



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BILOGÍA MOLECULAR

Potenciación de la capacidad apoptótica y
oncolítica
del virus de la enfermedad de Newcastle
mediante el desarrollo de recombinantes con el
gen para el TNFRSF6
(FAS-Receptor).
Estudios “in vitro” e “in vivo”

SARA CUADRADO CASTAÑO
2012

DON **ENRIQUE VILLAR LEDESMA**, CATEDRATICO DE UNIVERSIDAD DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLGIA MOLECULAR, DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “ Potenciación de la capacidad apoptótica y oncolítica del virus de la enfermedad de Newcastle mediante el desarrollo de recombinantes con el gen para el TNFRSF6 (FAS-Receptor). Estudios “in vitro” e “in vivo” “, que para optar al grado de Doctor en Biología presenta Doña Sara Cuadrado Castaño, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca.

Considerando que dicho trabajo se halla concluido, autoriza su presentación para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firma el presente certificado en Salamanca a 27 de Junio de 2012.

Dr. Enrique Villar Ledesma.

“Las ideas no duran mucho. Hay que hacer algo con ellas”
Santiago Ramón y Cajal.

AGRADECIMIENTOS.

A Enrique Villar Ledesma, por introducirme en la investigación, creer en mi y en mis ideas y proporcionarme todos los medios para desarrollarlas. Gracias con mayúsculas.

A Adolfo García-Sastre, por su generosidad y ayuda en la fase final de este trabajo y por darme la oportunidad de seguir mi carrera como investigadora formando parte de su equipo.

A Juan Ayllón, por guiarme en mis primeros pasos en este mundo, por su ayuda y su amistad.

A Javier Holguera y Jose Luis Sardina, por su compañerismo y, sobre todo, por toda su paciencia.

A Marín Perez-Andrés y a Verónica Gonzalez Nuñez, por ser unos excelentes jóvenes investigadores, unos increíbles amigos y por sus consejos y apoyo.

A Isabel Muñoz Barroso por estar siempre dispuesta a ayudarme. A Valery Shnyrov, por ser todo un ejemplo de una vida dedicada a la investigación.

A los becarios del departamento, Guiller, Bea, Violeta y muy en especial a Irene, por hacer mas llevadero el laboratorio y por hacerme sonreír, siempre.

A los “pequeños coreanos”, María, Eugenia y Nacho y a Jacinto, porque estáis siempre ahí pase lo que pase y estemos donde estemos.

A mi familia, mis lalos y mi tía Lisi por vuestra comprensión y cariño. A Niko.

A mi padre, Paco, por hacerme mirar siempre hacia el futuro, y a mis hermanos, Paco y Javier, por vivir conmigo mis ilusiones.

A mi madre, Manuela, por hacer que lo que parecía imposible haya sido siempre posible.

NOTA PRELIMINAR¹

Este trabajo se ha desarrollado con la concesión de una ayuda para la **contratación de personal investigador en formación**, concedida por la Junta de Castilla y León y cofinanciada por el Fondo Social Europeo. (EDU/330/2008; periodo 2008-20012).

La financiación de la presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a las subvenciones asignadas por los siguientes proyectos:

Bases Moleculares de los estadios tempranos de interacción virus-célula hospedadora. El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) como virus respiratorio modelo y como vector de expresión de proteínas foráneas implicadas en procesos patológicos. FIS PI051796.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca.

2006-2008

Responsable: Enrique Villar Ledesma.

Utilización del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) como herramienta molecular para el desarrollo de virus recombinantes con capacidad oncolítica. Junta de Castilla y León. SAN/1817/2008.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca.

2008

Responsable: Enrique Villar Ledesma.

El virus de la enfermedad de Newcastle, herramienta molecular para el estudio de la interacción virus-célula y de la aplicación de virus recombinantes que expresan proteínas implicadas en cáncer y otras patologías. FIS PI081813.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca.

2009-2011

Responsable: Enrique Villar Ledesma.

NOTA PRELIMINAR²

En el presente trabajo figuran numerosos términos en lengua inglesa.

A pesar de la riqueza del vocabulario castellano, hemos considerado más adecuado usar determinada terminología en inglés, debido a la complejidad, que en ocasiones, conlleva una traducción directa. Ello se ha hecho con el único fin de facilitar la lectura del texto, y siempre con términos cuyo uso en inglés está totalmente asumido por la comunidad científica. Del mismo modo se ha decidido respetar las abreviaturas de terminología científica en su forma inglesa original.

1. INTRODUCCION.	21
1.1. NDV: EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE.	21
1.1.1. TAXONOMIA.	21
1.1.2. LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE. CEPAS DEL NDV.	24
1.1.2.1. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE.	24
1.1.2.2. CEPAS DEL NDV.	25
1.1.3. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES Y GENETICAS DEL NDV.	26
1.1.3.1. ESTRUCTURA DEL VIRION.	26
1.1.3.2. ESTRUCTURA GENOMICA.	30
1.1.4. CICLO BIOLÓGICO.	32
1.1.4.1. RECONOCIMIENTO Y FUSION DE MEMBRANAS ENTRADA EN LA CELULA..	33
1.1.4.2. TRANSCRIPCION PRIMARIA.	34
1.1.4.3. REPLICACION.	35
1.1.4.4. ENSAMBLAJE Y LIBERACION.	36
1.1.5 VIROLOGIA MOLECULAR Y GENETICA INVERSA.	16
1.1.5.1. GENETICA INVERSA APLICADA A VIRUS RNA (-).	37
1.1.5.2. GENETICA INVERSA APLICADA AL NDV. RESCATE.	40
1.2. TNFRSF6 Y APOPTOSIS.	42
1.2.1. MUERTE CELULAR Y APOPTOSIS.	42
1.2.1.1. CONSIDERACIONES MORFOLOGICAS.	43
1.2.1.2. CASPASAS: EJECUCION DEL PROGRAMA DE MUERTE CELULAR.	45
1.2.1.3. VIA INTRINSECA O MITOCONDRIAL DE ACTIVACION DE APOPTOSIS.	47

INDICE

1.2.1.4. VIA EXTRINSECA O DE RECEPTORES DE MUERTE CELULAR.	49
1.2.1.5. FASE EJECUTORA.	51
1.2.1.6. ELIMINACION DE LAS CELULAS APOPTOTICAS. FAGOCITOSIS.	53
1.2.2. TNFRSF6.	54
1.2.2.1. ESTRUCTURA.	54
1.2.2.2. EL SISTEMA FAS/FAS _L	56
1.2.2.2.1. EL LIGANDO DE FAS: FAS _L	56
1.2.2.2.2. ESQUEMA GENERAL DE ACTIVACION.	57
1.2.2.2.3. MODULACION Y REGULACION DE LA SEÑALIZACION MEDIADA POR FAS...	61
1.2.2.3. OTROS EFECTOS LIGADOS A FAS: ACTIVACION INDEPENDIENTE DE LIGANDO, NECROSIS REGULADA Y EFECTO CITOTOXICO DEL SISTEMA PERFORINA- GRANZIMA.	62
1.2.2.3.1. ACTIVACION INDEPENDIENTE DE LIGANDO.	62
1.2.2.3.2. NECROSIS REGULADA.	63
1.2.2.3.3. SISTEMA PERFORINA-GRANZIMA.	63
1.2.2.4. IMPORTANCIA FISIOPATOLOGICA DE FAS.	64
1.3. VIROTERAPIA. EL NDV Y SU CAPACIDAD ONCOLITICA.	67
1.3.1. VIROTERAPIA.	67
1.3.2. EL NDV Y SU POTENCIAL ONCOLITICO.	68
1.3.3. ESTUDIO Y POTENCIACION DE LA CAPACIDAD ONCOLITICA MEDIANTE EL RESCATE DE NDV RECOMBINANTES.	71
2. OBJETIVOS.	73
3. MATERIAL Y METODOS.	75
3.1. MATERIAL DE LABORATORIO, REACTIVOS Y RECURSOS.	75

INDICE

3.1.1. APARATOS Y MATERIAL DE LABORATORIO.	75
3.1.2. REACTIVOS.	76
3.1.3. RECURSOS INFORMÁTICOS Y BASES DE DATOS.	79
3.2. MATERIAL BIOLÓGICO.	80
3.2.1. LÍNEAS CELULARES Y MANTENIMIENTO.	80
3.2.1.1. LÍNEAS CELULARES.	80
3.2.1.2 MEDIOS Y SOLUCIONES PARA CULTIVO CELULAR.	80
3.2.2. CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO.	80
3.2.2.1. CEPAS BACTERIANAS.	80
3.2.2.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO BACTERIANO.	81
3.2.3. VIRUS.	81
3.2.4. HUEVOS EMBRIONADOS.	83
3.2.5 LÍNEAS DE RATÓN.	83
3.3. MATERIAL GENÉTICO. PLÁSMIDOS.	84
3.3.1. pTM1: pTM1-NP, pTM1-P y pTM1-L.	84
3.3.2. pGEM-NDV-F-TMCyt.	85
3.3.3. pNDV-B1.	86
3.3.4. pL430.	88
3.4 MÉTODOS.	89
3.4.1. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS EMPLEADOS EN LA MANIPULACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO.	89
3.4.1.1. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA PCR	89

INDICE

3.4.1.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA. PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR.	91
3.4.1.2.1. PCR	91
3.4.1.2.2. PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR.	92
3.4.1.3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.	93
3.4.1.4. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA DESDE EL GEL DE AGAROSA.	93
3.4.1.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DNA y RNA.	94
3.4.1.6. SECUENCIACIÓN DEL DNA.	94
3.4.1.7. DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.	95
3.4.1.8. CONSTRUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES	96
3.4.1.8.1. LIGACIÓN	96
3.4.1.8.2. TRANSFORMACIÓN.....	97
3.4.1.8.3. PURIFICACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO.....	97
3.4.1.9. SELECCIÓN DE CLONES POR PCR SOBRE COLONIAS.	99
3.4.1.10. PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS EN GRADIENTE CONTINUO DE CLORURO DE CESIO.	100
3.4.2. METODOLOGÍA DEL RESCATE DE VIRUS RECOMBINANTES.	101
3.4.2.1. INFECCIÓN DE CÉLULAS EN CULTIVO CON EL VIRUS MVA-T7.	101
3.4.2.2. TRANSFECCIÓN CON LIPOFECTAMÍNA.....	102
3.4.2.3. COCULTIVO CON FIBROBLASTOS DE POLLO.....	102
3.4.2.4. INFECCIÓN DE HUEVOS EMBRIONADOS.....	103
3.4.2.5. EXTRACCIÓN DEL LÍQUIDO ALANTOIDEO.	104
3.4.2.6. VALIDACIÓN DEL RESCATE.	104
3.4.2.7. CRECIMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS VIRUS NDVs .TITULACIÓN.	105

3.4.3. CARACTERIZACIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES.	107
3.4.3.1. ESTABILIDAD DE LA SECUENCIA INSERTADA. RT-PCR.	108
3.4.3.1.1 .EXTRACCIÓN DEL RNA DE CÉLULAS INFECTADAS.	108
3.4.3.1.2. RT-PCR.	108
3.4.3.2. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS VÍRICAS Y RECOMBINANTES. INMUNOFLUORESCENCIA Y WESTERN BLOT.	109
3.4.3.2.1. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS VÍRICAS Y RECOMBINANTES. VISUALIZACIÓN MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA.	111
3.4.3.2.2. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y VÍRICAS DURANTE LA INFECCIÓN. CARACTERIZACIÓN DEL VIRIÓN.	113
3.4.4.3. CAPACIDAD REPLICATIVA DE LOS VIRUS RESCATADOS. CURVAS DE CRECIMIENTO	116
3.4.4. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO DE LA CAPACIDAD APOPTÓTICA DE LOS VIRUS RECOMBINANTES EN MODELOS CELULARES.	118
3.4.4.1. TINCIÓN CELULAR CON CRISTAL VIOLETA.	118
3.4.4.2. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR.	118
3.4.4.3. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS VÍRICAS Y ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.	119
3.4.4.4. DOBLE MARCAJE ANEXINA-V/IODURO DE PROPIDIO PARA CITOMETRÍA DE FLUJO.....	121
3.4.4.5. DOBLE MARCAJE ANEXINA-V/IODURO PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.	124
3.4.4.6. ESTUDIO DEL CICLO CELULAR Y ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.	124
3.4.4.7. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE DNA SUBGENÓMICO.	126
3.4.4.8. ANÁLISIS DEL PATRÓN DE ACTIVACIÓN DE CASPASAS.	127
3.4.5. METODOLOGÍA APLICADA AL ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ONCOLÍTICA DE LOS VIRUS RECOMBINANTES EN TUMORES SOLIDOS.	130
3.4.5.1. GENERACIÓN DE TUMORES SOLIDOS EN MODELO MURÍNO.	130

3.4.5.2. INFECCIÓN DE TUMORES SOLIDOS. ESTUDIO DE LA PROGRESIÓN TUMORAL.	131
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	133
4.1 RESCATE DE LOS VIRUS RECOMBINANTES rNDV-B1, rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX.	133
4.1.1. ESTRATEGIA DE CLONACIÓN. GENERACIÓN DE LOS VECTORES pNDV-B1/Fas y pNDV-B1/Fex.	133
4.1.1.1. GENERACIÓN DE LOS INSERTOS Fas y Fex (Fas-Nt).	134
4.1.1.1.1. pNDV-B1/Fex.	134
4.1.1.1.1.1 CLONACIÓN DE Fex EN EL VECTOR LANZADERA pGEM-NDV-F\TMCyt.	134
4.1.1.1.1.2. CLONACIÓN DE Fex\F-TMCyt EN pNDV-B1.	136
4.1.1.1.2. CLONACIÓN DE Fas EN pNDV-B1.	137
4.1.2. SECUENCIACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS pNDV-B1/Fas y pNDV-B1/Fex.	141
4.1.3. RESCATE DE LOS VIRUS RECOMBINANTES rNDV-B1, rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX. ...	142
4.1.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS VIRUS RECOMBINANTES.	143
4.1.4.1. CAPACIDAD REPLICATIVA DE LOS VIRUS: CINÉTICA DEL CRECIMIENTO.	143
4.1.4.2. ESTABILIDAD DE LOS INSERTOS Fas y Fex EN LOS VIRUS RESCATADOS.	146
4.1.4.3. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS FAS Y FEX EN CÉLULAS INFECTADAS.	148
4.1.4.3.1. INMUNODETECCIÓN Y VISUALIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.	148
4.1.4.3.2. INMUNODETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS FAS Y FEX EN EXTRACTOS PROTEICOS CELULARES.	150
4.1.4.3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS VIRIONES DE LOS VIRUS RECOMBINANTES RESCATADOS.	151
4.2. CAPACIDAD APOPTÓTICA DE LOS VIRUS rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX.	153
4.2.1. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS FAS Y FEX EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES. ...	153

INDICE

4.2.1.1. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DEL RECEPTOR FAS EN CÉLULAS HeLa.	155
4.2.1.2. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA FEX EN CÉLULAS HeLa.	159
4.2.2. ESTUDIO DE LA CITOPATOCIDAD ASOCIADA A LA INFECCIÓN DE LOS VIRUS rNDV/B1, rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX.	162
4.2.2.1. EXPRESIÓN MORFOLÓGICA DEL EFECTO CITOPÁTICO (CPE) INDUCIDO POR LOS VIRUS rNDV/B1, rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX.	162
4.2.2.2. ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DERIVADA DE LA INFECCIÓN CON LOS VIRUS rNDV-B1/FAS , rNDV/B1, y rNDV-B1/FEX.	164
4.2.2.3. ALTERACIONES EN EL CICLO CELULAR DE CÉLULAS INFECTADAS.....	169
4.2.3. ANÁLISIS DE LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR PARTE DE LOS VIRUS rNDV- B1/FAS rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX.....	173
4.2.4. ANÁLISIS DEL PROGRAMA DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS MEDIADO POR CASPASAS	180
4.2.5. ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA EN CÉLULAS INFECTADAS POR LOS VIRUS rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX.....	185
4.3. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ONCOLÍTICA DE LOS VIRUS RECOMBINANTES rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX EN TUMORES SOLIDOS.	188
5. CONCLUSIONES.	201
6. BIBLIOGRAFÍA.	203
7. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.	219

TABLAS.

1. VIRUS RNA (-).TAXONOMÍA.....	23
2. INGENIERÍA GENÉTICA ASOCIADA A VIRUS DNA Y RNA (+).....	37
3. RESCATE DE NDV RECOMBINANTES PARA EL ESTUDIO O MODIFICACIÓN DE SU CAPACIDAD ONCOLÍTICA.	72
4. LÍNEAS CELULARES INCLUIDAS EN ESTE TRABAJO.....	81
5. MEDIOS Y SOLUCIONES DE CULTIVO.	82
6. MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANO.	83
7. OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA EL PROCESO DE CLONACIÓN.	91
8. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN LOS PROCEDIMIENTOS DE PCR, RT-PCR Y SECUENCIACIÓN.....	95
9. ANTICUERPOS Y DILUCIONES USADAS EN LOS PROCEDIMIENTOS DE INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y CARACTERIZACIÓN DEL VIRIÓN.	115
10. CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA DETECCIÓN DE CASPASAS MEDIANTE WESTERN BLOT.	129

FIGURAS.

1. ESTRUCTURA DEL VIRIÓN DEL NDV.	27
2. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL GENOMA DEL NDV.	31
3. CICLO BIOLÓGICO DEL NDV.	33
4. ESQUEMA GENERAL DEL RESCATE DE VIRUS RNA (-) NO SEGMENTADOS.	41
5. ESTRUCTURA DE LAS PRINCIPALES CASPASAS INICIADORAS Y EJECUTORAS.	46
6. VÍA INTRÍNSECA O MITOCONDRIAL DE ACTIVACIÓN DE APOPTOSIS.	49
7. TNFRSF6	55
8. ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR FAS. INTERACCIÓN CON EL ADAPTADOR FADD.	58

INDICE

9.	PASOS EN LA ACTIVACIÓN DE LA PROCASPASA-8 A NIVEL DE DISC.	59
10.	RUTA DE SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR EL RECEPTOR FAS.	60
11.	MAPA DEL VECTOR pTM1. PLÁSMIDOS pTM1-P, -NP Y L.	85
12.	MAPA DEL VECTOR pGEM-NDV-F-TMCyt.	86
13.	MAPA DEL VECTOR pNDV-B1.	87
14.	MAPA DEL VECTOR pL430.	88
15.	ESTRATEGIAS DE CLONACIÓN EN pNDV-B1.	90
16.	ANATOMÍA DE UN HUEVO DE POLLO EMBRIONADO DE 10 DÍAS Y PROCEDIMIENTO DE INFECCIÓN.	105
17.	CURVA DE CRECIMIENTO DE UN VIRUS.	117
18.	INMUNODETECCIÓN DE LA INFECCIÓN POR NDV MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.	121
19.	IDENTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES EN UN ENSAYO DE DOBLE MARCAJE ANEXINA-IP.	123
20.	SUBPOBLACIONES DIFERENCIABLES SEGÚN LA FASE DE CICLO CELULAR EN UN ENSAYO DE INFECCIÓN Y TRATAMIENTO CON RNAsa-IP.	125
21.	ESQUEMA DEL PROCESO DE CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES pNDV-B1/Fas y pNDV-B1/Fex.....	133
22.	AMPLIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS Fas y Fex POR PCR. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.	134
23.	CLONACIÓN DEL INSERTO Fex. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.	135
24.	SECUENCIAS DE RECONOCIMIENTO PARA XbaI Y NheI.	137
25.	DISEÑO DEL ENSAYO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN PARA LA VALIDACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES pNDV-B1/Fex. ..	138
26.	CLONACIÓN DE Fas EN pNDV-B1.	139
27.	VALIDACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES pNDV-B1/Fas y pNDV-B1/Fex.	140
28.	SECUENCIA Fas EN EL VECTOR pNDV-B1/Fas.	141

INDICE

29.	SECUENCIA Fex EN EL VECTOR pNDV-B1/Fex.	142
30.	RESCATE DE VIRUS RECOMBINANTES.	144
31.	CAPACIDAD REPLICATIVA DE LOS VIRUS rNDV-B1, rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX EN CÉLULAS VERO.	145
32.	ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LAS SECUENCIAS Fas y Fex. RT-PCR.	147
33.	DETECCIÓN DE PROTEÍNAS VÍRICAS.	149
34.	INMUNODETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS FAS Y FEX EN EXTRACTOS CELULARES.	151
35.	DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS FAS Y FEX EN LOS VIRIONES DE LOS VIRUS RESCATADOS. WESTERN BLOT.	152
36.	EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS FAS Y FEX DURANTE LA INFECCIÓN DE DIFERENTES LÍNEAS CELULARES.	153
37.	CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE FAS EN CÉLULAS HeLa.	154
38.	CÉLULAS HeLa INFECTADAS CON EL VIRUS rNDV-B1/FAS.	156
39.	LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DEL RECEPTOR FAS.	157
40.	INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA FAS EN EXTRACTOS PROTEICOS DE CÉLULAS HeLa.	158
41.	CÉLULAS HeLa INFECTADAS CON EL VIRUS rNDV-B1/FEX.	160
42.	LOCALIZACIÓN INTRACELULAR LA PROTEÍNA FEX.	161
43.	EFFECTO CITOPÁTICO EN CÉLULAS HeLa ASOCIADO A LA INFECCIÓN CON LOS VIRUS rNDV-B1, rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX.	163
44.	CAPACIDAD REPLICATIVA DE LOS VIRUS rNDV-B1, rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX EN CÉLULAS HeLa.	165
45.	ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR POST-INFECCIÓN MEDIANTE ENSAYO CON MTT.....	167

INDICE

46.	ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR.	170
47.	IMPACTO DE LA INFECCIÓN CON LOS VIRUS rNDV-B1/FAS, NDV-B1 y rNDV-B1/FEX SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS FASES DEL CICLO CELULAR.	171
48.	IDENTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN SUB-G0 EN MUESTRAS INFECTADAS CON LOS VIRUS rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX.	172
49.	DETECCIÓN DE LA EXTERNALIZACIÓN DE FOSFATIDILSERINA EN CÉLULAS INFECTADAS.....	173
50.	ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE DOBLE MARCAJE ANEXINA/IP (1).	175
51.	ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE DOBLE MARCAJE ANEXINA/IP (2).	177
52.	ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE DOBLE MARCAJE ANEXINA/IP (3).	179
53.	PATRÓN DE ACTIVACIÓN DE CASPASAS DESARROLLADO DURANTE LA INFECCIÓN CON LOS VIRUS rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX.	182
54.	DETECCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA INDUCIDA TRAS LA INFECCIÓN CON LOS VIRUS rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX.	186
55.	INFECCIÓN DE CÉLULAS B16-F10 Y CT26.	189
56.	ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO SEGUIDO PARA LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ONCOLÍTICA DE LOS VIRUS RECOMBINANTES rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX EN TUMORES SOLIDOS.....	190
57.	PRIMER ENSAYO EN MODELO SINGÉNICO DE CARCINOMA DE COLON DE RATÓN. CURVAS DE SUPERVIVENCIA DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES TRATADOS CON LOS VIRUS rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX.	191
58.	SUPERVIVENCIA POST-TRATAMIENTO CON LOS VIRUS rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX DE TUMORES SOLIDOS GENERADOS EN RATONES BALB-C.	194

INDICE

59. Generación DE TUMORES MEDIANTE INYECCIÓN INTRADÉRMICA DE CÉLULAS TUMORALES EN RATONES BALB-C.	196
60. DESARROLLO DE TUMORES SINGÉNICOS A PARTIR DE CÉLULAS DE MELANOMA B16-F10 EN RATONES BLACK6.	198

INTRODUCCIÓN

1.1. NDV: EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE.

1.1.1. TAXONOMÍA.

El Virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV) pertenece al grupo de los virus RNA (-) o de polaridad negativa, en el que se encuentran patógenos humanos tan importantes como el virus de la Gripe, el Ebola o el Marbug. El NDV se incluye dentro del **Orden Mononegavirales (Tabla 1)**, que engloba a los virus con genoma no segmentado, y que está constituido por cuatro de las siete familias en las que se clasifican los virus RNA (-): Filo-, Rhabdo-, Paramyxo- y Bornaviridae.

El NDV pertenece a la **Familia Paramyxoviridae**, la que, de forma general, comprende virus que poseen nucleocápsidas donde el material genético está asociado a proteínas, entre ellas la polimerasa vírica y que mediante la proteína de matriz M (García-Sastre *et al.*, 1989) establece comunicación con una envoltura lipoproteica, derivada de la célula del hospedador, en la que se encontrarán inmersas glicoproteínas víricas (Rott, 1979). Las características diferenciatorias tanto morfológicas como de organización genómica, así como de contenido proteico y actividades biológicas asociadas, hacen que el Comité Internacional de Taxonomía de Virus distinga entre dos grupos: las subfamilias Pneumovirinae y Paramyxovirinae.

Bajando un escalón más nos detenemos en la Subfamilia a la que pertenece el NDV: la **Subfamilia Paramyxovirinae**. Los virus pertenecientes a esta subfamilia poseen dos glicoproteínas transmembranales. Una de ellas es la encargada de la unión del virus a receptores específicos de la célula huésped [G (glicoproteína), H (hemaglutinina) o HN (hemaglutinina-neuraminidasa), dependiendo del género del virus]. La otra glicoproteína (F) lleva a cabo la fusión de membranas, vírica y celular, necesaria para que la nucleocápsida penetre en el citoplasma celular. La subfamilia Paramyxovirinae hasta hace poco estaba dividida en tres géneros, *Respirovirus*, *Morbilivirus* y *Rubulavirus*, de acuerdo con la existencia o no de actividad sialidásica en la proteína de reconocimiento del receptor y la longitud de las secuencias intergénicas en su genoma. Esta clasificación separaba al género *Morbilivirus* del resto por carecer de actividad sialidásica, aunque en 1997 la describieron para miembros de este grupo (Langedijk *et al.*, 1997).

INTRODUCCIÓN

En los *Respirovirus*, las secuencias intergénicas tienen una longitud constante de tres nucleótidos, a diferencia de lo que ocurre con el género *Rubulavirus*, en el cual la longitud de estas secuencias puede variar desde 1 a 47 nucleótidos. El género *Henipavirus* (Chua *et al.*, 2000) se creó tras la aparición de dos nuevos virus: Hendra (HeV), agente etiológico de una epizootia respiratoria sucedida en Australia en 1994 que afectó principalmente al ganado equino y produjo la muerte de una persona; y el virus Nipah, causante de una epidemia de encefalitis febril en Malasia en 1998 que también produjo muertes humanas.

El virus de la enfermedad de Newcastle y otros paramixovirus de aves fueron en principio incluidos en el género *Rubulavirus*, debido a las características de sus regiones intergénicas conservadas y a la ausencia de fase de lectura abierta para la proteína C. Sin embargo, en la organización del gen de la proteína P del NDV y en su perfil de edición del mRNA se parecen más a los géneros *Morbilivirus* y *Respirovirus*, por lo que se llegó a la conclusión de que se requerían más consideraciones sobre la taxonomía de este tipo de virus. Tras la comparación de las secuencias genómicas completas del NDV y otros paramixovirus (Peeters *et al.*, 2000) del análisis de las proteínas P (Locke *et al.*, 2000) M (Seal *et al.*, 2000); y NP (Seal *et al.*, 2002), se decidió crear para este grupo el **Género Avulavirus** en Mayo del 2002. También se han llevado a cabo estudios acerca de la evolución de las distintas cepas (Toyoda *et al.*, 1989; Seal, *et al.*, 1998), que indican que la misma ocurre principalmente por acumulación de mutaciones puntuales.

TABLA 1. VIRUS RNA (-). TAXONOMÍA.

FAMILIAS		VIRUS REPRESENTATIVOS		
Orden Mononegavirales	Borna-viridae	Virus de la enfermedad de Borna.		
	Rhabdo-viridae	Virus de la rabia, virus de la estomatitis vesicular de Indiana.		
	Filo-viridae	Virus Marburg del Lago Victoria, virus del Ebola Zaire.		
	Paramyxoviridae	Subfamilia Paramyxovirinae	Género <i>Respirovirus</i>	Virus Sendai, Virus parainfluenza humano (hPIV) tipos 1 y 3, Virus parainfluenza bovino (bPIV) tipo 3
			Género <i>Rubulavirus</i>	Virus de simios 5 (SV5); Virus de las paperas (MuV); Virus parainfluenza humano (hPIV) tipos 2, 4a y 4b
			Género <i>Morbillivirus</i>	Virus del sarampión (MV); Virus del moquillo canino (CDV); Virus de la peste bovina
			Género <i>Avulavirus</i>	Virus de la enfermedad de Newcastle (NDV)
			Género <i>Henipavirus</i>	Virus Hendra; Virus Nipah
		Subfamilia <i>Pneumo-virinae</i>	Género <i>Pneumovirus</i>	Virus respiratorio sincitial humano (hRSV); Virus respiratorio sincitial bovino (bRSV); Virus de la neumonía del ratón
			Género <i>Metapneumo-virus</i>	Metaneumovirus humano; Metaneumovirus de aves tipos A, B y C
Orthomyxo-viridae	Virus de la gripe A, B y C.			
Bunyaviridae	Virus bunyamwera, virus de la fiebre del valle del Rift.			
Arenaviridae	Virus de la coriomeningitis linfocítica.			
Sin Familia asignada	Virus de la hepatitis delta, virus del rayado del arroz, virus de la enfermedad vírica de los cítricos, virus asociado a las venas grandes de la lechuga.			

INTRODUCCIÓN

1.1.2. LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE. CEPAS DEL NDV.

1.1.2.1. ENFERMEDAD DE NEWCASTLE.

La enfermedad de Newcastle está causada por el NDV y afecta a pollos y aves de corral así como a algunas especies silvestres. Las fuentes de transmisión del virus entre las aves son las secreciones respiratorias y heces, así como los cuerpos de las aves muertas. El virus se transmite activamente durante el período de incubación que dura de cuatro a seis días. Las aves afectadas pueden presentar trastornos locomotores debido a lesiones en sistema nervioso así como alteraciones del sistema respiratorio y reducción de la puesta, variando la gravedad de los mismos según la cepa. La alta mortalidad y morbilidad de la enfermedad, que en el caso de las cepas más virulentas puede alcanzar hasta un 90% de la población infectada hace que sea una enfermedad con graves consecuencias a nivel económico. La enfermedad de Newcastle constituye un serio problema para la salud de las aves de corral en Asia, África y partes de Centro y Suramérica, ya sea como una enfermedad enzoótica o como causa de brotes epizooticos regulares y frecuentes. En otras áreas como Europa, la situación es distinta, apareciendo como enfermedades epizooticas esporádicas que desafían los programas de vacunación. Se ha demostrado que más de 250 especies de aves son susceptibles a infecciones naturales o experimentales con NDV y parece probable que lo sean muchas más.

El NDV también es un patógeno humano reconocido. En el Reino Unido el virus ha sido colocado en el grupo 2 de peligrosidad por parte del *Advisory Committee on Dangerous Pathogens* (Comité Asesor sobre Patógenos Peligrosos) en 1995. El primer caso de infección en humanos por el NDV reconocido fue descrito por Burnet en 1943 tratándose de una conjuntivitis causada por contaminación ocular con líquido alantoideo que desarrolló un trabajador de laboratorio. En contraposición a como ocurre en las aves, las infecciones descritas en humanos no han constituido peligro para la vida, y por lo general no han afectado al paciente por más de uno o dos días. Los signos clínicos más frecuentes son las infecciones oculares (que normalmente consisten en enrojecimiento unilateral o bilateral) lagrimeo excesivo, edema de los párpados, conjuntivitis y hemorragia subconjuntiva; las infecciones son normalmente transitorias y la córnea no se ve afectada.

INTRODUCCIÓN

Otros síntomas clínicos menos comunes incluyen infecciones más generalizadas que resultan en resfriados, dolores de cabeza y fiebre, con o sin conjuntivitis. Las infecciones con el NDV son resultado del contacto directo con el virus, con pájaros infectados o con los cadáveres de pájaros muertos como consecuencia de la infección. No existen casos descritos de transmisión del NDV de humano a humano, aunque esto en teoría podría ser posible. Los pacientes infectados por el NDV incluyen trabajadores de laboratorio, veterinarios de laboratorios diagnósticos, trabajadores de plantas procesadoras de pollos y cuadrillas de vacunación. El virus apenas puede multiplicarse en células humanas sanas, sin embargo se multiplica 10000 veces más rápido en células tumorales, probablemente debido a la alteración del sistema de interferón, al que es especialmente sensible y a la expresión de sialoglicoproteínas de membrana que sirven como receptor del virus. El propio daño que produce en ellas y la potenciación del sistema inmune como consecuencia de su alta actividad han fijado en el NDV la diana como posible agente antitumoral incluyéndose en el grupo de los virus oncolíticos más estudiados (Hay y Kannourakis 2002; Ring, 2002; Cattaneo *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2008; Liu y Kirn 2008; Ravindra *et al.*, 2009).

1.1.2.2. CEPAS DEL NDV.

Se han descrito varias cepas de NDV con marcadas diferencias en cuanto a su capacidad para producir enfermedad y muerte en pollos, entendiendo el término “cepa” (aplicado al NDV) como una línea de virus caracterizada y estable.

Hanson y Brandly las agruparon arbitrariamente en tres grupos según su patogenicidad en embriones de pollo (Hanson y Brandly, 1955). Denominaron **Cepas Velogénicas** a aquellas que producen la muerte del embrión entre 40 y 60 horas tras la inyección de la dosis letal mínima (tiempo medio de muerte en huevos); **Cepas Mesogénicas** a aquellas líneas cuyo tiempo medio de muerte en huevos es de entre 60 y 90 horas y que son capaces de causar síntomas respiratorios en aves adultas (virulencia intermedia). Por último incluyeron dentro de las **Cepas Lentogénicas** a aquellas que tardan más de 90 horas en provocar efectos letales y no suelen causar enfermedades en aves adultas.

INTRODUCCIÓN

En 1972 Hanson, tomando en consideración los síntomas que produce la enfermedad, clasificó las cepas del NDV en otros cuatro grupos (Hanson, 1972):

Formas “Doyle” o velogénicas-viscerotrópicas, que engloban las cepas extremadamente letales en pollos y que producen lesiones hemorrágicas en el intestino.

Formas “Beach” o velogénicas-neurotrópicas, que provocan una mortalidad en pollos también elevada, con aparición de trastornos nerviosos y respiratorios pero sin lesiones intestinales.

Formas “Beaudette”, equivalentes a las mesogénicas. Provocan en pollos síntomas respiratorios y ocasionalmente nerviosos. Los pollos jóvenes pueden morir, pero en general la mortalidad es muy baja.

Formas “Hitchner”, que engloban las cepas lentogénicas, provocando infecciones suaves o inaparentes.

1.1.3. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y GENÉTICAS DEL NDV.

1.1.3.1. ESTRUCTURA DEL VIRIÓN.

EL virus de la enfermedad Newcastle (**Figura 1**) presenta una organización estructural característica de los Paramyxovirus: una nucleocápsida helicoidal rodeada por una membrana derivada de la célula hospedadora y que configurará partículas, más o menos esféricas, de diámetro comprendido entre 100 y 200 nm existiendo un elevado pleomorfismo en este rasgo debido a la capacidad de las proteínas del virus para interactuar con el citoesqueleto.

Si realizamos una descripción de los componentes de un virión, desde el interior al exterior, encontraremos en primer lugar, la **Nucleocápsida** que es una estructura helicoidal de giro levógiro, con un diámetro de 17-18 nm y una luz interior de 4-5 nm. Dependiendo del estado del ciclo replicativo del virus, pueden aparecer otras formas (Egelman *et al.*, 1989), con medidas de hasta 37.5 nm si está en fase activa de transcripción. Esta estructura está compuesta por una molécula de RNA monocatenario de polaridad negativa revestida, en todo momento del ciclo, por proteínas, formando un complejo ribonucleoproteico (RNP) (Chambers y Samson 1980).

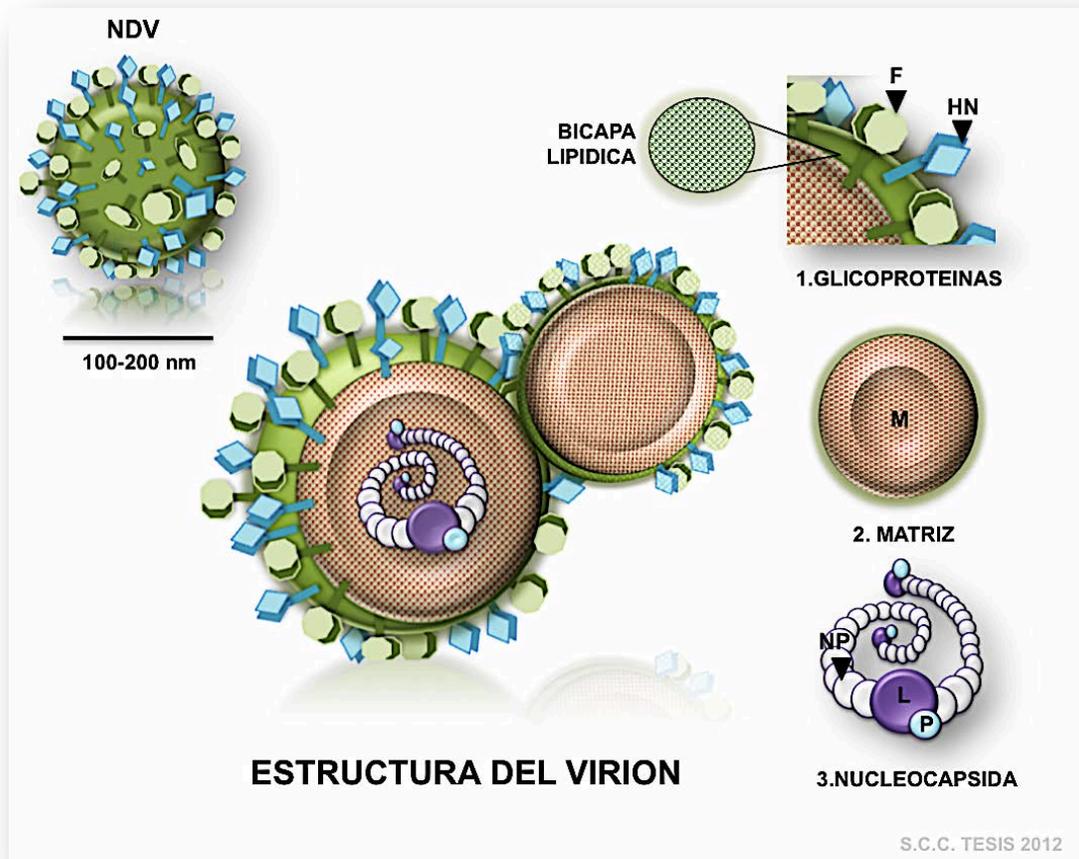


FIGURA 1. ESTRUCTURA DEL VIRIÓN DEL NDV.

Margen superior izquierdo, detalle de la morfología y tamaño del virión del NDV.

Parte central, representación virtual de la estructura interna del virión.

Margen derecho, detalle de los diferentes elementos estructurales diferenciables en el virión.

Las proteínas que se encuentran formando parte de estos RNPs son:

Proteína NP (53 kDa): la proteína **NP** (*Nucleocapsid Protein*, proteína de la nucleocápsida) es la proteína estructural mayoritaria, con 2600 copias por cada molécula de RNA. La principal función de la proteína NP es la protección del material genético frente a RNAsas uniéndose al RNA de manera que cada seis nucleótidos del genoma interactúan con una copia de ésta (Egelman *et al.*, 1989). Esta interacción, que no desaparece durante el ciclo replicativo es indispensable para mantener la integridad de las RNPs, debido a que todo el ciclo tiene lugar en el citoplasma.

INTRODUCCIÓN

Por otro lado, la NP interactúa con las proteínas víricas P y L durante los procesos de transcripción y replicación, formando el Complejo Transcripcional del Virus (Hamaguchi *et al.*, 1983). Por último, la proteína NP interacciona con la proteína de la matriz, o proteína M, en el proceso de encapsidación en la última fase del ciclo.

Proteína L (250 kDa): La proteína L (*large* o de alto peso molecular) es la RNA polimerasa vírica RNA-dependiente (Peeples y Bratt, 1982). Existen entre 30 y 50 copias por nucleocápsida, pues sólo van a precisarse un pequeño número de ellas para la replicación del RNA. Recientes estudios con recombinantes destacan que la existencia de diferencias entre la procesividad de la proteína L de las diferentes cepas, lo cual les confiere una mayor o menor virulencia (Rout y Samal, 2008).

Proteína P (53 kDa): o fosfoproteína, es la segunda proteína más abundante de la nucleocápsida, con 250-300 copias por virión. Se encuentra altamente fosforilada y tiene un papel central en la replicación vírica y en la transcripción, aparte de otras funciones. Se ha demostrado que la proteína P estabiliza a la proteína L en el complejo P-L, el cual actúa como RNA-polimerasa RNA dependiente (Errington y Emmerson 1999). La proteína P también actúa como “chaperona” con el fin de prevenir la encapsidación incontrolada de RNA no vírico por la proteína NP.

Siguiendo el recorrido hacia la superficie nos encontramos con una **matriz** que servirá no sólo como nexo de unión de la nucleocápsida con la envoltura lipoproteica sino como almacén que mantendrá la estructura del virión. Esta matriz está compuesta por un único tipo de proteína, la Proteína M. **La proteína M (40 kDa)** (M, matriz) es la más abundante del virión y es una de las proteínas más conservadas dentro de los Paramyxovirus. Dos son las características que la hacen ser un excelente nexo de unión entre las RNPs y la membrana: su carácter básico, clave para poder interactuar con las proteínas NP (ácidas), y sus α –hélices anfipáticas que facilitan su interacción con la membrana lipoproteica. Esta proteína parece ser que juega un papel en la salida de los nuevos viriones de la célula infectada, interactuando con el segmento intracelular de la proteína HN y generando una curvatura negativa en la membrana plasmática, produciendo el proceso de gemación (Shnyrova *et al.*, 2007).

Por último y apoyándose en un almacén de proteína M, encontramos la **Membrana Externa**. La membrana externa o envoltura del virus es una membrana lipoproteica, con estructura de bicapa derivada de la membrana plasmática de la célula hospedadora y modificada por la incorporación de las proteínas propias del virus.

INTRODUCCIÓN

El componente lipídico, aún derivado de la membrana plasmática, difiere porcentualmente de ésta, lo que sugiere una cierta capacidad de selección de los mismos por parte del virus durante el proceso de gemación. Esta selección se lleva a cabo por parte de las propias proteínas del virus, acondicionando así el entorno donde se encuentran y condicionando y modulando factores que afectarán a la capacidad infectiva de la nueva progenie (Aloia *et al.*, 1993). En el NDV, nuestro grupo demostró que las actividades sialidásica y hemaglutinante de la proteína HN requieren la presencia de fosfolípidos definidos en el entorno, en concreto fosfatidil-etanolamina (Muñoz-Barroso *et al.*, 1997) y dependen en cierto grado de los niveles de colesterol de la membrana (Martin *et al.*, 2012). Las proteínas víricas que se encuentran inmersas en esta bicapa son dos: la proteína HN y la proteína F. Ambas son glicoproteínas y ambas atraviesan la membrana exponiendo hacia el interior parte de su cadena polipeptídica y hacia el exterior una cabeza con estructura globular. Esto les confiere una apariencia de espículas sobre la superficie del virión, las cuales se proyectan unos 8 nm hacia el exterior, tienen entre 1,0-1,5 nm de ancho y están espaciadas entre 5-10 nm.

Proteína HN (72 kDa): es una glicoproteína de membrana de tipo II, es decir, con el extremo carboxiterminal extracelular (Schuy *et al.*, 1984). Se trata de una glicoproteína multifuncional que constituye el mayor determinante antigénico de los paramyxovirus. Reconoce y se une a las moléculas receptoras que contienen restos de ácido siálico. La glicoproteína posee tres actividades biológicas principales, con importantes funciones en el ciclo infectivo del virus: hemaglutinante, sialidásica y promotora de la fusión. La actividad hemaglutinante permite la unión del virus a sus receptores en la superficie de la célula hospedadora. La actividad sialidásica facilita la propagación de los viriones resultantes de la replicación del virus. Finalmente, la actividad promotora de la fusión permite que la glicoproteína F lleve a cabo su actividad de fusión (Villar y Muñoz-Barroso, 2006). Nuestro grupo constató la interacción entre la proteína HN con la proteína M (García Sastre *et al.*, 1991).

Proteína F (67 kDa): es una glicoproteína de tipo I, con una secuencia señal en N-terminal, un dominio transmembrana hidrofóbico localizado cerca del extremo C-terminal y un dominio citoplasmático de entre 25 y 30 aminoácidos (Morrison *et al.*, 1991). Es la encargada de la fusión entre las membranas vírica y celular y es sintetizada como precursor (F₀).

INTRODUCCIÓN

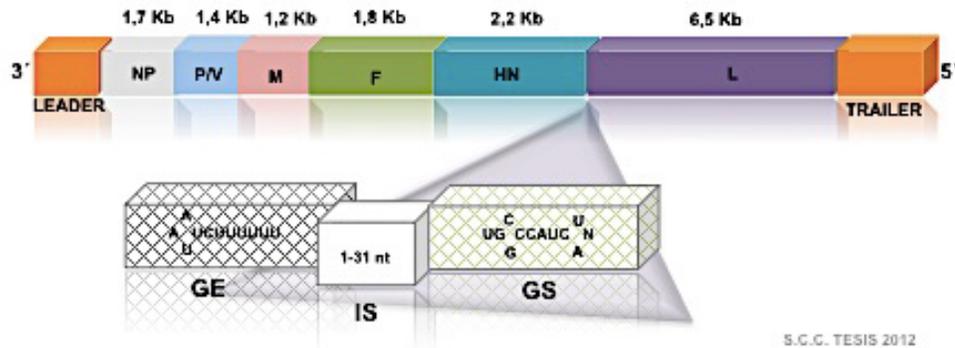
El precursor debe ser escindido por ciertas proteasas de la célula en los polipéptidos F₁ y F₂, los cuales permanecerán unidos por un puente disulfuro (1), para adquirir la actividad fusogénica (Dutch *et al.*, 2001). El determinante molecular crítico para la patogenicidad parece ser el sitio de escisión de la proteína (Peeters *et al.*, 1999; revisado por Lamb y Kolakofsky, 2001) encontrándose la secuencia ₁₁₃RQK/RR↓F₁₁₇ en virus virulentos. Por el contrario, los virus con baja virulencia normalmente tienen la secuencia ₁₁₃K/RQG/ER↓L₁₁₇. En el caso del NDV las bases moleculares de la patogenicidad residen tanto en la secuencia de aminoácidos del lugar de proteólisis de la proteína F (Glickman *et al.*, 1988) como en la capacidad de algunas proteasas específicas celulares de romper esta proteína F, según corresponda a cepas más o menos virulentas. Existe un menor número de aminoácidos básicos en el lugar de rotura de las cepas lentogénicas, mientras que ese número es mayor en las cepas mesogénicas y velogénicas, cuyas secuencias en el sitio de corte son similares (Glickman *et al.*, 1988). Nuestro grupo ha visto como mutaciones puntuales en el ectodominio de la proteína F pueden hacer que su activación sea HN independiente (Ayllon *et al.*, 2010).

1.1.3.2. ESTRUCTURA GENÓMICA.

EL genoma del NDV es RNA monocatenario de polaridad negativa con un tamaño de 15186 nucleótidos (Krishnamurthy y Samal, 1998; de Leeuw y Peeters 1999). En los extremos del genoma posee dos secuencias extracistrónicas, no codificantes, conocidas como “*leader*” (en 3´) y “*trailer*” (en 5´) (**Figura 2**). Estas dos secuencias de control, que son esenciales para la transcripción y replicación (Harty y Palese, 1995; Marcos *et al.*, 2005) flanquean los seis genes que codifican las proteínas estructurales del NDV. En los virus RNA(-), por consenso, el término gen se refiere a la secuencia del genoma que codifica un único mRNA, incluso si esa secuencia contiene más de una fase de lectura abierta (ORF) o puede codificar más de una proteína.

El orden en que se encuentran los seis genes del NDV es el mismo en el que los mRNA son transcritos, tal y como están dispuestos, lo cual es de suma importancia para el ciclo replicativo del virus. Entre los genes hay secuencias conservadas que indican a la polimerasa vírica el final (GE) y el inicio (GS) de cada ORF, separadas por una región intergénica no codificante (IS) de longitud variable en los paramixovirus y que en el caso del NDV oscila entre 1 y 31 nucleótidos (Lamb y Kolakofsky, 2001).

INTRODUCCIÓN



S.C.C. TESIS 2012

FIGURA 2. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL GENOMA DEL NDV.

Se recogen tanto la disposición de las secuencias génicas como el tamaño. En la parte inferior se muestran las secuencias terminadoras (GE), intergénica (IS) y de inicio (GS) encontradas en el caso concreto del NDV.

La representación no está hecha a escala sino con el fin de resaltar los distintos elementos que forman parte del genoma

En los paramixovirus la capacidad codificante se ve ampliada por la edición del mRNA derivado del gen P (Samson *et al.*, 1991). Estas proteínas adicionales V y W, originadas por el desplazamiento de la fase de lectura de la traducción al añadirse un nucleótido adicional (no presente en el molde durante la transcripción) comparten su extremo N-terminal con la proteína P y difieren en su extremo C-terminal. De la proteína V, que en principio sólo se suponía implicada en la regulación de la replicación vírica (Steward *et al.*, 1993), se han descrito recientemente funciones como antagonista del sistema del interferón de la célula hospedadora y como determinante del espectro de posibles hospedadores (Park, García-Sastre *et al.*, 2003; Park, Shaw *et al.*, 2003), lo cual la convierten en fundamental para explicar la capacidad replicativa de las distintas cepas y su virulencia (Mebatsion *et al.*, 2001).

La "Regla del Seis": la mayor parte de los genomas conocidos de los paramyxovirus tienen un número de nucleótidos múltiplo de seis. En 1989, mediante el análisis y

INTRODUCCIÓN

reconstrucción de imágenes de microscopía electrónica de nucleocápsidas del Virus Sendai (SeV), se concluyó que cada subunidad de proteína NP se asociaba exactamente con un número de nucleótidos igual a seis (Egelman *et al.*, 1989). Esto llevó a estudiar la eficacia replicativa de minigenomas con distinto número de nucleótidos. La conclusión a la que llegaron, y que acuñaron como “regla del seis” es que el genoma de estos virus debe ser múltiplo de ese número para ser replicado eficientemente (Calain y Roux, 1993). La explicación lógica de este fenómeno es que sólo si el genoma está completamente recubierto por NP hasta su extremo promotor puede la polimerasa incorporarse al mismo para llevar a cabo su función. Aunque aún no hay evidencias bioquímicas directas de la interacción de NP con seis nucleótidos en el caso del NDV, sí demuestra tener una alta importancia. El ajuste a la regla del seis se da en ciertos géneros de paramixovirus que pertenecen a la subfamilia Paramyxovirinae: respovirus Sendai, y el virus de la parainfluenza humano 3 (hPIV3) (Durbin *et al.*, 1997; Kolakofsky *et al.*, 1998) y el avulavirus NDV. Especialmente en él se ha descrito que su cumplimiento es de esencial importancia (Peeters *et al.*, 2000).

1.1.4. CICLO BIOLÓGICO.

El ciclo biológico del NDV (**Figura 3**) se desarrolla con totalidad en el citoplasma de la célula hospedadora y el tiempo que le supone crear una nueva progenie de virus varía dependiendo de la virulencia de las cepas. Así, se ha descrito que en cultivos celulares, un ciclo de crecimiento tiene una duración de entre 14-20 horas pudiendo ser inferior, unas 10 horas, en cepas más virulentas. Para explicar el proceso de multiplicación del virus podemos dividir el ciclo en un conjunto de etapas o acontecimientos, que cronológicamente son: reconocimiento de la célula hospedadora, fusión, transcripción primaria, replicación y, por último, ensamblaje y liberación.

INTRODUCCIÓN

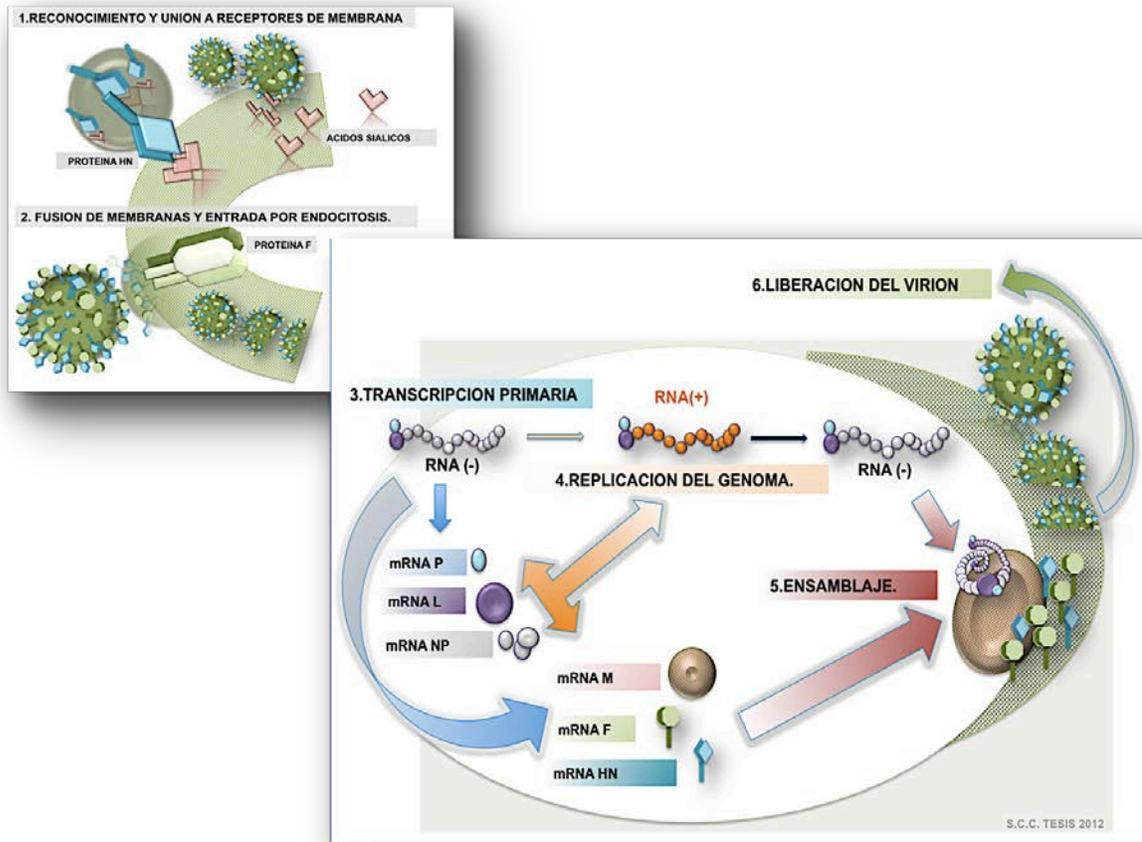


FIGURA 3. CICLO BIOLÓGICO DEL NDV.

Margen superior izquierdo, detalle del reconocimiento y entrada del virus en la célula.

Margen inferior derecho, detalle de las distintas etapas intracitoplasmáticas.

1.1.4.1. RECONOCIMIENTO Y FUSIÓN DE MEMBRANAS: ENTRADA EN LA CÉLULA.

El NDV reconoce receptores específicos en la membrana de las células susceptibles de infección. Estos receptores se caracterizan por tener restos de ácidos siálicos con los que interaccionará la proteína vírica HN gracias a su actividad hemaglutinante.

Existen numerosas moléculas susceptibles de ser receptores potenciales para el NDV, que abarcan tanto a glicoproteínas como gangliósidos, de membrana o solubles en suero, pero siempre tendrán en común la presencia de restos de ácidos siálicos.

Nuestro grupo de investigación demostró recientemente que gangliósidos y *N*-glicoproteínas, pero no las *O*-glicoproteínas, son importantes en el proceso de la interacción virus-célula (Ferreira *et al.*, 2004; Ferreira, Villar *et al.*, 2004).

INTRODUCCIÓN

Algunos lípidos sialilados, como ciertos gangliósidos, pueden actuar también como moléculas receptoras.

Una vez que el virus se ha unido a la membrana de la célula huésped, comienza el segundo paso en la infección, mediado por la proteína F: fusión de membranas vírica y celular (Choppin *et al.*, 1975). El modelo generalizado de cómo ocurre el proceso supone que la interacción de la proteína HN con la molécula receptora promovería un cambio conformacional en ésta y que sería transmitido a la proteína F. Esta respondería exponiendo una secuencia aminoacídica altamente hidrofóbica, el péptido de fusión, que al interactuar con la membrana diana crearía una desestabilización que promovería la fusión con la membrana vírica.

Se ha mantenido como dogma de los paramixovirus que el proceso de fusión de membranas tiene lugar a nivel de la membrana plasmática de la célula hospedadora y no precisa un descenso del pH. Sin embargo, por primera vez para un paramixovirus, nuestro grupo de investigación ya demostró hace años que la fusión del NDV en cultivos celulares a pH ácido se ve favorecida (San Román *et al.*, 1999). Recientemente se ha caracterizado que el NDV puede entrar e infectar células utilizando también la ruta endocítica (Cantin *et al.*, 2007). Las razones por las que elige una u otra vía son objeto de estudio en la actualidad.

1.1.4.2. TRANSCRIPCIÓN PRIMARIA.

Con la fusión de membranas se propicia la entrada de la nucleocápsida en el citoplasma celular. Una vez allí, y sin requerimientos de un iniciador exógeno, la polimerasa vírica, la proteína L, con ayuda de la fosfoproteína P, utilizan el complejo RNA-NP como molde para transcribir los primeros mRNAs, con el único estímulo de la presencia de ribonucleótidos trifosfato presentes en el citoplasma celular. Estos mRNAs monocistrónicos presentarán *Cap* de 7-metil-guanosina en 5' y señal de poliadenilación en 3' de forma semejante a como aparecen en los mRNA celulares.

Tras transcribir la secuencia rica en U presente justo antes de cada GE, la polimerasa saltará la secuencia intergénica, reconocerá la GS de la siguiente unidad transcripcional y sintetizará el nuevo mRNA.

Este procedimiento no es perfecto y la polimerasa puede soltarse del molde, por lo que tendrá que regresar al extremo 3' del genoma y comenzar de nuevo. Esta "imperfección" es la responsable de que se cree un gradiente de transcritos de modo

INTRODUCCIÓN

que existirá un mayor número de aquellos cuyas unidades transcripcionales estén hacia el extremo 3', reduciéndose en número según se avance hacia el 5' (Glazier *et al.*, 1977). De esta forma el virus es capaz de modular la cantidad de proteína que se sintetizará según sus requerimientos estructurales y como veremos a continuación, regular su propio ciclo de replicación.

1.1.4.3. REPLICACIÓN.

La transición entre transcripción y replicación viene marcada por la síntesis de proteína NP: mientras la cantidad de NP en el citoplasma sea baja, el genoma seguirá transcribiéndose. Cuando su expresión supere unos valores dados, las NP se unirán a los mRNA nacientes impidiendo la procesividad de la polimerasa al evitar que esta reconozca las secuencias de regulación y edición y desplazando la función hacia la síntesis de una copia completa o *full length* del genoma, pero de polaridad positiva. Este antígeno o RNA (+) unido a múltiples copias de NP, sin *Cap* ni poli-A será replicado para formar nuevas copias de RNA, ahora sí, de polaridad negativa, que conformarán los genomas de la nueva progenie vírica. Durante el proceso de replicación pueden producirse errores por saltos de la polimerasa, que puede pasar directamente a replicar el extremo opuesto. De esta manera se generan minigenomas defectivos que conservarán las secuencias *leader* y *trailer* necesarias para la replicación pero que han perdido toda la información genética comprendida entre ambas. Estos minireplicones, también conocidos como partículas **DI** (del inglés **Defective Interfering**, por interferir competitivamente con la replicación normal) fueron los empleados para definir la "regla del seis" y las herramientas de base para el desarrollo de la genética reversa en virus RNA (-) (revisado por Lamb y Kolakofsky 2001).

1.1.4.4. ENSAMBLAJE Y LIBERACIÓN.

INTRODUCCIÓN

Tras la síntesis, las glicoproteínas estructurales víricas van plegando y madurando, con la ayuda de las chaperonas en proceso de plegado. Sólo cuando están correctamente plegadas, las glicoproteínas se transportan al Retículo Endoplasmático y al Complejo de Golgi, donde sufren modificaciones post-traduccionales, lo que les permitirá adquirir sus actividades biológicas.

Estos eventos post-traduccionales tales como glicosilación, acilación (Morrison, 1988; Yoshida *et al.*, 1989; Ng *et al.*, 1990) y formación de puentes disulfuro les conduce a su oligomerización (Markwell y Fox, 1980; Ng *et al.*, 1990; McGinnes *et al.*, 1993). Las ribonucleocápsidas ensambladas interaccionan con la proteína M y la parte interna de la membrana plasmática. Además, la proteína M interacciona con la cola citoplasmática de las glicoproteínas virales del límite de la membrana (García-Sastre *et al.*, 1989). Como otros virus con membrana, los nuevos viriones se forman por un proceso de gemación, emergiendo desde lugares de la membrana plasmática de la célula hospedadora, donde los componentes víricos (ribonucleocápsida y proteínas de membrana) se asocian y cierran, en lo que resulta en la liberación de una nueva progenie de viriones. En este proceso, la proteína M juega un papel crucial uniéndose a las ribonucleocápsidas y a la cara interna de la membrana de la célula huésped, donde las glicoproteínas integrales se han insertado.

1.1.5. VIROLOGÍA MOLECULAR Y GENÉTICA INVERSA.

En los años 70, con el desarrollo de las técnicas del DNA recombinante, comienza a ser posible la manipulación y el control de diversas características de los virus, lo cual supone un gran avance en el conocimiento tanto de su biología como en la capacidad de usarlos en nuestro propio beneficio.

Parte de este avance es el desarrollo de la denominada Genética Inversa (del inglés *Reverse Genetics*), que aplicado a la virología molecular describe la posibilidad de actuar *in vitro* sobre el material genético de los virus, obteniéndolo y modificándolo mediante técnicas de biología molecular, y la capacidad posterior de, a partir de ese material genético, obtener virus viables. Es por tanto la generación de virus que poseen un genoma derivado de cDNA clonado.

Este conjunto de técnicas, genéricamente denominado “rescate”, se llevo a cabo por primera vez sobre virus dsDNA por el grupo de Paul Breg, de la Universidad de Stanford. Ellos consiguieron construir cDNA a partir del genoma del virus SV40 (dsDNA)

INTRODUCCIÓN

y clonar un fragmento del DNA del fago λ dvgl, generando el primer virus recombinante (Jackson *et al.*, 1972).

Tras los virus DNA, las técnicas se adaptaron a los virus RNA (+) y por último a los RNA (-), existiendo en la actualidad una gran galería de recombinantes con representantes de la mayoría de los grupos, incluido el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV).

TABLA 2. INGENIERÍA GENÉTICA ASOCIADA A VIRUS DNA Y RNA (+).
(Palese *et al.*, 1996)

TIPO DE GENOMA	VIRUS MÁS REPRESENTATIVOS	ESTRATEGIAS
DNA doble cadena	SV40, herpes, adenovirus, Poxvirus.	Transfección de cDNA. Recombinación homóloga usando cDNA y DNA vírico intacto o virus <i>helper</i> . Transfección con cósmidos.
DNA cadena sencilla	Virus adeno-asociados	Transfección con plásmidos.
RNA cadena sencilla, polaridad positiva	Retrovirus.	Transfección con cDNA infeccioso.
	Picornavirus, virus del bosque de Semliki, virus Sindbis.	Transfección con cDNA infeccioso o RNA derivado de él.

1.1.5.1. GENÉTICA INVERSA APLICADA A VIRUS RNA (-).

Los virus RNA (-) agrupan patógenos tan importantes como el ebola, sarampión, paperas, virus de la gripe A, B y C o el respiratorio sincitial. El desarrollo de nuevas estrategias, para poderlos modificar genéticamente, han provisto, a los investigadores, de nuevas herramientas para poder estudiar su estructura, la relación entre sus componentes y su patogenicidad, entre otras características.

Toda esta nueva información, extraída a partir del avance de técnicas de ingeniería genética, ha propiciado el desarrollo de nuevas vacunas y la aplicación de algunos recombinantes como vectores de expresión de proteínas foráneas, con un alto potencial de aplicación tanto en la prevención de las enfermedades como en el

INTRODUCCIÓN

desarrollo de terapias génicas. En 1989, Palese y sus colaboradores, en el Hospital Monte Sinaí de Nueva York (USA), establecieron el primer sistema que permitió la modificación genética de un virus RNA (-), el de la gripe tipo A (Luytjes *et al.*, 1989; García-Sastre y Palese, 1993; García-Sastre *et al.*, 1994). La estrategia seguida consistió en clonar en el cDNA del virus el gen para la proteína cloranficol acetiltransferasa (CAT), entre secuencias 5' y 3' no codificantes. Esta construcción estaba flanqueada por la secuencia promotora de la polimerasa del fago T7 y una secuencia de reconocimiento de una enzima de restricción la cual permitiría la formación de un verdadero extremo 3' vírico. In vitro, se obtuvo un RNA de polaridad negativa que se mezcló con nucleoproteínas purificadas NP y polimerasa vírica para reconstituir RNPs (ribonucleocápsidas). Estas RNPs generadas artificialmente se usaron para transfectar células eucariotas infectadas con un virus de la gripe *helper* ("ayudante"). Los virus que fueron rescatados contenían no sólo los ocho segmentos genómicos normales (proporcionados por el *helper*) sino que incorporaban un noveno correspondiente a la proteína CAT. Poco después se conseguía producir la primera mutación de un gen del virus de la gripe utilizando la misma estrategia (Enami *et al.*, 1990).

El principal problema de esta estrategia era que, tras el rescate, se necesitaba un buen método de discriminación para poder diferenciar entre el virus *helper* (*wild-type* o tipo silvestre) y los recombinantes derivados. Además el paso de reconstruir las RNPs in vitro era muy complicado, sobre todo en el caso de Mononegavirales, con genomas de más de 11 kb y con RNPs altamente estructuradas. Por ello y para el resto de los virus RNA (-), los problemas derivados del primer sistema de rescate se resolvieron gracias a tres nuevos avances:

1. conocimiento de los requerimientos proteicos que el RNA vírico tenía para su amplificación (Conzelmann *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1991).
2. generación de nuevos minigenomas (derivados de cDNAs clonados) bajo el control del promotor de T7, a partir de los cuales se sintetizaría RNA de polaridad negativa en las células transfectadas (Lamb y Kolakofsky, 2001).
3. desarrollo de un virus Vaccinia recombinante que expresaría la polimerasa del fago T7 (Fuerst *et al.*, 1986) y que actuaría como *helper* en el proceso de formación de los elementos necesarios para la constitución de nuevos viriones.

INTRODUCCIÓN

Así en 1994 se logró construir un plásmido que expresara el RNA completo del antigenoma del virus de la rabia (Conzelmann y Schnell, 1994). El vector se encontraba bajo el control del promotor de T7 y fue transfectado junto con plásmidos para las proteínas N, L y P, en células previamente infectadas con el Vaccinia recombinante. De este modo consiguieron rescatar por primera vez un virus RNA (-) a partir de un sistema basado únicamente en plásmidos (**Figura 4**). La clave de este sistema era la utilización del RNA antigenómico, en sentido positivo, y no del RNA genómico; si se hubiera usado este último, los mRNA para las proteínas N, L y P habrían impedido la formación de las nucleocápsidas, al hibridar con él.

El uso de RNA antigenómico, además solventa otros dos problemas:

- la formación de dobles cadenas de RNA, la cual es la posible causa de inducción del sistema del interferón en la célula transfectada (Basler y García-Sastre, 2002).
- la existencia de secuencias que se asemejan a la señal terminadora para la polimerasa de T7, lo que podría provocar una interrupción temprana de la transcripción.

Comenzando por el transcrito antigenómico, este RNA puede formar RNPs junto a las nucleoproteínas producidas por los cDNAs cotransfectantes y, una vez que se han formado, la cadena positiva puede replicarse por el complejo de la polimerasa, también cotransfectante y formar genomas RNA (-). A medida que éstos se van produciendo, van asociándose con más nucleoproteínas, de forma que tampoco en ese momento puede producirse interferencia por los mRNA complementarios. Una vez que se dispone de RNPs genómicas funcionales puede iniciarse un ciclo de infección normal. La principal causa de la baja eficacia del sistema es que no es fácil obtener la primera encapsidación del RNA desnudo con las nucleoproteínas, algo que el virus no debe nunca afrontar en su ciclo natural.

Desde 1994 se han realizado, empleando el mismo sistema, un gran número de nuevos rescates de virus RNA (-) de genoma no segmentado pertenecientes a las familias Rhabdoviridae y Paramyxoviridae a los que se sumó más recientemente el filovirus Ebola (Palese *et al.*, 1996; García-Sastre, 1998; Volchkov *et al.*, 2001; Neumann y Kawaoka, 2002).

INTRODUCCIÓN

También se han realizado intentos comparativos de rescate empleando el RNA genómico en lugar del antígenómico, demostrándose su inviabilidad (Radecke y Billeter, 1995; Whelan *et al.*, 1995). Tras los éxitos conseguidos en los Mononegavirales pronto se obtuvieron en otros virus con genoma segmentado, primero en bunyavirus (Bridgen y Elliott, 1996), con el genoma constituido por tres segmentos. Para virus de la gripe el sistema requiso un mayor refinamiento al implicar ocho segmentos genómicos, pero finalmente se pudieron rescatar virus partiendo únicamente de baterías de doce plásmidos (Fodor *et al.*, 1999), ocho para los RNA genómicos y cuatro para los componentes de la polimerasa.

1.1.5.2. GENÉTICA INVERSA APLICADA AL NDV. RESCATES.

Como con el resto del orden *Mononegavirales*, en los últimos años han comenzado a aplicarse las técnicas de la genética inversa al NDV con distintos objetivos, siguiendo, con más o menos modificaciones, los procedimientos descritos para otros virus de genoma RNA(-) no segmentado. En 1999 se consiguió clonar el cDNA antígenómico completo, o *full length*, del NDV de la cepa lentogénica La Sota, flanqueado por el promotor de T7 y por la ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV), que permite que el extremo 3' del transcrito primario sea el mismo que el del antígenoma vírico original (de Leeuw y Peeters, 1999; Peeters *et al.*, 1999). A partir de esta construcción, y siguiendo un procedimiento similar al descrito anteriormente, consiguieron por primera vez rescatar NDV infeccioso a partir de plásmidos con cDNA. Esta técnica la emplearon para modificar la secuencia aminoacídica diana del procesamiento proteolítico de la proteína F, demostrando que es un factor determinante de la virulencia del virus. Simultáneamente a la publicación de estos resultados se describe el rescate de virus de la cepa lentogénica *Clone 30* según un procedimiento similar, si bien en este último caso se emplearon células con una transfección estable de la polimerasa de T7 en vez de un vector vírico (Romer-Oberdorfer *et al.*, 1999).

Pese a ligeras modificaciones como ésta, el sistema de rescate del NDV, esquematizado en la **Figura 4**, se ha mantenido básicamente igual durante los últimos diez años, permitiendo nuevas aproximaciones en el estudio o utilización del NDV y el rescate de cepas no sólo lentogénicas, sino también mesogénicas y velogénicas.

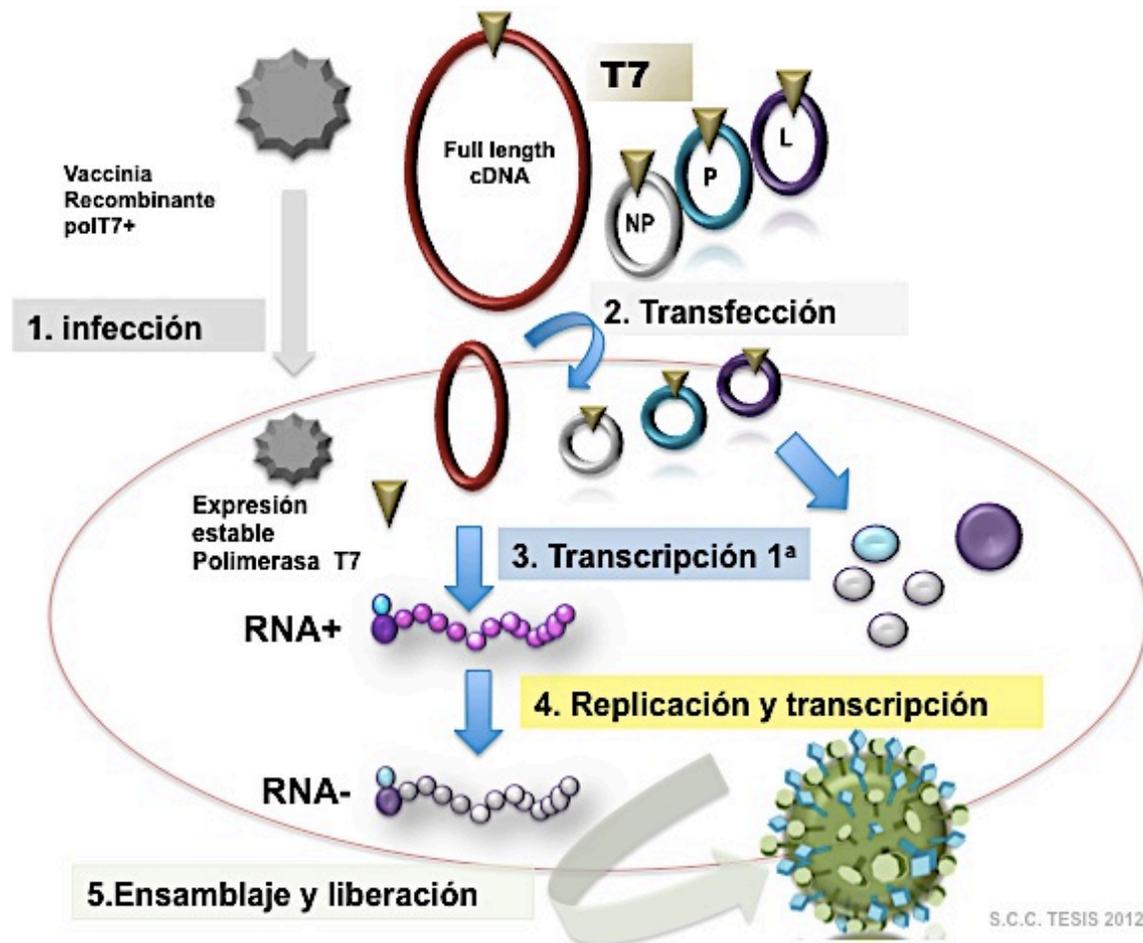


FIGURA 4. ESQUEMA GENERAL DEL RESCATE DE VIRUS RNA (-) NO SEGMENTADOS.

Tras la infección del cultivo celular con un virus *Vaccinia* recombinante, capaz de expresar la polimerasa del fago T7, las células son co-transfectadas con plásmidos para la expresión de la proteína N, P y L y con el plásmido que contiene el cDNA *full-length* del virus, todos ellos bajo el control del promotor de T7. Las síntesis *de novo* de los componentes del virus disparará la activación del proceso replicativo y con ello la generación de una nueva progenie vírica.

La generación de recombinantes ha tenido tres puntos fundamentales de interés: estudiar los factores de la virulencia del NDV, uso como vector de vacunación y su uso como agente antitumoral. Con respecto a su capacidad antitumoral, ésta será revisada en el Apartado 1.3 de esta introducción.

1.2. TNFRSF6 Y APOPTOSIS.

1.2.1. MUERTE CELULAR Y APOPTOSIS.

La muerte celular es parte integral de la vida de los organismos superiores. No solo es un mecanismo primordial durante el desarrollo embrionario sino que, ya en el adulto, estará presente tanto en el mantenimiento de la homeostasis como en la adaptación y respuesta del organismo a los estímulos ambientales. La relevancia de la importancia de la muerte celular en la rutina de la vida se pone de manifiesto cuando se producen desajustes espacio-temporales en su activación, los cuales tienen graves consecuencias para la viabilidad del individuo. Cuando la muerte celular fisiológica no ocurre aparecen patologías como cáncer (acumulación celular, resistencia a anticancerígenos, supervivencia tumoral por fallos asociados al reconocimiento por parte del sistema inmunitario) o enfermedades autoinmunes (fallo en la eliminación de linfocitos autoreactivos) y persistencia de infecciones. Cuando tiene lugar de una manera errónea y en exceso es responsable de patologías tan graves como las asociadas a la degeneración neuronal (Alzheimer, Parkinson, Huntington), autoinmunidad (apoptosis incontrolada en órganos específicos), SIDA (eliminación de linfocitos T) e infarto de miocardio, entre otras (Kerr *et al.*, 1994; Freude *et al.*, 2000; Smyth *et al.*, 2001; Igney y Krammer, 2002; Reed, 2002; Ethell y Buhler, 2003).

Aunque en concepto de muerte celular puede parecer trivial a simple vista, las diferentes causas y repercusiones, tanto fisiológicas como morfológicas y metabólicas, han hecho que en las últimas décadas se hayan realizando muchos esfuerzos, por parte del Comité de Nomenclatura de Muerte Celular **NCDD (*Nomenclature Committee on Cell Death*)**, para intentar realizar una clasificación adecuada que resuma toda la información referente a los diferentes tipos y subtipos de muerte celular. Criterios morfológicos (que diferencian fundamentalmente entre Apoptosis, Necrosis, Autofagia o Muerte Celular asociada a Mitosis), enzimológicos (implicación o no de endonucleasas, caspasas, transglutaminasas, etc.), aspectos funcionales (muerte celular programada o accidental, fisiológica o patológica) o características inmunológicas (muerte celular inmunogénica o no inmunogénica) han supuesto que a los clásicos Apoptosis, Necrosis, Muerte celular por Autofagia o Cornificación se les hayan unido nuevos conceptos como Catástrofe Mitótica (muerte celular inducida por fallos en la regulación de la Mitosis), Excitotoxicidad (muerte celular en neuronas ligada a una estimulación no fisiológica por

INTRODUCCIÓN

parte de aminoácidos como el ácido glutámico), Paraptosis (semejante a la apoptosis pero con la importante diferencia de no poder ser revertida al bloquear la acción de las caspasas) y Degeneración Walleriana (en neuronas en las que se produce degeneración del axón pero no del soma), entre otros (Kroemer *et al.*, 2009; Galluzzi *et al.*, 2012).

De entre todos los tipos descritos hasta la actualidad, es el del concepto de apoptosis el que más modificaciones o matizaciones ha sufrido desde que en 1972 se diera un nombre concreto, el de apoptosis, al conjunto de características morfológicas asociadas a la muerte celular observada durante sus estudios en diferentes tejidos y situaciones fisiopatológicas (Kerry *et al.*, 1972).

Arriesgándonos a dar nuestra propia descripción o definición, diríamos que la Apoptosis es el conjunto de sucesos que, de una forma organizada y siguiendo un patrón semejante al de un programa altamente especializado y regulado, se producen en respuesta a un estímulo y cuya manifestación última será la muerte celular individual o de una sección concreta de células dentro de un tejido. Este programa de inducción de muerte se manifestará en forma de cascada de señalización intracelular mediada por proteasas especializadas y que presentará unos rasgos morfológicos y bioquímicos recurrentes, incluso cuando los estímulos desencadenantes puedan tener diferentes orígenes.

1.2.1.1. CONSIDERACIONES MORFOLÓGICAS.

Durante la ejecución de la respuesta de apoptosis, el contenido celular permanece rodeado por su membrana. La célula se deshidrata y pierde su morfología, tanto que si la célula es adherente pierde el contacto con el sustrato y las células adyacentes, pasando a adoptar una morfología redondeada. En el núcleo, la cromatina se condensa (fenómeno conocido como *Picnosis*), se polariza aproximándose a la membrana nuclear y se produce, en la mayoría de los casos, la fragmentación del material genético.

Los orgánulos celulares permanecen prácticamente intactos durante la progresión de la muerte aunque se pueden observar fenómenos de dilatación del Retículo Endoplasmático o agregación de ribosomas en estadios finales del proceso.

En fases avanzadas, se observa la constricción y aparición de abultamientos en la membrana citoplasmática (fenómeno conocido como *blebbing*) que son síntoma de la pérdida de consistencia en su unión a proteínas del citoesqueleto y la fragmentación del

INTRODUCCIÓN

núcleo (o *Cariorrhexis*). Finalmente este colapso celular generalizado se da lugar a pequeños cuerpos con contenido citoplasmático (incluyendo orgánulos celulares y en ocasiones fragmentos nucleares) y rodeados de membrana, denominados cuerpos apoptóticos (Hacker, 2000).

De una forma especial, los cambios morfológicos sufridos a nivel nuclear (*Picnosis* y *Cariorrhexis*) y la resolución en forma de cuerpos apoptóticos son claves para poder diferenciar, a nivel morfológico, la apoptosis de otros tipos de muerte como la Muerte celular por Autofagia o la Necrosis.

En la muerte celular por Autofagia no se produce condensación del material genético y su rasgo más característico es el aumento de la vacuolización celular. Los orgánulos y el contenido celular son secuestrados en vesículas con una doble o múltiple membrana y transportados a los lisosomas donde serán degradados. La muerte por autofagia se resuelve con una autodegradación o autocanibalismo del contenido celular que normalmente acontece a un fallo en los dispositivos propios de inducción de muerte por apoptosis. Durante la Necrosis hay un daño irreversible a nivel de la consistencia de la membrana citoplasmática, vacuolización del citoplasma, condensación, deshidratación y colapso de las mitocondrias y disrupción de las membranas de los orgánulos celulares, entre otros procesos. Como consecuencia la célula se hincha, estalla y vierte su contenido al espacio extracelular. A diferencia de la apoptosis, la necrosis es mayoritariamente una muerte accidental y pasiva (no dependiente de energía), inducida por factores externos, como procesos infecciosos o estrés químico, que promueven en la célula un daño irreversible a nivel del conjunto de sistemas de membrana celulares y pérdida masiva del potencial energético de la misma, haciendo que su supervivencia sea inviable. Al igual que la muerte por autofagia, la necrosis puede aparecer como suceso final en respuesta a un proceso programado de muerte celular en cuyo caso se ha pasado a denominar Necrosis regulada (Festjens *et al.*, 2007; He *et al.*, 2009).

Una vez ejecutado el programa de muerte hasta su última consecuencia, la formación de cuerpos apoptóticos, éstos serán rápidamente fagocitados por las células adyacentes (*in vivo*). Esto se debe a que durante el progreso de la muerte celular se va a producir la exposición hacia la matriz extracelular de marcadores pro-fagocitosis como la fosfatidilserina, Anexina-I o Calreticulina (Elmore, 2007) que serán reconocidos por receptores específicos presentes en células especializadas, como macrófagos, o no

INTRODUCCIÓN

especializadas como células neoplásicas y algunos tipos de células endoteliales. La retirada de los cuerpos apoptóticos del dominio extracelular mediante fagocitosis es característica exclusiva de la apoptosis y tendrá importantes consecuencias fisiopatológicas: la conclusión de la muerte celular en forma de cuerpos apoptóticos evita la liberación del contenido celular al medio extracelular lo cual evita la aparición de procesos inflamatorios; las células fagocíticas no producirán citocinas antiinflamatorias y además, junto con la digestión de los cuerpos apoptóticos, se evitará la aparición secundaria de necrosis (Kurosaka *et al.*, 2003).

1.2.1.2. CASPASAS: EJECUCIÓN DEL PROGRAMA DE MUERTE CELULAR.

Todas las manifestaciones citomorfológicas descritas en el apartado anterior son consecuencia de una masiva proteólisis intracelular activada en respuesta a un estímulo proapoptótico. Las proteasas encargadas de ejecutar este programa de proteólisis activa son denominadas “Caspasas”. Las caspasas son endoproteasas aspártico-específicas-cistein-dependientes: su actividad catalítica depende de la presencia de una cisteína en la secuencia de reconocimiento QACRG y el corte lo realizan siempre después de restos de aspartato. Lo que diferenciarán las caspasas en sus múltiples susceptibles sustratos serán los aminoácidos adyacentes al aspartato (**Figura 5**). Se han descrito 14 caspasas diferentes en mamíferos (nombradas de caspasa-1 a caspasa-14), con implicaciones fisiológicas diferentes: mientras que las caspasas 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10 serán las implicadas en la respuesta apoptótica, caspasas como la 11 y 12 parecen colaborar en respuesta a citocína. Las caspasas 1, 4 y 5 parecen activarse en procesos o respuestas inflamatorias y la 14 parece estar activa solamente durante el desarrollo embrionario.

En relación al papel de las caspasas dentro de la apoptosis podemos hacer una segunda subdivisión atendiendo a la temporalidad de su actuación dentro de la respuesta de muerte celular.

Así, diferenciaremos entre caspasas iniciadoras (caspasa-2, -8, -9 y -10) como aquellas que serán las responsables de la activación, post-estimulación y a través de complejas vías de señalización, de las verdaderas responsables de la ejecución del programa apoptótico, o caspasas efectoras/ejecutoras (caspasa-3, -6 y -7). Las caspasas están ampliamente distribuidas en la mayoría de los tipos celulares, encontrándose en forma de procaspasas inactivas. Esta es una de las razones por las que todas las células de

INTRODUCCIÓN

organismos multicelulares pueden estar preparadas o intrínsecamente preprogramadas para que de forma rápida, coordinada y altamente regulada puedan acometer su propia muerte en respuesta a un estímulo específico (Ameisen, 2002).

Todas ellas poseen tres dominios denominados prodominio (en el extremo N-terminal), subunidad grande y subunidad pequeña (C-terminal). Entre la subunidad mayor y la menor siempre aparece al menos un subdominio o secuencia de unión a nivel de la cual se llevará a cabo la proteólisis necesaria para la activación del zimógeno. Esta activación será de forma autocatalítica en las caspasas iniciadoras, o dependiente de otras caspasas, en el caso de las efectoras.



S.C.C. TESIS 2012

FIGURA 5. ESTRUCTURA DE LAS PRINCIPALES CASPASAS INICIADORAS Y EJECUTORAS.

Se muestra la secuencia de reconocimiento así como los diferentes dominios funcionales y estructurales de las principales caspasas iniciadoras y efectoras analizadas durante nuestro trabajo. Modificado de Lavrik *et al.*, 2005.

Los prodominios son especialmente importantes en el caso de las caspasas iniciadoras. En ellos encontraremos los subdominios encargados de interactuar con las plataformas responsables de su activación. Así se podrán diferenciar Dominios DED (***Death Effector Domain***, dominio efector de muerte) en aquellas iniciadoras, como la 8 o la 10, que requieran interactuar con plataformas creadas a partir de Receptores de Muerte Celular y Dominios CARD (***Caspase Recruitment Domain***, dominio de reclutamiento

INTRODUCCIÓN

de caspasas) en la caspasa-9 para poder formar parte de la plataforma del apoptosoma (apartados 1.2.1.4 y 1.2.1.3, respectivamente).

Es importante reseñar que existen numerosas implicaciones de las caspasas en ámbitos diferentes a la muerte celular como en supervivencia, diferenciación y desarrollo (Lamkanfi *et al.*, 2007).

1.2.1.3. VÍA INTRÍNSECA O MITOCONDRIAL DE ACTIVACIÓN DE APOPTOSIS.

Se habla de Vía Intrínseca o Apoptosis Intrínseca cuando la activación de la muerte celular se produce desde dentro de la misma, es decir, cuando la fuente de estimulación pro-apoptótica se encuentra en la propia célula. Condicionantes negativos tales como la ausencia de estimulación hormonal o factores de crecimiento, fallos en la supresión del programa de muerte, o las secuelas de verdaderas agresiones celulares como el daño en el DNA por la exposición a radiación, hipoxia, radicales libres o infecciones víricas son algunos de los responsables de la inducción de la vía intrínseca (**Figura 6**). A pesar de la heterogeneidad de estos estímulos, el control de la respuesta estará localizado en un solo punto inicial: la mitocondria. Como consecuencia del estrés generado en la célula la mitocondria reaccionará de dos maneras: i) se producirá una variación en el potencial de membrana y ii) se modificará la permeabilidad de su membrana interna a partir de la formación de un poro que comunicará el interior mitocondrial con el citoplasma. Si bien siempre que existe modificación del potencial de membrana aparece el poro, no siempre la aparición del poro conlleva la aparición de la modificación del potencial de membrana. Este poro denominado **MPT (Mitochondrial Transition Pore**, poro de permeabilidad mitocondrial transitoria) será a través del cual se liberarán, al contenido citoplasmático, dos grupos diferentes de proteínas, definiendo a su vez, dos fases temporales de inducción:

- Fase temprana de inducción: se liberan las proteínas **Citocromo C**, **Smac/DIABLO** y **HtrA2**. El Citocromo C será fundamental junto con la proteína Apaf-1, en un proceso energéticamente activo (dependiente de ATP), para formar la plataforma Apoptosoma, necesaria en el reclutamiento y autoactivación de la procaspasa-9 (D'Amelio *et al.*, 2008). La caspasa-9 en su forma dimérica

INTRODUCCIÓN

activa será la encargada de activar a las procaspasas ejecutoras, principalmente la caspasa-3.

Smac/DIABLO y HtrA2/Omi son las proteínas encargadas de bloquear la acción de las proteínas **IAPs** (**Inhibitors of Apoptosis Proteins**, inhibidores de proteínas de apoptosis) cuya función principal es inactivar la cascada de señalización mediada por caspasas ejecutoras (Apartado 1.2.1.5).

- Fase tardía de inducción: liberación de **CAD** (**Caspase Activated DNase**, DNasa activada por caspasas), **Endonucleasa G** y **AIF** (**Apoptosis-Inducing Factor**, factor de inducción de apoptosis). Mientras que la translocación de la Endonucleasa G y AIF al núcleo y la fragmentación temprana del DNA es independiente de la actuación de las caspasas, la actividad de CAD dependerá de la proteólisis de su inhibidor **ICAD** (**CAD Inhibitor**, inhibidor de CAD), que permanece unido a la endonucleasa cuando no hay estimulación de la muerte celular, realizada por la caspasa-3.

El control sobre la Vía Intrínseca se ejerce por los miembros de la Familia de proteínas Bcl-2 (Chipuk *et al.*, 2010). Dentro de ella existen miembros pro-apoptóticos como Bax, Bid, Bim, Bad, Noxa y Puma y miembros pro-supervivencia como Bcl-2 o Bcl-X_L.

Las proteínas pro-apoptóticas tienen implicaciones directas en el programa de muerte inducida desde la mitocondria:

- Bax y Bak facilitarán, previa oligomerización, la formación del MPT, formando parte de él o reclutando las proteínas formadoras del poro.
- Bad es capaz de formar heterodímeros con Bcl-2 evitando su actividad.
- Bcl-2 puede servir de nexo entre la vía extrínseca e intrínseca, (apartado 1.2.1.4).

Los miembros pro-supervivencia intentarán regular la integridad mitocondrial y la liberación de proteínas intramitocondriales, uniéndose a los pro-apoptóticos y de este modo bloqueando oligomerización.

INTRODUCCIÓN

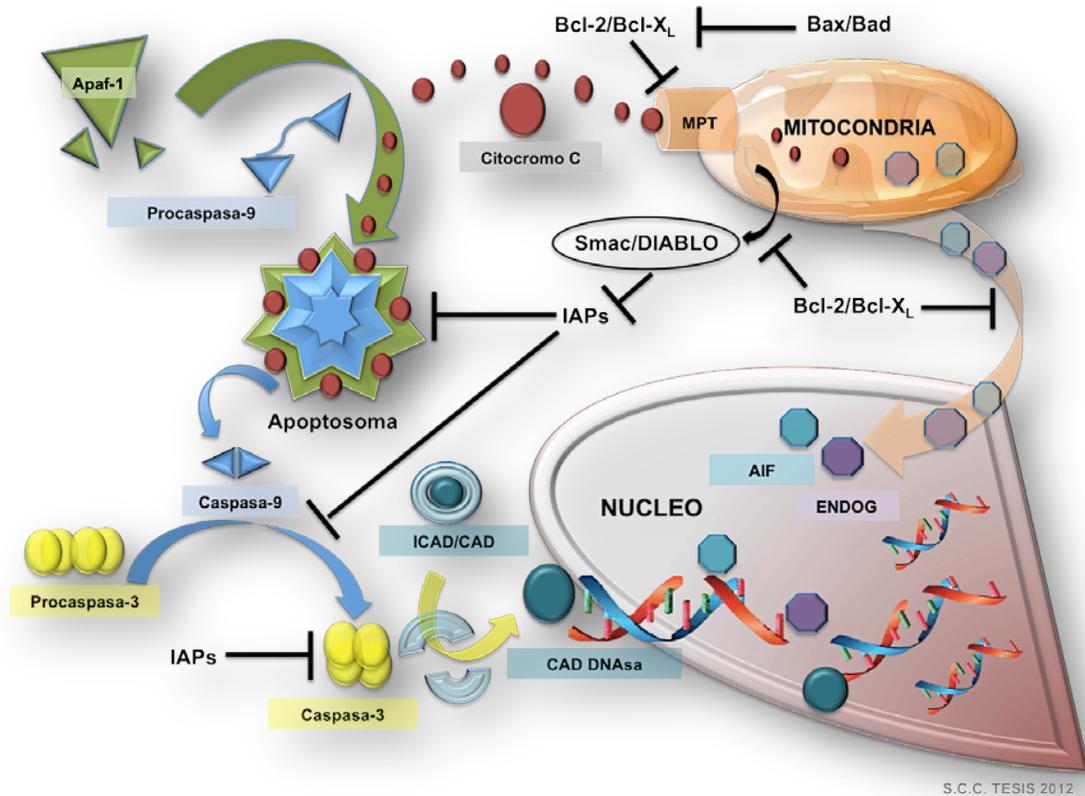


FIGURA 6. VÍA INTRÍNSECA O MITOCONDRIAL DE ACTIVACIÓN DE APOPTOSIS.

1.2.1.4. VÍA EXTRÍNSECA O DE RECEPTORES DE MUERTE CELULAR.

La segunda vía de activación de la apoptosis tiene su origen a nivel de la membrana celular y está mediada por los miembros de la **Superfamilia de Receptores de Muerte Celular** o **TNFRSFs** (*Tumor Necrosis Factor Receptor*, Receptores del Factor de Necrosis Tumoral) (Locksley *et al.*, 2001).

Dentro de ésta serán los miembros TNFR-1, CD95 (Fas, Apo-1), DR3, TRAIL-1 (DR4) y TRAIL-2 (DR5), y sus correspondientes ligandos TNF- α , CD95-L, Apo-3L y TRAIL, respectivamente, los encargados de activar la cascada de señalización mediada por caspasas. De modo general (posteriormente será ampliado en el apartado 1.2.2 para el caso concreto de FAS) la secuencia de eventos necesaria para la transducción de la señal será:

INTRODUCCIÓN

1. Presencia del TNFR en la membrana: el receptor se encuentra oligomerizado en un estado conocido como **PLAD** (del inglés ***Preligand Assembly Domain***) o Estado de Ensamblaje Pre-ligando.
2. La unión del ligando a su receptor, también trimérico, estabiliza al receptor e induce un cambio conformacional en éste, de manera que queda expuesto, en la cara citoplasmática de la membrana, el Dominio de Muerte o **DD** (***Death Domain***). Este dominio DD se encuentra exclusivamente en los miembros de la Superfamilia de TNFRs implicados en muerte celular.
3. La accesibilidad del dominio DD será necesaria para el reclutamiento de proteínas necesarias para formar la plataforma de activación de caspasas implicada en la Vía Extrínseca: el complejo **DISC** (del Inglés ***Death-Inducing Signaling Complex***) o Complejo de Señalización para la Inducción de Muerte. DISC estará constituido por diferentes proteínas, dependiendo del receptor, entre las que se encontrarán proteínas reguladoras, inhibidoras o estabilizadoras, y las proteínas adaptadoras (FADD en el caso de Fas, TRADD en el caso de TNFR-1) necesarias para el reclutamiento de las caspasas iniciadoras, fundamentalmente la caspasa-8, aunque también puede ser reclutada la caspasa-10. Las proteínas adaptadoras poseen dos dominios de interacción proteína-proteína: un dominio DD, con el que se unirá al complementario en el receptor, y un dominio DED complementario al presente en la caspasa iniciadora. La interacción Adaptador-DED-DED-procaspasa es imprescindible para la dimerización y autoactivación de la procaspasa.

La modulación de la señalización a partir de los receptores de muerte la realiza un grupo de proteínas denominadas **FLIPs** (***FLICE Inhibitor Proteins***, proteínas inhibidoras de FLICE o Caspasa-8) (Krueger *et al.*, 2001). Pertenecen al numeroso grupo de proteínas que poseen dominios DED (en concreto dos) y las primeras en ser descritas son las denominadas vFLIPs o proteínas FLIP víricas (Thome *et al.*, 1997). Estas están presentes en algunos gammaherpesvirus como el herpesvirus 8 humano y se vio que pueden interaccionar bloqueando la activación de la caspasa-8 a nivel de DISC en receptores como Fas, TNF-R1, DR3 y DR4.

INTRODUCCIÓN

En humanos, su homóloga cFLIP (también denominada FLAME-1, I-FLICE o CASPER) tiene su gen localizado en el brazo largo del cromosoma 2 (2q33-34) al igual que el gen de la caspasa-8 y la caspasa-10, por lo que se supone que estas proteínas han seguido una evolución conjunta. Se ha visto que cFLIP es capaz de interactuar a través de sus dos dominios DED con numerosos sustratos como FADD, las caspasas 8, 3 y 10 o la proteína Bcl-XL. cFLIP puede presentar diversas isoformas pero se ha visto que son las proteínas cFLIPs y cFLIP_L las principales moduladoras a nivel de DISC de dos maneras diferentes y complementarias: mientras que cFLIPs bloquea totalmente la autoproteólisis de la procaspasa-8 uniéndose directamente a ella, cFLIP_L vía interacción con FADD, permite el reclutamiento de la procaspasa-8 y la proteólisis incompleta (p43-p41) de ésta (Krueger *et al.*, 2001).

No solamente las proteínas FLIPs ejercen su acción sobre la vía extrínseca de inducción de apoptosis. Las posibles interconexiones con la vía mitocondrial la hacen susceptible de estar sometida a los mismos reguladores en el caso de que estas interconexiones existan.

1.2.1.5. FASE EJECUTORA.

Las vías intrínseca y extrínseca de inducción de apoptosis convergen, al final, en la Fase Ejecutora. Las encargadas de finalizar la respuesta celular al estímulo proapoptótico serán las caspasas ejecutoras, 3, 6 y 7 (Slee *et al.*, 2001), las cuales, al igual de lo que ocurría con las iniciadoras, se mantienen como precursores en estado latente hasta que se produce la estimulación de la muerte celular.

A diferencia de las iniciadoras, las caspasas ejecutoras ya se encuentran como dímeros inactivos y su activación no dependerá de la existencia de ninguna plataforma específica sino que se requerirá la proteólisis promovida por las caspasas iniciadoras. La activación de las ejecutoras conlleva una proteólisis generalizada a nivel citoplasmático y nuclear, cuyas consecuencias últimas son la fragmentación del DNA y desorganización del citoesqueleto, provocando los cambios morfológicos descritos en el apartado 1.2.1.1.

La caspasa-3 está considerada la más importante de las caspasas ejecutoras y puede ser activada por cualquiera de las caspasas iniciadoras (caspasa-8, -9 y -10). La caspasa-3 activa de forma específica a la endonucleasa CAD (en ratones, en humanos DFF40).

INTRODUCCIÓN

En células con actividad proliferativa CAD se encuentra unida a su inhibidor ICAD (DFF45 en humanos). En células en las que se ha activado la apoptosis, la caspasa-3 proteoliza ICAD y CAD es libre para poder degradar el DNA cromosómico (Liu *et al.*, 1997; Enari *et al.*, 1998). Pero la caspasa-3 no sólo actúa sobre proteínas nucleares sino también sobre proteínas del citoesqueleto. Entre sus sustratos, uno de los mejor caracterizados es la geoslina, proteína de unión a actina. La proteólisis de la geoslina conlleva una desorganización de los filamentos de actina, y por lo tanto, la desorganización de todo el sistema de transporte y señalización a partir de la membrana plasmática así como la imposibilidad de llevarse a cabo la división celular. La reorganización de los filamentos de actina es imprescindible en la aparición del *blebbing* que conducirá a la formación de los cuerpos apoptóticos.

Las caspasas 6 y 7 parecen actuar de forma menos específica que las caspasa-3 y sus efectos están relacionados con eventos tardíos dentro del programa de apoptosis, siendo su activación mayoritariamente dependiente de la caspasa-3. La caspasa-7 parece actuar como la 3 a nivel del núcleo, proteolizando dianas como PARP o NuMA (Timmer y Salvesen, 2007), mientras que la actividad nuclear de la caspasa-6 parece estar orientada hacia la proteólisis de las lamininas A y B. La desorganización de las lamininas conduce a la deformación de la membrana nuclear, que posteriormente revestirá los fragmentos cromosómicos. La activación de la caspasa-6 puede ser inducida por los niveles de Citocromo C y de este modo parece ser capaz de activar la procaspasa-8, lo cual representa una vía de interconexión entre caspasas iniciadoras de la vía extrínseca y la vía intrínseca (Cowling y Downward, 2002).

La activación de las caspasas ejecutoras es irreversible una vez que éstas han sido activadas por lo que debe existir un control estricto para prevenir una activación inapropiada de las mismas. Las encargadas del control de la señalización mediada por las caspasas ejecutoras son las proteínas IAPs. Las primeras descritas son de origen vírico, más concretamente de Baculovirus, y en mamíferos se han descrito 8 IAPs de las cuales tres, XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 están directamente relacionadas con la inhibición de las caspasas 3, 7 y 9 (Chai *et al.*, 2001; Srinivasula *et al.*, 2001). Su descubrimiento en Baculovirus hace que el principal dominio que poseen se denomine Dominio **BIR** (del inglés **Baculovirus IAP Repeat**) (Verhagen *et al.*, 2001). Este dominio BIR, de unos 70 aminoácidos y con un subdominio con estructura en dedo de zinc, es indispensable para el reconocimiento e interacción con las caspasas (Takahashi *et al.*, 1998).

INTRODUCCIÓN

Además del dominio BIR, se ha descrito la presencia de otros dominios implicados en la inhibición de la actividad caspasa: un segundo dominio con estructura de dedo de zinc denominado **RING** (del inglés *Really Interesting New Gen*) en el extremo c-terminal con actividad E3 ubiquitin-ligásica. Este subdominio permite su autoubiquitinación para su degradación en el proteasoma, así como la ubiquitinación de sus caspasas sustrato (Suzuki *et al.*, 2001). La proteína Smac/DIABLO es un regulador negativo de IAPs: liberada desde la mitocondria en la vía intrínseca es capaz de eliminar el efecto represor de XIAP uniéndose a ella (siguiendo un modelo de inhibición de tipo competitivo) (Du *et al.*, 2000).

1.2.1.6. ELIMINACIÓN DE LAS CÉLULAS APOPTÓTICAS. FAGOCITOSIS.

Muchas de las funciones de las caspasas ejecutoras están ligadas a la resolución en forma de cuerpos apoptóticos y su fagocitosis. Las células apoptóticas son reconocidas por las fagocíticas debido a la aparición de señales, fundamentalmente a nivel de membrana, que surgen como consecuencia de la actividad de las caspasas. La más conocida es la exposición hacia el espacio extracelular de fosfatidilserina, lo cual ocurre en estadios muy tempranos de la inducción de la muerte celular (Fadok *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1995). Esta translocación parece estar ligada a movimientos de fosfolípidos de tipo *flip-flop* debidos a la inhibición de aminofosfolípido translocasas (Bratton *et al.*, 1997). Aunque se supone la participación de las caspasas en el proceso, aún no está totalmente esclarecido su papel (Bervers y Williamson, 2010). La exposición de fosfatidilserina, junto con modificaciones químicas a nivel de lípidos de membrana y alteraciones en los patrones de glicosilación de proteínas son reconocidos por receptores específicos en la membrana de las células fagocíticas: MFG-E8, Gas6 o la glicoproteína β 2GPI, entre otras, (Hoffmann *et al.*, 2001; Erwig y Henson, 2008) son capaces de unirse a fosfatidilserina. Las proteínas surfactantes SP-A y SP-B (Vandivier *et al.*, 2002) así como algunas lectinas son capaces de reconocer perfiles de glicosilación asociados a muerte celular (Ogden *et al.*, 2001).

INTRODUCCIÓN

1.2.2. TNFRSF6.

En Mayo de 1989, el grupo de Shin Yonehara, en el Instituto Metropolitano de Medicina, en Tokio (Japón), desarrolló un anticuerpo monoclonal capaz de inducir muerte en numerosos tipos celulares humanos y denominaron **FAS (FS7-Associated cell surface antigen)** a la proteína de membrana que era reconocida por éste (Yonehara *et al.*, 1989). En julio del mismo año, el grupo de Krammer, en el Instituto de Inmunología y Genética del Centro de Investigación del Cáncer, en Heidelberg (Alemania) publican el desarrollo de un anticuerpo monoclonal de ratón, el APO-1, que era capaz de inducir apoptosis en células leucémicas y linfocitos activados humanos (Trauth *et al.*, 1989). En 1991 el grupo Nagata, del Instituto de Biociencia de Osaka (Japón), consigue clonar la proteína de membrana que era reconocida por el anticuerpo, el antígeno Fas, y concluyó que era la misma molécula que APO-1. Poco tiempo después este mismo grupo consigue clonar el ligando fisiológico de FAS, FAS_L (Itoh *et al.*, 1991). Estos trabajos marcaron las pautas para poder caracterizar uno de los sistemas más importantes de inducción de la apoptosis a nivel de membrana en mamíferos.

1.2.2.1. ESTRUCTURA.

FAS (APO-I, APT1o CD95), pertenece a la familia de los Receptores de Muerte Celular o TNFRSFPs, siendo denominado TNFRSFP6 o miembro número 6.

El gen *Fas* se localiza en el brazo largo del cromosoma 10 en humanos (10q24.1). En ratón se localiza en el cromosoma 19. El gen está constituido por 9 exones (**Figura 7**) (Nagata y Golstein, 1995). La expresión del gen es activa en gran variedad de tejidos pero es especialmente relevante en el hígado, corazón, páncreas, cerebro, timo y en linfocitos.

El receptor FAS es una glicoproteína transmembrana Tipo I (con su extremo N-terminal hacia el dominio extracelular), de aproximadamente 48 kDa, constituida por 319 aminoácidos. En la membrana FAS se asocia formando homotrímeros.

FAS posee un dominio N-terminal de 157 aminoácidos, rico en cisteínas, expuesto en la cara extracelular (**Figura 7**). La presencia de subdominios ricos en cisteínas o **CRDs** (del inglés **Cystein Rich Domain**) es común a todos los miembros de los TNFRSFPs, los cuales suelen presentar de 2 a 6 subdominios de este tipo, en su región extracelular.

INTRODUCCIÓN

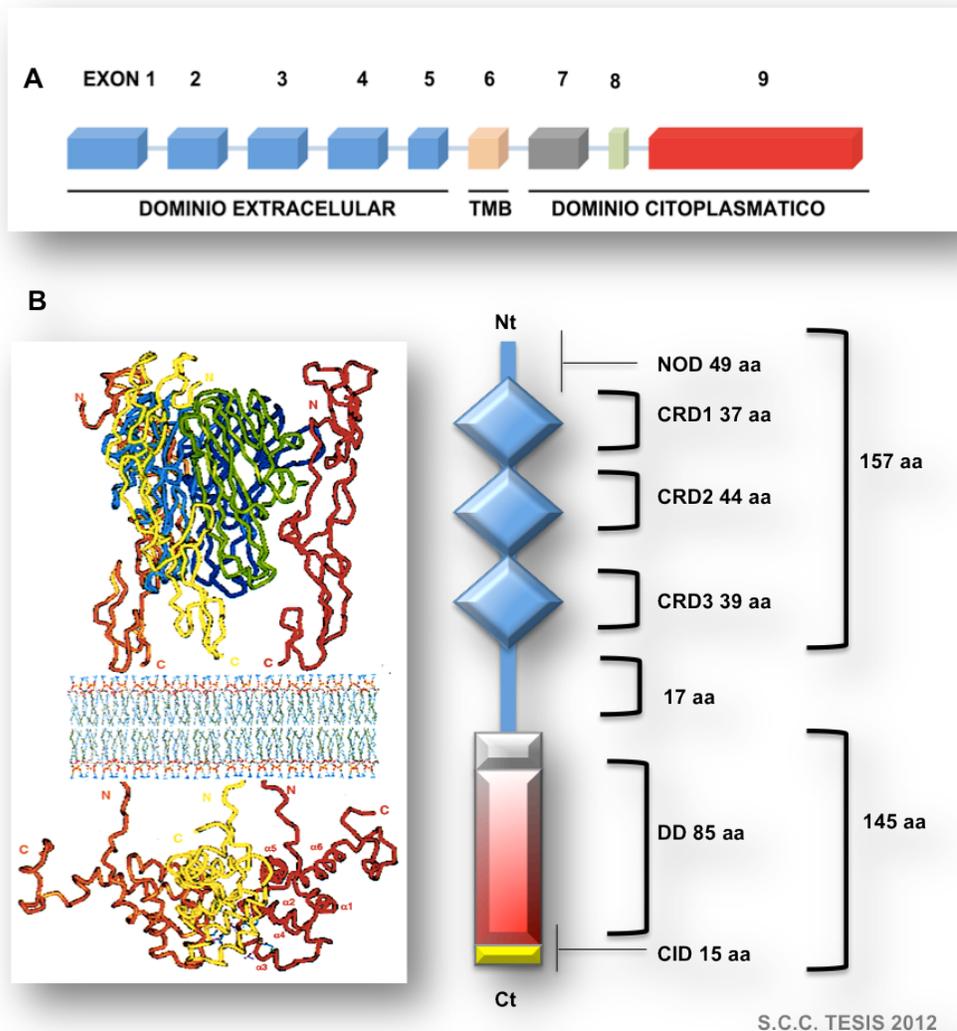


FIGURA 7. TNFRSF6.

A. ESQUEMA DEL GEN *Fas*.

Los 5 primeros exones codifican los elementos del dominio N-terminal, un exón codificará para los 17 aa del dominio transmembrana y tres lo harán para el citoplasmático. Las marcas transversales marcan el posible sitio de mutación, cerca de la secuencia para el dominio de muerte que evitaría el funcionamiento correcto del Sistema FAS/FAS-L.

B. RECEPTOR FAS.

IZQUIERDA. POSIBLE MODELO DEL RECEPTOR FAS ACTIVADO. Basándose en la homología existente con TNF-R1 y TNF β (parte superior) el dominio extracelular del receptor esta reconstruido sobre la simulación de un complejo formado por dos trímeros, uno de sTNF-R1 (naranja, amarillo y rojo) y otro de TNF β (en azul, cian y verde). La conformación del dominio citoplasmático está desarrollada a partir de la disposición que adquieren los monómeros solubles del dominio de muerte de FAS (FASDD) cuando trimerizan (naranja, amarillo y rojo). El esquema no muestra los dominios transmembrana.

Adaptado de (2).

DERECHA. RECEPTOR FAS. Se muestran los tres grandes dominios estructurales con las referencias al número de aminoácidos que los conforman en cada caso. En el dominio extracelular: NOD o Dominio de oligomerización N-terminal y los tres dominios ricos en cisteínas (CRD1, CRD2 y CRD3). En el dominio citoplasmático: DD o Dominio de muerte y CID o Dominio de Inhibición C-terminal.

INTRODUCCIÓN

En el caso concreto de FAS, éste presenta tres CRDs siendo especialmente importantes el CRD2 y CRD3 por ser los lugares de interacción con el ligando de FAS (FAS_L).

El dominio transmembrana está formado por solo 17 aminoácidos (Leu-158 a Val-174) y sirve de nexo con el dominio citoplasmático, que comprende el extremo C-terminal de la proteína. En esta región C-terminal, formada por 145 aminoácidos, con un alto porcentaje de restos de aminoácidos cargados (24 ácidos y 19 básicos), de los cuales 85 son esenciales para la transmisión de la señal (Nagata, 1997) y constituyen el denominado Dominio de Muerte o **DD** (del inglés *Death Domain*).

El dominio de muerte tiene tendencia a auto-agregarse en solución y la estructura terciaria que se desprende por análisis con NMR muestra que está formado por 6 hélices α antiparalelas (Huang *et al.*, 1996). El DD no posee actividad enzimática, a diferencia de otros receptores de membrana implicados en la transducción de señales. Sin embargo, interviene en la transmisión de la señal posibilitando interacciones de tipo proteína-proteína. La región citoplasmática marca la pauta diferencial y funcional dentro de los miembros de la familia de los TNFRSFs: FAS presenta una homología de 80 aminoácidos con TNFR1 y 2, coincidiendo estos con la ubicación del dominio de muerte.

1.2.2.2. EL SISTEMA FAS/FAS_L: RUTA DE SEÑALIZACIÓN.

1.2.2.2.1. EL LIGANDO DE FAS: FAS_L.

El ligando de FAS pertenece a la familia de los **TNFs** (del inglés *TNF-related apoptosis inducing ligand*), la cual incluye a miembros como TNF, linfotóxina, el ligando de CD30, o TRAIL. Los TNFs pertenecen al grupo de las citocinas o proteínas reguladoras de la proliferación y diferenciación celular. FAS_L es una proteína de membrana Tipo II cuyo extremo N-terminal se orienta hacia la cara citoplasmática y el C-terminal hacia la extracelular. El dominio extracelular contiene entorno a 150 aminoácidos altamente conservados dentro de la familia de los TNFs. Su estructura es homotrimérica, al igual que la de su receptor.

FAS_L puede encontrarse también como forma soluble: la proteólisis a nivel de membrana es mediada por metaloproteasas.

INTRODUCCIÓN

La forma activa soluble de FAS_L será también trimérica pero el potencial de inducción de muerte mediada por ella es del orden de 1000 veces menor. La forma soluble del FAS_L humano si es capaz de inducir apoptosis mientras que la de ratón no.

1.2.2.2.2. ESQUEMA GENERAL DE ACTIVACIÓN.

De modo general, la interacción de FAS con su ligando, FAS_L promueve la agregación de moléculas del receptor, homotrímeros preestablecidos o en estado de pre-ligando (PLAD, apartado 2.1.4). La formación del complejo FAS/FAS_L implica:

1. Se estabiliza la oligomerización del receptor. En consecuencia se produce un cambio conformacional en las moléculas de éste que se transmitirá al extremo C-terminal de la proteína. Como resultado de este cambio quedará expuesto su dominio de muerte DD hacia la cara citoplasmática de la membrana (Scott *et al.*, 2009).
2. Se promueve el reclutamiento de la proteína adaptadora **FADD** (del inglés **FAS-associated Death Domain-containing protein**) que interaccionará con el receptor a través de su propio dominio de muerte (**Figura 8**). El adaptador FADD, también conocido como MORT1 (Chinnaiyan *et al.*, 1995), fue identificado gracias a un experimento basado en el sistema de doble híbrido en *S.cerevisiae*, usando el dominio C-terminal de FAS como cebo. Además de su papel en la señalización mediada por TNFRs, FADD está implicado en otros sucesos celulares durante el desarrollo embrionario, supervivencia, proliferación y división celular, progresión tumoral y en modalidades de muerte celular como la necrosis y la muerte por autofagia (Tourneur y Chiocchia, 2010).

La interacción de FADD con el complejo FAS/FAS_L tiene dos funciones importantes: por un lado estabiliza los homotrímeros de receptor actuando como puente entre ellos y por otro lado induce el reclutamiento de la procaspasa-8 (o la procaspasa-10) (Sandu *et al.*, 2006). El sistema formado por FAS/FAS_L, FADD y procaspasa-8 se denomina DISC o complejo de señalización de muerte.

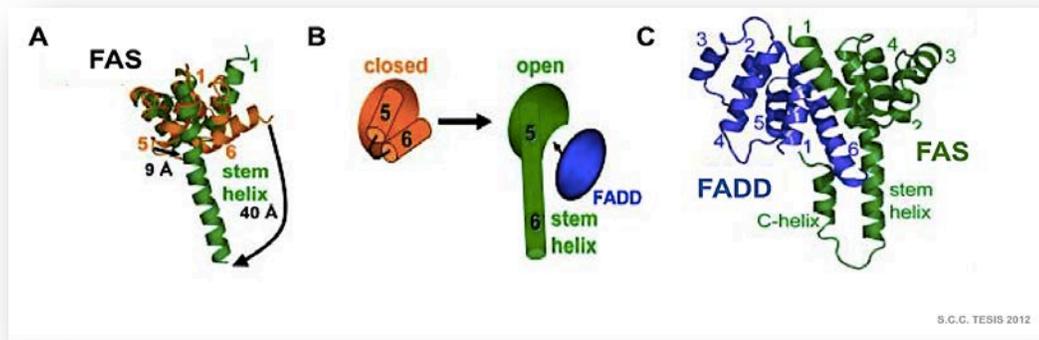


FIGURA 8. ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR FAS. INTERACCIÓN CON EL ADAPTADOR FADD.

- A.** Estructura del monómero de receptor pre-ligando.
B. Esquema del cambio conformacional inducido tras la unión al ligando y el lugar de exposición del DD para su interacción con FADD.
C. Representación de la interacción proteína-proteína entre FAS y FADD
 Adaptación de la Figura 1 de (Scott *et al.*, 2009).

La constitución de esta plataforma es esencial para que la señal se transduzca a través de la activación de las procaspasas iniciadoras. El reclutamiento y la acumulación de procaspasas a nivel de DISC inducirá su autoactivación. Para que la procaspasa-8 se active tienen que sucederse tres pasos (**Figura 9**):

1. Reclutamiento de la procaspasa-8 a nivel del complejo FAS/FAS_L/FADD y dimerización siguiendo el denominado Modelo de Dimerización Dirigido por Proximidad (Keller *et al.*, 2010): FADD contiene además del dominio DD un Dominio Efecto de Muerte, DED o dominio MORT, a través del cual interaccionará con dominios análogos, repetidos en *tandem*, presentes en las procaspasas 8 y 10. La unión de FADD al complejo FAS/FAS_L induce un cambio conformacional en el adaptador (Scott *et al.*, 2009) de modo que el dominio DED estará accesible para su interacción con los DED de las procaspasas (Carrington *et al.*, 2006). Además esta unión FAS/FAS_L/FADD activa el reclutamiento de la procaspasa-8 a nivel de la membrana. Tras la interacción FADD-DED-DED-procaspasa, la proximidad de múltiples procaspasas es suficiente para inducir la dimerización (Pop *et al.*, 2007).

INTRODUCCIÓN

2. Autoproteólisis intradimérica en la secuencia de unión entre la subunidad grande y la pequeña.
3. Proteólisis interdimérica entre la subunidad grande y el prodominio: de este modo la caspasa-8 se libera de los dominios implicados en el reclutamiento (dominios DED) y la caspasa es liberada del complejo DISC como heterotetrámero activo (2p18/2p10).

Tras la estimulación, los receptores preasociados forman microagregados en la membrana plasmática, que permiten la constitución de plataformas DISCs aunque en pequeño número (**Figura 10**). Los microagregados se forman en microambientes especializados dentro de la membrana plasmática: *rafts* lipídicos (Mollinedo y Gajate 2006; Gajate y Mollinedo, 2011).

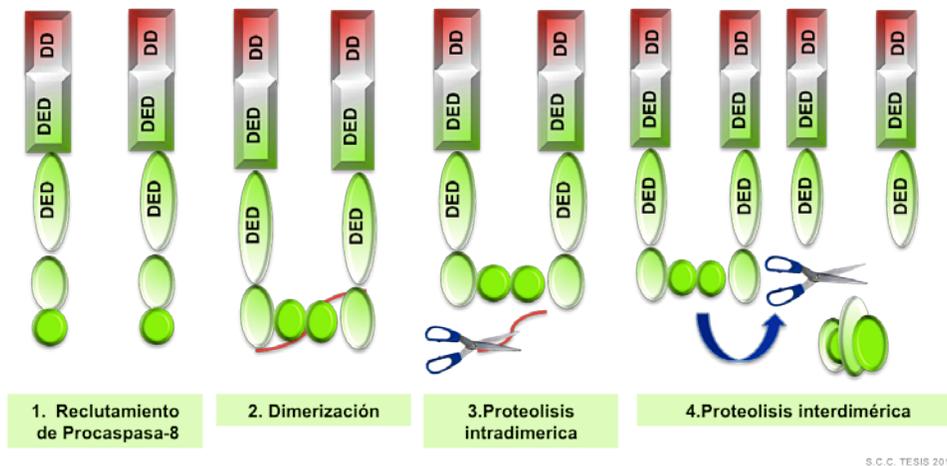


FIGURA 9. PASOS EN LA ACTIVACIÓN DE LA PROCASPASA-8 A NIVEL DE DISC.

La localización de proteínas en los *rafts* lipídicos requieren modificaciones post-traduccionales tales como *N-miristoilación* o *S-palmitoilación*. En el caso de FAS se ha visto que la palmitoilación en los residuos Cys199 y Cys 194 es indispensable para su localización en los *rafts* lipídicos (Feig *et al.*, 2007) ya que, en ausencia de la misma, los niveles de formación de agregados, así como la transducción de la señal en los primeros estadios de la activación de la vía, se ven muy comprometidos.

INTRODUCCIÓN

Se ha identificado recientemente una región rica en lisina en FAS en el dominio citoplasmático que actuaría como un nanodominio de localización en *rafts* (Rossin *et al.*, 2010).

Seguidamente se produce un segundo grado o nivel de agregación de receptores los cuales permanecen confinados en los *rafts* lipídicos formando grandes plataformas de transducción de señal o **SPOTs** (**Signalling Protein Oligomerization structures**, estructuras de señalización de proteínas oligomerizadas). La caspasa-8 activa facilitará esta formación de grandes *clusters* o plataformas de receptor (también denominados receptosomas) que serán internalizadas a través de un proceso de endocitosis mediado por clatrina (Tchikov *et al.*, 2011).

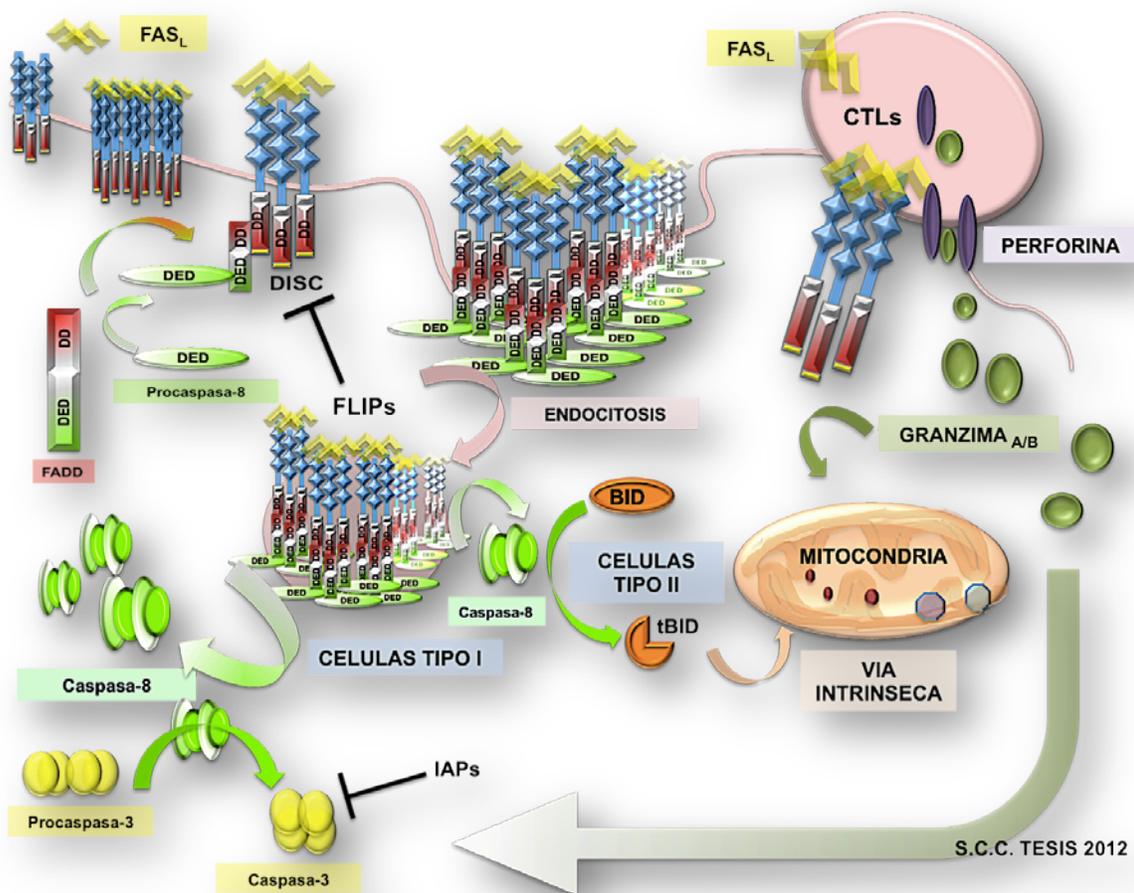


FIGURA 10. RUTA DE SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR EL RECEPTOR FAS.

INTRODUCCIÓN

Estudios realizados en estas plataformas o receptosomas revelan la presencia de proteínas como Rab4, EEA-1 o Catepsina D, implicadas en procesos de internalización de receptores por endocitosis (Lee *et al.*, 2006; Feig *et al.*, 2007). La presencia en el receptor de un dominio de unión a glicofosfolípidos es imprescindible para su internalización así como para la interacción con la proteína *Ezrin* implicada en la interacción con los filamentos de actina (Chakrabandhu *et al.*, 2008).

Las vesículas que contienen el receptor son transportadas a nivel del compartimento celular endosómico. Será aquí donde se produzca la mayor formación de DISCs. La internalización del receptor y su localización en el compartimento endosómico son imprescindibles para que se produzca un ensamblaje eficiente de DISC, la amplificación de la señal y la activación de la fase ejecutora de muerte celular.

Si la internalización del receptor no se produce pueden generarse respuestas antagónicas: la inhibición de la internalización de FAS bloquea la señal de apoptosis e induce la activación de programas *pro* proliferativos a través de NF- κ B y cascadas de MAPKs (Barnhart *et al.*, 2004; Golks *et al.*, 2006).

Dependiendo de los niveles de caspasa-8 iniciadora activada, la fase ejecutora podrá seguir dos caminos (Scaffidi *et al.*, 1998): si los niveles son altos, la caspasa-8 será capaz de activar directamente a las ejecutoras principalmente a la caspasa-3. Las células en las que por sus condicionantes desarrollan preferentemente esta señalización se denominan **Células Tipo I**. Si por el contrario los niveles de caspasa-8 no son elevados se podrá desarrollar una vía secundaria ejecutando la proteólisis de la proteína proapoptótica BID (apartado 1.2.1.3). La forma truncada de BID, tBID es capaz de activar la vía intrínseca de apoptosis estableciendo interacciones proteína-proteína con los miembros pro-supervivencia de la familia Bcl-2 encargados de reprimir la apoptosis a nivel de la mitocondria. Las células en las que se puede establecer este tipo de patrón de activación se denominan **Tipo II** (Barnhart *et al.*, 2003).

1.2.2.2.3. MODULACIÓN Y REGULACIÓN DE SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR FAS.

Además de los mecanismos básicos de regulación de la vía extrínseca, descritos en los apartados 1.2.1.4 y 1.2.1.5, en la señalización mediada por el receptor FAS existen otros sistemas de modulación y control de la respuesta apoptótica:

INTRODUCCIÓN

- Co-activadores o moduladores positivos:
 1. **DAXX** (**FAS Death Domain-Associated Protein**, proteína de unión al dominio de muerte de FAS) se une específicamente a FAS potenciando la capacidad de inducción de muerte mediante la activación de la vía de JNK (Yang *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 2000; Tournier *et al.*, 2000).
 2. **FAF-1** (**FAS Associated Factor-1**, Factor-1 asociado a FAS) (Chu *et al.*, 1995) que actúa a nivel de DISC estabilizándolo y reprimiendo con ello la vía de supervivencia al disminuir la actividad de NF- κ B (Park *et al.*, 2004).
 3. **FLASH** (**Flice-Associated Huge Protein**, proteína grande asociada a caspasa-8) puede formar parte de DISC y potenciar la activación de la procaspasa-8 (Imai *et al.*, 1999).
- Represores:
 1. **FAP-1** (**FAS-Associated Phosphatase-1**, fosfatasa-1 asociada a FAS) es la única proteína que se asocia al dominio C-terminal de FAS y actúa disminuyendo el tráfico de receptores a la membrana (Ivanov *et al.*, 2003).
 2. **FIST** (**FAS-Interacting Serine-Threonine Kinase**, serina-treonina quinasa asociada a FAS) se ha visto que es capaz de unirse a FAS y fosforilar FADD (Rochat-Steiner *et al.*, 2000).
 3. **SUMO-1** (**Small Ubiquitin-related Modifier-1**, modificador pequeño 1 relacionado con ubiquitina) reprime la unión de FADD al receptor (Okura *et al.*, 1996; Gill, 2004).

1.2.2.3. OTROS EFECTOS LIGADOS A FAS: ACTIVACIÓN INDEPENDIENTE DE LIGANDO, NECROSIS REGULADA Y EFECTO CITOTÓXICO DEL SISTEMA PERFORINA-GRANZIMA.

1.2.2.3.1. ACTIVACIÓN INDEPENDIENTE DE LIGANDO.

Existen numerosas evidencias de la posible activación de la cascada de señalización mediada por el receptor FAS en ausencia de la unión a su ligando fisiológico FAS_L: se ha determinado la existencia de un dominio de oligomerización en el extremo N-terminal del receptor, diferente al dominio de unión al ligando y que, con independencia de la presencia del dominio citoplasmático, es capaz de inducir homo y heterotrimerización de

INTRODUCCIÓN

las moléculas de receptor. Estos trímeros son capaces de reclutar FADD y procaspasa-8 en ausencia de unión del ligando (Papoff *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2000). La interacción entre las formas pre-ensambladas del receptor y FADD parecen estabilizar las moléculas de receptor, favorecen la formación de los *clusters* a nivel de membrana y activan la señalización incluso sin la participación de FAS_L (Scott *et al.*, 2009). Algunos estímulos externos como la radiación ultravioleta o la radiación gamma (Huang *et al.*, 2003) son capaces de inducir apoptosis mediada por FAS (Aragane *et al.*, 1998; Zhuang y Kochevar 2003). Agentes antitumorales como el Resveratrol, Edefolsina o el Cisplatino, entre otros, facilitan la redistribución y localización de FAS en los *rafts* lipídicos y activan el programa apoptótico mediado por FAS (Micheau *et al.*, 1999; Delmas *et al.*, 2003; Gajate *et al.*, 2004; Mollinedo *et al.*, 2004).

1.2.2.3.2. NECROSIS REGULADA.

Bajo determinadas circunstancias en la que la activación del programa apoptótico no es totalmente eficaz, a menudo relacionada con una disfunción de la actividad de las caspasas, se ha visto que se produce el reclutamiento de la serína-treonína quinasa **RIP-1 (RIPK-1)** (Hitomi *et al.*, 2008) a nivel de FAS. La actividad de RIP-1 parece estar ligada a la de la quinasa RIP-3 encargada de fosforilar numerosas proteínas implicadas en el metabolismo de la glucosa y cuyos cambios están ligados a la aparición de necrosis (Holler *et al.*, 2000). Los rasgos de la necrosis aparecen de forma tardía siendo los primeros cambios fenotípicos típicos de un programa de apoptosis como, por ejemplo, la exposición de fosfatidilserina.

Aunque se desconoce mucho sobre esta nueva modalidad de muerte celular, a la que se ha denominado Necroptosis, lo que si se ha confirmado, en el caso de FAS, es que en presencia de caspasa-8 unida a FLIP RIP-1 es reprimida.

1.2.2.3.3. SISTEMA PERFORINA-GRANZIMA.

Los Linfocitos T Citotóxicos, CTLs, son capaces de inducir muerte celular por apoptosis utilizando el sistema FAS/FAS_L. En células infectadas con virus y células tumorales los CTLs pueden usar el sistema FAS/FAS_L combinado con la acción citotóxica de las serin-proteasas Granzima A y B (Brunner *et al.*, 2003).

INTRODUCCIÓN

Para ello, una vez anclados a la membrana de la célula diana necesitan secretar la molécula Perforína que formará un poro a nivel de ésta y se producirá la secreción de los gránulos que contienen las granzimas. La granzima B actuará a nivel de la activación de la procaspasa-10, caspasa-3 e ICAD mientras que parece que la granzima A contribuye activando vías independientes de caspasas (Russell y Ley, 2002; Pardo *et al.*, 2004).

1.2.2.4. IMPORTANCIA FISIOPATOLÓGICA DE FAS.

El sistema FAS/ FAS_L es indispensable a nivel fisiológico por su función en el mantenimiento de la tolerancia auto-antigénica y por su papel en la actividad citotóxica de los linfocitos T.

Mutaciones de *Fas* en la línea germinal están asociadas con el Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune o **ALPS (*Autoimmune Lymphoproliferative Síndrome*, LPR en ratones)** (Fisher *et al.*, 1995; Rieux-Laucat *et al.*, 1995). ALPS aparece como respuesta a un defecto en la apoptosis de los linfocitos causado por mutaciones en el gen *Fas*. La enfermedad también puede deberse a mutaciones en el gen que codifica el ligando de FAS. Estas dos formas de la enfermedad han sido referidas como ALPS tipo 1A y tipo 1B, respectivamente, existiendo variantes dentro de cada grupo atendiendo a la mutación que se presente en cada caso (Bettinardi *et al.*, 1997; Infante *et al.*, 1998).

Adicionalmente existe un tipo II de ALPS causado por la mutación del gen de la caspasa-10 (Wang *et al.*, 1999). La enfermedad consiste en un cuadro crónico que se hereda de forma autosómica dominante pero con un alto grado de variabilidad en su expresión clínica. El mecanismo patológico que justifica este cuadro consiste en el acumulo de linfocitos T debido al fallo en la apoptosis mediada por FAS. Junto a esta parte linfoproliferativa, el fallo en la apoptosis de los linfocitos B podría ser responsable de los fenómenos autoinmunitarios que completan el síndrome. El síndrome se caracteriza por la aparición de esplenomegalia, linfadenopatía, hipergammaglobulemia, autoinmunidad, linfocitosis B y la expansión de una población inusual de células T aunque los efectos en ratones *Lpr/lpr* (*lpr* implica la inserción de un endotransposon en el gen que causa una importante disminución de la expresión del mRNA de FAS) son algo diferentes, con un desarrollo de hipergammaglobulemia, glomerulonefritis, artritis y vasculitis entre otros (Ramenghi *et al.*, 2000).

INTRODUCCIÓN

Las diferencias también existen a nivel del origen de la enfermedad: en ratones está asociada a mutaciones en homocigosis mientras que los humanos que la presentan son heterocigóticos. Se han descrito déficits de apoptosis mediados por FAS en ausencia de mutaciones del gen Fas (Ramenghi *et al.*, 2000), como rasgo familiar que predispone a padecer enfermedades autoinmunes y cáncer, lo que ha originado el término de enfermedad linfoproliferativa autoinmune (a diferencia de la ALPS).

Existe un subtipo de lupus eritematoso en el que se ha visto que existe una sobreexpresión de una forma mutante del receptor FAS, carente de dominio transmembrana. Esta proteína interferiría en la función normal del sistema FAS/ FAS_L y podría jugar un papel importante en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, bloqueando la muerte de células autoreactivas (Cheng *et al.*, 1994).

El sistema FAS/FAS_L también tiene importantes implicaciones en el desarrollo de tumores. Las líneas celulares tumorales y las células de tumores *in vivo* son generalmente resistentes a la apoptosis inducida por FAS debido a que son capaces de reprimir la expresión del receptor, secretar formas solubles de FAS o sintetizar formas de FAS defectuosas a nivel funcional. Estas alteraciones pueden ser debidas a mutaciones somáticas que dañan a Fas o al sistema de transducción de FAS por lo cual la célula neoplásica adquiere una eficaz protección ante el reconocimiento del sistema inmunitario.

Se han descrito células cancerígenas que son capaces de expresar FAS_L en sus membranas (melanoma, cáncer de colon, algunos linfomas, carcinoma de tiroides y hepatocarcinoma) lo cual les confiere una tolerancia inmunológica específica al ser capaces atacar y promover la muerte de las células inmunológicas que expresan el receptor FAS (células T citotóxicas y NK) (Solary *et al.*, 1998). Esta es una de las estrategias más repetidas en la bibliografía de cómo las células tumorales usan el sistema de FAS como mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria (Hahne *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2001). Sin embargo, parece que, ya sea en líneas celulares que son FAS positivas o FAS negativas, la incorporación de FAS_L produce parada del crecimiento tumoral, ya sea en forma de apoptosis en las líneas FAS positivas o a través de inflamación aguda con polinucleares y monocitos en las líneas que son FAS negativas (Arai *et al.*, 1997).

INTRODUCCIÓN

El reconocido papel del oncogén c-myc en condiciones normales como inductor de la apoptosis para evitar el resurgimiento de tumores requiere la interacción en la superficie celular de FAS/FAS_L (Hueber *et al.*, 1997), mientras que el potencial oncogénico de H-ras puede residir en su capacidad, no solamente de promover la proliferación celular, sino de inhibir de forma simultánea la apoptosis inducida por FAS (Peli *et al.*, 1999).

Existen mutaciones en *Fas* que pueden incrementar la patogenicidad de diversos tumores.

En estudios realizados sobre carcinomas de células escamosas, mutaciones somáticas que conllevan la producción de receptores con alteraciones tanto en el dominio extracelular como citoplasmático, muestran una acentuada progresión hacia formas más agresivas, como por ejemplo la relación entre genotipos mutantes de *Fas* y *Fas_L* y el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (Zhang *et al.*, 2005).

En el otro lado de la balanza, y apoyando el concepto de desregulación del sistema FAS/FAS_L, se encuentran aquellas enfermedades debidas a un aumento de la apoptosis que provoca una muerte celular excesiva. El gen del TNFRSF6 se localiza en el cromosoma 10 en una zona de importante relevancia en la enfermedad de Alzheimer. En 2003 se publicó la relación entre los primeros estadios de demencia en la Enfermedad de Alzheimer y la presencia de polimorfismos en la región promotora del gen *Fas* (Feuk *et al.*, 2003).

Se ha visto que disfunciones en el sistema FAS/ FAS_L pueden estar relacionadas con la aparición de Diabetes (3).

Una inyección de anticuerpos anti-FAS causa apoptosis masiva de hepatocitos y muerte de ratones adultos en pocas horas (Ogasawara *et al.*, 1993; Adachi *et al.*, 1996), lo que sugiere que las hepatitis fulminantes en humanos podrían estar mediadas por FAS. Avalan esta hipótesis la acumulación de linfocitos T citotóxicos en estas hepatitis y la sensibilidad a la apoptosis mediada por FAS de cultivos primarios de hepatocitos (Ni *et al.*, 1994).

FAS también está implicado en la patología del VIH de modo que sería la vía de muerte activada en los linfocitos T durante el proceso de infección (Alfonzo *et al.*, 2008).

1.3. VIROTERAPIA. EL NDV Y SU CAPACIDAD ONCOLÍTICA.

1.3.1. VIROTERAPIA.

Los procesos tumorales o cancerígenos aparecen como resultado de la desregulación de los sistemas encargados de mantener el equilibrio entre crecimiento y muerte celular, pudiendo ser los desencadenantes tanto desordenes genéticos como ambientales (Igney y Krammer, 2002; Gerl y Vaux, 2005). Los fallos en el control del ciclo celular o en las vías que controlan los programas de muerte conllevan una división y crecimiento celular descontrolado y la aparición de tumores en tejidos especializados o clones celulares defectuosos en neoplasias hematológicas.

Las terapias antitumorales actuales cuentan con dos obstáculos principales: los tratamientos quimioterapéuticos tienen asociada una alta toxicidad en tejidos sanos y poseen una eficacia limitada. Como consecuencia, en muchos casos la supervivencia de los pacientes con tumores malignos se encuentra altamente comprometida. En este sentido, los esfuerzos están centrados en conseguir terapias muy específicas contra las dianas tumorales y que no afecten, o causen el menor daño posible, a los tejidos sanos. Desde el descubrimiento de los virus, la idea de poderlos usar como agentes antitumorales ha estado en la cabeza de muchos investigadores. Desde las primeras observaciones a principios del Siglo XX de la remisión temporal de tumores en pacientes que, de manera coincidente, estaban infectados por virus, han sido muchos los que han sido identificados y caracterizados por su potencial oncolítico (Kelly y Russell, 2007). Dentro de los virus oncolíticos se incluyen tanto virus DNA, como Adenovirus, Herpesvirus o Poxvirus (Taqi *et al.*, 1981; Bischoff *et al.*, 1996; Longo *et al.*, 2011), como virus RNA, entre los que destacan los paramixovirus, con el virus de las paperas (Coffey *et al.*, 1998), el del sarampión (Springfeld *et al.*, 2006) y el NDV (Freeman *et al.*, 2006; Reuven, 2012), este último con representantes incluidos en ensayos clínicos.

Aunque muchos virus presentan una capacidad oncolítica innata, será desde el desarrollo de la genética inversa cuando se observan las verdaderas posibilidades del uso de los virus como agentes terapéuticos al existir la posibilidad de modificarlos (Liu y Kirn 2008).

INTRODUCCIÓN

En la actualidad son tres las estrategias seguidas para modificar o reprogramar los virus para que posean o potencien su capacidad oncolítica (Ring, 2002; Cattaneo *et al.*, 2008):

1. redirigir los virus a tejidos específicos.
2. potenciar su capacidad de inducción de muerte en células tumorales
3. disminuir la respuesta inmune derivada de su uso como agente terapéutico.

Se puede redirigir su capacidad infectiva a células tumorales modificando la secuencia de proteólisis de las proteínas de fusión de los virus implicadas en la entrada del virus en la célula, de manera que éstas sean procesadas por proteasas expresadas en mayor grado en células tumorales, como las metaloproteasas (Peng *et al.*, 1999). También se puede sustituir las proteínas de reconocimiento del virus original por las de virus patógenos con especificidad de tejido (Schnell *et al.*, 1997; Vongpunsawad *et al.*, 2004). Se pueden desarrollar virus cuya expresión génica ese encuentre bajo el control de promotores específicos de células tumorales (Kim *et al.*, 2003). La genética inversa permite “armar” los virus de modo que sean capaces de expresar, durante su ciclo de infección, transgenes proapoptóticos como TRAIL (Sova *et al.*, 2004) o de citocinas como INF- α (Zhang *et al.*, 1996).

Se han generado virus que tras modificar sus envolturas externas han reducido las respuesta inmunológica frente a estos (Fisher *et al.*, 2001; Munguia *et al.*, 2008) lo cual es de vital importancia en tratamientos que se presumen pueden ser prolongados.

1.3.2. EL NDV Y SU POTENCIAL ONCOLÍTICO.

En 1965 se describió por primera vez el potencial antitumoral del NDV (Cassel y Garrett 1965). Las características innatas que hacen al NDV ser uno de los virus con capacidad oncolítica mas estudiados son:

1. El NDV se replica con elevada eficacia en células tumorales tanto humanas como de ratón (Reichard *et al.*, 1992). Esta capacidad inherente es debida a los defectos en los sistemas antivíricos que presentan muchas células tumorales, especialmente el del interferón (Stojdl *et al.*, 2000; Krishnamurthy *et al.*, 2006) y a limitación del abanico de posibles células hospedadoras que ejerce la proteína V del virus (Park *et al.*, 2003).

INTRODUCCIÓN

Por lo tanto, y aunque el NDV es capaz de infectar cualquier tipo celular, infectar células tumorales le resulta mucho más sencillo (Fiola *et al.*, 2006), llegándose a potenciar su capacidad replicativa 10^4 veces con respecto a una célula normal. Las cepas de NDV, en relación con su capacidad de replicación en células tumorales se dividen en dos grupos: cepas líticas o capaces de realizar multiciclos infectivos o cepas no-líticas a aquellas que presentan un perfil monocíclico (Alexander y Allan, 1974).

2. El NDV es capaz de inducir apoptosis en células tumorales: el NDV ha demostrado tener efecto citotóxico en tumores humanos de origen ecto-, endo- y mesodérmico y es capaz de inducir apoptosis tanto por vía intrínseca como extrínseca (Elankumaran *et al.*, 2006). La apoptosis es caspasa dependiente y las células presentan las modificaciones citomorfológicas características del proceso de muerte por apoptosis (Ravindra *et al.*, 2009). El proceso de inducción parece ser independiente de p53 (Fabian *et al.*, 2007) lo cual es sumamente relevante teniendo en cuenta que la mayoría de los tumores son defectivos en la activación de p53 (Elankumaran *et al.*, 2006). Se ha demostrado que cepas no líticas como la atenuada Ulster es capaz de inducir la producción del TNF TRAIL en macrófagos estimulados por la presencia del virus. TRAIL sería responsable de la inducción de muerte celular en tumores que expresan su receptor TRAIL-R2 (Washburn *et al.*, 2003). No solamente el proceso de infección de la célula está relacionado con la inducción de la muerte celular: se ha descrito que la proteína HN podría tener un papel importante en la activación de las caspasas (Ravindra *et al.*, 2008) así como su relación con el reconocimiento y activación de CTLs. Parece que durante la infección del NDV existe una redistribución de la proteína Bax hacia la membrana mitocondrial potenciando mas la importancia de la vía intrínseca como la primordial en la apoptosis inducida por el NDV (Molouki *et al.*, 2010).
3. El NDV es capaz de estimular la respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa .La expresión de las proteínas F y HN en la superficie de las células tumorales tiene un elevado poder inmunogénico (Schirmmacher *et al.*, 1999).

INTRODUCCIÓN

Además el NDV estimula de forma natural la producción de citocinas que activarán la respuesta mediada por macrófagos, *Natural Killers* y linfocitos T (Schirmacher *et al.*, 2001). La infección con NDV es capaz de estimular la producción de INF- α y β , TNF- α o IL-1 (Umansky *et al.*, 1996; Schirmacher *et al.*, 1999; Avki *et al.*, 2004). La infección con NDV promueve una protección de un 50% frente a metástasis vinculada a la generación de una respuesta policlonal adaptativa frente a las células tumorales (Schirmacher, 1987; Schirmacher y Heicappell, 1987; Steiner *et al.*, 2004).

Por todas estas características el NDV ha sido probado en numerosos ensayos clínicos. Las principales cepas usadas han sido las líticas MTH68/H, PV701, 73-T y la no lítica Ulster (Lam *et al.*, 2011).

El NDV ha sido usado como agente terapéutico abordando diferentes aplicaciones:

1. El PV701 se ha usado como agente citotóxico en tumores promoviendo oncolisis (Pecora *et al.*, 2002).
2. Virus de la cepa Ulster han sido empleados como adyuvante en vacunas antitumorales para inducir la activación de los CTLs (Schirmacher *et al.*, 1999).
3. LA cepa Ulster ha demostrado ser un potente agente estimulador de la respuesta inmunitaria innata (Schirmacher *et al.*, 1999; Zeng *et al.*, 2002).
4. Como vector que exprese genes foráneos con fines terapéuticos como el gen para el **GM-CFS** (***Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor***), factor estimulador de Granulocitos y Macrófagos (Janke, *et al.*, 2007).

En 2006 comenzó el ensayo clínico con el MTH-68 con resultados prometedores en el tratamiento de metástasis (NCT00348842, clinicaltrials.gov). En la actualidad existen ensayos clínicos en fase avanzada (Fase II) orientados al tratamiento de Glioblastoma Multiforme con el virus NDV-HUJ (Reuven, 2012)

1.3.3. ESTUDIO Y POTENCIACIÓN DE LA CAPACIDAD ONCOLÍTICA MEDIANTE EL RESCATE DE NDV RECOMBINANTES.

Con el desarrollo de las estrategias de genética inversa para el NDV (apartado 1.1.5.1) se ha podido avanzar tanto en el conocimiento de las estrategias naturales por la cual el virus tiene capacidad oncolítica como intentar incrementar la capacidad innata del mismo (**Tabla 3**). El primer trabajo que demuestra que la modificación genética del virus puede incrementar la capacidad terapéutica del mismo fue realizado por el grupo de García-Sastre, en el Departamento de Microbiología del Hospital Monte Sinaí de Nueva York (USA). Ellos rescataron un recombinante que posee la proteína de fusión F mutada en 3 aminoácidos convirtiéndola en altamente fusogénica (Vigil *et al.*, 2007). El tratamiento con el virus recombinante F3aa redujo la capacidad de crecimiento del tumor así como potenció la respuesta inmunitaria frente a los mismos. El mismo grupo, junto con sus colaboradores, han rescatado virus que expresan GM-CSF, IFN- γ , IL-2, TNF α . De todos ellos, el recombinante con IL-2 ha sido el que mayor potencial oncolítico ha demostrado en modelos tumorales en ratón (Vigil *et al.*, 2008; Zamarin *et al.*, 2009; Zamarin, Vigil *et al.*, 2009).

Recombinantes que expresan la proteína NS1 del virus de la gripe, antagonista del sistema del interferón y marcadamente antiapoptótica, han demostrado que, a pesar de que el NDV ejecutará una respuesta de muerte, parece que su capacidad oncolítica es favorecida con la expresión de proteínas pro-supervivencia como Bcl-XL (Zamarin *et al.*, 2009; Mansour *et al.*, 2011).

Los estudios realizados con el recombinante MTH146, que expresa las cadenas pesada y ligera de la Inmunoglobulina G, IgG, han demostrado su eficacia como vector de expresión de anticuerpos en el interior de tumores sólidos, pudiendo representar una ventaja en tratamientos inmunoterapéuticos (Puhler *et al.*, 2008). El recombinante GM-CSF ha demostrado inducir una mayor respuesta a INF- α que el virus parental, demostrando que la excelente capacidad inmunoestimuladora del NDV puede ser mejorada (Janke *et al.*, 2007).

INTRODUCCIÓN

Las posibilidades del NDV como agente terapéutico son una realidad. Es de esperar que con el rescate de nuevos recombinantes se pueda ahondar más en el conocimiento las características que hacen de este virus una excelente herramienta para el tratamiento de tumores, así como poder mejorar sus cualidades mediante manipulación genética. En nuestro trabajo presentamos dos nuevos candidatos: rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX.

TABLA 3. RESCATE DE NDV RECOMBINANTES PARA EL ESTUDIO O MODIFICACIÓN DE LA CAPACIDAD ONCOLÍTICA.

CEPA	MODIFICACIONES/INSERTOS	AUTORES
La Sota	EGFP	(Bian <i>et al.</i> , 2005)
La Sota Beaudette C	EGFP, F modificada, V modificada.	(Elankumaran <i>et al.</i> , 2006)
Hitchner B1(F3aa)	Luciferasa, fragmento β -galactosidasa, GM-CSF, IFN- γ , IL-2, TNF α .	(Vigil <i>et al.</i> , 2007)
La Sota	GM-CSF	(Janke <i>et al.</i> , 2007)
MTH68	EGFP. Cadenas ligera y pesada IgG (2 insertos)	(Puhler <i>et al.</i> , 2008)
La Sota	IL-2	(Zhao <i>et al.</i> , 2008)
Hitchner B1 (F3aa)	Fragmento β -galactosidasa, antígeno asociado a tumor (TAA)	(Vigil <i>et al.</i> , 2008)
Hitchner B1 (F3aa)	NS1 (gripe)	(Zamarin <i>et al.</i> , 2009)
Hitchner B1 (F3aa)	IL-2	(Zamarin, Vigil <i>et al.</i> , 2009)
Hitchner B1 (F3aa)	F3aa modificada	(Altomonte <i>et al.</i> , 2010)
La Sota Beaudette C	F modificada, V modificada	(Elankumaran <i>et al.</i> , 2010)
LaSota Hitchner B1 (F3aa)	NS1,GFP	(Mansour <i>et al.</i> , 2011)
Italian NDV	Luciferasa, EGFP	(Wei <i>et al.</i> , 2012)

OBJETIVOS

Desde que la genética inversa comienza a ser aplicada en los virus, se ha avanzado mucho en el conocimiento sobre el modo en el que éstos interactúan con su hospedador. Si bien la lista de virus que son patógenos para los humanos se incrementa cada día, la mejora y estandarización de los métodos de rescate de virus recombinantes nos ha permitido ampliar nuestra capacidad de reacción, desarrollándose nuevas vacunas y estrategias antivirales a partir de la información obtenida del estudio de esta nueva generación de virus recombinantes.

La genética inversa no solo ha ayudado a avanzar en la prevención y tratamiento de enfermedades víricas sino que ha permitido desarrollar nuevos virus que ejerzan como agentes terapéuticos. Esta posibilidad de introducir modificaciones genéticas, que redirijan el comportamiento natural de los virus, es especialmente importante en el desarrollo de estrategias terapéuticas para patologías como el cáncer. Existe una gran variedad de virus, tanto virus DNA como RNA, que de forma innata poseen capacidad oncolítica, como el virus de la enfermedad de Newcastle. El NDV es uno de los virus más prometedores para su uso en viroterapia existiendo en la actualidad estudios sobre su capacidad oncolítica a nivel clínico. La mayoría de los esfuerzos, orientados a incrementar su potencial oncolítico, se han basado en generar NDVs recombinantes que aumenten la respuesta inmunológica producida durante la infección de las células tumorales.

En nuestro trabajo nos planteamos potenciar otra de las capacidades que el NDV posee durante la infección de las células tumorales, la de activación de la vía intrínseca de muerte celular por apoptosis, incorporando a su genoma la secuencia de uno de los receptores más importantes en la activación de la vía extrínseca de inducción de apoptosis, la del TNFRSF6, más conocido como receptor FAS.

Bajo estas premisas nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Clonar las fases de lectura abierta del receptor humano FAS y de una quimera FAS/proteína F del NDV en el cDNA antígenómico completo del NDV de la cepa Hitchner B1.
2. Rescatar NDV recombinantes infectivos a partir de las mencionadas construcciones.
3. Caracterizar los virus recombinantes rescatados, tanto a nivel biológico como genético y estructural.

OBJETIVOS

4. Determinar la producción de las proteínas FAS y FEX durante su ciclo de infección.
5. Evaluar la capacidad apoptótica de los virus recombinantes rescatados *in vitro*, en células en cultivo.
6. Estudiar la capacidad oncolítica de los virus recombinantes rescatados *in vivo*, en modelos de tumores singénicos desarrollados en ratón.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL DE LABORATORIO, REACTIVOS Y RECURSOS.

3.1.1. APARATOS Y MATERIAL DE LABORATORIO.

- Agitador magnético. P-Selecta Agimatic.
- Agitador orbital. Thermo Forma.
- Aparato de electroforesis horizontal B1A.OWL.
- Aparato de transferencia de proteínas Mini Trans-Blot .BioRad.
- Aparatos de electroforesis vertical en placa Mini Protean. BioRad.
- Autoclave. P-Selecta.
- Balancín BFR25. Grant Boekel.
- Balanza de precisión 405M-200^a.Precisa.
- Baños termostáticos.
- Calibre digital Frankford Arsenal 672-060
- Campana de extracción .F+ Valles.
- Campanas de flujo laminar Telstar Bio 11^a y Gelaire TC48.
- *Cassette* de revelado. Amersham Pharmacia Biotech.
- Centrífugas Beckman Allegra 21R y Beckman J2-21M.Rotores de centrifuga Beckman JA-10, JLA 16.250, SW 28.
- Congelador de -20°C .Zanussi.
- Congelador de -80°C. Revco.
- Congelador de Nitrógeno líquido Crioforma 3 .Thermo Star.
- Contador de células. Tamaco.
- Espectrofotómetro Gene Quant Pro RNA/DNA Calculator. Amersham Pharmacia Biotech.
- Estufa de secado. P-Selecta.
- Filtros estériles de 0,22 µm. Millipore.
- Frigoríficos 4°C .Koxka y Liebherr.
- Fuentes de alimentación para electroforesis vertical PowerPac. Biorad.
- Incubador para cultivos celulares Hep Class 10G.Thermo Corp.
- Incubador de huevos Sigma 210 XH/m .Maino.
- Lector de placas Multiskan FC. Thermo.
- Máquina de hielo. ITV.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Membranas para transferencia de proteínas Amersham Hypobond-P PVDF Membrane. GE Healthcare.
- Microcentrífuga. Haraeus Biofuge.
- Microondas. Panasonic.
- Micropipetas Pipetman. Gilson.
- Microscopio invertido. Nikon.
- Microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX51.
- Microscopio confocal Zeiss LSM 510.
- Películas de autorradiografía Hyperfilm® ECL High Performance Chemilluminiscence Film. Amersham Bioscience.
- pH-metro digital Micro pH 2001. Crison.
- Pipetas automáticas Accujet-pro.
- Placas para cultivo celular. Falcon.
- Secuenciador automático capilar 3100 Genetic Analyser. Applied Biosystem.
- Sistemas de purificación de H₂O Millipore ,modelos Milli-Q Plus 185 y Milli-RO Plus 10.
- Termociclador PTC-100 . MS Research.
- Transiluminador TFX-35M .Vibler Lourmat.
- Tubos para ultracentrífuga. Beckman.
- Ultracentrífugas refrigeradas Opti XL-100K y L8-70M. Beckman.
- Unidad de corriente Miniphore Power Suply. Techne.
- Vortex MS2 Minishaker .IKA.

3.1.2. REACTIVOS.

- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Sigma.
- Acrilamida Omnipur Acrylamide Bis-acrylamide, 40% solution. Merck.
- Agarosa ultraPure. Invitrogen.
- Agente reductor DTT 20X Reducing Agent. Fermentas.
- Ampicilina. Boehringer-Mannheim.
- Anexina-V para citometría de flujo Annexin V-DY-634. Immunostep Research.
- Anexina-V Alexa- Fluor® 488. Invitrogen.
- Anticuerpo monoclonal anti-actina (ACTN05 C4). Abcam.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Anticuerpo monoclonal anti- β -Tubulina (clon 2-28-33). Sigma.
- Anticuerpo monoclonal anti-caspasa 8 (1C12). Cell Signaling.
- Anticuerpo monoclonal anti-caspasa 8 específico de ratón. Cell Signaling.
- Anticuerpo monoclonal anti-inmunoglobulina de ratón Alexa Fluor[®] 568. Invitrogen.
- Anticuerpo monoclonal anti-NP proporcionado por el Doctor Adolfo García-Sastre (Mount Sinai Hospital, New York. N.Y., U.S.A.).
- Anticuerpo monoclonal anti-F proporcionado por el Doctor Adolfo García-Sastre (Mount Sinai Hospital, New York. N.Y., U.S.A.).
- Anticuerpo monoclonal anti-human APO-1/Fas. Bender MedSystems .
- Anticuerpo policlonal anti-Bid humano. Cell Signaling.
- Anticuerpo policlonal anti-caspasa 3. Cell Signaling.
- Anticuerpo policlonal anti-caspasa 9 humana .Cell Signaling.
- Anticuerpo policlonal anti-caspasa 9 de ratón .Cell Signaling
- Anticuerpo policlonal anti-Fas (N-18): sc-714. Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo policlonal anti-Fas humano (C18C12). Cell Signaling.
- Anticuerpo policlonal anti-inmunoglobulina de conejo Alexa Fluor[®] 488. Invitrogen.
- Anticuerpo policlonal anti-NDV proporcionado por el Doctor Adolfo García-Sastre (Mount Sinai Hospital, New York. N.Y., U.S.A.).
- Anticuerpos secundarios HRP conjugados para Western Blot ECL Western Blotting System.. GE Healthcare.
- Bactotripton. Oxoid.
- Bromuro de etídio. Boehringer-Mannheim.
- Desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs). Invitrogen.
- Dodecil sulfato sódico (SDS). Sigma.
- Endonucleasas de restricción. Promega .
- Expand High Fidelity PCR System". Roche.
- Extracto de levadura. Oxoid.
- Fosfatasa alcalina intestinal (CIP). New England Biolabs.
- Inhibidor de proteasas Proteoblock[™]. Fermentas.
- L-Glutamina 100X. Invitrogen.
- 4-Iodofenol. Aldrich Chemical Company, Inc.
- Lipofectamina 2000. Invitrogen .
- Medios para cultivo celular, DMEM, EMEM, RPMI. Lonza.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Marcador de proteínas pre teñidas, referentes de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder. Fermentas.
- Monolaurato de polioxietilén-(20)-sorbitán (Tween-20). Sigma.
- MTT 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide MTT Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium .Sigma.
- *N,N,N',N'*-tetrametil-etilendiamina (TEMED). Sigma.
- OptiMEM I. Invitrogen.
- Paraformaldehído . Sigma.
- Patrones de DNA de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder. Invitrogen .
- Penicilina/Estreptomicina 100X. Invitrogen.
- Peptona triptona. Difco .
- Persulfato amónico (APS). Biorad.
- pGEM-T Vector System. Promega .
- QIAGEN Plasmid Maxi Kit. Qiagen INC.
- QIAprep Spin Plasmid. Qiagen INC.
- QIAquick Gel Extraction Kit. Qiagen INC.
- QIAquick PCR Purification Kit. Qiagen INC.
- Quick Apoptotic DNA Ladder Detection Kit. Invitrogen .
- Solución PI/RNasa para Citometría de Flujo. Immunostep.
- Sistema de ligación Rapid DNA Ligation Kit. Roche.
- Reactivo de Bradford. Fermentas.
- Reactivo Caspase Colorimetric Protease Assay. Invitrogen.
- Reactivo Click-iT Tunel Alexa Fluor imagin Assay. Invitrogen.
- Reactivo Hoechst 33258 pentahidratado. Molecular Probes.
- Reactivo Image-iT Live Red Caspase Detection. Molecular Probes.
- Retrotranscriptasa Superscript. Invitrogen.
- Seroalbúmina bovina (BSA). Sigma.
- Solución de revelado ECL Western Blotting Substrate. Thermo.
- Solución de lisis celular ProteoJET Mammalian Cell Lysis Reagent. Fermentas.
- Tampón de carga para SDS-Page Dual Color™. Fermentas.
- Tampón de disociación celular libre de enzimas, Cell Dissociation Buffer, Enzyme free. Gibco.
- Tripsina-EDTA. Invitrogen .

MATERIAL Y MÉTODOS

- Tripsina-TPCK. Sigma.
- Tris (hidroximetil) aminometano (Tris). Sigma.

3.1.3 RECURSOS INFORMÁTICOS Y BASES DE DATOS.

- La redacción del presente trabajo se realizó con el procesador de texto **Microsoft Office Word 2010**.
- Las bases de datos de los resultados obtenidos, así como las graficas de los resultados y análisis estadístico, se realizaron con el programa **Microsoft Office Excel**.
- Las ilustraciones y esquemas se realizaron con el programa **Microsoft Power Point 2010** y **Adobe Photoshop CS 5.0**.
- Las fotografías de los geles de agarosa se procesaron con el programa **Kodak 1D 3.6**.
- Las fotografías obtenidas con el microscopio invertido de fluorescencia se procesaron, a su vez, con el programa **DPCController v.1.2.1.108**. El tratamiento final de las fotografías se efectuó con los programas **Image-J** y **Adobe Photoshop CS 5.0**.
- Para el análisis y procesamiento de las secuencias obtenidas con el secuenciador automático se empleó el programa **Codon Code Aligner 1.6.3**.
- Para el análisis de los datos obtenidos por citometría de flujo se uso el programa **Cell Quest** ,para la adquisición de muestras ,y los programas **Paint a Gate (BD Biosciences)** **Modfit** y **WinMDI** para el análisis de los datos.
- El programa **EndNote** se uso como gestor de bibliografía.
- La búsqueda de información referente a las líneas celulares del trabajo se efectuó en la web de **LGC Prochem (<http://www.lgcpromochem-atcc.com/>)**
- La búsqueda de secuencias de DNA y proteínas se llevó a cabo en la base de datos **Gen Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html)**.
- A la hora de localizar las ORF se empleó el programa “**ORF Finder**”, disponible online en **www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/**.
- La búsqueda de referencias bibliográficas se realizo a través de el motor de búsqueda **PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)**.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO.

3.2.1. LÍNEAS CELULARES Y MANTENIMIENTO.

Todas las líneas celulares citadas con posterioridad se mantuvieron bajo condiciones generales de cultivo de 37°C con saturación de húmeda y con 5% de CO₂, pudiendo variar el medio de crecimiento, dependiendo de los requisitos propios de la línea o del proceso experimental.

3.2.1.1. LÍNEAS CELULARES.

En el desarrollo de este trabajo se han usado diferentes líneas celulares eucariotas de origen humano, murino y aviar. Estas se encuentran recogidas en la **Tabla 4**.

3.2.1.2. MEDIOS Y SOLUCIONES PARA CULTIVO CELULAR.

Los diferentes medios de cultivo usados durante el desarrollo de este trabajo así como su formulación se recogen en la **Tabla 5**.

3.2.2 CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO.

3.2.2.1. CEPAS BACTERIANAS.

En este trabajo se ha utilizado ***Escherichia coli* DH5α**, con competencia adquirida químicamente, de Invitrogen™. Esta cepa contiene mutaciones que impiden la recombinación, asegurando la estabilidad de los insertos y mejorando la calidad del DNA plasmídico obtenido de ellas. Los cultivos de *E.coli* se desarrollaron a 30°C.

En el caso de los cultivos en medio líquido, éstos se inocularon con una colonia individual o una réplica de la misma y se mantuvieron en agitación a 250 rpm, procurando no sobrepasar, con el medio, un tercio del volumen del recipiente.

TABLA 4. LÍNEAS CELULARES INCLUIDAS EN ESTE TRABAJO.

LÍNEA	ORIGEN	MANTENIMIENTO	REFERENCIA
A549	HUMANO CARCINOMA DE PULMÓN	DMEM-10%FBS/PS	ATCC Cat. CCL-185
HeLa	HUMANO ADENOCARCINOMA DE CÉRVIX	DMEM-10%FBS/PS	ATCC Cat. CCL-2
Hep2	HUMANO CARCINOMA DE LARINGE.	DMEM-10%FBS/PS	ATCC Cat. CCL-23
HBL	HUMANO MELANOMA	DMEM-10%FBS/PS	ATCC Cat.HTB-124 (descatalogadas)
B16-F10	RATÓN. MELANOMA	DMEM-10%FBS/PS	ATCC Cat.CRL-6475
CT26	RATÓN CARCINOMA DE COLON	RPMI 10%FBS/PS.	ATCC Cat.CRL-2638
Vero	MONO VERDE AFRICANO EPITELIO RENAL	DMEM-10%FBS/PS	ATCC Cat.CCL-81
ELL-O	POLLO FIBROBLASTO	DMEM-10%FBS/PS	ATCC Cat.CRL-12203

3.2.2.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO BACTERIANO.

Los medios de crecimiento para *E.coli* utilizados tanto para la propagación en suspensión como en placa se recogen en la **Tabla 6**.

3.2.3. VIRUS.

Los virus usados como herramientas o no generados durante nuestro trabajo han sido:

MVA-T7: virus Vaccinia Ankara modificado que expresa establemente la RNA polimerasa del fago T7 en células de mamíferos. Cedido por el Doctor Adolfo García-Sastre del Departamento de Microbiología del Mount Sinaí Medical Center (Nueva York, USA.), originalmente cedido por el doctor Bernard Moss (NIH, Bethesda, USA).

MATERIAL Y MÉTODOS

rNDV-B1/GFP: Virus de la enfermedad de Newcastle recombinante que expresa la proteína verde fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*). Cedido por el Doctor Adolfo García-Sastre del Departamento de Microbiología del Hospital Monte Sinaí (Nueva York, USA).

TABLA 5. MEDIOS Y SOLUCIONES DE CULTIVO.

TIPO	FORMULACIÓN
EMEM-10%FBS/PS	50 ml EMEM 10X; 50 ml FBS (inactivado por calentamiento durante 30 min); 5 ml Penicilina/Estreptomicina 100X; 5 ml L-Glutamina 200 mM; ajustado a un volumen total de 500 ml con H ₂ O ultra pura.
DMEM-10%FBS	450 ml DMEM; 50 ml FBS inactivado.
DMEM-10%FBS/PS	450ml de medio DMEM; 50 ml FBS inactivado; Penicilina/Estreptomicina 100X 5 ml; 5 ml de Glutamax (L-Glutamina).
DMEM/0,1%FBS/PS/0,3%BSA/TPCK-TRIPSINA	500 ml de medio DMEM; 37 ml 37 ml de solución NaHCO ₃ al 5%; 5 ml de solución de BSA al 30%;0,5 ml de FBS inactivado. TRIPSINA-TPCK 1 mg/ml , añadida al medio en proporción 1/2000 (en el momento de uso).
RPMI-10%FBS/PS/NaHCO₃	450 ml de medio RPMI; 50 ml de FBS inactivado; Penicilina/Estreptomicina 100X 5 ml; 37 ml de solución NaHCO ₃ al 5%
10X PBS	80 g NaCl; 2 g KCl; 11.5 g Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O; 2 g KH ₂ PO ₄ ; ajustado a 1L con H ₂ O ultra pura, ajustado a pH 7.3 y autoclavado. Para la solución de trabajo (1X PBS), se diluyó 1:10 en H ₂ O ultra pura y se autoclavó.
OPTIMEM I	Medio comercial con bases de DMEM enriquecido y sin FBS.

TABLA 6. MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANO.

TIPO	FORMULACIÓN
SOC	Extracto de levadura 0,5%; Bactotripton, 2%; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl ₂ 10 mM; MgSO ₄ 10 mM; glucosa 20 mM.
LB	Luria-Bertani ; Extracto de levadura 0,5%; Bactotripton 1%; NaCl 1%.
LB-Agar	Extracto de levadura 0,5%; Bactotripton 1%; NaCl 1%; agar 1,5%

3.2.4. HUEVOS EMBRIONADOS DE POLLO

Se emplearon huevos embrionados de pollo libres de patógenos específicos (SPF) suministrados por la granja Rodríguez Serrano (Alba de Tormes, Salamanca, España). Los huevos de 0 ó 6 días de crecimiento (según disponibilidad) se incubaron en una incubadora Sigma 210 XH/m (Maino). Las condiciones de incubación fueron a temperatura de 37.7 °C y humedad del 40% , la cual se modificó a 80% tras alcanzar los 8 días de embriogénesis.

3.2.5. LÍNEAS DE RATÓN.

Los ensayos en animales fueron realizados gracias a la colaboración con el Doctor Adolfo García-Sastre, en las Instalaciones para Investigación Animal del Edificio Annenberg del Hospital Mount Sinai Medical Center, en Nueva York (USA). El proveedor, en ambos casos, fue Jackson Laboratory, ME (USA). Las líneas utilizadas fueron:

- **BALB-C**: ratón albino Balb/CJ (000651). Usado para desarrollar el modelo de tumor con células de carcinoma de colon.
- **BLACK6**: ratón de pelaje oscuro C57BL/6J (000664). Usado para desarrollar el modelo de tumor con células de melanoma.

3.3. MATERIAL GENÉTICO. PLÁSMIDOS.

3.3.1. pTM1: pTM1-NP, pTM1-P y pTM1-L.

El vector pTM1 (**Figura 11**) es un plásmido derivado del pUC. La construcción presenta el promotor T7 Φ 10, la región no traducida (UTR) del virus de la encefalomiocarditis (EMCV), un sitio de clonación múltiple (MCS), el terminador transcripcional de T7, la secuencia del gen de la timidina quinasa del virus Vaccinia (para facilitar la recombinación con el genoma del virus) y un origen de replicación de DNA de cadena sencilla f1. Este vector pTM1 está diseñado para expresar genes bajo control del promotor T7/EMCV UTR, lo que significa que la expresión génica está controlada por la RNA polimerasa del fago T7, expresada por el virus MVA-T7 (ver 3.2.3). Aunque las cantidades de RNA producido por esa polimerasa son extraordinariamente altas (aproximadamente un 30% del total del RNA en el citoplasma), el análisis de los transcritos revela que sólo un 5% se modifica con el *cap* o caperuza en 5', y dado que ello es necesario para una traducción eficiente en células eucariotas, sólo se consiguen niveles moderados de síntesis proteica. Por esta razón se creó el pTM1, en el que se incluyó, justo detrás del promotor T7, la región no traducida (UTR) del virus de la encefalomiocarditis (EMCV). Este virus pertenece a la familia *Picornaviridae*, en la que los transcritos se generan sin *cap* pero que disponen de esta región no codificante para facilitar la unión al ribosoma. De esta manera se consigue aumentar la expresión del gen insertado entre 5 y 10 veces.

El cDNA de los genes NP, P y L de la cepa Hitchner B1 del NDV, obtenido por RT-PCR a partir del RNA viral, fue clonado en pTM1, que había sido amablemente suministrado por el doctor Bernard Moss (NIH, Bethesda, USA). La construcción de los vectores pTM1-NP, pTM1-P y pTM1-L se llevó a cabo en el grupo de Adolfo García-Sastre, en el Departamento de Microbiología del Hospital Monte Sinaí, (Nueva York, USA). Los genes NP y P se clonaron entre los sitios de restricción *Pst*I y *Nco*I; el gen L, de tamaño mucho mayor y que precisó tres pasos en su clonación, entre *Nco*I y *Spe*I.

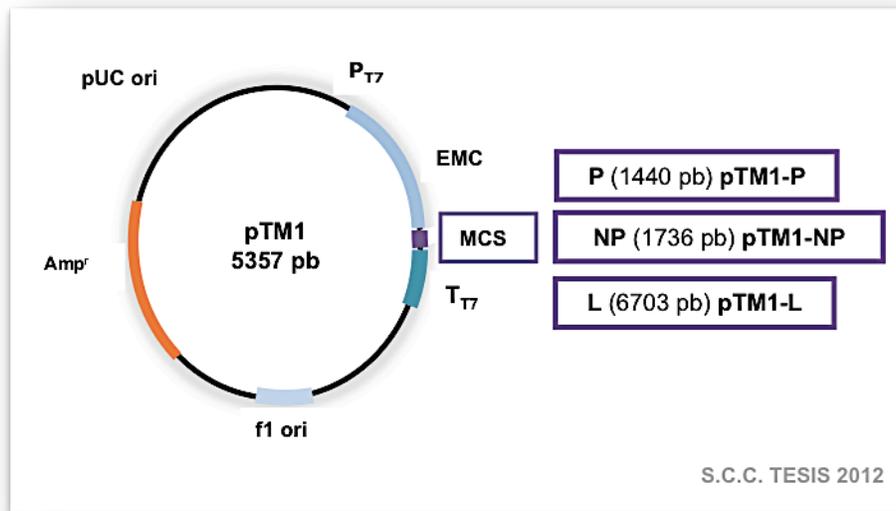


FIGURA 11. MAPA DEL VECTOR p_{TM1} . PLÁSMIDOS p_{TM1-P} , $-NP$ Y $-L$.
 El Vector p_{TM1} , a la izquierda, es la base estructural
 A la derecha, detalle del **MCS** (**Multiple Cloning Site**, sitio de clonación múltiple) y el tamaño de las secuencias para P, NP y L.

3.3.2. pGEM-NDV-F\TMCyt.

pGEM-NDV-F\TMCyt (**Figura 12**) es un vector lanzadera que permite clonar de manera sencilla el dominio extracelular de una proteína de membrana tipo I conjuntamente con los dominios transmembrana y citoplasmático de la proteína F o de fusión del NDV. De este modo se pueden originar quimeras de cDNA que pueden a su vez clonarse en un vector con el cDNA *full length* o genoma completo del virus. Fue originalmente diseñado y construido en el laboratorio de Adolfo García-Sastre, del departamento de Microbiología del Hospital Monte Sinaí (Nueva York, USA), para clonar el dominio extracelular de la proteína hemaglutinina (HA) del virus de la gripe.

Este vector lanzadera es una construcción realizada sobre el vector comercial pGEM-T. El inserto contiene la fase de lectura para el dominio extracelular de la glicoproteína se inserta direccionalmente entre dos sitios de restricción *SpeI* y *HpaI*. Aguas arriba del *SpeI* se encuentra la región reguladora que permitirá la correcta expresión de la quimera dentro del genoma vírico, GE, IS y GS.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aguas abajo del sitio *HpaI* se encuentran las secuencias de los dominios transmembrana y citoplasmático de la proteína F. Una vez clonado el inserto en el vector lanzadera, todo el fragmento que a su vez será clonado en el cDNA completo o *full length*, se halla flanqueado por sitios de restricción *NheI*, con lo que resulta fácil de extraer.

El lugar para la clonación de un gen foráneo en el cDNA del NDV, entre las proteínas P y M, fue diseñado con un sitio de restricción *XbaI*, compatible con *NheI*, con lo que puede procederse directamente a la clonación en el mismo.

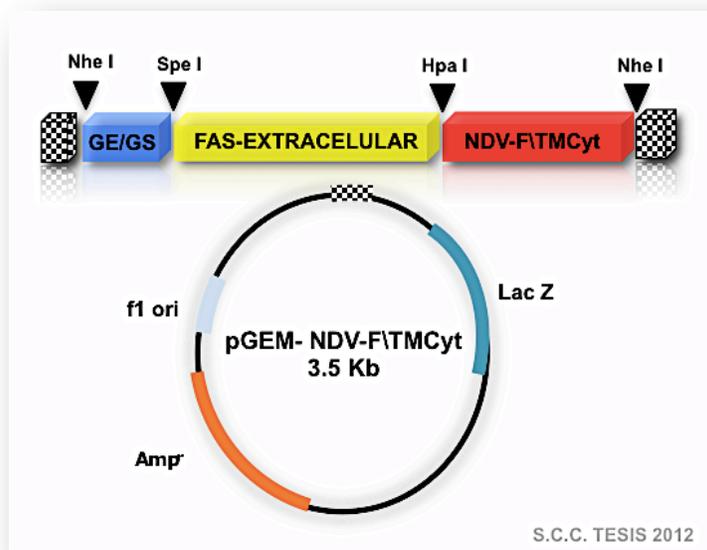


FIGURA 12. MAPA DEL VECTOR pGEM-NDV-F/TMCYT.

En la parte superior de la figura se muestra en detalle la distribución de las secuencias génicas incluidas en el sitio de clonación y sitios de restricción usados para la posterior validación del proceso de clonación.

Azul: GE/GS secuencia de terminación e inicio de gen.

Amarillo: posición de la secuencia inserto, en nuestro caso, secuencia para el dominio N-terminal del receptor humano FAS.

3.3.3. pNDV-B1.

El plásmido pNDV-B1 (**Figura 13**) (Nakaya *et al.*, 2001), con el cDNA completo, *full length*, (15186 nucleótidos) del genoma del NDV de la cepa Hitchner B1, se construyó a partir de fragmentos de PCR ensamblados conjuntamente en el plásmido pSL1180 (Amersham Pharmaci Biotech). El cDNA del virus se puso bajo control del promotor y el terminador de la polimerasa de T7, y antes de éste último, en el extremo 3', se añadió la secuencia de la ribozima del virus de la hepatitis delta (HDV), que al procesar el transcrito primario permitiría que su extremo 3' tuviera exactamente la longitud deseada y fuera igual que el extremo del antígenoma vírico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante el proceso de clonación se añadieron al genoma del virus dos sitios únicos de restricción como marcadores genéticos y lugares para la introducción de genes foráneos: en la posición 1755, entre las ORF de los genes NP y P, se introdujo un sitio *Sac II*; en 3163, entre P y M, un sitio *Xba I*.

En este último se han clonado en sucesivos trabajos distintos genes, entre ellos el gen marcador de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT), la hemaglutinina (HA) del virus de la gripe A/WSN/33 (Nakaya *et al.*, 2001), y el gen *gag* del virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) (Nakaya *et al.*, 2004), rescatándose a continuación virus recombinantes y probándolos con éxito como vectores de vacunación en modelos animales. La secuencia del genoma vírico clonada en pNDV-B1 fue remitida al *GenBank*, donde se encuentra bajo el número de acceso AF375823.

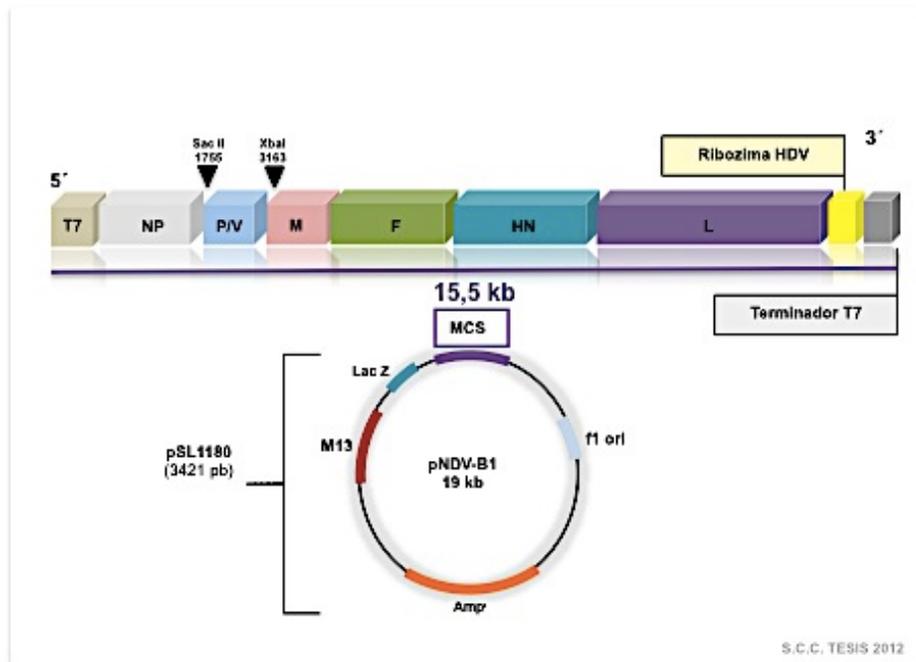


FIGURA 13. MAPA DEL VECTOR pNDV-B1.

PARTE INFERIOR: Estructura base del vector pSL1180 y tamaño inicial.

PARTE SUPERIOR: Sitio de clonación MCS del vector pSL1180 en el cual se insertó el genoma del NDV. Se muestran los dos sitios de restricción introducidos en el genoma del virus, *Sac II* y *Xba I* y la posición que ocupan dentro de la secuencia total. T7: promotor para la polimerasa del Fago T7. NP, P/V, M, F, HN y L, secuencias para las proteínas del NDV.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.3.4. pL430.

El plásmido pL430 (pKEX-2-XR-APO1) fue construido por el grupo de Peter H. Kramer en 1991 usando como base el pKEX-2-XR (**Figura 14**) (Rittner, K *et al.*, 1991).

El plásmido original pKEX-2-XR se creó sobre la estructura del pUC19, usado habitualmente para transformar *E.coli*. En el vector, el cDNA para Fas (registro X63717, EMBL) se clonó entre los sitios SstII-XbaI y se expresa bajo el control del promotor del HCMV (citomegalovirus humano).

Puede crecerse tanto en bacterias, seleccionando los clones positivos con Ampicilina o en células eucariotas, haciendo la selección con Higromicina.

El pL430 fue donado generosamente por el Dr. Faustino Mollinedo del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca.

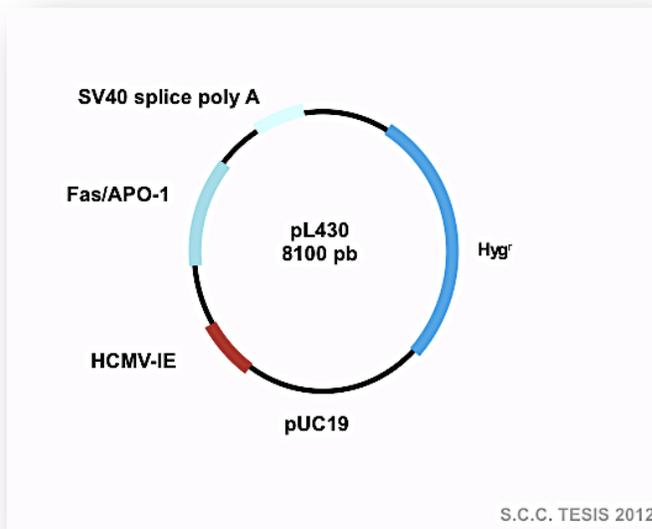


FIGURA 14. MAPA DEL VECTOR pL430. Se muestra la disposición de las diferentes secuencias que lo conforman así como la posición que ocupa la correspondiente al receptor FAS en la estructura.

3.4. MÉTODOS.

MATERIAL Y MÉTODOS

Durante el desarrollo de este trabajo se han utilizado metodologías pertenecientes al campo de la genética básica, biología molecular y microbiología, bioquímica, biología celular y biología animal, que abarcan desde técnicas básicas, como la valoración de proteínas, hasta procedimientos más complejos, como los empleados en la generación de virus recombinantes y en la generación de tumores sólidos en ratones.

3.4.1. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS EMPLEADOS EN LA MANIPULACIÓN DE MATERIAL GENÉTICO.

3.4.1.1. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA PCR.

Para poder diseñar los cebadores primero se realizó el estudio de la secuencia del gen Fas con el fin de que los sitios de restricción que se iban a incorporar, para la posterior clonación, no estuviesen presentes de forma natural en el gen original. Una vez verificado este hecho, los oligonucleótidos se construyeron sobre los siguientes principios:

- La ORF (*Open Reading Frame*) del gen Fas, (ORF que anotaremos a lo largo del trabajo como Fas) una vez integrada en el genoma del virus, debe comportarse como un gen más del virus: los oligonucleótidos deberán pues incorporar, tras la amplificación por PCR, a la ORF Fas los elementos reguladores propios de los genes víricos GE, GS e I.
- La incorporación del gen no debe afectar la estructura funcional del genoma: el número de nucleótidos totales incorporados debe respetar la *regla del seis* para que se produzca una replicación eficiente del genoma del virus. Para ello, y solo en el caso de la clonación de la ORF completa de Fas, se añadió justo después del extremo 3' una cisteína. En el caso del diseño para la construcción quimérica no fue necesaria incorporación alguna.
- Garantizar una traducción óptima de la proteína: para ello se incorporó una secuencia Kozak que estimula la traducción de los mRNA en células eucariotas.
- Puesto que los sitios de restricción se incorporarán a los extremos de la secuencia a clonar, será necesario, para que lo hagan de forma correcta, añadir al extremo 5' de estas secuencias un número de nucleótidos tal que posibilite la unión de las endonucleasas de restricción que se usarán tras la PCR. Los

MATERIAL Y MÉTODOS

nucleótidos se eligieron siguiendo las pautas definidas por la casa comercial de la que se adquirieron las enzimas (Promega).

La secuencia final de los oligonucleótidos diseñados para el proceso de clonación se recoge en la **Tabla 7**.

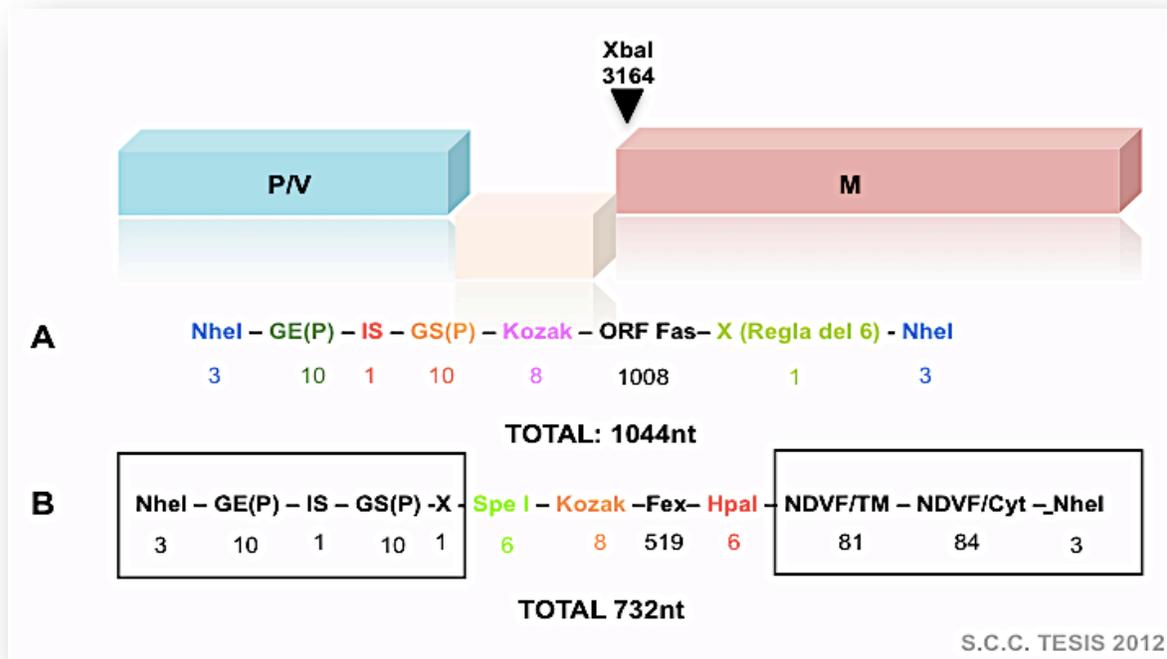


FIGURA 15. ESTRATEGIAS DE CLONACIÓN EN pNDV-B1.

A. Secuencias introducidas para clonar la ORF entera del gen Fas y longitud de cada una de ellas.

B. Secuencias introducidas para clonar la secuencia quimera Fex. Las secuencias enmarcadas en amarillo no fueron amplificadas por PCR, se incorporarían en el vector lanzadera, pero su longitud se tuvo en cuenta para el cálculo del número total de nucleótidos

MATERIAL Y MÉTODOS

3.4.1.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR.

3.4.1.2.1. PCR.

TABLA 7. OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA EL PROCESO DE CLONACIÓN.

Para cada uno se indica el sitio de reconocimiento (en color en la referencia) y los nucleótidos que son complementarios en la ORF Fas (en negro). En la secuencia se resaltan tanto los sitios de reconocimiento para las Endonucleasas de restricción como los nucleótidos correspondientes a la finalización del gen **GE**, intergénica **I**, comienzo del gen **GS** y **kozak**.

REFERENCIA	SECUENCIA
FAS/ NheI /FORWARD	GCG CTA GCT TAG AAA AAA TAC GGG TAG AAC CGC CAC CAT GCT GGG CAT CTG GAC CCT CC
FAS/ NheI /REVERSE	GCG CTA GCT CTA GAC CAA GCT TTG GAT TTC
FEX/ SpeI /FORWARD	GGA CTA GTC CGC CAC CAT GCT GGG CAT CTG GAC CCT CC
FEX/ HpaI /REVERSE	GGG TTA ACG TTA GAT CTG GAT CCT TCC TC

La reacción se inicia con un paso de desnaturalización a alta temperatura que separa las dos hebras de la molécula molde de DNA; un segundo paso, a una temperatura menor, lleva al anillamiento de los oligonucleótidos cebadores con sus secuencias complementarias en el molde desnaturalizado, de forma que presentan un hidroxilo en posición 3' disponible para que la polimerasa vaya añadiendo nucleótidos y completando la hebra.

Este paso es el de elongación, y su duración depende de la longitud del fragmento que se persigue amplificar. Estos tres pasos se van repitiendo sucesivamente a lo largo de un determinado número de ciclos, de forma que al final la población de moléculas de DNA de la muestra esté casi exclusivamente formada por el fragmento específicamente amplificado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Puesto que se amplifican selectivamente las partes del molde comprendidas entre los oligonucleótidos cebadores, estos pueden diseñarse específicamente para extraer genes enteros de los vectores en que se encuentren y modificarlos añadiendo secuencias en sus extremos.

Para la amplificación de la ORF Fas y de su dominio extracelular empleando como molde el plásmido pL430, así como el resto de PCRs realizadas a lo largo del trabajo, se utilizó el kit comercial **Expand High Fidelity PCR System** (Roche). Las muestras se prepararon en hielo y en un volumen de 50 μ l, con 500 ng de cada uno de los cebadores, 1 μ l de una mezcla de dNTPs 10 mM, 100 ng de molde, 5 μ l de solución amortiguadora con $MgCl_2$ 2,5 mM y 0,5 μ l de la solución con DNA polimerasas Taq y Pwo. La reacción que se programó en el termociclador fue:

- 1º- Calentamiento inicial para desnaturalización parcial, a 95°C, 5 minutos.
- 2º- 40 ciclos sucesivos con desnaturalización a 94°C, 1 minuto; anillamiento de los cebadores a 55°C, 1 minuto, y elongación a 72°C, 1 minuto.
- 3º- Un último paso de elongación para completar definitivamente los dúplex de DNA, con calentamiento a 72°C, 10 minutos.
- 4º- Finalmente, enfriamiento para la conservación del DNA a 4°C.

Con este protocolo se pueden obtener entre 0,5 y 1 μ g de DNA de interés en 30-35 ciclos de PCR partiendo tan solo de 10^{-6} μ g de material genético.

3.4.1.2.2. PURIFICACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR.

Los fragmentos de DNA resultantes de la PCR fueron purificados con el kit **QIAquick PCR Purification** (QUIAGEN). Este kit permite la retirada rápida y eficiente de los restos de dNTPs, oligonucleótidos cebadores y enzimas, permitiendo la recuperación de más del 80% del DNA puro y preparado para su subsiguiente manipulación.

En el proceso se añadieron 5 volúmenes de solución amortiguadora PB al volumen de la mezcla de reacción de PCR, y el conjunto se centrifugó por una de las columnas del kit a 13000 rpm durante 1 minuto, permitiendo la adsorción del DNA a la columna de silicagel. El resto del protocolo implica un paso de lavado con una solución con etanol, la eliminación de todo residuo de etanol y la elución del DNA purificado con 50 μ l de agua ultra pura.

3.4.1.3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

El proceso electroforético consiste en la separación de los fragmentos de DNA en función de su tamaño, mediante su migración en geles de agarosa, al aplicar una corriente constante de 50 o 100 V. La proporción de agarosa de los geles usados durante este trabajo ha sido del 0,8% al 1,5%, dependiendo del tamaño del fragmento a separar y preparada en medio tamponado TAE (Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM, pH 8). La disolución de la agarosa se llevó a cabo por calentamiento en un horno microondas. Una vez disuelta la agarosa se añadieron 2,5 µl de bromuro de etidio (0,5 mg/ml) el cual, al intercalarse en la doble hélice de DNA, nos permitirá visualizar el material genético al ser excitado con luz ultravioleta y emitir fluorescencia anaranjada. Las muestras se mezclaron con tampón de carga 10x (0,25% de azul de bromofenol, 33% de Tris 150mM pH 7,6 y 60% de glicerol), y se depositaron en los pocillos del gel, una vez que éste hubo solidificado. Los fragmentos, como se indicó antes, migraron a corriente constante (50, 100 o 150V), siendo la solución amortiguadora de carrera en todos los casos TAE 1x.

Los geles se visualizaron sobre un transiluminador con fuente ultravioleta y las imágenes de éstos se tomaron con la cámara Kodak Gel Logic 100. Para el procesado las imágenes se usó el software Kodak 1D 3.6.

3.4.1.4. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA DESDE EL GEL AGAROSA.

El aislamiento y purificación de fragmentos de DNA de interés, a partir de geles de agarosa, se realizó con el kit **QIAquick Gel Extraction Kit (50)** (QUIAGEN), que consiste esencialmente en una cromatografía de intercambio iónico.

El proceso comienza cortando la banda de interés con un escalpelo afilado y estéril, mientras se ilumina el gel con un transiluminador de luz ultravioleta.

Una vez extraída la banda, se deposita en un tubo eppendorf al que se añaden 600 µl de la solución comercial QG. Se disuelve el gel incubándolo a 37°C, agitando regularmente. Todo el volumen se añade a una columna de gel de sílice y se centrifuga durante 1 minuto a 13000 rpm. De esta manera, el DNA quedará adsorbido en la columna. Posteriormente se lava la columna con solución PE (que contiene etanol) y se centrifuga a 13000 rpm durante 1 minuto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tras una última centrifugación de la columna para retirar todos los restos de etanol que pudieran quedar, el DNA puro se eluye de la columna a baja fuerza iónica, añadiendo 30 µl de H₂O ultra pura, sobre un vial estéril. Se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifuga a 13000 rpm durante 1 minuto., recogiendo el DNA en la elución.

3.4.1.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DNA y RNA.

La concentración de DNA y RNA se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro **GeneQuantpro RNA/DNA Calculator**.

El parámetro que se estableció para la determinación del grado de pureza de las muestras fue la relación entre la absorbancia a 260/280 considerándose óptimo para valores por encima de 1.8.

El grado de pureza de los plásmidos se comprobó cualitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.4.1.6. SECUENCIACIÓN DEL DNA.

La secuenciación del DNA se remitió al **Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca**. El proceso se llevó a cabo en un secuenciador automático capilar **3100 Genetic Analyser** (Applied Biosystem).

La secuenciación de los genes se hizo de manera fraccionada y solapando las distintas secuencias, debido a que sólo son fiables aproximadamente los primeros 500 pares de bases de lectura del secuenciador (excluidos los 60 primeros). Una vez obtenidas todas las secuencias parciales se analizaron y se alinearon de manera apropiada con el programa **Codon Code Aligner v. 1.6.3**.

Para la comprobación de las secuencias Fas y Fex así como la comprobación del estado de las construcciones y los pasos intermedios del proceso de clonación, se usaron 6 oligonucleótidos diferentes, cuatro de ellos con nucleótidos complementarios en la ORF de Fas y dos en el genoma del NDV (**Tabla 8**).

TABLA 8. OLIGONUCLEÓTIDOS USADOS EN LOS PROCEDIMIENTOS DE PCR, RT-PCR Y SECUENCIACIÓN.

MATERIAL Y MÉTODOS

REFERENCIA	SECUENCIA
FAS/NheI/FORWARD	GCG CTA GCT TAG AAA AAA TAC GGG TAG AAC CGC CAC CAT GCT GGG CAT CTG GAC CCT CC
FAS/NheI/REVERSE	GCG CTA GCT CTA GAC CAA GCT TTG GAT TTC
FAS/Sec/FORWARD	GCA GAA GAT GTA GAT TG
FAS/Sec/REVERSE	GTG AGT GTG CAT TCC TTG
pNDV /3102+	CTGTCCACTCGGCATCACAC
pNDV /3231-	CTAGATTAATTACGGTTACGC
T7	TAATACGACTCACTATAGGGGCAG
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAATAC

3.4.1.7. DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.

La digestión con enzimas de restricción ha sido necesaria como método preparatorio de las secuencias y las construcciones, en la fase previa a la clonación y como método analítico para obtener los patrones de digestión de los clones obtenidos y así verificar si la clonación era o no óptima.

El procedimiento tanto en uno como en otro caso es sencillo y se limita a una incubación a temperatura adecuada del sustrato a digerir y la o las enzimas con las que se quiere procesar.

En este trabajo se han realizado reacciones a 37°C en solución tamponada (específica para cada enzima y determinada por la casa comercial Promega) y a tiempos que varían entre 2-4 horas. En el caso de la preparación de las secuencias que iban a ser posteriormente clonadas, éstas y las correspondientes construcciones a las que iban a ser transferidas se digirieron con las mismas enzimas para de este modo crear los sitios de restricción complementarios necesarios.

Los vectores usados se sometieron previamente a tratamiento con fosfatasa alcalina (CIP) para evitar fenómenos de recircularización, que son una importante fuente de trasfondo en los procesos de clonación, especialmente si dichos vectores son digeridos

MATERIAL Y MÉTODOS

con una única endonucleasa de restricción. La reacción de la fosfatasa implica la eliminación de los grupos fosfato de los extremos 5' de una cadena de DNA lineal, de forma que durante la ligación sólo se pueda restituir uno de los dos enlaces fosfodiéster rotos en la digestión, lo que produce hebras melladas y mucho más inestables.

3.4.1.8. CONSTRUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES.

Las construcciones recombinantes pNDV-B1/Fas, pNDV-B1/Fex y la intermediaria pGEM-NDV-F\Fex se obtuvieron mediante la combinación de fragmentos de DNA purificados de la ORF de Fas, la secuencia que codifica el dominio extracelular de FAS (Fex) y el vector plasmídico.

El procedimiento de clonación seguido requiere de la realización de cuatro pasos sucesivos:

1. Digestión con enzimas de restricción de vector e insertos.
2. Ligación.
3. Transformación de *E.coli* DH5 α : permitirá la incorporación del fragmento de DNA al vector y la propagación de éste usando la maquinaria replicativa de la bacteria.
4. Purificación de las estructuras de clonación.

3.4.1.8.1. LIGACIÓN.

Para llevar a cabo el proceso de ligación se utilizó el kit comercial **Rapid DNA Ligation Kit** (Roche), que permite una reacción eficiente con tan solo 20 minutos de incubación a temperatura ambiente. En primer lugar se diluyeron 2 μ l de vector y de 2 a 8 μ l de inserto, para probar un intervalo variado de relaciones vector:inserto, en la solución amortiguadora de dilución del kit 5X y agua ultra pura, hasta un volumen de 15 μ l. Posteriormente se añadieron 15 μ l de solución amortiguadora de ligación 2X y 1 μ l de ligasa del fago T4. Se incubó la mezcla 20 minutos a temperatura ambiente. Acto seguido se utilizó la totalidad de la reacción para transformar las *E.coli* DH5 α .

3.4.1.8.2. TRANSFORMACIÓN.

MATERIAL Y MÉTODOS

La técnica usada fue Transformación mediante Choque Térmico. Tras descongelar 200 µl de la suspensión de DH5α competentes en hielo se añadió la mezcla de ligación. Se incubaron 5 minutos en hielo e inmediatamente se sometió a las células a un choque térmico en un baño a 42°C durante 1 minuto seguido de 5 minutos de incubación en hielo. Posteriormente se añadieron 800 µl de medio SOC (apartado 3.2.2.2) y la mezcla se incubó a 30°C durante 1 hora y en agitación, para que las células que hubiesen adquirido el plásmido expresasen la resistencia a la ampicilina en él codificada y reconstituyeran sus membranas tras el choque térmico.

Finalmente, las bacterias transformadas se sedimentaron por centrifugación 1 minuto a 13000 rpm, se resuspendieron en 100 µl de medio SOC y se sembraron bajo condiciones estériles en placas Petri de LB-agar con ampicilina (50 µg/µl) (apartado 3.2.2.2).

3.4.1.8.3. PURIFICACIÓN DEL DNA PLASMÍDICO.

Para la purificación de DNA plasmídico a partir de *E.coli* transformantes se siguió el protocolo de lisis alcalina seguido de la unión de DNA plasmídico a resinas de intercambio aniónico de la marca QUIAGEN. Este método permite la obtención de DNA suficientemente puro para su posterior uso en transformación, clonación, transfección o secuenciación sin que sea preciso emplear métodos más engorrosos y menos seguros que impliquen solventes orgánicos o bromuro de etidio.

La obtención de DNA plasmídico a pequeña escala se realizó utilizando el kit **QIAprep spin plasmid** siguiendo las especificaciones del fabricante. De 2 a 4 ml de medio LB-ampicilina (50 µg /ml) con *E.coli* transformantes se centrifugaron 1 minuto. Ésta y el resto de centrifugaciones en este método se realizan a máxima velocidad en una centrífuga de mesa (13000 rpm).

El sedimento conteniendo las bacterias se resuspendió en 250 µl de una solución amortiguadora comercial de dilución con RNAsa A (100 µl/ml). El DNA se obtiene por tratamiento con 250 µl de una solución compuesta por NaOH 200 mM y SDS al 1% que provoca la lisis bacteriana. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción de lisis se detuvo con la adición de 350 µl de una solución neutralizante con acetato potásico 3M.

La muestra se centrifugó a continuación durante 10 minutos y el sobrenadante se pasó entonces a una columna del kit, sobre la que se centrifugó nuevamente 1 minuto de

MATERIAL Y MÉTODOS

forma que el DNA plasmídico disuelto en alta fuerza iónica quedase adsorbido en la columna de silicagel. El volumen eluido se desechó y la columna fue lavada con 750 μ l de una solución con etanol al 15%, centrifugando de nuevo 1 minuto, con lo que se retiraron eficientemente las sales.

Tras desechar el volumen lavado en este paso, la columna volvió a centrifugarse vacía otro minuto para eliminar cualquier resto de etanol que pudiera afectar negativamente al rendimiento de los procesos en los que posteriormente se emplease el DNA puro. Finalmente, el DNA se eluyó a baja fuerza iónica añadiendo 30 μ l de agua ultra pura autoclavada en el centro de la columna, incubando 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugando 1 minuto, colocando la columna sobre un vial autoclavado. Con este procedimiento se obtuvieron entre 5 y 15 μ g de DNA puro ($DO_{260/280} \geq 1,8$), cantidad que variaba en función del tamaño del plásmido a purificar.

La obtención de DNA plasmídico a gran escala se realizó utilizando el kit **QIAGEN Plasmid Maxi**, siguiendo las indicaciones de la casa comercial, con algunas modificaciones. En esencia el método es el mismo que se ha descrito anteriormente. Se partió de un cultivo de 400 ml. de *E. coli* en medio LB con ampicilina (50 μ g /ml), crecido como se describe en el apartado 3.2.2.1, que se centrifugó a 5000 rpm en un rotor angular tipo JA-14 o JLA-16.250, 30 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió en 20 ml de solución comercial con RNAsa A.

Dado que se había partido de un volumen de cultivo más alto que el habitual, hecho que podría provocar el posterior colapso de las columnas de intercambio aniónico y una pérdida cuantitativa y cualitativa del producto final, el volumen total resuspendido fue dividido en dos alícuotas que se pasaron a dos tubos Falcon de 50 ml, y a cada uno se añadió 15 ml de solución de lisis. Se agitaron los tubos vigorosamente y se incubaron a temperatura ambiente 5 minutos, tras los cuales se paró la reacción con 15 ml de solución neutralizante y una nueva agitación. Los tubos se centrifugaron 15 minutos a aproximadamente 3500 rpm en una centrífuga con rotor para tubos Falcon de 50 ml, y mientras este paso tenía lugar se equilibraron 2 columnas QIAGEN con 10 ml de solución amortiguadora comercial QBT (NaCl 0,7 M, MOPS 50 mM, isopropanol 15%, triton X-100 0,1 %, pH 7.0). Inmediatamente tras la centrifugación, el sobrenadante de cada tubo se depositó en cada una de las columnas y se dejó pasar por gravedad a través de la resina.

Después se lavó la columna 3 veces con 30 ml de la solución comercial QC (NaCl 1 M, MOPS 50 mM, isopropanol 15%, pH 7.0). Finalmente se eluyó el DNA unido a la

MATERIAL Y MÉTODOS

columna, sobre un tubo de ultracentrífuga, con 15 ml de solución QF (Tris-HCl 50 mM, NaCl 1,25 mM, isopropanol 15%, pH 8.5). Una vez eluído, se añadieron 12 ml de isopropanol volteando suavemente para precipitar el DNA, e inmediatamente se centrifugó a 20000 rpm y 4°C, entre 30 y 40 minutos, en un rotor oscilante SW-28 (Beckman). El sobrenadante se decantó cuidadosamente y se retiraron los restos que pudiera haber con ayuda de una pipeta. Se dejó secar el precipitado al aire brevemente y se combinó el contenido de ambos tubos resuspendiéndolos conjuntamente en 400 µl de agua ultra pura autoclavada. Con este procedimiento se obtuvieron 800-1000 µg de DNA puro ($DO_{260/280} \geq 1,8$), incluso de aquellos plásmidos con un tamaño muy superior al habitual.

3.4.1.9. SELECCIÓN DE CLONES POR PCR SOBRE COLONIAS.

El fundamento de esta técnica radica en la posibilidad de añadir parte de una colonia bacteriana directamente desde la placa de cultivo a una mezcla de reacción de PCR, y obtener amplificación del fragmento de DNA deseado. Dada la gran sensibilidad de la técnica, no es preciso multiplicar en cultivo las colonias y se pueden analizar un gran número de ellas en poco tiempo. El método permite también detectar, en un único paso, si el inserto ha sido clonado con la orientación correcta. Para ello se requiere que del par de cebadores empleados, uno anille dentro del inserto y otro en una región del vector, de forma que se sólo se produzca amplificación si la entrada del inserto se ha producido de manera que los cebadores flanqueen la zona a amplificar.

Se usó el kit **Expand High Fidelity PCR System**, que suministra una mezcla enzimática de las polimerasas de DNA *Taq* y *Pwo*. Se preparó una mezcla de reacción para PCR, con un volumen final adecuado al número total de colonias que se pretendía analizar: por cada una de éstas se añadieron 2,5 µl de cada uno de los cebadores (50 ng /µl), 5 µl de la solución amortiguadora de reacción 10X suministrada con el kit, 6 µl de una solución de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de una mezcla de dNTPs 10 mM, 0,25 µl de mezcla enzimática y 32 µl de agua ultra pura autoclavada.

Las colonias, con un diámetro mínimo de 2 mm, se picaron con una punta de pipeta autoclavada y se sumergieron en 50 µl de la mezcla de reacción con una breve agitación. La misma punta de pipeta se empleó para hacer una réplica de cada colonia

MATERIAL Y MÉTODOS

en placa, de forma que pudieran reutilizarse los clones que resultaran positivos. Las placas de réplica se incubaron durante toda la noche a 30°C.

La reacción de PCR se llevo a cabo con el mismo programa usado en el apartado 3.4.1.2.1. Tras la finalización de la reacción se cargaron las muestras en un gel de agarosa para comprobar los clones positivos por electroforesis.

3.4.1.10. PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS EN GRADIENTE CONTINUO DE CLORURO DE CESIO.

La clonación de cualquier inserto en el plásmido pNDV-B1 presenta una dificultad adicional debido al gran tamaño de los mismos. Por ello, las preparaciones de estos vectores se sometieron a un paso adicional de purificación en gradiente de CsCl, tras haber sido obtenidas mediante el kit **QIAGEN Plasmid Maxi** como se ha descrito anteriormente. La purificación en gradiente de CsCl es un proceso engorroso y no resulta necesario para la mayoría de las aplicaciones de un plásmido, pero permite obtener un DNA extremadamente puro, lo que en este caso concreto significó un enorme incremento en la eficiencia de clonación.

Se partió de 450-500 µg de DNA plasmídico, que fueron disueltos en 7.2 ml de solución amortiguadora TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). Se añadieron 7,5 g de CsCl al tubo y se agitó hasta su completa disolución. A continuación se añadieron 300 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) y el volumen total se trasvasó a un tubo OptiSeal (Beckman Coulter). El resto del tubo se rellenó completamente con parafina y a continuación se selló térmicamente. Los tubos se centrifugaron, tras ser cuidadosamente equilibrados, durante 24 horas a 60.000 rpm y 20°C en un rotor de ángulo fijo Beckman 70.1 Ti.

Tras la centrifugación aparecieron claramente visibles dos bandas de color rojo intenso: una superior correspondiente al DNA mellado y una inferior conteniendo el DNA superenrollado de interés. Esta última banda se extrajo mediante punción del tubo con una aguja hipodérmica, dejando gotear el contenido en un tubo eppendorf.

El bromuro de etidio presente en la muestra se retiró mediante seis extracciones consecutivas con *n*-butanol saturado con agua. Finalmente, el DNA se precipitó con la adición de tres volúmenes de etanol al 70% a uno de muestra, 15 minutos de incubación en hielo y una centrifugación a 10.000 g 15 minutos a 4°C. El precipitado fue lavado con etanol al 70% y secado al aire, para ser finalmente resuspendido en 200 µl

MATERIAL Y MÉTODOS

de H₂O ultra pura. La pureza y concentración del DNA se analizaron mediante espectrofotometría UV y electroforesis en gel de agarosa, previamente descritos.

3.4.2. METODOLOGÍA DE RESCATE DE VIRUS RECOMBINANTES.

La generación de una progenie vírica a partir de construcciones de cDNA en el proceso que se conoce como Rescate, consta a su vez de 6 fases:

1. **Pre-infección con el virus MVA-T7.**
2. **Transfección con lipofectamína de células eucariotas.**
3. **Co-cultivo con fibroblastos de pollo.**
4. **Infección de huevos embrionados.**
5. **Extracción del líquido alantoideo.**
6. **Validación del rescate.**

3.4.2.1. INFECCIÓN DE CÉLULAS EN CULTIVO CON EL VIRUS MVA-T7.

Los genes, codificados por los plásmidos que van a utilizarse en el rescate, se encuentran bajo el control del promotor de la polimerasa del fago T7, de forma que el primer paso debe consistir en facilitar la expresión de dicha polimerasa en las células a transfectar. Para ello, placas de 35 mm X 10 mm con células A549, a una confluencia aproximada del 90%, se infectaron con el virus Vaccinia Ankara modificado que expresa la polimerasa T7 en células de mamíferos (MVA-T7).

Se lavaron las placas 2 veces con PBS/BA/PS y se trataron con una solución de infección con MVA-T7 a una **m.o.i (m.o.i, *multiplicity of infection* multiplicidad de infección)** de 1 en 100 µl de PBS/BA/PS.

Se incubaron 1 hora a 37°C y posteriormente tras retirar la solución de infección, se procedió a la transfección tal y como se describe en el siguiente apartado.

3.4.2.2. TRANSFECCIÓN CON LIPOFECTAMÍNA.

Mientras se llevaba a cabo la incubación de las células infectadas con MVA-T7 se preparó el material para la transfección. Por un lado, se incubaron 1,5 µl de

MATERIAL Y MÉTODOS

lipofectamína en 250 µl/placa de OptiMEM I durante 5 minutos. Por otro lado se preparó el DNA, que contenía el plásmido con el genoma recombinante de los virus y también los plásmidos de expresión pTM1-NP, pTM1-P y pTM1-L.

Éstos llevan los genes de las proteínas P, NP y L del NDV, también bajo el promotor de T7, forman el complejo necesario para la replicación del genoma vírico. Se añadieron 0,4 µg de pTM1-NP, 0,2 µg de pTM1-P, 0,2 µg de pTM1-L y 1 µg del pNDV recombinante en un volumen de 50 µl de OptiMEM-I por cada placa. Tanto esta mezcla como la de lipofectamína en OptiMEM-I se realizaron en tubos de poliestireno, ya que en los de polipropileno la lipofectamína se adhiere a las paredes. Finalmente, el volumen incubado con lipofectamína se vertió sobre la solución con DNA, y tras una leve agitación se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente, pasados los cuales se añadieron 300 µl de esta mezcla a cada una de las placas previamente infectadas con MVA-T7. También se añadió 1 ml de DMEM-10%FBS, sin antibióticos, a cada placa, y éstas se incubaron de 6 a 8 horas a 37°C, 5% CO₂, tras las cuales el medio de transfección se sustituyó por 1,5 ml de DMEM-10%FBS sin antibióticos y se prosiguió con la incubación.

3.4.2.3. COCULTIVO CON FIBROBLASTOS DE POLLO.

La línea celular A549 permite la infección con MVA-T7 y la eficiente expresión de los plásmidos transfectantes, pero no facilita la multiplicación de los NDVs originados por éstos. El rescate de un número adecuado de NDVs requiere pues una fase de amplificación en células más favorables para su ciclo biológico, como lo son las de su hospedador natural, el pollo.

El proceso de cocultivo es el paso más importante de todo el rescate, y debe hacerse de manera que la proporción de fibroblastos de pollo con respecto a las A549 sea tal que el pequeño número de viriones que salgan de las segundas puedan infectar las primeras. El medio en que se realiza el cocultivo debe disponer de fluido alantoideo procedente de huevos embrionados y de MgCl₂ para que los viriones sean infectivos.

Las células A549, transfectadas según se ha descrito en el apartado anterior y tras 1-2 horas de incubación, se cocultivaron con fibroblastos de pollo. Se empleó una placa de 100 mm X 20 mm con células ELL-0 con una confluencia del 90% por cada dos placas de 35 mm X 10 mm transfectadas. A éstas se les aspiró el medio y se lavaron dos veces con PBS, después se añadieron 200 µl de tripsina y se incubaron a 37°C hasta

MATERIAL Y MÉTODOS

que las células se desprendieron de la placa. El mismo proceso se llevó a cabo con las placas de ELL-0, empleando 1 ml de tripsina.

En el momento en que las A549 se despegaron, se suspendieron en 1 ml de medio EMEM-10% FBS/PS con $MgCl_2$ a una concentración final de 30mM y con un volumen de 5-10%, respecto al total, de líquido alantoideo. Se pasaron a una placa de 100 mm X 20 mm con 3 ml del mismo medio. Por su parte, las ELL-0, tras haber sido tripsinizadas, se suspendieron en 7 ml del medio antes citado, y 4 ml de la suspensión se pasaron a las placas de 100 mm X 20mm con las A549.

Por último, éstas se agitaron suavemente para distribuir uniformemente su contenido celular, y se incubaron a 37°C, en atmósfera saturada de humedad y 5% CO_2 entre 3 y 4 días.

3.4.2.4. INFECCIÓN DE HUEVOS EMBRIONADOS.

Entre 3 y 4 días tras el cocultivo, se recogieron 800 μ l del sobrenadante de las placas. Se centrifugaron a 13000 rpm 30 segundos para sedimentar las células muertas y se procedió a infectar huevos embrionados de 9 a 12 días libres de patógenos específicos. Los huevos, generalmente de entre 0 a 6 días, habían sido mantenidos en un incubador a una temperatura de 37,7 °C y 40% de humedad hasta el momento de la infección.

Tras detectar la cavidad alantoidea del huevo con un ovoscopio, se marcó la posición de ésta y se realizó una pequeña incisión en la cáscara por la que se procedió a inyectar 800 μ l del medio de infección con una jeringuilla estéril (**Figura 16**). El orificio se selló con cera fundida y los huevos se mantuvieron en un incubador 2-3 días, tras los que se extrajo el líquido alantoideo que contenía el virus.

Todo el proceso de infección de huevos se llevó a cabo en condiciones estériles dentro de la campana de cultivo celular con flujo laminar. El mismo procedimiento de infección se siguió para poder crecer los virus, una vez caracterizado el rescate de los mismos. En el caso de virus purificados (apartado 3.4.2.7), el volumen de infección por huevo se ajustó dependiendo de la m.o.i estimada, con un volumen máximo de 200 μ l por huevo.

3.4.2.5. EXTRACCIÓN DEL LÍQUIDO ALANTOIDEO.

Para la extracción del líquido alantoideo de huevos previamente infectados, en primer lugar éstos se incubaron 4-6 horas a 4°C, para matar al embrión y coagular su sangre.

MATERIAL Y MÉTODOS

Posteriormente se rompió la cáscara por la región del saco aéreo y se retiraron los fragmentos con unas pinzas, dejando al descubierto la membrana alantoidea. Ésta se rasgó por el lado opuesto al que se podía ver que ocupaba el embrión, para no dañar la yema. Se presionó el embrión suavemente con una espátula hacia la parte inferior del huevo, de forma que el líquido alantoideo ascendió a la parte superior y pudo ser recogido con una pipeta estéril. Todo el proceso se llevó a cabo en esterilidad, en la campana de flujo laminar, y tras haber rociado los huevos y el material usado con etanol al 70%. De cada huevo se recogieron entre 10-15 ml de líquido alantoideo, que se guardó convenientemente rotulado a 4°C hasta su utilización.

3.4.2.6. VALIDACIÓN DEL RESCATE.

Para confirmar que el rescate de los virus recombinantes se había producido, los mismo líquidos alantoideos extraídos se usaron como inóculo para infectar células Vero, sembradas a una confluencia del 80% en placas multipocillo, de 24 pocillos, y con un volumen máximo de líquido alantoideo de 250 µl en cada uno. El inóculo se mantuvo durante una hora a 37 grados centígrados y una atmósfera de 5% CO₂ y tras la cual se añadieron 0.750 ml de medio DMEM-10%FBS/PS a cada pocillo sin retirar el inóculo inicial. La incubación se mantuvo durante 24 horas tras lo cual se procedió a detectar la presencia de los virus recombinantes mediante inmunodetección y visualización mediante microscopía de fluorescencia de las proteínas víricas expresadas en células infectadas, según se recoge en el apartado 3.4.3.2. Para ello se usó como anticuerpo primario el policlonal anti-NDV en dilución 1:600 y como secundario el anticuerpo policlonal anti-inmunoglobulina de conejo Alexa Fluor[®] 488 (Invitrogen).

En este paso del desarrollo del trabajo hay que puntualizar que este primer procedimiento de validación del rescate es clave, pero no determinante, a la hora de validación del virus en sí. Para ello será necesario realizar la caracterización genética y estructural del virus.

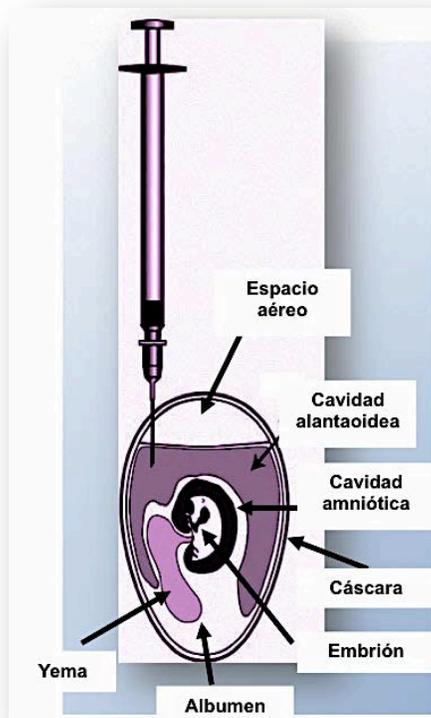


FIGURA 16. ANATOMÍA DE UN HUEVO DE POLLO DE 10 DÍAS Y PROCEDIMIENTO DE INFECCIÓN.

El volumen con el virus debe inyectarse en la cavidad alantoidea, cuidando de no dañar al embrión ni a los principales vasos en la zona.

Imagen modificada a partir de la incluida en el documento de la FAO “*A basic laboratory manual for the small scale production and testing of I-2 Newcastle Disease Vaccine*”. Disponible en <http://www.fao.org/documents/>

3.4.2.7. CRECIMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS VIRUS NDVs . TITULACIÓN.

Para optimizar las infecciones con los virus rescatados es necesario que estos se encuentren en una solución tamponada libre de líquido alantoideo el cual si no, con el paso del tiempo, puede degradarse y ejercer un efecto citotóxico sobre las células. Durante el desarrollo de este trabajo, y para mantener la cantidad y calidad de las muestras de virus rescatados, se ha procedido al crecimiento de estos en huevos y su posterior purificación al menos una vez al año, conservándose siempre un *stock* de cada fase de crecimiento a -80°C . Del mismo modo, y para facilitar la evaluación del efecto real de la infección, se hace necesario tener conocimiento del número de virus infectivos que se utilizan en cada procedimiento en relación al número de células.

El número de virus que adicionamos o que tenemos en un volumen conocido es a lo que denominamos Título de Virus. El Título de un virus se puede expresar como **pfu/ml**, (**pfu**, **plaque formation units**, unidades formadoras de placa) cuando nos referimos a la cantidad de virus con respecto a un volumen de suspensión del mismo o como m.o.i cuando nos referimos a la cantidad de virus que adicionamos a una placa de cultivo en relación con el número de células que hay en ella.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CRECIMIENTO Y PURIFICACIÓN DE VIRUS.

Se infectaron huevos embrionados, de entre 8 y 12 días, con cada uno de los rNDVs que se pretendía purificar según el procedimiento descrito en el apartado 3.4.2.4. Tras 48 horas de incubación a 37°C, se extrajo el líquido alantoideo como se ha descrito en el apartado anterior, de forma que se obtuvieron entre 30 y 40 ml totales para cada virus. Este volumen se centrifugo 5 minutos a 10000 rpm para sedimentar los eritrocitos que pudieran haberse recogido. El sobrenadante se centrifugo 2h y 30 minutos a 10000 rpm y 4°C en una ultracentrífuga con el rotor Beckman SW-28. El sobrenadante de esta centrifugación se depositó cuidadosamente sobre una solución en gradiente continuo de Tartrato Potásico, preparado con un mezclador de gradiente en solución amortiguadora NTE (100mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) en tubos para SW-28, tras lo que se centrifugaron 90 minutos a 25000 rpm y 4°C. El resultado de este proceso fue un sedimento claro que, tras aspirar el sobrenadante, se resuspendió en 100-1000 µl de PBS. Los virus así purificados se guardaron a -80°C hasta su posterior utilización.

2. TITULACIÓN DE LOS RECOMBINANTES RESCATADOS.

Se procedió a infectar placas de 24 o 96 pocillos sembradas con células Vero en número de $2,5 \times 10^5$ o 2×10^4 respectivamente. A partir de la suspensión de virus purificados se realizaron diluciones seriadas en base 10 o en base 2 en OptiMEM-I, con un volumen final de 200 µl, en el caso de inóculos para placas de 24 pocillos y de 50 µl en el caso de pocillos de placas de 96. Cada pocillo se lavó dos veces con PBS y se adicionó la suspensión de infección la cual se mantuvo durante 1 hora a 37°C en una atmosfera con un 5% de CO₂. Pasado el tiempo de incubación se procedió a aspirar la solución de infección y se añadió 1 ml (0,1 ml en placas de 96 pocillos) de medio DMEM-10%FBS/PS a cada pocillo y se mantuvo la incubación 24h.

Transcurridas las 24 horas de incubación las placas se procesaron para realizar la inmunodetección de células infectadas y su visualización mediante microscopia de fluorescencia, según se contempla en el apartado 3.4.3.2. Para ello se uso como anticuerpo primario el policlonal anti-NDV en dilución 1:600 y como secundario el anticuerpo policlonal anti-inmunoglobulina de conejo Alexa Fluor® 488 (Invitrogen). Para facilitar valorar el número de células se uso simultáneamente, con el anticuerpo secundario, el reactivo para marcaje nuclear Hoechst, en proporción 1:1000.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para establecer el valor del título para cada uno de los virus se procedió a cuantificar el número de células que estaban infectadas y que serían aquellas que presentarían inmunofluorescencia verde.

El valor de pfu/ml se calcula según la siguiente relación:

$$\frac{\text{Numero de células fluorescentes}}{\text{Volumen del inóculo (ml)}} \times \text{Factor de Dilución} = \text{pfu/ml}$$

La m.o.i de un virus se calcula valorando cuál es la mínima dilución a la cual todas las células del pocillo están infectadas.

3.4.3. CARACTERIZACIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES.

Tras confirmar el rescate es necesario comprobar que los virus obtenidos presentan las características planteadas en el diseño original. Por lo tanto, se hace necesario comprobar en cada caso tres características críticas:

1. Estabilidad de la secuencia génica del inserto.
2. Expresión de las proteínas recombinantes durante el ciclo de infección.
Caracterización del virión.
3. Capacidad infectiva del virus.

3.4.3.1. ESTABILIDAD DE LA SECUENCIA INSERTADA. RT-PCR.

3.4.3.1.1 .EXTRACCIÓN DEL RNA DE CÉLULAS INFECTADAS.

Para comprobar la expresión de la secuencia Fas y su quimera Fex, se procedió a extraer el RNA de células infectadas con los virus rescatados.

El proceso implicó un primer paso de infección de células Vero con los virus recombinantes rescatados, a una m.o.i de 1. Las placas se incubaron durante 48 horas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tras aspirar el medio de cultivo se añadió 1 ml de solución PBS y se realizó un raspado del contenido celular de cada placa. Se recogió todo el volumen posible de raspado, de cada una de las placas y se sometió cada vial a centrifugación a máxima velocidad (13000 rpm) en una microcentrífuga (éste es el tipo de centrifuga que se usará durante todo el proceso). El sedimento resultante se resuspensión en 1 ml de Trizol® (que mantiene la integridad del RNA mientras lisa las células y disuelve sus componentes) y tras incubar 5 minutos a temperatura ambiente se añadieron 200 µl de triclorometano, para separar las proteínas del RNA. Se procedió a mezclarlo con el vortex y se dejó a temperatura ambiente durante 3 minutos.

Posteriormente, la mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm y se recogió la fase superior acuosa que contiene el RNA. A ésta, ya en un nuevo vial, se le añadieron 500 µl de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos tras lo cual se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm. Para finalizar, se aspiró el sobrenadante cuidadosamente y se adicionó 1 ml de etanol al precipitado, agitando evitando la resuspensión. Se volvió a centrifugar durante 5 minutos a 7500 rpm, se aspiró el sobrenadante y se dejó secar el fondo del tubo durante 1 minuto, para, por último, resuspender el RNA en 40 µl de H₂O ultra pura y autoclavada. Para validar la presencia y pureza del RNA y estimar su concentración se midió la absorbancia a 260 nm en el espectrofotómetro dando como buena la extracción para valores de $DO_{260/280} \geq 1,8$.

3.4.3.1.2. RT-PCR.

La RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) es una técnica que permite amplificar una secuencia génica o parte de esta a partir de la información contenida en el RNA.

Es un proceso que conlleva dos pasos consecutivos en los que el RNA es primero sometido a una transcripción inversa de su secuencia produciéndose una copia de DNA complementario o cDNA. El cDNA obtenido es amplificado en el segundo paso mediante una PCR convencional para la secuencia de interés.

1. Obtención del cDNA: el primer paso consistió en añadir en cada vial de PCR el RNA extraído de cada muestra anteriormente, los dos oligonucleótidos **pNDV /3102+** y **pNDV /3231-** (Tabla 8) y H₂O ultra pura y autoclavada hasta completar

MATERIAL Y MÉTODOS

- un volumen de 12 μ l. Posteriormente se incubó durante 10 minutos a 72°C para el preanillamiento de los cebadores.
2. En hielo, se añadió 1 μ l de inhibidor de RNA polimerasa, 4 μ l de buffer de retrotranscripción, 2 μ l de dTT 0,1 M, 1 μ l de una mezcla de dNTPs 10 mM y 1 μ l de Retrotranscriptasa “*Superscript*“.La reacción se llevó a cabo a 42°C durante 50 minutos y 70°C durante 15 minutos para la inactivación de la retrotranscriptasa.
 3. Una vez obtenido el cDNA se procedió a su amplificación mediante una reacción de PCR convencional, como la descrita en el apartado 3.4.1.2.
 4. El producto amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa para comprobar la banda de interés. Se cargó en un nuevo gel la totalidad del material restante y se purificó la banda de interés según el procedimiento descrito en el apartado 3.4.1.4 para, finalmente, secuenciar el DNA purificado (apartado 3.4.1.6).

3.4.3.2. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS VÍRICAS Y RECOMBINANTES. INMUNOFLUORESCENCIA Y *WESTERN BLOT*.

La detección de las proteínas FAS y FEX, así como la de las proteínas víricas y proteínas celulares de interés en nuestros estudios, ha requerido de dos técnicas básicas de inmunodetección:

1. Inmunodetección y Visualización mediante Microscopia de Fluorescencia:

las técnicas de visualización por inmunofluorescencia combinan la especificidad de la reacción de reconocimiento antígeno-anticuerpo con la posibilidad de la visualización de ésta usando anticuerpos secundarios marcados fluorescentemente. La posibilidad de combinar los anticuerpos y fluoróforos nos permiten detectar en el mismo campo la presencia del virus y la expresión de las proteínas recombinantes con solo cambiar la longitud de onda de excitación. En este trabajo se han desarrollado procedimientos de detección mediante Inmunofluorescencia para Microscopio Invertido de Fluorescencia y Confocal. Mientras que en el primer caso

nos permite valorar la presencia o no de la proteína de interés y una primera aproximación de la localización en la célula, la Microscopía Confocal nos permitió visualizar la localización de las proteínas de interés dentro de la ultraestructura celular. En todos los casos el procedimiento general implica una primera fase de Fijación de las células, una posterior Incubación con Anticuerpos Primarios específicos para la proteína o proteínas de interés en el estudio y por último la Incubación con Anticuerpos Secundarios, con especificidad frente a los primarios, marcados con diferentes fluorocromos.

Las posibles variaciones que pueden aparecer en el procedimiento harán referencia al tipo de agente químico usado en la fijación, la necesidad de una fase de permeabilización, si la función de la técnica es la localización de proteínas intracelulares y en el caso de la Microscopía Confocal, el soporte sobre el que se realiza el proceso.

En apartados posteriores se detallarán las variaciones en el método general de detección mediante inmunofluorescencia teniendo en cuenta el objetivo del estudio.

2. Electroforesis de extractos proteicos en presencia de SDS, inmovilización mediante transferencia de Western e inmunodetección (Western Blot):

la posibilidad de poder obtener extractos proteicos de células infectadas es imprescindible para poder comprender tanto la capacidad infectiva del virus como para poder estudiar las modificaciones que se están produciendo, durante el proceso de infección, en las células infectadas, a nivel de su perfil proteico.

En el transcurso de este trabajo se han usado las metodologías implicadas en la Extracción y Valoración de Concentración de Proteínas, de Electroforesis de extractos proteicos en presencia de SDS, Inmovilización mediante transferencia de Western e Inmunodetección tanto para el estudio de las características generales de los virus como para el estudio de la capacidad apoptótica de los mismos.

En cada caso, se ha podido variar tanto la metodología empleada para la extracción de proteínas como el límite de resolución de los geles empleados en la electroforesis, los tiempos de transferencia o los anticuerpos usados en cada caso. Para todos los ensayos se hará una descripción precisa de cómo se llevo a cabo.

3.4.3.2.1. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS VÍRICAS Y RECOMBINANTES.
VISUALIZACIÓN MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA.

1. INFECCIÓN DE CÉLULAS CON rNDVs: 24 horas antes de la infección se prepararon las células en placas de 24 pocillos. Tras comprobar que las células han desarrollado una monocapa se retira el medio, se lavan dos veces con solución PBS y se añade a cada pocillo el medio de infección. En el caso concreto de las inmunofluorescencias realizadas para la caracterización de expresión de las proteínas FAS y FEX, se usaron los virus rNDV-B1/FAS, rNDV-B1/FEX y rNDV-B1 con diluciones de trabajo a una m.o.i de 1 en OptiMEM-I. Las células se mantuvieron con el medio de infección durante 1 hora agitando cada 20 minutos las placas para evitar que se sequen. Posteriormente se sustituyó el medio de infección por 400 µl de DMEM-10%FBS/PS. Las células se incubaron a 37°C durante 24 horas.

La validación de los resultados requiere la presencia de dos controles adicionales: células Vero sin tratar y células Vero sometidas al mismo tratamiento de incubación con OPTIMEM-I (control de técnica o *mock*).

2. FIJACIÓN E INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS: 24 horas post-infección se aspiró el medio de los pocillos y se lava con PBS. Las células se fijan con paraformaldehído al 2,5% en PBS durante 10-20 minutos a temperatura ambiente y después se lavaron 2 veces con PBS.

A continuación se incubaron 30 minutos en solución de bloqueo (BSA al 0.1% en PBS) tras lo cual se aspirará y sin lavar se procede a incubar las células con 150 µl de la dilución adecuada de anticuerpo primario :

Anticuerpo policlonal anti-NDV ,en dilución 1:600 en solución de bloqueo.

Anticuerpo monoclonal anti-human APO-1/Fas (Bender MedSystems), en dilución 1:800 en solución de bloqueo.

El tiempo de incubación fue de 1 hora a temperatura ambiente. Tras ésta, se lavó 3 veces con PBS se añadió la solución de 150 µl con los anticuerpos secundarios:

Anticuerpo policlonal anti-inmunoglobulina de conejo Alexa Fluor® 488 (Invitrogen), en dilución 1:1000 en solución de bloqueo.

Anticuerpo monoclonal anti-inmunoglobulina de ratón Alexa Fluor® 568 (Invitrogen), en dilución 1:1000 en solución de bloqueo.

MATERIAL Y MÉTODOS

El tiempo de incubación para el anticuerpo secundario fue de 45 minutos y se realizó a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron los pocillos 3 veces y se dejaron con 500 µl de PBS para ser observados al microscopio invertido de fluorescencia.

A la incubación con el anticuerpo secundario se le añadió el reactivo Hoechst a cada uno de los pocillos, en proporción 1:1000 con respecto al volumen final de PBS.

Para validar la técnica se realizaron los siguientes controles:

1. Células sin infectar y sin tratamiento incubadas con anticuerpos primarios y secundarios.
2. Células sin infectar pero tratadas con OPTIMEM-I incubadas con anticuerpos primarios y secundarios.

Las imágenes se obtuvieron con la cámara digital Sony DKC-5000.

3. MODIFICACIÓN DE LA TÉCNICA PARA MICROSCOPIA CONFOCAL.

En el caso de la inmunodetección y visualización mediante Microscopía Confocal las células se cultivaron en placas multipocillo con fondo plano de vidrio pretratadas con polilisina. La fijación, tras el procedimiento de infección y lavado de los pocillos, se realizó con etanol al 70%, previamente enfriado, a 4°C y durante 10 minutos. Previamente a la incubación con la solución de bloqueo, las células se permeabilizaron con una solución de Triton-X-100 al 0.01% durante 15 minutos tras lo cual se lavaron dos veces con la solución de PBS.

El resto del procedimiento sigue los mismos pasos descritos en el punto 2 de este apartado. Las imágenes se tomaron usando el Microscopio Confocal Zeiss LSM 510. El análisis de las imágenes se realizó usando el programa Image-J.

3.4.3.2.2. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y VÍRICAS DURANTE LA INFECCIÓN. CARACTERIZACIÓN DEL VIRIÓN.

1. EXTRACCIÓN Y VALORACIÓN DE PROTEÍNAS: el primer paso consistió en obtener extractos proteicos de cultivos infectados. Para ello se partió de 5 placas de 100 x 20 mm con células Vero crecidas hasta una confluencia del 80% (5×10^6 células por placa). Estas se infectaron 3 con los rNDVs purificados y titulados, una con el virus

MATERIAL Y MÉTODOS

rNDV-B1/GFP y la quinta se dejó sin infectar para usarla como control negativo. Las placas se infectaron a una m.o.i de 1 y se incubaron durante 48 horas a 37°C, en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Se aspiró el medio y se añadió 1 ml de PBS por placa y se rascaron para poder recoger las células.

Todo el volumen obtenido para cada placa se recogió en un vial que se centrifugó a 13000 rpm 1 minuto en una microcentrífuga de mesa, retirándose el sobrenadante y resuspendiéndose el sedimento con 100 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM; NaCl 1 M; CaCl₂ 10 mM; Triton X-100 2 %; PMSF 1 mM; pH 7,5). Tras una incubación de 30 minutos en hielo, se centrifugó el lisado a 13000 rpm durante 30 minutos a 4°C (en la centrífuga Kubota) para eliminar los restos celulares y quedarnos con el extracto proteico contenido en el sobrenadante. Dicho extracto se guardó a -20°C hasta su posterior utilización.

Para determinar la cantidad de proteínas totales de las muestras de virus purificados y las obtenidas de los cultivos infectados se empleó el método de Lowry para la cuantificación de proteínas de membrana y lipoproteínas. Para el ensayo se utilizaron como patrón concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina. Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm.

2. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS:

los extractos proteicos para las muestras de cultivos infectados y los virus purificados se sometieron a electroforesis para obtener el perfil proteico de cada uno de ellos. Se usó como referencia de concentración del contenido proteico la valoración realizada en el apartado anterior.

Tanto las muestras de virus como los extractos celulares se diluyeron para poder cargar la misma concentración de proteínas (5 µg/µl en el caso de virus, 10 µg/µl para los extractos celulares) y se añadió a una solución amortiguadora de carga 2X (Tris-HCl 0.0625 M, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.001% y β-mercaptoetanol al 5%). Las muestras ya con el tampón de carga fueron incubadas a 100°C durante 5 minutos. Paralelamente se preparó un gel de poliacrilamida al 12% (concentrante al 4%) y se dejó polimerizar a temperatura ambiente. Una vez listo el gel se procedió a cargar las

MATERIAL Y MÉTODOS

muestras en los pocillos correspondientes dejando reservados los extremos para el marcador de peso molecular de proteínas (Page Ruler Prestained Protein Ladder, Fermentas). La electroforesis se desarrolló sobre una solución amortiguadora TE (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%) a un voltaje inicial de 50V hasta que las muestras superaron el gel concentrante y a 180V en el separador.

3. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS E INMUNODETECCIÓN (WESTERN BLOT).

Desde el gel de poliacrilamida, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa empleando una solución de transferencia TBS 10X (Tris 30,3 g, glicina 144.16 g) siendo la solución de trabajo 1X. La electrotransferencia se desarrolló a una intensidad constante de 400 mA, 1 hora a 4°C, tras lo cual la membrana se lavó en una solución de TTBS (TBS, TWEEN-20 0,1%, pH 7.5), con agitación durante unos minutos para retirar los restos de sales.

A continuación se incubó la membrana con una solución de bloqueo igual a la de lavado pero con un 5% de seroalbúmina bovina, en agitación y durante 1 hora a temperatura ambiente.

Tras el bloqueo, se procedió a la incubación con los anticuerpos. La dilución precisa para cada anticuerpo se hizo con la misma solución de bloqueo, y se incubó con la membrana de nitrocelulosa, en agitación, durante 1 hora.

Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se lavó la membrana 3 veces con TTBS en pases de 10, 5 y 5 minutos sucesivamente.

A continuación se incubó 1 hora en agitación a temperatura ambiente, con la dilución correspondiente de anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano (HRP). Posteriormente se volvió a lavar 3 veces la membrana como en el paso anterior y se procedió a su revelado.

La detección de las proteínas marcadas por el complejo anticuerpo primario-anticuerpo secundario-HRP se realizó mediante una reacción de quimioluminiscencia provocada por la oxidación del luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalatozinediona) por la HRP en presencia de peróxido de hidrógeno. Para revelar se usó el kit comercial ECL Western Blotting Substrate (Thermo). La membrana se incluyó en película transparente y se introdujo en la *cassette* de revelado, donde se produciría la exposición de una película fotográfica a determinados periodos de tiempo. Las películas se sometieron finalmente a revelado automático.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las diluciones usadas para los diferentes anticuerpos usadas en este apartado se recogen en la **Tabla 9**.

TABLA 9. ANTICUERPOS Y DILUCIONES USADAS EN LOS PROCEDIMIENTOS DE INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y CARACTERIZACIÓN DEL VIRIÓN.

3.4.4.3. CAPACIDAD REPLICATIVA DE LOS VIRUS RESCATADOS: CURVAS DE CRECIMIENTO.

Se prepararon células Vero en placas de 35 mm en número de 5×10^5 células por placa. Partiendo de virus titulados, se procedió a preparar una suspensión de cada uno de ellos de 750 μ l en OptiMEM-I, calculando que la m.o.i final de infección fuera de 0.1. Las placas se lavaron dos veces con PBS y se inocularon con la suspensión de virus, manteniéndose en incubación durante una hora a 37°C, en una atmósfera húmeda con

ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN PRIMARIO	ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN SECUNDARIO
POLICLONAL ANTI-NDV	1/800	Anti-inmunoglobulina de conejo. GE Healthcare	1/10000
POLICLONAL ANTI-FAS (N-18): SC-714 Santa Cruz Biotechnology	1/600	Anti-inmunoglobulina de conejo. GE Healthcare	1/10000
POLICLONAL ANTI-FAS HUMANO (C18C12) Cell Signaling	1/2000	Anti-inmunoglobulina de conejo. GE Healthcare	1/10000
MONOCLONAL ANTI-NP	1/400	Anti-inmunoglobulina de ratón. GE Healthcare	1/8000

5% de CO₂ y agitando cada veinte minutos. Tras el periodo de incubación, se aspiró la solución de infección y se añadió a cada una de las placas 3 ml del medio de post-infección DMEM/0,1%FBS/PS/0,3%BSA/TPCK-TRIPSINA.

MATERIAL Y MÉTODOS

A intervalos de tiempo de 0, 24, 36, 48 y 64 horas se procedió a tomar alícuotas de 200 µl del medio de cultivo de las placas infectadas. Las alícuotas se mantuvieron a -20°C hasta su utilización.

Para poder calcular el número de virus generados, se prepararon placas de 96 pocillos subcultivadas con células Vero (2×10^4 células por pocillo). Con las alícuotas obtenidas previamente, se procedió a hacer diluciones seriadas en base 10 en medio OptiMEM-I. Los pocillos de la placa de 96 fueron lavados dos veces con PBS e infectados con 50 µl de las diferentes diluciones. Cada una de las diluciones fue usada para infectar 3 pocillos y se mantuvieron durante una hora a 37°C, en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Sin aspirar el medio de infección, se procedió a añadir 50 µl de medio completo DMEM-10%FBS/PS y se preservó la incubación entre 16-20 horas.

La valoración del número de virus presentes en cada uno de los pocillos se llevo a cabo mediante Inmunodetección y Visualización mediante Microscopia de Fluorescencia. El procedimiento es exactamente igual que el seguido en el apartado 3.4.3.2 para la titulación de los virus solo que, en este caso, el volumen de las incubaciones es adaptado a placas de 96 pocillos y fue para todos los pasos de 50 µl. Se uso como anticuerpo primario el policlonal anti-NDV en dilución 1:600 y como secundario el anticuerpo policlonal anti-inmunoglobulina de conejo Alexa Fluor® 488 (Invitrogen), en dilución 1:1000. Para facilitar valorar el número de células se uso simultáneamente con el anticuerpo secundario el reactivo para contraste nuclear Hoechst, en proporción 1:1000.

El cálculo de las pfu/ml se hizo contando el número de células positivas presentes en los pocillos que fueron inoculados, buscando siempre la máxima dilución, para la cual, el número de células positivas sea, como mínimo, igual a 30, para considerar el proceso objetivo.

Como con cada dilución se inocularon tres pocillos, el valor final del título del virus evaluado será:

$$\frac{\text{Numero de células fluorescentes (Media de los tres pocillos)}}{\text{Volumen del inóculo (ml)}} \times \text{Factor de dilución} = \text{pfu/ml}$$

Con los datos de las pfu/ml se pudieron representar las curvas de crecimiento de cada uno de los virus representando el valor del logaritmo decimal de las pfu/ml con respecto al tiempo de infección al cual se tomó la alícuota. De este modo podemos obtener un gráfico que muestra como es la cinética de replicación del virus, tal y como se representa en la **Figura 17**.

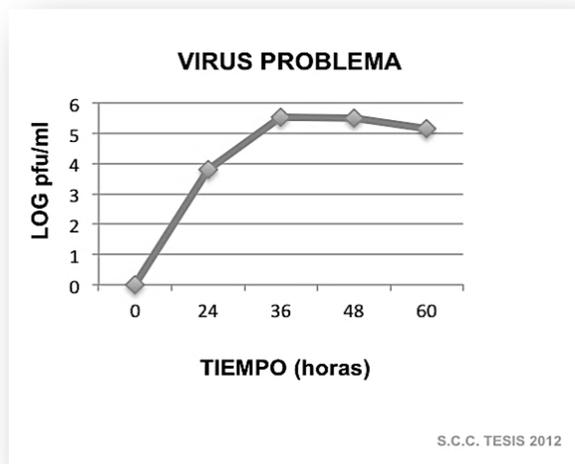


FIGURA 17. CURVA DE CRECIMIENTO DE UN VIRUS.

Cinética de la variación del título de un virus. En el eje de abscisas se representa el tiempo post-infección en horas. En ordenadas, el título o número de virus detectable en el cultivo.

Este mismo procedimiento será realizado también en la línea celular HeLa.

3.4.4. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO DE LA CAPACIDAD APOPTÓTICA DE LOS VIRUS RECOMBINANTES EN MODELOS CELULARES.

3.4.4.1. TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA.

Los experimentos se llevaron a cabo en placas de 12 o 24 pocillos, subcultivadas 12 horas con 2×10^5 o 1×10^5 células respectivamente. Las suspensiones de los diferentes virus, para la infección, se prepararon en OptiMEM-I a la m.o.i. que requiriese el experimento y se incubaron durante 1 hora a 37 °C y en atmósfera de 5 % de CO₂, agitando periódicamente. Pasado este tiempo se aspiró el inóculo y se añadió medio DMEM-10%FBS/PS, tras lo cual, las células se incubaron 12, 24 y 36 horas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las células se fijaron directamente en la placa sin retirar el medio con formaldehído a una concentración final del 1 % durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se aspiró el medio, se lavaron dos veces con PBS y las células de los pocillos se tiñeron con 100 µl de cristal violeta al 0.1 % en metanol.

Las placas se observaron y fotografiaron usando el Microscopio Invertido Olympus IX51.

3.4.4.2. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR.

Las células se subcultivaron en placas de 24 pocillos a una confluencia de entre el 40 al 50% (5×10^4 células por pocillo). Se prepararon las suspensiones para la infección, con virus purificados y titulados, en 200 µl OptiMEM-I, ajustando, en cada caso, el volumen de virus según la m.o.i a la que se quisiera realizar el experimento. Las infecciones se llevaron a cabo como ya se ha detallado anteriormente: lavado de las placas, dos veces, con PBS, adición de la suspensión de virus e incubación durante 1 hora a 37 °C y en atmósfera de 5 % de CO₂. Pasado este tiempo, se aspiró el inóculo y se añadió medio DMEM-10%FBS/PS o DMEM/0,1%FBS/PS/0,3%BSA/TPCK-TRIPSINA y las células se incubaron durante 12, 24, 36, 48 y 72 horas.

Una vez transcurrido el periodo de post-infección, se aspiró el medio de cultivo y se añadió a cada pocillo 300 µl de bromuro de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolio)-2,5-difenil-2H-tetrazolio o MTT (concentración final de 5mg/ml) en proporción 1:10 en PBS y se incubaron las muestras durante 1 hora y 15 minutos en oscuridad y en condiciones de cultivo de 37 °C y atmósfera de 5 % de CO₂.

A continuación se aspiró el medio y se añadieron, a cada pocillo, 500 µl de DMSO. La placa se mantuvo en agitación en oscuridad y a temperatura ambiente, durante 10 minutos. Tras este último paso de incubación se procede a leer la absorbancia de las muestras de cada pocillo a una longitud de onda de 570 nm en un espectrofotómetro adaptado para la lectura de placas.

Para calcular la variación en la viabilidad y/o proliferación de las células sometidas a las diferentes infecciones se consideraran los valores de densidad óptica u absorbancia obtenidos para cada una de las muestras, en comparación con los obtenidos para los controles, no infectados, en cada intervalo de tiempo elegido:

D.O Muestra

X 100 = Porcentaje de Viabilidad

D.O Control

3.4.4.3. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS VÍRICAS Y ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.

12 horas antes del proceso de infección se prepararon placas de 35 mm en las que se cultivaron entre $5 \times 10^5 / 10^6$ células, según la línea celular implicada en el estudio. Las suspensiones para la infección con virus purificados y titulados, se prepararon en 750 μ l OptiMEM-I ajustando en cada caso el volumen de virus según la m.o.i a la que se quisiera realizar el experimento.

Las infecciones se llevaron a cabo como ya se ha detallado anteriormente: lavado de las placas, dos veces, con PBS, adición de la suspensión de virus e incubación durante 1 hora a 37 °C y en atmósfera de 5 % de CO₂. Transcurrido el tiempo de infección, se aspiró el inóculo, se añadió medio DMEM-10%FBS/PS y las células se incubaron durante el tiempo elegido en el estudio.

El medio de cultivo se recogió en tubos Falcon de 15 ml y las células, aún adheridas a la superficie de la placa, se levantaron usando 1 ml de tampón de disociación celular libre de enzimas (Gibco). Una vez levantadas, las células se transfirieron a los tubos Falcon y se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm.

Se eliminó el sobrenadante y el depósito celular se resuspendió en 1 ml de PBS y se transfirió a tubos tipo eppendorf. Las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 2500 rpm en una centrifuga de mesa. Se aspiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 200 μ l de paraformaldehído al 2,5% y se incubaron durante 15 minutos sobre un balancín de mesa.

Posteriormente las muestras se lavaron 2 veces con PBS, añadiendo, en cada paso, 800 μ l de PBS, centrifugando a 2500 rpm y eliminando el sobrenadante. Tras los dos lavados las muestras se incubaron con el anticuerpo primario de elección, en una solución de bloqueo de BSA al 0,1%, preparada en PBS, y con un volumen total de entre 100 y 200 μ l, según el volumen celular que queda en el precipitado.

El tiempo de incubación fue de 45 minutos y ésta se realizó a temperatura ambiente y en movimiento constante sobre un balancín.

MATERIAL Y MÉTODOS

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a lavar 2 veces las células, mediante adición de 800 µl de PBS en cada lavado y centrifugando 5 minutos a 2500 rpm en cada uno de ellos. Se eliminó el PBS mediante aspiración y se incubó cada muestra con una solución de anticuerpo secundario marcado fluorescentemente, también en solución de bloqueo y en un volumen final igual al usado para la incubación con el primario.

En este caso, la incubación se realizó en oscuridad 45 minutos, en las mismas condiciones de temperatura y de movimiento que en el primario.

Las muestras se lavaron dos veces mediante adición de PBS y centrifugación. Finalmente las células se resuspendieron en un volumen total de 400 µl de PBS, se transfirieron a tubos Falcon específicos para citómetro y se conservaron a 4°C hasta su adquisición.

El análisis de los datos recogidos por el citómetro se llevó a cabo usando el programa WinMDI para Macintosh. La información recogida por el citómetro hace referencia a las células que son positivas o negativas para el marcaje con los anticuerpos primario y secundario, que presentaran o no fluorescencia, respectivamente. Los datos son presentados en forma de Histograma o de Diagrama de Puntos, en los que se muestra la Intensidad de Fluorescencia registrada por el citómetro en cada uno de los eventos o células individuales que han pasado por el detector (**Figura 18**).

Los controles necesarios para validar la técnica y calibrar el citómetro fueron:

1. Células sin infectar resuspendidas en PBS.
2. Células sin infectar fijadas con paraformaldehído al 2,5% y resuspendidas en PBS.
3. Células sin infectar fijadas con paraformaldehído al 2,5% e incubadas con anticuerpo secundario, resuspendidas en PBS
4. Células sin infectar fijadas con paraformaldehído al 2,5% e incubadas con anticuerpos primario y secundario, resuspendidas en PBS

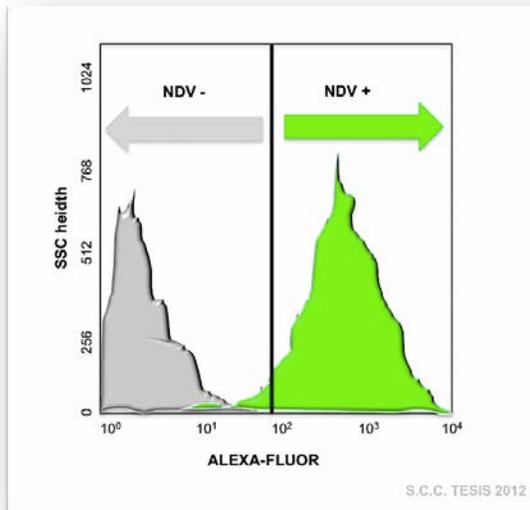


FIGURA 18. INMUNODETECCIÓN DE LA INFECCIÓN CON NDV MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.

REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA.

En el Histograma aparecen los parámetros SSC, correspondiente al tamaño de cada evento o célula, en el eje de ordenadas, y la intensidad de fluorescencia correspondiente a la inmunodetección registrada en cada evento o célula, en el eje de abscisas. En gris se representa la señal correspondiente a la población celular de una muestra control (células no infectadas). En verde, señal obtenida en una población positiva para la infección con NDV.

3.4.4.4. DOBLE MARCAJE ANEXINA-V / IODURO DE PROPIDIO (IP) PARA CITOMETRÍA DE FLUJO.

Se prepararon placas de 35 mm en las que se cultivaron 5×10^5 células. Las suspensiones para la infección con virus purificados y titulados, se prepararon en 750 μ l OptiMEM-I ajustando, en cada caso, el volumen de virus según la m.o.i a la que se quisiera realizar el experimento.

Las infecciones se llevaron a cabo como ya se ha detallado anteriormente: lavado de las placas, dos veces, con PBS, adición de la suspensión de virus e incubación durante 1 hora a 37 °C y en atmósfera de 5 % de CO₂.

Pasado este tiempo se aspiró el inóculo y se añadió medio DMEM-10%FBS/PS, tras lo cual, las células se incubaron durante el tiempo de estudio elegido.

Transcurrido el periodo de infección programado, se recogió el medio de cultivo en tubos Falcon de 15 ml y las células aun adheridas en la placa se levantaron usando 1 ml de tampón de disociación celular libre de enzimas (Gibco). Una vez levantadas, las células se transfirieron a los correspondientes Falcon y se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de PBS y se transfirieron a tubos tipo eppendorf. Las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 2500 rpm en una centrifuga de mesa a 4°C.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un segundo lavado de las células con 200 μl del tampón específico para ensayos con Anexina-V (0,1M HEPES/NaOH, 1,4M NaCl, 25mM CaCl_2 , pH 7.4). Tras el lavado se preparó una solución de 100 μl por muestra de tampón específico para la unión de anexina, a la que se adicionaron 5 μl del reactivo Anexina-V y 5 μl de Ioduro de Propidio (IP). Las muestras fueron resuspendidas en la solución de Anexina/IP y transferidas a tubos Falcon específicos para su uso en el citómetro. Se incubaron durante 15 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se añadió a cada tubo 400 μl del tampón específico y se procedió a su adquisición y lectura por el citómetro.

El citómetro detectará la Intensidad de Fluorescencia del fluorocromo con el que está complejada la Anexina, en nuestro caso DY634, y la fluorescencia roja emitida por el IP. Ambas son registradas por el citómetro en cada uno de los eventos o células individuales que pasan por el detector. El análisis de los datos recogidos por el citómetro se llevó a cabo usando el programa WinMDI. La información recogida por el citómetro hace referencia a las células que son positivas o negativas para el marcaje con Anexina /IP. Los datos se organizan en forma Diagramas de Densidad de Población (**Figura 19**) para la detección de subpoblaciones de inducción de apoptosis, o en forma de Histogramas, valorando la positividad de los dos marcadores de forma individual. De este modo podemos diferenciar en un mismo experimento cuatro subpoblaciones celulares:

1. Células viables: Anexina-V negativas/ IP negativas.
2. Células en Apoptosis temprana: Anexina-V positivas / IP negativas.
3. Células en apoptosis tardía: Anexina-V positivas / IP positivas.
4. Células necróticas y otras formas de muerte celular: IP positivas.

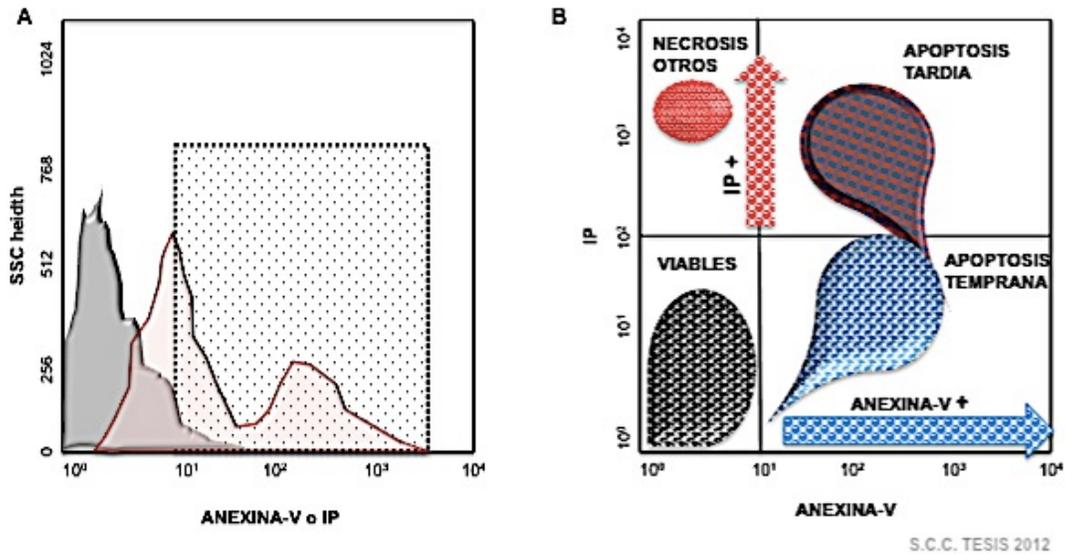


FIGURA 19. IDENTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES EN UN ENSAYO DE DOBLE MARCAJE ANEXINA-V/IP.

A. Histograma para la determinación de señal positiva para Anexina-v o IP. En el Histograma aparecen los parámetros SSC, correspondiente al tamaño de cada evento o célula, en el eje de ordenadas, y la intensidad de fluorescencia correspondiente a la inmunodetección registrada en cada evento o célula, en el eje de abscisas. En gris se representa la señal correspondiente a la población celular de una muestra control (células no infectadas). En rojo, la posible señal obtenida para una población con células positivas para el marcaje con Anexina-V o con IP. El área punteada mostraría los valores, a partir de los cuales, consideraríamos la población positiva, para cualquiera de los marcajes.

B. Ejemplo de subpoblaciones identificadas en un Diagrama de Densidad de Población. Los gráficos de densidad de población nos muestran la distribución de las diferentes poblaciones que pueden aparecer en nuestro estudio y, mediante un código colorimétrico, nos informan de donde se localiza el mayor número de células de nuestra muestra. En los ejes aparecen los valores en escala logarítmica de la intensidad de fluorescencia que han presentado cada uno de los eventos o células que han sido detectadas por el citómetro, tanto para Ioduro de Propídio (IP) (eje Y) como para Anexina-V (eje X).

Los controles necesarios para validar la técnica y calibrar el citómetro fueron:

1. Células sin infectar resuspendidas en tampón para marcaje con anexina.
2. Células sin infectar resuspendidas en tampón específico con Anexina-V.
3. Células sin infectar resuspendidas en tampón específico con IP.
4. Células sin infectar resuspendidas en tampón específico con Anexina-V e IP.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.4.4.5. DOBLE MARCAJE ANEXINA-V / IODURO DE PROPIDIO (IP) PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

Para la visualización de la exposición de fosfatidilserina en la cara extracelular de la membrana citoplasmática, en células infectadas se usó la Anexina-V conjugada con el fluorocromo Alexa-Fluor 488 de la empresa Invitrogen. El protocolo incluido en el producto tuvo que ser adaptado para células adherentes. Se prepararon las células en placas de 24 pocillos a una confluencia del 50%. Las infecciones se llevaron a cabo como ya se ha detallado anteriormente: lavado de las placas, dos veces, con PBS, adición de la suspensión de virus a una m.o.i de 1 e incubación durante 1 hora a 37 °C y en atmósfera de 5 % de CO₂. Pasado este tiempo se aspiró el inóculo y se añadió medio DMEM-10%FBS/PS, tras lo cual, las células se incubaron durante 24 horas.

Transcurrido el tiempo de infección, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron una vez con PBS frío. Se prepararon las diluciones de trabajo de Anexina-V y Ioduro de propidio, tal y como especifica el fabricante, a partir del stock provisto en el kit y se adicionaron 5 µl de cada reactivo a un volumen total de 150 µl de solución de marcaje por pocillo y cuya base es el tampón para Anexina proporcionado por el kit. Las muestras se incubaron durante 15 minutos tras lo cual los pocillos se lavaron una vez con el tampón de Anexina, se añadieron 250 µl del tampón y se procedió a su visualización con el microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX51.

3.4.4.6. ESTUDIO DEL CICLO CELULAR Y ANÁLISIS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.

Se prepararon placas de 35 mm en las que se cultivaron entre 5×10^5 y 10^6 células, según la línea celular implicada en el estudio. Las suspensiones para la infección con virus purificados y titulados, se prepararon en 750 µl OptiMEM-I ajustando en cada caso el volumen de virus según la m.o.i a la que se quisiera realizar el experimento.

Las infecciones se llevaron a cabo como ya se ha detallado anteriormente: lavado de las placas, dos veces, con PBS, adición de la suspensión de virus e incubación durante 1 hora a 37 °C y en atmósfera de 5 % de CO₂. Pasado este tiempo se aspiró el inóculo y se añadió medio DMEM-10%FBS/PS, tras lo cual, las células se incubaron durante el tiempo de estudio elegido.

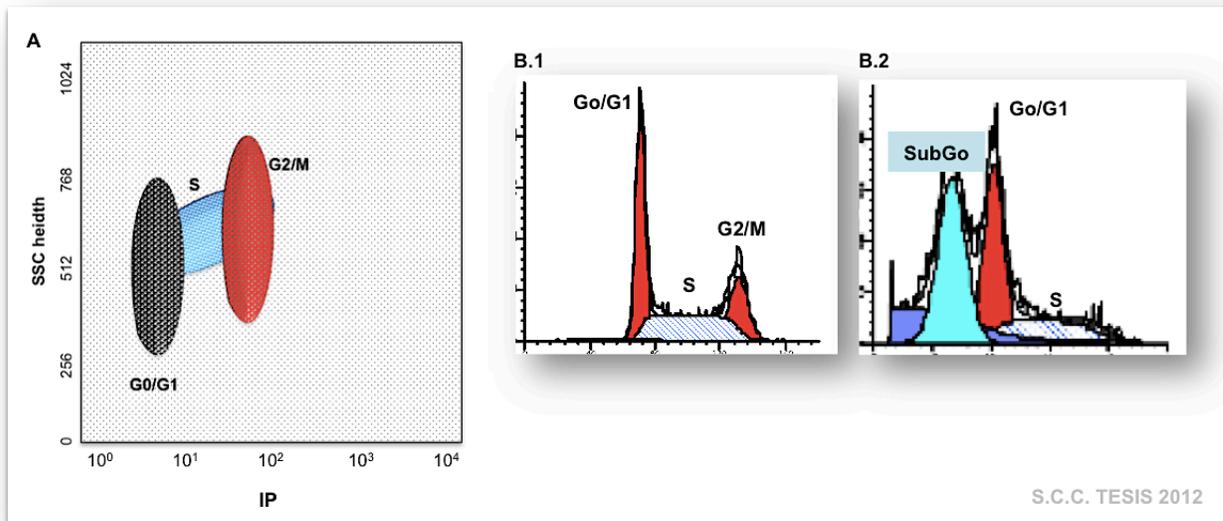


FIGURA 20. SUBPOBLACIONES DIFERENCIABLES SEGÚN LA FASE DE CICLO CELULAR EN UN ENSAYO DE INFECCIÓN Y TRATAMIENTO CON IP/RNAsa.

A. Simulación de un posible Diagrama de Puntos o DotPlot correspondiente a la adquisición de una muestra celular y las correspondientes poblaciones que pueden ser identificadas. Se representan SSC, correspondiente al tamaño de cada evento o célula, en el eje de ordenadas, e IP, correspondiente a la intensidad de la señal de Ioduro de Propídio para cada evento o célula, en el eje de abscisas.

B.1. Histograma correspondiente a una muestra control y las correspondientes subpoblaciones (G0/G1, S y G2/M) que pueden identificarse, según la fase del ciclo celular.

B.2. Histograma correspondiente a una muestra en la que ha habido inducción de apoptosis. Se destaca la aparición de una nueva población, SubG0, que engloba a todas aquellas células que están en una fase avanzada de muerte celular por apoptosis.

Transcurrido el tiempo de incubación se recogió todo el medio de cultivo correspondiente a cada placa en un tubo Falcon de 15 ml de volumen y las células que permanecían adheridas a la placa se levantaron usando 1 ml de tampón de disociación celular libre de enzimas (Gibco) y que se añadió a cada tubo correspondiente. Los tubos se centrifugaron a 4°C a una velocidad de 1200 rpm. Se elimina el sobrenadante y las células se resuspenden y fijan en 200 µl de Etanol al 70% previamente enfriado a -20°C. La fijación se llevó a cabo durante 30 minutos a 4°C. Transcurrido el tiempo de fijación se añadió a cada tubo 2ml de una solución de BSA al 2% en PBS y las células se centrifugaron durante 5 minutos a 4°C y velocidad de 1200 rpm.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se eliminó el sobrenadante y se añadió a cada tubo 500 µl de la solución comercial IP/RNAsa (Immunostep). Las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Se transfirieron a tubos Falcon específicos para citómetro y se procedió a la adquisición y lectura de las muestras.

Los datos recogidos por el citómetro hacen referencia a la intensidad de fluorescencia que presenta cada célula, la cual es proporcional a la cantidad de IP que se ha unido al DNA en cada una de ellas. Los resultados se analizaron con los programas Paint a Gate (BD Biosciences), Modfit y WinMDI y se representaron mediante Histogramas y *Dot plots* (**Figura 20**).

En cada representación se puede identificar el estadio del ciclo celular en el que se encuentra cada evento o célula individual que ha sido detectada siendo, el histograma en sí, una representación de las diferentes fases en las que se encuentran las diferentes células de la población que está siendo estudiada.

3.4.4.7. AISLAMIENTO Y ANÁLISIS DE DNA SUBGENÓMICO.

Se prepararon placas de 60 mm en las que se cultivaron 1×10^6 células, Las suspensiones para la infección con virus purificados y titulados, se prepararon en 1ml de OptiMEM-I ajustando en cada caso el volumen de virus según la m.o.i a la que se quisiera realizar el experimento.

Las infecciones se llevaron a cabo como ya se ha detallado anteriormente: dos lavados de las placas con PBS, adición de la suspensión de virus e incubación durante 1 hora a 37 °C y en atmósfera de 5 % de CO₂. Pasado este tiempo se aspiró el inóculo y se añadió 3 ml de medio DMEM-10%FBS/PS, tras lo cual, las células se incubaron durante el tiempo de estudio elegido.

La obtención de DNA subgenómico se llevó a cabo siguiendo las instrucciones que Invitrogen adjunta el su producto Quick Apoptotic DNA Ladder Detection Kit.

Así, tras los periodos de incubación programados, el medio de cultivo se transfirió a un tubo Falcon de 15 ml, se levantaron las células que quedaban usando un rascador y se resuspendieron en 1ml de PBS. Todo el contenido celular de cada placa se transfirió a un tubo Falcon y se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm.

Se eliminó el sobrenadante mediante aspiración y se resuspendieron las células en 1 ml de PBS que se transfirieron a un tubo tipo eppendorf de 1,5 ml.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 2500 rpm en una centrifuga de mesa. El sobrenadante se eliminó y se añadieron, a cada uno de los tubos, 35 µl del tampón de lisis denominado TE y se resuspendió todo el contenido celular mediante pipeteo. A cada lisado se añadieron 5 µl de la solución enzimática A, se mezcló el contenido usando el agitador vortex y las muestras se incubaron durante 10 minutos en un baño a 37 °C. Tras los 30 minutos se añadieron 5 µl de la solución enzimática B y las muestras se incubaron en un baño a 50 °C, durante 30 minutos. Tras la incubación a 50°C, se añadieron a cada uno de los tubos 5 µl de la solución de acetato amónico y 100 µl de etanol absoluto, previamente enfriado a -20°C. Las muestras se mezclaron usando un agitador o vortex y se incubaron a -20°C durante 15 minutos para precipitar el DNA.

El siguiente paso consistió en centrifugar las muestras durante 10 minutos a 13000 rpm en una centrifuga de mesa refrigerada y a 4°C. El sobrenadante se eliminó y se añadieron 500 µl de etanol al 70% para lavar el DNA mediante centrifugación, otra vez a 4°C y a velocidad de 13000 rpm. Tras eliminar el sobrenadante, las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente para que se evaporara el resto de etanol que pudiera quedar en los tubos, durante aproximadamente 15 minutos. Una vez libre de restos de etanol, se añaden a cada tubo 30 µl del tampón de resuspensión del kit y se homogeniza, mediante pipeteo, la muestra de DNA obtenida en cada caso.

Es necesario preparar un gel de Agarosa al 1,2 % que contenga 0,5 µg/ml de Bromuro de Etidio para proceder a la electroforesis de las muestras. Esta se llevó a cabo a una intensidad de 5 voltios durante aproximadamente 1 hora y media. Los geles se visualizaron sobre un transiluminador con fuente ultravioleta .

3.4.4.8. ANÁLISIS DEL PATRÓN DE ACTIVACIÓN DE CASPASAS.

Se prepararon placas de 100 mm en las que se cultivaron $5-6 \times 10^6$ células. Las suspensiones para la infección con virus purificados y titulados, se prepararon en 2,5 ml de OptiMEM-I ajustando, en cada caso, el volumen de virus según la m.o.i a la que se quiso realizar el experimento. Las infecciones se llevaron a cabo como ya se ha detallado anteriormente: lavado de las placas, dos veces, con PBS, adición de la suspensión de virus e incubación durante 1 hora a 37 °C y en atmósfera de 5 % de CO₂.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pasado este tiempo se aspiró el inóculo y se añadieron 7,5 ml de medio DMEM-10%FBS/PS, tras lo cual, las células se mantuvieron en incubación durante el tiempo de estudio elegido.

Para cada tiempo de estudio se recogieron tanto el sobrenadante como las células presentes en cada placa, las cuales fueron levantadas usando un tampón de disociación celular libre de enzimas (Gibco). Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 1200 rpm, se aspiró el sobrenadante y el depósito celular se resuspendió en 200-400 μ l del tampón de lisis ProteoJET Mammalian Cell Lysis Reagent (Fermentas), al que se adicionó, en proporción 1:100, la solución de inhibición de proteasas Proteoblock™ (Fermentas). Tras 15 minutos de incubación en agitación constante, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm en una centrifuga de mesa refrigerada, a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se procedió a la valoración de la concentración de proteína total mediante el Método de Bradford (Reactivo de Bradford, Fermentas).

Cada una de las muestras fue procesada añadiendo en cada caso:

- Volumen de muestra para concentración final de 10-15 μ g de proteína total.
- 5 μ l de tampón de carga para SDS-Page Dual Color™ (Fermentas).
- 1 μ l de agente reductor DTT (Fermentas).
- Agua ultrapura, hasta un volumen final de 20 μ l.

Las muestras se calentaron durante 5 minutos a 95°C en una placa termocalefactante y posteriormente se mantuvieron a 4°C hasta el momento de su carga en el gel de electroforesis.

Para estudiar las condiciones de activación de caspasas, así como la presencia o ausencia de proteínas relacionadas con la misma, se usaron distintas condiciones experimentales para cada una de las proteínas. Estas variaciones técnicas implican diferentes límites de resolución de los geles empleados en la electroforesis, diferentes tiempos e intensidades de corriente en las transferencias, diferentes diluciones y tiempos de incubación de anticuerpos para la inmunodetección e incluso diferentes tiempos de exposición en la fase de revelado. En la **Tabla 10**, se recogen las condiciones experimentales usadas para cada una de las ellas.

MATERIAL Y MÉTODOS

La preparación de los geles para la electroforesis se llevó a cabo usando la solución de acrilamida al 40% Omnipur Acrylamide Bis-acrylamide, de Merck. En todos los casos, el gel concentrante se preparó al 4%. Se usaron las membranas de Difluoruro de Polivinilo Amersham Hypobond-P PVDF Membrane (GE Healthcare) para la fase de transferencia. Estas se activaron en metanol, durante 10 segundos. Para el bloqueo de las membranas y la incubación de los anticuerpos se usó una solución de PBS/ 1%TWEEN-20 / 3% LECHE EN POLVO. El control de carga fue la tubulina excepto en las muestras procedentes de células de ratón, en el que se usó actina. En ambos casos se usaron diluciones 1:10000 tanto para el anticuerpo primario como para el secundario. El revelado se llevó a cabo usando la solución ECL Western Blotting Substrate (Thermo). Los marcadores usados para determinar el peso molecular de las bandas obtenidas fueron Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas).

TABLA 10. CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA DETECCIÓN DE CASPASAS.

PROTEÍNA	% GEL	TRANSFERENCIA	ANTICUERPO PRIMARIO	ANTICUERPO SECUNDARIO	EXPOSICIÓN ECL
CASPASA-8	8	230 mA , 2horas 30 minutos	1:1000	1:10000	6-8 minutos
CASPASA-3	12	230 mA , 2 horas 30 minutos	1:800	1:10000	3-5 minutos
CASPASA-9	10	230 mA , 2 horas 30 minutos	1:800	1:10000	6-8 minutos
BID	12	60 V, 1 hora 30 min	1:1000	1:10000	3-4 minutos
FAS	8	80 V, 60 minutos	1:1000	1:10000	1-15 segundos

3.4.5. METODOLOGÍA APLICADA AL ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ONCOLÍTICA DE LOS VIRUS RECOMBINANTES EN TUMORES SÓLIDOS.

En los estudios realizados en modelo animal se usaron como modelo hembras de 2 a 4 semanas de vida de las líneas Balb-C y Black6. Los ratones se estabularon siguiendo el protocolo general, no superando un número de 5 por caja y se mantuvieron con un régimen de dieta normal, sin ninguna restricción de agua o alimento durante todo el desarrollo experimental, ni adición de otras sustancias como aditivos especiales o antibióticos. Todo el procedimiento experimental se llevó a cabo en las Instalaciones para Investigación Animal del Edificio Annenberg, en el Hospital Monte Sinaí de Nueva York (USA).

3.4.5.1. GENERACIÓN DE TUMORES SÓLIDOS EN MODELO MURINO.

Células de las líneas CT26 (carcinoma de colon de ratón) y BLACK6 (melanoma de ratón) se subcultivaron y mantuvieron en medio RPMI-10%FBS/PS/NaHCO₃ y DMEM-10%FBS/PS, respectivamente, hasta el momento de su utilización.

Tanto para el modelo singénico de carcinoma de colon como para el de melanoma se implantó un número de 1×10^6 células tumorales por animal. Las células, que permanecían en cultivo, se lavaron 2 veces con PBS, se levantaron de la placa con tripsina y se contaron, de modo que se prepararon tantas suspensiones de 1×10^6 células, en 100 μ l PBS como número de animales teníamos en cada uno de los estudios. La implantación de las células en los animales se llevó a cabo bajo condición de anestesia suave de los individuos, para lo cual se usó una cámara de anestesia para roedores con adaptación para Anestesia con Isoflurano. La implantación de las células se realizó usando una jeringuilla de insulina en el flanco de la pata trasera derecha, la cual fue rasurada previamente para una mejor manipulación. La inyección se hizo de modo subcutáneo o intradérmico, según las condiciones deseadas para el estudio. Tras la inyección celular, los animales se mantuvieron en condiciones generales de estabulación durante de 7 a 10 días. Durante este periodo las células implantadas desarrollaron una masa tumoral en el flanco de la pata trasera.

3.4.5.2. INFECCIÓN DE TUMORES SÓLIDOS. ESTUDIO DE LA PROGRESIÓN TUMORAL.

MATERIAL Y MÉTODOS

Transcurridos de 7 a 10 días post implantación se procedió a seleccionar los animales de experimentación que habían desarrollado un tumor. Para una mejor visualización, se procedió a rasurar de nuevo el pelo de la pata.

Las consideraciones generales tenidas en cuenta en la selección de los animales fueron:

1. **Presencia de masa tumoral:** solo se consideraron aquellos animales que no presentaban síntomas de debilidad, enfermedad o infección y que habían desarrollado un tumor perceptible tanto al tacto como visualmente. Los tumores se examinaron descartando aquellos que por error experimental se hubieran desarrollado intramuscularmente.
2. **Homogeneidad en el tamaño del tumor:** se procedió a realizar la primera medición del volumen del tumor desarrollado. Para ello se usó un calibre con pantalla digital con el cual se tomó la medida tanto de longitud como de anchura del tumor. El volumen final, calculado en cada caso, se correspondió con el producto:

$$\text{Longitud del tumor (mm) X Anchura del Tumor (mm)}^2 = \text{Volumen del Tumor (mm}^3\text{)}$$

Esta primera medición se considera la medida del Volumen del Tumor a Día 0 del ensayo. Calculado el volumen de tumor para cada individuo, se procedió a hacer una distribución homogénea de los animales implicados en el estudio, de modo que cada grupo experimental tuviera individuos con tumores de tamaños equivalentes. Se descartaron todos aquellos animales cuyo volumen de masa tumoral fuera igual o superior a 1000mm^3 . Según el reglamento de experimentación animal para este tipo de ensayos, cuando la masa tumoral del animal excede de 1000mm^3 éste debe ser sacrificado. Establecidos los grupos experimentales se procedió a la inyección intratumoral de la suspensión vírica. En nuestros ensayos se inyectó, a cada individuo de cada grupo experimental, una carga viral de 10^7 pfu/ml.

MATERIAL Y MÉTODOS

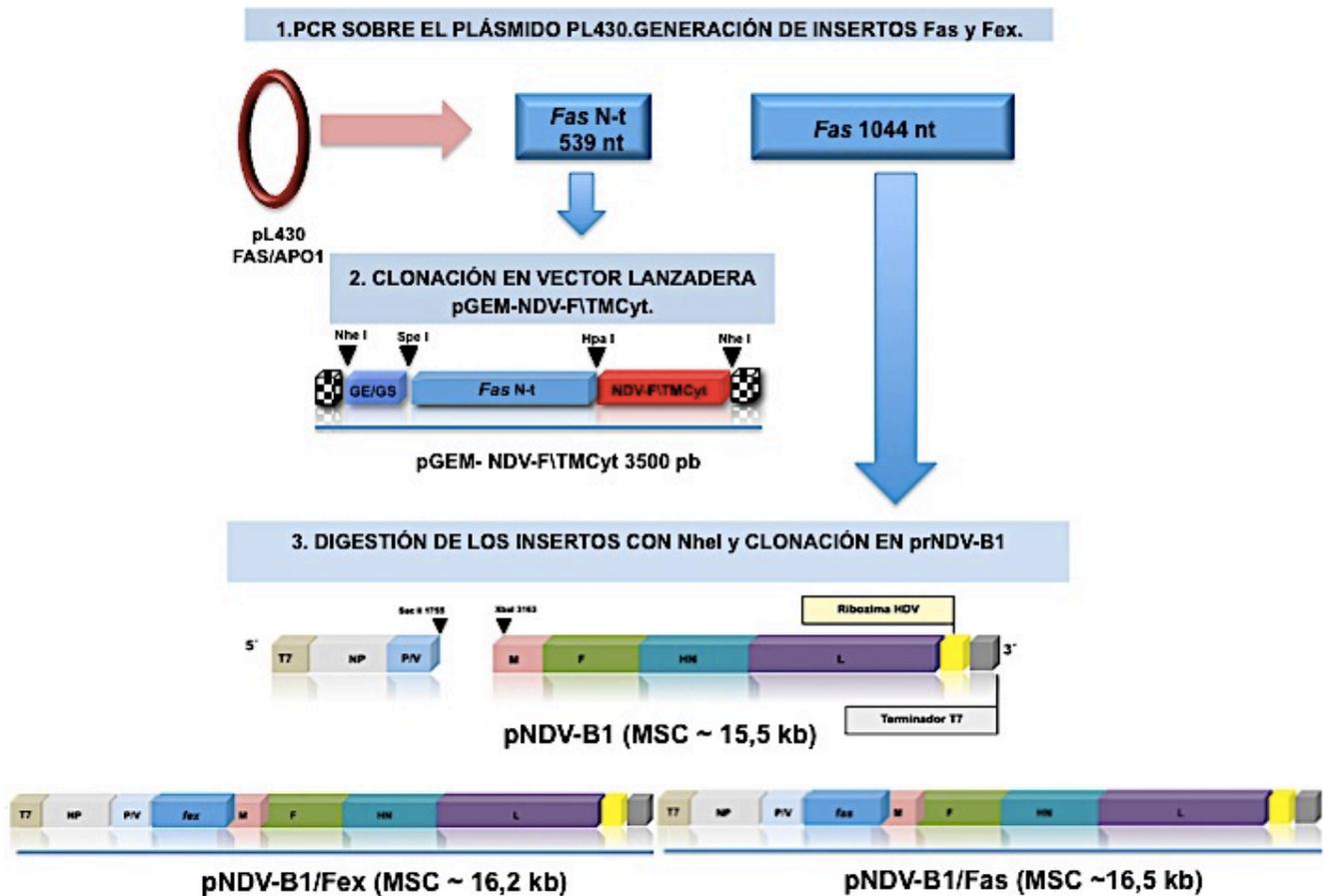
El volumen total de la inyección fue, en todos los casos, de 100 μ l y la suspensión vírica se realizó en PBS. Los grupos control negativo fueron tratados únicamente con inyecciones de 100 μ l de PBS. Durante las inyecciones los animales estuvieron bajo condiciones de anestesia con Isoflurano. Nuestro procedimiento experimental requirió de dos inyecciones o dosis virales más, siempre de 10^7 pfu/ml, en los 2 días consecutivos a la primera dosis intratumoral (Día 0 experimental). A partir del Día 0 se procedió a la medida del Volumen del Tumor cada 48 horas y cada 24 horas en fases avanzadas del estudio. Los datos obtenidos se usaron para el análisis cinético del crecimiento de los tumores así como para el estudio de la supervivencia de los grupos implicados en el estudio.

4.1. RESCATE DE LOS VIRUS RECOMBINANTES rNDV-B1, rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX.

4.1.1. ESTRATEGIA DE CLONACIÓN. GENERACIÓN DE LOS VECTORES

pNDV-B1/Fas y pNDV-B1/Fex.

Para la construcción de los plásmidos recombinantes que incorporarán las secuencias del receptor FAS y de la proteína quimérica FEX (FAS-extracelular\F-TMcyt), se desarrolló una estrategia de clonación que comprendió los pasos que se resumen en el esquema de la **Figura 21**.



S.C.G. TESIS 2012

FIGURA 21. ESQUEMA DEL PROCESO DE CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES pNDV-B1/Fas y pNDV-B1/Fex.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.1.1. GENERACIÓN DE LOS INSERTOS Fas y Fex (Fas-Nt).

Las secuencias Fas y Fex se obtuvieron mediante PCR (apartado 3.4.1.2) a partir del plásmido pL430 (apartado 3.3.4) que contiene la ORF para el receptor FAS. Para la amplificación de la ORF completa – secuencia Fas - se usaron los oligonucleótidos **FAS/NheI/FORWARD** y **FAS/NheI/REVERSE** y para la fracción extracelular (secuencia Fex) **FEX/SpeI/FORWARD** y **FEX/HpaI/REVERSE** (Tabla 7, pag.71), diseñados como se describe en el apartado 3.4.1.1.

La PCR se realizó siguiendo el protocolo y programa descrito en el apartado 3.4.1.2.1 y el producto de la reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa tal y como se describe en el apartado 3.4.1.3. Tras la comprobación de la presencia y tamaños de las secuencias (**Figura 22**), las bandas se purificaron a partir del gel (apartado 3.4.1.4) y se secuenciaron para verificar tanto la secuencia nucleotídica como la incorporación correcta de los sitios de restricción necesarios para la posterior clonación: dos sitios *NheI* flanqueantes en el caso de Fas y *SpeI* y *HpaI* para Fex.

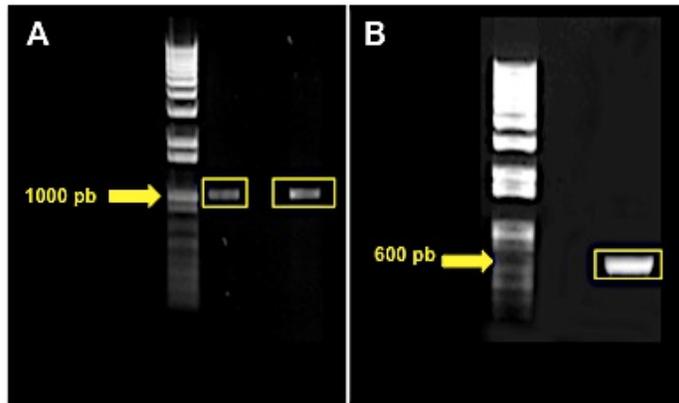


FIGURA 22. AMPLIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS Fas y Fex POR PCR. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

A. Amplificación de la secuencia Fas. Se marca la banda de 1000 pb como referencia. Tamaño de la banda amplificada: 1044 pb.

B. Amplificación de la secuencia Fex. Banda de referencia marcada: 600 pb (amarillo). Tamaño de la secuencia amplificada: 539 pb.

4.1.1.1.1. pNDV-B1/Fex.

4.1.1.1.1.1. CLONACIÓN DE Fex EN EL VECTOR LANZADERA pGEM-NDV-F\TMCyt.

Comprobada la secuencia y la incorporación de los sitios de restricción, todo el volumen de la PCR de Fex se purificó (apartado 3.4.2.2) y se procedió a digerirlo con las enzimas *SpeI* y *HpaI* según el protocolo descrito en el apartado 3.4.1.7. De este modo, se crearon los extremos *SpeI* y *HpaI* complementarios necesarios para la posterior inserción de la secuencia en el vector pGEM-NDV-F\TMCyt (**Figura 23**).

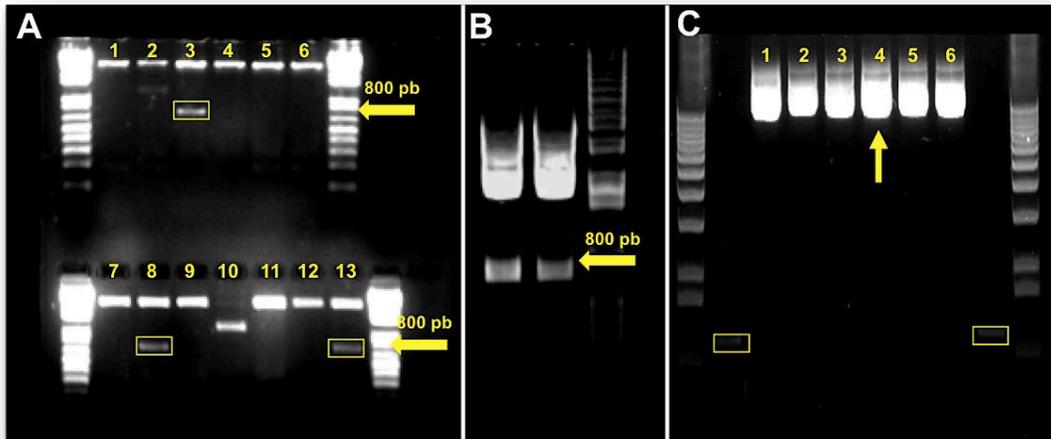


FIGURA 23. CLONACIÓN DEL INSERTO Fex. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

A. DIGESTIÓN CON *NheI* DEL DNA PLASMÍDICO EXTRAÍDO EN EL PROCESO DE CLONACIÓN DE Fex EN EL VECTOR LANZADERA pGEM-NDV-F\TMCyt. Material obtenido de colonias transformantes.

B. DIGESTIÓN PARA EXTRAER EL FRAGMENTO Fex\F-TMCyt DEL DNA PLASMÍDICO AMPLIFICADO A GRAN ESCALA Y PERTENECIENTE AL CLON 3.

C. DNA PLASMÍDICO DE LOS CLONES TRANSFORMANTES PARA pNDV-B1/Fex. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA. En el gel se muestran los plásmidos obtenidos de cada uno de los clones tras la amplificación a pequeña escala y a partir del clon 3. El Clon 4 (flecha amarilla) fue el único positivo verificado en este ensayo. En el primer y octavo carril se cargó una muestra del inserto Fex\F-TMCyt de 732 pb (enmarcado en amarillo). **Banda de referencia de 800 pb.**

Todo el volumen de digestión se sometió a electroforesis en gel de agarosa y se purificó la banda a partir del fragmento extraído de éste (apartado 3.4.1.4).

A continuación, se procedió a la clonación del inserto *SpeI-Fex-HpaI* en el vector lanzadera pGEM-NDV-F\TMCyt (apartado 3.3.2), siguiendo los pasos descritos a este fin en el punto 3.4.1.8 de Material y Métodos. Tras la transformación y crecimiento de las DH5 α , se extrajo el DNA plasmídico de las colonias transformantes (apartado 3.4.1.8.3), haciendo previamente una placa replica, y se sometió a una nueva digestión, esta vez con la enzima *NheI*. La digestión con *NheI* permitió extraer la secuencia Fex\F-TMCyt que codifica la información de la proteína quimérica, que denominaremos FEX, y que contiene el dominio extracelular de FAS y los transmembranal y citoplasmático de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

la proteína F del NDV. La digestión sirvió también como prueba discriminatoria entre los verdaderos y los falsos transformantes. El producto de la digestión de cada clon se cargó en un gel de agarosa, donde se descartaron aquellos transformantes para los que la digestión no reveló la presencia del inserto Fex\F-TMCyt de 732 pb. En los tres casos en los que se confirmó la existencia de la banda correcta, los plásmidos se secuenciaron usando los oligonucleótidos de secuencia interna **FAS/Sec/FORWARD y FAS/Sec/REVERSE** y los oligonucleótidos **T7 y SP6 (Tabla 8, pag.75)** que hibridan en los extremos del sitio de clonación del vector pGEM-NDV-FITMCyt.

De los tres clones *a priori* positivos (**Figura 23**), se eligió el número 3 tras valorar la secuenciación, siendo para éste más regular y óptima. A partir de la placa réplica se creció de nuevo para obtener a gran escala el DNA plasmídico siguiendo las pautas indicadas en el apartado 3.4.1.8.3. El plásmido se volvió a secuenciar para garantizar que este proceso de producción a gran escala no había modificado la secuencia clonada y se sometió de nuevo a digestión con la enzima *NheI*, para poder extraer el fragmento Fex/F-TMCyt de 732 pb. La cantidad obtenida fue suficiente para su uso en el siguiente paso de clonación en el vector pNDV-B1. Se purificó dos veces la banda del futuro inserto, a partir del gel de agarosa (apartado 3.4.1.4), para evitar posibles contaminaciones.

4.1.1.1.1.2. CLONACIÓN DE Fex\F-TMCyt EN pNDV-B1.

Para la clonación de la secuencia quimérica Fex\F-TMCyt y Fas, es necesario que éstas posean dos sitios *NheI* flanqueando sus extremos. Estos extremos *NheI* son complementarios a los *XbaI* del sitio de clonación del vector pNDV-B1, de modo que una vez reconstituido el dúplex, la secuencia resultante es híbrida y no permite el reconocimiento por ninguna de las dos enzimas. Esta complementariedad asegura una óptima clonación y estabilidad del inserto dentro del plásmido (**Figura 24**).

Como paso inicial, las dos secuencias a insertar se digirieron previamente con la enzima *NheI*. El protocolo seguido para la clonación se encuentra descrito en el apartado 3.4.1.8. En el ensayo que permitió conseguir el vector pNDV-B1/Fex-4 (clon 4) se obtuvo un bajo número de colonias transformantes, por lo que se optó por hacer un primer paso de amplificación del DNA plasmídico a pequeña escala para cada una de las colonias, preservando una copia en una placa replica de cada una de ellas (**Figura 23; C**)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

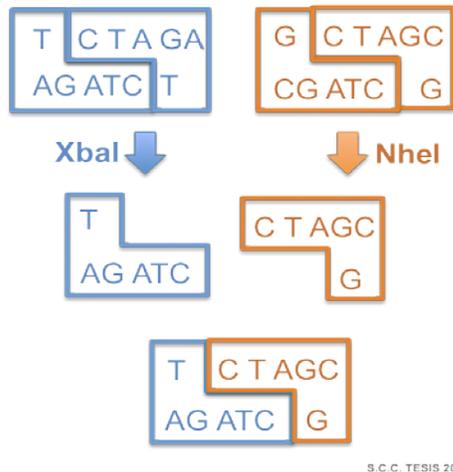


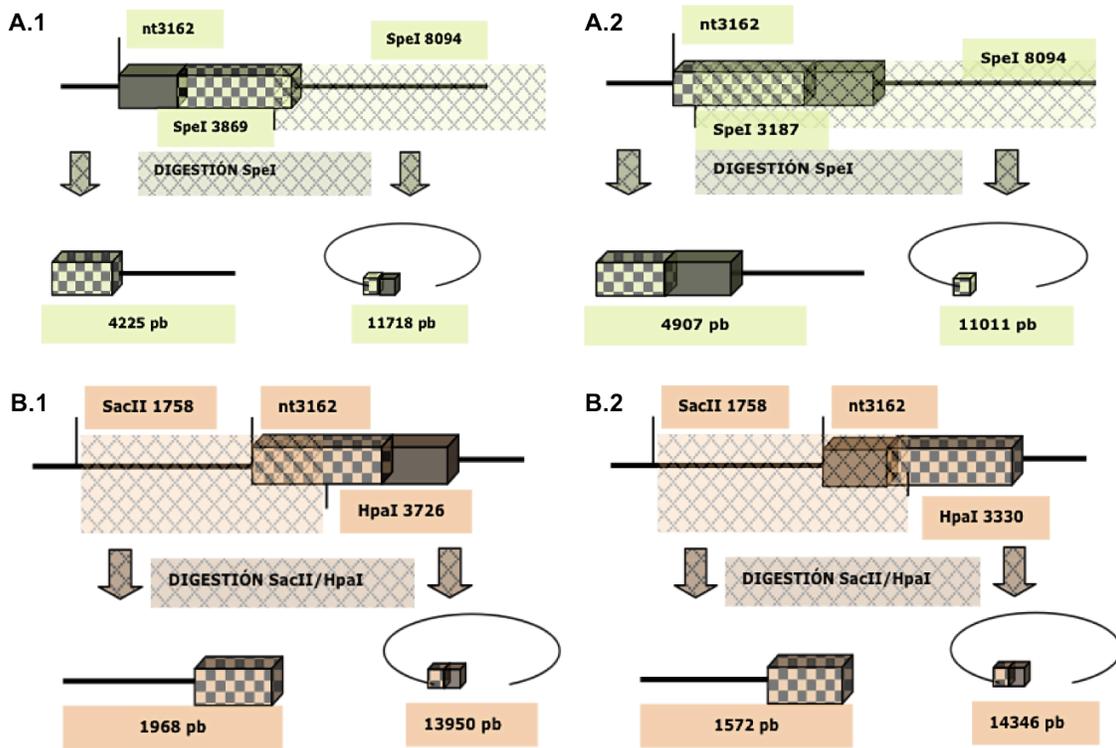
FIGURA 24. SECUENCIAS DE RECONOCIMIENTO PARA LAS ENZIMAS XbaI Y NheI. Se muestra como se generan extremos cohesivos mediante digestión y como se pierde el sitio de reconocimiento al reconstruirse el dúplex.

Una vez extraídos y comprobada su concentración y pureza (apartado 3.4.1.5), se procedió a discriminar los verdaderos positivos mediante dos ensayos con enzimas de restricción (apartado 3.4.1.7). En el primero, se realizó una doble digestión con las enzimas SacII y HpaI (**Figura 25; B.1 y B.2**). Si el inserto estaba clonado en el sentido correcto, la digestión debería presentar, como productos, dos bandas en el perfil electroforético del gel de agarosa: una banda de 1968 pb y otra de 13950 pb..

El segundo ensayo se realizó con la enzima SpeI (**Figura 25; A.1 y A.2**) la cual tiene un único sitio de corte en la secuencia plasmídica y en el inserto. Si el resultado es positivo deberían aparecer dos bandas: una de 4907 pb y la segunda de 11011 pb. Ambos resultados solo se obtuvieron para el clon 4 de este ensayo (**Figura 27; carriles 7 y 8**). El DNA plasmídico del Clon 4 se creció a gran escala (3.4.1.8.3), se purificaron (3.4.1.10) y se secuenció usando como oligonucleótidos pNDV/3102+, pNDV/3231- y los de secuencia interna de Fas, **Fas/Sec/Forward** y **Fas/Sec/Reverse** (**Tabla 8, pag.75**) verificando la estabilidad de la secuencia insertada y del vector.

4.1.1.1.2. CLONACIÓN DE Fas EN pNDV-B1.

La obtención de un número de colonias discreto hizo que se optara por un primer análisis por PCR sobre bacteria para así descartar los clones que no hubieran incorporado el inserto. Siguiendo los pasos señalados en el apartado 3.4.1.9 y usando como oligonucleótidos el pNDV/3102+ y el interno a la secuencia de Fas, **FAS/Sec/REVERSE** (**Tabla 8, pag.75**), la secuencia a amplificar sería de 571 pb.



S.C.C. TESIS 2012

FIGURA 25. DISEÑO DEL ENSAYO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN PARA LA VALIDACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES pNDV-B1/Fex.

Para cada ensayo se ilustra la posición del inserto en el vector, ya sea en la orientación adecuada como en la invertida. Del mismo modo se señala la posición de los sitios de reconocimiento de las enzimas usadas en cada ensayo y los fragmentos que se esperan obtener en cada uno de los casos.

A.1 y A.2. Ensayo de restricción para la validación de pNDV-B1/Fex con la enzima SpeI

A.1 Resultado para clonación en sentido correcto. A.2 Resultados para la clonación en sentido invertido del inserto.

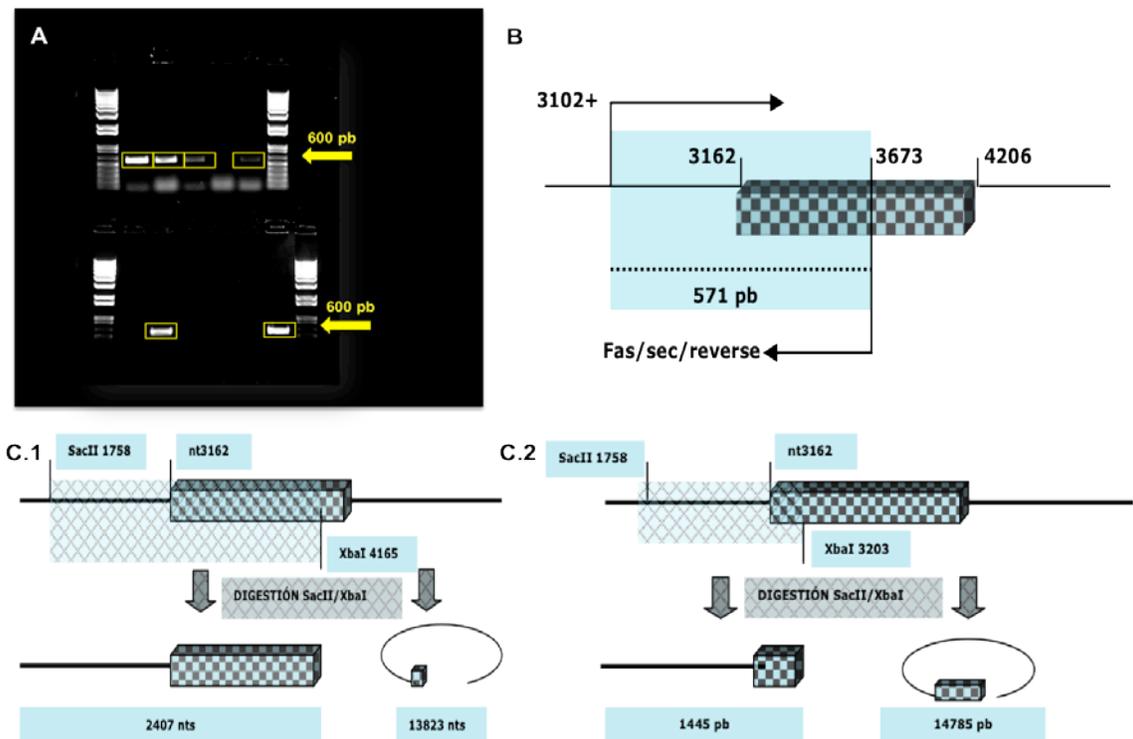
B.1 y B.2, Ensayo de restricción con SacII y HpaI. B.1: clonación en sentido adecuado; B2. Clonación en sentido opuesto

La PCR sobre bacteria puede discriminar entre aquellos clones que han incorporado el inserto en el sentido correcto pero, en este caso, una inserción en sentido contrario nos daría una amplificación de 593 pb, no diferenciable con exactitud de la banda de 571 pb que aparecería en el perfil electroforético en el caso de que el inserto estuviera clonado en el sentido correcto (**Figura 26; B**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Así pues, los clones que inicialmente se consideraron positivos, por presentar una amplificación aproximada a 600 pb (**Figura 26; A**), se crecieron a pequeña escala, tomando las muestras correspondientes de la placa replica y se purificó el DNA plasmídico (apartado 3.4.1.8.3).

Tras comprobar la concentración y pureza del material extraído, se diseñó un análisis con enzimas de restricción para validar los positivos (**Figura 26; C1 y C2**). En el caso de Fas, se realizó una doble digestión con las enzimas SacII y XbaI.



S. C. C. TESIS 2012

FIGURA 26. CLONACIÓN DE Fas EN pNDV-B1.

A. PCR sobre bacteria. Electroforesis en gel de agarosa; se numeran los clones analizados así como se señala, enmarcada en rojo, la banda amplificada en los casos positivos. Banda de referencia del marcador: 600 pb.

B. Esquema de la disposición de los oligonucleótidos dentro del vector y tamaño de la secuencia a amplificar por PCR sobre bacteria.

C. Esquemas ilustrativos del ensayo de restricción para la validación de pNDV-B1/Fas con enzimas SacII y XbaI. C.1. Resultado para clonación en sentido correcto. C.2 Resultados para la clonación en sentido invertido del inserto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Si la clonación era positiva y en el sentido correcto deberíamos obtener dos bandas en el perfil electroforético: una de 13866 pb y una de 2405 pb. Este resultado solo se confirmó en el caso de los clones 7 y 11 (**Figura 27**) los cuales seguidamente se crecieron para obtener el DNA plasmídico a gran escala (3.4.1.8.3) y luego se purificaron (3.4.1.10).

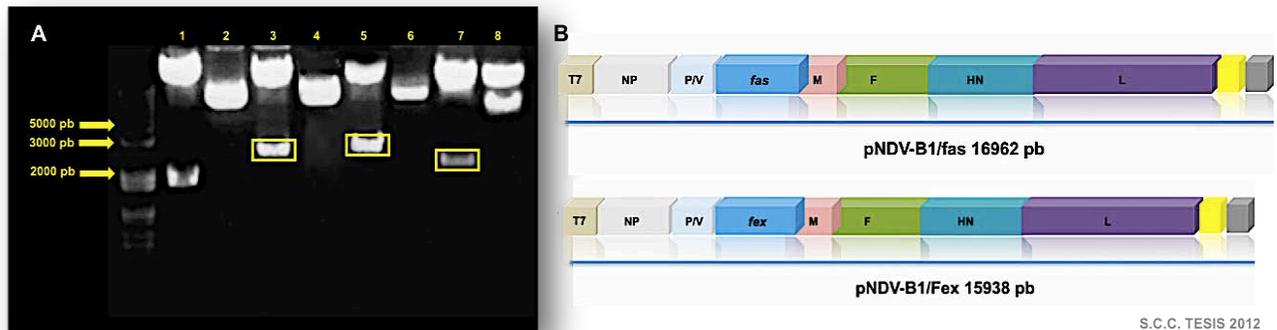


FIGURA 27. VALIDACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES pNDV-B1/Fas y pNDV-B1/Fex
A. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA. RESULTADOS DE LAS DIGESTIONES DE LOS PLÁSMIDOS pNDV-B1/Fas 7 y 11 y pNDV-B1/Fex 4. Se indican los pesos moleculares de las bandas del marcador que se toman como referencia para validar el resultado. Enmarcadas en amarillo, las bandas producto de las digestiones que validan los vectores.

1. Vector linealizado pNDV-B1 digerido con *SacII* y *XbaI*: la banda que aparece deriva del corte de la enzima *SacII*.
 2. pNDV-B1/Fas 7 sin digerir.
 3. Digestión de pNDV-B1/Fas 7 con *SacII* y *XbaI*.
 4. pNDV-B1/Fas 11 sin digerir.
 5. Digestión pNDV-B1/Fas 11 con *SacII* y *XbaI*.
 6. Vector pNDV-B1/Fex sin digerir.
 7. pNDV-B1/Fex 4 digerido con *SacII* y *HpaI*.
 8. pNDV-B1/Fex 4 digerido con *SpeI*.
- B. ESQUEMA DE LAS CONSTRUCCIONES pNDV-B1/Fas y pNDV-B1/Fex.**

4.1.2. SECUENCIACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES pNDV-B1/Fas y pNDV-B1/Fex.

Tras la extracción del material plasmídico para los clones 7 y 11 de Fas y el 4 para Fex y la valoración de su concentración y pureza, los plásmidos se secuenciaron usando como cebadores los oligonucleótidos **pNDV/3102+**, **pNDV/3231-** y los de secuencia interna de Fas, **Fas/Sec/Forward** y **Fas/Sec/Reverse (Tabla 8, pag.75)**. Para cada clon se realizaron cuatro reacciones con el fin de cubrir toda la longitud de la secuencia clonada así como parte de la plasmídica. Cada reacción tuvo un volumen final de 8 µl en los que 5 µl se corresponderán con la muestra plasmídica (400-600 ng de DNA) y los 3 restantes serán los correspondientes al cebador que se usará en la reacción (máxima cantidad 3 pmoles). Para cada clon se obtuvieron cuatro secuencias que se procesaron usando el programa Codon Code Aligner v.1.6.3.



FIGURA 28. SECUENCIA Fas EN EL VECTOR pNDV-B1/Fas. Se destacan el codón de inicio y finalización en rojo subrayado. La secuencia de bases en color se corresponde a la incorporada al inserto para poder llevar a cabo la clonación (apartado 3.4.1.1). En negro la secuencia nucleotídica correspondiente a la ORF de Fas.

```

                                TCTAGCTTAGAAAAAATACGGGTAGAAC 28
ACTAGTCCGCCACCATGCTGGGCATCTGGACCCTCCTACCTCTGGTTCTTACGTCTGTTG 88
CTAGATTATCGTCCAAAAGTGTTAATGCCCAAGTGACTGACATCAACTCCAAGGGATTGG 148
AATTGAGGAAGACTGTTACTACAGTTGAGACTCAGAACTTGGAAGGCCTGCATCATGATG 208
GCCAATTCTGCCATAAGCCCTGTCCCTCCAGGTGAAAGGAAAGCTAGGGACTGCACAGTCA 268
ATGGGGATGAACCAGACTGCGTGCCCTGCCAAGAAGGGAAGGAGTACACAGACAAAGCCC 328
ATTTTTCTTCCAAATGCAGAAGATGTAGATTGTGTGATGAAGGACATGGCTTAGAAGTGG 388
AAATAAACTGCACCCGGACCCAGAATACCAAGTGCAGATGTAAACCAAACCTTTTTTTGTA 448
ACTCTACTGTATGTGAACACTGTGACCCTGCACCAAATGTGAACATGGAATCATCAAGG 508
AATGCACACTCACCAGCAACACCAAGTGCAAAGAGGAAGGATCCAGATCTAACGTTAACC 568
CTCATTACCTATATCGTTTTBACTATCATATCTCTTGTTTTTGGTATACTTAGCCTGATT 628
CTAGCCTGATTCTAGCATGCTACCTAATGTACAAGCAAAGGCGCAACAAAAGACCTTAT 688
TATGGCTTGGGAATAATACCCTAGATCAGATGAGAGCCACTACAAAAATGTGATAAGCTA 748
GA 750

```

FIGURA 29. SECUENCIA Fex EN EL VECTOR pNDV-B1/Fex. En negro, la secuencia del dominio extracelular de FAS. El dominio transmembrana de F aparece en verde claro y el citoplasmático en verde oscuro. Los codones de inicio y finalización se muestran en rojo subrayado. La secuencia híbrida *Xba*//*Nhe*I aparece subrayada en los extremos de la secuencia. El resto de nucleótidos en color son secuencias añadidas durante el proceso de clonación (apartado 3.4.1.1).

4.1.3. RESCATE DE LOS VIRUS RECOMBINANTES rNDV-B1, rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX.

Las construcciones obtenidas en el apartado anterior se usaron para rescatar los virus recombinantes rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX tal y como se describe en el apartado 3.4.2, realizándose por triplicado para cada uno de vectores obtenidos. En el caso de las construcciones para Fas, se usó el pNDV-B1/Fas 11 ya que el resultado de su secuenciación fue mejor que para el clon 7. Paralelamente, se procedió a rescatar el virus recombinante rNDV-B1 a partir del plásmido pNDV-B1 y siguiendo el mismo procedimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El virus rNDV-B1 se usará como control en las sucesivas pruebas realizadas con los recombinantes, puesto que las únicas modificaciones que posee en su genoma, en comparación con el virus nativo, son los sitios de restricción que se incorporaron para poder facilitar su uso como vector de expresión de proteínas foráneas. El recombinante rNDV-B1 se comporta en todo momento como el virus nativo NDV-B1.

El desarrollo del rescate se realizó siguiendo todos los pasos descritos en el apartado 3.4.2. La confirmación del rescate de los recombinantes se realizó mediante inmunofluorescencia sobre células infectadas (3.4.2.6). Se preparó una placa con células Vero que fueron infectadas con el líquido alantoideo preservando un pocillo sin infectar para tener un control negativo. Esta placa se mantuvo 24 horas antes de proceder a la fijación de las células y al marcaje con los anticuerpos. Se siguieron los pasos citados en el apartado 3.4.3.2 usando un anticuerpo primario policlonal anti-NDV y un secundario frente inmunoglobulina de conejo, marcado con el fluoróforo AlexaFluor-488, que emite fluorescencia verde (**Figura 30**).

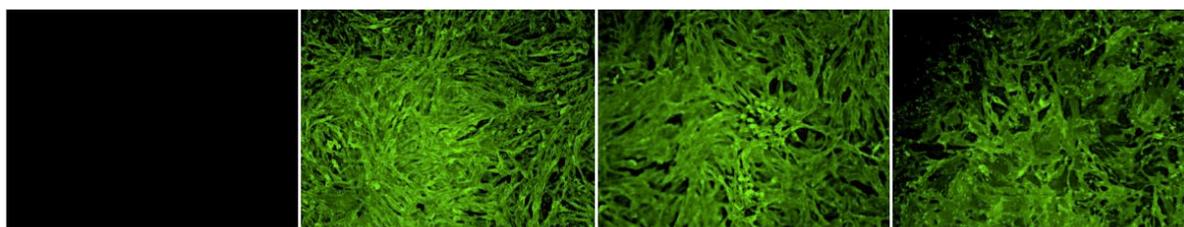
Tras la validación del rescate los virus se crecieron de nuevo en huevos embrionados, purificados en gradiente de tartrato potásico y titulados tal y como se describe en los apartados 3.4.2.4 y 3.4.2.7.

4.1.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS VIRUS RECOMBINANTES.

4.1.4.1. CAPACIDAD REPLICATIVA DE LOS VIRUS: CINÉTICA DEL CRECIMIENTO.

El primer paso en la caracterización de los virus rescatados fue comprobar su capacidad replicativa. Para ello células Vero fueron infectadas con los virus rNDV-B1, rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX a una m.o.i de 0.01 realizándose la evaluación del crecimiento del virus a tiempos de 0, 24, 32, 48 y 64 horas post-infección, tal y como se indica en el apartado 3.4.4.3.

Los resultados muestran que los virus rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX tienen una cinética de replicación muy semejante a la del rNDV-B1 (**Figura 31**). Las curvas de crecimiento muestran que, para todos los virus, la duración del ciclo de replicación en células Vero será próxima a las 24 horas, observándose picos de crecimiento o de producción de viriones a 24 y 48 horas.



MOCK

rNDV-B1/FAS

rNDV-B1/FEX

rNDV-B1

FIGURA 30. RESCATE DE VIRUS RECOMBINANTES.
PARTE SUPERIOR: ESQUEMA DEL PROCESO DE RESCATE.
PARTE INFERIOR: INMUNOFLUORESCENCIA PARA LA VALIDACIÓN DEL RESCATE DE LOS VIRUS RECOMBINANTES. Línea celular usada: células Vero. Anticuerpo primario policlonal anti-NDV; anticuerpo secundario frente a inmunoglobulina de conejo marcado con Alexafluor-488. Imágenes tomadas con el objetivo 10X.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

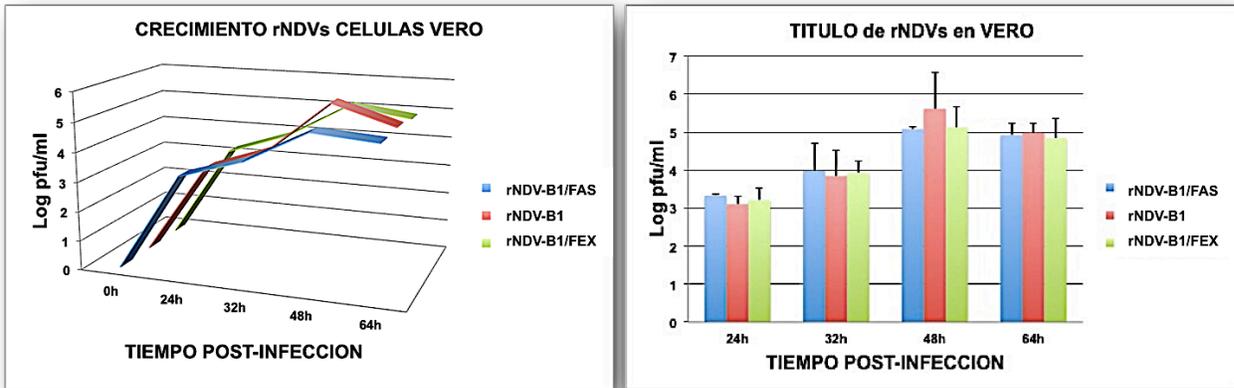


FIGURA 31. CAPACIDAD REPLICATIVA DE LOS VIRUS rNDV-B1, rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX EN CÉLULAS VERO.

Izquierda: Curvas de crecimiento o cinética de la replicación. Se representa la variación del título, expresado como el logaritmo decimal de las pfu/ml, frente al tiempo transcurrido de infección, en horas

Derecha: niveles de producción de viriones obtenidos para cada uno de los virus expresados como logaritmo decimal de las pfu/ml.

Las barras de error muestran la desviación estándar dentro de cada grupo.

Azul: rNDV-B1/FAS. **Rojo:** rNDV-B1. **Verde:** rNDV-B1/FEX.

El rNDV-B1 demuestra una mayor capacidad replicativa transcurridas 48 horas desde la infección: mientras que los títulos obtenidos tras 24 y 32 horas de infección son semejantes en los tres casos, se observa que a partir de las 48 horas los virus rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX no incrementan su población, apareciendo en la curva de estos una fase de meseta. Sin embargo el rNDV-B1 no empieza a reducir la producción de viriones hasta pasadas las 48 horas, momento en el cual los niveles de producción pueden alcanzar valores próximos a 10^7 pfu/ml, dos órdenes de magnitud más que los alcanzados por el rNDV-B1/FAS y el rNDV-B1/FEX. Esta diferencia entre los tres virus puede estar relacionada con el escaso efecto citopático que el rNDV-B1 ejerce sobre las células Vero, a diferencia de los otros dos recombinantes y especialmente en el caso del virus rNDV-B1/FAS, en cuyas placas se detectó mayor número de células en suspensión. La relevancia de esta observación será desarrollada en profundidad en el apartado

4.2.4.1.4.2. ESTABILIDAD DE LOS INSERTOS Fas y Fex EN LOS VIRUS RESCATADOS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de caracterizar estabilidad de los insertos se procedió a diseñar un ensayo de RT-PCR partiendo del RNA extraído de células infectadas. El procedimiento se realizó siguiendo las pautas ya desarrolladas en el apartado 3.4.3.1.1. En este caso se usó como virus control el virus rNDV-B1/GFP que expresa la proteína verde fluorescente (**GFP, Green Fluorescence Protein**) por dos motivos: el rNDV-B1/GFP es un virus ya caracterizado, con una secuencia estable e insertada del mismo modo que Fas y Fex en el genoma del virus, por lo que identificar su inserto nos serviría como control de la RT-PCR, y la expresión de la secuencia inserto conlleva la producción de la proteína verde fluorescente GFP lo cual, y teniendo en cuenta que las infecciones de los tres virus se realiza a m.o.i de 1, nos serviría como referencia del progreso de la misma.

Se extrajo el RNA total de las células infectadas y se sometió a retrotranscripción para generar el cDNA correspondiente a los insertos, usando como cebadores los *primers* **pNDV/3102+** y **pNDV/3231-** (**Tabla 8, pag.75**) que hibridan cerca del sitio de clonación. De este modo aseguramos que el cDNA generado por retrotranscripción se corresponde con el de los insertos. En la fase de PCR para la amplificación del cDNA obtenido se incorporó una quinta reacción que contenía como material de partida el plásmido pNDV-B1/Fas 11.

Se usó el clon 11 porque ya se había validado mediante secuenciación y se sabía que los cebadores hibridarían correctamente y se produciría amplificación durante la PCR.

Como cabía esperar, la muestra control negativo (**Figura 32; carril 2**) no mostró amplificación ninguna, no sucediendo así con el control positivo de PCR, para el que se obtuvo la banda de 1173pb que corresponde a la amplificación de la secuencia comprendida entre los dos *primers* (**Figura 32; carril 1**). Esta banda aparece también en la muestra que corresponde al producto de la infección con el rNDV-B1/FAS (**Figura 32; carril 3**).

Para las muestras de rNDV-B1/FEX y rNDV-B1/GFP también apareció una sola banda de amplificación, que se corresponde con la banda del inserto pero con un tamaño de 129 pb más del esperado, que es lo que se incrementa al usar los *primers* **pNDV/3102+** y **pNDV/3231-** para amplificar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez validada la estabilidad del inserto dentro del genoma, faltaba comprobar la estabilidad de la secuencia de nucleótidos de los insertos en los virus rescatados. Para ello se cargó todo el producto de la RT-PCR de las muestras de los virus rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX en un nuevo gel de agarosa y se sometió a electroforesis. Se purificaron las bandas del gel (3.4.1.4) y se midió la concentración (3.4.1.5). Para la secuenciación de las muestras purificadas, se prepararon dos reacciones usando los *primers* **FAS/Sec/REVERSE** y **FAS/Sec/FORWARD** (3.4.1.6). Los resultados de la secuenciación no mostraron modificación alguna en la secuencia de nucleótidos de los insertos Fas y Fex.

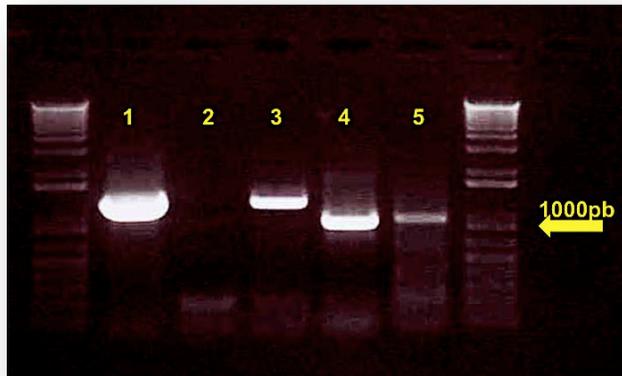


FIGURA 32 .ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LAS SECUENCIAS Fas y Fex. RT-PCR.

Electroforesis en gel de agarosa para los productos de RT-PCR obtenidos desde el material de células infectadas con los virus rNDV-B1/FAS, rNDV-B1/FEX y rNDV-B1/GFP. Se señala la banda de 1000 pb como referencia en el marcador de peso molecular.

- 1. Control positivo: PCR sobre pNDV-B1/FAS.**
- 2. Control Negativo: Células sin infectar.**
- 3. Muestra rNDV-B1/FAS.**
- 4. Muestra rNDV-B1/FEX.**
- 5. Muestra rNDV-B1/GFP.**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.4.3. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS FAS Y FEX EN CÉLULAS INFECTADAS.

4.1.4.3.1. INMUNODETECCIÓN Y VISUALIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

Para constatar la expresión de las secuencias insertadas y la producción de las proteínas que codifican, se procedió a realizar un ensayo de infección de células Vero e inmunodetección de proteínas para su visualización mediante microscopia de fluorescencia. Se infectaron células Vero durante 24 horas con los virus rNDV-B1, rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX, tal y como se ha descrito en el apartado 3.4.3.2.1. Como muestran los resultados recogidos en la **Figura 33**, no se produjo inmunodetección de FAS o de la quimera FEX ni en los controles (MOCK) ni en las células infectadas por el rNDV-B1. En el caso de los virus rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX se aprecia una intensa señal perteneciente a las proteínas así como se detecta su ubicación prevista a nivel de la membrana citoplasmática. Como se advierte en las imágenes tomadas con un objetivo 40X, sólo las células que son infectadas por los recombinantes son capaces de expresar el gen y sintetizar las proteínas. Este hecho es especialmente relevante en el caso de FAS, ya que descarta una posible expresión del gen del receptor propio de la célula, como respuesta a la infección.

La intensidad de la señal procedente de las proteínas es consecuencia de la posición donde están clonados los insertos Fas y Fex en el *full lenght* (entre las secuencias de P y M): el orden en que se encuentran los seis genes del NDV es el mismo en el que se transcriben los mRNA; el número de transcritos que se genera para cada secuencia es proporcional al número de proteínas de cada tipo que necesitará para producir virus completos. FAS y FEX se sintetizan a un nivel semejante a como lo hacen P y M. Esta elevada capacidad de expresión valida a nuestros recombinantes como excelentes vectores para producir las proteínas foráneas en un sistema celular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

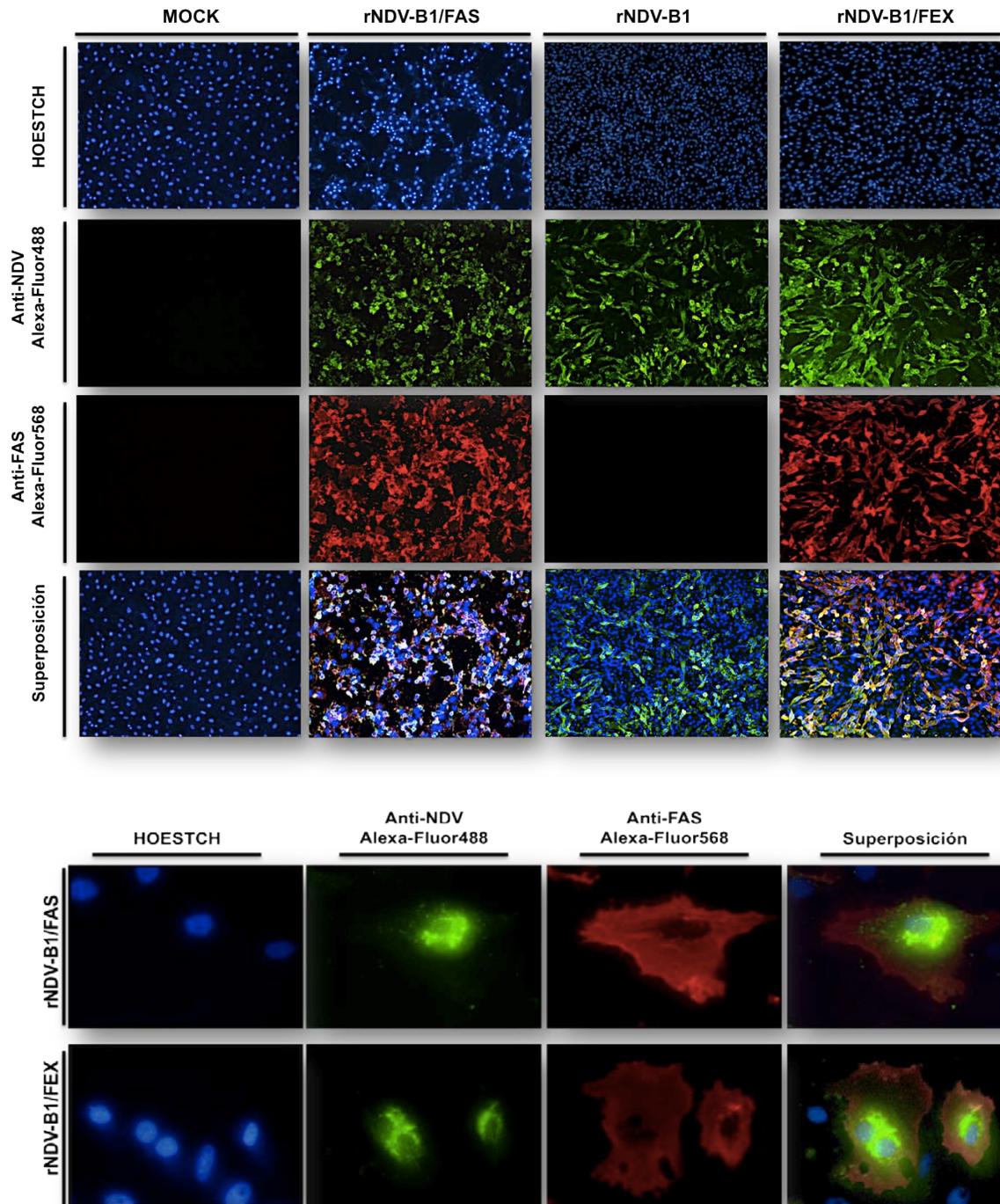


FIGURA 33. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS VÍRICAS.

Células Vero infectadas por los virus rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX. Inmunofluorescencia realizada 24 horas post-infección. En el margen superior se detallan los anticuerpos primario y secundario usados. **Rojo**: señal para el receptor FAS y la proteína química FEX (FAS-Nt). **Verde**: proteínas del virus. **Azul**: Núcleos.

Parte superior: imágenes tomadas usando el objetivo 10X. **Parte inferior**: imágenes tomadas usando el objetivo 40X.

4.1.4.3.2. INMUNODETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS FAS Y FEX EN EXTRACTOS CELULARES.

Quisimos comprobar la producción de las proteínas FAS y FEX a partir de extractos proteicos procedentes de células infectadas. Para ello procedimos a infectar células Vero con los virus rNDV-B1/FAS, rNDV-B1/FEX y rNDV-B1/GFP, éste último usado como control, durante 24 horas y a una multiplicidad de infección de 1.

La elección del virus rNDV-B1/GFP como control volvió a tener una doble función: puesto que el inserto GFP está clonado de la misma forma y posición que las secuencias Fas y Fex, la detección mediante microscopía de la fluorescencia emitida por la proteína, nos ayudaría a estimar en qué momento las proteínas recombinantes víricas estaban siendo sintetizadas. Además, al ser un virus recombinante, también nos ayudaría a descartar que la expresión del receptor FAS pudiera estar vinculada con a la manipulación genética del virus, es decir, que los virus recombinantes pudieran estar influyendo de alguna manera en la expresión del FAS celular. La infección con los virus recombinantes se llevó a cabo tal y como está descrito en el apartado 3.4.3.2.1.

La extracción de proteínas totales celulares se realizó siguiendo las pautas descritas en el apartado 3.4.3.2.2. La incubación de las membranas se hizo con el anticuerpo monoclonal anti-NP, la proteína más abundante de la nucleocápsida del virus y a partir de la cual podemos valorar si la tasa de replicación de los tres virus ha sido semejante (**Figura 34;B**). Para localizar la proteína FAS y su quimera FEX se utilizó el anticuerpo policlonal anti-FAS SC-714 que se une a nivel del extremo N-terminal del receptor, permitiendo detectar tanto al receptor FAS como a la quimera. Ambas proteínas fueron detectadas en las células infectadas por los virus rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX (**Figura 34;C**).

Como esperábamos, FAS se detectó a nivel de la banda del marcador de 40 kDa mientras que FEX presentó un peso molecular un poco inferior. Ninguna de las dos bandas apareció en las muestras infectadas con el recombinante que expresa el gen para la GFP ni en las células control (MOCK), las cuales se sometieron a los mismos procedimientos experimentales que conlleva una infección.

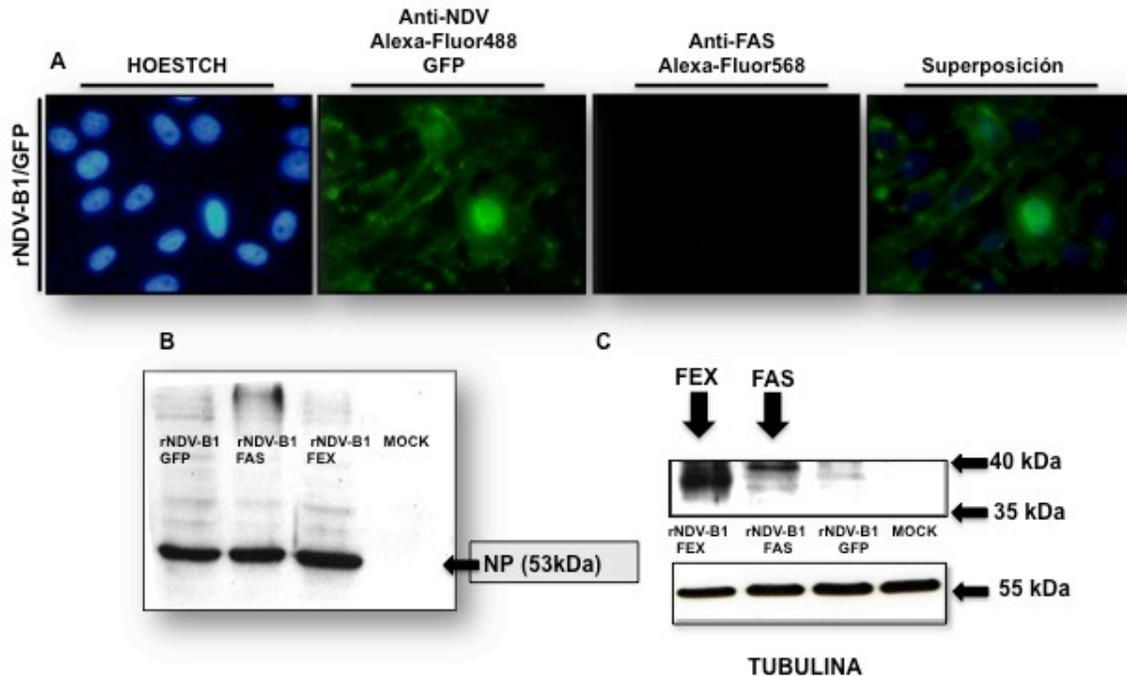


FIGURA 34. INMUNODETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS FAS Y FEX EN EXTRACTOS CELULARES.

A. Células Vero infectadas con el virus rNDV-B1/GFP. Azul: núcleos. Verde: señal procedente de las proteínas víricas y de la GFP. El objetivo usado en la captación de las imágenes fue de 40X.

B. Western blot para la detección de la proteína vírica NP en extractos procedentes de células Vero infectadas. Anticuerpo monoclonal anti-NP.

C. inmunodetección de las proteínas FAS y FEX. Western blot realizado con el anticuerpo anti-FAS SC-714.

4.1.4.3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS VIRIONES DE LOS VIRUS RECOMBINANTES RESCATADOS

La envoltura del NDV deriva de la membrana de la célula en la que se replica. Considerando el hecho de que tanto el receptor FAS como la proteína quimérica FEX son expresadas por la célula e insertadas en su membrana, quisimos comprobar si los virus serían capaces de incorporarlas a su envoltura.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

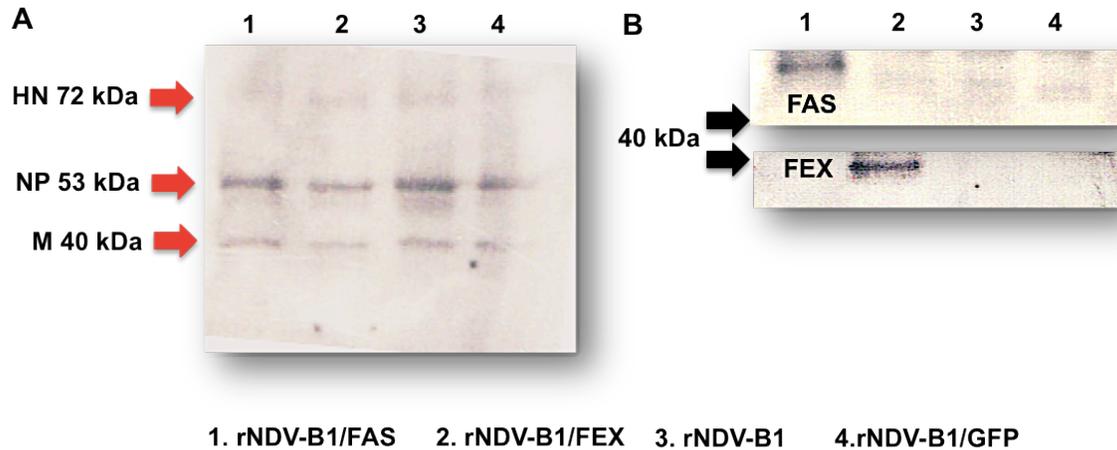


FIGURA 35. DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS FAS Y FEX EN LOS VIRIONES DE LOS VIRUS RESCATADOS. WESTERN BLOT.

A. Inmunodetección de las proteínas víricas sobre extractos de virus purificados. Anticuerpo primario policlonal anti-NDV. Anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina de conejo.

B. Inmunodetección de las proteínas FAS y FEX sobre extractos de virus purificados. Se usaron los anticuerpo policlonaes anti-FAS SC-714 y anti-FAS (C18C12) para la detección de FEX y FAS, respectivamente.

Procedimos a hacer un estudio del perfil proteico de los virus rescatados, siguiendo las mismas pautas en el caso de proteínas celulares, pero en este caso las muestras fueron virus purificados, procedentes de nuestro *stock*.

Tanto la proteína FAS como su quimera FEX parecen ser incorporadas a las membranas de los viriones nacientes (**Figura 35**). La inclusión de FEX parece lógica teniendo en cuenta que la parte citoplasmática de FEX es la de la proteína de fusión F del virus y que la interacción con las proteínas F y HN con la proteína M son indispensables para que se produzca el ensamblaje y la liberación del virión (García-Sastre *et al.*, 1990). La incorporación de FAS seguramente sea un hecho circunstancial debido a su elevada expresión a nivel de la membrana citoplasmática. Este comportamiento ya se ha visto en virus recombinantes generados en nuestro laboratorio que expresan la proteína humana Endoglina donde el virión era capaz de incorporarla a su envoltura.

4.2. CAPACIDAD APOTÓTICA DE LOS VIRUS rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX.

4.2.1. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS FAS Y FEX EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES.

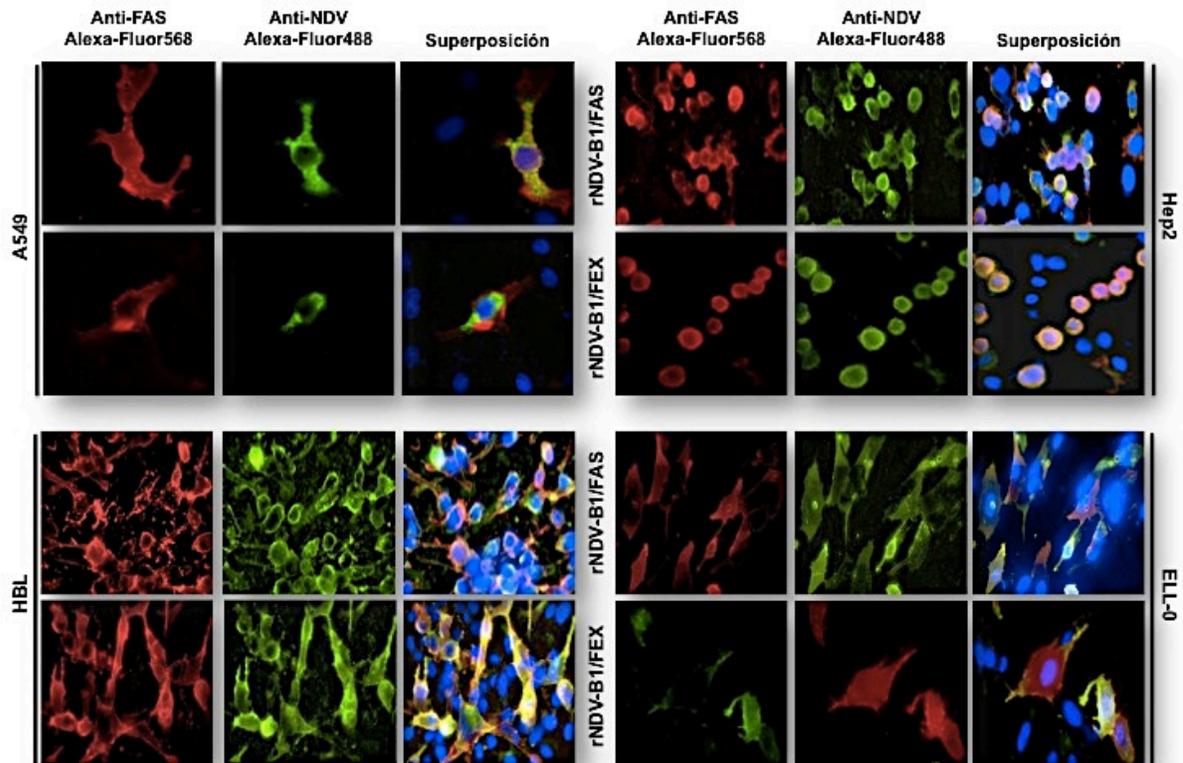


FIGURA 36. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS FAS Y FEX DURANTE LA INFECCIÓN DE DIFERENTES LÍNEAS CELULARES.

Inmunofluorescencia sobre células de las líneas A549, HBL, Hep2 y ELL-0 infectadas con los recombinantes rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX (24 horas post-infección, m.o.i de 1). En el margen superior se detallan los anticuerpos primario y secundario usados.

Rojo, señal para el receptor FAS y la quimera FEX. **Verde**, señal correspondiente a las proteínas nativas del virus. **Azul**, señal del reactivo Hoescht usado para el contraste nuclear. Las imágenes se tomaron con un microscopio de fluorescencia invertido, usando el objetivo de 40X.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante la caracterización de los virus rescatados, pudimos observar que los niveles de expresión de la proteína FAS y de la quimera FEX, en las células infectadas, son bastante significativos. La localización de las proteínas a nivel de la membrana citoplasmática es signo de que el virus no solamente funciona como un excelente vector de expresión de las mismas sino que las modificaciones post-traduccionales necesarias para su translocación a la membrana se producen de forma correcta. Bajo esta premisa quisimos comprobar si este rasgo sería general en otras líneas celulares diferentes a la línea Vero, usada en la primera parte del trabajo. El *screening* se llevó a cabo en células de origen aviar (línea celular ELL-0), células cancerígenas de origen humano (HeLa, Hep2, HBL y A549) y murino (B16-F10) (**Tabla 4, material y métodos**). La localización de las proteínas se llevó a cabo tras 24 horas post-infección (m.o.i de 1) inmunodetectando las proteínas y visualizándolas mediante microscopía de fluorescencia (3.4.3.2.1). Como podemos observar en las **Figuras 36, 38 y 40**, todas ellas mostraron elevados niveles de producción tanto del receptor FAS como de la proteína quimérica FEX durante el ciclo de replicación del virus, no apareciendo señal para ninguna de ellas en las células no infectadas. Ninguna de las líneas expresaron FAS ni de forma endógena, ni en respuesta a la infección con el virus rNDV-B1 (**Figura 37**).

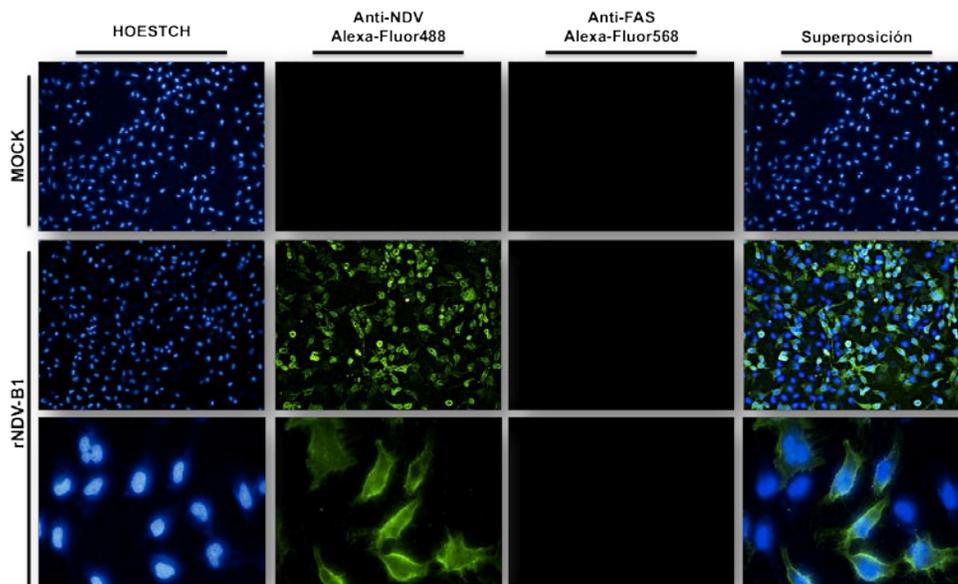


FIGURA 37. CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE FAS EN CÉLULAS HeLa.

Inmunofluorescencia para la detección del receptor FAS y proteínas víricas (24 horas post-tratamiento (rNDV-B1 m.o.i de 1).

Parte superior: Control MOCK. Objetivo10X.

Parte inferior: infección con NDV-B1. Objetivos 10X (superior) y 40X (inferior).

4.2.1.1. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR FAS EN CÉLULAS HeLa.

En el caso de las células infectadas con el recombinante rNDV-B1/FAS se detectan elevados niveles de FAS en la membrana citoplasmática, colocalizando con las glicoproteínas del virus. La señal de FAS se localiza con mayor intensidad en lo que parecen ser zonas de máxima acumulación del receptor o *clusters*. Esta localización nos hace suponer que estas secciones de la membrana se corresponden con los *rafts* lipídicos (Mollinedo y Gajate, 2006) los cuales son la localización predominante descrita para este TNFR cuando se encuentra en el nivel PLAD de agregación o fase de ensamblaje pre-ligando. En el segundo nivel de agregación de FAS a nivel de membrana se produce una estabilización del receptor, generalmente tras la interacción con su ligando, y que corresponden al estadio previo a su internalización (Tchikov et al., 2011). Las células infectadas con el recombinante rNDV-B1/FAS presentan zonas de acumulación del receptor con un perfil a modo de *spots* distribuidos por toda la membrana. Estas formaciones pueden corresponderse con las plataformas previas a la endocitosis del receptor necesarias para el segundo nivel de activación.

La presencia de FAS en el citoplasma, en el compartimento endosómico, supone un segundo nivel de activación de la cascada de señalización o amplificación mediada por el receptor. Aunque las imágenes tomadas con el microscopio de fluorescencia invertido parecen evidenciar que existe una localización citoplasmática, fue necesario llevar a cabo su visualización mediante microscopía confocal, la cual nos permitió visualizar y analizar diferentes planos o niveles de profundidad en la estructura celular. Como se muestra en la **Figura 39**, FAS no solo se localiza a nivel de la membrana sino también en el compartimento endosómico. Esta evidencia confirma que en nuestro modelo, la expresión del receptor FAS durante el ciclo de replicación del virus sigue todas las pautas de localización celular necesarias para que se pueda producir una activación del programa de muerte celular por apoptosis: localización en la membrana, acumulación del receptor en *clusters*, formación de las plataformas pre-endocitosis o *spots* y localización en el compartimento endosómico. Si la ruta de inducción de apoptosis está activa, esto supone además una serie de cambios morfológicos en la célula con una importante relevancia a nivel nuclear. Como se muestra en la **Figura 38**, tras 24 horas las células infectadas con el virus rNDV-B1/FAS muestran una morfología redondeada, típica de las modificaciones a nivel de membrana que implican pérdida de adherencia a

nivel de sustrato. Los núcleos de éstas muestran una marcada condensación del material genético lo cual es síntoma de una apoptosis ya avanzada.

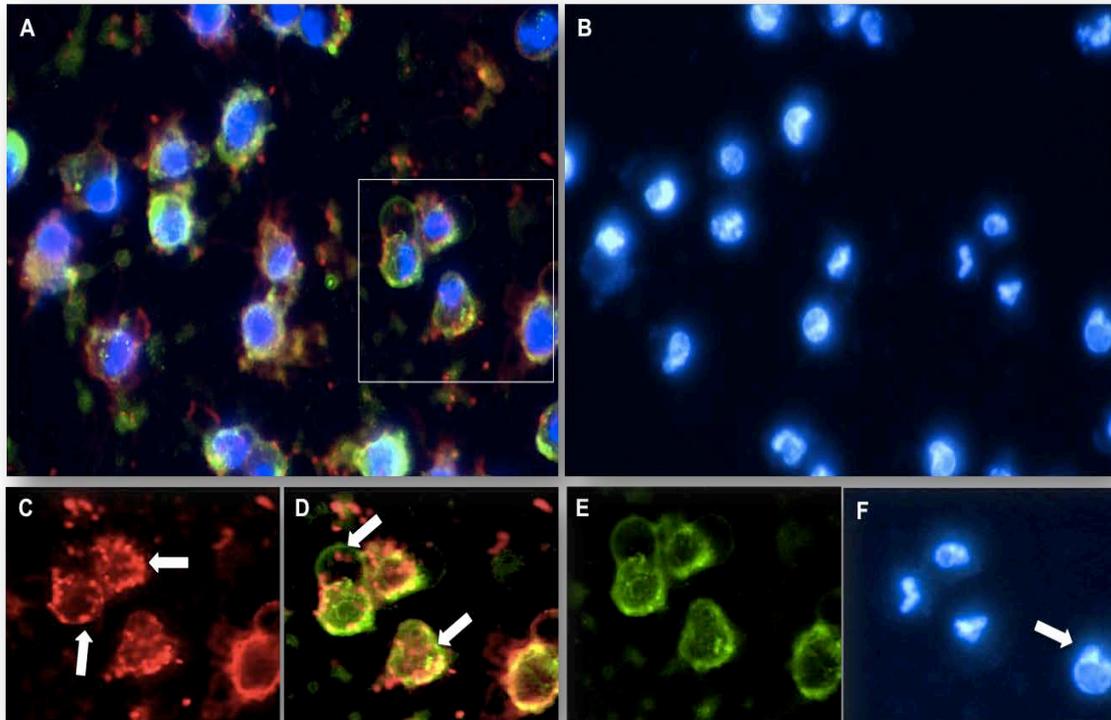


FIGURA 38. CÉLULAS HeLa INFECTADAS CON EL VIRUS rNDV-B1/FAS.

Inmunofluorescencia realizada 24 horas post-infección a una m.o.i de 1. Las células se incubaron con los anticuerpos policlonal anti-NDV (secundario Alexa-Fluor488, **señal verde**), anti-FAS humano (secundario Alexa-Fluor568, **señal roja**) y Hoestch para el contraste nuclear (**señal azul**). Objetivo usado en la captación de las imágenes: 40X.

A. Células HeLa infectadas. La fluorescencia deriva de la superposición de las señales de los anticuerpos y el contraste nuclear. Todas las células del campo fueron positivas para la infección. Se enmarca el área estudiada en las imágenes C, D, E y F.

B. Núcleos apoptóticos de las células infectadas.

C. Distribución de FAS en la membrana. Las flechas señalan los *spots* o áreas de acumulación del receptor.

D. Distribución de FAS y las proteínas víricas en la célula. La superposición de la señal obtenida para las proteínas víricas y el receptor muestran colocación a nivel de membrana (intensidad amarilla). Las flechas marcan puntos de una posible localización intracelular del receptor.

E. Inmunodetección de las proteínas víricas.

F. Morfología nuclear de apoptosis temprana con polarización del DNA (Flecha). El resto de los núcleos muestran una fase más avanzada de muerte celular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las imágenes obtenidas con el confocal (**Figura 39**), a 16 horas post-infección, se pueden diferenciar claramente los rasgos asociados a la apoptosis tardía: *blebbing* en la membrana, fragmentación del DNA y formación de cuerpos apoptóticos.

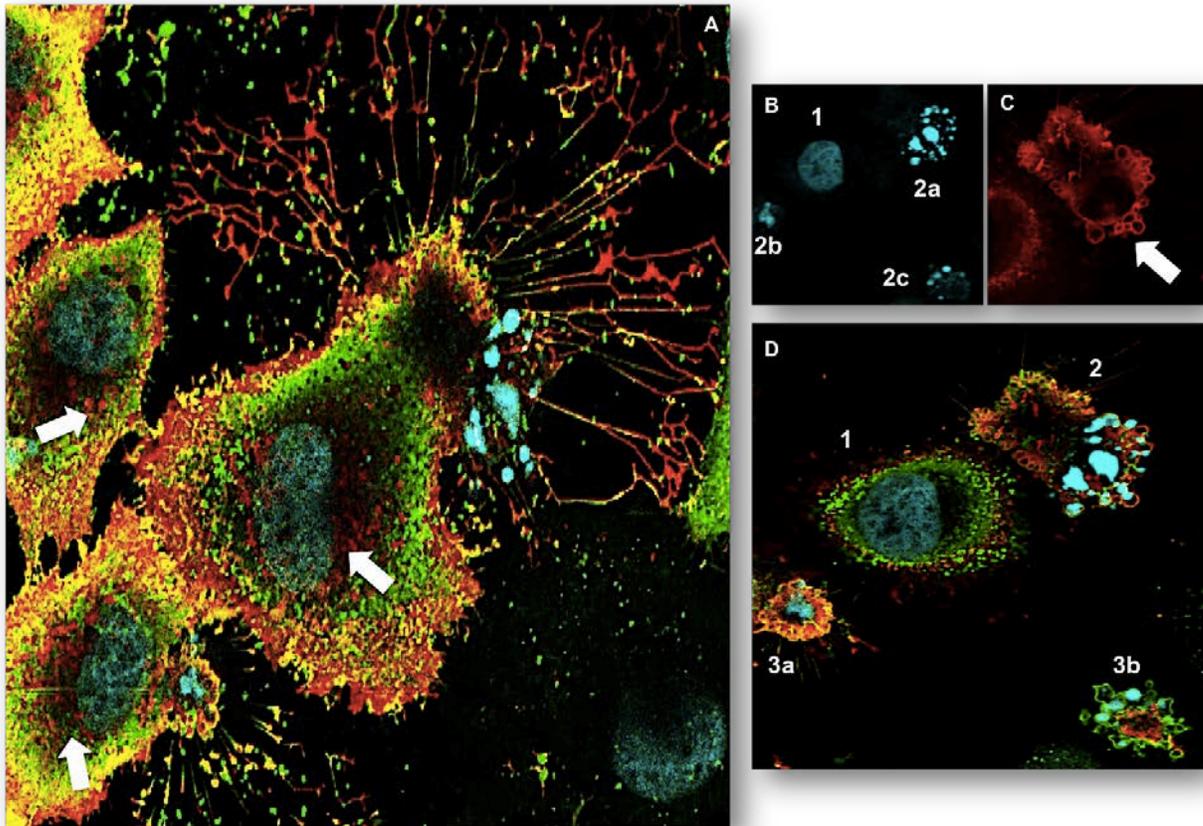


FIGURA 39. LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DEL RECEPTOR FAS.

Inmunofluorescencia realizada tras 16 horas post-infección (m.o.i de 1). Las células se incubaron con los anticuerpos policlonal anti-NDV (secundario Alexa-Fluor488, **señal verde**), anti-FAS humano (secundario Alexa-Fluor568, **señal roja**) y Hoestch para el contraste nuclear (**señal azul**). La superposición de la señal obtenida para las proteínas víricas y el receptor muestran colocalización a nivel de membrana (**intensidad amarilla**). Imágenes tomadas con el Microscopio Confocal Zeiss LSM 510. Niveles de profundidad o cortes en Z=1 para los más superficiales y Z=6 los más profundos. Objetivo usado: 60X.

A. Células HeLa infectadas por el virus rNDV-B1/FAS. Fluorescencia perteneciente a la superposición de las señales de los anticuerpos y el contraste nuclear. Las flechas marcan la localización a nivel del compartimento endosómico del receptor (nivel Z3 de 6).

B. Núcleos apoptóticos. 1: Apoptosis temprana. 2a, 2b y 2c: diferentes grados de fragmentación del material genético durante la fase tardía de inducción de apoptosis.

C. *Blebbing* a nivel de membrana (Flecha).

D. Estadios de la muerte celular. 1. Apoptosis temprana. 2. Apoptosis en fase avanzada con polarización del DNA y alto nivel de fragmentación. 3a y 3b: Cuerpos apoptóticos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectaron estos morfotipos en todas las líneas celulares tumorales humanas evaluadas durante este trabajo (Hep2, A549, HBL), datos no mostrados.

Además de la visualización mediante inmunofluorescencia quisimos comprobar la existencia de agregados de receptor FAS en extractos proteicos de células HeLa infectadas con el virus rNDV-B1/FAS. Como se muestra en la **Figura 40**, tanto bajo condiciones reductoras como en no reductoras se pudieron identificar bandas con pesos moleculares superiores al que corresponde a la forma monomérica del receptor, que podrían coincidir con formas multiméricas del receptor y que en ningún caso aparecen en las muestras control. Además las bandas de pesos moleculares superiores a 72 kDa parecen aparecer cuando los niveles de las formas monoméricas se incrementan en las muestras y que puede derivar en un mayor nivel de expresión del receptor en la membrana citoplasmática. Este perfil proteico fue observado en todas las líneas celulares que han sido analizadas tras la infección con el virus rNDV-B1/FAS.

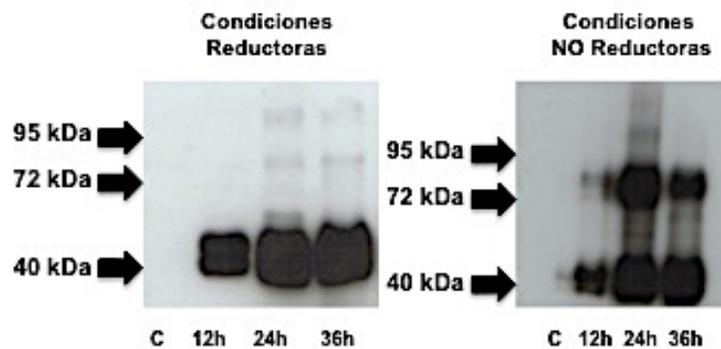


FIGURA 40. INMUNODETECCIÓN DE LA PROTEÍNA FAS EN EXTRACTOS PROTEICOS DE CÉLULAS HeLa.

Western Blot en condiciones reductoras y no reductoras para la detección del receptor FAS. Las flechas indican la posición de la banda del marcador para los pesos moleculares que sirvieron de referencia. La inmunodetección se realizó con el anticuerpo anti-FAS humano C18C12 (Cell Signaling). En todos los casos se cargó 15 µg de proteína total.

Teniendo en cuenta estas observaciones junto con los datos obtenidos mediante las imágenes de microscopía se consideró la posibilidad de que nuestro virus rNDV-B1/FAS, a través de la sobreexpresión del receptor FAS durante la infección, estuviera condicionando una activación de la señalización mediada por éste y de forma independiente a la unión a su ligando.

4.2.1.2. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA FEX EN CÉLULAS HeLa.

En el caso de la quimera FEX pudimos observar un patrón de localización semejante al de FAS: distribución generalizada en la membrana con zonas específicas de acumulación de la proteína. FEX, que posee el dominio extracelular de FAS y el transmembrana y citoplasmático de la proteína de fusión del NDV, también se localiza en *rafts*. Esta predisposición parece lógica si consideramos que es un híbrido de dos proteínas con localización preferente en ellos. Como se puede ver en la **Figura 41**, FEX colocaliza perfectamente con las glicoproteínas del virus, incluso en las áreas de máxima concentración, no siendo visibles, al menos con esta técnica, *spots* como ocurría en el caso del receptor FAS. La morfología de las células infectadas está menos alterada que en el caso de las infecciones con el virus rNDV-B1/FAS y el número núcleos apoptóticos que aparecen en relación con las células que son infectadas es menor. Al igual que en el caso de FAS, quisimos comprobar si la proteína FEX, por su característica de híbrido, sería capaz de ser internalizada hacia el compartimento endosómico. Como mostramos en la **Figura 42** las células mostraron una extensa distribución de la proteína a nivel de la membrana plasmática colocalizando con las proteínas del virus y si se pueden observar *spots* o zonas de mayor acumulación de la proteína FEX mediante microscopia confocal. Esos *spots* aparecen mayoritariamente en la superficie celular y van desapareciendo según avanzamos hacia el interior de la célula (**Figura 42; B.2 y B.3**). La localización en el citoplasma no parece tan clara como en el caso de FAS, aunque sí se detecta algo de señal en lo que se correspondería con el compartimento endosómico. La presencia de *spots* en el caso de esta proteína se puede considerar significativo: la parte N-terminal del receptor FAS puede estar favoreciendo a la proteína quimérica a agruparse, tal y como lo haría la molécula de receptor. Además este hecho puede verse favorecido si tenemos en cuenta que la proteína F del virus forma estructuras triméricas, al igual que FAS.

Si esto es así puede suponer la formación de estados PLAD o de pre-ligando, tal y como ocurre el receptor original, y que se sabe pueden condicionar una activación primaria de la señal de apoptosis. Esta activación, aunque más atenuada que la producida cuando el receptor es internalizado al citoplasma, podría influir en la capacidad apoptótica global del virus.

El perfil proteico para FEX no se ha podido realizar hasta el momento debido a la ineficacia del anticuerpo sc-714 y será un punto importante a abordar a corto plazo.

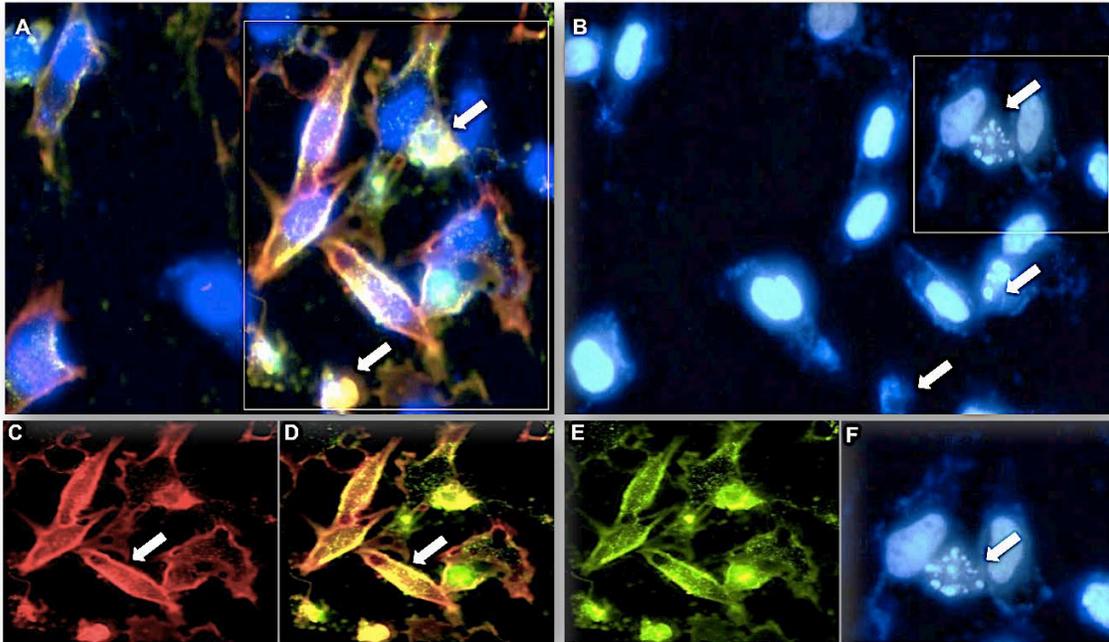


FIGURA 41. CÉLULAS HeLa INFECTADAS CON EL VIRUS rNDV-B1/FEX.

Inmunofluorescencia realizada 24 horas post-infección a una m.o.i de 1. Las células se incubaron con los anticuerpos policlonal anti-NDV (secundario Alexa-Fluor488, **señal verde**), anti-FAS humano (secundario Alexa-Fluor568, **señal roja**) y Hoestch para el contraste nuclear (**señal azul**). Objetivo: 40X.

A. Células HeLa infectadas. Fluorescencia perteneciente a la superposición de las señales de los anticuerpos y el contraste nuclear. Las flechas indican células en fase avanzada de apoptosis. Se enmarca el área que es ampliada en las imágenes C, D y E.

B. Núcleos. Las flechas señalan sólo los núcleos apoptóticos. De modo general las células presentan una morfología nuclear normal tras 24 horas post-infección.

C. Distribución de FEX en la membrana. La flecha señala el área de acumulación del receptor.

D. Distribución de FEX y las proteínas víricas en la célula. La superposición de la señal obtenida para las proteínas víricas y el receptor muestran colocalización a nivel de membrana (intensidad amarilla).

E. Inmunodetección de las proteínas víricas.

F. Morfología nuclear de una célula en fase avanzada de apoptosis (Flecha).

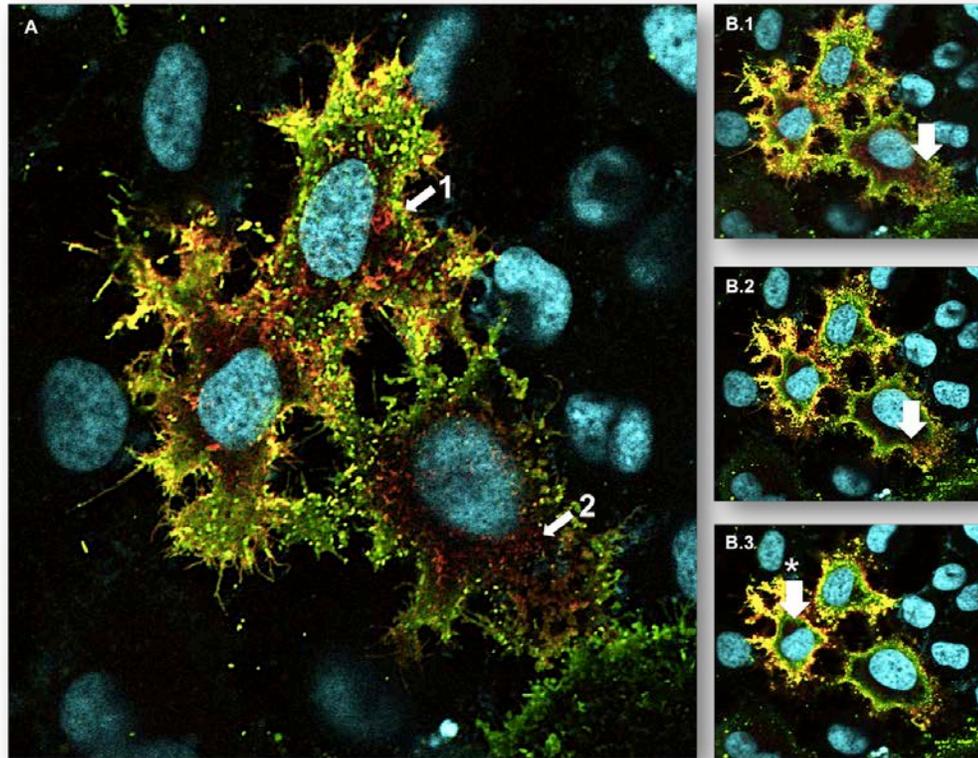


FIGURA 42. LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE LA PROTEÍNA FEX.

Inmunofluorescencia realizada 16 horas post-infección (m.o.i de 1). Las células se incubaron con los anticuerpos policlona anti-NDV (secundario Alexa-Fluor488, **señal verde**), anti-FAS humano (secundario Alexa-Fluor568, **señal roja**) y Hoestch para el contraste nuclear (**señal azul**). La superposición de la señal obtenida para las proteínas víricas y el receptor muestran colocalización a nivel de membrana (intensidad amarilla). Imágenes tomadas con microscopio confocal. Niveles de profundidad o cortes de Z=1 para los más superficiales y Z=6 los más profundos. Objetivo usado: 60X.

A. Células HeLa infectadas por el virus rNDV-B1/FEX. Fluorescencia derivada de la superposición de las señales de los anticuerpos y el contraste nuclear. Las flechas marcan la localización a nivel de membrana del receptor en las células infectadas (nivel Z=1 de 6). **1.** Spots o zonas de acumulación de la proteína en la membrana citoplasmática. **2.** Distribución de los spots en la membrana.

B. Análisis en Z de la presencia de FEX a nivel intracelular.

B.1. Z=2.

B.2. Z=3. Las flechas marcan la distribución prioritaria de la proteína.

B.3. Z=6. La flecha con el asterisco marca la localización del compartimento endosómico.

4.2.2. ESTUDIO DEL EFECTO CITOPÁTICO ASOCIADO A LA INFECCIÓN DE LOS VIRUS rNDV/B1, rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX.

4.2.2.1. EXPRESIÓN MORFOLÓGICA DEL EFECTO CITOPÁTICO (CPE) INDUCIDO POR LOS VIRUS rNDV/B1, rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX.

La muerte celular por apoptosis implica la aparición de una serie de rasgos morfológicos (apartado 1.2.1.1): las células sufren una alteración generalizada a nivel de la membrana plasmática y como consecuencia una pérdida progresiva de la adherencia de la célula al sustrato. Aparecen entonces cuerpos celulares deformes, en relación con la apariencia natural del tipo celular, con una tendencia durante la progresión del programa de muerte a adoptar una forma más compacta o redondeada. En el núcleo, la cromatina se condensa (Picnosis), se fragmenta y en la fase final se puede visualizar la aparición de cuerpos apoptóticos.

Si nuestra hipótesis sobre la posible potenciación de la capacidad apoptótica para el caso del recombinante rNDV-B1/FAS era cierta, estos rasgos deberían aparecer de forma más acentuada a cómo podrían hacerlo en las poblaciones celulares infectadas por los virus rNDV/B1 y rNDV-B1/FEX. Bajo este supuesto, diseñamos un ensayo de evaluación del efecto citopático y de identificación de fenotipos de muerte celular en relación con el tiempo de infección. La m.o.i a la que se infectaron las placas fue de 1 y el medio post-infección no incorporó TPCK-Tripsina. Esto supone que los virus desarrollarán un solo ciclo de infección-replicación y de este modo nos aseguramos de que los tres virus estuvieran en igualdad de condiciones, evitando las variaciones debidas a una posible ventaja replicativa. Los tiempos durante los cuales se mantuvo la infección fueron de 12, 24 y 36 horas. Para poder visualizar las células realizamos una tinción con Cristal Violeta, tal y como se explica en el apartado 3.4.4.1.

Los resultados recogidos en la **Figura 43** para la línea celular HeLa muestran que en el caso del virus rNDV-B1/FAS, el efecto citopático asociado a su infección es mucho más severo, y de aparición más temprana, al observado en las células infectadas tanto con el virus rNDV-B1 como por el rNDV-B1/FEX. A partir de las 24 horas post-infección, no solamente se hace patente una importante pérdida del número de células en la placa sino que las células que permanecen aún adheridas a la superficie, presentan morfologías aberrantes en comparación con el fenotipo normal (**Figura 43;A**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

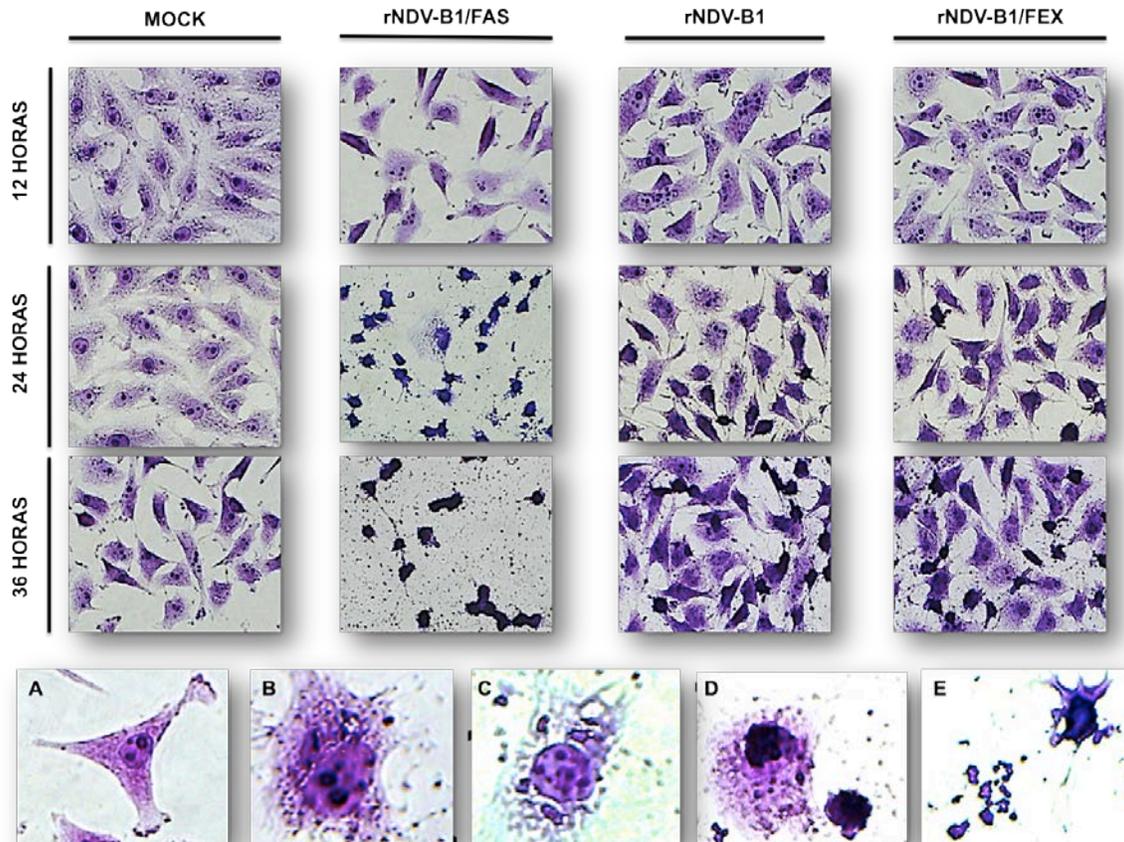


FIGURA 43. EFECTO CITOPÁTICO EN CÉLULAS HeLa ASOCIADO A LA INFECCIÓN CON LOS VIRUS rNDV-B1, rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX.

Tinción con cristal violeta de células infectadas y visualización tras 12, 24 y 36 horas post-tratamiento.

Parte superior: Evaluación temporal del efecto citopático.

Parte Inferior. Morfotipos apoptóticos detectados tras 24 horas post-infección con el virus rNDV-B1/FAS.

A. Morfología Normal de células HeLa.

B. Pérdida de volumen y morfología celular.

C. Desorganización y fragmentación del núcleo.

D. Condensación del DNA y polarización de éste en el Núcleo.

E. Cuerpos apoptóticos.

La concentración del colorante Cristal Violeta en el compartimento celular deja patente un marcado colapso y reducción del volumen celular con pérdida total de la morfología original. En las placas infectadas con el rNDV-B1/FAS, 24 horas post-infección se pudieron identificar fenotipos asociados a los distintos estadios o etapas de la muerte celular (**Figura 43, B, C, D y E**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de las 36 horas, tanto en las placas infectadas con el virus rNDV-B1 como con el rNDV-B1/FEX comienzan a aparecer células con mayor concentración del colorante a nivel nuclear, de forma semejante a lo descrito para el rNDV-B1/FAS aunque siempre en menor número y aparentemente en un estadio menos avanzado de degeneración celular.

Con estos resultados podemos afirmar que las manifestaciones morfológicas asociadas al efecto citopático generado por la infección con el recombinante rNDV-B1/FAS son más acusadas. La población celular se ve altamente reducida en número de células en comparación con los resultados obtenidos con los virus rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX, especialmente a partir de las 24 horas post-infección. El efecto de la infección conlleva la aparición de morfotipos característicos de un proceso de inducción de muerte por apoptosis. Estos aparecen de forma más evidente y temprana (24 horas post-infección) en las placas infectadas con el virus rNDV-B1/FAS en comparación con los otros dos virus, cuyo efecto parece comenzar a partir de las 36 horas post-infección.

Este mismo patrón se ha observado en todas las líneas celulares de las que dispusimos durante este trabajo (**Tabla 4**) (datos no mostrados).

4.2.2.2. ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DERIVADA DE LA INFECCIÓN CON LOS VIRUS RNDV/B1, rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX.

La inducción de apoptosis supone la disminución progresiva de la viabilidad celular que culminará con la muerte de la misma si no existen o no se activan los mecanismos capaces de reprimirla. Una de las manifestaciones de esta reducción de la viabilidad es la pérdida progresiva de sus funciones bioquímicas y metabólicas, las cuales se mantienen hasta bien avanzada la inducción de la muerte celular ya que son imprescindibles para garantizar el aporte de energía necesario durante todo el proceso. Para evaluar el impacto que estaba teniendo la infección de nuestros virus a este nivel, nos planteamos desarrollar un ensayo de viabilidad celular mediante el uso del reactivo **MTT** [Bromuro de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolio)-2,5-difenil-2H-tetrazolillo]. La prueba se basa en la capacidad de la enzima mitocondrial Succinato-deshidrogenasa para reducir el reactivo MTT hasta generar un compuesto coloreado azul, el formazán.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Solamente aquellas células en las que la viabilidad no esté totalmente comprometida serán capaces de reducir el MTT. La cantidad de formazán producido por la población celular es directamente proporcional al número de células viables dentro de la misma. La línea celular con la que se llevó a cabo el ensayo fue HeLa. Previamente se realizó el estudio de la capacidad replicativa de los virus rNDV-B1, rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX en esta línea celular (**Figura 44**), como ya se hizo con anterioridad para las Vero. Este paso fue necesario para asegurarnos de que ninguno de ellos tenía ninguna ventaja o facilidad replicativa mayor.

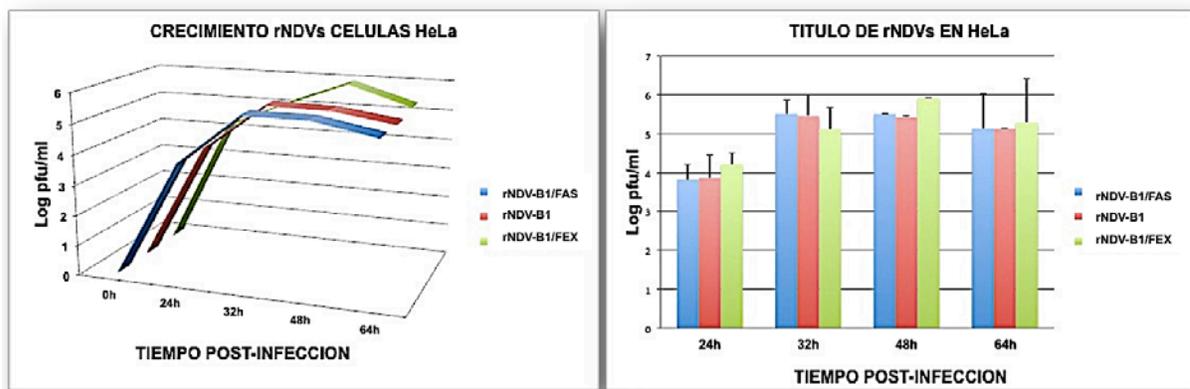


FIGURA 44. CAPACIDAD REPLICATIVA DE LOS VIRUS rNDV-B1, rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX EN CÉLULAS HeLa.

Izquierda: Curvas de crecimiento o cinética de la replicación.

Derecha: niveles de producción de viriones obtenidos para cada uno de los virus expresados como logaritmo decimal de las pfu/ml.

Las barras de error muestran la desviación estándar de los datos obtenidos dentro de cada grupo y ensayo. **Azul:** rNDV-B1/FAS. **Rojo:** rNDV-B1. **Verde:** rNDV-B1/FEX.

La metodología empleada en el ensayo con MTT se recoge en el apartado 3.4.4.2. Durante el procedimiento quisimos valorar la disminución de la viabilidad asociada a la variación de la m.o.i con la que se infectan las células así como el efecto asociado a la capacidad replicativa del virus, desarrollando monociclos y multiciclos infectivos. Para ello, las células se infectaron a dos m.o.i diferentes, 0.5 y 1. En el caso de las muestras infectadas a una m.o.i de 0.5 los experimentos se realizaron usando tanto un medio post-infección normal como con un medio con TPCK-tripsina (**Tabla 5, pag.62**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta proteasa garantizará el correcto procesamiento proteolítico de la proteína F, necesario para la fusión de membranas y entrada del virus, lo cual incrementará la capacidad infectiva de los viriones producidos durante la infección y nos permitirá seguir el efecto citopático debido a la existencia de multiciclos replicativos de la progenie vírica. Las células control se sometieron a los mismos procedimientos que conlleva la infección con los virus para poder sopesar los efectos derivados de la manipulación técnica sobre la viabilidad. En todos los casos las células se cultivaron en número suficiente para garantizar que nunca se alcanzaran niveles altos de confluencia en los pocillos. Cuando la confluencia supera el 80% la viabilidad del cultivo se ve comprometida, lo cual podrían introducir falsos positivos en la evaluación de la disminución de la misma.

Los resultados observados (**Figura 45**) muestran una clara diferencia de comportamiento entre los tres virus, siendo el rNDV-B1/FAS el que promueve la mayor reducción en la viabilidad de los cultivos, en todas las condiciones estudiadas, y siendo ésta más relevante tras tiempos cortos post-infección. El potencial de inducción de muerte por parte del recombinante que expresa FAS se hace aún más patente cuando los cultivos se infectan con una m.o.i de 1 (**Figura 45; C.1 y C.2**) y con la capacidad post-replicativa limitada (medio sin TPCK-tripsina); el virus es capaz de reducir la viabilidad del cultivo más de un 50% entre las 12 y 24 horas post-infección, aumentando de manera progresiva el porcentaje de muerte celular hasta alcanzar un 90% a las 72 horas. La diferencia con respecto a los virus rNDV/B1 y rNDV-B1/FEX es claramente significativa, siendo el valor máximo de inducción de muerte celular alcanzado por éstos próximo al 50% y únicamente tras 72 horas post-infección. Esta diferencia es explicable solamente si consideramos el hecho de que en las células infectadas con el rNDV-B1/FAS se esté promoviendo una potenciación de la capacidad de inducción de la muerte celular durante su ciclo replicativo de modo independiente a la capacidad innata que tiene el virus nativo. Valorando estos resultados, junto con las observaciones previas (localización celular del receptor y presencia de multímeros, la aparición de morfotipos apoptóticos y la citopaticidad asociada a tiempos cortos de infección), nuestra hipótesis sobre si la sobreexpresión de FAS potencia la capacidad innata del NDV para inducir muerte celular, toma más peso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

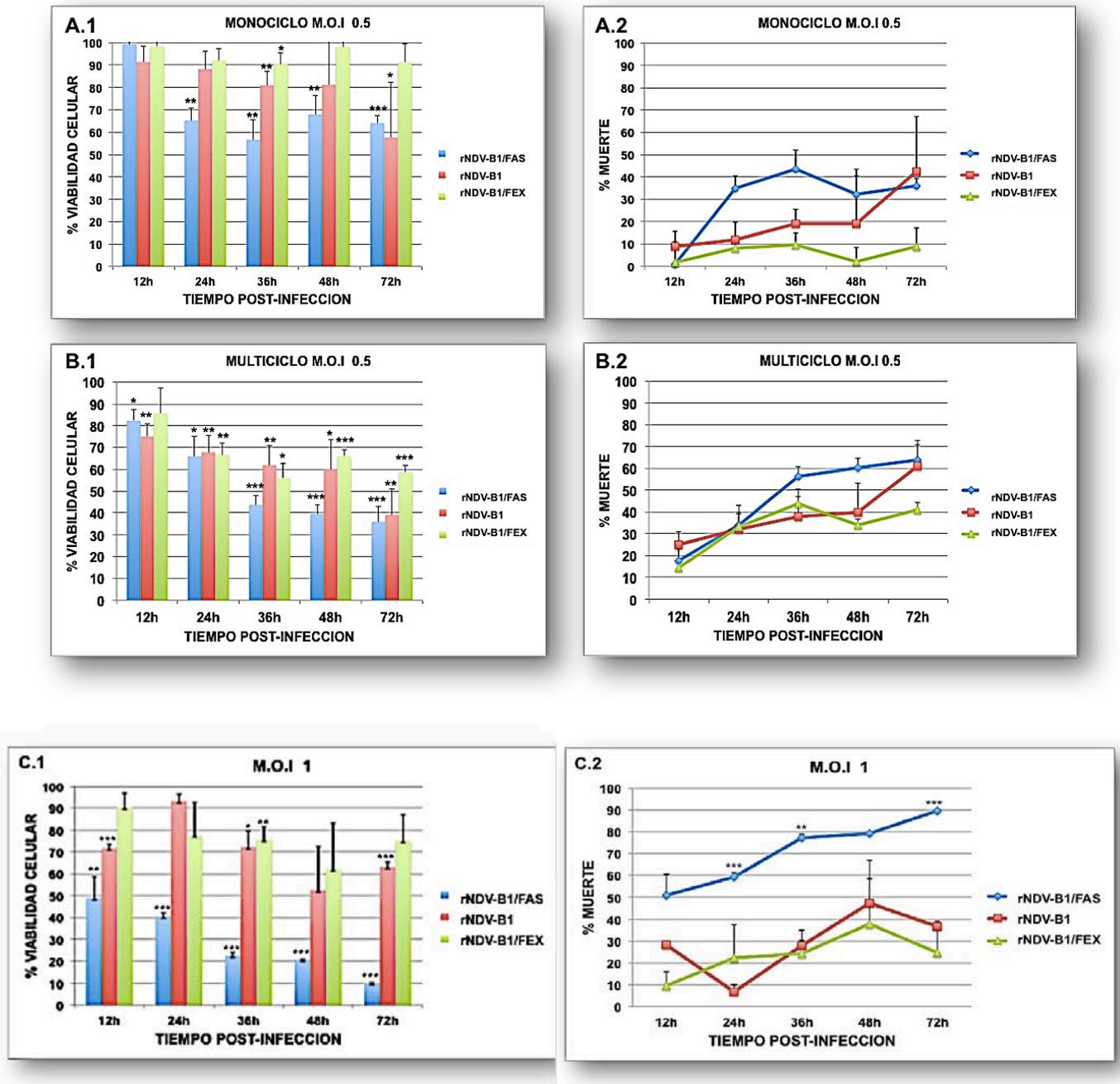


FIGURA 45. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR POST-INFECCIÓN MEDIANTE ENSAYO CON MTT.
A.1, B.1 y C.1. Disminución de la viabilidad celular tras la infección con los virus rNDV-B1/FAS (Azul), NDV-B1 (Rojo) y rNDV-B1/FEX (Verde) en relación con las muestras control. Las condiciones del ensayo suponen un porcentaje de supervivencia asociado a los controles del 100%. Las barras de error muestran la desviación estándar. Nivel de significación para n=3: *p≤ 0.05, **p≤0.005, ***p≤0.0005.
A.2, B.2 y C.2. Porcentaje de inducción de muerte celular tras la infección con los virus rNDV-B1/FAS (Azul), NDV-B1 (Rojo) y rNDV-B1/FEX (Verde). Comparativa entre la actividad de los virus recombinantes rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX con respecto al nativo NDV-B1. Las barras de error muestran la desviación estándar. Nivel de significación para n=3: *p≤ 0.05, **p≤0.005, ***p≤0.0005.

El impacto sobre la viabilidad celular de los virus rNDV/B1 y rNDV-B1/FEX mostró una clara dependencia de la capacidad infectiva de la progenie vírica, obteniéndose los mayores valores de reducción de viabilidad cuando el ensayo se realizó con un medio post-infección que garantizaba los multiciclos replicativos (**Figura 45; B.1 y B.2**). Estos virus reducen la viabilidad de forma más significativa a las 36 horas post-infección, volviendo a aparecer periódicamente esta reducción en intervalos de 36 horas (como demuestran los valores alcanzados a 72 horas post-infección). Los dos virus mostraron ser menos citopáticos que el rNDV-B1/FAS y además, al contrario de lo que se pensó inicialmente, su comportamiento no es mimético. Es decir, el virus rNDV-B1/FEX, lejos de comportarse como el virus rNDV-B1 (al cual podemos considerar biológicamente como al virus nativo NDV-B1 ya que no incorpora ninguna ORF externa), parece tener una capacidad citotóxica reducida, si la comparamos con la obtenida para el rNDV-B1. La proteína quimérica FEX se construyó para poder tener un referente de control negativo con respecto a los posibles efectos que tuviera la expresión de FAS en el ciclo replicativo del rNDV-B1/FAS. La respuesta esperada por este recombinante debería ser una imagen especular de los efectos del rNDV-B1, puesto que FEX es una proteína sin ninguna funcionalidad esperada en el proceso de muerte celular. Este recombinante, sin embargo, ha demostrado no ver limitada su capacidad replicativa, a pesar de incorporar el gen híbrido, pero sí parece verse comprometida, al menos en los tiempos observados, su capacidad de disminución de la viabilidad celular. En este punto de nuestro trabajo podemos pensar que esta diferencia se deba a que FEX posee el dominio extracelular del receptor FAS. El dominio N-terminal del receptor tiene un papel relevante en el proceso de inducción temprana o primaria de la señalización pro-apoptótica (1.2.1.4 y 1.2.2.2.3). Hay estudios que demuestran que en la activación de la cascada de FAS existen mecanismos de control destinados a contrarrestar la respuesta en los primeras etapas de la inducción del programa apoptótico. Estos mecanismos son especialmente importantes para que en aquellos casos en los que el receptor es expresado a altos niveles, y de manera normalmente patológica, se pueda evitar una activación incorrecta de la vía extrínseca (1.2.2.2.3). Viendo que la supervivencia de las muestras infectadas con el virus rNDV-B1/FEX no se veía tan comprometida como con el virus nativo, puede ser que FEX esté induciendo algún tipo de respuesta celular anti-apoptótica ligada a los mecanismos de control que regulan la actividad del receptor FAS y que prolongue la viabilidad de la célula, a pesar de que la replicación del virus tenga lugar.

4.2.2.3. ALTERACIONES EN EL CICLO CELULAR DE CÉLULAS INFECTADAS.

Todo proceso de inducción de muerte celular por apoptosis viene acompañado de una progresiva pérdida de funcionalidad en la actividad replicativa de la célula. El fin último de un programa apoptótico es evitar que las células que están dañadas sigan multiplicándose.

En una población celular con una elevada tasa de inducción de apoptosis el primer rasgo que aparece es un aumento en el número de células que permanecen en Fase G0/G1. La progresión del programa de muerte celular conlleva la pérdida paulatina de estabilidad del DNA por la acción de las endonucleasas, activadas tanto por vía intrínseca como extrínseca, y cuya manifestación es la aparición de una población Sub-G0. Ésta representará la parte de la población donde la pérdida de integridad del material genético supone más de un 30%.

Quisimos evaluar la repercusión que tiene la replicación del virus respecto a las fases del ciclo celular. Para ello diseñamos un ensayo de estimación de la viabilidad celular mediante tratamiento con RNasa y marcaje con Ioduro de Propidio, (IP) (3.4.4.6).

La línea celular sobre la que se realizó el estudio fue HeLa. Las células fueron infectadas con los virus rNDV-B1, rNDV-B1/FAS o rNDV-B1/FEX a una m.o.i de 1 y con un medio post-infección sin TPCK-tripsina. La evaluación se realizó tras 12, 24, 36 y 48 horas post-infección y los resultados obtenidos con los virus se compararon teniendo en cuenta el porcentaje de células que presentaron las células control en cada fase.

Los resultados mostrados en la **Figura 46** muestran cómo a medida que avanza el tiempo de infección, el número de células que están en Fase G0/G1 aumenta progresivamente en los tres casos. El virus rNDV-B1/FAS produce otra vez más una reducción de la viabilidad de la población mayor que la que aparece asociada a los otros dos virus y de manera más temprana (24 horas post-infección). Si bien comparando la diferencia entre los tres virus respecto al arresto celular en G0/G1 ésta no resultó extremadamente significativa, sí parecieron demostrar un comportamiento diferente con respecto a las Fases G2/M y S (**Figura 47**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

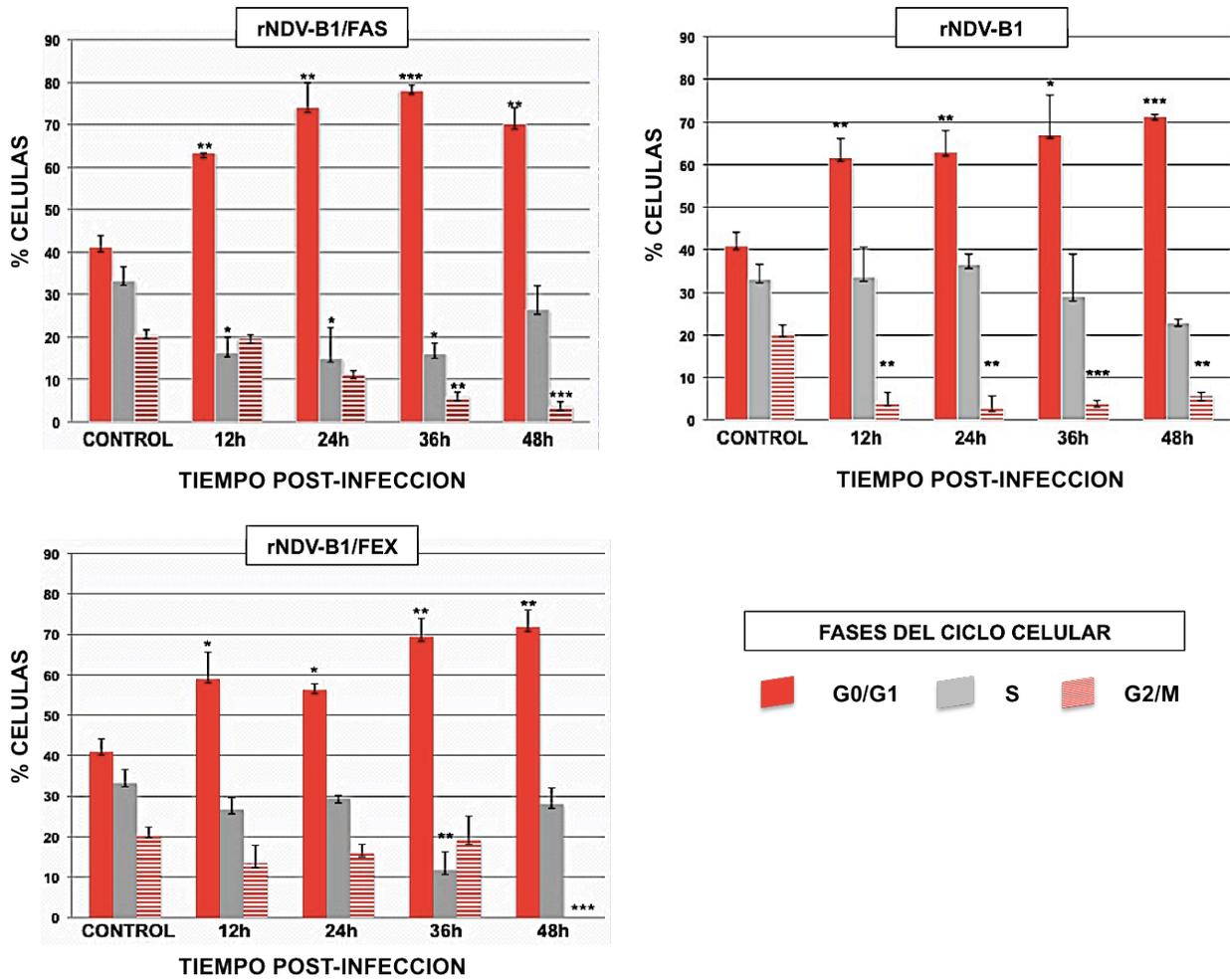


FIGURA 46. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE EL ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR. Comparativa con respecto a la muestra de células HeLa control de la variación en el porcentaje de células que aparecen en las distintas fases del ciclo celular tras la infección con los virus rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX. Los datos se obtuvieron mediante el tratamiento con RNasa y marcaje con Ioduro de Propidio de las células infectadas y fueron analizados mediante Citometría de Flujo. La multiplicidad de infección fue de 1 para los tres virus. Las barras de error muestran la desviación estándar. Nivel de significación para $n=3$: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

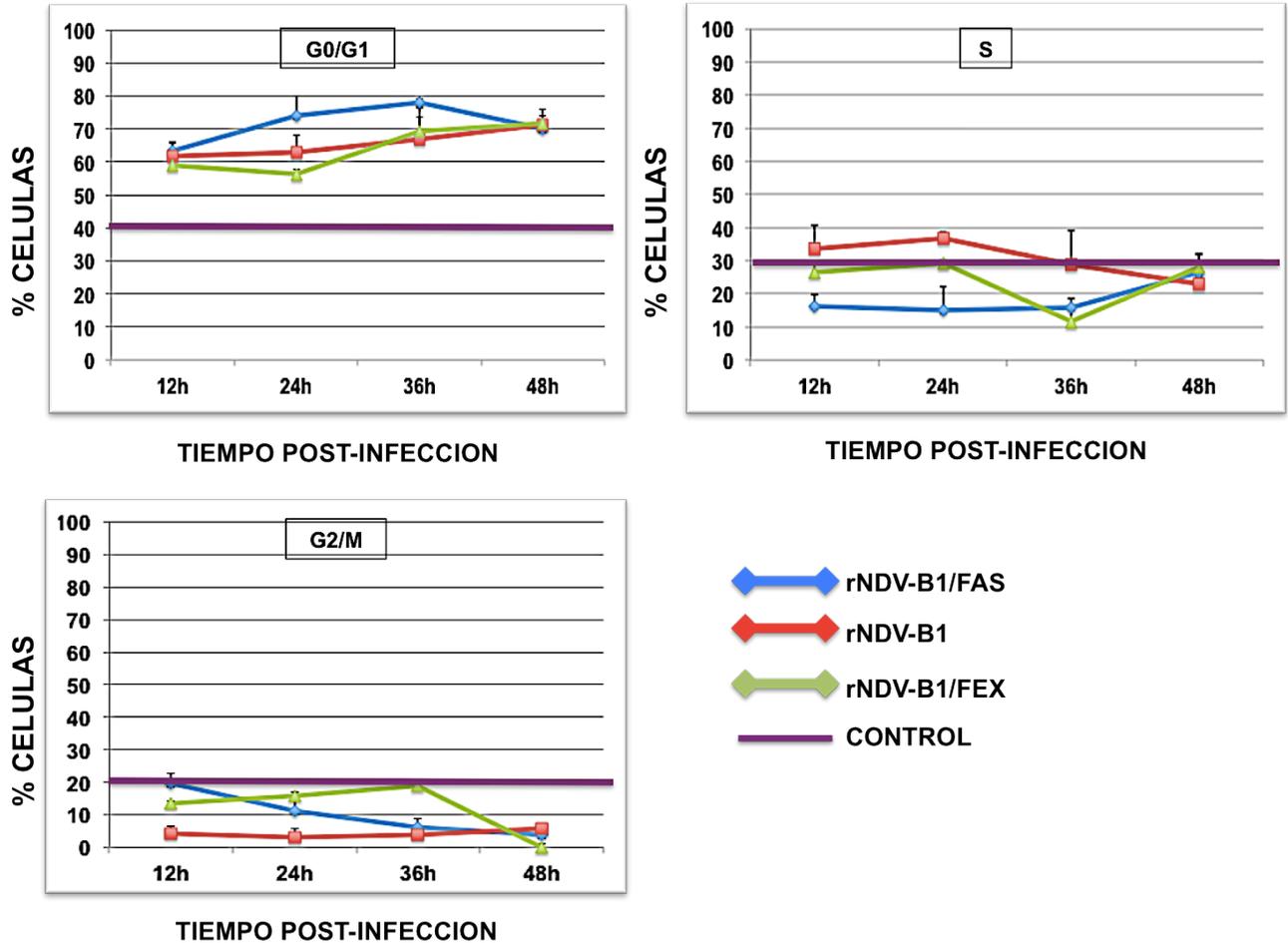


FIGURA 47. IMPACTO DE LA INFECCIÓN CON LOS VIRUS rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS FASES DEL CICLO CELULAR.

Progresión del efecto citopático asociado a la variación en el porcentaje de células que aparecen en las distintas fases del ciclo celular tras la infección con los virus rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX.

Las graficas muestran el perfil descrito por cada virus a lo largo del tiempo de infección al que se sometieron las muestras. La multiplicidad de infección fue de 1 para los tres virus.

La barra morada de las gráficas representa el valor promedio detectado para cada una de las fases en las muestras control.

Los datos fueron obtenidos mediante el tratamiento con RNAsa y marcaje con Ioduro de Propidio de las células infectadas y fueron analizados mediante Citometría de Flujo.

Las barras de error muestran la desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desde el comienzo de la infección, el rNDV-B1 disminuye la población en G2/M mientras que el rNDV-B1/FAS la disminuye progresivamente. En el caso del rNDV-B1/FEX, sólo tras 48 horas post-tratamiento aparece una reducción de esta población y que es del 100%.

A nivel de Fase S el comportamiento es más irregular, siendo reducida desde el principio en las células infectadas por el rNDV-B1/FAS mientras que los otros dos virus parecen reducir esta población a partir de las 36 horas post-infección. Si estas manifestaciones a nivel de las fases G2/M y S son importantes o condicionantes para la correcta replicación del virus está aún por determinar. Lo que sí que queda claro es que la tendencia durante la replicación del virus es producir un arresto o parada del ciclo celular en G0/G1 desde el comienzo de la infección. Los niveles más altos son alcanzados por el virus rNDV-B1/FAS y éstos, además, aparecen de forma temprana (a partir de las 24 horas post-infección) en comparación con los virus rNDV/B1 y rNDV-B1/FEX.

Para el análisis de la viabilidad celular basada en los estadios o fases de ciclo no se tomó en cuenta la aparición de la cuarta población que se puede diferenciar, la Sub-G0. Las células con perfil Sub-G0 aparecieron en los tres casos siendo en el caso de las células infectadas con rNDV-B1/FAS más numerosas a partir de las 24 horas post-infección, alcanzándose valores próximos al 50% tras 48 horas post-infección (**Figura 48**).

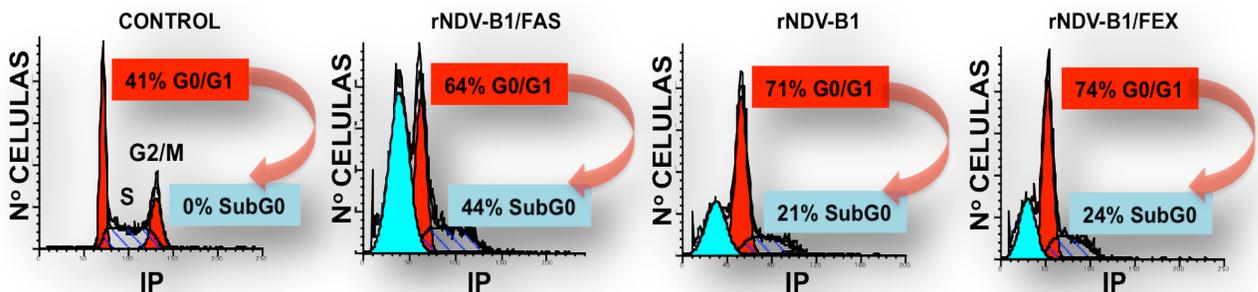


FIGURA 48. IDENTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN SUB-G0 EN MUESTRAS INFECTADAS CON LOS VIRUS rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX.

Ejemplo representativo de uno de los ensayos para el estudio de viabilidad mediante el análisis de las fases del ciclo celular. Se muestran los histogramas correspondientes a las muestras obtenidas de los tres virus del estudio y el correspondiente a las células control. De izquierda a derecha aparecen las poblaciones G0/G1 (**pico rojo**), S (**rayas azules**) y G2/M (**pico rojo**), ésta última solo diferenciable en el control. En azul claro se muestra la subpoblación Sub-G0.

4.2.3. ANÁLISIS DE LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR LOS VIRUS

rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX.

Una de las primeras manifestaciones que aparecen tras la inducción de muerte celular por apoptosis es la externalización de fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana citoplasmática hacia el exterior celular. Este suceso puede ser detectado fácilmente mediante el uso de anexinas recombinantes conjugadas con fluorocromos que son capaces de unirse al fosfolípido en un proceso dependiente de calcio.

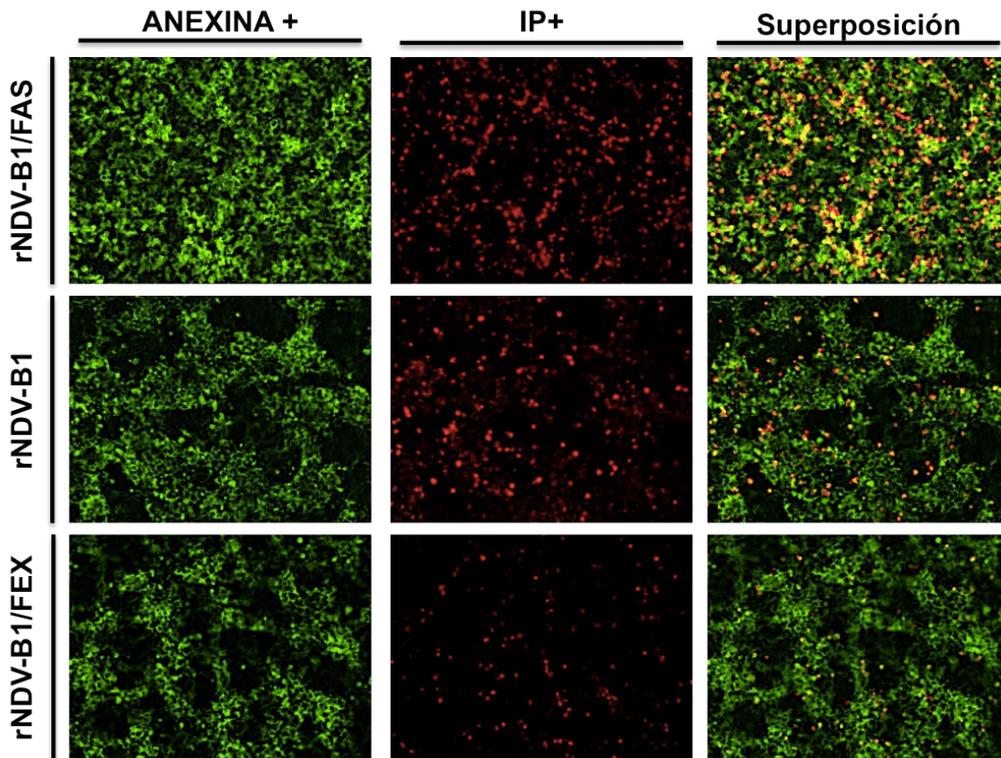


FIGURA 49. DETECCIÓN DE LA EXTERNEALIZACIÓN DE FOSFATIDILSERINA EN CÉLULAS INFECTADAS.

Análisis mediante microscopía de fluorescencia de la exposición de fosfatidilserina hacia el dominio extracelular de células HeLa infectadas con los virus rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX. Las células se infectaron con una m.o.i de 1. El análisis se realizó 24 horas post-infección. La Anexina-V se detecto mediante la señal del fluorocromo Alexa-Fluor488. El marcaje nuclear de las células apoptóticas de llevó a cabo mediante tinción simultánea con Ioduro de Propidio (IP).

La visualización se realizó con un microscopio de fluorescencia Invertido usando un objetivo 10X.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Siguiendo con nuestro estudio sobre la posible potenciación de la capacidad apoptótica del virus rNDV-B1/FAS, planteamos un primer ensayo para detectar si las células infectadas con nuestros virus exponían fosfatidilserina en su membrana durante el ciclo de replicación. Para ello usamos una Anexina-V recombinante conjugada con el fluorocromo Alexa-Fluor488 que permitiría visualizarla mediante microscopía de fluorescencia. Al mismo tiempo se empleó Ioduro de Propidio (IP) que nos permitiría visualizar cuales de estas células presentaban una fase más avanzada de apoptosis (3.4.4.5). Como se muestra en la **Figura 49**, pudimos visualizar tanto células Anexina positivas como IP positivas en los tres casos. Sin embargo es evidente que las placas infectadas con el virus rNDV-B1/FAS, a pesar de presentar un menor volumen de células y que la señal detectada procedía únicamente de las que aún permanecían adheridas a la placa, aparecían mas células Anexina-V/IP positivas que en las muestras de los virus rNDV/B1 y rNDV-B1/FEX.

Tras esta evidencia realizamos un segundo ensayo que nos permitiría cuantificar qué porcentaje de la población infectada por cada uno de los virus era positiva para el doble marcaje Anexina-V/IP y que incluyera tanto las células adheridas como las que estaban en suspensión (Apartado 3.4.4.4). Las células HeLa se cultivaron de modo que nunca se alcanzaran niveles de confluencia que pudieran dar falsos positivos. Las infecciones se realizaron a una m.o.i de 1 y el efecto de la replicación de los virus sobre la exposición hacia la cara extracelular de fosfatidilserina se evaluó a tiempos de 12, 24, 36 y 48 horas post-infección mediante citometría de flujo.

De forma paralela a la infección de las muestras destinadas a valorar la viabilidad se infectaron el mismo número de células y en las mismas condiciones para valorar el porcentaje de infección (3.4.4.3). Las peculiaridades de la metodología a emplear para el uso de la Anexina-V limitó nuestra capacidad de realizar un triple marcaje Anexina-V/IP/NDV. No se dieron como válidos los ensayos en los que el porcentaje de infectividad fuera menor del 80 % o con elevada variabilidad entre el nivel de infección alcanzado por cada uno de los virus.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

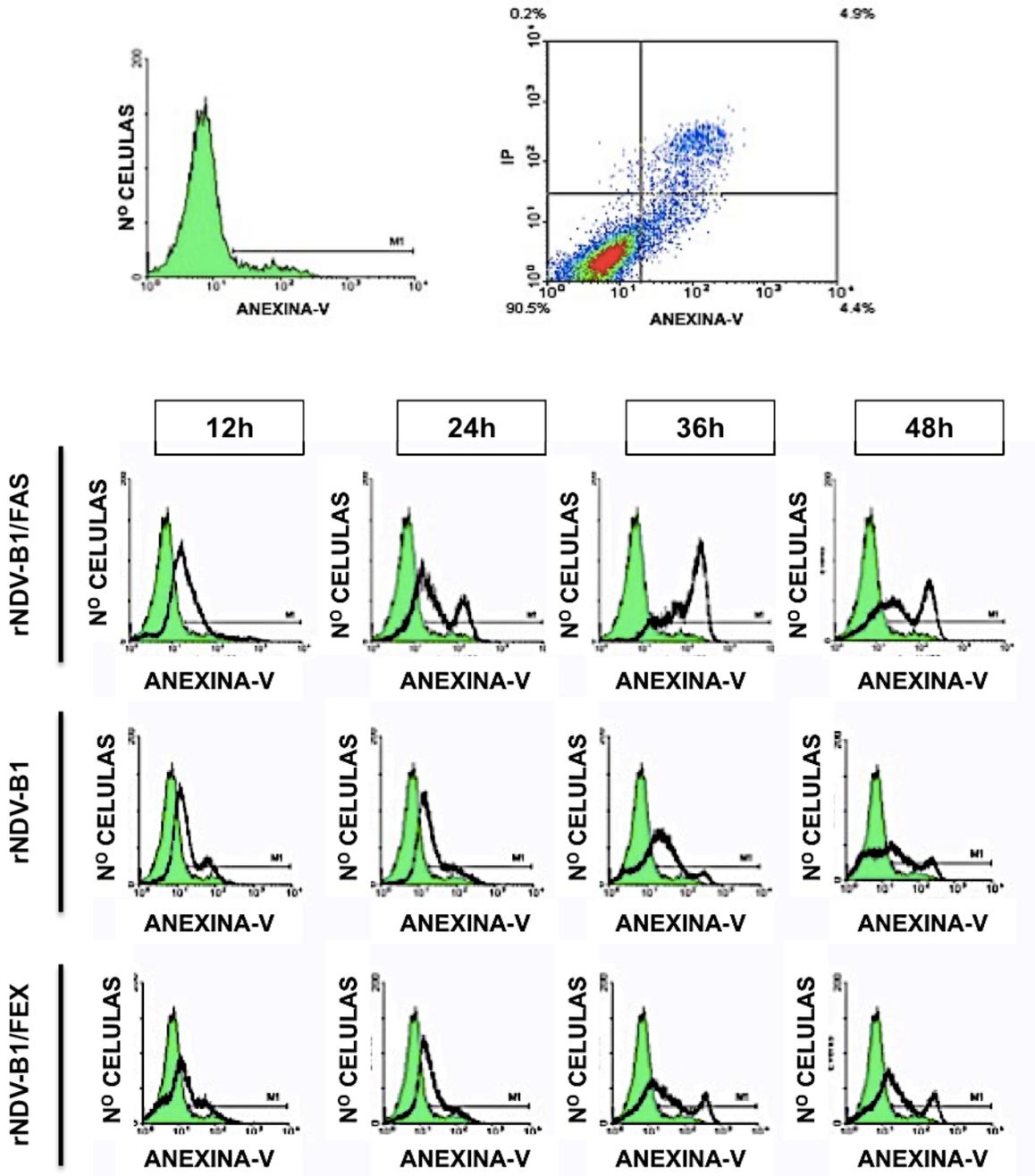


FIGURA 50. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE DOBLE MARCAJE ANEXINA/IP (1).

Parte superior: histograma obtenido para la señal de Anexina (izquierda) y Diagrama de Densidad de Población para el doble marcaje ANEXINA/IP (derecha) perteneciente a la muestra control de la línea celular HeLa.

Parte inferior. Ejemplo de uno de los ensayos realizados para la detección de células Anexina (+) en células infectadas por los virus rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX.

Pico verde: señal del control. **Pico negro:** superposición de la señal obtenida en cada muestra. La baliza horizontal muestra el valor para el que se consideraron las células como anexina positivas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de los histogramas (**Figura 50**) muestra cómo desde las 12 horas post-infección pudimos identificar células anexina positivas en los cultivos infectados por los tres virus. Coincidiendo con las pautas observadas en los experimentos anteriores observamos que las muestras infectadas por el virus rNDV-B1/FAS fueron aquellas para las que se obtuvieron los valores máximos de marcaje. La diferencia con los otros dos virus volvió a ser relevante a partir de las 24 horas post-infección. Los virus rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX en este ensayo sí mostraron tener un comportamiento muy similar, alcanzándose los valores máximos de marcaje con anexina a partir de las 36 horas.

La ventaja que ofrece el doble marcaje Anexina-Ioduro de Propidio, con respecto a los métodos usados con anterioridad, es que podemos inferir como está progresando la apoptosis, es decir, en qué momento de la muerte celular se encuentran nuestras células. Así, las células que sean Anexina-positivas pero IP-negativas se consideran que están en una fase temprana de inducción del programa de muerte, mientras que las células que sean positivas para el doble marcaje estarán en una fase avanzada. Para visualizar la progresión de la apoptosis en nuestros cultivos y calcular el porcentaje de células que están en cada estadio de muerte, representamos los datos obtenidos mediante citometría de flujo en forma de Diagramas de Densidad de Población. La determinación de los cuadrantes donde detectaríamos las distintas subpoblaciones se hizo a partir de los valores obtenidos para las señales de Anexina y Ioduro de propidio-positivo de las muestras control (**Figura 50; Parte Superior**). Como muestra la **Figura 51**, la tendencia general en una población con un proceso de apoptosis activo es de desplazarse progresivamente, según avanza el tiempo post-infección, del cuadrante ocupado por las Anexina-positivas al cuadrante de las Anexina-IP-positivas. Si nos fijamos en el caso de las células infectadas con el rNDV-B1/FAS podemos ver cómo las células que a las 12 horas estaban en una fase temprana de inducción de muerte (Anexina-positivas), a partir de las 24 horas, parecieron desdoblarse apareciendo dos subpoblaciones: apoptóticas tempranas y tardías (Anexina-IP-positivas). Según aumentó el tiempo post-infección, el número de células que formaban parte de esta fase tardía siguió incrementándose hasta representar un 50% de las células con perfil de muerte celular por apoptosis. El valor promedio máximo de muerte celular que pudimos observar para el rNDV-B1/FAS, mediante esta técnica y a tiempo máximo post-infección de 48 horas, fue del 75% (**Figura 52**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

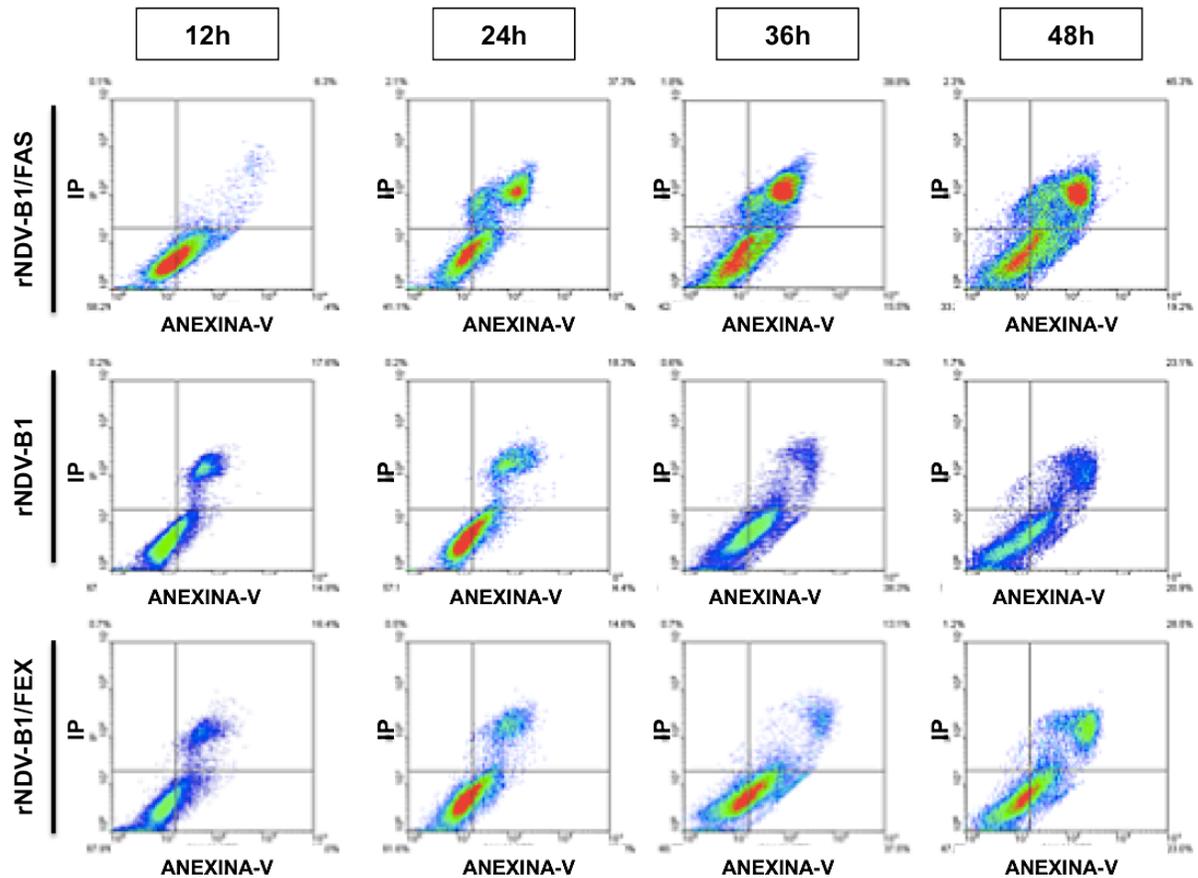


FIGURA 51. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE DOBLE MARCAJE ANEXINA/IP (2).

Ejemplo de los Diagramas de Densidad de Población para el doble marcaje ANEXINA/IP de uno de los ensayos realizados en células HeLa infectadas por los virus rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX.

Los cuadrantes que aparecen en cada gráfico marcan los límites de separación entre las posibles poblaciones que pueden identificarse. La línea vertical del cuadrante indica a partir de qué valores de intensidad de señal de Anexina se consideró como Anexina (+). La línea horizontal marca a partir de qué intensidad de señal de IP las células se consideraron IP (+). En los vértices del gráfico aparecen los porcentajes obtenidos para cada uno de los cuatro cuadrantes delimitados por nuestros ejes. La intensidad de colores en el gráfico muestra donde se localiza el grueso de la población en cada momento del estudio. Los colores fríos, como el azul, señalan los porcentajes más bajos mientras que los colores más cálidos, como el rojo, señalan áreas de máxima concentración celular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los virus rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX volvieron a producir los niveles inferiores de reducción de la viabilidad celular en comparación con el efecto del virus rNDV-B1/FAS. Con este ensayo pudimos obtener más información sobre las diferencias de comportamiento de estos dos virus respecto a la inducción de la muerte celular. Como muestra la **Figura 51**, tras 12 horas post-infección pudimos identificar tanto células en fase temprana como tardía, en ambos casos, y no se produjo ningún tipo de progreso significativo con respecto a la evolución de la apoptosis hasta las 36 horas. Tanto a 12 horas como a 24 horas obtuvimos prácticamente los mismos valores de apoptosis temprana y de tardía en ambos virus y la distribución de las poblaciones fue prácticamente idéntica. A partir de las 36 horas, aunque parecía haber una evolución respecto al desplazamiento de las poblaciones, vimos que ésta no era tan grande como en el caso del efecto del rNDV-B1/FAS y se apreció una diferencia entre los dos virus: las muestras examinadas del virus rNDV-B1/FEX mostraron un mayor porcentaje de células Anexina-positivas que en la población de células infectadas por el rNDV-B1 (**Figura 52**), aunque esta diferencia se compensó a las 48 horas.

Analizando en conjunto los datos obtenidos hasta el momento sobre la reducción de la viabilidad celular por parte de los virus rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX podemos asumir que:

- El virus rNDV-B1/FAS induce apoptosis en un 75% de las células según el análisis de viabilidad realizado mediante el doble marcaje Anexina-IP. De éstas, el 50% están se encuentran en estado avanzado o fase tardía del programa apoptótico. El valor de reducción de viabilidad mediante esta técnica coincide con el porcentaje medio estimado de células en Fase G0/G1 (**Figura 46, pag.150**), entre el 75-80%, en las que además observamos una población SubG0 de entrono al 50% a tiempo máximo de infección de 48 horas. También existe correlación con los datos observados mediante el análisis de viabilidad con MTT (Figura 45; C2) en el que veíamos como esta se ve reducida la hasta un 80% cuando son infectadas a una m.o.i igual a 1 y con un tiempo máximo de infección de 48 horas.
- Los virus rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX repiten los resultados de reducción de viabilidad celular (entorno al 60% del total de la población) obtenidos tanto en el ensayo con MTT como con la proporción de células en fase G0/G1. Los datos sobre apoptosis tardía coinciden con los porcentajes obtenidos para la población Sub-G0 en el análisis del ciclo celular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

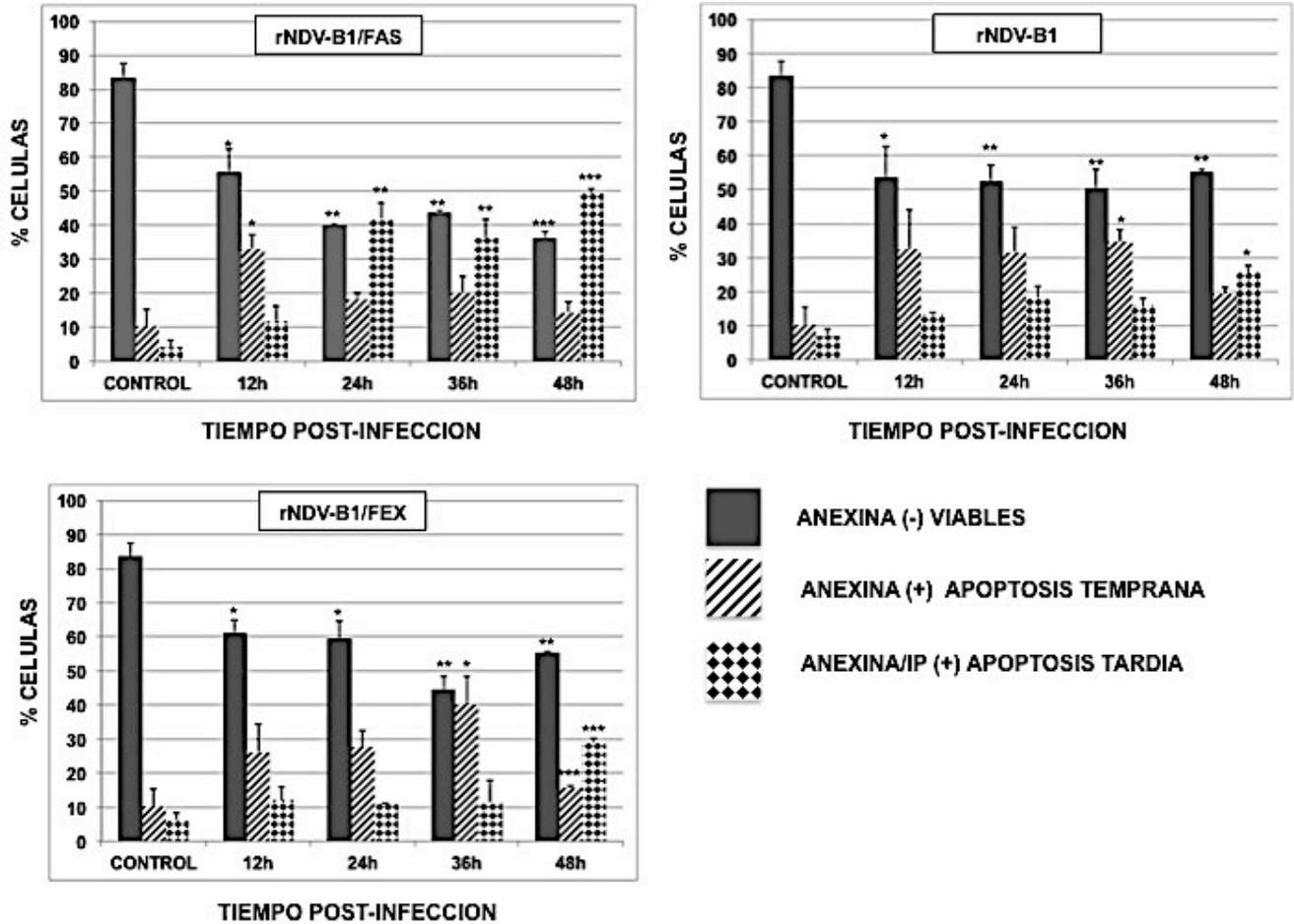


FIGURA 52. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE DOBLE MARCAJE ANEXINA/IP (3).

Resultados obtenidos tras el análisis de las muestras de células HeLa infectadas con los virus rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX. El análisis tuvo en cuenta la variación en la proporción de las tres posibles poblaciones, Viables, Apoptosis Temprana y Apoptosis Tardía, que se pueden identificar con el doble marcaje Anexina/IP, comparando los datos de las muestras infectadas con los obtenidos en los controles.

Las barras de error muestran la desviación estándar. Nivel de significación para n=3: *p ≤ 0.05, **p ≤ 0.005,

Si bien el efecto global de ambos virus, tras 48 horas post-infección, parece ser semejante, volvemos a encontrar una diferencia de comportamiento a las 36 horas entre los dos virus. En el análisis del ciclo celular ya observamos la existencia de diferencias con respecto a la Fase celular S y G2/M, que si bien no repercutían en el efecto total de reducción de viabilidad, sí marcaban un punto de discordancia entre dos virus que, en principio, deberían ser idénticos en su comportamiento.

Si estas discrepancias son el reflejo de la existencia de diferencias en torno al modo de inducir la muerte celular en las células que son infectadas por estos virus, tendrá que estar necesariamente relacionado con la proteína quimérica FEX.

4.2.4. ANÁLISIS DEL PROGRAMA DE INDUCCIÓN DE APOPTOSIS MEDIADO POR CASPASAS.

La existencia de una respuesta de muerte celular por apoptosis deriva de la activación de unas proteasas llamadas caspasas. Las caspasas están implicadas tanto en el inicio de la activación del programa de muerte, sirviendo como nexo de unión entre el estímulo pro-apoptótico y la cascada de señalización, como en la ejecución de los últimos pasos o fase de finalización de la respuesta (activación de DNAsas y proteasas específicas).

El NDV es capaz de inducir apoptosis principalmente por vía intrínseca (Elankumaran *et al.*, 2006) aunque se ha visto que existe una activación de las rutas mediadas por receptor (vía extrínseca) en fases avanzadas de la infección y principalmente atribuidas a la respuesta mediada por TRAIL y su receptor DR4 (Washburn *et al.*, 2003), en ningún caso a través de FAS (Fabian *et al.*, 2007).

Quisimos comprobar si la sobreexpresión del receptor FAS durante el ciclo de infección del virus pudiera estar modificando el patrón general de activación de caspasas que desarrolla el NDV. Decidimos estudiar el perfil de activación de las caspasas iniciadoras 8 y 9 y el de la ejecutora caspasa-3. La caspasa-8 es la iniciadora relacionada con la activación de la apoptosis mediada por receptor y la más importante en la respuesta de activación de la vía extrínseca mediada por FAS; la caspasa-9 es la iniciadora ligada a inducción de apoptosis por vía intrínseca en el esquema general del NDV y la caspasa-3 es la ejecutora más importante y puede ser activada por ambas vías. La activación de las caspasas es dependiente de un procesamiento proteolítico de las formas precursoras o pro-caspasas (1.2.1.2). Los productos resultantes de su proteólisis son fácilmente identificables analizando los extractos proteicos celulares mediante *western blot*. El ensayo se diseñó tal y como está descrito en el apartado 3.4.4.8. Simultáneamente a la detección de las caspasas, se estudió la expresión de FAS por parte de las células infectadas así como se inmunodetectaron las proteínas del virus para constatar el progreso de la infección en las muestras (**Figura 53**).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Manteniendo las condiciones generales de nuestro trabajo, es decir, m.o.i de 1 y tiempo máximo post-infección de 48 horas, pudimos observar el siguiente patrón de activación de caspasas (**Figura 53**):

- Las células infectadas con el recombinante rNDV-B1/FAS mostraron una evidente activación de la caspasa-8 transcurridas 24 horas desde el inicio de la infección. La presencia de la forma activa se mantuvo durante el resto del tiempo en el que se llevó a cabo el ensayo. Como podemos ver en la **Figura 53**, el procesamiento proteolítico de la procaspasa-8 fue total, haciéndose detectable el péptido p18, componente estructural de los heterotetrámeros de la proteína activa, junto con p10 (1.2.2.2.2). La existencia de procesamiento proteolítico de la procaspasa-3 también se detectó a partir de las 24 horas post-infección. Esta activación sugiere una interconexión directa entre la actividad iniciadora de la caspasa-8 y su principal ejecutora, la caspasa-3. También se detectó caspasa-9 activa tanto a 24 horas como a 36 horas post-infección. Este hecho nos pareció relevante puesto que, si bien es conocido que la caspasa-9 es la principal iniciadora de la apoptosis mediada por el NDV, los datos que se conocen sobre ella afirman que su actividad está únicamente ligada a estadios avanzados de la infección (Ravindra *et al.*, 2009). En el caso de las células infectadas con el virus rNDV-B1/FAS su activación apareció de forma más temprana a como lo hizo en las infectadas por el rNDV-B1. Como ya mencionamos durante la introducción, en la apoptosis derivada de la activación de la ruta del receptor FAS, cuando los niveles de transformación de procaspasa-8 a caspasa-8 activa no son muy elevados, se puede producir una interconexión entre la vía extrínseca, dependiente de FAS, y la vía intrínseca dependiente de la respuesta mitocondrial (1.2.2.2.2). Esta interconexión se lleva a cabo a través de la proteólisis de la proteína Bid, la cual es ejecutada por la caspasa-8. Quisimos comprobar si la activación temprana de la caspasa-9 en nuestras muestras podría estar basada en este tipo de respuesta. Como puede observarse en la **Figura 53**, existe una disminución significativa de la forma no apoptótica de Bid (22kDa) a partir de las 24 horas post-infección, que además se mantuvo durante el tiempo restante del estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

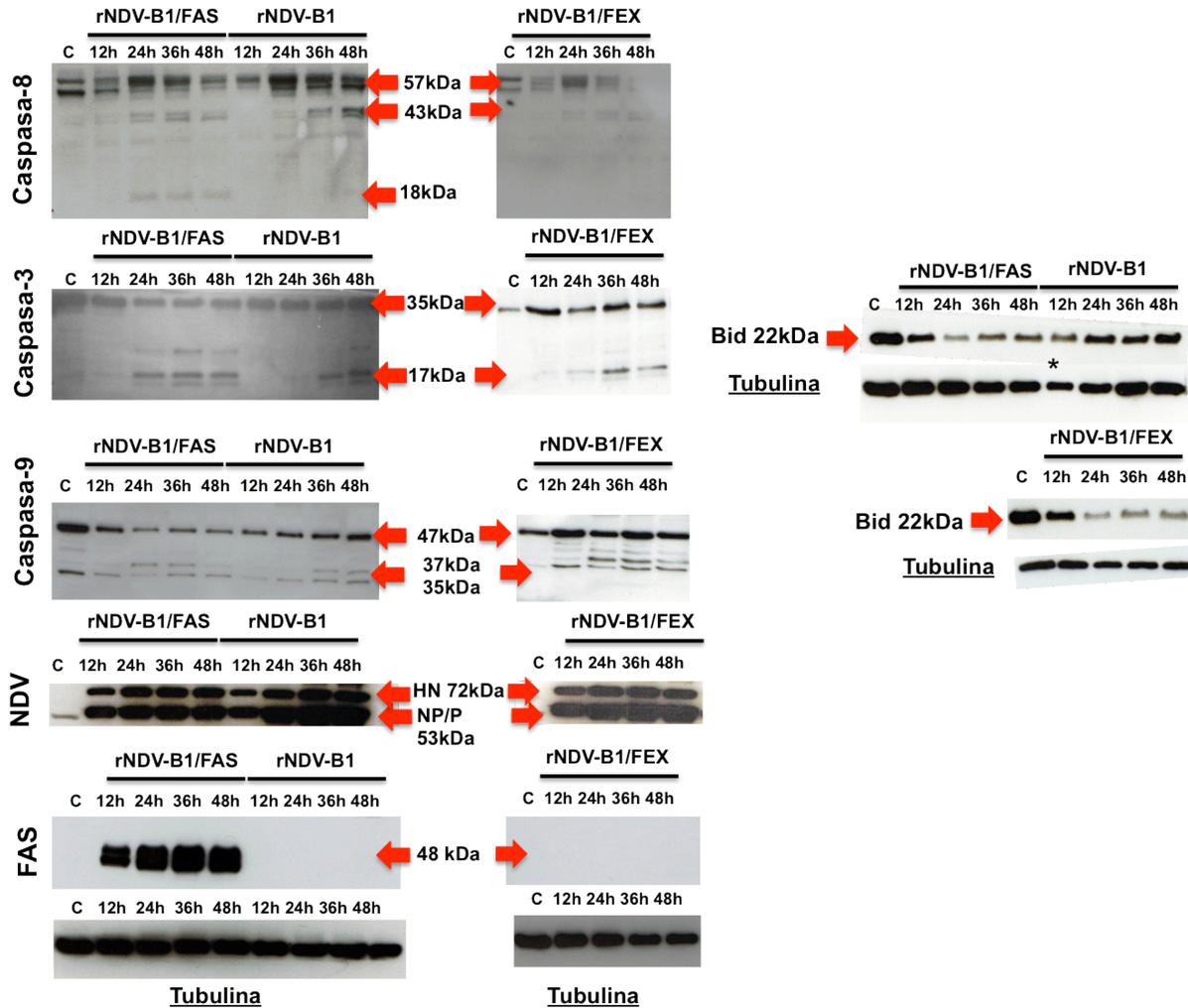


FIGURA 53. PATRÓN DE ACTIVACIÓN DE CASPASAS DESARROLLADO DURANTE LA INFECCIÓN CON LOS VIRUS rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX.

Western blot para la detección de las procaspasa-8, -9 y -3, así como la de sus productos derivados de la proteólisis que conlleva su activación. Extractos proteicos obtenidos a partir de células HeLa infectadas a una m.o.i igual a 1. Los pocillos se cargaron con 10 µg del extracto total de proteína obtenido en cada muestra y para cada tiempo de infección. Los anticuerpos y concentraciones usados para cada una de las proteínas se resumen en la **Tabla 10**.

Las Flechas rojas marcan la localización de las bandas correspondientes tanto a las procaspasas como los productos de su procesamiento proteolítico.

La figura incluye la inmunodetección del receptor humano FAS y de las proteínas víricas en todas las muestras y para cada tiempo de infección.

En el margen derecho se muestran los resultados obtenidos durante la detección de la proteína Bid.

En todos los casos se uso como control de carga la tubulina. El asterisco marca una diferencia de carga en la muestra.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Basándonos en el modelo de activación de la cascada de señalización del receptor FAS podemos proponer el siguiente modelo de actividad apoptótica del virus rNDV-B1/FAS: la activación típica de la cascada de señalización mediada por el receptor FAS se produce a partir de las 24 horas, momento en el cual podemos diferenciar perfectamente las formas activas de la caspasa-8 y que demuestra ser la principal vía de activación de la apoptosis inducida por el virus rNDV-B1/FAS, manteniéndose la presencia de caspasa-8 activa durante todo el tiempo del estudio. Posiblemente, en la ventana comprendida entre las 12 y 24 horas post-infección, se esté produciendo una activación de caspasa-8 a niveles más bajos o una activación incompleta de la misma y cuya manifestación parece corresponderse con una respuesta primaria del receptor, con insuficiente caspasa-8 para activar directamente a la caspasa-3, pero suficiente para transformar Bid en su forma truncada. De este modo se desencadenaría la respuesta de muerte celular a través de la vía intrínseca o mitocondrial. Este hecho apoya la existencia de caspasa-9 activa de forma más temprana a como ocurre con el virus rNDV-B1.

- El patrón de activación de caspasas generado por la actividad del virus rNDV-B1 respondió a lo esperado, basándonos en los datos existentes en la bibliografía. Apareció una proteólisis primaria leve de la procaspasa-8 (p43 y p45) a las 24 horas post-infección, la cual se hizo más evidente a partir de las 36 horas. Pero en ningún caso derivó en la proteólisis final, a p18 y p10, necesaria para la formación del heterotetrámero activo. La caspasa-3 apareció en su forma activa a partir de las 36 horas, del mismo modo a como ocurrió en la activación de la caspasa-9. Como era de esperar, fue a partir del momento en el que pudimos detectar caspasa-9 activa cuando se detectó la presencia de la forma activa de la ejecutora caspasa-3. La imagen obtenida para la detección de Bid demostró que los niveles de la forma no activa de Bid se mantuvieron durante todo el proceso, por lo que no existe interconexión con la vía extrínseca mediada por FAS.
- En el caso de las células infectadas con el virus rNDV-B1/FEX pudimos observar un tercer patrón de activación diferente: a nivel de la activación de la procaspasa-8 el virus se comportó igual que el rNDV-B1, no pudiéndose apreciar en ningún momento un procesamiento completo de la proteína.

Sin embargo pudimos ver que la caspasa-9 se encontraba en su forma activa tras 24 horas post infección, de manera más temprana a como aparece en el patrón de activación descrito por el rNDV-B1.

Cuando analizamos si existía o no modificación en los niveles de Bid pudimos observar que, del mismo modo a como ocurría con el virus rNDV-B1/FAS, existió una disminución de la forma inactiva de Bid, a partir de 24 horas post-infección. Estudios realizados con proteínas recombinantes que expresan el dominio N-terminal de FAS y que carecen del dominio C-terminal han demostrado que éste posee cierta capacidad para activar el reclutamiento de FADD y la procaspasa-8 a nivel de la membrana e inducir una respuesta de bajo nivel (Papoff *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2000). Nuestros resultados obtenidos por microscopía en los que observamos la aparición de *spots* apoyan la posibilidad de que se estén formando los microagregados necesarios para que se inicie esta fase primaria de activación. Sin embargo, y como ya hemos valorado con los ensayos anteriores de viabilidad, el efecto inducido por FEX nunca supone una potenciación de la capacidad apoptótica con respecto al rNDV-B1, lo cual se justificaría si esa respuesta primaria que parece tener estuviera siendo contrarrestada por alguno de los mecanismos de control de la vía mediada por FAS (1.2.2.2.3). Parece que la presencia de FEX podría desencadenar una modificación con respecto al patrón general de activación de caspasas del NDV, a diferencia de la modificación y potenciación demostrada por la sobreexpresión de FAS. Se necesitaría profundizar más en el estudio de esta proteína para definir su papel real.

4.2.4. ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA EN CÉLULAS INFECTADAS POR LOS VIRUS rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX.

La característica definitoria principal de la apoptosis es la aparición de Pícnosis o fragmentación del material genético. Anteriormente ya se expusieron resultados en los que habíamos identificado la existencia de núcleos con morfologías aberrantes en células infectadas así como identificado poblaciones Sub-G0 en el estudio del impacto de la infección sobre el ciclo celular.

En esta ocasión quisimos evaluar el estado del DNA de las células durante el transcurso de la infección y ver si los resultados eran consistentes con los datos obtenidos del estudio del programa de inducción de apoptosis mediado por caspasas, para cada uno de los virus. Las condiciones tanto de infección como de tiempo de incubación fueron las generales de nuestro trabajo (m.o.i de 1 y evaluación a las 12, 24, 36 y 48 horas post-infección).

Como se muestra en la **Figura 54**, a pesar de que en las muestras procedentes de los tres virus se vio un elevado impacto a nivel de la estabilidad del DNA, las muestras obtenidas a partir de células infectadas con el virus rNDV-B1/FAS presentaron mayor grado de degradación, apareciendo a partir de las 24 horas fragmentos de tamaños moleculares menores a 500 pares de bases.

En el caso de las células infectadas por los virus rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX aunque el DNA estaba completamente dañado no se observó esa fragmentación o *laddering* presente en las muestras del recombinante rNDV-B1/FAS.

Durante el desarrollo de la fase ejecutora o final del programa de apoptosis, existen varias endonucleasas implicadas en la fragmentación del DNA. Las endonucleasas AIF y G se liberan desde la mitocondria durante la inducción de apoptosis por vía intrínseca y son las encargadas de generar los primeros daños a nivel del material genético a partir de la inducción de cortes que permitirán la condensación del DNA. Esta fragmentación aparece de forma temprana y el daño inducido a nivel del DNA se conoce como estadio I de condensación. Ni la actividad de AIF ni la de la endonucleasa G dependen de la activación de la caspasa-3. Sin embargo y en lo que se ha conocido como estadio II de condensación, el DNA es digerido por acción de la endonucleasa CAD, que como hemos advertido en la introducción, su actividad es dependiente de la caspasa-3 (1.2.1.5).

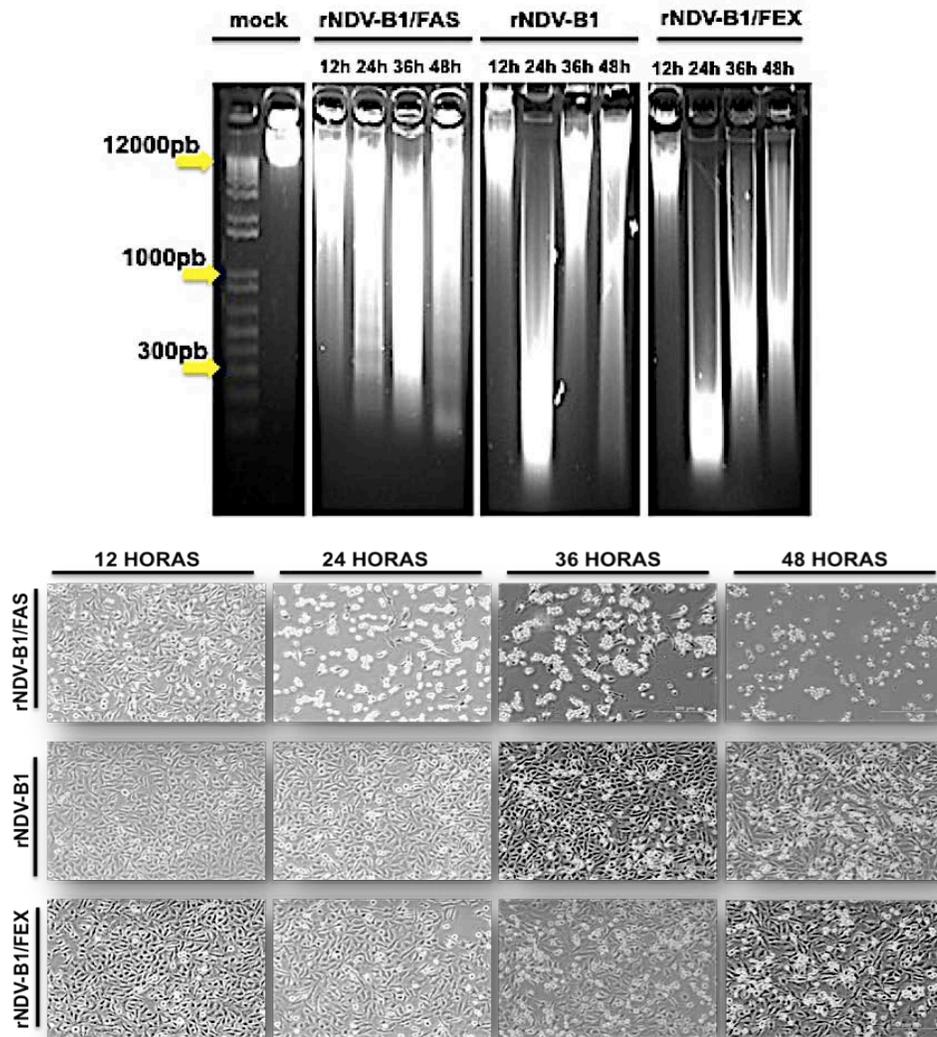


FIGURA 54. DETECCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA INDUCIDA TRAS LA INFECCIÓN CON LOS VIRUS rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX.

Parte superior: electroforesis en gel de agarosa del DNA subgenómico extraído de los cultivos celulares infectados durante el desarrollo del ensayo. A la derecha se muestra el marcador de peso molecular, 1kb DNA *ladder* y los tamaños de tres bandas como referencia. De izquierda a derecha se muestran los resultados obtenidos para las células control (MOCK), y las obtenidas para los virus rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX, respectivamente.

Parte inferior: células HeLa infectadas por los recombinantes rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX, respectivamente. Imágenes pertenecientes a las placas de las que se extrajo el material genético, captadas con un objetivo 10X.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A la vista de los resultados obtenidos, y en consonancia con los patrones de activación de caspasas, podríamos concluir que el DNA de las células infectadas por los virus rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX parece estar aun en una fase temprana o estadio I de condensación, el cual estaría motivado por la activación de la vía intrínseca de inducción de muerte celular que, como ya hemos podido constatar en el estudio de la actividad de caspasa, es la vía principal de activación apoptosis en ambos casos.

En el caso del recombinante rNDV-B1/FAS parece que el daño ocasionado en el DNA de las células que infecta presenta un perfil de estadio II, más avanzado y en todo caso motivado por la activación de la caspasa-3.

Como se muestra en la **Figura 54**, este daño en el DNA es un reflejo de lo que sucede en las poblaciones celulares desde las que se extrajeron las muestras.

4.3. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ONCOLÍTICA DE LOS VIRUS RECOMBINANTES rNDV-B1/FAS, rNDV/B1 y rNDV-B1/FEX EN TUMORES SÓLIDOS.

El virus de la enfermedad de Newcastle está incluido dentro del grupo de virus con capacidad oncolítica mas estudiados en la actualidad (1.3.2). La versatilidad que ofrece la metodología de la genética inversa a la hora de generar NDVs recombinantes ha abierto las puertas a poder desarrollar virus con mayor potencial terapéutico.

Los virus recombinantes rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX fueron desarrollados para demostrar la posibilidad de incrementar la capacidad oncolítica del virus nativo NDV-B1 a través de la potenciación de la respuesta apoptótica en las células infectadas. Como han demostrado nuestros resultados previos en líneas tumorales humanas el virus rNDV-B1/FAS es capaz de inducir la respuesta de muerte celular por apoptosis en mayor grado y de manera más temprana a como ocurre en los cultivos celulares infectados por el rNDV-B1 o por el rNDV-B1/FEX. Aunque la experimentación en cultivos celulares puede ser, en muchas ocasiones, reflejo de lo que ocurre *in vivo*, solamente es posible ver la repercusión real del posible potencial terapéutico de un virus en un modelo animal con un sistema inmunológico activo.

Quisimos comprobar si la respuesta a la infección con nuestros virus recombinantes tendría la misma repercusión en tumores sólidos desarrollados en ratón que en las líneas celulares tumorales en cultivo. Se evaluó la capacidad oncolítica de los virus sobre dos modelos de tumores singénicos diferentes desarrollados con células de carcinoma de colon (CT26) y células de melanoma (BLACK6) en ratones BALB-C y BLACK6, respectivamente. Los estudios realizados en modelo murino se desarrollaron gracias a la colaboración con el grupo de investigación del Doctor Adolfo García-Sastre, en el Departamento de Microbiología del Hospital Monte Sinaí, en Nueva York (USA), y bajo la tutela del Doctor Mena Mansour.

Antes de comenzar el trabajo en ratones, las dos líneas celulares se infectaron con los virus recombinantes rNDV-B1/FAS, rNDV/B1 y rNDV-B1/FEX y se evaluaron tanto la localización de las proteínas FAS y FEX como la capacidad de inducción de apoptosis, usando como marcador único la activación de la caspasa-3 (**Figura 55**).

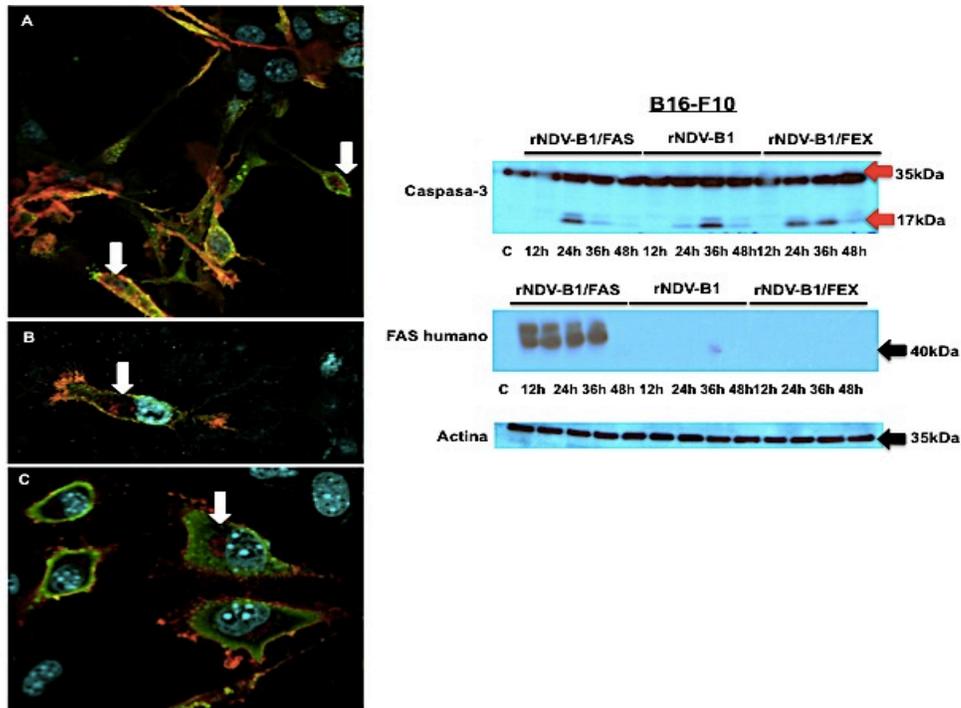


FIGURA 55. INFECCIÓN DE CÉLULAS B16-F10 Y CT26.

Izquierda: inmunodetección de las proteínas FAS y FEX en células CT26 y B16-F10. Microscopia confocal. Tras la infección (16 horas, m.o.i de 1) las células fueron incubadas con los anticuerpos policlonal anti-NDV (secundario Alexa-Fluor488, **señal verde**), anti-FAS humano (secundario Alexa-Fluor568, **señal roja**) y Hoestch para el contraste nuclear (**señal azul**). Las flechas blancas indican puntos de localización intracelular del receptor. Objetivo 60X.

A. CT26 infectadas con el recombinante rNDV-B1/FAS.

B. CT26 infectadas con el recombinante rNDV-B1/FEX.

C. B16-F10 infectadas con el recombinante rNDV-B1/FAS

Derecha: patrón de activación de la caspasa-3 en la línea B16-F10. También se muestra la expresión del receptor humano FAS. En todos los casos se cargaron 10 µg de la proteína total extraída en cada muestra. Las flechas rojas indican las formas pro-caspasa y caspasa activa. Las flechas negras indican la posición de la banda del marcador y el peso molecular. Los resultados obtenidos con la línea CT26 fueron idénticos, aunque no se muestran.

El procedimiento de la implantación y desarrollo de tumores sólidos se detalla en el apartado 3.4.5.1. Una vez generados los tumores éstos fueron infectados con los virus durante tres días consecutivos, tal y como se recoge en el apartado 3.4.5.2. y la variación del volumen de la masa tumoral se evaluó cada 48 horas desde el comienzo del tratamiento (Día 0). En la **Figura 56** se muestra un esquema de los pasos generales que componen el proceso.

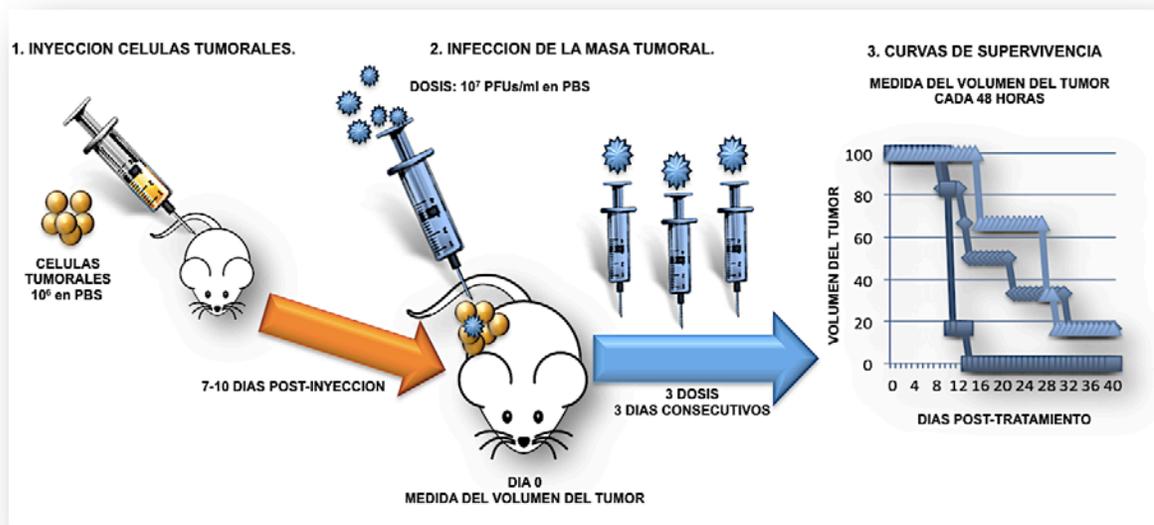


FIGURA 56. ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO SEGUIDO PARA LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ONCOLÍTICA DE LOS VIRUS RECOMBINANTES rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX EN TUMORES SÓLIDOS.

La implantación de las células se realizó a nivel subcutáneo o intradérmico, según el estudio. Nuestro ensayo precisó de tres inyecciones o dosis víricas de 10^7 pfu/ml durante tres días consecutivos. El día 0 experimental es en el que se realiza la primera inyección. El procedimiento es el mismo tanto para el modelo de carcinoma de colon como para el de melanoma.

La primera evaluación de la capacidad oncolítica de nuestros virus se llevó a cabo sobre tumores singénicos de carcinoma de colon en ratones BALB-C. Los ratones que generaron tumores con un volumen semejante se dividieron en tres grupos experimentales, uno para cada virus implicado en el ensayo, estando cada grupo formado por seis individuos. Tras tres dosis consecutivas de 10^7 pfu/ml, inyectados de manera subcutánea, se procedió a valorar el efecto de la terapia. Como podemos ver en la **Figura 57**, ninguno de los individuos del grupo experimental tratado con el virus rNDV-B1 demostró una reducción en el tamaño de los tumores. Como vimos en los resultados obtenidos *in vitro*, el efecto citotóxico del virus rNDV-B1 es mayor entre las 36 y 48 horas post-infección. Sin embargo los tumores duplicaron su volumen prácticamente cada 48 horas, lo cual fue indicativo de que la muerte celular inducida por del virus no estaba siendo capaz de contrarrestar el crecimiento del tumor.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

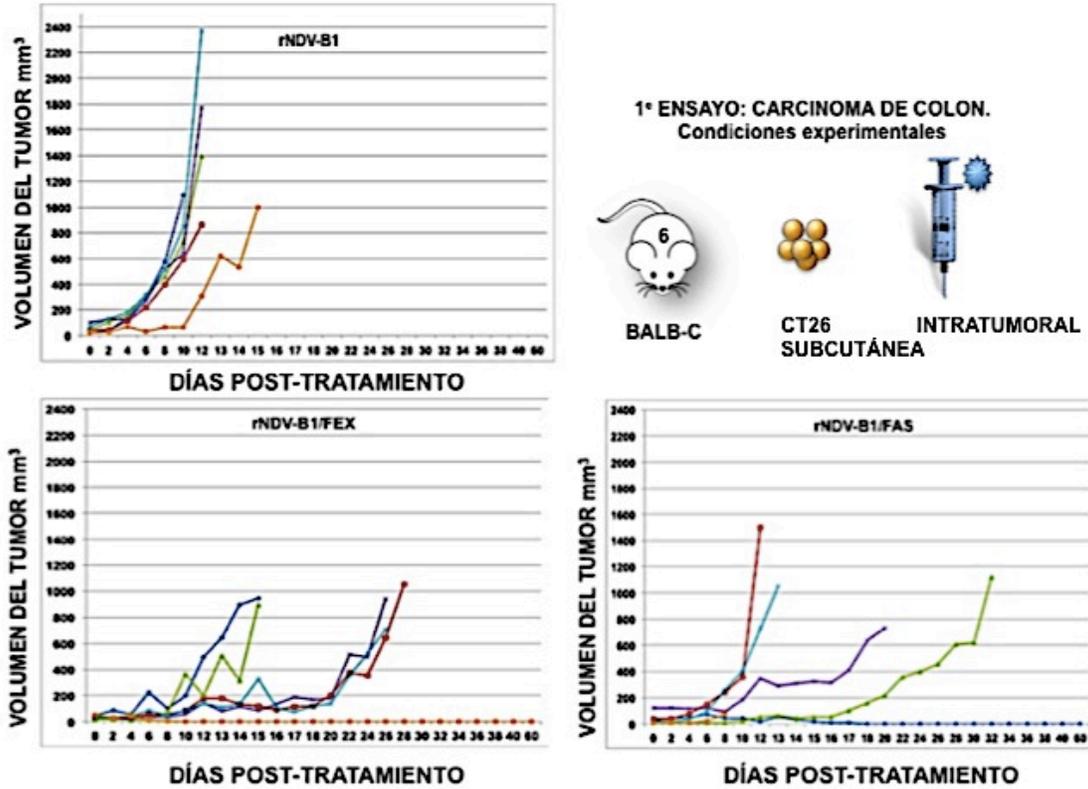


FIGURA 57. PRIMER ENSAYO EN MODELO SINGÉNICO DE CARCINOMA DE COLON DE RATÓN. CURVAS DE SUPERVIVENCIA DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES TRATADOS CON LOS VIRUS rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX.

La implantación de las células se realizó a nivel subcutáneo. Se llevaron a cabo tres inyecciones o dosis víricas de 10^7 pfu/ml durante tres días consecutivos. El día 0 experimental es en el que se realiza la primera inyección.

Los colores identifican la cinética del crecimiento del tumor para cada uno de los individuos que formaron parte en el estudio. Solo se muestran los resultados obtenidos durante los dos primeros meses post-tratamiento.

Los animales del grupo experimental tratado con el rNDV-B1 tuvieron que ser sacrificados durante los 12 primeros días post-tratamiento debido a que los tumores alcanzaron los niveles máximos de volumen de tumor permitidos en el reglamento establecido para este tipo de experimentación animal. Solo uno de los individuos, con un volumen de tumor inicial menor que los demás, prolongó su supervivencia hasta el día 15 post-tratamiento.

Los animales de los grupos tratados con los virus rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX vieron incrementada su supervivencia en comparación con los del grupo tratado con el virus rNDV-B1:

- En el grupo experimental tratado con el virus rNDV-B1/FAS tres de los animales de experimentación tuvieron que ser sacrificados de forma temprana al desarrollar tumores intramusculares, sumamente agresivos, debido a un fallo procedimental a la hora de inyectar las células a nivel subcutáneo (**Figura 57; Grupo rNDV-B1/FAS, curvas roja, naranja y azul claro**). Los restantes tres individuos mostraron como el crecimiento del tumor era contrarrestado por la acción de los virus de manera excepcional durante la primera semana post-tratamiento, no apreciándose diferencias significativas entre el volumen del tumor tras 8 días post-tratamiento con el volumen a día 0. Transcurrida la primera semana del tratamiento se pudo observar que aunque se apreciaba un incremento del volumen del tumor, especialmente en uno de los individuos (**Figura 57; Grupo rNDV-B1/FAS, curva malva**), éste seguía siendo contrarrestado y el crecimiento del tumor llegaba a estabilizarse durante periodos de hasta 5 días consecutivos, en los que no apreciamos aumento del volumen. Este patrón implica que la actividad del virus. Tras 20 días post-infección se sacrificó al cuarto animal de este grupo ya que presentó un elevado grado de ulceración a nivel del tumor y tanto su salud como los datos que se pudieran obtener de él se verían comprometidos (**Figura 57; Grupo rNDV-B1/FAS, curva malva**). De los dos individuos restantes, si bien podemos destacar la prolongación de la supervivencia más de 34 días en ambos casos, uno de ellos presentó reversión total del tumor y permanece vivo en la actualidad (9 meses post-tratamiento), sin que el animal haya presentado ningún signo de enfermedad o patología durante todo este periodo.
- El grupo experimental tratado con el virus rNDV-B1/FEX no presentó ningún individuo con tumor intramuscular. La supervivencia de los componentes de este grupo se prolongó en la mayoría de los casos hasta 30 días desde el comienzo del tratamiento. En las cinéticas del crecimiento del tumor se pudo observar como la acción del virus se producía a intervalos de 48 horas y cuya manifestación en las gráficas es la aparición de picos de aumento y disminución del volumen del tumor cada 4 días.
Uno de los seis componentes del grupo experimental presentó reversión total del tumor y su supervivencia se ha prolongado hasta el día de hoy sin que presentara durante el transcurso de los 9 meses ninguna patología.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos durante este primer ensayo demuestran que tanto el virus rNDV-B1/FAS como el rNDV-B1/FEX tienen mayor capacidad oncolítica que el rNDV-B1. Como podemos ver en la gráfica de supervivencia (**Figura 58**), el tratamiento con los virus rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX de los tumores singénicos, desarrollados a partir de células de carcinoma de ratón, incrementa la supervivencia de los individuos durante la progresión del tumor en comparación con el efecto generado por el rNDV-B1. Ambos tratamientos consiguen un 16,6% de supervivientes que presentan reversión total del tumor (33% en el caso del rNDV-B1/FAS si no consideramos los animales que tuvieron que ser sacrificados por presentar tumores intramusculares), sin que se haya observado, durante el transcurso de los 9 meses desde que se administró el tratamiento, ningún efecto secundario derivado de la viroterapia.

La respuesta obtenida en el primer tratamiento en el modelo subcutáneo de carcinoma de colon, en los ratones BALB-C, nos hizo plantearnos cuanta responsabilidad real tenía el efecto de la viroterapia sobre la remisión del tumor y cuál sería la contribución de la respuesta del sistema inmunitario en este resultado.

La limitación de tiempo en la estancia de colaboración nos impidió realizar un análisis serológico que vislumbrara como estaba reaccionando el sistema inmune contra el tumor. Aun así, planteamos un ensayo que de forma simple pudiera mostrarnos si había o no colaboración virus-sistema inmune en la eliminación de los tumores. Este nuevo ensayo consistió en inyectar las células tumorales CT26 a nivel intradérmico. De esta manera los tumores se desarrollarían en áreas más vascularizadas y en consecuencia más accesibles a una posible reacción contra el tumor por parte del sistema inmunitario. Como contraprestación el tumor se desarrollaría más rápidamente que en el modelo subcutáneo, al estar más irrigado.

El ensayo se llevó a cabo incorporando un nuevo grupo experimental cuyo tratamiento consistió en tres dosis consecutivas del tampón PBS. En esta ocasión cada grupo estuvo formado por cinco animales.

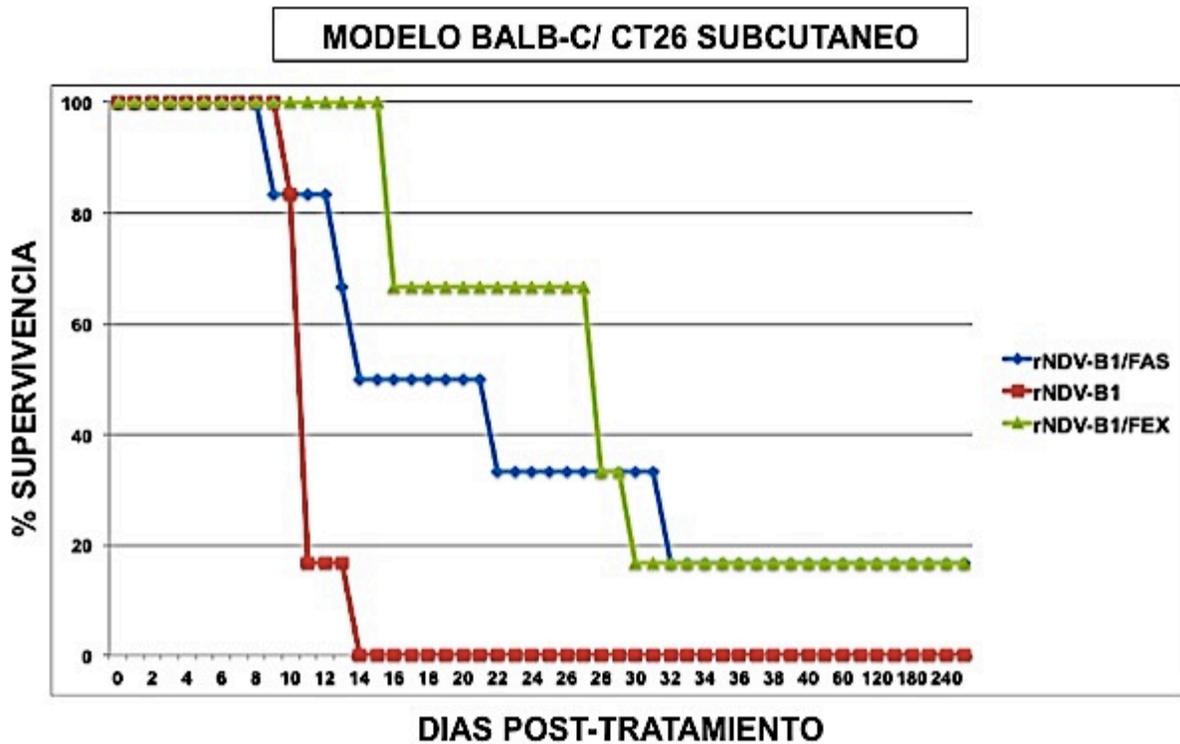


FIGURA 58. SUPERVIVENCIA POST-TRATAMIENTO CON LOS VIRUS rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX DE TUMORES SÓLIDOS GENERADOS EN RATONES BALB-C.

Curvas de supervivencia de los grupos experimentales del primer ensayo realizado sobre ratones BALB-C en los que se desarrollaron tumores sólidos con la línea celular de carcinoma de colon de ratón CT26.

Los resultados obtenidos en esta ocasión (**Figura 59**) demostraron que sólo los tumores infectados con el virus rNDV-B1/FAS mantuvieron el control de la progresión del tumor durante los primeros 8 días. Esta capacidad de contrarrestar la agresividad del crecimiento de las células cancerígenas fue debilitándose progresivamente según se alargaba el tiempo con respecto al último día de tratamiento. La supervivencia de los individuos que formaron parte de este grupo experimental llegó a prolongarse más del doble de tiempo, en comparación con los resultados obtenidos en los otros tres grupos experimentales, pero en ningún caso se observó la reversión total del tumor. Tanto los tratamientos con PBS como con el virus rNDV-B1 demostraron ser incapaces de sostener el crecimiento de las células del tumor y los ratones de ambos grupos fueron sacrificados alrededor de las dos semanas post-tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Solo dos de los componentes del grupo tratado con el virus rNDV-B1/FEX fueron capaces de superar la tasa de supervivencia obtenida con los tratamientos con PBS y el virus rNDV-B1, siendo la diferencia, en el mejor de los casos, de 4 días.

La explicación más intuitiva que podríamos dar a estos resultados es que la posibilidad de una exposición temprana de los virus fuera de lo que se correspondería con el entorno tumoral, facilitada por la alta irrigación del área de implantación del tumor, podría adelantar su detección por parte del sistema inmunitario. Si esto ocurre, la capacidad oncolítica de la progenie vírica producida en la masa tumoral tras los primeros ciclos de replicación se vería altamente comprometida por el bloqueo que la respuesta inmunitaria produciría en la infección. Si la progenie vírica generada en la masa tumoral es detectada y bloqueada por la respuesta inmune de manera temprana se pierde gran parte de los beneficios de usar virus como agentes terapéuticos. Nosotros, al igual que otros investigadores, pensamos que el reto es conseguir una viroterapia efectiva que combine el efecto citotóxico del virus sobre la célula tumoral con la presentación de antígenos víricos o proteínas inmunoestimuladoras que puedan ser reconocidas en la superficie de las células tumorales y puedan desencadenar, en una segunda fase complementaria a la viroterapia, una respuesta humoral frente al tumor. Nuestros virus recombinantes, capaces de expresar el receptor FAS y la proteína quimérica FEX, que porta el dominio N-terminal de FAS, son a priori unos excelentes candidatos a desarrollar un programa combinado de muerte celular por apoptosis, mediada tanto por el virus como por una posible apoptosis inducida por el sistema Perforina-Granzima. Los linfocitos T citotóxicos (CTLs) sólo activan el proceso de muerte celular por apoptosis, a través del sistema perforina-granzima en aquellas células en las que reconocen el receptor FAS en la superficie de la membrana, anclándose a ellas mediante la interacción FAS-FAS_L. Además se ha demostrado que el NDV estimula de forma natural la producción de citocinas que activarán la respuesta de los CTLs, entre otros (Schirmacher *et al.*, 1999). Solamente realizando un perfil serológico y analizando la infiltración de células del sistema inmune en el tumor, durante nuestros experimentos, seremos capaces de inferir si este sistema puede estar llevándose a cabo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

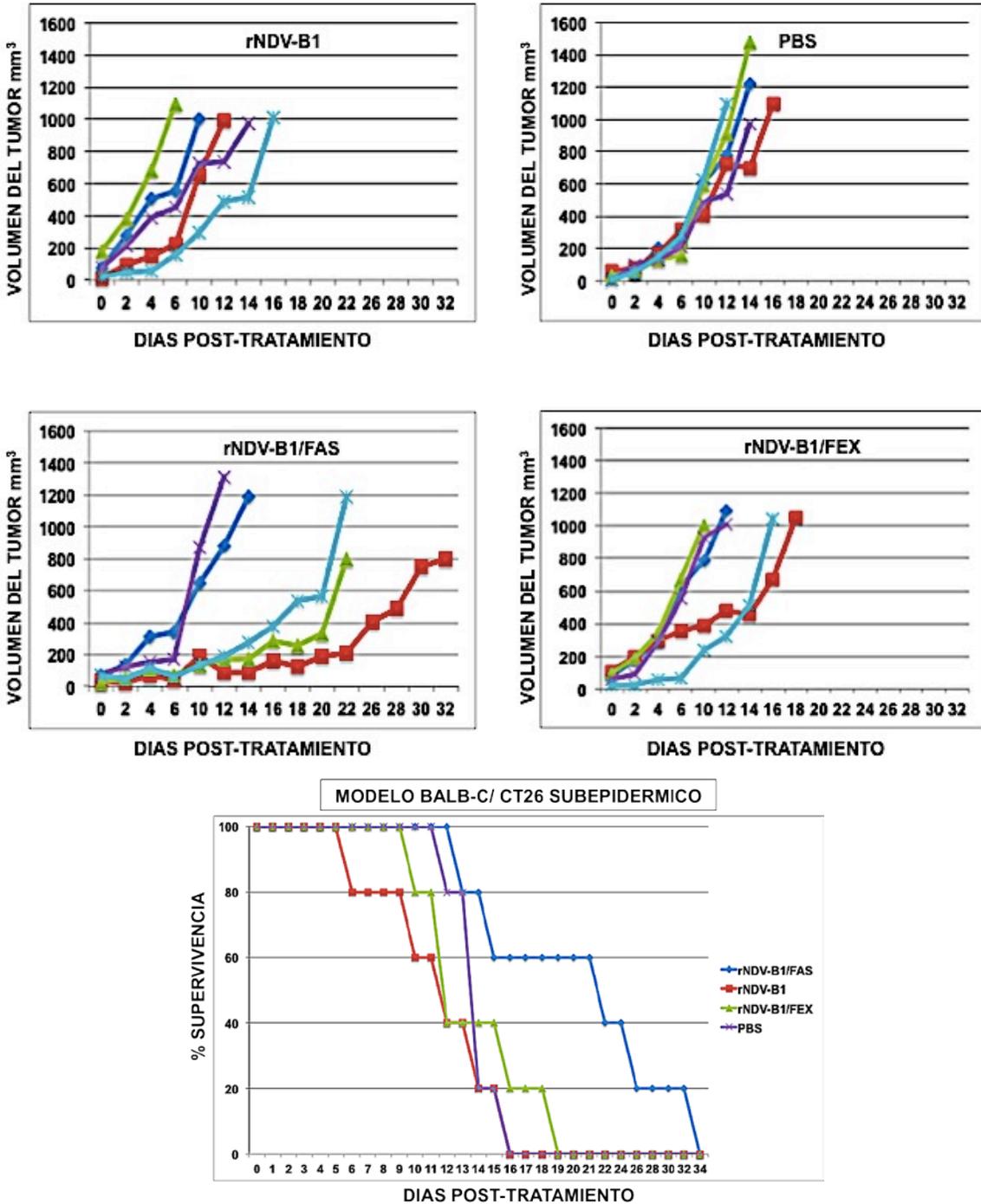


FIGURA 59. GENERACIÓN DE TUMORES MEDIANTE INYECCIÓN INTRADÉRMICA DE CÉLULAS TUMORALES EN RATONES BALB-C.

Cinética del crecimiento y curvas de supervivencia obtenidos durante el segundo ensayo realizado sobre ratones BALB-C. Los tumores se desarrollaron mediante la inyección intradérmica de células CT26 de carcinoma de colon murino. En este experimento se añadió un cuarto grupo de estudio en el que los ratones solamente recibieron tres dosis del tampón PBS como tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para conseguir un verdadero efecto terapéutico se hace imprescindible conocer exactamente como está actuando el sistema inmunitario. Solo entonces podremos diseñar un programa de dosificación eficaz que combine el potencial oncolítico de nuestros virus con la respuesta inmune frente al tumor. Estamos convencidos de que una vez que podamos estudiar la respuesta inmunológica generada durante el tratamiento seremos capaces de mejorar la respuesta obtenida sobre tumores con alta tasa de irrigación.

El último de los estudios que realizamos fue desarrollando un modelo de tumor singénico de melanoma en ratones BLACK6 a partir de la implantación de células B16-F10. De modo general cuando se desarrolla este tipo de tumor se suelen inyectar las células en el pie del animal, proceso que es altamente doloroso para los mismos tanto en la fase de inyección como durante el desarrollo del tumor. Nosotros decidimos realizar la inyección de las células en el flanco de la pata tal y como habíamos realizado en los ratones BALB-C. La complejidad de trabajar con los ratones BLACK6 radica en que a diferencia de los BALB-C, los BLACK6 se muestran menos colaboradores durante todo el procedimiento. Esto, combinado con su menor tamaño, la elevada sensibilidad al isofluorano y la dificultad de visibilidad que ofrece su piel oscura, nos hizo desistir de la idea inicial que era desarrollar otro modelo de tumor intradérmico. Así pues, la inyección de las células B16-F10 de melanoma de ratón tras la generación de los tumores en los ratones se procedió a administrar el tratamiento. se realizó de igual manera a como se hizo con anterioridad.

Los resultados obtenidos con el modelo de melanoma fueron, en nuestra opinión, los más importantes durante esta primera inmersión en el trabajo con animales de experimentación (**Figura 60**). Si bien es por todos conocido que el melanoma es uno de los tumores más agresivos y de peor pronóstico en humanos, fue precisamente en este modelo en el que nuestros virus demostraron tener una extraordinaria capaz de limitar el progreso del tumor y en el que más numero de reversiones observamos. Como se muestra en la **Figura 60**, mientras que tanto el tratamiento con PBS como con el virus rNDV-B1 volvieron a manifestarse como ineficaces, los resultados con los virus recombinantes rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX fueron muy significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

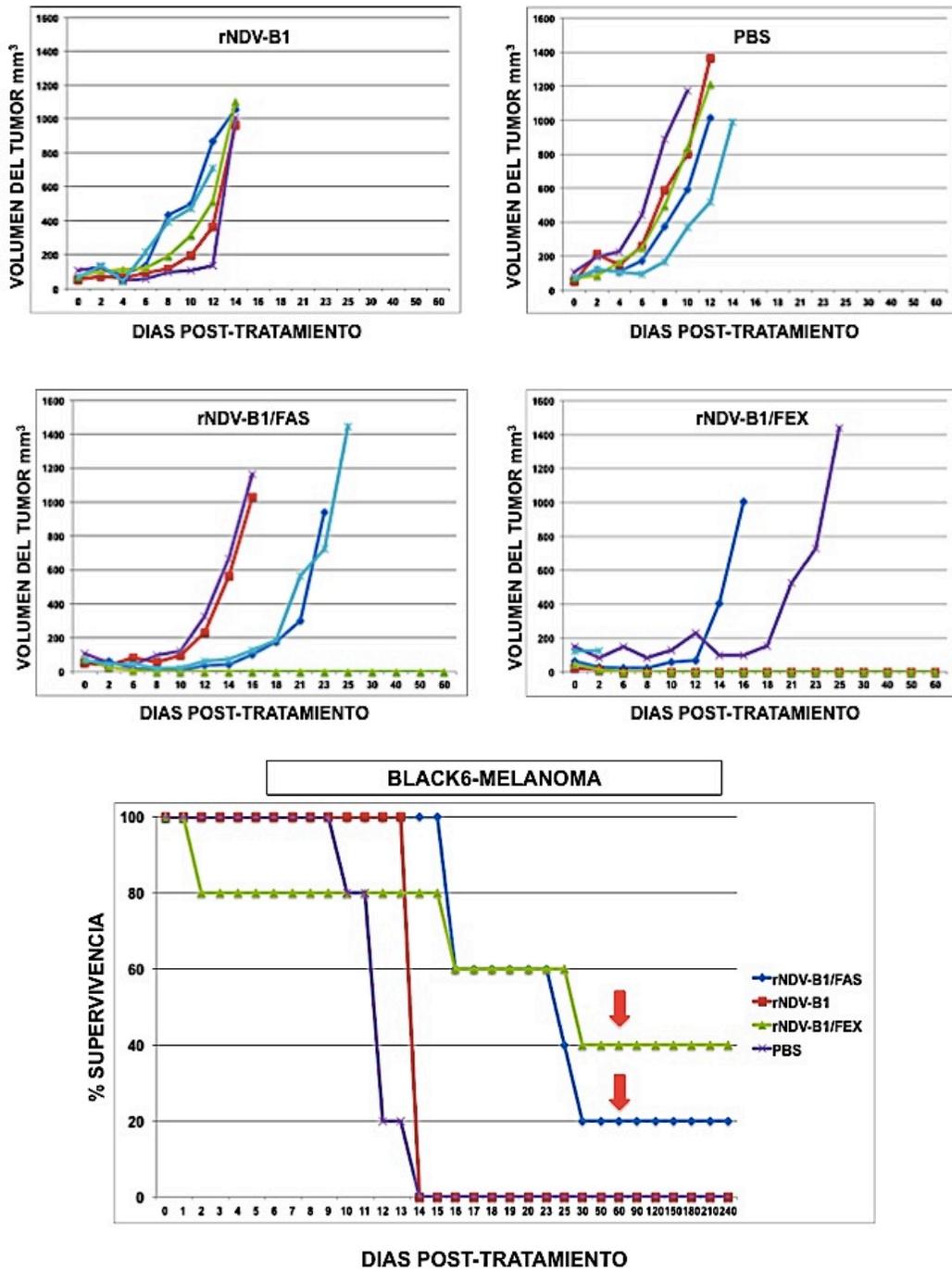


FIGURA 60. DESARROLLO DE TUMORES SINGÉNICOS CON CÉLULAS B16-F10 DE MELANOMA DE RATÓN

Cinética del crecimiento y curvas de supervivencia obtenidos durante el segundo ensayo realizado sobre ratones BLACK6. Las flechas rojas marcan el momento en el que se volvieron a inyectar células B16-F10 en los ratones que ya habían superado el primer tumor.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los virus fueron capaces de controlar la progresión del tumor de manera especialmente importante durante las dos primeras semanas y hasta tres semanas post-tratamiento en el caso del grupo experimental del rNDV-B1/FAS. En este ensayo obtuvimos reversión total del tumor en dos de los componentes del grupo experimental tratado con el virus rNDV-B1/FEX y uno en el del virus rNDV-B1/FAS lo cual se corresponde con un porcentaje de supervivencia del 40% y del 20%, respectivamente.

Tras demostrar la estabilidad de la reversión del tumor, habiendo transcurrido tres meses desde que se administró por primera vez el tratamiento, decidimos dar un paso más en esta primera aproximación al trabajo con el modelo animal. Si nuestra teoría era cierta y nuestros virus recombinantes eran capaces de inducir una respuesta inmune frente al tumor, una segunda implantación de células B16-F10 en los animales que ya superaron su implantación en la primera fase de nuestro estudio podría desencadenar una respuesta inmunitaria específica frente a las células B16-F10 y detener el progreso de la masa tumoral. Así lo hicimos y hasta el día de hoy, 6 meses después de la segunda implantación, los ratones no han mostrado signo de desarrollo de tumor ni han presentado patologías secundarias en respuesta al tratamiento recibido.

Como destacamos durante la introducción, son tres las estrategias que se están siguiendo en la actualidad para intentar conseguir una viroterapia eficaz: redirigir el virus a tejidos específicos, potenciar la capacidad de inducción de muerte en las células tumorales que son infectadas y disminuir la respuesta inmune derivada del uso de virus como agentes terapéuticos. El virus rNDV-B1/FAS ha demostrado tener una extraordinaria capacidad oncolítica en todos los modelos celulares analizados así como en el modelo animal. A falta de los estudios de respuesta inmunitaria, pero basándonos en los resultados obtenidos con la reimplantación de células de melanoma, parece que en modelo animal tanto el rNDV-B1/FAS como el rNDV-B1/FEX potencian la respuesta inmune frente al tumor pudiéndose generar memoria frente a las células cancerígenas.

A la vista de los resultados obtenidos hasta el momento, tanto *in vitro* como *in vivo* con los virus recombinantes rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX creemos justificado proseguir con los estudios sobre la capacidad oncolítica de estos virus. Son muchas las preguntas a las que hay que dar respuesta aún y mucha la información útil que creemos pueden proporcionar.

CONCLUSIONES

1. Se han construido y rescatado virus de la enfermedad de Newcastle recombinantes de la cepa Hitchner B1 con la fase de lectura abiertas del TNFRSF6 (FAS) y de una quimera FAS/proteína F del NDV.
2. Los virus recombinantes rNDV-B1/FAS, rNDV-B1 y rNDV-B1/FEX son infectivos y tienen una capacidad replicativa semejante en todas las líneas celulares estudiadas. Las células infectadas con los virus rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX expresan de manera elevada las proteínas FAS y la quimera FEX, lo que les valida como excelentes vectores de expresión de proteínas foráneas.
3. Los viriones de las progenies generadas en las células infectadas por los virus rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX incorporan las proteínas FAS y FEX a su envoltura.
4. Las proteínas FAS y FEX demuestran tener un procesamiento post-transcripcional adecuado, incorporándose correctamente a la membrana citoplasmática de las células. En el caso de la proteína FAS se ha detectado su localización endosómica derivada de la activación e internalización del receptor.
5. El virus rNDV-B1 activa la apoptosis celular tal y como está descrito para el virus parental NDV-B1. A diferencia del comportamiento del rNDV-B1, el virus rNDV-B1/FEX parece activar de manera temprana de la vía extrínseca. Por su parte, el programa de inducción de apoptosis desarrollado por el virus rNDV-B1/FAS activa tanto la vía mediada por receptor como la mitocondrial, cuyo reflejo es un mayor efecto citopático y de reducción de la viabilidad en todos los cultivos celulares tumorales evaluados en este trabajo.
6. Los virus rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX han demostrado tener mayor potencial oncolítico que el virus rNDV-B1 en los tumores singénicos de carcinoma de colon y melanoma desarrollados en el modelo murino. La supervivencia de los ratones es incrementada tras el tratamiento con los virus rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX, llegándose a producir reversiones totales de los tumores en ambos tipos de tumores. La viroterapia antitumoral con los virus rNDV-B1/FAS y rNDV-B1/FEX parece inducir memoria inmunológica contra el tumor.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Adachi, M., S. Suematsu, T. Suda, D. Watanabe, H. Fukuyama, J. Ogasawara, T. Tanaka, N. Yoshida, and S. Nagata.** 1996. Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:2131-2136.
2. **Alexander, D. J., and W. H. Allan.** 1974. Newcastle disease virus pathotypes. *Avian Pathol* **3**:269-278.
3. **Alfonzo, M., J. Suarez, A. Diaz, M. Comegna, P. Valenzuela, M. Sanchez, D. Hernandez, and A. Hung.** 2008. [Altered expression of survival (CD127) and death (Fas) receptors in total, naive and memory CD8 T lymphocytes from human immunodeficiency virus infected patients: possible implications for progression of infection]. *Invest Clin* **49**:151-168.
4. **Aloia, R. C., H. Tian, and F. C. Jensen.** 1993. Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:5181-5185.
5. **Altomonte, J., S. Marozin, R. M. Schmid, and O. Ebert.** 2010. Engineered newcastle disease virus as an improved oncolytic agent against hepatocellular carcinoma. *Mol Ther* **18**:275-284.
6. **Ameisen, J.** 2002. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years.. *Cell Death Differ* **9**:367-393.
7. **Aragane, Y., D. Kulms, D. Metze, G. Wilkes, B. Poppelmann, T. A. Luger, and T. Schwarz.** 1998. Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol* **140**:171-182.
8. **Arai, H., D. Gordon, E. G. Nabel, and G. J. Nabel.** 1997. Gene transfer of Fas ligand induces tumor regression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:13862-13867.
9. **Avki, S., H. Turutoglu, A. Simsek, and A. Unsal.** 2004. Clinical and immunological effects of Newcastle disease virus vaccine on bovine papillomatosis. *Vet Immunol Immunopathol* **98**:9-16.
10. **Ayllon, J., E. Villar, and I. Munoz-Barroso.** 2010. Mutations in the ectodomain of newcastle disease virus fusion protein confer a hemagglutinin-neuraminidase-independent phenotype. *J Virol* **84**:1066-1075.
11. **Barnhart, B. C., E. C. Alappat, and M. E. Peter.** 2003. The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* **15**:185-193.
12. **Barnhart, B. C., P. Legembre, E. Pietras, C. Bubici, G. Franzoso, and M. E. Peter.** 2004. CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells. *The EMBO journal* **23**:3175-3185.
13. **Bettinardi, A., D. Brugnoli, E. Quiros-Roldan, A. Malagoli, S. La Grutta, A. Corra, and L. D. Notarangelo.** 1997. Missense mutations in the Fas gene resulting in autoimmune lymphoproliferative syndrome: a molecular and immunological analysis. *Blood* **89**:902-909.
14. **Bervers, E. M., and P. L. Williamson.** 2010. Phospholipid scramblase: an update. *febs letters* **584**:2724-2730.
15. **Bian, H., P. Fournier, R. Moormann, B. Peeters, and V. Schirmacher.** 2005. Selective gene transfer in vitro to tumor cells via recombinant Newcastle disease virus. *Cancer Gene Ther* **12**:295-303.
16. **Bischoff, J. R., D. H. Kirn, A. Williams, C. Heise, S. Horn, M. Muna, L. Ng, J. A. Nye, A. Sampson-Johannes, A. Fattaey, and F. McCormick.** 1996. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* **274**:373-376.

BIBLIOGRAFÍA

17. **Brunner, T., C. Wasem, R. Torgler, I. Cima, S. Jakob, and N. Corazza.** 2003. Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Semin Immunol* **15**:167-176.
18. **Calain, P., and L. Roux.** 1993. The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol* **67**:4822-4830.
19. **Cantin, C., J. Holguera, L. Ferreira, E. Villar, and I. Munoz-Barroso.** 2007. Newcastle disease virus may enter cells by caveolae-mediated endocytosis. *J Gen Virol* **88**:559-569.
20. **Carrington, P. E., C. Sandu, Y. Wei, J. M. Hill, G. Morisawa, T. Huang, E. Gavathiotis, and M. H. Werner.** 2006. The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Mol Cell* **22**:599-610.
21. **Cassel, W. A., and R. E. Garrett.** 1965. Newcastle Disease Virus as an Antineoplastic Agent. *Cancer* **18**:863-868.
22. **Cattaneo, R., T. Miest, E. V. Shashkova, and M. A. Barry.** 2008. Reprogrammed viruses as cancer therapeutics: targeted, armed and shielded. *Nat Rev Microbiol* **6**:529-540.
23. **Chai, J., E. Shiozaki, S. M. Srinivasula, Q. Wu, P. Datta, E. S. Alnemri, and Y. Shi.** 2001. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* **104**:769-780.
24. **Chakrabandhu, K., S. Huault, N. Garmy, J. Fantini, E. Stebe, S. Mailfert, D. Marguet, and A. O. Hueber.** 2008. The extracellular glycosphingolipid-binding motif of Fas defines its internalization route, mode and outcome of signals upon activation by ligand. *Cell death and differentiation* **15**:1824-1837.
25. **Chan, F. K., H. J. Chun, L. Zheng, R. M. Siegel, K. L. Bui, and M. J. Lenardo.** 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* **288**:2351-2354.
26. **Cheng, J., T. Zhou, C. Liu, J. P. Shapiro, M. J. Brauer, M. C. Kiefer, P. J. Barr, and J. D. Mountz.** 1994. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* **263**:1759-1762.
27. **Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, M. Tewari, and V. M. Dixit.** 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**:505-512.
28. **Chipuk, J. E., T. Moldoveanu, F. Llambi, M. J. Parsons, and D. R. Green.** 2010. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* **37**:299-310.
29. **Choppin, P. W., A. Scheid, and W. E. Mountcastle.** 1975. Proceedings: Paramyxoviruses, membranes, and persistent infections. *Neurology* **25**:494.
30. **Chu, K., X. Niu, and L. T. Williams.** 1995. A Fas-associated protein factor, FAF1, potentiates Fas-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:11894-11898.
31. **Chua, K. B., W. J. Bellini, P. A. Rota, B. H. Harcourt, A. Tamin, S. K. Lam, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, S. R. Zaki, W. Shieh, C. S. Goldsmith, D. J. Gubler, J. T. Roehrig, B. Eaton, A. R. Gould, J. Olson, H. Field, P. Daniels, A. E. Ling, C. J. Peters, L. J. Anderson, and B. W. Mahy.** 2000. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* **288**:1432-1435.
32. **Coffey, M. C., J. E. Strong, P. A. Forsyth, and P. W. Lee.** 1998. Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* **282**:1332-1334.
33. **Conzelmann, K. K., J. H. Cox, and H. J. Thiel.** 1991. An L (polymerase)-deficient rabies virus defective interfering particle RNA is replicated and transcribed by heterologous helper virus L proteins. *Virology* **184**:655-663.
34. **Conzelmann, K. K., and M. Schnell.** 1994. Rescue of synthetic genomic RNA analogs of rabies virus by plasmid-encoded proteins. *J Virol* **68**:713-719.

BIBLIOGRAFÍA

35. **D'Amelio, M., E. Tino, and F. Cecconi.** 2008. The apoptosome: emerging insights and new potential targets for drug design. *Pharm Res* **25**:740-751.
36. **de Leeuw, O., and B. Peeters.** 1999. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *J Gen Virol* **80 (Pt 1)**:131-136.
37. **Delmas, D., C. Rebe, S. Lacour, R. Filomenko, A. Athias, P. Gambert, M. Cherkaoui-Malki, B. Jannin, L. Dubrez-Daloz, N. Latruffe, and E. Solary.** 2003. Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells. *J Biol Chem* **278**:41482-41490.
38. **Dong, C., D. D. Yang, C. Tournier, A. J. Whitmarsh, J. Xu, R. J. Davis, and R. A. Flavell.** 2000. JNK is required for effector T-cell function but not for T-cell activation. *Nature* **405**:91-94.
39. **Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang.** 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**:33-42.
40. **Durbin, A. P., J. W. Siew, B. R. Murphy, and P. L. Collins.** 1997. Minimum protein requirements for transcription and RNA replication of a minigenome of human parainfluenza virus type 3 and evaluation of the rule of six. *Virology* **234**:74-83.
41. **Dutch, R. E., R. N. Hagglund, M. A. Nagel, R. G. Paterson, and R. A. Lamb.** 2001. Paramyxovirus fusion (F) protein: a conformational change on cleavage activation. *Virology* **281**:138-150.
42. **Egelman, E. H., S. S. Wu, M. Amrein, A. Portner, and G. Murti.** 1989. The Sendai virus nucleocapsid exists in at least four different helical states. *J Virol* **63**:2233-2243.
43. **Elankumaran, S., V. Chavan, D. Qiao, R. Shobana, G. Moorkanat, M. Biswas, and S. K. Samal.** 2010. Type I interferon-sensitive recombinant newcastle disease virus for oncolytic virotherapy. *J Virol* **84**:3835-3844.
44. **Elankumaran, S., D. Rockemann, and S. K. Samal.** 2006. Newcastle disease virus exerts oncolysis by both intrinsic and extrinsic caspase-dependent pathways of cell death. *J Virol* **80**:7522-7534.
45. **Elmore, S.** 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**:495-516.
46. **Enami, M., W. Luytjes, M. Krystal, and P. Palese.** 1990. Introduction of site-specific mutations into the genome of influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:3802-3805.
47. **Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, and S. Nagata.** 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**:43-50.
48. **Erwig, L. P., and P. M. Henson.** 2008. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell death and differentiation* **15**:243-250.
49. **Fabian, Z., C. M. Csatory, J. Szeberenyi, and L. K. Csatory.** 2007. p53-independent endoplasmic reticulum stress-mediated cytotoxicity of a Newcastle disease virus strain in tumor cell lines. *J Virol* **81**:2817-2830.
50. **Fadok, V. A., D. R. Voelker, P. A. Campbell, J. J. Cohen, D. L. Bratton, and P. M. Henson.** 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **148**:2207-2216.

BIBLIOGRAFÍA

51. **Feig, C., V. Tchikov, S. Schutze, and M. E. Peter.** 2007. Palmitoylation of CD95 facilitates formation of SDS-stable receptor aggregates that initiate apoptosis signaling. *The EMBO journal* **26**:221-231.
52. **Ferreira, L., E. Villar, and I. Munoz-Barroso.** 2004. Conformational changes of Newcastle disease virus envelope glycoproteins triggered by gangliosides. *Eur J Biochem* **271**:581-588.
53. **Ferreira, L., E. Villar, and I. Munoz-Barroso.** 2004. Gangliosides and N-glycoproteins function as Newcastle disease virus receptors. *Int J Biochem Cell Biol* **36**:2344-2356.
54. **Festjens, N., T. Vanden Berghe, S. Cornelis, and P. Vandenabeele.** 2007. RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die. *Cell death and differentiation* **14**:400-410.
55. **Feuk, L., J. A. Prince, K. Blennow, and A. J. Brookes.** 2003. Further evidence for role of a promoter variant in the TNFRSF6 gene in Alzheimer disease. *Hum Mutat* **21**:53-60.
56. **Fiola, C., B. Peeters, P. Fournier, A. Arnold, M. Bucur, and V. Schirmacher.** 2006. Tumor selective replication of Newcastle disease virus: association with defects of tumor cells in antiviral defence. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **119**:328-338.
57. **Fisher, G. H., F. J. Rosenberg, S. E. Straus, J. K. Dale, L. A. Middleton, A. Y. Lin, W. Strober, M. J. Lenardo, and J. M. Puck.** 1995. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* **81**:935-946.
58. **Fisher, K. D., Y. Stallwood, N. K. Green, K. Ulbrich, V. Mautner, and L. W. Seymour.** 2001. Polymer-coated adenovirus permits efficient retargeting and evades neutralising antibodies. *Gene Ther* **8**:341-348.
59. **Fodor, E., L. Devenish, O. G. Engelhardt, P. Palese, G. G. Brownlee, and A. Garcia-Sastre.** 1999. Rescue of influenza A virus from recombinant DNA. *J Virol* **73**:9679-9682.
60. **Freeman, A. I., Z. Zakay-Rones, J. M. Gomori, E. Linetsky, L. Rasooly, E. Greenbaum, S. Rozenman-Yair, A. Panet, E. Libson, C. S. Irving, E. Galun, and T. Siegal.** 2006. Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Mol Ther* **13**:221-228.
61. **Fuerst, T. R., E. G. Niles, F. W. Studier, and B. Moss.** 1986. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:8122-8126.
62. **Gajate, C., E. Del Canto-Janez, A. U. Acuna, F. Amat-Guerri, E. Geijo, A. M. Santos-Beneit, R. J. Veldman, and F. Mollinedo.** 2004. Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Exp Med* **200**:353-365.
63. **Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D. R. Green, M. O. Hengartner, O. Kepp, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nunez, M. E. Peter, M. Piacentini, D. C. Rubinsztein, Y. Shi, H. U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino, and G. Kroemer.** 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* **19**:107-120.

BIBLIOGRAFÍA

64. **Garcia Sastre, A., C. Cobaleda, J. A. Cabezas, and E. Villar.** 1991. On the inhibition mechanism of the sialidase activity from Newcastle disease virus. *Biol Chem Hoppe Seyler* **372**:923-927.
65. **Garcia-Sastre, A.** 1998. Negative-strand RNA viruses: applications to biotechnology. *Trends Biotechnol* **16**:230-235.
66. **Garcia-Sastre, A., J. A. Cabezas, and E. Villar.** 1989. Proteins of Newcastle disease virus envelope: interaction between the outer hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein and the inner non-glycosylated matrix protein. *Biochim Biophys Acta* **999**:171-175.
67. **Garcia-Sastre, A., and P. Palese.** 1993. Genetic manipulation of negative-strand RNA virus genomes. *Annu Rev Microbiol* **47**:765-790.
68. **Garcia-Sastre, A., N. Percy, W. Barclay, and P. Palese.** 1994. Introduction of foreign sequences into the genome of influenza A virus. *Dev Biol Stand* **82**:237-246.
69. **Gerl, R., and D. L. Vaux.** 2005. Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis* **26**:263-270.
70. **Gill, G.** 2004. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* **18**:2046-2059.
71. **Glazier, K., R. Raghov, and D. W. Kingsbury.** 1977. Regulation of Sendai virus transcription: evidence for a single promoter in vivo. *J Virol* **21**:863-871.
72. **Glickman, R. L., R. J. Syddall, R. M. Iorio, J. P. Sheehan, and M. A. Bratt.** 1988. Quantitative basic residue requirements in the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein as a determinant of virulence for Newcastle disease virus. *J Virol* **62**:354-356.
73. **Golks, A., D. Brenner, I. Schmitz, C. Watzl, A. Krueger, P. H. Krammer, and I. N. Lavrik.** 2006. The role of CAP3 in CD95 signaling: new insights into the mechanism of procaspase-8 activation. *Cell death and differentiation* **13**:489-498.
74. **Guo, Z. S., S. H. Thorne, and D. L. Bartlett.** 2008. Oncolytic virotherapy: molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses. *Biochim Biophys Acta* **1785**:217-231.
75. **Hacker, G.** 2000. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* **301**:5-17.
76. **Hahne, M., D. Rimoldi, M. Schroter, P. Romero, M. Schreier, L. E. French, P. Schneider, T. Bornand, A. Fontana, D. Lienard, J. Cerottini, and J. Tschopp.** 1996. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* **274**:1363-1366.
77. **Hamaguchi, M., T. Yoshida, K. Nishikawa, H. Naruse, and Y. Nagai.** 1983. Transcriptive complex of Newcastle disease virus. I. Both L and P proteins are required to constitute an active complex. *Virology* **128**:105-117.
78. **Hanson, R.** 1972. Newcastle disease *En Diseases of poultry*. Iowa State University Press.
79. **Hanson, R., and C. Brandly.** 1955. Identification of vaccine strains of Newcastle Disease Virus. *Science* **122**:156-157
80. **Harty, R. N., and P. Palese.** 1995. Mutations within noncoding terminal sequences of model RNAs of Sendai virus: influence on reporter gene expression. *J Virol* **69**:5128-5131.
81. **Hay, S., and G. Kannourakis.** 2002. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol* **83**:1547-1564.
82. **He, S., L. Wang, L. Miao, T. Wang, F. Du, L. Zhao, and X. Wang.** 2009. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* **137**:1100-1111.

83. **Hitomi, J., D. E. Christofferson, A. Ng, J. Yao, A. Degterev, R. J. Xavier, and J. Yuan.** 2008. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* **135**:1311-1323.
84. **Hoffmann, P. R., A. M. deCathelineau, C. A. Ogden, Y. Leverrier, D. L. Bratton, D. L. Daleke, A. J. Ridley, V. A. Fadok, and P. M. Henson.** 2001. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol* **155**:649-659.
85. **Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J. L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed, and J. Tschopp.** 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* **1**:489-495.
86. **Huang, H. L., L. W. Fang, S. P. Lu, C. K. Chou, T. Y. Luh, and M. Z. Lai.** 2003. DNA-damaging reagents induce apoptosis through reactive oxygen species-dependent Fas aggregation. *Oncogene* **22**:8168-8177.
87. **Hueber, A. O., M. Zornig, D. Lyon, T. Suda, S. Nagata, and G. I. Evan.** 1997. Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science* **278**:1305-1309.
88. **Igney, F. H., and P. H. Krammer.** 2002. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *Journal of leukocyte biology* **71**:907-920.
89. **Imai, Y., T. Kimura, A. Murakami, N. Yajima, K. Sakamaki, and S. Yonehara.** 1999. The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature* **398**:777-785.
90. **Infante, A. J., H. A. Britton, T. DeNapoli, L. A. Middleton, M. J. Lenardo, C. E. Jackson, J. Wang, T. Fleisher, S. E. Straus, and J. M. Puck.** 1998. The clinical spectrum in a large kindred with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a Fas mutation that impairs lymphocyte apoptosis. *J Pediatr* **133**:629-633.
91. **Itoh, N., S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, S. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto, and S. Nagata.** 1991. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* **66**:233-243.
92. **Ivanov, V. N., P. Lopez Bergami, G. Maulit, T. A. Sato, D. Sassoon, and Z. Ronai.** 2003. FAP-1 association with Fas (Apo-1) inhibits Fas expression on the cell surface. *Mol Cell Biol* **23**:3623-3635.
93. **Iwata, S., A. C. Schmidt, K. Titani, M. Suzuki, H. Kido, B. Gotoh, M. Hamaguchi, and Y. Nagai.** 1994. Assignment of disulfide bridges in the fusion glycoprotein of Sendai virus. *J Virol* **68**:3200-3206.
94. **Jackson, D. A., R. H. Symons, and P. Berg.** 1972. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**:2904-2909.
95. **Janke, M., B. Peeters, O. de Leeuw, R. Moorman, A. Arnold, P. Fournier, and V. Schirmacher.** 2007. Recombinant Newcastle disease virus (NDV) with inserted gene coding for GM-CSF as a new vector for cancer immunogene therapy. *Gene Ther* **14**:1639-1649.
96. **Keller, N., M. G. Grutter, and O. Zerbe.** 2010. Studies of the molecular mechanism of caspase-8 activation by solution NMR. *Cell death and differentiation* **17**:710-718.
97. **Kelly, E., and S. J. Russell.** 2007. History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol Ther* **15**:651-659.

BIBLIOGRAFÍA

98. **Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie.** 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**:239-257.
99. **Kim, E., J. H. Kim, H. Y. Shin, H. Lee, J. M. Yang, J. Kim, J. H. Sohn, H. Kim, and C. O. Yun.** 2003. Ad-mTERT-delta19, a conditional replication-competent adenovirus driven by the human telomerase promoter, selectively replicates in and elicits cytopathic effect in a cancer cell-specific manner. *Hum Gene Ther* **14**:1415-1428.
100. **Kolakofsky, D., T. Pelet, D. Garcin, S. Hausmann, J. Curran, and L. Roux.** 1998. Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. *J Virol* **72**:891-899.
101. **Krishnamurthy, S., and S. K. Samal.** 1998. Nucleotide sequences of the trailer, nucleocapsid protein gene and intergenic regions of Newcastle disease virus strain Beaudette C and completion of the entire genome sequence. *J Gen Virol* **79 (Pt 10)**:2419-2424.
102. **Krishnamurthy, S., T. Takimoto, R. A. Scroggs, and A. Portner.** 2006. Differentially regulated interferon response determines the outcome of Newcastle disease virus infection in normal and tumor cell lines. *J Virol* **80**:5145-5155.
103. **Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, and G. Melino.** 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* **16**:3-11.
104. **Krueger, A., S. Baumann, P. H. Krammer, and S. Kirchhoff.** 2001. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* **21**:8247-8254.
105. **Krueger, A., I. Schmitz, S. Baumann, P. H. Krammer, and S. Kirchhoff.** 2001. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* **276**:20633-20640.
106. **Kurosaka, K., M. Takahashi, N. Watanabe, and Y. Kobayashi.** 2003. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* **171**:4672-4679.
107. **Lam, H. Y., S. K. Yeap, M. Rasoli, A. R. Omar, K. Yusoff, A. A. Suraini, and N. B. Alitheen.** 2011. Safety and clinical usage of newcastle disease virus in cancer therapy. *J Biomed Biotechnol* **2011**:718710.
108. **Lamb, R. A., and D. Kolakofsky (ed.).** 2001. *Paramyxoviridae: the viruses and their replication.* lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
109. **Lamkanfi, M., N. Festjens, W. Declercq, T. Vanden Berghe, and P. Vandenabeele.** 2007. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell death and differentiation* **14**:44-55.
110. **Lavrik, I. N., A. Golks, and P. H. Krammer.** 2005. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* **115**:2665-2672.
111. **Lee, K. H., C. Feig, V. Tchikov, R. Schickel, C. Hallas, S. Schutze, M. E. Peter, and A. C. Chan.** 2006. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *The EMBO journal* **25**:1009-1023.
112. **Liu, T. C., and D. Kirn.** 2008. Gene therapy progress and prospects cancer: oncolytic viruses. *Gene Ther* **15**:877-884.

BIBLIOGRAFÍA

113. **Liu, X., H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang.** 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**:175-184.
114. **Locke, D. P., H. S. Sellers, J. M. Crawford, S. Schultz-Cherry, D. J. King, R. J. Meinersmann, and B. S. Seal.** 2000. Newcastle disease virus phosphoprotein gene analysis and transcriptional editing in avian cells. *Virus Res* **69**:55-68.
115. **Locksley, R. M., N. Killeen, and M. J. Lenardo.** 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**:487-501.
116. **Longo, S. L., C. Griffith, A. Glass, E. J. Shillitoe, and D. E. Post.** 2011. Development of an oncolytic herpes simplex virus using a tumor-specific HIF-responsive promoter. *Cancer Gene Ther* **18**:123-134.
117. **Luytjes, W., M. Krystal, M. Enami, J. D. Parvin, and P. Palese.** 1989. Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus. *Cell* **59**:1107-1113.
118. **Mansour, M., P. Palese, and D. Zamarin.** 2011. Oncolytic specificity of Newcastle disease virus is mediated by selectivity for apoptosis-resistant cells. *J Virol* **85**:6015-6023.
119. **Marcos, F., L. Ferreira, J. Cros, M. S. Park, T. Nakaya, A. Garcia-Sastre, and E. Villar.** 2005. Mapping of the RNA promoter of Newcastle disease virus. *Virology* **331**:396-406.
120. **Markwell, M. A., and C. F. Fox.** 1980. Protein-protein interactions within paramyxoviruses identified by native disulfide bonding or reversible chemical cross-linking. *J Virol* **33**:152-166.
121. **Martin, J. J., J. Holguera, L. Sanchez-Felipe, E. Villar, and I. Munoz-Barroso.** 2012. Cholesterol dependence of Newcastle Disease Virus entry. *Biochim Biophys Acta* **1818**:753-761.
122. **Martin, S. J., C. P. Reutelingsperger, A. J. McGahon, J. A. Rader, R. C. van Schie, D. M. LaFace, and D. R. Green.** 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* **182**:1545-1556.
123. **McGinnes, L., T. Sergel, and T. Morrison.** 1993. Mutations in the transmembrane domain of the HN protein of Newcastle disease virus affect the structure and activity of the protein. *Virology* **196**:101-110.
124. **Mebatsion, T., S. Versteegen, L. T. De Vaan, A. Romer-Oberdorfer, and C. C. Schrier.** 2001. A recombinant newcastle disease virus with low-level V protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos. *J Virol* **75**:420-428.
125. **Micheau, O., E. Solary, A. Hammann, and M. T. Dimanche-Boitrel.** 1999. Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs. *J Biol Chem* **274**:7987-7992.
126. **Mollinedo, F., C. Gajate, S. Martin-Santamaria, and F. Gago.** 2004. ET-18-OCH3 (edelfosine): a selective antitumour lipid targeting apoptosis through intracellular activation of Fas/CD95 death receptor. *Curr Med Chem* **11**:3163-3184.
127. **Molouki, A., Y. T. Hsu, F. Jahanshiri, R. Rosli, and K. Yusoff.** 2010. Newcastle disease virus infection promotes Bax redistribution to mitochondria and cell death in HeLa cells. *Intervirology* **53**:87-94.
128. **Morrison, T., C. McQuain, and L. McGinnes.** 1991. Complementation between avirulent Newcastle disease virus and a fusion protein gene expressed from a retrovirus vector: requirements for membrane fusion. *J Virol* **65**:813-822.

BIBLIOGRAFÍA

129. **Morrison, T. G.** 1988. Structure, function, and intracellular processing of paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res* **10**:113-135.
130. **Munguia, A., T. Ota, T. Miest, and S. J. Russell.** 2008. Cell carriers to deliver oncolytic viruses to sites of myeloma tumor growth. *Gene Ther* **15**:797-806.
131. **Munoz-Barroso, I., C. Cobaleda, G. Zhadan, V. Shnyrov, and E. Villar.** 1997. Dynamic properties of Newcastle Disease Virus envelope and their relations with viral hemagglutinin-neuraminidase membrane glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* **1327**:17-31.
132. **Neumann, G., and Y. Kawaoka.** 2002. Generation of influenza A virus from cloned cDNAs--historical perspective and outlook for the new millenium. *Rev Med Virol* **12**:13-30.
133. **Ng, D. T., S. W. Hiebert, and R. A. Lamb.** 1990. Different roles of individual N-linked oligosaccharide chains in folding, assembly, and transport of the simian virus 5 hemagglutinin-neuraminidase. *Mol Cell Biol* **10**:1989-2001.
134. **Ni, R., Y. Tomita, K. Matsuda, A. Ichihara, K. Ishimura, J. Ogasawara, and S. Nagata.** 1994. Fas-mediated apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes. *Exp Cell Res* **215**:332-337.
135. **Ogasawara, J., R. Watanabe-Fukunaga, M. Adachi, A. Matsuzawa, T. Kasugai, Y. Kitamura, N. Itoh, T. Suda, and S. Nagata.** 1993. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* **364**:806-809.
136. **Ogden, C. A., A. deCathelineau, P. R. Hoffmann, D. Bratton, B. Ghebrehiwet, V. A. Fadok, and P. M. Henson.** 2001. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* **194**:781-795.
137. **Okura, T., L. Gong, T. Kamitani, T. Wada, I. Okura, C. F. Wei, H. M. Chang, and E. T. Yeh.** 1996. Protection against Fas/APO-1- and tumor necrosis factor-mediated cell death by a novel protein, sentrin. *J Immunol* **157**:4277-4281.
138. **Palese, P., H. Zheng, O. G. Engelhardt, S. Pleschka, and A. Garcia-Sastre.** 1996. Negative-strand RNA viruses: genetic engineering and applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11354-11358.
139. **Papoff, G., P. Hausler, A. Eramo, M. G. Pagano, G. Di Leve, A. Signore, and G. Ruberti.** 1999. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem* **274**:38241-38250.
140. **Pardo, J., A. Bosque, R. Brehm, R. Wallich, J. Naval, A. Mullbacher, A. Anel, and M. M. Simon.** 2004. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol* **167**:457-468.
141. **Park, K. H., T. Huang, F. F. Correia, and M. Krystal.** 1991. Rescue of a foreign gene by Sendai virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:5537-5541.
142. **Park, M. S., A. Garcia-Sastre, J. F. Cros, C. F. Basler, and P. Palese.** 2003. Newcastle disease virus V protein is a determinant of host range restriction. *J Virol* **77**:9522-9532.
143. **Park, M. S., M. L. Shaw, J. Munoz-Jordan, J. F. Cros, T. Nakaya, N. Bouvier, P. Palese, A. Garcia-Sastre, and C. F. Basler.** 2003. Newcastle disease virus (NDV)-based assay demonstrates interferon-antagonist activity for the NDV V protein and the Nipah virus V, W, and C proteins. *J Virol* **77**:1501-1511.
144. **Park, M. Y., H. D. Jang, S. Y. Lee, K. J. Lee, and E. Kim.** 2004. Fas-associated factor-1 inhibits nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) activity by interfering with nuclear translocation of the RelA (p65) subunit of NF-kappaB. *J Biol Chem* **279**:2544-2549.

BIBLIOGRAFÍA

145. **Pecora, A. L., N. Rizvi, G. I. Cohen, N. J. Meropol, D. Stermann, J. L. Marshall, S. Goldberg, P. Gross, J. D. O'Neil, W. S. Groene, M. S. Roberts, H. Rabin, M. K. Bamat, and R. M. Lorence.** 2002. Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. *J Clin Oncol* **20**:2251-2266.
146. **Peeples, M. E., and M. A. Bratt.** 1982. UV irradiation analysis of complementation between, and replication of, RNA-negative temperature-sensitive mutants of Newcastle disease virus. *J Virol* **41**:965-973.
147. **Peeters, B. P., O. S. de Leeuw, G. Koch, and A. L. Gielkens.** 1999. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J Virol* **73**:5001-5009.
148. **Peeters, B. P., Y. K. Gruijthuisen, O. S. de Leeuw, and A. L. Gielkens.** 2000. Genome replication of Newcastle disease virus: involvement of the rule-of-six. *Arch Virol* **145**:1829-1845.
149. **Peli, J., M. Schroter, C. Rudaz, M. Hahne, C. Meyer, E. Reichmann, and J. Tschopp.** 1999. Oncogenic Ras inhibits Fas ligand-mediated apoptosis by downregulating the expression of Fas. *The EMBO journal* **18**:1824-1831.
150. **Peng, K. W., R. Vile, F. L. Cosset, and S. Russell.** 1999. Selective transduction of protease-rich tumors by matrix-metalloproteinase-targeted retroviral vectors. *Gene Ther* **6**:1552-1557.
151. **Pop, C., P. Fitzgerald, D. R. Green, and G. S. Salvesen.** 2007. Role of proteolysis in caspase-8 activation and stabilization. *Biochemistry* **46**:4398-4407.
152. **Puhler, F., J. Willuda, J. Puhlmann, D. Mumberg, A. Romer-Oberdorfer, and R. Beier.** 2008. Generation of a recombinant oncolytic Newcastle disease virus and expression of a full IgG antibody from two transgenes. *Gene Ther* **15**:371-383.
153. **Radecke, F., and M. A. Billeter.** 1995. Appendix: measles virus antigenome and protein consensus sequences. *Curr Top Microbiol Immunol* **191**:181-192.
154. **Ramenghi, U., S. Bonisconi, G. Migliaretti, S. DeFranco, F. Bottarel, C. Gambaruto, D. DiFranco, R. Priori, F. Conti, I. Dianzani, G. Valesini, F. Merletti, and U. Dianzani.** 2000. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. *Blood* **95**:3176-3182.
155. **Ravindra, P. V., A. K. Tiwari, B. Ratta, U. Chaturvedi, S. K. Palia, and R. S. Chauhan.** 2009. Newcastle disease virus-induced cytopathic effect in infected cells is caused by apoptosis. *Virus Res* **141**:13-20.
156. **Ravindra, P. V., A. K. Tiwari, B. Sharma, and R. S. Chauhan.** 2009. Newcastle disease virus as an oncolytic agent. *Indian J Med Res* **130**:507-513.
157. **Ravindra, P. V., A. K. Tiwari, B. Sharma, Y. S. Rajawat, B. Ratta, S. Palia, N. R. Sundaresan, U. Chaturvedi, G. B. Kumar, K. Chindera, M. Saxena, P. K. Subudhi, A. Rai, and R. S. Chauhan.** 2008. HN protein of Newcastle disease virus causes apoptosis in chicken embryo fibroblast cells. *Arch Virol* **153**:749-754.
158. **Reichard, K. W., R. M. Lorence, C. J. Cascino, M. E. Peeples, R. J. Walter, M. B. Fernando, H. M. Reyes, and J. A. Greager.** 1992. Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells. *J Surg Res* **52**:448-453.
159. **Reuven, O.** 2012, posting date. NCT01174537. [Online.]
160. **Rieux-Laucat, F., F. Le Deist, C. Hivroz, I. A. Roberts, K. M. Debatin, A. Fischer, and J. P. de Villartay.** 1995. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* **268**:1347-1349.

BIBLIOGRAFÍA

161. **Ring, C. J.** 2002. Cytolytic viruses as potential anti-cancer agents. *J Gen Virol* **83**:491-502.
162. **Rochat-Steiner, V., K. Becker, O. Micheau, P. Schneider, K. Burns, and J. Tschopp.** 2000. FIST/HIPK3: a Fas/FADD-interacting serine/threonine kinase that induces FADD phosphorylation and inhibits fas-mediated Jun NH(2)-terminal kinase activation. *J Exp Med* **192**:1165-1174.
163. **Romer-Oberdorfer, A., E. Mundt, T. Mebatsion, U. J. Buchholz, and T. C. Mettenleiter.** 1999. Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *J Gen Virol* **80 (Pt 11)**:2987-2995.
164. **Rossin, A., R. Kral, N. Lounnas, K. Chakrabandhu, S. Mailfert, D. Marguet, and A. O. Hueber.** 2010. Identification of a lysine-rich region of Fas as a raft nanodomain targeting signal necessary for Fas-mediated cell death. *Exp Cell Res* **316**:1513-1522.
165. **Rott, R.** 1979. Molecular basis of infectivity and pathogenicity of myxovirus. Brief review. *Arch Virol* **59**:285-298.
166. **Rout, S. N., and S. K. Samal.** 2008. The large polymerase protein is associated with the virulence of Newcastle disease virus. *J Virol* **82**:7828-7836.
167. **Russell, J. H., and T. J. Ley.** 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* **20**:323-370.
168. **Samson, A. C., I. Levesley, and P. H. Russell.** 1991. The 36K polypeptide synthesized in Newcastle disease virus-infected cells possesses properties predicted for the hypothesized 'V' protein. *J Gen Virol* **72 (Pt 7)**:1709-1713.
169. **San Roman, K., E. Villar, and I. Munoz-Barroso.** 1999. Acidic pH enhancement of the fusion of Newcastle disease virus with cultured cells. *Virology* **260**:329-341.
170. **Sandu, C., G. Morisawa, I. Wegorzewska, T. Huang, A. F. Arechiga, J. M. Hill, T. Kim, C. M. Walsh, and M. H. Werner.** 2006. FADD self-association is required for stable interaction with an activated death receptor. *Cell death and differentiation* **13**:2052-2061.
171. **Savinov, A. Y., A. Tcherepanov, E. A. Green, R. A. Flavell, and A. V. Chervonsky.** 2003. Contribution of Fas to diabetes development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:628-632.
172. **Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K. J. Tomaselli, K. M. Debatin, P. H. Kramer, and M. E. Peter.** 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO journal* **17**:1675-1687.
173. **Schirmacher, V.** 1987. [Tumor cell immunogenicity and T-cell-mediated antitumor immune reactions. Modulation and application to immunotherapy]. *Arzneimittelforschung* **37**:259-262.
174. **Schirmacher, V., A. Griesbach, and T. Ahlert.** 2001. Antitumor effects of Newcastle Disease Virus in vivo: local versus systemic effects. *Int J Oncol* **18**:945-952.
175. **Schirmacher, V., C. Haas, R. Bonifer, T. Ahlert, R. Gerhards, and C. Ertel.** 1999. Human tumor cell modification by virus infection: an efficient and safe way to produce cancer vaccine with pleiotropic immune stimulatory properties when using Newcastle disease virus. *Gene Ther* **6**:63-73.
176. **Schirmacher, V., and R. Heicappell.** 1987. Prevention of metastatic spread by postoperative immunotherapy with virally modified autologous tumor cells. II. Establishment of specific systemic anti-tumor immunity. *Clinical & experimental metastasis* **5**:147-156.

177. **Schnell, M. J., J. E. Johnson, L. Buonocore, and J. K. Rose.** 1997. Construction of a novel virus that targets HIV-1-infected cells and controls HIV-1 infection. *Cell* **90**:849-857.
178. **Schuy, W., W. Garten, D. Linder, and H. D. Klenk.** 1984. The carboxyterminus of the hemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus is exposed at the surface of the viral envelope. *Virus Res* **1**:415-426.
179. **Scott, F. L., B. Stec, C. Pop, M. K. Dobaczewska, J. J. Lee, E. Monosov, H. Robinson, G. S. Salvesen, R. Schwarzenbacher, and S. J. Riedl.** 2009. The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature* **457**:1019-1022.
180. **Seal, B. S., J. M. Crawford, H. S. Sellers, D. P. Locke, and D. J. King.** 2002. Nucleotide sequence analysis of the Newcastle disease virus nucleocapsid protein gene and phylogenetic relationships among the Paramyxoviridae. *Virus Res* **83**:119-129.
181. **Seal, B. S., D. J. King, D. P. Locke, D. A. Senne, and M. W. Jackwood.** 1998. Phylogenetic relationships among highly virulent Newcastle disease virus isolates obtained from exotic birds and poultry from 1989 to 1996. *J Clin Microbiol* **36**:1141-1145.
182. **Seal, B. S., D. J. King, and R. J. Meinersmann.** 2000. Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among the paramyxoviridae. *Virus Res* **66**:1-11.
183. **Shnyrova, A. V., J. Ayllon, Mikhalyov, II, E. Villar, J. Zimmerberg, and V. A. Frolov.** 2007. Vesicle formation by self-assembly of membrane-bound matrix proteins into a fluidlike budding domain. *J Cell Biol* **179**:627-633.
184. **Slee, E. A., C. Adrain, and S. J. Martin.** 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* **276**:7320-7326.
185. **Solary, E., O. Micheau, M. T. Dimanche-Boitrel, and F. Martin.** 1998. [The Fas/Fas-ligand system: implications in the antitumor immune response and in the activity of cytotoxic agents]. *Bull Cancer* **85**:685-694.
186. **Sova, P., X. W. Ren, S. Ni, K. M. Bernt, J. Mi, N. Kiviat, and A. Lieber.** 2004. A tumor-targeted and conditionally replicating oncolytic adenovirus vector expressing TRAIL for treatment of liver metastases. *Mol Ther* **9**:496-509.
187. **Springfeld, C., V. von Messling, M. Frenzke, G. Ungerechts, C. J. Buchholz, and R. Cattaneo.** 2006. Oncolytic efficacy and enhanced safety of measles virus activated by tumor-secreted matrix metalloproteinases. *Cancer Res* **66**:7694-7700.
188. **Srinivasula, S. M., R. Hegde, A. Saleh, P. Datta, E. Shiozaki, J. Chai, R. A. Lee, P. D. Robbins, T. Fernandes-Alnemri, Y. Shi, and E. S. Alnemri.** 2001. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410**:112-116.
189. **Steiner, H. H., M. M. Bonsanto, P. Beckhove, M. Brysch, K. Geletneky, R. Ahmadi, R. Schuele-Freyer, P. Kremer, G. Ranaie, D. Matejic, H. Bauer, M. Kiessling, S. Kunze, V. Schirmacher, and C. Herold-Mende.** 2004. Antitumor vaccination of patients with glioblastoma multiforme: a pilot study to assess feasibility, safety, and clinical benefit. *J Clin Oncol* **22**:4272-4281.
190. **Steward, O., M. S. Kelley, and E. R. Torre.** 1993. The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: temporal relationship between changes in the levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and GFAP mRNA in reactive astrocytes. *Exp Neurol* **124**:167-183.

BIBLIOGRAFÍA

191. **Stojdl, D. F., B. Lichty, S. Knowles, R. Marius, H. Atkins, N. Sonenberg, and J. C. Bell.** 2000. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med* **6**:821-825.
192. **Suzuki, Y., Y. Nakabayashi, K. Nakata, J. C. Reed, and R. Takahashi.** 2001. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J Biol Chem* **276**:27058-27063.
193. **Takahashi, R., Q. Deveraux, I. Tamm, K. Welsh, N. Assa-Munt, G. S. Salvesen, and J. C. Reed.** 1998. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* **273**:7787-7790.
194. **Taqi, A. M., M. B. Abdurrahman, A. M. Yakubu, and A. F. Fleming.** 1981. Regression of Hodgkin's disease after measles. *Lancet* **1**:1112.
195. **Tchikov, V., U. Bertsch, J. Fritsch, B. Edelmann, and S. Schutze.** 2011. Subcellular compartmentalization of TNF receptor-1 and CD95 signaling pathways. *Eur J Cell Biol* **90**:467-475.
196. **Thome, M., P. Schneider, K. Hofmann, H. Fickenscher, E. Meini, F. Neipel, C. Mattmann, K. Burns, J. L. Bodmer, M. Schroter, C. Scaffidi, P. H. Krammer, M. E. Peter, and J. Tschopp.** 1997. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* **386**:517-521.
197. **Tournier, C., P. Hess, D. D. Yang, J. Xu, T. K. Turner, A. Nimnual, D. Barsagi, S. N. Jones, R. A. Flavell, and R. J. Davis.** 2000. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* **288**:870-874.
198. **Toyoda, T., T. Sakaguchi, H. Hirota, B. Gotoh, K. Kuma, T. Miyata, and Y. Nagai.** 1989. Newcastle disease virus evolution. II. Lack of gene recombination in generating virulent and avirulent strains. *Virology* **169**:273-282.
199. **Trauth, B. C., C. Klas, A. M. Peters, S. Matzku, P. Moller, W. Falk, K. M. Debatin, and P. H. Krammer.** 1989. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* **245**:301-305.
200. **Umansky, V., V. A. Shatrov, V. Lehmann, and V. Schirmacher.** 1996. Induction of NO synthesis in macrophages by Newcastle disease virus is associated with activation of nuclear factor-kappa B. *Int Immunol* **8**:491-498.
201. **Vandivier, R. W., C. A. Ogden, V. A. Fadok, P. R. Hoffmann, K. K. Brown, M. Botto, M. J. Walport, J. H. Fisher, P. M. Henson, and K. E. Greene.** 2002. Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J Immunol* **169**:3978-3986.
202. **Verhagen, A. M., E. J. Coulson, and D. L. Vaux.** 2001. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol* **2**:REVIEWS3009.
203. **Vigil, A., O. Martinez, M. A. Chua, and A. Garcia-Sastre.** 2008. Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector for cancer therapy. *Mol Ther* **16**:1883-1890.
204. **Vigil, A., M. S. Park, O. Martinez, M. A. Chua, S. Xiao, J. F. Cros, L. Martinez-Sobrido, S. L. Woo, and A. Garcia-Sastre.** 2007. Use of reverse genetics to enhance the oncolytic properties of Newcastle disease virus. *Cancer Res* **67**:8285-8292.
205. **Volchkov, V. E., V. A. Volchkova, E. Muhlberger, L. V. Kolesnikova, M. Weik, O. Dolnik, and H. D. Klenk.** 2001. Recovery of infectious Ebola virus from complementary DNA: RNA editing of the GP gene and viral cytotoxicity. *Science* **291**:1965-1969.

BIBLIOGRAFÍA

206. **Vongpunsawad, S., N. Oezgun, W. Braun, and R. Cattaneo.** 2004. Selectively receptor-blind measles viruses: Identification of residues necessary for SLAM- or CD46-induced fusion and their localization on a new hemagglutinin structural model. *J Virol* **78**:302-313.
207. **Wang, G. Q., B. R. Gastman, E. Wieckowski, L. A. Goldstein, A. Rabinovitz, X. M. Yin, and H. Rabinowich.** 2001. Apoptosis-resistant mitochondria in T cells selected for resistance to Fas signaling. *J Biol Chem* **276**:3610-3619.
208. **Wang, J., L. Zheng, A. Lobito, F. K. Chan, J. Dale, M. Sneller, X. Yao, J. M. Puck, S. E. Straus, and M. J. Lenardo.** 1999. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* **98**:47-58.
209. **Washburn, B., M. A. Weigand, A. Grosse-Wilde, M. Janke, H. Stahl, E. Rieser, M. R. Sprick, V. Schirmacher, and H. Walczak.** 2003. TNF-related apoptosis-inducing ligand mediates tumoricidal activity of human monocytes stimulated by Newcastle disease virus. *J Immunol* **170**:1814-1821.
210. **Wei, D., N. Sun, G. Nan, Y. Wang, H. Q. Liu, B. Peeters, Z. N. Chen, and H. Bian.** 2012. Construction of Recombinant Newcastle Disease Virus Italian Strain for Oncolytic Virotherapy of Tumors. *Hum Gene Ther.*
211. **Whelan, S. P., L. A. Ball, J. N. Barr, and G. T. Wertz.** 1995. Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:8388-8392.
212. **Yang, X., R. Khosravi-Far, H. Y. Chang, and D. Baltimore.** 1997. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* **89**:1067-1076.
213. **Yonehara, S., A. Ishii, and M. Yonehara.** 1989. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* **169**:1747-1756.
214. **Yoshida, T., S. Takao, K. Kiyotani, and T. Sakaguchi.** 1989. Endoproteolytic activation of Newcastle disease virus fusion proteins requires an intracellular acidic environment. *Virology* **170**:571-574.
215. **Zamarin, D., L. Martinez-Sobrido, K. Kelly, M. Mansour, G. Sheng, A. Vigil, A. Garcia-Sastre, P. Palese, and Y. Fong.** 2009. Enhancement of oncolytic properties of recombinant newcastle disease virus through antagonism of cellular innate immune responses. *Mol Ther* **17**:697-706.
216. **Zamarin, D., A. Vigil, K. Kelly, A. Garcia-Sastre, and Y. Fong.** 2009. Genetically engineered Newcastle disease virus for malignant melanoma therapy. *Gene Ther* **16**:796-804.
217. **Zeng, J., P. Fournier, and V. Schirmacher.** 2002. Induction of interferon-alpha and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human blood mononuclear cells by hemagglutinin-neuraminidase but not F protein of Newcastle disease virus. *Virology* **297**:19-30.
218. **Zhang, J. F., C. Hu, Y. Geng, J. Selm, S. B. Klein, A. Orazi, and M. W. Taylor.** 1996. Treatment of a human breast cancer xenograft with an adenovirus vector containing an interferon gene results in rapid regression due to viral oncolysis and gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:4513-4518.
219. **Zhang, X., X. Miao, T. Sun, W. Tan, S. Qu, P. Xiong, Y. Zhou, and D. Lin.** 2005. Functional polymorphisms in cell death pathway genes FAS and FASL contribute to risk of lung cancer. *J Med Genet* **42**:479-484.
220. **Zhao, H., M. Janke, P. Fournier, and V. Schirmacher.** 2008. Recombinant Newcastle disease virus expressing human interleukin-2 serves as a potential candidate for tumor therapy. *Virus Res* **136**:75-80.

BIBLIOGRAFÍA

221. **Zhuang, S., and I. E. Kochevar.** 2003. Ultraviolet A radiation induces rapid apoptosis of human leukemia cells by Fas ligand-independent activation of the Fas death pathways. *Photochemistry and photobiology* **78**:61-67.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AIF	Factor inductor de apoptosis.
ALPS	Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune.
Amp^r	Secuencia para resistencia a ampicilina.
APO-1	Anticuerpo monoclonal de ratón anti-FAS
ATCC	Colección americana de cultivos tipo. (<i>American type cultures collection</i>)
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>. Familia de proteínas reguladoras de la apoptosis vía mitocondrial.
Bcl-xL	Proteína transmembrana mitocondrial implicada en la regulación de la apoptosis.
Bid, BID	Proteína con dominio de unión BH3, nexo entre la vía extrínseca e intrínseca de apoptosis.
BSA	Seroalbúmina bovina.
CAD	DNAasa activada por caspasa.
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas.
CAT	Cloranfenicol acetiltransferasa.
cDNA	DNA copia; procedente de RNA tras una reacción de retrotranscripción.
CD95	Cluster de diferenciación 95.FAS.
CID	Dominio de inhibición C-terminal de FAS.
CIP	Fosfatasa alcalina de intestino de cordero.
CRD	Dominio rico en cisternas.
CTLs	Linfocitos T citotóxicos.
Cys	Cisteína.
DD	Dominio de muerte (<i>Death Domain</i>)
DED	Dominio efector de muerte.
DI	Partículas víricas de interferencia (<i>Defective Interfering</i>).

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

DISC	Complejo de señalización para la inducción de muerte.
DMEM	Medio de Eagle, modificado por Dulbecco.
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	DNA de cadena doble.
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato.
EGFP	Proteína verde fluorescente.
EMEM	Medio mínimo esencial de Eagle.
EMCV	Virus de la encefalomiocarditis.
<i>et al.</i>	(Latín: <i>et alteri</i>) « y otros ».
F	Proteína de fusión de los paramixovirus
F3aa	Proteína F altamente fusogénica.
FADD	Proteína adaptadora de FAS (<i>FAS-associated death domain-containing protein</i>).
FAS	Receptor FAS.
FAS_L	Ligando fisiológico de FAS
Fas	ORF del gen <i>Fas</i>
<i>Fas</i>	Gen de la proteína FAS
FBS	Suero fetal bovino.
FEX	Proteína quimérica formada por el dominio extracelular de FAS y el transmembranal y citoplasmático de la F del NDV.
Fex	Secuencia del dominio extracelular de FAS.
FLICE	Caspasa-8.
FLIP_s	Proteínas inhibidoras de FLICE.
HN	Proteína hemaglutinina-neuroaminidasa del NDV.
GE	Secuencia de final de gen.
GFP	Proteína verde fluorescente
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

GS	Secuencia de inicio de gen.
HDV	Virus de la hepatitis delta.
HeV	Virus Hendra.
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana.
hPIV3	Parainfluenza virus humano tipo 3.
hRSV	Virus respiratorio sincitial humano.
HRP	Peroxidasa de rábano.
IAPs	Proteínas inhibidoras de apoptosis.
ICAD	Inhibidor de la endonucleasa CAD.
ICE	Caspasas efectoras de la ruta de FAS.
IFN	Interferón.
IL	Interleucina.
IS	Secuencia intergénica.
Kb	Kilobases.
kDa	Kilodaltons.
L	RNA polimerasa del NDV.
M	Proteína de la matriz del NDV.
MCS	Sitio de clonación múltiple.
mM	Milimolar.
m.o.i	Multiplicidad de infección.
MORT1	Proteína adaptadora de FAS (FADD).
MPT	Poro de permeabilidad mitocondrial.
MuV	Virus de las paperas.
MV	Virus del sarampión.
MVA-T7	Virus vaccinia Ankara modificado que expresa la polimerasa T7.
NCDD	Comité de nomenclatura de muerte celular.
NDV	Virus de la enfermedad de Newcastle.
NDV\F_{TM}	Secuencia transmembrana de la proteína F del NDV.
NDV\F_{Cyt}	Secuencia citoplasmática de la proteína F del NDV.
Ng	Nanogramos.
nm	Nanómetros.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

NMR	Resonancia Magnética Nuclear
NOD	Dominio de oligomerización de FAS.
NS1	Proteína no estructural 1 del virus de la gripe.
NP	Proteína de la nucleocápsida del NDV
ORF	Fase de lectura abierta.
P	Fosfoproteína del NDV.
pag.	Página.
pb	Pares de bases.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PLAD	Estado de ensamblaje del receptor pre-ligando.
pNDV-B1	Plásmido con el cDNA antígenómico completo del NDV-B1.
PS	Penicilina/Estreptomicina.
RNA	Ácido ribonucleico.
mRNA	RNA mensajero.
RNA (+)	Cadena de RNA de polaridad positiva, con significado traduccional.
RNA (-)	Cadena de RNA de polaridad negativa, complementaria a la que posee significado traduccional.
rNDV	Virus de la enfermedad de Newcastle recombinante.
rNDV-B1/FAS	Virus NDV recombinante que porta la información para la proteína FAS.
rNDV-B1/FEX	Virus NDV recombinante que porta la información para la proteína quimérica FEX.
RNP	Ribonucleoproteína.
RNPs	Ribonucleocápsidas.
rpm	Revoluciones por minuto.
RT	Reacción de retrotranscripción.
RSV	Virus respiratorio sincitial.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

RV	Virus de la rabia.
SDS	Dodecil sulfato sódico.
SeV	Virus Sendai.
SIV	Virus de la inmunodeficiencia de simios.
SPF	Sin patógenos específicos.
SVS	Virus del simio tipo S.
SV40	Virus del simio 40.
tBID	Forma truncada de la proteína Bid
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFRSF	Receptor de Factor de necrosis tumoral.
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta.
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
UTR	Región no traducida.
V	Voltios.
VSV	Virus de la estomatitis vesicular.

