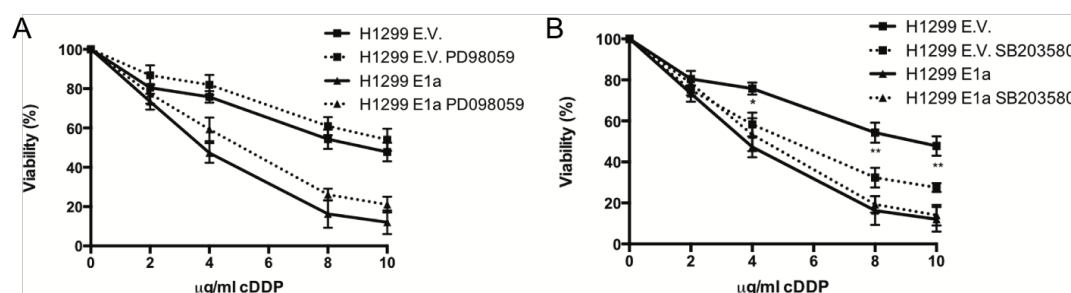


Figura 24. El incremento de MKP1 media la sensibilidad a cDDP asociada a E1a a través de p38 MAPK. (A) Viabilidad por cristal violeta de las células H1299 E.V y H1299 E1a tratadas a las dosis indicadas de cDDP durante 48 horas en presencia/ausencia de PD98059 10 µM. (B) Se siguió el mismo abordaje usando el inhibidor SB203580 a 10 µM. En ambas (A) y (B), los datos son la media ± D.E. de tres experimentos independientes.

4.3 E1A y el papel de su expresión *in vivo*

4.3.1 E1A es capaz de bloquear la tumorigénesis en un modelo de xenotransplante de HCT116 en ratones atímicos

Es conocido que E1A presenta un carácter dual en cáncer, tanto como oncogén como supresor tumoral en función de contexto (Frisch & Mymryk 2002). En un intento de demostrar el posible papel oncogénico o supresor tumoral de la expresión de E1A *in vivo*, células humanas de cáncer colorrectal HCT116 se infectaron con lentivirus portando pLesip E.V. o E1A 13s y se seleccionaron con puomicina. Los niveles de expresión de proteína E1A se confirmaron por western blot. Se evaluó la proliferación de ambas líneas celulares por MTT encontrando una replicación más rápida en las células con expresión de E1A. Asimismo, se sometió a éstas células a un ensayo de formación tumoral *in vivo* por inyección en ratones inmunodeprimidos BALB/c-Nude y se evaluó el volumen tumoral. A pesar de éste incremento en proliferación las células con expresión de E1A perdían su capacidad de desarrollar tumores cuando se inoculaban en el modelo de ratones inmunodeprimidos (Fig. 25).

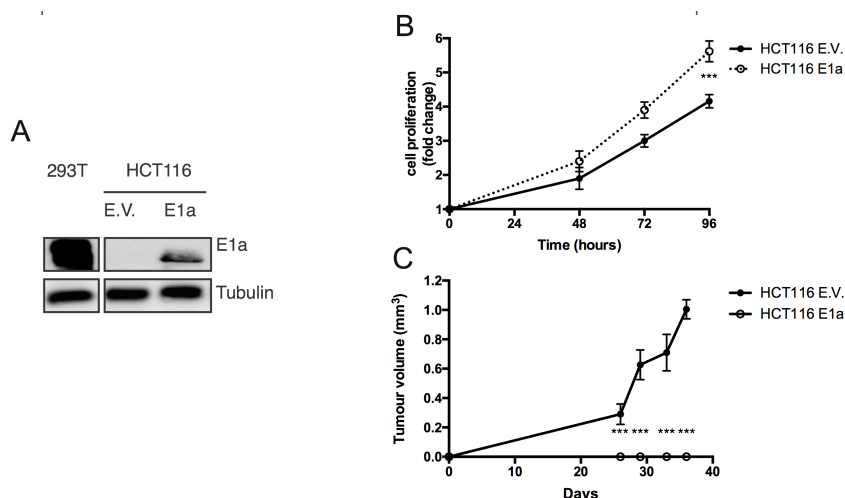


Figura 25. E1A es capaz de bloquear la tumorigénesis en un modelo de xenotransplante de HCT116 en ratones inmunodeprimidos. (A) Se comprobaron los niveles de expresión de E1A en células HCT116 E.V. o E1A por western blot usando 50 µg de LCT comprobándolos por tubulina. Se usaron células HEK293T como control positivo de la expresión de E1A. Experimento representativo de tres experimentos independientes. (B) Proliferación celular de ambas líneas analizada por MTT desde 0 a 96 horas. Datos representados como la media ± D.E. de tres experimentos independientes. (C) Volumen tumoral formado por células HCT116 E.V. o E1A al inyectar 5 millones de células por inyección subcutánea en seis ejemplares por cada grupo experimental. Se evaluó el volumen tumoral periódicamente hasta la eutanasia de los animales.

4.3.2 E1A es capaz de bloquear la tumorigénesis en un modelo singénico de células B16-F10 y ratones C57BL/6

En un intento de reproducir el efecto como supresor tumoral de E1A en un contexto inmunocompetente, se desarrolló un experimento similar usando el modelo singénico compuesto por la línea celular de melanoma murino B16-F10 y la cepa C57BL/6 de ratones de laboratorio. Las células B16-F10 se infectaron con lentivirus portadores de pLesip E.V. o E1A 13s y se seleccionaron con puromicina. Se llevó a cabo un western blot para confirmar la expresión de E1A. Además, se evaluó la proliferación de ambas líneas celulares por MTT encontrando de nuevo una replicación más rápida en aquellas células con expresión de E1A al igual que en HCT116. De la misma forma, la expresión de E1A en éstas células las privó de su capacidad de desarrollar tumores al inocularse por vía subcutánea en su modelo murino singénico, sugiriendo el papel supresor tumoral de E1A al expresarse *in vivo* (Fig. 26).

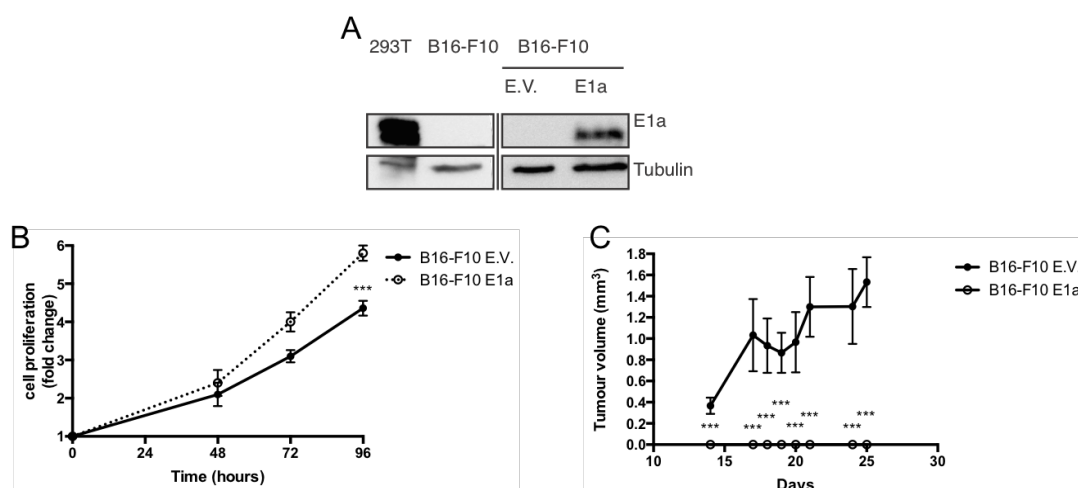


Figura 26. E1A es capaz de bloquear la tumorigénesis en un modelo singénico de células B16-F10 y ratones C57BL/6. (A) Los niveles de proteína de las células B16-F10 infectadas con pLesip E.V. o E1A se analizaron por western blot a partir de 50 μ g de L.C.T. y su carga se comprobó mediante tubulina. Se usaron células HEK293T como control positivo de la expresión de E1A. Experimento representativo de tres experimentos independientes. (B) Proliferación celular de ambas líneas analizada por MTT desde 0 a 96 horas. Datos representados como la media \pm D.E. de tres experimentos independientes. (C) Volumen tumoral de las lesiones producidas por la inyección subcutánea de 1 millón de células E.V. o E1A en seis ratones C57BL/6 por grupo experimental y medido a los tiempos indicados hasta la eutanasia de los animales.

4.3.3 La expresión de E1A en un modelo de ratón transgénico inducible y específico de piel no causa fenotipo deletéreo

Los datos anteriores indican el papel de E1A como supresor tumoral *in vivo* independientemente del contexto inmune. Sin embargo, era necesario dilucidar la seguridad de la expresión de E1A *in vivo* y su papel en la génesis tumoral para valorar su posible utilidad terapéutica. Por tanto se desarrolló un modelo de ratón transgénico inducible de tipo TetO7 y específico de piel, denominado cK5-rtTA/tet-E1A. En él, el gen *E1a* se expresa bajo un promotor TetO7 que sólo se expresa en presencia del elemento de respuesta a tetraciclina. Dicho elemento está codificado bajo el promotor de la citokeratina 5 (K5) y se induce sólo en presencia de tetraciclina o análogos al ser un sistema de tipo Tet-ON, permitiendo el control temporal y tisular de la expresión del transgén. Para la generación de éste modelo se cruzaron dos cepas transgénicas de fondo genético FVB/N, hembras tet-E1A portadoras del gen E1A y machos cK5-rtTA portadores del elemento de respuesta a tetraciclina.

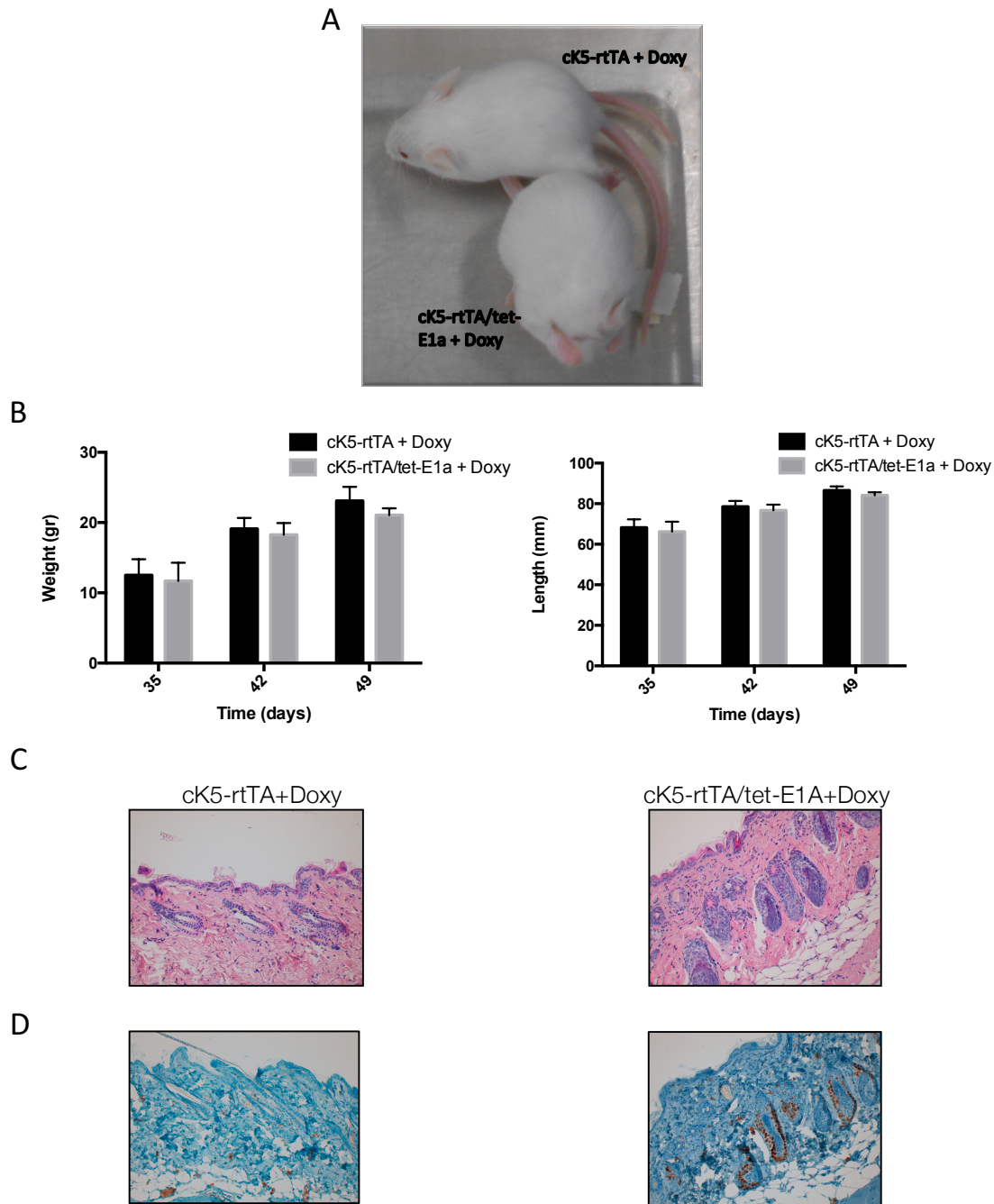


Figura 27. Análisis fenotípico de los animales transgénicos. (A) No se encontraron diferencias morfológicas entre los animales cK5-rtTA/tet-E1A+Doxy y cK5-rtTA+Doxy durante las siete primeras semanas de vida. (B) Tampoco se encontraron diferencias en el peso o talla entre ambas cepas. (C) El análisis histopatológico de la piel reveló ausencia de diferencias en cuanto al espesor de la epidermis, caracteres morfológicos o densidad de bulbos capilares. (D) La expresión de E1A fue claramente detectada mediante análisis inmunohistoquímico en los animales cK5-rtTA/tet-E1A+Doxy e indetectable en los animales cK5-rtTA+Doxy.

Se llevó a cabo el análisis fenotípico de dos grupos experimentales de animales alimentados con pienso con doxiciclina tras el nacimiento, el grupo problema denominado cK5-rtTA/tet-E1A+Doxy y su grupo control denominado cK5-rtTA+Doxy hasta las siete semanas de vida. No se pudo apreciar diferencia alguna en cuanto a la morfología general de los animales, su peso, longitud, grosor de la epidermis o densidad de bulbos capilares en la piel de estos animales. El análisis inmunohistoquímico reveló una buena expresión de E1A en la capa basal de la epidermis y especialmente en el bulbo piloso como se esperaba (Fig. 27).

4.3.4 La expresión de E1A reduce el tamaño y cantidad de las lesiones inducidas por carcinogénesis química en la piel

Para evaluar el papel de la expresión de E1A durante la génesis tumoral, se desarrolló un abordaje de carcinogénesis de animales cK5-rtTA/tet-E1A comparados con ratones cK5-rtTA como control, ambos alimentados con doxiciclina desde el nacimiento y compuesto por cuatro ratones por grupo. Se expusieron a carcinogénesis química por DMBA/TPA y la cantidad y el tamaño de las lesiones originadas se evaluó dos veces por semana. Tras 30 semanas, se llevó a cabo la eutanasia de los animales y se tomaron biopsias de piel para el análisis histopatológico y de la expresión de E1A. Los animales con expresión de E1A desarrollaron menos lesiones y más pequeñas que los animales control (Fig. 28). En vista de estos resultados puede concluirse que E1A actúa como un supresor tumoral al expresarse *in vivo* en este modelo de carcinogénesis química en piel. Esta evidencia concuerda, a su vez, con los datos obtenidos en xenotransplante, poniendo de manifiesto la potencia de su efecto antitumoral y abriendo la puerta a su futuro uso terapéutico.

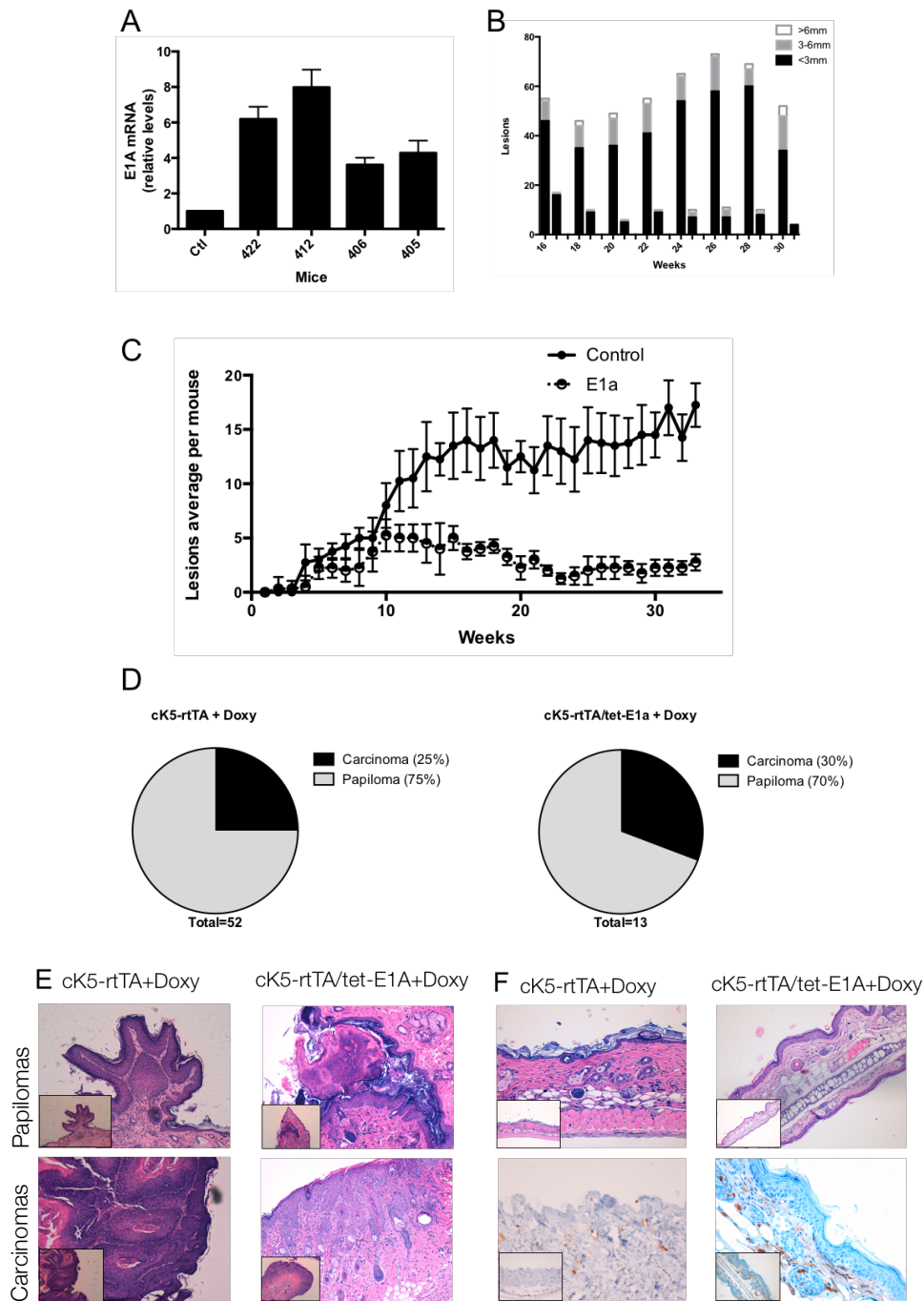


Figura 28. E1A actúa como supresor tumoral en el contexto de carcinogénesis química DMBA-TPA. (A) Niveles del mRNA de E1A medidos en la piel de los animales cK5-rtTA/tet-E1A+Doxy a tiempo final del experimento, y referidos a un control de tejido muscular murino. (B) Promedio de lesiones por ratón de los grupos cK5-rtTA+Doxy (izquierda) y cK5-rtTA/tet-E1A+Doxy (derecha) y durante el transcurso del ensayo de carcinogénesis. (C) Clasificación de tamaño de las lesiones por ratón de los grupos cK5-rtTA/tet-E1A+Doxy y cK5-rtTA+Doxy durante el transcurso del ensayo de carcinogénesis. (D) Porcentaje de lesiones clasificadas anatomopatológicamente como papilomas o carcinomas a tiempo final del ensayo de carcinogénesis. (E) Imágenes representativas de lesiones papilomatosas y carcinomatosas teñidas con hematoxilina/eosina de individuos cK5-rtTA+Doxy y cK5-rtTA/tet-E1A+Doxy. (F) Imágenes representativas de pieles teñidas con hematoxilina/eosina o inmunohistoquímica frente a E1A de individuos cK5-rtTA+Doxy y cK5-rtTA/tet-E1A+Doxy.

Discusión

El cáncer es uno de los principales problemas de salud humana aún en el siglo XXI, siendo responsable de una importante cantidad de muertes cada año (GLOBOCAN, 2012). El conjunto de tratamientos tradicionales de cáncer ha demostrado no ser suficiente para remitir o incluso detener la progresión de la enfermedad en ciertos tipos de pacientes. Ésta situación es especialmente grave en ciertos tipos de tumores como el cáncer de páncreas o el glioblastoma cuya esperanza de vida sigue siendo muy reducida (GLOBOCAN, 2012). La heterogeneidad de las células tumorales, tanto entre pacientes como dentro de cada tumor, es uno de los aspectos más limitantes a la hora de encontrar tratamientos efectivos contra ésta enfermedad (V. M. Howell 2015). Dado que el conjunto de mutaciones que portan las células tumorales no es el mismo, no todas responden por igual a los tratamientos. Incluso en los tumores más sensibles a cierto fármaco existe una subpoblación de células resistentes al mismo que acaban por proliferar y continuar con la progresión de la enfermedad.

Dada ésta situación se hace necesario el desarrollo de técnicas que permitan la caracterización exacta del tumor, así como nuevas terapias que permitan eliminar las células tumorales siguiendo nuevas estrategias. Abordajes como educar al sistema inmune para que sea capaz de eliminarlas por sí solo, como en el caso de algunos tipos de inmunoterapia, pueden suponer un importante avance en la clínica del cáncer. Así mismo, mecanismos como inhibir las rutas clave de señalización tumoral con inhibidores específicos o bloquear la expresión de oncogenes y potenciar la de genes supresores de tumores en el interior de las células tumorales podrían ser de gran utilidad. Estos procedimientos permitirían revertir el proceso de transformación tumoral y acabar provocando la muerte celular en los tumores a través de procesos biológicos como la apoptosis o la autofagia.

En éste contexto el gen *E1a* y su producto se ha propuesto como un firme candidato a su utilización como terapia génica dadas sus propiedades biológicas. E1A ha sido una proteína ampliamente estudiada desde que comenzara su caracterización en 1977 (Ishibashi et al. 1977). Muy pronto se encontró que E1A era capaz de transformar, de forma incompleta, líneas celulares *in vitro* (Shiroki et al. 1981) y se asumió su papel oncogénico dada su capacidad de colaborar en la transformación celular junto con potentes oncogenes como Ras (Pulciani et al. 1985). Sin embargo, pronto comenzaron a aflorar otras propiedades que podrían ser interesantes de cara a su uso en terapia. E1A posee propiedades que le hacen comportarse como un

supresor tumoral (Frisch 1991; Chinnadurai 1992). En el caso de los adenovirus oncolíticos, E1A posee la capacidad de incrementar los fenómenos de muerte en las células transformadas que lo expresan a través de mecanismos como la inducción de apoptosis (J. Deng et al. 1998) o de la autofagia (Tazawa, Kagawa & Fujiwara 2013a) haciéndolo un elemento clave en el diseño de adenovirus oncolíticos (Wei, Wang, Chen, Li & Huang 2014a). Esta capacidad de promover la muerte celular le ha hecho, además, un agente especialmente prometedor como cotratamiento con terapias tradicionales, siendo capaz de promover la quimio y radiosensibilización de muchos modelos celulares (para revisión ver (Y.-W. Chang et al. 2014)).

Todas éstas propiedades sitúan a E1A como candidato claro para un ensayo clínico como agente terapéutico. Por tanto, de cara a éste uso, algunas cuestiones deben ser aclaradas previamente. ¿Es E1A realmente capaz de sensibilizar modelos fuertemente radioresistentes y de mal pronóstico como el glioblastoma? ¿Es capaz de conferir quimiosensibilidad a aquellas células tumorales refractarias al tratamiento con cisplatino como en modelos de NSCLC? Y si esto es así, ¿mediante qué mecanismos? La respuesta a éstas preguntas sería suficiente para el uso de E1A como adyuvante terapéutico permitiendo sensibilizar tumores refractarios. Pero, de cara a su uso en terapia, ¿es seguro E1A? ¿Puede la expresión de E1A *in vivo*, lo que mimetizaría un posible escenario de uso en terapia génica, conllevar la transformación de células sanas y provocar el desarrollo de nuevas hiperplasias? Y si E1A resulta ser un gen seguro, ¿puede que sus propiedades supresoras tumorales ayuden a combatir la aparición de tumores? En este escenario, si E1A es capaz de reducir la aparición de tumores, podría usarse como un gen profiláctico con aplicación preventiva o incluso un fármaco *per sé* para el tratamiento de tumores. El presente trabajo trata de dar respuesta a todas éstas preguntas que, durante décadas, han rodeado el estudio de E1A y su hipotético uso como terapia.

En referencia a la primera de las preguntas, el glioblastoma es uno de los tipos tumorales más virulentos, así como el más común de los tumores del sistema nervioso central que se diagnostican cada año en la práctica clínica (GLOBOCAN, 2012). Desgraciadamente, la esperanza de vida de los pacientes de glioblastoma ronda los doce meses y su terapia está basada en una combinación de cirugía, quimioterapia y radioterapia (Hau et al. 2016). Dada las especiales condiciones que se dan en el cerebro, la radioterapia es el mejor tratamiento teórico. Esto es así dado que se puede concentrar en el tumor el efecto tóxico de la radiación sin tener que alterar el tejido colindante a diferencias de lo que ocurre en la cirugía. La radioterapia evita, además, la pérdida de eficacia de la quimioterapia debida a la barrera hematoencefálica. Desafortunadamente, los glioblastomas han demostrado una acusada radioresistencia

(Noda et al. 2009) por lo que éste abordaje terapéutico ve reducida su efectividad y hace necesario comprender mejor el mecanismo por el que las células son resistentes a la radiación y encontrar un modo de sensibilizarlas de forma inocua para el tejido colindante, lo que incrementaría de forma considerable su efectividad.

Dado el potencial de E1A como agente radiosensibilizador, se evaluó si éste gen adenoviral era capaz de inducir radiosensibilidad en dos modelos celulares de glioblastoma como U87MG y T98G con alta radioresistencia (Otomo et al. 2004). Ambas líneas celulares se comportaron de forma similar con una acusada radiosensibilidad al expresar E1A, a pesar de portar diferentes mutaciones implicadas en la respuesta a radiación como p53 y PI3K/AKT en el caso de T98G (Mercer et al. 1990) y PTEN en el de U87MG (Otomo et al. 2004). Estos resultados fueron extrapolados a su vez a otras dos líneas celulares de glioblastoma como LN-405 y A172. Estas observaciones dan una idea del carácter universal de éste fenómeno de radiosensibilización mediada por E1A en glioblastoma, permitiendo empezar a considerarlo como una de las herramientas terapéuticas a ensayar para su tratamiento. De hecho, los adenovirus oncolíticos, en los que el papel de E1A es clave a la hora de conferir toxicidad a las células tumorales que infectan (Wei, Wang, Chen, Li & Huang 2014b), son uno de los nuevos abordajes terapéuticos más estudiados para el tratamiento del glioblastoma (Toucheffeu et al. 2011) y podrían beneficiarse de una radiosensibilización no esperada *a priori* en las células que consigan resistir la lisis tras la infección, incrementando su eficacia terapéutica en el caso de aquellos que contienen E1A.

En cuanto al mecanismo molecular a través del cual E1A es capaz de mediar éste efecto, el estudio del ciclo celular fue clave a la hora de elegir un posible efector (Pawlik & Keyomarsi 2004). Las células con expresión de E1A mostraban un claro acúmulo en las fases G2/M del ciclo celular, las cuales son típicamente radiosensibles (Busse et al. 1978) dados los mecanismos de control de la integridad del DNA que se producen en ésta etapa. La distribución del ciclo celular en estas células es peculiar ya que la acumulación en fase G2/M se mantiene alta hasta momentos tardíos post-tratamiento. Ésta distribución característica ha demostrado ser independiente de ATM en trabajos previos (Xu et al. 2002), por lo que el foco se centró en ATR y sus sustratos como candidatos a mediar el bloqueo en G2/M debido a E1A. El eje de señalización compuesto por ATR y Chk1 se ha demostrado capaz de promover el arresto celular en G2/M (Yarden et al. 2002; Kaneko et al. 1999) sugiriéndolo como un posible mediador del efecto mediado por E1A.

Así pues, se evaluó el cambio en la expresión de Chk1 producido por E1A en el modelo experimental, obteniendo un incremento en los niveles de proteína total y fosforilada y en el RNA, sugiriendo una regulación a nivel transcripcional. No es la primera vez que se describe una alteración de los niveles de Chk1 a causa de la infección adenoviral ya que se ha descrito que durante éste proceso la desregulación del ciclo celular por parte de E1A dispara el eje de señalización ATR-Chk1 (Connell et al. 2011). Si bien ésta observación concuerda con los resultados aquí descritos, en el contexto de éste trabajo la acción de E1A se ejerce sin el resto de los genes adenovirales como *E1b* por lo que no son completamente asimilables. Además se han descrito multitud de mecanismos que regulan la activación de Chk1 (Y. Zhang & Hunter 2013) por lo que se trata de una interacción compleja y que requiere un estudio en profundidad.

En este sentido, se profundizó en el eje E1A-Chk1 para tratar de encontrar cómo la proteína adenoviral era capaz de incrementar la transcripción y activación de Chk1. Como se ha tratado con anterioridad, c-Myc es un potente regulador del ciclo celular a través de los transcritos que regula y una diana bien establecida de E1A mediante su estabilización (Tworkowski et al. 2008) con un papel clave en muchos de los efectos biológicos que se le adjudican (Chakraborty & Tansey 2009). Así, mutantes de E1A incapaces de unirse a p400 (como el mutante de delección $\Delta 26-35$) y por tanto incapaces de estabilizar c-Myc carecen de la capacidad de sensibilizar frente a quimioterápicos que actúan mediante daño al DNA como la doxorubicina (Samuelson et al. 2005). A su vez, c-Myc es capaz de controlar la expresión de Chk1 como se ha descrito en diferentes estudios (Höglund et al. 2011; W.-J. Wang et al. 2013) por lo que parece un candidato ideal para ser el mediador entre E1A y Chk1 y promover el incremento de éste último.

c-Myc es capaz de promover una situación de estrés replicativo en las células donde se sobrepresa (Rohban & Campaner 2015). Dicho estrés se origina en situaciones donde la replicación del DNA es aberrante, provocando horquillas de replicación desapareadas que deben ser reparadas antes de continuar con el proceso (Zeman & Cimprich 2013; Mazouzi et al. 2014). Ésta situación podría estar relacionada con un incremento en la radiosensibilidad a través de E1A. Sin embargo, se ha demostrado que c-Myc está implicado en la radioresistencia de células madre derivadas de carcinoma nasofaríngeo a través de la sobreexpresión de Chk1 y 2 (W.-J. Wang et al. 2013). Ésta aparente contradicción indicaría que la implicación del eje c-Myc y Chk1 en respuesta a radiación sería dependiente del contexto celular y el fondo genético en que se da.

En este trabajo se describe cómo c-Myc controla los niveles de Chk1 en las células con expresión de E1A, de ahí que su interferencia disminuya los niveles de Chk1. Además, la interferencia de c-Myc es suficiente para revertir casi totalmente el efecto sobre el ciclo celular, mientras que la interferencia de Chk1 *per se* ejerce un efecto más modesto como ya se ha descrito en estudios previos (Gagou et al. 2010). Chk1 podría estar mediando la supervivencia de las células afectadas por el estrés replicativo mediado por c-Myc, como se ha descrito en distintos contextos como melanomas (Brooks et al. 2013) y tumorigénesis producidas por c-Myc (Murga et al. 2011). La estabilización de c-Myc sería pues el evento clave en la radiosensibilidad mediada por E1A. Esta situación es consistente con un escenario de estrés replicativo por E1A mediado por c-Myc en consonancia con la replicación aberrante y la activación de la respuesta de daño al DNA desencadenada por c-Myc en un contexto sin p300 (Sankar et al. 2009).

Aún con todo esto, hay otras posibilidades que merecen ser exploradas de cara al futuro. Una reducción en la duración de la fase G1 del ciclo celular también sería consistente con un patrón de radiosensibilización mediado por E1A como ocurre en el caso de las células quiescentes a través de potentes reguladores del ciclo como c-Myc o pRb (Baluchamy et al. 2007) mediante sus respectivos mecanismos específicos. En el caso de c-Myc, trascendente en este modelo experimental, este mecanismo consiste en la unión de E1A al dominio C-terminal de p300 impidiendo así que este reprima a c-Myc (Kadeppagari et al. 2009).

En definitiva, los resultados expuestos previamente permiten deducir un modelo general, al menos para el caso de los glioblastomas, aunque podría ser extrapolable a otros modelos celulares en futuros ensayos. En éste modelo, la expresión de E1A estabiliza los niveles de proteína de c-Myc, el cual es responsable de inducir en las células una situación de estrés replicativo haciéndolas mucho más susceptibles al daño producido por la radiación. c-Myc incrementa la transcripción y activación de Chk1 además de promover una acusada situación de daño al DNA como se puede comprobar con el marcaje de histona H2AX en unos resultados no mostrados en el presente trabajo (Valero et al. 2014). Estos efectos ejercidos por c-Myc acaban por inducir la muerte celular en células sometidas a daño al DNA como el daño disparado por radiación ionizante. Éstos resultados aportan un nuevo mecanismo de radiosensibilización mediado por E1A que se añade a los ya existentes, siendo así un potencial agente terapéutico en modelos tumorales refractarios a la

radiación como el glioblastoma y, muy probablemente, en otros tipos tumorales que presenten radioresistencia.

Haber esclarecido un nuevo mecanismo por el cual E1A puede sensibilizar modelos celulares tan resistentes a la radiación (Fig. 29) permitirá con el tiempo no sólo su uso clínico como agente sensibilizador a radiación, sino la evaluación de los componentes de éste eje de señalización como factor pronóstico de respuesta a radiación de pacientes de ésta y otras patologías. De cara al futuro, queda abierta la posibilidad de comprobar e implementar éstos resultados en la práctica clínica y comprobar cómo de extrapolables son en otros contextos celulares y patologías.

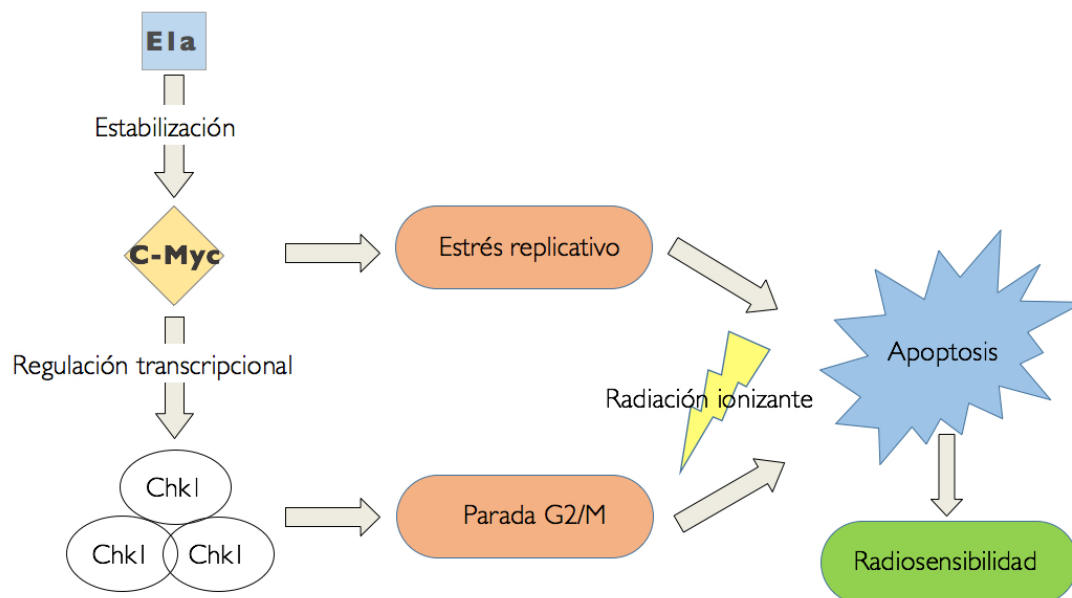


Figura 29. Modelo de mecanismo de inducción de radiosensibilidad por E1A en líneas celulares derivadas de glioblastoma.

Las propiedades sensibilizantes de E1A no se restringen sólo a la radiación. E1A se ha demostrado capaz, como ya se ha indicado, de sensibilizar en distinto grado frente a diferentes quimioterápicos que van desde la doxorubicina al paclitaxel (Sanchez-Prieto et al. 1996; Brader et al. 1997; Y.-W. Chang et al. 2014). Dada la diversidad de fármacos frente a los que actúa, los mecanismos de acción de E1A en éste contexto también son múltiples. Una molécula clave para la inducción de quimiosensibilidad mediada por E1a es p53, a la que estabiliza (de Stanchina et al. 1998) a través de su unión a Mdm4 y la inhibición de Mdm2, disminuyendo su exportación nuclear (Zheng Li et al. 2004) y degradación por el proteosoma (Kubbutat et al. 1997; Haupt et al. 1997); aunque el mecanismo de inducción de

sensibilidad también puede ser p53 independiente (Sanchez-Prieto et al. 1995). En otras ocasiones, E1A media su efecto sensibilizador a través del bloqueo de la vía de PI3K/AKT (Guinea Viniegra et al. 2002; Liao & Hung 2003c), su acción sobre supresores tumorales como p19ARF (de Stanchina et al. 1998) o pRb (Samuelson & Lowe 1997) o la inducción de proteínas proapoptóticas como Bax o Caspasa 9 (McCurrach et al. 1997; Ueno, 2000b; Pützer et al. 2000) que favorecerían la inducción de apoptosis en presencia de los fármacos. La inducción de muerte celular a través de mecanismos como la apoptosis o incluso la autofagia (Tazawa, Kagawa & Fujiwara 2013b) puede ser, sin duda, la base del efecto quimiosensibilizador de E1A.

Además, E1A puede ejercer sus funciones biológicas a través de la interacción con las vías de señalización de las MAPKs. Así, E1A interfiere con la vía de p38 MAPK a través de la fosfatasa PP2A en respuesta a distintos estímulos entre los que se encuentra la radiación ultravioleta o quimioterápicos como adriamicina o gemcitabina (Liao & Hung 2003c; Liao & Hung 2004). De igual modo, E1a puede afectar a la vía de JNK a través de su acción en las enzimas por encima de la GTPasa Rac1 en la ruta como MKK4 o MKK7 sin alterar sus patrones de transcripción (Romanov et al. 2014). Además, E1A es capaz de bloquear la activación de otra vía clave de las MAPKs al evitar la activación de ERK1/2 en fibroblastos en presencia de v-H-Ras a través del incremento en los niveles de MKP1, fosfatasa nuclear de las MAPKs, y permitiendo así escapar de una situación de OIS (Callejas-Valera, 2008). Ésta relación de E1A con MKP1 y su efecto sobre las cascadas de señalización de las MAPKs podrían ejercer un papel clave en la sensibilización de distintos linajes celulares a la quimioterapia, dado el papel clave que juegan las MAPKs en fenómenos de respuesta a dicha terapia (Dhillon et al. 2007).

Para estudiar la quimiosensibilidad al cDDP mediada por E1A, los fenómenos de muerte celular asociados o las posibles MAPKs implicadas, el NSCLC es un modelo idóneo. En ésta patología los compuestos derivados de platino, entre los que destaca el cDDP, constituyen el tratamiento de primera línea; a pesar de lo cual existe una alta tasa de pacientes refractarios a la misma (Mountzios et al. 2010). En un intento por contrarrestar dicha resistencia, se están desarrollando diferentes estrategias. Un ejemplo es el uso de glitazonas, agonistas de los receptores proliferadores de peroxisomas gamma que modulan la expresión de genes que regulan el equilibrio glucémico, lipídico, y el estado proinflamatorio (Girnun et al. 2007) (Girnun et al. 2008; Giaginis et al. 2012). También se han usado queladores de cobre que incrementan la absorción de los compuestos de platino por parte de las células (Ishida et al. 2010). Además, las MAPKs poseen un papel fundamental en el desarrollo de NSCLC, pues un incremento en su actividad posee una fuerte correlación con un

peor pronóstico en ésta patología (Fang & Richardson 2005; Lochhead et al. 2012), lo que concuerda con la correlación inversa en lo que a MKP1 se refiere. Así, altos niveles de MKP1 conllevan un mejor pronóstico en cáncer de pulmón (Vicent et al. 2004) dado su papel clave en la inhibición de las rutas de las MAPK (C.-Y. Huang & Tan 2012).

En vista de dichas características, se seleccionó un panel de líneas celulares derivadas de NSCLC con un fondo genético y una tolerancia al cDDP diferente, con el objetivo de intentar esclarecer los mediadores moleculares de dicha resistencia y como E1A podría ser capaz de modularlos. Como se ha demostrado, la resistencia de dichas líneas al tratamiento con cDDP correlaciona con los niveles de la fosfatasa MKP1, de forma que las células más sensibles son aquellas con niveles más altos de expresión de dicha fosfatasa. MKP1 ya ha sido considerado como un buen biomarcador de respuesta en distintos tumores (Denkert et al. 2002; Vicent et al. 2004). Ésta fosfatasa es, a su vez, el mecanismo molecular por el cual E1A es capaz de ejercer su papel como quimiosensibilizador en un nuevo modelo, como el NSCLC, donde no había sido todavía descrito, a diferencia de otros en lo que su papel sensibilizador ya se encontraba bien establecido como en el caso del carcinoma de célula escamosa o el cáncer de ovario (Sanchez-Prieto et al. 1996; Brader et al. 1997). Estos datos permiten reforzar el carácter universal como quimiosensibilizador de E1A independientemente del contexto tisular en el que se encuentre y en una amplia variedad de células con diferentes patrones de expresión génica como en el caso del panel celular utilizado (Blanco et al. 2009).

En éste sentido, las líneas seleccionadas para configurar el panel de estudio son representativas de diferentes mutaciones clave en la tumorigénesis en pulmón y en la respuesta a la quimioterapia con cDDP. Así, la línea más resistente de todas las utilizadas, H1299, posee una delección parcial en el locus que codifica para el supresor tumoral p53, careciendo de su expresión (J. Y. Chen et al. 1993). p53 se ha considerado en las últimas décadas como uno de los genes maestros que controlan la respuesta a cDDP en multitud de modelos celulares como NSCLC (Rusch et al. 1995), llegando a ser considerado un biomarcador de resistencia a cDDP en la práctica clínica (Mandic et al. 2005; Tsao et al. 2007; Perrone et al. 2010). Dado que E1A es capaz de sensibilizar células H1299, con una delección de gen p53 (Lai et al. 2000), éste efecto quimiosensibilizante es p53 independiente. Esto lo haría aplicable a más del 50% del total de tumores humanos y da una idea del gran potencial del uso de E1A en la terapia basada en derivados de platino.

Por otra parte, K-RAS es otra de las proteínas clave en la tumorigénesis del NSCLC (Aviel-Ronen et al. 2006), provocando un incremento en la resistencia a cDDP (Sklar 1988). Esta proteína parece no estar implicada en la mediación de los efectos de E1A según se deduce de los datos obtenidos de la línea celular H23 dada su mutación en dicho gen (Yoon et al. 2010). El efecto de E1A en un panel celular con alteraciones tan diversas permite asegurar su carácter como quimiosensibilizador universal en NSCLC y cuyo efecto podría ser especialmente útil en aquellos modelos con alteraciones en genes clave que conlleven quimioresistencia.

Volviendo a MKP1, los datos obtenidos demuestran su papel clave en la resistencia a cDDP. La correlación entre bajos niveles de expresión de dicha fosfatasa y una resistencia intrínseca a cDDP contrastan con las evidencias previas que sugerían la modulación a la baja de los niveles de MKP1 como un mecanismo para inducir sensibilidad a quimioterápicos en NSCLC (Sánchez-Pérez et al. 2000; J. Wang et al. 2009; Z. Wang et al. 2006; Chattopadhyay et al. 2006). Sin embargo, los datos obtenidos en éste trabajo refuerzan su efecto sensibilizador al encontrarse menores niveles endógenos de MKP1 en las células H460 con resistencia adquirida por cocultivo así como el efecto de la interferencia en dicha línea, que las hace más resistentes. Más aún, la interferencia de MKP1 en las H1299 con expresión de E1A revierte su efecto quimiosensibilizador, manifestando su papel como mediador de dicho proceso.

Es cierto, sin embargo, que E1A no sólo afecta a MKP1 y que la interacción con otras vías de señalización como la de PI3K/AKT podría estar implicada en la sensibilización a cDDP de las líneas celulares por E1A (Guinea Viniegra et al. 2002). En éste sentido es conveniente recordar que son las MAPKs los sustratos naturales de MKP1 y de hecho los datos obtenidos señalan a una de ellas, p38 MAPK, como efectora del papel quimiosensibilizador de E1A. En este sentido, ya se había descrito la influencia de E1A en el eje de señalización de p38 y concretamente en relación con la respuesta a cDDP u otros quimioterápicos (Liao & Hung 2003a; Liao & Hung 2004) y se ha confirmado recientemente el hecho de que la inhibición de p38 es capaz de promover la sensibilidad a cDDP (Pereira et al. 2013) lo que concuerda con los datos obtenidos en el contexto de E1A. Así pues, y dados los resultados obtenidos, el efecto quimiosensibilizador de E1A se debería a la regulación de p38. Otras vías de señalización de MAPKs parecen no estar implicadas en el efecto quimiosensibilizador de E1A, como es el caso de ERK1/2, a pesar de que se sabe que dicha vía es diana del gen adenoviral (Bartholomeusz et al. 2005) (Callejas-Valera, 2008) y puede regular la respuesta a cDDP (X. Wang et al. 2000; D.-W. Wu et al. 2014).

Más allá del eje de señalización E1A-MKP1-p38, podrían existir otros mecanismos implicados en la quimiosensibilización mediada por E1A. Por ejemplo, es notorio el papel quimiosensibilizante de NF-kB (Yiwei Li et al. 2005; Ruan et al. 2006) y el hecho de que su activación correlaciona con un fenotipo resistente (S.-F. Yang et al. 2015). Además, el eje de señalización de NF-kB es también diana de E1A como se ha descrito en (Shao et al. 1997) y se ha descubierto recientemente una correlación inversa entre la expresión de MKP1 y la actividad de NF-kB (Gil-Araujo et al. 2014). Más aún, existen otros mecanismos regulados por NF-kB que correlacionarían con una situación como ésta, como la desregulación de RIP1 y su efecto en la inhibición del miR-940 (Q. Wang et al. 2014), lo que sería especialmente plausible dada la influencia que la expresión de E1A ejerce sobre una MAPK clave en la vía de NF-kB como es JNK (Romanov et al. 2014). Todas estas observaciones encajarían con el modelo propuesto de sensibilización mediada por E1A. De hecho, un incremento en los niveles de MKP1 se considera crítico en nuevos abordajes terapéuticos en otros contextos, como en el caso de las carcinogénesis disparada por K-Ras y la γ -secretasa en pulmón. En éste caso, la inhibición de γ -secretasa permite la activación de MKP1 que puede bloquear así a ERK1/2 para ejercer su función terapéutica (Maraver et al. 2012).

De los datos obtenidos es importante remarcar no sólo la vía de señalización de MAPKs por la cual E1A es capaz de ejercer su efecto quimiosensibilizante al cDDP, sino que el mecanismo de muerte celular por el que lo hace es igualmente clave. En el presente trabajo se ha encontrado que E1A es capaz de incrementar la sensibilidad a cDDP a través de un incremento en la apoptosis. Éste incremento, típico de situaciones en las que E1A ejerce un efecto sensibilizador, como en el caso de la radiación (Sanchez-Prieto et al. 1995), correlaciona en ésta ocasión con el bloqueo de la respuesta autofágica en las células que expresan dicho gen adenoviral. Se ha descrito como la autofagia puede usarse por las células tumorales como un mecanismo de respuesta y resistencia a quimioterápicos como el cDDP (Kaminsky et al. 2012; García-Cano et al. 2015), por lo que su bloqueo podría ayudar a eliminar dichos fenómenos de resistencia. Así, según los datos obtenidos, E1A sería un nuevo modulador del incremento en el flujo autofágico, promoviendo una fuerte autofagia basal. Esto provocaría la incapacidad de las células que lo expresan de inducir autofagia en respuesta al cDDP, lo que desencadenaría en la inducción de apoptosis. Éste efecto sería particularmente importante en las células resistentes como las H1299 al permitir sensibilizarlas por inducción de apoptosis.

Si bien se ha descrito que la expresión de ciertas regiones del genoma de los adenovirus en infecciones pueden inducir autofagia, hasta ahora se consideraba necesaria la expresión de ambos genes tempranos, *E1a* y *E1b* para la inducción de autofagia (Rodríguez-Rocha et al. 2011). Los datos presentados demuestran, sin embargo, que la expresión exclusiva de *E1A* es suficiente para promover un incremento en el flujo autofágico reflejado en un incremento en los niveles de proteína de LC3-II y un descenso en los de p62; así como la insensibilidad en respuesta a cloroquina. Es ésta saturación del flujo autofágico basal la que impediría desencadenar la respuesta autofágica al cDDP en un modelo resistente como H1299. El mecanismo por el que se produce, sin embargo, no está claro y requiere una investigación más en profundidad.

En definitiva, los datos presentados evidencian el potencial quimiosensibilizador de *E1A* en NSCLC a través del incremento en los niveles de MKP1 y su efecto sobre la activación de p38 MAPK. Esta situación produce una fuerte inducción de la autofagia basal, impidiendo la respuesta autofágica típica de las líneas celulares al cDDP y desembocando en la inducción de apoptosis (Fig. 30). Este efecto es independiente del estatus de genes clave para el desarrollo de NSCLC como K-Ras o p53, como demuestra su efecto sobre todas las células del panel analizado. Así pues, se abre la puerta al uso terapéutico del gen *E1A* en NSCLC, especialmente en tumores refractarios a la quimioterapia, así como en otros modelos tumorales que presenten características similares.

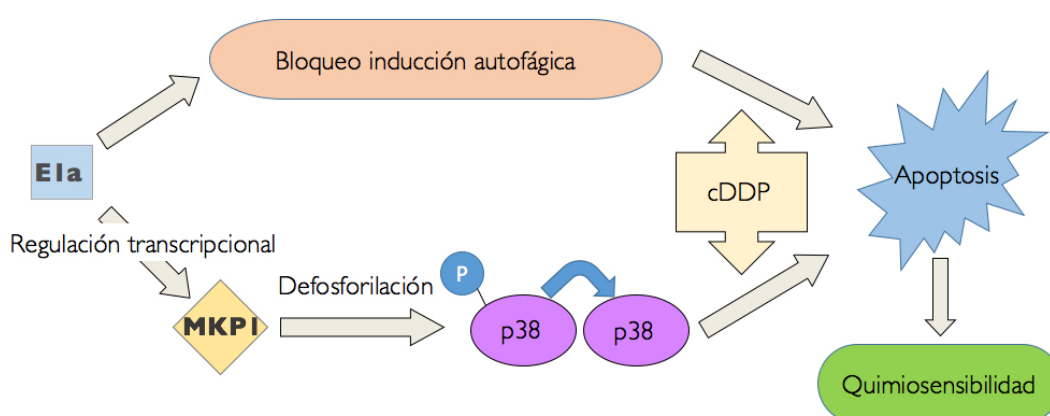


Figura 30. Modelo de mecanismo de inducción de quimiosensibilidad por *E1A* en líneas celulares derivadas de NSCLC.

Más allá de su papel como sensibilizante frente a quimio y radioterapia, E1A puede presentar un potencial terapéutico *per se* basado en las propiedades como supresor tumoral que han sido observadas con anterioridad. De hecho, se ha demostrado un descenso de la tumorigenicidad de diferentes líneas de tumores (Bartholomeusz et al. 2005; Frisch 1991). Los datos obtenidos en las líneas celulares HCT116, derivada de carcinoma colorrectal humano y B16-F10, derivada de melanoma murino, indican que E1A es capaz de suprimir su capacidad de formar tumores al inyectarse por vía subcutánea en ensayos de xenotransplante. Además, lo hace de forma independiente del estatus del sistema inmune de los animales inoculados como demuestran los datos obtenidos del modelo singénico. Ésta característica, unida a la diversidad de fondo genético de ambas líneas, indicaría un carácter supresor tumoral universal e intrínseco a la expresión de E1A con independencia de contexto. Estos datos en modelos no testados previamente se unen al conjunto de ensayos de formación de tumores con xenotransplantes ya existentes, siguiendo la misma tendencia de la función antitumoral de E1A *in vivo*. Dado que esos experimentos no se habían llevado a cabo en modelos singénicos hasta la fecha, estos resultados son especialmente informativos. Si bien sería necesario extender ésta observación a un panel compuesto por más líneas celulares transformadas diferentes, su fuerte efecto sobre el desarrollo de tumores abre vías para su utilización como un futuro agente terapéutico.

Sin embargo, como paso previo a la utilización de E1A en abordajes de terapia génica, es necesario dilucidar la seguridad de su expresión *in vivo*, así como comprender mejor su papel en la génesis de tumor y el mecanismo por el cual es capaz de evitar la aparición de tumores al expresarse en células transformadas. Con el objetivo de responder a todas éstas cuestiones se desarrolló el modelo murino transgénico, específico de tejido e inducible expuesto en el presente trabajo. Las características de éste modelo experimental permiten contestar a dichas preguntas de una forma que no había sido posible hasta la fecha. La inducibilidad de la expresión de E1A permite evitar los efectos indeseados sobre el desarrollo que se han observado en los modelos animales desarrollados previamente, y que se detallarán más tarde. Éste parece ser el principal motivo por los que el presente modelo no presenta un fenotipo deletéreo en los animales con expresión de E1A. Esto, unido a la especificidad del tejido en el que se expresa, hace que el modelo se asemeje más a un posible escenario terapéutico en el futuro donde la expresión de E1A se produzca sólo sobre el tejido afectado por medio de diferentes vectores.

El hecho de que, en nuestro modelo de expresión de E1A, el transgén pueda activarse a voluntad del experimentador, supone una gran ventaja a la hora de dilucidar sus propiedades como un supresor tumoral u oncogén en comparación con los abordajes de xenotransplante. La observación de que E1A bloqueaba la aparición de tumores al expresarse en células transformadas durante ensayos de xenotransplante ya había sido difundida con anterioridad (**Sanchez-Prieto et al. 1998**). Esto iría en consonancia con posibles efectos en la adhesión ya que, como se observa en cultivo (datos no mostrados), las células pierden capacidad de adhesión al expresar E1A. Todo esto, unido al hecho de que E1A sea capaz de inducir anoikis (**Frisch & Francis 1994**), posibilita que el descenso en el volumen tumoral originado por las células que lo expresaran se debiera a su muerte durante el proceso de inyección y anclaje en el organismo hospedador, puesto que la falta de anclaje podría provocar la apoptosis de dichas células. En el presente modelo, las células son propias del organismo y se encuentran ancladas al mismo formando parte de la arquitectura del tejido, evitando así fenómenos como la anoikis y posibles artefactos experimentales derivados de los ensayos de xenotransplantes en los que las células se separan de su matriz. Las cualidades de E1A derivadas de éste modelo son en todo momento propias de la proteína y no son atribuibles al procedimiento experimental.

Contar con un modelo transgénico de expresión de E1A permite, además, dar respuesta a las preguntas sobre la seguridad que la expresión de éste gen tendría en su uso como terapia génica. La expresión de E1A *in vivo*, sostenida en el tiempo y sobre tejidos no transformados es inocua para el organismo, lo que se deduce de la falta de anomalías morfológicas, histológicas o etológicas en los animales que lo expresan hasta las siete semanas. Más aún, en experimentos todavía en curso y cuyos datos no se presentan en éste trabajo, los animales con E1A se han mantenido con vida durante más de nueve meses (datos no mostrados) sin encontrar anomalía alguna ni desarrollar lesiones neoplásicas en ausencia de carcinogénesis, ni en piel ni en ninguno de los otros tejidos donde también se encuentra expresión a partir del promotor de la cK5 en ratones como la córnea o el epitelio de estómago.

Esta falta de efectos deletéreos contrasta con los encontrados en otros modelos transgénicos de E1A desarrollados con anterioridad en órganos como los pulmones y la piel (**Y. Yang, 2002; Missero et al. 1993**). En la piel, por ejemplo, se encuentran defectos en la vaina del pelo originando vello acortado y retorcido, así como alopecia parcial y folículos capilares distróficos (**Missero et al. 1993**). En otros modelos, como en un transgénico en retina, se observa un fenotipo de ojo pequeño, displasia retinal o hiperplasia del epitelio pigmentario de la retina (**Y. Wang et al. 1994**). Si bien estos resultados parecen contradictorios, cabe destacar que en el presente

trabajo su carácter inducible permite que no se exprese durante el desarrollo embrionario donde una proteína como E1A, con su ingente capacidad de interacción con vías clave para la homeostasis celular, podría causar efectos profundamente deletéreos como los observados en trabajos previos. Además, en el caso del modelo de piel, más cercano al presente trabajo, cabe destacar que el fondo genético de los animales es diferente (SENCAR frente a FVB/N) (Missero et al. 1993) y el promotor cK5 usado en ésta ocasión es mucho más específico que el usado en modelos anteriores, que puede considerarse un promotor mínimo (Missero et al. 1993). Más aún, en ese mismo trabajo la isoforma de E1A utilizada es la NTdl646, mutante que presenta un defecto de unión a p300 (Drews et al. 1998). Estas diferencias (Missero et al. 1993) podrían justificar a su vez el distinto fenotipo de los individuos entre ambos trabajos.

En el presente modelo, la expresión de E1A no sólo no potencia el desarrollo de lesiones durante el proceso de carcinogénesis química, sino que lo inhibe, encontrando menos lesiones y de menor tamaño que en los individuos controles. Más aún, no se han encontrado otras lesiones que no sean las tradicionalmente descritas en un tratamiento tópico de DMBA-TPA como los papilomas y carcinomas dérmicos. Además, durante el proceso de carcinogénesis, se encontraron en tres animales, dos sin expresión de E1A y uno con expresión del mismo, lesiones neoplásicas en los ganglios linfáticos y pulmones. Tras su análisis histológico, se diagnosticaron como células procedentes de carcinomas epidermoides como los generados en la piel del animal. De hecho, está descrito para éste modelo de carcinogénesis química una incidencia de entre el 15-35% de metástasis de los carcinomas epidermoides originados en ganglios linfáticos y pulmones (Abel et al. 2009), precisamente las localizaciones donde se observan las lesiones en éste modelo y de forma independiente al genotipo de los ejemplares. Por último cabe destacar que, si bien la expresión de E1A es perfectamente detectable en las pieles de los animales, sólo en una de todas las lesiones aparecidas se ha podido detectar la expresión de E1A (datos no mostrados), lo que da a entender que la tumorogénesis en los animales con expresión de E1A se da principalmente en células que o bien carecían desde un principio de su expresión o bien la pierden en el proceso de transformación tumoral; mientras que las células que mantienen una buena expresión del transgén son incapaces de originar tumores. Más allá de las implicaciones que esto tiene en el posible mecanismo a través del cual E1A podría ser capaz de ejercer su papel supresor tumoral, lo que se puede concluir es que E1A es un gen seguro al expresarse *in vivo* puesto que no origina defectos en el organismo ni lesiones hiperplásicas ni es capaz de promover un mayor número de lesiones o una mayor

capacidad metastática en los ejemplares expuestos a un proceso de carcinogénesis química.

Como se ha demostrado, las células transformadas con expresión de E1A proliferan más rápido que sus correspondientes controles *in vitro*. Esto es así no sólo en los modelos analizados para su uso en xenotransplantes como HCT116 o B16-F10, sino que se encuentran los mismos datos en las células de glioblastoma analizadas (Valero et al. 2014). Así pues, se puede considerar que el incremento en la proliferación mediado por E1A es un fenómeno universal en el contexto de una expresión *in vitro*. Estas observaciones pueden correlacionar con el aspecto oncogénico de E1A basado en su capacidad de colaboración en la transformación de células no transformadas *in vitro*. Como se ha demostrado en el presente trabajo, el hecho de que E1A incremente la proliferación de las células transformadas donde se expresa no las hace más tumorogénicas sino al contrario, inhibe su capacidad para formar tumores en los animales inoculados independientemente de contexto inmune. Existen multitud de posibles explicaciones para éste fenómeno. Por ejemplo, existen mecanismos que influyen decisivamente en el desarrollo de un tumor que son imposibles de mimetizar en un cultivo celular, como la hipoxia que sufren determinadas zonas del tumor y la respuesta angiogénica que se desencadena para intentar compensarla.

Cabe destacar que la capacidad tumorogénica de E1A *in vivo* dependería, a su vez, de la isoforma que se exprese en cada sistema. Un claro ejemplo son los modelos de pulmón desarrollados. En aquel modelo donde se producía una expresión preferencial de E1A 12s en pulmón, acompañado de la expresión de E1B, los animales desarrollaban tumores espontáneos (Koike et al. 1990). La aparición de dichos tumores, sin embargo, puede atribuirse a E1B, dado que al expresar sólo E1A 12s no se desarrollan tumores espontáneos sino hiperplasia en los pulmones de los individuos (Y. Yang, 2002). Así mismo, si la isoforma expresada en ese mismo modelo es la 13s dicha inducción de hiperplasia desaparece (Y. Yang, 2002). Este precedente apoya la seguridad de la expresión de E1A *in vivo* que sugieren los datos aportados por el presente trabajo y señala la importancia del dominio CR3, ausente en la isoforma 12s y responsable de la unión a proteínas como YY1 (Lee, See, et al. 1995; Lee, Galvin, et al. 1995; Lewis et al. 1995), como compensador del posible efecto hiperproliferativo de E1A y posible responsable de su seguridad *in vivo*. El hecho de que en ese mismo trabajo la hiperplasia mediada por el E1A 12s correlacione con bajos niveles de apoptosis mediada por p53, mientras que la presencia de la isoforma completa medie una situación de daño al DNA similar a la producida por p53 (Y. Yang, 2002), nos devuelve a una situación en la que E1A estaría mediando una situación de daño al DNA que resultaría preventiva contra los efectos deletéreos que

podiera conllevar la expresión de ciertas regiones de su propio gen y, a la vez, actuar como agente preventivo y sensibilizador como en el caso de la radiación y el glioblastoma o el cDDP y el NSCLC.

Dado que uno de los mecanismos más frecuentes en los que se ha observado la capacidad transformante de E1A ha sido en cooperación con el oncogén *ras* (Jenkins et al. 1984; Zerler et al. 1986), los datos obtenidos en la presente carcinogénesis química son particularmente relevantes para esclarecer el papel como oncogén o supresor tumoral del gen adenoviral. El protocolo de DMBA-TPA induce, precisamente, mutaciones en el codón 61 de *H-RAS* debidas a la acción del DMBA (Pazzaglia et al. 2001; Ridd et al. 2006). De hecho, se ha propuesto un modelo de colaboración entre E1A y v-H-RAS en el que el gen adenoviral serviría para evitar, a través de la vía de ERK1/2 (Callejas-Valera, 2008), la senescencia inducida por la expresión de RAS permitiendo la transformación completa de las células (Serrano et al. 1997 (Callejas-Valera, 2008)). Por todos estos motivos habría sido previsible que la expresión de E1A exacerbara la transformación y progresión tumoral en lugar de impedirla como ocurre en este modelo, y más considerando que el fondo genético FVB/N es más sensible a carcinogénesis química que el fondo SENCAR (Abel et al. 2009) usado en trabajos previos (Missero et al. 1993). En esta clara diferencia intervendrían diversos factores que determinarían el papel de E1A. En primer lugar el contexto donde se produce la expresión, puesto que los fenómenos de transformación asociada a E1A son todos *in vitro* mientras que en el presente modelo animal actúa como un supresor tumoral. Además, el linaje celular donde se expresa también es determinante ya que los fenómenos de transformación mediados por E1A se han observado en fibroblastos mientras que en el modelo aquí presentado la expresión se restringe a las células epiteliales con expresión de cK5.

El hecho de que en trabajos previos también desarrollados en piel el efecto supresor tumoral de E1A sea más modesto (Missero et al. 1993) conduce a pensar en otro posible mediador del efecto antitumoral de E1A como p300, ya que el mutante usado en ese trabajo previo carece de su unión a ésta proteína (Drews et al. 1998). Dicha proteína, que ha sido sugerida como clave para la actividad transformante e inmortalizadora de E1A *in vitro* (Gopalakrishnan et al. 1997; Whyte et al. 1989), podría ejercer éste efecto a través de varias de sus vías de actuación descritas. En primer lugar, éste dominio de unión a p300/CBP sería responsable de inhibir la respuesta p53 dependiente y el control sobre el ciclo celular asociado (Somasundaram & El-Deiry 1997). Este dominio está implicado, a su vez, en alteraciones del metabolismo celular, así como en la resistencia a TGF- β

(Gopalakrishnan et al. 1996; Missero et al. 1991). Todos estos factores influirían en conseguir un efecto supresor tumoral más modesto, aunque nunca promotor tumoral.

En conjunto, y a la hora de evaluar el papel biológico de E1A, es necesario no perder de vista el contexto de expresión y su papel adaptativo como proteína viral. Como se ha desarrollado en esta discusión, el efecto biológico *in vivo* e *in vitro* de E1A puede cambiar dramáticamente al estar acompañado por la expresión de E1B. Esto es así ya que, evolutivamente, ambas moléculas han ido adquiriendo funciones complementarias y antagonistas que permiten al virus modular distintos aspectos de la biología de la célula hospedadora al modificar el ratio de ambas moléculas y sus isoformas. Esto mismo ocurre con el propio balance de las distintas isoformas de E1A, cuya distinta proporción en el tiempo permite provocar distintos efectos. Así, las aparentes contradicciones observadas en la función biológica de E1A pueden deberse a su evaluación fuera de contexto, por su uso como herramienta molecular a partir de cDNAs y sin el resto de isoformas y moléculas virales que ayuden a E1A a desarrollar el papel para el que está evolutivamente diseñado. Sea como fuere, la seguridad de la expresión de E1A y su carácter supresor tumoral quedan demostradas en el presente modelo, abriendo nuevas vías para su uso como terapia génica en el tratamiento de tumores tan diversos como el glioblastoma o el NSCLC de forma segura. De hecho, su efecto sobre la carcinogénesis podría suponer una posible aplicación preventiva. De cara al futuro, quedan por dilucidar el mecanismo molecular concreto por el cual E1A es capaz de bloquear la aparición de tumores y cuáles serían los mejores vectores de tratamiento para el uso terapéutico de E1A. Sólo así podrá hacerse realidad el futuro que se vislumbra en el que E1A ayude a los pacientes a combatir la enfermedad en el día a día clínico.

Conclusions

- E1A is able to promote radiosensitivity in radioresistant glioblastoma-derived cell lines such as U87MG, T98G, LN-405 and A-172.
- Radiosensitivity induced by E1A expression in this experimental system correlates with a G2/M arrest as well as with an induction of apoptosis when exposed to I.R.
- E1A expression in glioblastoma derived cell lines induces an increase in Chk1 transcription, which is responsible of the alterations observed in the cell cycle.
- E1A-associated radiosensitivity in glioblastoma-derived cell lines is exerted through c-Myc protein stabilization, which is consistent with a replicative stress situation.
- E1A is able to promote remarkable sensitivity to cisplatin in H23, H661 and H1299 NSCLC derived cell lines, whereas it is almost undetectable in H460.
- The E1A sensitizer effect to cisplatin in H23, H661 and H1299 NSCLC derived cell lines relays on the increase of phosphatase MKP1 expression at the transcriptional level.
- The chemosensitizer effect of E1A in the H1299 cell line correlates with an increase in the apoptosis by blocking the autophagic response.
- The axis E1A-MKP1-p38 MAPK mediates cDDP sensitivity in the H1299 E1A-expressing cell line, excluding the ERK1/2 pathway as a putative candidate.
- Xenograft assays developed with E1A expressing cells show E1A is able to block the tumour formation in both, immunodepressed (HCT116/BALB/c-Nude) and immunocompetent (B16-F10/C57BL/6) models.
- E1A expression *in vivo* is safe in an inducible, skin-specific model of transgenic mouse. E1A postnatal expression causes no observable phenotype and E1A expressing mice not develop any kind of proliferative lesions in any analysed tissues.
- In an *in vivo* chemical carcinogenesis DMBA/TPA assay, E1A acts as a tumour suppressor as shown by the reduced, in amount and size, lesions observed upon treatment.

Bibliografía

- Abel, E.L. et al., 2009. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: Fundamentals and applications. *Nature Protocols*, 4(9), pp.1350–1362.
- Abrams, T.J. et al., 2003. SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(5), pp.471–478.
- Adhikary, S. & Eilers, M., 2005. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6(8), pp.635–645.
- Ahmad, T. & Eisen, T., 2004. Kinase inhibition with BAY 43-9006 in renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10(18 Pt 2), pp.6388S–92S.
- Alemaný, R. et al., 1999. Complementary adenoviral vectors for oncolysis. *Cancer Gene Therapy*, 6(1), pp.21–25.
- Aviel-Ronen, S. et al., 2006. K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review. *Clinical lung cancer*, 8(1), pp.30–38.
- Baeuerle, P.A., 1998. I κ B-NF- κ B structures: at the interface of inflammation control. *Cell*, 95(6), pp.729–731.
- Bagchi, S., Raychaudhuri, P. & Nevins, J.R., 1990. Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell*, 62(4), pp.659–669.
- Baluchamy, S. et al., 2007. Relationship between E1A binding to cellular proteins, c-myc activation and S-phase induction. *Oncogene*, 26(5), pp.781–787.
- Bartholomeusz, C. et al., 2005. Antitumor effect of E1A in ovarian cancer by cytoplasmic sequestration of activated ERK by PEA15. *Oncogene*.
- Bartholomeusz, C. et al., 2008. PEA-15 Induces Autophagy in Human Ovarian Cancer Cells and Is Associated with Prolonged Overall Survival. *Cancer Research*, 68(22), pp.9302–9310.
- Baselga, J. et al., 1998. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Research*, 58(13), pp.2825–2831.
- Baumann, M., Hölscher, T. & Zips, D., 2008. The future of IGRT - cost benefit analysis. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 47(7), pp.1188–1192.
- Benjamin, D.J., 2014. The efficacy of surgical treatment of cancer - 20 years later. *Medical hypotheses*, 82(4), pp.412–420.
- Blanco, R. et al., 2009. A gene-alteration profile of human lung cancer cell lines. *Human mutation*, 30(8), pp.1199–1206.
- Bos, L.J. et al., 2005. The sensitivity of dose distributions for organ motion and set-up uncertainties in prostate IMRT. *Radiotherapy and Oncology*, 76(1), pp.18–26.
- Brader, K.R. et al., 1997. Adenovirus E1A expression enhances the sensitivity of an ovarian cancer cell line to multiple cytotoxic agents through an apoptotic mechanism. *Clinical Cancer Research*, 3(11), pp.2017–2024.

- Breckpot, K., Aerts, J.L. & Thielemans, K., 2007. Lentiviral vectors for cancer immunotherapy: transforming infectious particles into therapeutics. *Gene Therapy*, 14(11), pp.847–862.
- Brooks, K. et al., 2013. A potent Chk1 inhibitor is selectively cytotoxic in melanomas with high levels of replicative stress. *Oncogene*, 32(6), pp.788–796.
- Buchdunger, E. et al., 1996. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Research*, 56(1), pp.100–104.
- Bushmeyer, S., Park, K. & Atchison, M.L., 1995. Characterization of functional domains within the multifunctional transcription factor, YY1. *Journal of Biological Chemistry*, 270(50), pp.30213–30220.
- Busse, P.M. et al., 1978. The action of caffeine on X-irradiated HeLa cells. III. Enhancement of X-ray-induced killing during G2 arrest. *Radiation research*, 76(2), pp.292–307.
- Callejas-Valera, J.L., Guinea Viniegra, J., Ramírez-Castillejo, C., Recio, J.A., Galan-Moya, E., Martinez, N., Rojas, J.M., Ramón y Cajal, S. & Sánchez-Prieto, R., 2008a. E1a gene expression blocks the ERK1/2 signaling pathway by promoting nuclear localization and MKP up-regulation: implication in v-H-Ras-induced senescence. *Journal of Biological Chemistry*, 283(19), pp.13450–13458.
- Callejas-Valera, J.L., Guinea Viniegra, J., Ramírez-Castillejo, C., Recio, J.A., Galan-Moya, E., Martinez, N., Rojas, J.M., Ramón y Cajal, S. & Sánchez-Prieto, R., 2008b. E1a gene expression blocks the ERK1/2 signaling pathway by promoting nuclear localization and MKP up-regulation: implication in v-H-Ras-induced senescence. *Journal of Biological Chemistry*, 283(19), pp.13450–13458.
- Chakraborty, A.A. & Tansey, W.P., 2009. Adenoviral E1A Function through Myc. *Cancer Research*, 69(1), pp.6–9.
- Chakravarti, D. et al., 1999. A viral mechanism for inhibition of p300 and PCAF acetyltransferase activity. *Cell*, 96(3), pp.393–403.
- Chan, H.M. et al., 2001. Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein. *Nature Cell Biology*, 3(7), pp.667–674.
- Chang, J.Y. et al., 1996. Inhibition of intratracheal lung cancer development by systemic delivery of E1A. *Oncogene*, 13(7), pp.1405–1412.
- Chang, J.Y. et al., 1997. The tumor suppression activity of E1A in HER-2/neu-overexpressing breast cancer. *Oncogene*, 14(5), pp.561–568.
- Chang, Y.-W., Hung, M.-C. & Su, J.-L., 2014. The Anti-Tumor Activity of E1A and its Implications in Cancer Therapy. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62(3), pp.195–204.
- Chattopadhyay, S. et al., 2006. MKP1/CL100 controls tumor growth and sensitivity to cisplatin in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, 25(23), pp.3335–3345.
- Chen, H. & Hung, M.-C., 1997. Involvement of co-activator p300 in the transcriptional regulation of the HER-2/neu gene. *Journal of Biological Chemistry*, 272(10), pp.6101–6104.
- Chen, H.X., Gore-Langton, R.E. & Cheson, B.D., 2001. *Clinical trials referral resource: Current clinical trials of the anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab*,
- Chen, J.Y. et al., 1993. Heterogeneity of transcriptional activity of mutant p53 proteins and p53 DNA target sequences. *Oncogene*, 8(8), pp.2159–2166.
- Chen, Q. et al., 2002. Inhibition of crystallin expression and induction of apoptosis by lens-specific E1A expression in transgenic mice. *Oncogene*, 21(7), pp.1028–1037.
- Chiarella, P. et al., 2007. Adjuvants in vaccines and for immunisation: current trends. *Expert opinion*

- on biological therapy, 7(10), pp.1551–1562.
- Chinnadurai, G., 1992. Adenovirus E1a as a tumor-suppressor gene. *Oncogene*, 7(7), pp.1255–1258.
- Choi, I.-K. & Yun, C.-O., 2013. Recent developments in oncolytic adenovirus-based immunotherapeutic agents for use against metastatic cancers. *Cancer Gene Therapy*, 20(2), pp.1–7.
- Cohen, M.J. et al., 2014. Functional analysis of the C-terminal region of human adenovirus E1A reveals a misidentified nuclear localization signal. *Virology*, 468-470(C), pp.238–243.
- Cohen, S.S. et al., 1958. THE MODE OF ACTION OF 5-FLUOROURACIL AND ITS DERIVATIVES. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(10), pp.1004–1012.
- Connell, C.M. et al., 2011. Genomic DNA damage and ATR-Chk1 signaling determine oncolytic adenoviral efficacy in human ovarian cancer cells. *Journal of Clinical Investigation*, 121(4), pp.1283–1297.
- Criswell, T. et al., 2003. Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation. *Oncogene*, 22(37), pp.5813–5827.
- Cuenda, A. et al., 1995. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS letters*, 364(2), pp.229–233.
- Culver, K.W. et al., 1992. In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science*, 256(5063), pp.1550–1552.
- Curtin, M.E., 1984. Retrovirus vectors for mammalian engineering. *Microbiological sciences*, 1(8), p.210.
- Dasari, S. & Tchounwou, P.B., 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, pp.364–378.
- de Stanchina, E. et al., 1998. E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes & Development*, 12(15), pp.2434–2442.
- Deissler, H. & Opalka, B., 2007. Therapeutic transfer of DNA encoding adenoviral E1A. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 2(1), pp.1–10.
- Deng, J., Xia, W. & Hung, M.-C., 1998. Adenovirus 5 E1A-mediated tumor suppression associated with E1A-mediated apoptosis in vivo. *Oncogene*, 17(17), pp.2167–2175.
- Deng, Q. et al., 2005. The ability of E1A to rescue ras-induced premature senescence and confer transformation relies on inactivation of both p300/CBP and Rb family proteins. *Cancer Research*, 65(18), pp.8298–8307.
- Denkert, C. et al., 2002. Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. *International Journal of Cancer*, 102(5), pp.507–513.
- Dhillon, A.S. et al., 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26(22), pp.3279–3290.
- Doi, K. & Takeuchi, Y., 2015. Gene therapy using retrovirus vectors: vector development and biosafety at clinical trials. *Uirusu*, 65(1), pp.27–36.
- Drews, R. et al., 1998. Genetic analysis of adenovirus E1A: induction of genetic instability and altered cell morphologic and growth characteristics are segregatable functions. *Mutation research*, 421(1), pp.9–25.

- Druker, B.J. et al., 1996. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature Medicine*, 2(5), pp.561–566.
- Dudley, D.T. et al., 1995. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(17), pp.7686–7689.
- Dumont, D.J. et al., 1993. Role of phosphorylation near the amino terminus of adenovirus type 5 early region 1A proteins. *Journal of General Virology*, 74 (Pt 4)(4), pp.583–595.
- Dunnwald, L.K., Rossing, M.A. & Li, C.I., 2007. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast cancer research : BCR*, 9(1), p.R6.
- Duyndam, M.C. et al., 1999. The N-terminal transactivation domain of ATF2 is a target for the co-operative activation of the c-jun promoter by p300 and 12S E1A. *Oncogene*, 18(14), pp.2311–2321.
- Egan, C., Bayley, S.T. & Branton, P.E., 1989. Binding of the Rb1 protein to E1A products is required for adenovirus transformation. *Oncogene*, 4(3), pp.383–388.
- Everts, B. & van der Poel, H.G., 2004. Replication-selective oncolytic viruses in the treatment of cancer. *Cancer Gene Therapy*, 12(2), pp.141–161.
- Fabian, I. et al., 1993. Effects of CAMPATH-1 antibodies on the functional activity of monocytes and polymorphonuclear neutrophils. *Experimental hematology*, 21(12), pp.1522–1527.
- Fang, J.Y. & Richardson, B.C., 2005. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *The Lancet. Oncology*, 6(5), pp.322–327.
- Fattaey, A.R., Harlow, E. & Helin, K., 1993. Independent regions of adenovirus E1A are required for binding to and dissociation of E2F-protein complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 13(12), pp.7267–7277.
- Felgner, P.L. et al., 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(21), pp.7413–7417.
- Ferrari, R. et al., 2008. Epigenetic reprogramming by adenovirus e1a. *Science*, 321(5892), pp.1086–1088.
- Flinterman, M. et al., 2003. E1A-mediated suppression of EGFR expression and induction of apoptosis in head and neck squamous carcinoma cell lines. *Oncogene*, 22(13), pp.1965–1977.
- Flinterman, M.B. et al., 2007. p400 function is required for the adenovirus E1A-mediated suppression of EGFR and tumour cell killing. *Oncogene*, 26(48), pp.6863–6874.
- Frazer, I.H., Lowy, D.R. & Schiller, J.T., 2007. Prevention of cancer through immunization: Prospects and challenges for the 21st century. *European journal of immunology*, 37 Suppl 1(S1), pp.S148–55.
- Frisch, S.M., 1991. Antioncogenic effect of adenovirus E1A in human tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(20), pp.9077–9081.
- Frisch, S.M. & Dolter, K.E., 1995. Adenovirus E1a-mediated tumor suppression by a c-erbB-2/neu-independent mechanism. *Cancer Research*, 55(23), pp.5551–5555.
- Frisch, S.M. & Francis, H., 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of cell biology*, 124(4), pp.619–626.

- Frisch, S.M. & Mymryk, J.S., 2002. Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(6), pp.441–452.
- Frisch, S.M. & Ruoslahti, E., 1997. Integrins and anoikis. *Current Opinion in Cell Biology*, 9(5), pp.701–706.
- Fu, D., Calvo, J.A. & Samson, L.D., 2012. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. *Nature Reviews Cancer*, 12(2), pp.104–120.
- Fuchs, M. et al., 2001. The p400 complex is an essential E1A transformation target. *Cell*, 106(3), pp.297–307.
- Fueyo, J. et al., 2000. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene*, 19(1), pp.2–12.
- Gagou, M.E., Zuazua-Villar, P. & Meuth, M., 2010. Enhanced H2AX phosphorylation, DNA replication fork arrest, and cell death in the absence of Chk1. *Molecular biology of the cell*, 21(5), pp.739–752.
- García-García, A. et al., 2012. E2F-1 lacking the transcriptional activity domain induces autophagy. *Cancer Biology & Therapy*, 13(11), pp.1091–1101.
- García-Cano, J. et al., 2015. Exploiting the potential of autophagy in cisplatin therapy: A new strategy to overcome resistance. *Oncotarget*, 6(17), pp.15551–15565.
- Gaumont-Leclerc, M.-F. et al., 2004. PEA-15 is inhibited by adenovirus E1A and plays a role in ERK nuclear export and Ras-induced senescence. *Journal of Biological Chemistry*, 279(45), pp.46802–46809.
- Georger, B. et al., 2001. Antitumor activity of the rapamycin analog CCI-779 in human primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma models as single agent and in combination chemotherapy. *Cancer Research*, 61(4), pp.1527–1532.
- Giaginis, C. et al., 2012. Expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR- γ) in human non-small cell lung carcinoma: correlation with clinicopathological parameters, proliferation and apoptosis related molecules and patients' survival. *Pathology oncology research : POR*, 18(4), pp.875–883.
- Gil-Araujo, B. et al., 2014. Dual specificity phosphatase 1 expression inversely correlates with NF- κ B activity and expression in prostate cancer and promotes apoptosis through a p38 MAPK dependent mechanism. *Molecular Oncology*, 8(1), pp.27–38.
- Gilmartin, A.G. et al., 2011. GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained in vivo pathway inhibition. *Clinical Cancer Research*, 17(5), pp.989–1000.
- Girnun, G.D. et al., 2008. Regression of drug-resistant lung cancer by the combination of rosiglitazone and carboplatin. *Clinical Cancer Research*, 14(20), pp.6478–6486.
- Girnun, G.D. et al., 2007. Synergy between PPARgamma ligands and platinum-based drugs in cancer. *Cancer Cell*, 11(5), pp.395–406.
- Good, J.S. & Harrington, K.J., 2013. The hallmarks of cancer and the radiation oncologist: updating the 5Rs of radiobiology. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*, 25(10), pp.569–577.
- Goodrum, F.D. & Ornelles, D.A., 1999. Roles for the E4 orf6, orf3, and E1B 55-kilodalton proteins in cell cycle-independent adenovirus replication. *Journal of Virology*, 73(9), pp.7474–7488.
- Gopalakrishnan, S., Douglas, J.L. & Quinlan, M.P., 1997. immortalization of primary epithelial cells by

- E1A 12S requires late, second exon-encoded functions in addition to complex formation with pRB and p300. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 8(5), pp.541–551.
- Gopalakrishnan, S., Fischer, R.S. & Quinlan, M.P., 1996. Induction of a complex between rasGAP and a novel 110 kD protein is required for immortalization of primary epithelial cells by the E1A 12S oncoprotein of adenovirus. *Oncogene*, 13(12), pp.2659–2669.
- Grange, J.M., Stanford, J.L. & Stanford, C.A., 2002. *Campbell De Morgan's 'Observations on cancer', and their relevance today*,
- Green, N.K. & Seymour, L.W., 2002. Adenoviral vectors: Systemic delivery and tumor targeting. *Cancer Gene Therapy*, 9(12), pp.1036–1042.
- Grootclaes, M.L. & Frisch, S.M., 2000. Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene*, 19(33), pp.3823–3828.
- Guinea Viniegra, J. et al., 2002. Modulation of PI3K/Akt pathway by E1a mediates sensitivity to cisplatin. *Oncogene*, 21(46), pp.7131–7136.
- Halbert, D.N., Cutt, J.R. & Shenk, T., 1985. Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *Journal of Virology*, 56(1), pp.250–257.
- Hamamori, Y. et al., 1999. Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell*, 96(3), pp.405–413.
- Hamid, O. et al., 2003. Phase II trial of intravenous CI-1042 in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 21(8), pp.1498–1504.
- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), pp.646–674.
- Harris, H. et al., 1969. Suppression of malignancy by cell fusion. *Nature*, 223(5204), pp.363–368.
- Hau, E. et al., 2016. The evolving roles and controversies of radiotherapy in the treatment of glioblastoma. *Journal of Medical Radiation Sciences*, 63(2), pp.114–123.
- Haupt, Y. et al., 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387(6630), pp.296–299.
- Hay, R.T. et al., 1995. Molecular interactions during adenovirus DNA replication. *Current topics in microbiology and immunology*, 199 (Pt 2), pp.31–48.
- Heise, C. et al., 1997. ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nature Medicine*, 3(6), pp.639–645.
- Hortobagyi, G.N. et al., 2001. Cationic liposome-mediated E1A gene transfer to human breast and ovarian cancer cells and its biologic effects: a phase I clinical trial. *Journal of Clinical Oncology*, 19(14), pp.3422–3433.
- Houweling, A., van den Elsen, P.J. & van der Eb, A.J., 1980. Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4.5% fragment of adenovirus 5 DNA. *Virology*, 105(2), pp.537–550.
- Howell, A. et al., 2005. Fulvestrant versus anastrozole for the treatment of advanced breast carcinoma. *Cancer*, 104(2), pp.236–239.
- Howell, V.M., 2015. Molecular heterogeneity in glioblastoma: potential clinical implications. pp.1–9.
- Höglund, A. et al., 2011. Therapeutic implications for the induced levels of Chk1 in Myc-expressing

- cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 17(22), pp.7067–7079.
- Huang, C.-Y. & Tan, T.-H., 2012. DUSPs, to MAP kinases and beyond. *Cell & bioscience*, 2(1), p.24.
- Huang, E. et al., 2002. Intrafraction prostate motion during IMRT for prostate cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 53(2), pp.261–268.
- Huang, K. et al., 2012. Inter- and intrafraction uncertainty in prostate bed image-guided radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 84(2), pp.402–407.
- Huang, T.-G. et al., 2003. Telomerase-dependent oncolytic adenovirus for cancer treatment. *Gene Therapy*, 10(15), pp.1241–1247.
- Ikeda, M.A. & Nevins, J.R., 1993. Identification of distinct roles for separate E1A domains in disruption of E2F complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 13(11), pp.7029–7035.
- Ishibashi, M., Chin, W.W. & Maizel, J.V., 1977. The polypeptides of adenovirus. IX. Partial purification of early proteins and observations on late proteins of type 5 adenovirus. *Virology*, 83(1), pp.1–15.
- Ishida, S. et al., 2010. Enhancing tumor-specific uptake of the anticancer drug cisplatin with a copper chelator. *Cancer Cell*, 17(6), pp.574–583.
- Jenkins, J.R., Rudge, K. & Currie, G.A., 1984. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature*, 312(5995), pp.651–654.
- Jonasch, E. & Haluska, F.G., 2001. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *The oncologist*, 6(1), pp.34–55.
- Jordan, M.A. & Wilson, L., 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, 4(4), pp.253–265.
- Jung, M. & Dritschilo, A., 2001. NF-kappa B signaling pathway as a target for human tumor radiosensitization. *Seminars in radiation oncology*, 11(4), pp.346–351.
- Kadeppagari, R.-K., Sankar, N. & Thimmapaya, B., 2009. Adenovirus transforming protein E1A induces c-Myc in quiescent cells by a novel mechanism. *Journal of Virology*, 83(10), pp.4810–4822.
- Kamijo, T. et al., 1997. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell*, 91(5), pp.649–659.
- Kaminski, M.S. et al., 2000. Radioimmunotherapy with iodine (131)I tositumomab for relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma: updated results and long-term follow-up of the University of Michigan experience. *Blood*, 96(4), pp.1259–1266.
- Kaminsky, V.O. et al., 2012. Suppression of basal autophagy reduces lung cancer cell proliferation and enhances caspase-dependent and -independent apoptosis by stimulating ROS formation. *Autophagy*, 8(7), pp.1032–1044.
- Kaneko, Y.S. et al., 1999. Cell-cycle-dependent and ATM-independent expression of human Chk1 kinase. *Oncogene*, 18(25), pp.3673–3681.
- Kelland, L., 2007. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), pp.573–584.
- Kleinstiver, B.P. et al., 2016. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, 529(7587), pp.490–495.
- Ko, J.-C. et al., 2013. Inhibition of p38 MAPK-dependent MutS homologue-2 (MSH2) expression by metformin enhances gefitinib-induced cytotoxicity in human squamous lung cancer cells. *Lung*

- cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 82(3), pp.397–406.
- Koike, K. et al., 1990. Activation of retrovirus in transgenic mice: association with development of olfactory neuroblastoma. *Journal of Virology*, 64(8), pp.3988–3991.
- Köhler, M. et al., 2001. Adenoviral E1A protein nuclear import is preferentially mediated by importin alpha3 in vitro. *Virology*, 289(2), pp.186–191.
- Kubbutat, M.H., Jones, S.N. & Vousden, K.H., 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 387(6630), pp.299–303.
- Kukushkin, A.N. et al., 2002. Downregulation of c-fos gene transcription in cells transformed by E1A and cHa-ras oncogenes: a role of sustained activation of MAP/ERK kinase cascade and of inactive chromatin structure at c-fos promoter. *Oncogene*, 21(5), pp.719–730.
- Kung, S., 2013. Lentiviral vector-based therapy in head and neck cancer (Review). *Oncology Letters*, pp.1–7.
- Lai, S.L., Perng, R.P. & Hwang, J., 2000. p53 gene status modulates the chemosensitivity of non-small cell lung cancer cells. *Journal of Biomedical Science*, 7(1), pp.64–70.
- Lamfers, M.L.M. et al., 2007. Differential Effects of Combined Ad5- 24RGD and Radiation Therapy in In vitro versus In vivo Models of Malignant Glioma. *Clinical Cancer Research*, 13(24), pp.7451–7458.
- Land, H., Parada, L.F. & Weinberg, R.A., 1983. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*, 304(5927), pp.596–602.
- Lander, E.S., 2016. The Heroes of CRISPR. *Cell*, 164(1-2), pp.18–28.
- Lane, D.P., 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381), pp.15–16.
- Lee, J.S. et al., 1996. Adenovirus E1A downregulates cJun- and JunB-mediated transcription by targeting their coactivator p300. *Molecular and Cellular Biology*, 16(8), pp.4312–4326.
- Lee, J.S., Galvin, K.M., et al., 1995. Relief of YY1 transcriptional repression by adenovirus E1A is mediated by E1A-associated protein p300. *Genes & Development*, 9(10), pp.1188–1198.
- Lee, J.S., See, R.H., et al., 1995. Functional interactions between YY1 and adenovirus E1A. *Nucleic Acids Research*, 23(6), pp.925–931.
- Lentacker, I. et al., 2009. Design and Evaluation of Doxorubicin-containing Microbubbles for Ultrasound-triggered Doxorubicin Delivery: Cytotoxicity and Mechanisms Involved. *Molecular Therapy*, 18(1), pp.101–108.
- Lewis, B.A. et al., 1995. Adenovirus E1A proteins interact with the cellular YY1 transcription factor. *Journal of Virology*, 69(3), pp.1628–1636.
- Li, Chengwen et al., 2005. Adeno-associated virus vectors: potential applications for cancer gene therapy. *Cancer Gene Therapy*, 12(12), pp.913–925.
- Li, Y et al., 1993. The adenovirus E1A-associated 130-kD protein is encoded by a member of the retinoblastoma gene family and physically interacts with cyclins A and E. *Genes & Development*, 7(12A), pp.2366–2377.
- Li, Yiwei et al., 2005. Inactivation of nuclear factor kappaB by soy isoflavone genistein contributes to increased apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cells. *Cancer Research*, 65(15), pp.6934–6942.
- Li, Yufeng et al., 2009. Summary of the primer on tumor immunology and the biological therapy of

- cancer. *Journal of Translational Medicine*, 7(1), pp.11–5.
- Li, Zheng et al., 2004. Adenoviral E1A targets Mdm4 to stabilize tumor suppressor p53. *Cancer Research*, 64(24), pp.9080–9085.
- Liao, Y. & Hung, M.-C., 2004. A new role of protein phosphatase 2a in adenoviral E1A protein-mediated sensitization to anticancer drug-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Research*, 64(17), pp.5938–5942.
- Liao, Y. & Hung, M.-C., 2003a. Regulation of the activity of p38 mitogen-activated protein kinase by Akt in cancer and adenoviral protein E1A-mediated sensitization to apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 23(19), pp.6836–6848.
- Liao, Y. & Hung, M.-C., 2003b. Regulation of the Activity of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase by Akt in Cancer and Adenoviral Protein E1A-Mediated Sensitization to Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 23(19), pp.6836–6848.
- Liao, Y. & Hung, M.-C., 2003c. Regulation of the Activity of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase by Akt in Cancer and Adenoviral Protein E1A-Mediated Sensitization to Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 23(19), pp.6836–6848.
- Lichtenstein, D.L. et al., 2004. Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins. *International reviews of immunology*, 23(1-2), pp.75–111.
- Liu, L. et al., 1999. p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Molecular and Cellular Biology*, 19(2), pp.1202–1209.
- Liu, T.-C. & Kinn, D., 2008. Gene therapy progress and prospects cancer: oncolytic viruses. *Gene Therapy*, 15(12), pp.877–884.
- Lochhead, P.A., Gilley, R. & Cook, S.J., 2012. ERK5 and its role in tumour development. *Biochemical Society transactions*, 40(1), pp.251–256.
- Lohr, K. et al., 2003. Mutual Interference of Adenovirus Infection and myc Expression. *Journal of Virology*, 77(14), pp.7936–7944.
- Lowe, S.W. & Ruley, H.E., 1993. Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes & Development*, 7(4), pp.535–545.
- Luo, J. et al., 2015. Adeno-associated virus-mediated cancer gene therapy: Current status. *Cancer Letters*, 356(PB), pp.347–356.
- Lutz, P. & Keding, C., 1996. Properties of the adenovirus IVa2 gene product, an effector of late-phase-dependent activation of the major late promoter. *Journal of Virology*, 70(3), pp.1396–1405.
- Lutz, P., Rosa-Calatrava, M. & Keding, C., 1997. The product of the adenovirus intermediate gene IX is a transcriptional activator. *Journal of Virology*, 71(7), pp.5102–5109.
- Lyons, R.H., Ferguson, B.Q. & Rosenberg, M., 1987. Pentapeptide nuclear localization signal in adenovirus E1a. *Molecular and Cellular Biology*, 7(7), pp.2451–2456.
- Madhusudan, S. et al., 2004. A multicenter Phase I gene therapy clinical trial involving intraperitoneal administration of E1A-lipid complex in patients with recurrent epithelial ovarian cancer overexpressing HER-2/neu oncogene. *Clinical Cancer Research*, 10(9), pp.2986–2996.
- Madison, D.L. et al., 2002. Acetylation of the adenovirus-transforming protein E1A determines nuclear localization by disrupting association with importin-alpha. *Journal of Biological Chemistry*, 277(41), pp.38755–38763.
- Mandic, R. et al., 2005. Reduced cisplatin sensitivity of head and neck squamous cell carcinoma cell

- lines correlates with mutations affecting the COOH-terminal nuclear localization signal of p53. *Clinical Cancer Research*, 11(19 Pt 1), pp.6845–6852.
- Maraver, A. et al., 2012. Therapeutic effect of γ -secretase inhibition in KrasG12V-driven non-small cell lung carcinoma by derepression of DUSP1 and inhibition of ERK. *Cancer Cell*, 22(2), pp.222–234.
- Mauri, D. et al., 2006. Survival With Aromatase Inhibitors and Inactivators Versus Standard Hormonal Therapy in Advanced Breast Cancer: Meta-analysis. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 98(18), pp.1285–1291.
- Mazouzi, A., Velimezi, G. & Loizou, J.I., 2014. DNA replication stress_ Causes, resolution and disease. *Experimental Cell Research*, 329(1), pp.85–93.
- MCALLISTER, R.M., 1965. VIRUSES AND CANCER. *California medicine*, 102(5), pp.344–352.
- McCurrach, M.E. et al., 1997. bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(6), pp.2345–2349.
- McMahon, S.B., Wood, M.A. & Cole, M.D., 2000. The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Molecular and Cellular Biology*, 20(2), pp.556–562.
- McNamara, M.A., Nair, S.K. & Holl, E.K., 2015. RNA-Based Vaccines in Cancer Immunotherapy. *Journal of Immunology Research*, 2015(2), pp.1–9.
- Meissner, J.M. et al., 2016. Liposomes as non-viral carriers for genetic drugs. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*, 70, pp.200–209.
- Mendel, D.B. et al., 2003. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clinical Cancer Research*, 9(1), pp.327–337.
- Mercer, W.E. et al., 1990. Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(16), pp.6166–6170.
- Missero, C. et al., 1993. Skin-specific expression of a truncated E1a oncoprotein binding to p105-Rb leads to abnormal hair follicle maturation without increased epidermal proliferation. *The Journal of cell biology*, 121(5), pp.1109–1120.
- Missero, C., Filvaroff, E. & Dotto, G.P., 1991. Induction of transforming growth factor beta 1 resistance by the E1A oncogene requires binding to a specific set of cellular proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(8), pp.3489–3493.
- Mountzios, G. et al., 2010. Histopathologic and genetic alterations as predictors of response to treatment and survival in lung cancer: a review of published data. *Critical reviews in oncology/hematology*, 75(2), pp.94–109.
- Murga, M. et al., 2011. Exploiting oncogene-induced replicative stress for the selective killing of Myc-driven tumors. *Nature structural & molecular biology*, 18(12), pp.1331–1335.
- Nguyen, D.T. et al., 1999. IDEC-C2B8 anti-CD20 (rituximab) immunotherapy in patients with low-grade non-Hodgkin's lymphoma and lymphoproliferative disorders: evaluation of response on 48 patients. *European journal of haematology*, 62(2), pp.76–82.
- Noda, S.-E. et al., 2009. Technological advances in radiation oncology for central nervous system tumors. *Seminars in radiation oncology*, 19(3), pp.179–186.
- O'Connor, M.J. et al., 1999. Characterization of an E1A-CBP interaction defines a novel transcriptional

- adapter motif (TRAM) in CBP/p300. *Journal of Virology*, 73(5), pp.3574–3581.
- Otomo, T. et al., 2004. Microarray analysis of temporal gene responses to ionizing radiation in two glioblastoma cell lines: up-regulation of DNA repair genes. *Journal of radiation research*, 45(1), pp.53–60.
- Parada, L.F. et al., 1984. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature*, 312(5995), pp.649–651.
- Pawlik, T.M. & Keyomarsi, K., 2004. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 59(4), pp.928–942.
- Pazzaglia, S. et al., 2001. Analysis of c-Ha-ras gene mutations in skin tumors induced in carcinogenesis-susceptible and carcinogenesis-resistant mice by different two-stage protocols or tumor promoter alone. *Molecular Carcinogenesis*, 30(2), pp.111–118.
- Pelka, P. et al., 2008. Intrinsic Structural Disorder in Adenovirus E1A: a Viral Molecular Hub Linking Multiple Diverse Processes. *Journal of Virology*, 82(15), pp.7252–7263.
- Pereira, L. et al., 2013. Inhibition of p38 MAPK sensitizes tumour cells to cisplatin-induced apoptosis mediated by reactive oxygen species and JNK. *EMBO Molecular Medicine*, 5(11), pp.1759–1774.
- Perrone, F. et al., 2010. TP53 mutations and pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin and fluorouracil chemotherapy in resected oral cavity squamous cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(5), pp.761–766.
- Polager, S., Ofir, M. & Ginsberg, D., 2008. E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene*, 27(35), pp.4860–4864.
- Prestwich, R.J. et al., 2009. The case of oncolytic viruses versus the immune system: waiting on the judgment of Solomon. *Human gene therapy*, 20(10), pp.1119–1132.
- Prewett, M. et al., 1996. The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma. *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology : official journal of the Society for Biological Therapy*, 19(6), pp.419–427.
- Pulciani, S. et al., 1985. ras gene Amplification and malignant transformation. *Molecular and Cellular Biology*, 5(10), pp.2836–2841.
- Puri, P.L. et al., 1997. Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Molecular Cell*, 1(1), pp.35–45.
- Pützer, B.M. et al., 2000. E1A is sufficient by itself to induce apoptosis independent of p53 and other adenoviral gene products. *Cell Death and Differentiation*, 7(2), pp.177–188.
- Ragozzino, M.M. et al., 1991. Mechanisms of oncogene cooperation: activation and inactivation of a growth antagonist. *Environmental health perspectives*, 93, pp.97–103.
- Ridd, K. et al., 2006. Association of gene expression with sequential proliferation, differentiation and tumor formation in murine skin. *Carcinogenesis*, 27(8), pp.1556–1566.
- Rini, B.I. et al., 2006. Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (provenge) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy. *Cancer*, 107(1), pp.67–74.
- Rivoltini, L. et al., 2005. Escape strategies and reasons for failure in the interaction between tumour cells and the immune system: how can we tilt the balance towards immune-mediated cancer control? *Expert opinion on biological therapy*, 5(4), pp.463–476.
- Rodriguez-Rocha, H. et al., 2011. Adenoviruses induce autophagy to promote virus replication and

- oncolysis. *Virology*, 416(1-2), pp.9–15.
- Rohban, S. & Campaner, S., 2015. Myc induced replicative stress response: How to cope with it and exploit it. *Biochimica et biophysica acta*, 1849(5), pp.517–524.
- Romanov, V.S. et al., 2014. Novel mechanism of JNK pathway activation by adenoviral E1A. *Oncotarget*, 5(8), pp.2176–2186.
- Rosenberg, S.A. et al., 1989. Experience with the use of high-dose interleukin-2 in the treatment of 652 cancer patients. *Annals of surgery*, 210(4), pp.474–84– discussion 484–5.
- Rowe, D.T., Graham, F.L. & Branton, P.E., 1983. Intracellular localization of adenovirus type 5 tumor antigens in productively infected cells. *Virology*, 129(2), pp.456–468.
- Ruan, H.-Y. et al., 2006. Effects of a novel NF-kappaB inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), on growth, apoptosis, gene expression, and chemosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Head & neck*, 28(2), pp.158–165.
- Rusch, V. et al., 1995. Aberrant p53 expression predicts clinical resistance to cisplatin-based chemotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, 55(21), pp.5038–5042.
- Russo, S.M. et al., 2001. Enhancement of radiosensitivity by proteasome inhibition: implications for a role of NF-kappaB. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 50(1), pp.183–193.
- Sakaguchi, K. et al., 1998. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes & Development*, 12(18), pp.2831–2841.
- Samuelson, A.V. & Lowe, S.W., 1997. Selective induction of p53 and chemosensitivity in RB-deficient cells by E1A mutants unable to bind the RB-related proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(22), pp.12094–12099.
- Samuelson, A.V. et al., 2005. p400 is required for E1A to promote apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 280(23), pp.21915–21923.
- Sanchez-Prieto, R. et al., 1996. Carcinoma cell lines become sensitive to DNA-damaging agents by the expression of the adenovirus E1A gene. *Oncogene*, 13(5), pp.1083–1092.
- Sanchez-Prieto, R. et al., 1998. In vivo tumor suppressor effect of retrovirus-mediated gene transfer of the adenovirus E1a gene. *Advances in experimental medicine and biology*, 451, pp.79–86.
- Sanchez-Prieto, R., Lleonart, M. & Ramon y Cajal, S., 1995. Lack of correlation between p53 protein level and sensitivity of DNA-damaging agents in keratinocytes carrying adenovirus E1a mutants. *Oncogene*, 11(4), pp.675–682.
- Sankar, N., Kadeppagari, R.-K. & Thimmapaya, B., 2009. c-Myc-induced aberrant DNA synthesis and activation of DNA damage response in p300 knockdown cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(22), pp.15193–15205.
- Sartorelli, V. et al., 1999. Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program. *Molecular Cell*, 4(5), pp.725–734.
- Sawka, C.A. et al., 1997. A randomized crossover trial of tamoxifen versus ovarian ablation for metastatic breast cancer in premenopausal women: a report of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC CTG) trial MA.1. *Breast cancer research and treatment*, 44(3), pp.211–215.
- Sánchez-Pérez, I. et al., 2000. CL100/MKP-1 modulates JNK activation and apoptosis in response to cisplatin. *Oncogene*, 19(45), pp.5142–5152.

- Schaeper, U. et al., 1995. Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(23), pp.10467–10471.
- Seo, H.K. et al., 2014. Development of replication-competent adenovirus for bladder cancer by controlling adenovirus E1a and E4 gene expression with the survivin promoter. *Oncotarget*, 5(14), pp.5615–5623.
- Serrano, M. et al., 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88(5), pp.593–602.
- Shao, R. et al., 2001. E1A inhibition of radiation-induced NF-kappaB activity through suppression of IKK activity and IkappaB degradation, independent of Akt activation. *Cancer Research*, 61(20), pp.7413–7416.
- Shao, R. et al., 1999. E1A sensitizes cells to tumor necrosis factor-induced apoptosis through inhibition of IkappaB kinases and nuclear factor kappaB activities. *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), pp.21495–21498.
- Shao, R. et al., 1997. Inhibition of nuclear factor-kappaB activity is involved in E1A-mediated sensitization of radiation-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272(52), pp.32739–32742.
- Shi, Y. et al., 1991. Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Krüppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell*, 67(2), pp.377–388.
- Shifera, A.S. & Hardin, J.A., 2009. PMA induces expression from the herpes simplex virus thymidine kinase promoter via the activation of JNK and ERK in the presence of adenoviral E1A proteins. *Archives of biochemistry and biophysics*, 490(2), pp.145–157.
- Shiroki, K. et al., 1981. Incomplete transformation of rat cells by a deletion mutant of adenovirus type 5. *Journal of Virology*, 38(3), pp.1048–1054.
- Sinkovics, J. & Horvath, J., 1993. New developments in the virus therapy of cancer: a historical review. *Intervirology*, 36(4), pp.193–214.
- Sioud, M., 2007. An overview of the immune system and technical advances in tumor antigen discovery and validation. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 360, pp.277–318.
- Sklar, M.D., 1988. Increased resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II) in NIH 3T3 cells transformed by ras oncogenes. *Cancer Research*, 48(4), pp.793–797.
- Small, E.J., 2006. Placebo-Controlled Phase III Trial of Immunologic Therapy with Sipuleucel-T (APC8015) in Patients with Metastatic, Asymptomatic Hormone Refractory Prostate Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 24(19), pp.3089–3094.
- Smith, C.L. et al., 1989. Phosphorylation of serine residue 89 of human adenovirus E1A proteins is responsible for their characteristic electrophoretic mobility shifts, and its mutation affects biological function. *Journal of Virology*, 63(4), pp.1569–1577.
- Smits, P.H. et al., 1996. The adenovirus E1A-associated 300 kDa adaptor protein counteracts the inhibition of the collagenase promoter by E1A and represses transformation. *Oncogene*, 12(7), pp.1529–1535.
- Somasundaram, K. & El-Deiry, W.S., 1997. Inhibition of p53-mediated transactivation and cell cycle arrest by E1A through its p300/CBP-interacting region. *Oncogene*, 14(9), pp.1047–1057.
- Souers, A.J. et al., 2013. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine*, 19(2), pp.202–208.

Bibliografía

- Stanbridge, E.J., 1976. Suppression of malignancy in human cells. *Nature*, 260(5546), pp.17–20.
- Standiford, D.M. & Richter, J.D., 1992. Analysis of a developmentally regulated nuclear localization signal in *Xenopus*. *The Journal of cell biology*, 118(5), pp.991–1002.
- Stehelin, D. et al., 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*, 260(5547), pp.170–173.
- Stephens, C. & Harlow, E., 1987. Differential splicing yields novel adenovirus 5 E1A mRNAs that encode 30 kd and 35 kd proteins. *The EMBO Journal*, 6(7), pp.2027–2035.
- Stratton, M.R., Campbell, P.J. & Futreal, P.A., 2009. The cancer genome. *Nature*, 458(7239), pp.719–724.
- Su, J.L. et al., 2011. FOXO3a-Dependent Mechanism of E1A-Induced Chemosensitization. *Cancer Research*, 71(21), pp.6878–6887.
- Sutlu, T. & Alici, E., 2009. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *Journal of Internal Medicine*, 266(2), pp.154–181.
- Tanimoto, T., Hori, A. & Kami, M., 2010. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 363(20), pp.1966–author reply 1967–8.
- Tazawa, H. et al., 2012. Genetically engineered oncolytic adenovirus induces autophagic cell death through an E2F1- microRNA-7-epidermal growth factor receptor axis. *International Journal of Cancer*, 131(12), pp.2939–2950.
- Tazawa, H., Kagawa, S. & Fujiwara, T., 2013a. Oncolytic adenovirus-induced autophagy: tumor-suppressive effect and molecular basis. *Acta medica Okayama*, 67(6), pp.333–342.
- Tazawa, H., Kagawa, S. & Fujiwara, T., 2013b. Oncolytic adenovirus-induced autophagy: tumor-suppressive effect and molecular basis. *Acta medica Okayama*, 67(6), pp.333–342.
- Thomas, M.J. & Seto, E., 1999. Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene*, 236(2), pp.197–208.
- Torchilin, V.P., 2005. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(2), pp.145–160.
- Toucheffeu, Y., Vassaux, G. & Harrington, K.J., 2011. Oncolytic viruses in radiation oncology. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 99(3), pp.262–270.
- Tremblay, M.L. et al., 1988. Identification of the phosphorylation sites in early region 1A proteins of adenovirus type 5 by amino acid sequencing of peptide fragments. *Journal of Biological Chemistry*, 263(13), pp.6375–6383.
- Trimarchi, J.M. & Lees, J.A., 2002. Sibling rivalry in the E2F family. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(1), pp.11–20.
- Tsao, M.-S. et al., 2007. Prognostic and predictive importance of p53 and RAS for adjuvant chemotherapy in non small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(33), pp.5240–5247.
- Tseng, W.C., Haselton, F.R. & Giorgio, T.D., 1999. Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes. *Biochimica et biophysica acta*, 1445(1), pp.53–64.
- Tworkowski, K.A. et al., 2008. Adenovirus E1A targets p400 to induce the cellular oncoprotein Myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(16), pp.6103–6108.

- Ueno, N.T., Bartholomeusz, C., Herrmann, J.L., Estrov, Z., Shao, R., Andreeff, M., Price, J., Paul, R.W., Anklesaria, P., Yu, D. & Hung, M.-C., 2000a. E1A-mediated paclitaxel sensitization in HER-2/neu-overexpressing ovarian cancer SKOV3.ip1 through apoptosis involving the caspase-3 pathway. *Clinical Cancer Research*, 6(1), pp.250–259.
- Ueno, N.T., Bartholomeusz, C., Herrmann, J.L., Estrov, Z., Shao, R., Andreeff, M., Price, J., Paul, R.W., Anklesaria, P., Yu, D. & Hung, M.-C., 2000b. E1A-mediated paclitaxel sensitization in HER-2/neu-overexpressing ovarian cancer SKOV3.ip1 through apoptosis involving the caspase-3 pathway. *Clinical Cancer Research*, 6(1), pp.250–259.
- Valero, M.L. et al., 2014. E1a promotes c-Myc-dependent replicative stress: implications in glioblastoma radiosensitization. *Cell Cycle*, 13(1), pp.52–61.
- van den Elsen, P.J., Houweling, A. & van der Eb, A.J., 1983. Morphological transformation of human adenoviruses is determined to a large extent by gene products of region E1a. *Virology*, 131(1), pp.242–246.
- Vejjongsang, P. & Yeh, E.T.H., 2014. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. *Journal of the American College of Cardiology*, 64(9), pp.938–945.
- Vicent, S. et al., 2004. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and is an independent predictor of outcome in patients. *Clinical Cancer Research*, 10(11), pp.3639–3649.
- Villaret, D. et al., 2002. A multicenter phase II study of tgDCC-E1A for the intratumoral treatment of patients with recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *Head & neck*, 24(7), pp.661–669.
- Volpers, C. & Kochanek, S., 2004. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *The journal of gene medicine*, 6 Suppl 1(S1), pp.S164–71.
- Vose, J.M. et al., 2000. Multicenter phase II study of iodine-131 tositumomab for chemotherapy-relapsed/refractory low-grade and transformed low-grade B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Journal of Clinical Oncology*, 18(6), pp.1316–1323.
- Vries, R.G. et al., 2001. A specific lysine in c-Jun is required for transcriptional repression by E1A and is acetylated by p300. *The EMBO Journal*, 20(21), pp.6095–6103.
- Wang, J. et al., 2009. Involvement of MKP-1 and Bcl-2 in acquired cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cell Cycle*, 8(19), pp.3191–3198.
- Wang, Q. et al., 2014. Retaining MKP1 expression and attenuating JNK-mediated apoptosis by RIP1 for cisplatin resistance through miR-940 inhibition. *Oncotarget*, 5(5), pp.1304–1314.
- Wang, W.-J. et al., 2013. MYC regulation of CHK1 and CHK2 promotes radioresistance in a stem cell-like population of nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Research*, 73(3), pp.1219–1231.
- Wang, X., Martindale, J.L. & Holbrook, N.J., 2000. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(50), pp.39435–39443.
- Wang, Y., Albert, D.M. & Shenk, T., 1994. Adenovirus E1A expression controlled by the red pigment promoter in transgenic mice: a model for developmental abnormalities of the eye. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 5(10), pp.1061–1068.
- Wang, Z. et al., 2006. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is required for cisplatin resistance. *Cancer Research*, 66(17), pp.8870–8877.
- Wei, F., Wang, H., Chen, X., Li, C. & Huang, Q., 2014a. Dissecting the roles of E1A and E1B in adenoviral replication and RCAd-enhanced RAd transduction efficacy on tumor cells. *Cancer*

- Biology & Therapy*, 15(10), pp.1358–1366.
- Wei, F., Wang, H., Chen, X., Li, C. & Huang, Q., 2014b. Dissecting the roles of E1A and E1B in adenoviral replication and RCAd-enhanced RAd transduction efficacy on tumor cells. *Cancer Biology & Therapy*, 15(10), pp.1358–1366.
- Weigel, S. & Dobbelstein, M., 2000. The nuclear export signal within the E4orf6 protein of adenovirus type 5 supports virus replication and cytoplasmic accumulation of viral mRNA. *Journal of Virology*, 74(2), pp.764–772.
- Whalen, S.G. et al., 1996. Importance of the Ser-132 phosphorylation site in cell transformation and apoptosis induced by the adenovirus type 5 E1A protein. *Journal of Virology*, 70(8), pp.5373–5383.
- Whyte, P. et al., 1988. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature*, 334(6178), pp.124–129.
- Whyte, P., Williamson, N.M. & Harlow, E., 1989. Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell*, 56(1), pp.67–75.
- Wilhelm, S. & Chien, D.-S., 2002. BAY 43-9006: preclinical data. *Current pharmaceutical design*, 8(25), pp.2255–2257.
- Wilhelm, S.M. et al., 2004. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Research*, 64(19), pp.7099–7109.
- Wiseman, G.A. et al., 1999. Radioimmunotherapy of relapsed non-Hodgkin's lymphoma with zevalin, a 90Y-labeled anti-CD20 monoclonal antibody. *Clinical Cancer Research*, 5(10 Suppl), pp.3281s–3286s.
- Wold, W.S., Hermiston, T.W. & Tollefson, A.E., 1994. Adenovirus proteins that subvert host defenses. *Trends in Microbiology*, 2(11), pp.437–443.
- Wolff, D. et al., 2009. Volumetric modulated arc therapy (VMAT) vs. serial tomotherapy, step-and-shoot IMRT and 3D-conformal RT for treatment of prostate cancer. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 93(2), pp.226–233.
- Wu, D.-W. et al., 2014. Phosphorylation of paxillin confers cisplatin resistance in non-small cell lung cancer via activating ERK-mediated Bcl-2 expression. *Oncogene*, 33(35), pp.4385–4395.
- Wu, J.T. & Kral, J.G., 2005. The NF-kappaB/IkappaB signaling system: a molecular target in breast cancer therapy. *The Journal of surgical research*, 123(1), pp.158–169.
- Wu, Q. et al., 2009. Adaptive replanning strategies accounting for shrinkage in head and neck IMRT. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 75(3), pp.924–932.
- Xing, X. et al., 1997. Safety studies of the intraperitoneal injection of E1A--liposome complex in mice. *Gene Therapy*, 4(3), pp.238–243.
- Xing, X. et al., 1998. Safety study and characterization of E1A-liposome complex gene-delivery protocol in an ovarian cancer model. *Gene Therapy*, 5(11), pp.1538–1544.
- Xu, B. et al., 2002. Two molecularly distinct G(2)/M checkpoints are induced by ionizing irradiation. *Molecular and Cellular Biology*, 22(4), pp.1049–1059.
- Yang, G. et al., 2014. Antitumor effects of a dual cancer-specific oncolytic adenovirus on colorectal cancer in vitro and in vivo. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9(2), pp.1–8.
- Yang, S.-F. et al., 2015. Coriolus versicolor mushroom polysaccharides exert immunoregulatory

- effects on mouse B cells via membrane Ig and TLR-4 to activate the MAPK and NF- κ B signaling pathways. *Molecular immunology*, 64(1), pp.144–151.
- Yang, X.D. et al., 2001. Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Critical reviews in oncology/hematology*, 38(1), pp.17–23.
- Yang, X.J. et al., 1996. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, 382(6589), pp.319–324.
- Yang, Y., McKerlie, C., Borenstein, S.H., Lu, Z., Schito, M., Chamberlain, J.W. & Buchwald, M., 2002a. Transgenic Expression in Mouse Lung Reveals Distinct Biological Roles for the Adenovirus Type 5 E1A 243- and 289-Amino-Acid Proteins. *Journal of Virology*, 76(17), pp.8910–8919.
- Yang, Y., McKerlie, C., Borenstein, S.H., Lu, Z., Schito, M., Chamberlain, J.W. & Buchwald, M., 2002b. Transgenic Expression in Mouse Lung Reveals Distinct Biological Roles for the Adenovirus Type 5 E1A 243- and 289-Amino-Acid Proteins. *Journal of Virology*, 76(17), pp.8910–8919.
- Yarden, R.I. et al., 2002. BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nature genetics*, 30(3), pp.285–289.
- Yi, Y., Noh, M.J. & Lee, K.H., 2011. Current advances in retroviral gene therapy. *Current gene therapy*, 11(3), pp.218–228.
- Yin, H. et al., 2014. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nature biotechnology*, 32(6), pp.551–553.
- Yoo, G.H. et al., 2001. Phase I trial of intratumoral liposome E1A gene therapy in patients with recurrent breast and head and neck cancer. *Clinical Cancer Research*, 7(5), pp.1237–1245.
- Yoon, Y.-K. et al., 2010. KRAS mutant lung cancer cells are differentially responsive to MEK inhibitor due to AKT or STAT3 activation: implication for combinatorial approach. *Molecular Carcinogenesis*, 49(4), pp.353–362.
- Yu, D. et al., 1993. Enhanced c-erbB-2/neu expression in human ovarian cancer cells correlates with more severe malignancy that can be suppressed by E1A. *Cancer Research*, 53(4), pp.891–898.
- Zarkowska, T. & Mitnacht, S., 1997. Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 272(19), pp.12738–12746.
- Zeman, M.K. & Cimprich, K.A., 2013. Causes and consequences of replication stress. *Nature Cell Biology*, 16(1), pp.2–9.
- Zerler, B. et al., 1986. Adenovirus E1A coding sequences that enable ras and pmt oncogenes to transform cultured primary cells. *Molecular and Cellular Biology*, 6(3), pp.887–899.
- Zhang, Q. et al., 2011. The oncogenic role of Yin Yang 1. *Critical reviews in oncogenesis*, 16(3-4), pp.163–197.
- Zhang, Y. & Hunter, T., 2013. Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy. *International Journal of Cancer*, 134(5), pp.1013–1023.
- Zhang, Y. et al., 1995. HER-2/neu-targeting cancer therapy via adenovirus-mediated E1A delivery in an animal model. *Oncogene*, 10(10), pp.1947–1954.
- Zhou, W.Z. et al., 1999. Protective immunization against melanoma by gp100 DNA-HVJ-liposome vaccine. *Gene Therapy*, 6(10), pp.1768–1773.
- Zhou, Z. et al., 2003. E1A gene therapy inhibits angiogenesis in a Ewing's sarcoma animal model. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(12), pp.1313–1319.

Anexo

El siguiente trabajo ha dado lugar, como resultado, a ocho publicaciones científicas. A continuación se relaciona la lista de artículos publicados durante este periodo:

ERK5/BMK1 is a novel target of the tumor suppressor VHL: implication in clear cell renal carcinoma. *Neoplasia*, 2013.

Laura Arias-González, Inmaculada Moreno-Gimeno, Antonio Rubio del Campo, Leticia Serrano-Oviedo, María Llanos Valero, Azucena Esparis-Ogando, Miguel Ángel de la Cruz-Morcillo, Pedro Melgar-Rojas, Jesús García-Cano, **Francisco J. Cimas**, María José Ruiz Hidalgo, Alfonso Prado, Juan Luis Callejas-Valera, Syong Hyun Nam-Cha, José Miguel Giménez-Bachs, Antonio S. Salinas-Sánchez, Atanasio Pandiella, Luis del Peso and Ricardo Sánchez Prieto.

Abrogation of the p38 MAPK α signaling pathway does not promote radioresistance but its activity is required for 5-Fluorouracil-associated radiosensitivity. *Cancer Letters*, 2013.

Miguel A. de la Cruz-Morcillo, Jesús García-Cano, Laura Arias-González, Elena García-Gil, Francisco Artacho-Cordón, Sandra Ríos-Arrabal, María L. Valero, **Francisco J. Cimas**, Leticia Serrano-Oviedo, María V. Villas, Jesús Romero-Fernández, María I. Núñez, Ricardo Sánchez-Prieto.

E1a promotes c-Myc-dependent replicative stress: Implications in glioblastoma radiosensitization. *Cell Cycle*, 2014.

María Llanos Valero, **Francisco J. Cimas**, Laura Arias, Pedro Melgar-Rojas, Elena García, Juan Luis Callejas-Valera, Jesús García-Cano, Leticia Serrano-Oviedo, Miguel Ángel de la Cruz-Morcillo, Isabel Sánchez-Pérez, Ricardo Sánchez-Prieto.

Exploiting the potential of autophagy in cisplatin therapy: A new strategy to overcome resistance. *Oncotarget*, 2015.

Jesús García-Cano, Gorbachev Ambroise, Raquel Pascual-Serra, M Carmen Carrión, Leticia Serrano-Oviedo, Marta Ortega-Muelas, **Francisco J. Cimas**, Sebastià Sabater, María José Ruiz-Hidalgo, Isabel Sanchez Perez, Antonio Mas, Félix A. Jalón, Aimé Vazquez, Ricardo Sánchez-Prieto.

MKP1 mediates chemosensitizer effects of E1a in response to cisplatin in Non-Small Cell Lung carcinoma cells, *Oncotarget*, 2015.

Francisco J. Cimas, Callejas-Valera JL, Pascual-Serra R, García-Cano J, Garcia-Gil E, De la Cruz-Morcillo MA, Ortega-Muelas M, Serrano-Oviedo L. Gutkind JS, Sánchez-Prieto R.

MKP1: Jekyll and Hyde for E1A. *Aging*, 2016

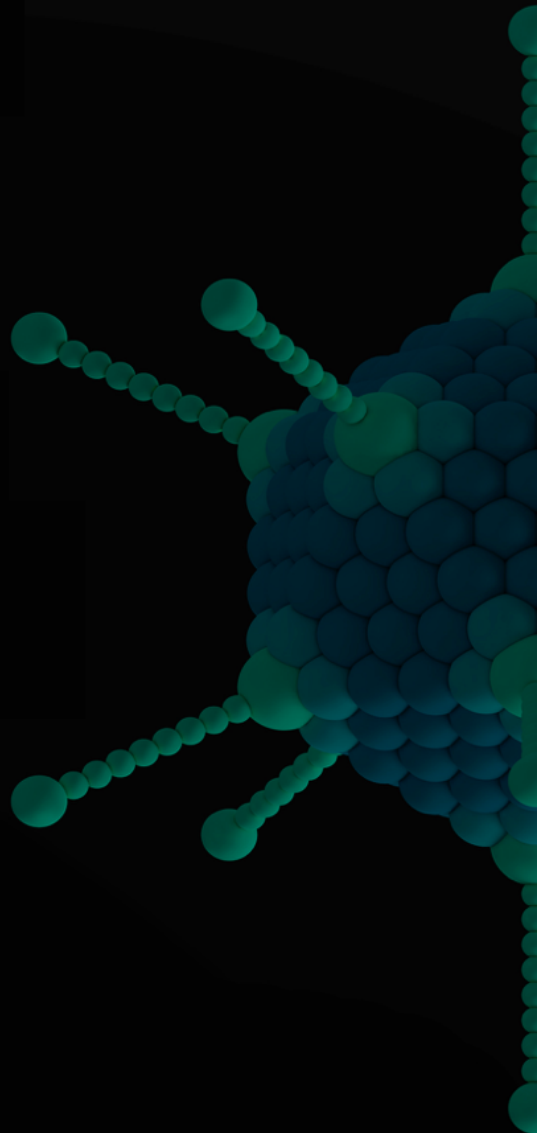
Francisco J. Cimas, Callejas-Valera JL, Sánchez-Prieto R.

HCV RNA-dependent RNA polymerase interacts with Akt/PKB inducing its subcellular re-localization. *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*, 2016.

María Llanos-Valero*, Rosario Sabariego*, **Francisco J. Cimas***, Celia Perales, Esteban Domingo, Ricardo Sánchez-Prieto, Antonio Mas.

p38MAPK and Chemotherapy: We Always Need to Hear Both Sides of the Story. *Frontiers in Cell & Developmental Biology*, 2016.

Jesús García-Cano*, Olga Roche*, **Francisco J. Cimas***, Raquel Pascual-Serra*, Marta Ortega-Muelas*, Diego M. Fernández-Aroca, Ricardo Sánchez-Prieto.



CENTRO REGIONAL DE
INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS



UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA
FACULTAD DE MEDICINA DE ALBACETE
Departamento de Ciencias Médicas