

LA VIROTERÀPIA

L'ENEMIC DE L'ENEMIC ÉS UN AMIC.



HeLa
2N DE BATXILLERAT
CURS 2021/22
ÀMBIT CIENTÍFIC
DEPARTAMENT DE CIÈNCIES



ÍNDEX

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
GLOSSARI D'ABREVIATURES	9
0. INTRODUCCIÓ	11
0.1. Motivació	11
0.2. Objectius	11
0.3. Hipòtesi	12
0.4. Metodologia i estructura	12
MARC TEÒRIC	14
1. EL CÀNCER	14
1.1. Què és?	14
1.2. Origen del càncer: la carcinogènesi.	14
1.3. Classificació	16
1.4. Fases	17
2. ELS VIRUS	17
2.1. Què són?	17
2.2. Classificació	18
2.2.2. <i>Classificació de Baltimore</i>	18
2.3. Procés de replicació viral	19
2.4. Els adenovirus	20
2.4.1. <i>Particularitats</i>	21
2.4.2. <i>Estructura</i>	21
2.4.3. <i>Mecanisme de replicació dels adenovirus</i>	22
3. LA TERÀPIA GÈNICA	25
3.1. Què és?	25
3.2. Recombineering	25
4. LA VIROTERÀPIA ONCOLÍTICA	26



4.1. Què és?	26
4.2. Limitacions	26
4.2.1. Arribada dels adenovirus al tumor	26
4.2.2. Dispersió intratumoral dels adenovirus	27
4.2.3. Potència oncolítica dels adenovirus	28
4.2.4. Models utilitzats	28
4.3. Estratègies per millorar l'eficàcia terapèutica	29
4.3.1. Millora del control de E1A	29
4.3.2. Bioselecció dels adenovirus	29
4.3.3. Adenovirus armats	29
4.3.4. Combinació amb drogues o altres teràpies	30
4.3.5. Utilització de models més complets	30
MARC PRÀCTIC	31
5. FONAMENTS TEÒRICS	32
5.1. Factor Duran-Reynals	32
5.2. Virus utilitzats	32
5.3. SKMel-28	33
6. PROBLEMA	34
7. HIPÒTESI	34
8. MATERIALS I MÈTODES	34
8.1. Tècniques de manipulació dels bacteris	34
8.2. Tècniques de manipulació dels llevats	35
8.3. Cultius cel·lulars	35
8.4. Adenovirus recombinants	36
8.4.1. Tècniques per titular adenovirus	36
8.5. Tècniques utilitzades en assajos in vivo en ratolins amb adenovirus	37
9. RESULTATS	37
9.1. Resultats experimentals	37
9.1.1. RGDK i Hialuronidasa per millorar l'orientació i la difusió	37
9.1.2. Adwt que expresa hialuronidasa: AdwtRGD-PH20	38



<u>9.1.3. Eficàcia antitumoral de ICOVIR17</u>	<u>39</u>
<u>9.2. Assaig clínic (VCN-01 + GE/nab-paclitaxel: efficacy and immune activation)</u>	<u>41</u>
<u>10. ANÀLISI DE RESULTATS I CONCLUSIONS</u>	<u>42</u>
<u>AGRAÏMENTS</u>	<u>44</u>
<u>BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA</u>	<u>45</u>
<u>PÀGINES WEB</u>	<u>45</u>
<u>TREBALLS</u>	<u>47</u>
<u>LLIBRES</u>	<u>47</u>



«Una idea que no és perillosa és absolutament indigna
de ser anomenada una idea».

Oscar Wilde



RESUM

Des de ben petita, sempre havia sentit la frase de “La curiosidad mató al gato”. Com a científica i persona curiosa que sóc, no podia estar-hi més en desacord. Considero que, quan parlem de curiositat, parlem d'innovació, de creativitat i d'evolució. I us preguntareu, perquè estic parlant de creativitat? Bàsicament, perquè aquest treball, es basa en això, creativitat i innovació.

El tema principal del treball és la viroteràpia, un nova tècnica en la que s'intenta tractar el càncer a partir de l'utilització de virus modificats genèticament. Per tal d'entendre en que consisteix aquesta teràpia, el treball presenta un marc teòric, on es desenvolupen els coneixements teòrics bàsics i necessaris per la bona comprensió del treball. En aquest marc teòric, es parla dels elements principals de la viroteràpia: el càncer, els virus, la teràpia gènica (utilitzada per modificar els virus). Com a síntesi de tota aquesta informació, al final del marc teòric s'explica la viroteràpia, què és i les limitacions que presenta actualment.

A partir d'una d'aquestes limitacions tractades en el marc teòric, es realitza el marc pràctic. Al tractar-se d'un tema complex, la pràctica no la vaig poder realitzar jo mateixa, tot i així, a partir d'una visita i de diverses explicacions i resultats proporcionats pel doctor Ramón Alemany, investigador principal de l'IDIBELL, vaig poder plantejar una hipòtesi, analitzar els resultats i extreure conclusions d'aquests.



RESUMEN

Desde pequeña, siempre había oído la frase de "La curiosidad mató al gato". Como científica y persona curiosa que soy, no podía estar más en desacuerdo con esta frase. Considero que, cuando hablamos de curiosidad, hablamos de innovación, de creatividad y de evolución. Y os preguntaréis, porque estoy hablando de creatividad? Básicamente, porque este trabajo, se basa en eso, creatividad e innovación.

El tema principal del trabajo es la viroterapia, una nueva técnica en la que se intenta tratar el cáncer a partir de la utilización de virus modificados genéticamente. Para entender en qué consiste esta terapia, el trabajo presenta un marco teórico, donde se desarrollan los conocimientos teóricos básicos y necesarios para la buena comprensión del trabajo. En este marco teórico, se habla de los elementos principales de la viroterapia: el cáncer, los virus, la terapia génica (utilizada para modificar los virus). Como síntesis de toda esta información, al final del marco teórico se explicada la viroterapia, qué es y las limitaciones que presenta actualmente.

A partir de una de estas limitaciones tratadas en el marco teórico, se realiza el marco práctico. Al tratarse de un tema complejo, la práctica no la pude realizar yo misma, aún así, a partir de una visita y de varias explicaciones y resultados proporcionados por el doctor Ramón Alemany, investigador principal del IDIBELL, pude plantear una hipótesis, analizar los resultados y extraer conclusiones de estos.



ABSTRACT

From a very young age, I had always heard the phrase “The curiosity killed the cat”. As a scientist and curious person that I am, I couldn’t disagree more. I think when we talk about curiosity, we talk about innovation, creativity and evolution. And you ask yourself, why am I talking about creativity? Basically, because this work is based on that, creativity and innovation.

The main topic of the work is virotherapy, a new technique that tries to treat cancer from the use of genetically modified viruses. In order to understand what this therapy consists of, the work presents a theoretical framework, where the basic theoretical knowledge necessary for a good understanding of the work is developed. In this theoretical framework, we talk about the main elements of virotherapy: cancer, viruses, gene therapy (used to modify viruses). As a synthesis of all this information, at the end of the theoretical framework, virotherapy is explained, what it is and the limitations it currently presents.

Based on one of these limitations addressed in the theoretical framework, the practical framework is realized. As this is a complex topic, I was not able to do the practice myself, however, based on a visit and various explanations and results provided by Dr. Ramón Alemany, principal investigator of IDIBELL, I was able to raise an hypothesis, analyze the results and draw conclusions from them.



GLOSSARI D'ABREVIATURES

α_v	Alfa V
Ad	Adenovirus
CAR	En anglès, chimeric antigen receptor
CPH	En anglès, major histocompatibility complex
CD46	En anglès, cluster of differentiation 46
°C	Graus centígrads
CR	En anglès, Complete Response (resposta completa)
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DCR	En anglès, Disease Control Rate
E1	En anglès, early gene 1
E1A	En anglès, early gene 1A
E1B	En anglès, early gene 1B
E2	En anglès, early gene 2
E3	En anglès, early gene 3
E4	En anglès, early gene 4
HA	Àcid hialurònic
ICTV	Comitè Internacional de Taxonomía de Virus
kD	Kilodalton
L1	En anglès, late gene 1
L2	En anglès, late gene 2
L3	En anglès, late gene 3
L4	En anglès, late gene 4
L5	En anglès, late gene 5
ml	Mil·lilitres
mm ³	Mil·límetres cúbics
nm	Nanòmetres
ORR	En anglès, Overall Response Rate
OS	En anglès, Overall Survival



pH	Potencial d'hidrogen
p.i.	En anglès, post injection
PFS	En anglès, Progression Free Survival
PCR	En anglès, polymerase chain reaction
PBS	En anglès, Phosphate Buffered Saline
PR	En anglès, Partial Response (resposta parcial)
RGD	Arginina-Glicina-Àcid Àspàrtic
RNA	Àcid ribonucleic
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
SD	En anglès, Stable Disease (malaltia estable)
tu	En anglès, transducing unit (unitats de transducció)
vp	Partícules virals



0. INTRODUCCIÓ

0.1. Motivació

Sempre he estat interessada en la ciència. Concretament, en els darrers anys, el meu interès per la medicina ha anat creixent. Per aquesta raó, quan se'm va presentar l'oportunitat de realitzar el treball de recerca vaig començar a investigar sobre quins temes actuals podria tractar. Des del principi, tenia clar que volia investigar alguna sobre alguna cosa innovadora i ambiciosa. Em vaig plantejar quins eren els problemes mèdics més presents en la nostra vida i d'aquí va sorgir la idea del càncer.

El càncer ha estat una malaltia molt present darrerament i amb el pas del temps ha anat augmentant el nombre d'afectats, fent-la una de les malalties més temudes per la població. Aquest augment dels casos ha estat causat per l'augment de l'esperança de vida degut a la millora en les condicions de vida de les persones, cosa que ha fet que aquestes visquin més anys però siguin més propenses a desenvolupar malalties associades a l'envelliment, com és el càncer. Les estadístiques apunten que, una de cada tres persones presentarà un càncer algun cop a la vida.

Finalment, vaig sentir parlar d'una teràpia contra el càncer que encara estava en procés d'investigació, però que semblava que estava donant uns resultats molt prometedors. A partir d'aquí, vaig plantejar-me aquesta pregunta: Hi ha cosa més ambiciosa que investigar sobre la cura del càncer?

0.2. Objectius

Els objectius principals del treball són:

- Investigar sobre la malaltia del càncer. Entendre què és, com funciona i com tractar-la.
- Realitzar una petita investigació sobre els virus, l'element principal del tractament plantejat en el treball, amb la intenció d'entendre quin paper juguen en la curació del càncer.
- Entendre què és la teràpia gènica, perquè la podem utilitzar i quin tipus de teràpia s'utilitza per modificar els adenovirus.
- Explicar què és i com funciona la viroteràpia i les seves limitacions.



- Millorar l'efectivitat de la viroteràpia buscant solució a una de les limitacions que aquesta presenta.
- Aplicar tècniques de recombinació genètica per crear un adenovirus recombinant capaç d'infectar i eliminar les cèl·lules tumorals de manera efectiva.
- Destruir el tumor utilitzant la menor quantitat de virus possible mitjançant una disseminació viral més eficaç.

0.3. Hipòtesi

Centrant-nos en l'objectiu principal del treball, que és millorar l'efectivitat de la viroteràpia buscant solució a una de les limitacions que aquesta presenta, la hipòtesi plantejada és:

- Els adenovirus injectats al pacient infectaran una part de les cèl·lules tumorals. Aquestes cèl·lules seran les encarregades de transcriure i traduir el material genètic del virus, en el qual s'hi ha inserit el gen que codifica la hialuronidasa, una enzima capaç de degradar l'àcid hialurònic. Aquesta degradarà gran part de l'àcid hialurònic localitzat a la matriu extracel·lular i facilitarà la disseminació viral, fent que gran part de la massa tumoral sigui infectada i destruïda.

0.4. Metodologia i estructura

El treball té dues parts ben diferenciades: el marc teòric i el marc pràctic. La primera part (marc teòric) està dividit en quatre parts, en les quals, s'expliquen els conceptes teòrics bàsics per entendre el treball. Per començar, en la primera part, es parla del càncer, la malaltia a tractar. Seguidament, la segona part aporta la informació necessària sobre els virus (aprofundint amb els adenovirus), l'element principal de la teràpia. En la tercera part del marc teòric, s'explica la teràpia gènica, concretament, les tècniques de modificació genètica utilitzades per modificar el genoma viral. Per últim, s'investiga la viroteràpia, les seves limitacions i les estratègies de millora d'aquestes. Tota la informació cercada en aquesta part ha estat extreta d'Internet i de llibres (articles, videos, enciclopèdies...). La segona part (marc pràctic), a causa de la seva complexitat, ha estat realitzada amb l'ajuda del doctor Ramón Alemany, investigador principal de l'IDIBELL. En aquest treball, no ha estat possible realitzar un procés experimental propi per tal de demostrar la hipòtesi plantejada, com he dit abans, a causa de la complexitat de l'experiment no em va ser permès realitzar-lo pel meu compte. La part pràctica, ha estat realitzada a partir d'una



visita a les instal·lacions de l'IDIBELL, en la qual se'm va explicar tota la informació necessària per explicar l'experiment (prèviament realitzat pels investigadors del centre) i per fer un anàlisi profitós dels resultats que se'm van proporcionar. Per facilitar als lectors la comprensió del treball, s'ha realitzat un glossari d'abreviatures a l'inici.



MARC TEÒRIC

1. EL CÀNCER

1.1. Què és?

El càncer és una malaltia provocada per una o diverses mutacions al material genètic de les cèl·lules que componen els nostres teixits. Aquestes cèl·lules es reproduïxen de manera descontrolada fins a formar un tumor, el qual pot afectar o no als òrgans.

Es diu que el tumor és benigne quan aquest no envaeix ni destrueix altres òrgans. Aquest s'extreu, en ocasions, quirúrgicament i no torna a reproduir-se.

Si el tumor és maligne, pot arribar a envair i destruir diversos òrgans, desplaçant-se mitjançant el sistema limfàtic, provocant així el que anomenarem una metàstasi.

1.2. Origen del càncer: la carcinogènesi.

El procés de desenvolupament d'un tumor maligne és anomenat carcinogènesi. Durant aquest etapa de desenvolupament el tumor es considerat no cancerós. Aquesta requereix un conjunt d'interaccions entre factors exògens i endògens i es produeix a través de tres estadis:

El primer estadi es anomenat iniciació. Durant aquesta fase, el carcinògen s'uneix de forma irreversible al DNA provocant una mutació. Tot aquest procés comporta l'activació d'un oncogen o la inactivació d'un gen supressor. És irreversible i amb memòria.

Seguidament, comença l'estadi de promoció on l'agent promotor és un compost químic, el qual és capaç de causar l'expansió selectiva de les cèl·lules iniciades. Aquestes provoquen alteracions en la transducció de senyals cel·lulars, sense modificar l'estructura molecular del DNA no es veu afectada. A diferència de les altres alteracions, aquesta és reversible.



Per últim, s'inicia l'estadi de progressió. L'agent progressor és un compost químic capaç de convertir una cèl·lula en estat de promoció en una cèl·lula potencialment maligna.

Aquesta alteració és irreversible i provoca una inestabilitat cariotípica que inclou alteracions en l'aparell mitòtic, trastorns funcionals en els telòmers i recombinació, amplificació i transposició gènica. També es pot donar a partir de cèl·lules normals, com resultat d'una exposició a dosis citotòxiques molt altes.

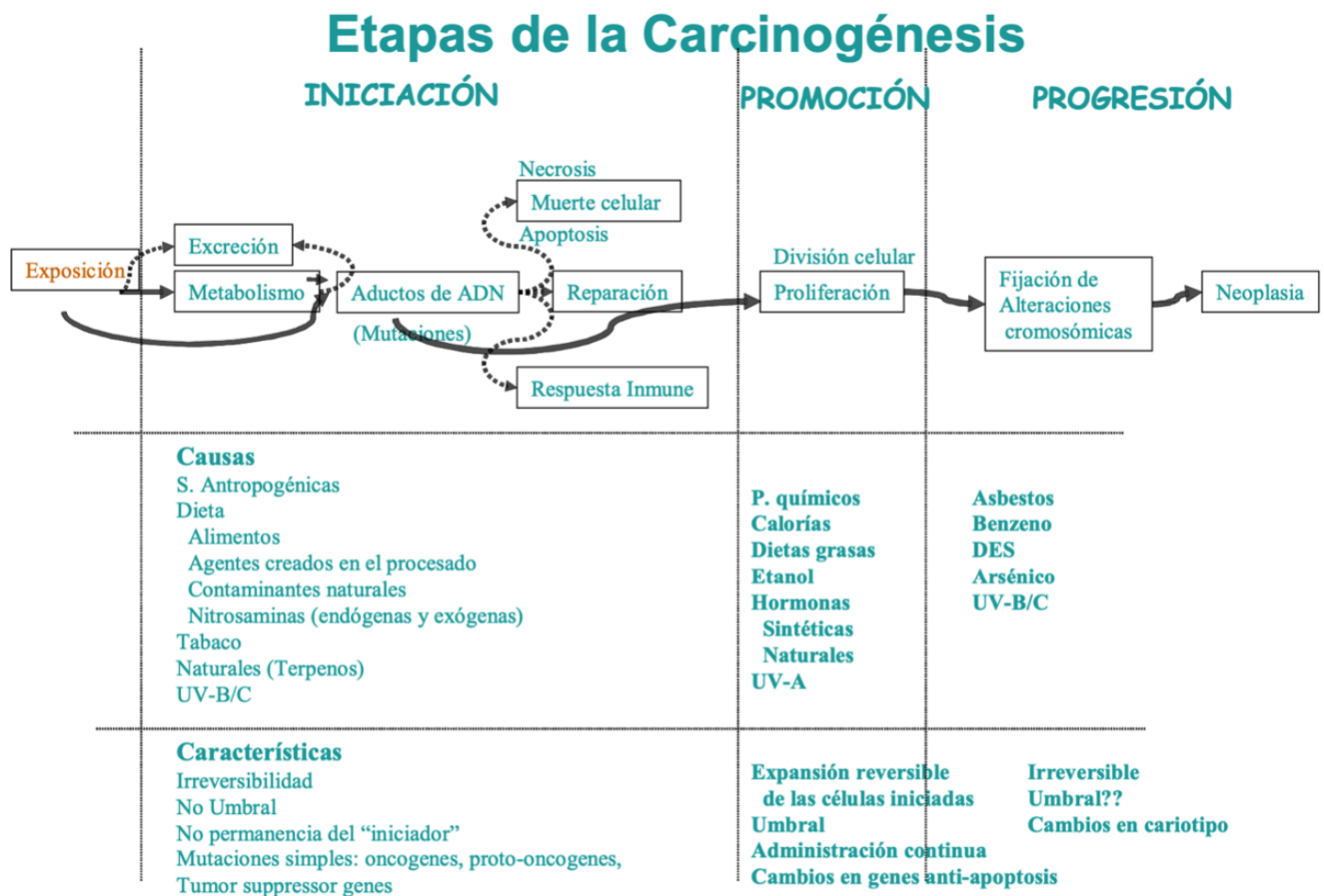


Figura 1. Esquema de les etapes de la cancerogènesi química i hormonal. Font: http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/educacion/01102014_CARCIINOGENESIS_III.pdf



1.3. Classificació

Carcinoma

Completant en total entre un 80 i 90 percent dels casos, els carcinomes, són un dels tipus més habituals de càncer. Tenen el seu origen a les cèl·lules epitelials, presents en els teixits externs (pell) o interns (mucoses).

Si el teixit afectat té una funció secretora, el tumor es anomena adenocarcinoma, si el teixit no té cap tipus de funció glandular s'anomena carcinoma epidermoide.

Sarcoma

Són un tipus de càncer que es forma als teixits de suport i connectius, normalment als ossos i els teixits tous. En alguns casos es poden arribar a formar als músculs, greixos i, fins i tot, als vasos sanguinis i/o limfàtics.

Mieloma

És un càncer que s'origina a les cèl·lules plasmàtiques de la medul·la òssia. Les cèl·lules plasmàtiques produeixen algunes de les proteïnes que es troben a la sang.

Leucèmia

Són càncers que es formen i desenvolupen a la medul·la òssia, que és on es produeixen les cèl·lules sanguínies. En molts casos, provoca una sobreproducció de glòbuls blancs immadurs, provocant al pacient un gran risc d'infecció.

Linfoma

Els limfomes es desenvolupen a les glàndules o ganglis del sistema limfàtic, una xarxa de vasos, ganglis i òrgans que purifiquen els fluids corporals i produeixen glòbuls blancs o limfòcits que combaten les infeccions. A diferència de les leucèmies, les quals s'anomenen "càncers líquids", els limfomes són "càncers sòlids".



1.4. Fases

El desenvolupament d'un càncer no té una duració exacta. Depenent de la persona i les seves condicions físiques i biològiques, pot evolucionar de manera més ràpida o més lenta:

- *Etapa 0:* durant aquesta fase es produeixen les mutacions en les cèl·lules en qüestió, dotant a aquestes amb les característiques de la malignitat (multiplicació descontrolada i capacitat d'invasió). No es presenta cap tipus de símptoma, la detecció és impossible.
- *Etapa I:* es caracteritza per l'existència de la microscòpica lesió cancerosa únicament localitzada al teixit on s'ha originat. Tampoc apareixen símptomes, però en alguns tipus és possible detectar-los amb tècniques de diagnòstic precoç.
- *Etapa II:* la lesió comença a estendre's fora de la seva localització inicial i envaeix altres teixits i/o òrgans. Aquesta és anomenada la fase d'invasió local. Comencen a aparèixer símptomes en el pacient.
- *Metàstasi:* finalment, la malaltia s'expandeix fora del seu lloc d'origen i apareixen lesions tumorals a distància denominades metàstasi. És l'etapa d'invasió a distància. La simptomatologia que presenta el pacient sol ser complexa.
- *Etapa IV (fase terminal):* aquesta fase es caracteritza per l'existència de malaltia oncològica avançada, progressiva i irreversible (incurable), també es coneix com càncer terminal.

2. ELS VIRUS

2.1. Què són?

Els virus són partícules senzilles de material genètic encapsulades en una vesícula de proteïnes. Aquestes petites partícules no són capaces de replicar-se per elles mateixes i



necessiten utilitzar els mecanismes de les cèl·lules, que prèviament han estat infectades, per tal de multiplicar-se.

2.2. Classificació

D'acord amb la teoria cel·lular, els virus no són considerats éssers vius, per aquesta raó la majoria de biòlegs els exclouen del sistema de classificació biològica. Tot i així, els científics s'han vist obligats a crear una classificació que agrupa els virus per semblança.

2.2.1. Classificació ICTV

El Comitè Internacional de Taxonomia de Virus (ICTV) ha desenvolupat un sistema de classificació en el qual es dona certa importància a unes propietats concretes dels virus per tal de mantenir la uniformitat familiar.

A l'any 2020, l' ICTV contava un total de 6 dominis, 10 regnes, 17 fílums, 2 subfílums, 39 classes, 59 ordres, 8 subordres, 189 famílies, 136 subfamílies, 2224 gèneres i 9110 espècies.

TAXONOMIA	
Super-regne	- <i>viria</i>
Regne	- <i>virae</i>
Fílum	- <i>viricota</i>
Subfílum	- <i>viricotina</i>
Classe	- <i>viricetes</i>
Ordre	- <i>virales</i>
Subordre	- <i>virineae</i>
Família	- <i>viridae</i>
Subfamília	- <i>virinae</i>
Gènere	- <i>virus</i>
Espècie	- <i>virus</i>

Taula 1. Taula de classificació segons l'ICTV. Font: Elaboració pròpia a partir de la informació de https://es.wikipedia.org/wiki/Virus#Clasificación_del_ICTV

2.2.2. Classificació de Baltimore

David Baltimore és el biòleg, guanyador del Premi Nobel, que va dissenyar un sistema de classificació dels virus. Actualment, aquest sistema creat per Baltimore s'utilitza en combinació amb el proposat per l'ICTV.

La classificació de Baltimore es basa en els mecanismes de producció del RNAm. Els virus necessiten generar aquest RNAm per tal de produir proteïnes i replicar-se, tot i així, cada família de virus utilitza uns mecanismes diferents. El genoma dels virus pot ser monocatenari (ss) o bicatenari (ds), de RNA o DNA, i poden utilitzar o no la transcriptasa

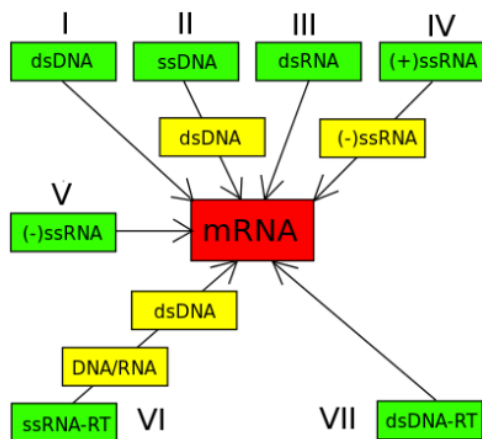


Figura 2: Esquema de la classificació de Baltimore.
Font: https://es.wikipedia.org/wiki/Virus#Clasificación_Baltimore

inversa. A més, els virus RNA monocatenaris poden ser positius (+) o negatius (-). Aquesta classificació reparteix els virus en set grups:

- I: Virus dsDNA (adenovirus, herpesvirus, poxvirus)
- II: Virus ssDNA (parvovirus)
- III: Virus dsARN (reovirus)
- IV: Virus (+)ssRNA (picornavirus, togavirus)
- V: Virus (-)ssRNA (Ortomixovirus, rabdovirus)
- VI: Virus ssRNA-RT (retrovirus)
- VII: Virus dsDNA-RT (Hepadnaviridae)

Cada tipus de virus està explicat a l'annex.

2.3. Procés de replicació viral

Els virus són patògens obligatoris, el que significa que són completament dependents del metabolisme de la cèl·lula infectada per replicar-se. El procés de replicació viral es divideix en 6 passos essencials, tot i que aquests poden variar depenent del tipus de virus:

- **Unió:** durant aquesta fase les proteïnes de la càpside interactuen amb els receptors específics de la membrana de la cèl·lula hoste.
- **Penetració:** prèviament, el procés d'unió pot haver induït canvis conformacionals, com a resultat, succeeix una fusió de les membranes viral i cel·lular.
- **Eliminació de la càpside:** un cop dins la cèl·lula, la càpside serà eliminada per enzimes, tant virals com de la mateixa cèl·lula hoste, alliberant així el genoma del virus.
- **Replicació:** quan la càpside ja ha estat eliminada, el genoma del virus es transcriu i tradueix per la mateixa cèl·lula, resultant en la síntesi de les proteïnes i del genoma viral. Aquest és el pas més variable.



- *Acoblament*: després de la síntesi, les proteïnes i els genomes són empaquetats per formar els virions, els quals ja estan a punt per sortir de la cèl·lula.
- *Alliberament dels virions*: hi ha dos mecanismes d'alliberament:
 - *Lisis*: la cèl·lula en qüestió es degrada, deixant lliures als virus que tenia a l'interior. Aquest procés culmina en la mort cel·lular. Els virus que s'alliberen mitjançant la lisis són anomenats citolítics.
 - *Gemmació*: els virus adquireixen la capa lipídica de la cèl·lula hoste. Aquest procés és exclusiu per virus amb embolcall i no resulta en la mort cel·lular. Els virus que s'alliberen mitjançant la gemmació són anomenats citopàtics.

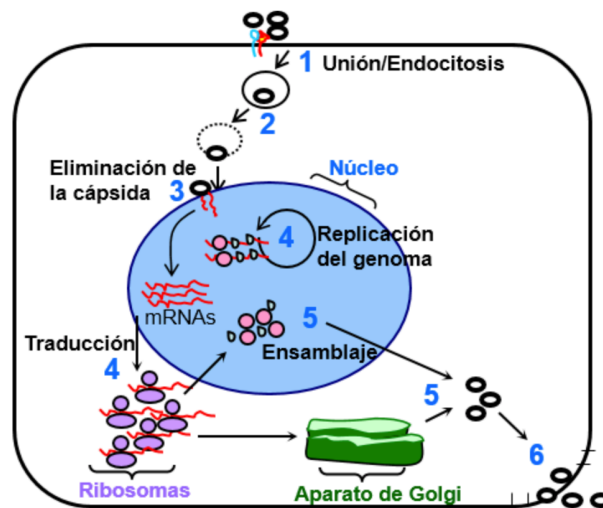


Figura 3. Esquema del procés de la replicació viral. Font: <https://www.immunology.org/es/public-information/bitesized-immunology/pathogens-and-disease/replicación-viral>

2.4. Els adenovirus

Els adenovirus són virus de DNA bicatenari. A l'infectar la cèl·lula hoste deixen el seu material genètic lliure pel nucli i aquest es transcriu de forma independent. La utilització d'aquests vectors virals té diferents avantatges com que no porten a la mutagènesi o que són capaços d'infectar tant a cèl·lules en divisió com cèl·lules quiescents (no es divideixen).



Per realitzar teràpies es modifica genèticament als virus. Als vectors de 1a generació se'ls elimina una part del gen E1 (early 1), bàsic per la replicació viral. Per altra banda, als vectors de 2a generació se'ls elimina gens temprans en el cicle del virus. En ambdós casos, quan es realitza la infecció s'expressen un seguit de gens que provoquen una resposta immune del cos del pacient.

2.4.1. Particularitats

L'immens regne dels virus presenta una gran varietat d'espècies, cadascuna amb particularitats i característiques completament diferents. Els adenovirus, causants del refredat comú, presenten un seguit de particularitats concretes que els han fet els candidats perfectes per aquest tractament:

- Són virus poc patològics, és a dir, no arriben a desenvolupar malalties greus, perjudicials per la salut humana. Per tant, inserir aquest virus no suposa cap tipus de perill per la persona.
- Els pacients afectats per aquesta família de virus majoritàriament són asimptomàtics, de manera que els virus no són perjudicials per la salut del pacient.
- Per altra banda, els adenovirus són una família molt coneguda i estudiada, es coneix la informació necessària per utilitzar-lo correctament i extreure tot el seu potencial.
- Al ser un virus de DNA es considera més estable, al no tenir tendència a patir mutacions, per tant, és més senzill tenir-lo controlat.
- Els adenovirus afecten principalment a cèl·lules epitelials, en les quals es formen la majoria dels tumors.

2.4.2. Estructura

Els adenovirus són virus de DNA bicatenari lineal, amb un genoma format per aproximadament 36.000 parells de bases, cadascuna de les quals conté entre 30 i 40 gens cadascuna. Els virions tenen una càpside icosaèdrica sense envoltura, la qual té un diàmetre d'entre 70 i 90 nm.



La càpside està formada per 240 capsòmers, subunitats morfològiques de la càpside, formats per hexones i pentones. Les 12 pentones es troben en cadascun dels vèrtex, aquestes presenten una base pentona i una fibra, la qual conté proteïnes de adherència vírica que permeten la infecció de les cèl·lules.

Dins de la càpside es troba el material genètic del virus i, almenys, dos de les seves proteïnes principals. Tot i així, el virió dels adenovirus conté almenys 11 proteïnes, de les quals, 9 tenen una funció estructural.

Aquesta estructura proporciona als adenovirus unes certes propietats, com la estabilitat a baix pH i a altes temperatures, o la resistència a les secrecions gàstriques i/o biliars.

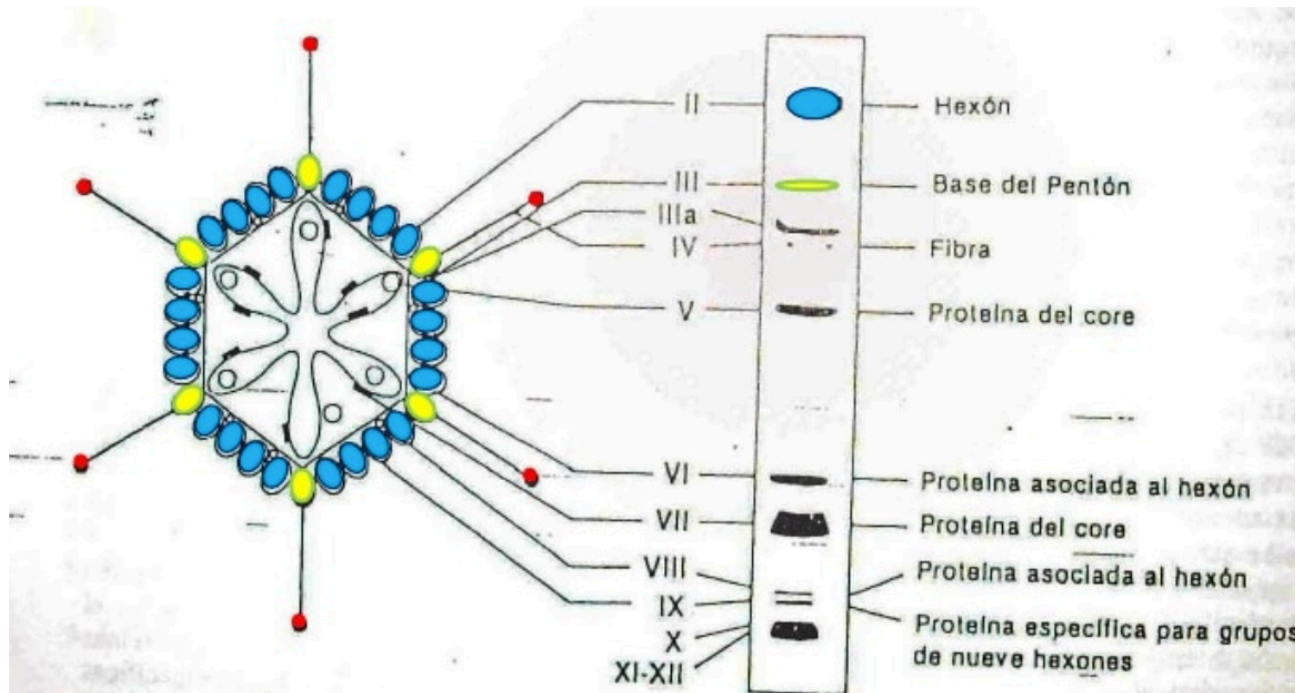


Figura 4. Representació esquemàtica d'una partícula d'adenovirus amb les seves parts senyalitzades. Font: <https://es.slideshare.net/sidney20178/adenoviridae>

2.4.3. Mecanisme de replicació dels adenovirus

Tots els mecanismes de replicació tenen una estructura similar, tot i així, en funció del tipus de virus i les seves característiques aquesta pot variar. Els adenovirus són virus de DNA bicatenari, aquesta característica els aporta un seguit de propietats i, per tant, el seu cicle consta de diferents parts:



- *Unió:* els adenovirus tenen afinitat a les cèl·lules mucoepitelials dels tractes respiratoris, gastrointestinals i conjuntius, per aquesta raó, són els causants de malalties com els refredats o la gastroenteritis. Els receptors amb els quals es compatible l'adenovirus són el CAR, el CPH i el CD46. La integritat de la seva envoltura és α_v Integrina¹.
- *Penetració:* l'entrada a l'interior de la cèl·lula hoste es dona per endocitosi de les vesícules de la membrana. La membrana d'aquestes vesícules es trenca a causa de l'acció tòxica del pentó, d'aquesta manera, perdent les proteïnes de la càpside, la partícula viral entra dins del citoplasma. Amb l'ajuda dels microtúbuls, la partícula viral arriba als porus nuclears, on aquesta es desmunta i allibera el DNA viral a dins del nucli.
- *Replicació del DNA:* el cicle lític dels adenovirus es divideix en quatre etapes o fases: la fase primerenca, la duplicació del DNA, la fase tardana i, finalment, l'acoblament i la maduració.
- *Fase primerenca:* Els gens de la fase inicial s'encarreguen d'expressar les proteïnes reguladores no-estructurals, les funcions d'aquestes proteïnes són:
 - Alterar l'expressió de proteïnes de la cèl·lula hoste, necessàries per realitzar la síntesi del DNA.
 - Activar altres gens del virus, com per exemple, la DNA polimerasa.
 - Evitar la mort prematura de la cèl·lula hoste a causa d'una resposta immunitària de l'organisme. Aquestes proteïnes bloquegen les defenses immunitàries com l'apoptosi, l'activitat de l'interferó i la translocació i expressió CPH de classe 1.

Dins del nucli, el genoma viral es transcriu. S'ha detectat que, en ambdues cadenes complementàries, els adenovirus tenen 6 proteïnes de transcripció temprana:

¹ Forma part d'una superfamília de glucoproteïnes que participen majoritàriament en la unió de les cèl·lules amb la matriu extracel·lular. Font: <https://es.wikipedia.org/wiki/Integrina>



Gen	Funció
<i>E1A</i>	És el gen encarregat d'activar la transcripció genètica vírica. Aquest s'uneix al supressor del creixement cel·lular i altera el creixement de la cèl·lula hoste. A més a més, inhibeix l'activació dels elements de resposta del interferó.
<i>E1B</i>	S'uneix al supressor del creixement cel·lular (p53 estimula la transformació) i inhibeix l'apoptosi.
<i>E2</i>	Aquest gen activa alguns promotors. Codifica la proteïna terminal en el DNA i la DNA polimerasa.
<i>E3</i>	És l'encarregat d'impedir la inflamació pel factor TFN-alfa (necrosis tumoral alfa).
<i>E4</i>	Limita l'efecte citopatològic del virus.
<i>AV ARN</i>	Inhibeix la resposta de l'interferó.

Taula 2. Proteïnes sintetitzades durant la fase temprana de la replicació viral dels Adenovirus. Font: Elaboració pròpia a partir de la informació de <https://es.slideshare.net/sidney20178/adenoviridae>

- **Duplicació del DNA:** La replicació del material genètic és realitzada a partir de les dues cadenes en forma semiconservativa. Una de les proteïnes terminals de 55 kD s'uneix covalentment a l'extrem 5' de la cadena de DNA i actua com a primer. El DNA polimerasa d'origen víric s'encarrega de mediar la replicació.
- **Fase tardana:** La última fase de la replicació es basa en la producció de proteïnes estructurals que s'utilitzaran per empaquetar el material genètic ja duplicat. Poc després d'haver començat la duplicació s'inicia la transcripció dels ARNm tardans, concretament, 5 regions (L1, L2, L3, L4 i L5).
- **Acoblament i maduració:** En acabar la duplicació del DNA, les proteïnes estructurals són transportades al nucli, on comença l'acoblament. En cada cèl·lula infectada es formen aproximadament unes 10.000 partícules virals en les 30 hores post-infecció. Finalment, els adenovirus són alliberats per una lisis de la cèl·lula hoste, per aquesta raó, els adenovirus són considerats virus citolítics.



3. LA TERÀPIA GÈNICA

3.1. Què és?

La teràpia gènica és una nova tecnologia que es basa en la transferència de material genètic a les cèl·lules d'un individu com a tractament per algunes malalties. La finalitat d'aquesta teràpia és restablir una funció cel·lular abolida o defectuosa, introduir una nova funció o interferir en una funció existent. Les diferents estratègies de la teràpia gènica es basen en la combinació de tres elements clau: el material genètic a transferir, el mètode de transferència d'aquest i el tipus cel·lular a que s'incorporarà el material.

En relació al tractament del càncer, aquesta tècnica és utilitzada de diverses maneres per la curació d'aquesta malaltia. *Aquestes estan explicades a l'annex.*

3.2. Recombineering

El recombineering és una tècnica de biologia genètica i molecular basada en sistemes de recombinació homòloga. El cromosoma bacterià i els plasmidis es poden dissenyar in vivo mitjançant recombinació homòloga utilitzant productes de PCR i oligonucleòtids sintètics com a substrats. Aquest procés és possible perquè les proteïnes de recombinació codificades per bacteriòfags són capaces de recombinar eficientment seqüències amb homologies d'entre 30 i 50 bases. Aquesta tècnica permet inserir o eliminar seqüències de DNA sense tenir en compte la ubicació dels llocs de restricció.

La seva realització requereix d'un seguit de tècniques complexes. Per començar, es prepara un stock de bacteris competents, els quals seran posteriorment transformats mitjançant electroporació. Un cop s'aconsegueix homogeneïtat en la mostra, es realitza l'aïllament, a petita o gran escala, del DNA plasmídic. Els plasmidis extrets seran modificats genèticament utilitzant enzims de restricció. Aquests plasmidis seran introduïts, mitjançant una transfecció amb fosfat de calci, als virus per tal de generar adenovirus recombinants. La homogeneïtat en l'estoc és vital per el bon funcionament de la tècnica, per tant, es fa una selecció de clons dels adenovirus. Finalment, aquests virus són amplificats i purificats.



4. LA VIROTERÀPIA ONCOLÍTICA

4.1. Què és?

La viroteràpia és un nou tractament contra el càncer en el qual s'utilitza un virus oncolític, és a dir, un virus que infecta i destrueix únicament a les cèl·lules canceroses. Els virus són modificats genèticament mitjançant la teràpia gènica, fent que aquests només infectin a les cèl·lules afectades pel càncer, d'aquesta manera el virus es torna completament inofensiu per al pacient.

Aquesta teràpia pot facilitar la destrucció de les cèl·lules tumorals si es combina amb altres tipus de tractaments, com la quimioteràpia o la radioteràpia. L'eficàcia d'aquesta no és gaire alta si no es combina amb altres teràpies i/o drogues. Per aquesta raó, s'està treballant per incrementar la seva eficàcia mitjançant altres mètodes aliens a altres tractaments o drogues.

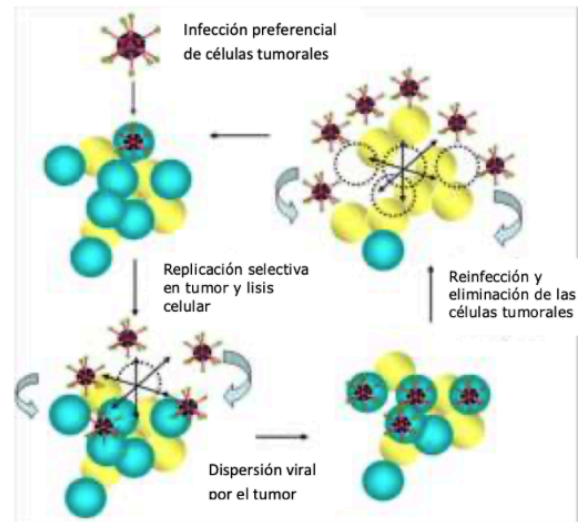


Figura 5. Esquema del sistema de propagació dels virus oncolítics. Font: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/120183/elj1de1.pdf?sequence=1>

4.2. Limitacions

Tot i estar demostrat que la viroteràpia és efectiva en la majoria dels casos, aquesta presenta un seguit de limitacions que fan disminuir la seva efectivitat. Limitacions com l'arribada dels virus al tumor o la seva dispersió per aquest mateix redueixen considerablement les possibilitats d'èxit d'aquest tractament, i fan que, de moment, no pugui ser utilitzada en pacients.

4.2.1. Arribada dels adenovirus al tumor

Factors com la localització i la disseminació del tumor dificulten en major o menor mesura l'arribada dels adenovirus a aquest. Els tumors poden aparèixer no disseminats, és a dir, concentrats en una sola massa, o en metàstasi, escampats per diferents parts de l'organisme de l'afectat. En cas que el tumor no estigui disseminat els virus s'injectaran mitjançant una administració local en la zona afectada. Per altra banda, si el càncer està



en estat de metàstasi es recorreria a una administració intravenosa, la qual, presenta més problemes.

Els adenovirus no estan adaptats a la circulació sanguínia, per tant, són eliminats ràpidament. Els virus són neutralitzats per la cascada del complement i la unió de plaquetes i eritròcits al entrar als vasos sanguinis, de la mateixa manera, els anticossos que l'organisme pot haver produït contra els adenovirus també contribueixen en la inactivació.

A part de la resposta immune que l'entrada dels virus provoca, el nivell de vascularització pot influir en la capacitat de disseminació dels adenovirus, dificultant així, la penetració del virus a la cèl·lula. Per aquesta raó, la viroteràpia és més efectiva en tumors petits, la seva gran vascularitat facilita l'entrada. Per últim, la pressió de l'espai intersticial, delimitat per les membranes de les cèl·lules de l'endoteli vascular i les tumorals, és significativament elevada, de manera que, dificulta l'arribada a la cèl·lula.

4.2.2. Dispersió intratumoral dels adenovirus

La dispersió intratumoral és essencial per tal d'eliminar la màxima massa tumoral possible amb la menor quantitat possible de virus. Quan la distribució dels virus és insuficient es dificulta l'eliminació de les cèl·lules tumorals.

El teixit tumoral presenta elevades contraccions a la matriu extracel·lular, la qual està formada per col·lagen, fibres elàstiques i àcid hialurònic. La pressió intersticial que produeixen aquests compostos dificulten el transport de macromolècules, fent també que la distribució dels adenovirus sigui més lenta i difícil.

Dels diferents components de la matriu extracel·lular destaca l'àcid hialurònic, el qual, s'ha demostrat que, en les cèl·lules tumorals es troba sobreexpressat i causa comportaments invasius i metastàsics (indueix la migració i adhesió del tumor a altres zones de l'organisme).



4.2.3. Potència oncolítica dels adenovirus

Els darrers assajos clínics han demostrat que és necessària l'obtenció de nous virus i/o mecanismes amb millor eficàcia antitumoral. Mitjançant un seguit d'estudis ha quedat demostrat que tots els efectes adversos (simptomatologia gripal, elevacions de transaminases hepàtiques o hiperbilirrubinèmia) que pot provocar la viroteràpia són fàcilment controlats, de manera que la fa una teràpia segura.

Tot i així, la potència oncolítica dels virus no és suficient per l'eliminació majoritària o total del tumor en qüestió, per tant, l'activitat antitumoral existeix però la resposta terapèutica és insuficient. La combinació amb altres teràpies com la quimioteràpia i la radioteràpia augmenta l'eficàcia sense necessitat de fer ascendir també la toxicitat. Amb aquest mateix objectiu, existeixen estratègies per contrarestar la baixa eficàcia dels adenovirus en alguns casos.

4.2.4. Models utilitzats

Per la realització dels assajos clínics s'utilitzen models, majoritàriament rosegadors com el ratolí o el hámster. Els assajos d'eficàcia són realitzats amb ratolins immunodeficients amb tumors xenògrafs humans, per centrar-se en la capacitat dels virus per eliminar massa tumoral. Per altra banda, també es realitzen assajos de toxicitat, en els quals s'utilitzen ratolins immunocompetents per tal d'estudiar si els efectes secundaris que poden ser causats per la teràpia són greus. Desgraciadament, en alguns casos els assajos són poc precisos a causa dels següents problemes:

- L'organisme dels ratolins és poc permissiu a la replicació dels adenovirus humans, cosa que fa que el virus no actuï de la mateixa manera que si fos injectat en un pacient humà.
- Per altra banda, els tumors que s'implanten als ratolins són fets artificialment, de manera que, tenen estructures i cinètiques de progressió diferents als tumors espontanis.



4.3. Estratègies per millorar l'eficàcia terapèutica

4.3.1. Millora del control de E1A

Les modificacions transcripcionals de E1A realitzades al material genètic del virus són les causants de la pèrdua de quantitat de proteïna E1A expressada. Aparentment, aquesta pèrdua pot semblar insignificant, però al provar-se en diferents tumors la pèrdua de potència oncolítica és perceptible.

Per compensar aquesta pèrdua, es treballa en l'augment d'expressió de la E1A que aconsegueix augmentar la quantitat de virus. De la mateixa manera, una quantitat més elevada de virus implica més quantitat de virus alliberats al medi extracel·lular.

4.3.2. Bioselecció dels adenovirus

Per tal de seleccionar els adenovirus més potents, es realitza un cribatge en condicions controlades en un laboratori d'un conjunt de virus ja modificats. Aleshores es donarà avantatge selectiva a aquells virus que compleixin les condicions ideals, ja triades prèviament.

4.3.3. Adenovirus armats

Les modificacions genètiques que es realitzen als adenovirus resulten útils ja que aporten eines exògenes amb funcions que els mateixos virus no són capaços de realitzar. Per aquesta raó, es combina la viroteràpia amb la teràpia gènica. Aquesta estratègia provoca una multiplicació de la quantitat de transgen mitjançant la replicació viral, afavorint a la infecció i destrucció de cèl·lules tumorals.

Quan modifiquem genèticament un organisme hem de tenir en compte dos factors. Per començar, la replicació viral no es pot veure afectada per la mutació. A més a més, s'ha de pensar en la capacitat d'incorporació de nou material genètic que tenen els adenovirus utilitzats, per exemple, l'adenovirus humà és capaç d'incorporar un 105% de material.

Utilitzant la teràpia gènica es pot aconseguir fer front a algunes de les limitacions que té aquesta teràpia, com la dificultat d'arribada o dispresió per la cèl·lula tumoral, o la pressió



intersticial que produeix la matriu extracel·lular. Amb aquestes incorporacions busquem assolir els següents objectius:

- Augmentar la capacitat citotòxica dels adenovirus.
- Modificar el microambient tumoral i/o la resposta immune en contra de la cèl·lula tumoral.
- Degradar la matriu extracel·lular.

4.3.4. Combinació amb drogues o altres teràpies

La combinació de la viroteràpia amb altres teràpies convencionals del càncer permet augmentar l'activitat antitumoral, d'aquesta manera, s'incrementa l'efectivitat del tractament.

La mort de les cèl·lules tumorals a causa de la quimioteràpia deixa espai intersticial lliure, cosa que, facilita la difusió dels virus pel tumor. A més a més, les drogues supressores són capaces de neutralitzar la resposta immune, i augmentar així l'efecte antitumoral. Per una altra banda, es pot utilitzar la teràpia gènica per inserir un transgen capaç de degradar la matriu extracel·lular i així afavorir la disseminació del virus, però també de l'agent quimioterapèutic.

En resum, la combinació de diferents tècniques amplia les possibilitats de potenciació de l'efecte oncolític.

4.3.5. Utilització de models més complets

Tal com s'ha explicat anteriorment, una de les limitacions de la viroteràpia són les diferències entre els models utilitzats en els assajos, en aquest cas ratolins, i l'ésser humà. Per aquesta raó, es proposa utilitzar el gos com a nou model d'investigació, ja que, és molt més complet. La utilització de gossos permet, en gran mesura, investigar amb tumors espontanis amb comportament biològic més similar als de l'espècie humana. A més a més, el genoma de les espècies canines té una major proximitat al genoma humà, cosa que fa que l'organisme dels models reaccioni de manera semblant a la de l'organisme humà.



MARC PRÀCTIC

Com s'ha explicat en el marc teòric, s'ha comprovat que la viroteràpia presenta un seguit de limitacions que impedeixen la seva utilització mèdica. Una d'aquestes limitacions és la disseminació dels adenovirus per la massa tumoral. A partir d'aquest problema, es va plantejar una hipòtesi que proporcionava una solució a aquest. Finalment, es va dur a terme tota la fase d'experimentació i es van extreure les conclusions a partir de fer un anàlisi dels resultats.

Per tal de realitzar aquesta part pràctica, vaig acudir a les instal·lacions de l'Institut de Recerca Biomèdica de Bellvitge, l'IDIBELL. Vaig posar-me en contacte amb el doctor Ramón Alemany, un dels investigadors principals del centre, el qual em va facilitar la investigació que estaven duent a terme. A partir d'aquests resultats, vaig realitzar un procés d'interpretació dels resultats i en vaig extreure conclusions.

L'Institut de Recerca Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL) és un centre de recerca orientat vers la millora dels problemes de salut de les persones. Per aconseguir-ho és necessari dur a terme recerca bàsica i clínica d'alt nivell.

L'IDIBELL té investigadors propis i integra la recerca que es duu a terme a l'Hospital Universitari de Bellvitge, l'Hospital de Viladecans (ambdós de l'Institut Català de la Salut), l'Institut Català d'Oncologia a l'Hospitalet i la Universitat de Barcelona al Campus de Bellvitge.

Els més de mil investigadors de l'IDIBELL s'organitzen en quatre grans àrees temàtiques –la de càncer, la de neurociències, la de medicina translacional i la de medicina regenerativa, nou programes de recerca i prop de setanta grups.²

² <https://idibell.cat/institut/>



5. FONAMENTS TEÒRICS

5.1. Factor Duran-Reynals

Francesc Duran i Reynals va néixer a Barcelona el 5 de desembre de 1899 i va morir a New Haven, EUA, el 27 de març de 1958. Va ser un metge i microbiòleg català descobridor del que ara s'anomena el factor testicular o de difusió. Aquesta factor es basa en la hialuronidasa.

1. un enzim que catalitza la hidròlisi de l'àcid hialurònic, el "material de ciment" dels teixits connectius; es troba en els testicles humans, així com en les sangoneres, el verí de la serp i el verí de les aranyes, i és produït per diversos bacteris patògens, que els permeten propagar-se pel teixit.³

5.2. Virus utilitzats

A continuació, es mostra un gràfic que representa els genomes dels adenovirus recombinants que han estat utilitzats en el projecte.

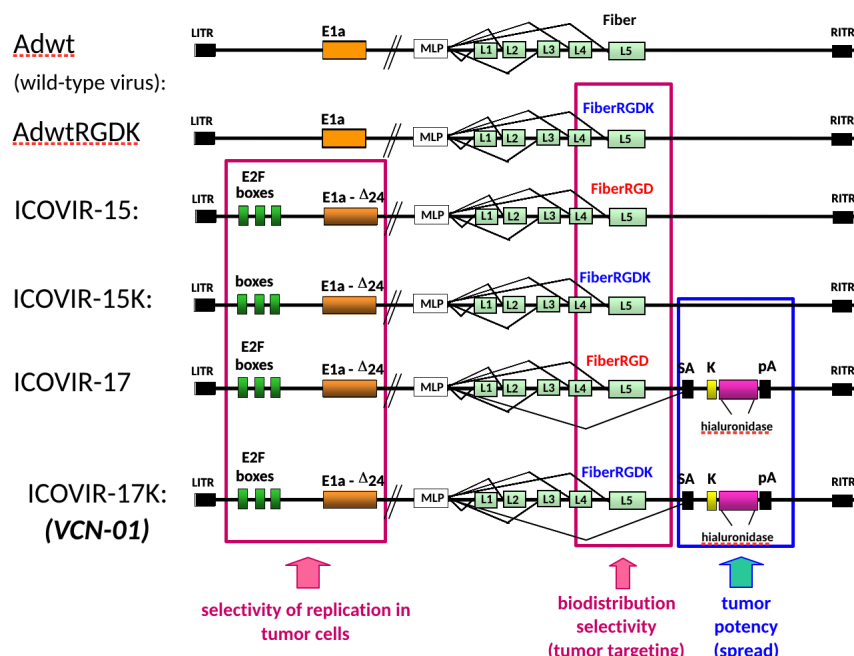


Figura 6. Representació gràfica dels genomes virals amb les seves modificacions corresponents indicades. Font: diapositives proporcionades per Ramon Alemany.

³<https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Duran-Reynals+spreading+factor>



Adwt: és el genoma d'un dels adenovirus utilitzats per crear tota la seqüència de virus utilitzats per al tractament del càncer. Aquest no presenta cap mutació, ni en la regió E1a (Early 1a) ni en la regió L5 (Late 5).

AdwtRGDK: es modifica la regió L5 del genoma afegint-hi una fibra RGDK. La regió E1a no es modifica.

ICOVIR-15: en aquest virus, s'aplica la mutació delta 24 en la regió E1a, la qual l'elimina. A més a més, s'afegeix la regió E2F i en la regió L5 s'hi afegeix una fibra RGD.

ICOVIR-15K: es realitzen exactament les mateixes modificacions que en l'adenovirus ICOVIR-15, amb la diferència que, a la regió L5 s'hi afegeix una fibra RGDK, en lloc d'una fibra RGD.

ICOVIR-17: s'aplica la mutació delta 24 en la regió E1a, la qual l'elimina. A més a més, s'afegeix la regió E2F i en la regió L5 s'hi afegeix una fibra RGD. El que el diferencia del virus ICOVIR-15 és que també se l'hi afegeix el gen que expressa la hialuronidasa.

ICOVIR-17K: es realitzen exactament les mateixes modificacions que en l'adenovirus ICOVIR-17, amb la diferència que, a la regió L5 s'hi afegeix una fibra RGDK, en lloc d'una fibra RGD.

5.3. SKMel-28

Les SKMel-28 són una sèrie de línies cel·lulars de melanoma, aïllades a partir de mostres tumorals derivades del pacient. Aquesta línia cel·lular expressa el mutant B-Raf (V600E) i el tipus salvatge N-Ras. S'utilitza en els laboratoris ja que aquesta és capaç de formar tumors en ratolins. Va ser establerta a partir d'un gangli limfàtic axil·lar d'un home de 51 anys d'etnia desconeguda.

S'ha utilitzat aquesta línia per realitzar diversos assajos in vitro ja que les seves cèl·lules són unes de les que produeixen més àcid hialurònic.



6. PROBLEMA

Està demostrat que el teixit tumoral presenta elevades contraccions a la matriu extracel·lular, la qual està formada per col·lagen, fibres elàstiques i àcid hialurònic.

Aquestes contraccions són degudes a les grans quantitats d'àcid hialurònic (HA) que presenta el teixit tumoral. La pressió que aquest realitza als tumors dificulta la disseminació dels virus arreu de la massa tumoral, fent així, que es necessitin una gran quantitat de virus per destruir completament, o gairebé, el tumor.

Per tant, com podríem augmentar la potència oncolítica dels adenovirus i facilitar la disseminació d'aquests pel tumor?

7. HIPÒTESI

Recordant la hipòtesi plantejada al principi del treball:

- Els adenovirus injectats al pacient infectaran una part de les cèl·lules tumorals. Aquestes cèl·lules seràn les encarregades de transcriure i traduir el material genètic del virus, en el qual s'hi ha inserit el gen que codifica la hialuronidasa, una enzima capaç de degradar l'àcid hialurònic. Aquesta degradarà gran part de l'àcid hialurònic localitzat a la matriu extracel·lular i facilitarà la disseminació viral, fent que gran part del tumor sigui infectada i destruïda.

8. MATERIALS I MÈTODES

En aquesta part del treball, s'explicarà tot el procediment seguit per realitzar l'experiment. Apareix de forma resumida, *la versió detallada i extensa es troba a l'annex.*

8.1. Tècniques de manipulació dels bacteris

Per tal d'obtenir les quantitats necessàries de DNA plasmídic, cal amplificar els bacteris. Aquests plasmidis han de contenir un origen de replicació que els permeti replicar-se dins de la cepa d'interès i un gen de resistència als antibiòtics (kanamicina o ampicilina), per tal de seleccionar els bacteris i evitar contaminacions. En aquest experiment, ha estat utilitzada la cepa DH5 del bacteri *Escherichia Coli*. Per amplificar els plasmidis, aquests



van ser introduïts a les DH5 mitjançant transformació, un cop l'estat de competència ja havia estat induït.

8.2. Tècniques de manipulació dels llevats

Les recombinacions d'aquest experiment han estat realitzades amb llevats, a causa de la seva eficiència. Igual que en els bacteris, els llevats han de contenir els elements necessaris per la replicació i un marcador de selecció que hagi estat mutat. Els llevats utilitzats pertanyen a la cepa *Saccharomyces cerevisiae* YPH857. Aquests han estat modificats per presentar mutacions en gens concrets implicats amb la síntesis de algunes molècules (ura3-53, lys2-801, ade2-101, his3- Δ 200, trp1- Δ 63, leu2- Δ 1cyh2R).

Les recombinacions han estat realitzades mitjançant la transformació dels dos DNAs d'interès linealitzats en llevats, als quals se'ls havia induït l'estat de competència anteriorment.

8.3. Cultius cel·lulars

La línia cel·lular utilitzada en aquest estudi (SKMel-28) es fa créixer formant una monocapa cel·lular amb morfologia epitelial adherida al suport sòlid on aquestes es cultiven.

Un cop realitzat el cultiu, s'ha de realitzar un comptatge cel·lular per determinar el nombre de cèl·lules i sembrar-ne, justament, la quantitat necessària. Seguidament, les cèl·lules es resuspenen amb el medi necessari per tenir la concentració desitjada. Quan la concentració és la desitjada, aquestes cèl·lules són congelades utilitzant nitrogen líquid i es porten a una concentració d'entre 5 i 20 milions de cèl·lules per ml de medi en congelació. Al cap d'unes hores, les cèl·lules ja es poden descongelar mitjançant un bany de 37°C, es canvia el medi de congelació i les cèl·lules es suspenen en el seu medi de cultiu corresponent. Aproximadament a les 16 hores, la majoria de les cèl·lules ja estaran adherides.



8.4. Adenovirus recombinants

Els adenovirus han estat obtinguts per recombinació homòloga en els llevats de la cepa YPH857.

El procés de construcció dels adenovirus recombinants està compost per dos passos: per començar, cal generar un insert, obtingut per PCR o síntesi directa, que contingui totes les modificacions que volem introduir al genoma del virus. Posteriorment, aquest insert es recombinat amb el plasmidi. Un cop s'obté el plasmidi que conté el genoma viral que volem introduir als adenovirus, s'allibera el genoma del suport del DNA que permet la replicació en bacteris i llevats. Aquest genoma viral es transfecta a les cèl·lules.

8.4.1. Tècniques per titular adenovirus

Per titular⁴ als adenovirus poden ser utilitzades tres tècniques diferents:

- *Determinació de les partícules víriques per espectrofotometria (vp/ml):* Aquest protocol es basa en determinar l'absorbància que té el DNA viral a una longitud d'ona de 260 nm, cosa que ens permet determinar el nombre de partícules virals totals d'un estoc viral purificat (sense discriminar entre partícules virals infectives i defectuoses).
- *Determinació de les partícules víriques per PCR a temps real (vp/ml):* Aquest protocol es basa en determinar els genomes virals que es troben en una mostra. Aquest procés es realitza mitjançant per amplificació de l'ADN per PCR a temps real. El nombre de còpies de genomes virals serveix per fer una quantificació en relació a una corba patró realitzada a partir de dilucions 1/10.
- *Determinació de les partícules virals funcionals (tu/ml) per tinció de l'hexó:* Aquest protocol es basa en fer un recompte del nombre de cèl·lules que són tenyides per la immunotinció de la proteïna viral de l'hexó en una monocapa de cèl·lules infectades. Permet determinar el nombre de partícules funcionals dels estocs virals purificats i d'extractes cel·lulars.

⁴ Les tècniques de titulació s'utilitzen per determinar la concentració de virus presents a l'estoc purificat.



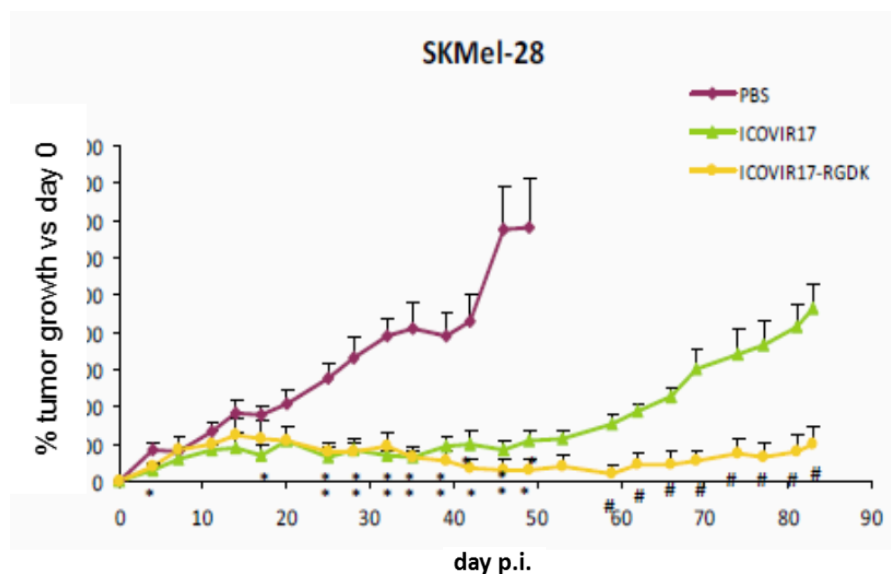
8.5. Tècniques utilitzades en assajos in vivo en ratolins amb adenovirus

Per començar, es realitza una implantació subcutània de les cèl·lules tumorals als ratolins amb els quals es realitzarà l'experiment. Quan els nòduls arriben a un volum d'entre 100-150 mm³, els ratolins es distribueixen a l'atzar en grups experimentals. Seguidament, es procedeix a administrar els estocs de virus purificats amb PBS. La injecció pot ser intratumoral o sistèmica.

9. RESULTATS

9.1. Resultats experimentals

9.1.1. RGDK i Hialuronidasa per millorar l'orientació i la difusió



Gràfic 1. Representació gràfica dels resultats de l'experiment in vitro realitzat en ratolins utilitzant els virus ICOVIR-17 i ICOVIR17-RGDK. Font: diapositives proporcionades per Ramón Alemany.

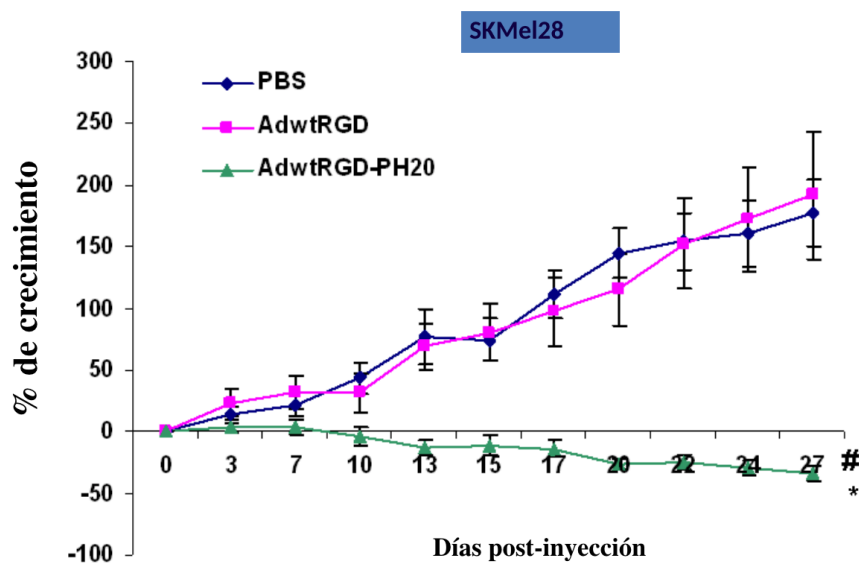
En aquest gràfic es pot observar l'evolució del creixement d'un tumor tractat amb viroteràpia (dos virus en concret). Aquest tumor ha estat induït en ratolins a partir de la línia cel·lular SKMel-28.



Per començar, el PBS (Phosphate Buffered Saline), representat en color lila a la gràfica, s'utilitza com a solució tampó. Inicialment, s'introdueix als ratolins aquesta solució salina tamponada amb fosfat per després injectar el virus. S'observa, únicament injectant el tampó, que el creixement de la massa tumoral és força significatiu, sobretot, entre els dies 40 i 50, on hi ha un gran increment del creixement.

El virus ICOVIR17, representat en color verd, ha estat modificat genèticament perquè expressi l'enzima hialuronidasa. Veiem que, l'expressió d'aquesta enzima afavoreix a la frenada del creixement del tumor. Per altra banda, representat en color groc, apareix el virus ICOVIR17-RGDK, aquest virus també ha estat modificat genèticament perquè expressi hialuronidasa, però, a més a més, se li ha modificat la fibra RGD per la RGDK, la qual afecta al factor de biodistribució del tumor. Inicialment, la línia que representa ICOVIR17-RGDK segueix el mateix patró que la del ICOVIR17, tot i així, a partir del dia 50 aquestes es comencen a diferenciar. El virus ICOVIR17-RGDK, resulta eficaç en la reducció del tumor, cosa que, pot ser deguda a la combinació dels dos factors utilitzats: l'expressió de hialuronidasa i l'augment de la focalització tumoral.

9.1.2. Adwt que expresa hialuronidasa: AdwtRGD-PH20



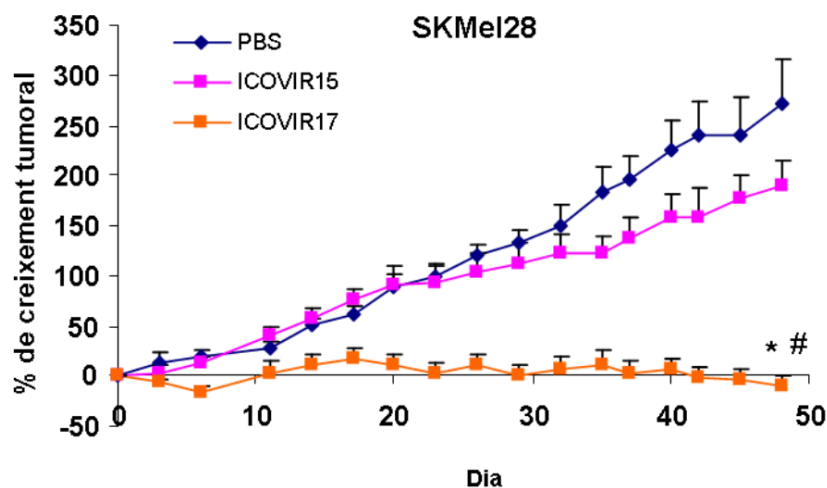
Gràfic 2. Representació gràfica dels resultats de l'experiment in vitro realitzat en ratolins utilitzant els virus AdwtRGD i AdwtRGD-PH20. Font: diapositives proporcionades per Ramón Alemany.



En aquest gràfic, també es representa el creixement després de tractar-lo amb un virus concret. En aquest cas, els virus utilitzats són els adenovirus AdwtRGD i el AdwtRGD-PH20 (amb hialuronidasa). L'experiment va ser realitzat en ratolins immunodeficients, als quals se'ls va injectar un tumor subcutani de la línia SKMel-28 humana. L'administració dels virus es va realitzar per la via intratumoral.

S'observen uns resultats similars a la gràfica anterior. Quan la solució tampó és aplicada, el creixement del tumor segueix sent significatiu. Per altra banda, es comprova que l'eficàcia oncolítica dels virus AdwtRGD és baixa, ja que no atura el creixement del tumor al llarg del temps. Tot i així, si aquest adenovirus és modificat genèticament perquè expressi hialuronidasa (PH20), la resposta antitumoral que aquest té és molt significativa. Es pot veure com, no només es frena el creixement del tumor, sinó que, a més a més, aquest es redueix.

9.1.3. Eficàcia antitumoral de ICOVIR17



Gràfic 3. Representació gràfica dels resultats de l'experiment in vitro realitzat en ratolins amb els virus ICOVIR15 i ICOVIR17. Font: diapositives proporcionades per Ramon Alemany.

En aquest gràfic, es veu representat el creixement d'un tumor després de ser tractat amb els virus ICOVIR15 i ICOVIR17. L'experiment va ser realitzat amb ratolins



immunodeficients, als quals se'ls va injectar un tumor subcutani, també de la línia SKMel28 humana. En aquest cas, però, l'administració dels virus va ser sistèmica.

Els resultats són similars als altres dos gràfics que han estat comentats prèviament. El virus ICOVIR15 frena el creixement del tumor, però de manera gairebé insignificant. En canvi, el virus ICOVIR17 atura el creixement del tumor totalment, i en alguns casos, fins i tot podria reduir la mida d'aquest.

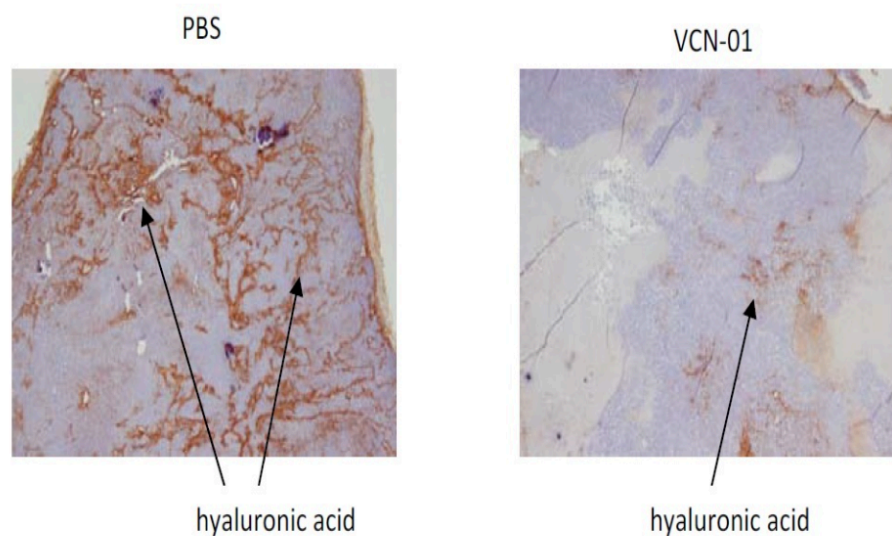


Figura 7. Comparació de la quantitat d'àcid hialurònic abans i després de ser tractat amb el virus VCN-01 (ICOVIR17K). Font: diapositives proporcionades per Ramón Alemany.

En la figura 7 apareixen dues imatges d'un tumor on s'hi diferencia l'àcid hialurònic. El tumor de la primera imatge, ha estat tractat únicament amb tampó (PBS) i es veu una gran quantitat d'àcid hialurònic repartit per tota la massa. Per altra banda, el tumor de la segona imatge, ha estat tractat amb virus VCN-01 (ICOVIR17K), virus que, expressa hialuronidasa. Es comprova que la major part d'aquest s'ha degradat.



9.2. Assaig clínic (VCN-01 + GE/nab-paclitaxel: efficacy and immune activation)

RECIST v 1.1 criteria	N=10
CR (Complete Response)	1 (10%)
PR (Partial Response)	3 (30%)
SD (Stable Disease)	6 (60%)
Long SD (>40 weeks)	2 (20%)
<i>DCR (Disease Control Rate)</i>	<i>10 (100%)</i>
ORR (Overall Response Rate)	4 (40%)
PFS (median)	9,93 months (2,8-20,2)
OS (median)	<i>on-going</i> 11,0 months (5,0-23,4)

Taula 3. Resultats de l'assaig clínic VCN-01 + GE/nab-paclitaxel: efficacy and immune activation. Font: diapositives proporcionades per Ramón Alemany.

PACIENTS	F	f(%)
CR (resposta completa)	1	10
PR (resposta parcial)	3	30
SD (malaltia estable)	4	40
Long SD (+40 setmanes)	2	20
TOTAL	10	100

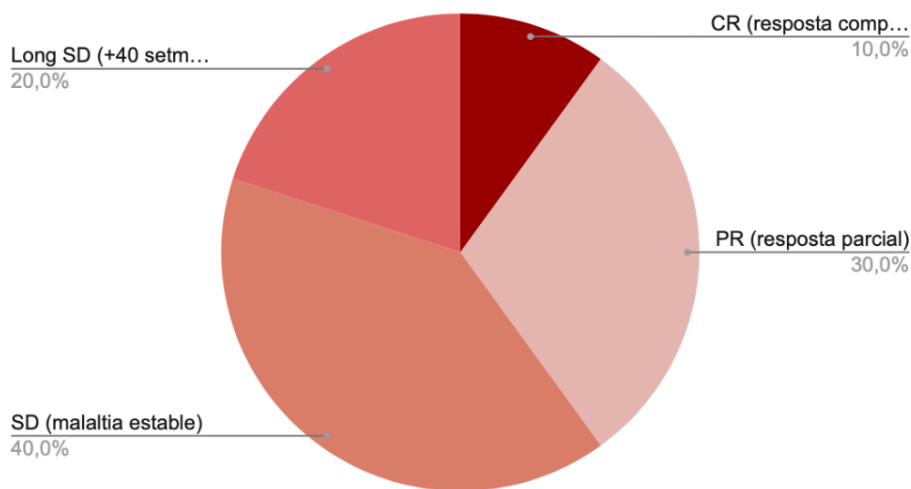
Taula 4. Resultats de l'assaig clínic traspassats a una taula de freqüències. Font: elaboració pròpia (a partir dels resultats proporcionats per Ramón Alemany).

L'assaig clínic va ser realitzat en 10 pacients. Només un d'aquests va produir una resposta completa, cosa que vol dir que el seu tumor va desaparèixer per complet. Tres dels pacients van desenvolupar una resposta parcial, és a dir, el seu tumor va reduir-se considerablement però no del tot. Per altra banda, en la resta de pacients la teràpia els va servir per mantenir la seva malaltia estable. Quatre d'aquests van mantenir la malaltia estable durant un període de temps mitjà, però a dos dels pacients els va ajudar a mantenir-la estable durant un període major a les 40 setmanes.



A més a més, a la taula 3 es veuen dos apartats més: OS (Overall Survival) i PFS (Progression Free Survival). Aquestes dues variables, serveixen per saber com funciona el tractament en l'evolució de la malaltia del pacient, és a dir, com aquest allarga la vida del pacient. La principal diferència entre aquestes dos és que la PFS té en compte el creixement del tumor, el que vol dir que, l'esperança de vida comença a contar-se a partir que el càncer deixa de créixer. Contràriament, la OS conta l'esperança de vida desde que el pacient es tractat. Per aquesta raó, la OS (11 mesos) és més elevada que la PFS (9,93 mesos).

RESULTATS ASSAIG CLÍNIC (10 pacients)



Gràfic 4. Representació gràfica dels resultats de l'assaig clínic. Font: elaboració pròpia (a partir dels resultats proporcionats per Ramón Alemany).

10. ANÀLISI DE RESULTATS I CONCLUSIONS

A l'inici del treball, es van plantejar un seguit d'objectius a assolir durant tot aquest procés. Inicialment, part dels objectius eren adquirir els coneixements necessaris per tal de realitzar el treball i ampliar considerablement els coneixements sobre el tema principal. Aquest objectiu ha estat assolit gràcies a tot el procés de recerca previ. A més a més, es va plantejar un objectiu principal d'aquest treball.

L'objectiu principal d'aquest treball és augmentar la potència oncolítica dels virus, trobant la solució a una de les limitacions de la viroteràpia. En aquest cas, la limitació tractada és la dificultat dels virus per disseminar-se per la massa tumoral. Es pot considerar que la



hipòtesi plantejada en aquest treball era correcta i l'objectiu principal que s'havia marcat ha estat assolit. Al llarg del treball, s'ha vist que la utilització del factor Duran-Reynals augmenta molt notòriament la potència oncolítica dels adenovirus, ja que els permet disseminar-se pràcticament per tota la massa tumoral.

Veient els resultats, es pot veure com els virus modificats per expressar hialuronidasa presenten una eficàcia significativament superior a la resta dels adenovirus. En els tres primers gràfics, es comprova que el creixement del tumor es redueix considerablement, i fins i tot, en alguns casos, aquest disminueix el seu tamany. A més a més, a la imatge es veu de forma visual i clara la degradació de gran part de l'àcid hialurònic que presentava el tumor abans de ser tractat.

Per altra banda, l'assaig clínic realitzat permet veure com els adenovirus actuen dins de l'organisme humà, que és el que realment interessa. Els resultats de l'assaig mostren que la viroteràpia és més eficaç per mantenir la malaltia controlada, o simplement per aturar o reduir el seu creixement. Tot i així, només un pacient va desenvolupar una resposta completa a la teràpia, per tant, es demostra que la viroteràpia encara ha de ser perfeccionada per tal d'utilitzar-la com a mètode definitiu de curació.

Per tant, com a conclusió general es pot dir que la viroteràpia és un tractament molt prometedor per al futur i que amb els coneixements generats amb les noves evidències científiques i la recerca biomèdica, s'aconseguirà perfeccionar-lo per tal de vèncer definitivament la malaltia del càncer.



AGRAÏMENTS

Per finalitzar aquest intens i enriquidor procés m'agradaria agrair a totes les persones que d'alguna manera han fet possible aquest treball.

Per començar, m'agradaria agrair a la meva tutora, [REDACTED], tota l'ajuda i el suport que m'ha proporcionat i haver tret el millor de mi durant tot aquest llarg procés. També m'agradaria agrair a la meva família per estar allà sempre animant-me i per estar disposats a ajudar-me en tot el que necessités. Agraeixo als meus amics i amigues haver viscut tots els bons i mals moments d'aquest procés al meu costat i ajudar-me si era necessari. Per últim, m'agradaria agrair al meu professor de Bojos per la Bioquímica, Víctor Jiménez, per l'interés mostrat i haver resolt tots els meus dubtes.

A més a més, m'agradaria agrair a Ramón Alemany l'oportunitat de visitar les instal·lacions de l'IDIBELL i tota la informació i els resultats que m'ha proporcionat, ja que sense això aquest treball no s'hauria pogut realitzar.

Per acabar, agraeixo a totes les persones que han col·laborat d'una manera o una altra en la realització d'aquest treball. Sense tots vosaltres això no hagués estat possible. Ha estat un plaer!



BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA

PÀGINES WEB

CÀNCER

Instituto Nacional del Cáncer. *¿Qué es el cáncer?*. <<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>> [Consulta: 12.05.21]

Clínic Barcelona, Hospital Universitari. *¿Qué tipos de cáncer hay?* <<https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/enfermedades/cancer/tipos-de-cancer>> [Consulta: 13.05.21]

National Cancer Institute. *Cancer classification*. <<https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>> [Consulta: 25.05.21]

Asociación Española Contra el Cáncer. *Fases y etapas del cáncer*. <<https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/que-es-cancer/fase>> [Consulta: 14.06.21]

Instituto Nacional del Cáncer. *Tipos de tratamiento*. <<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos>> [Consulta: 15.09.21]

DOMÍNGUEZ BOADA, Luis (2004). *Principios generales de la cancerogénesis: cancerogénesis química y hormonal*. <http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/educacion/01102014_CARCIINOGENESIS_III.pdf> [Consulta: 17.09.21]

VIRUS

National Human Genome Research Institute. *Virus*. <<https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Virus>> [Consulta: 17.08.21]

Wikipedia. *Virus*. <<https://es.wikipedia.org/wiki/Virus>> [Consulta: 22.08.21]

SIDNEY, Andrés. *Adenoviridae*. <<https://es.slideshare.net/sidney20178/adenoviridae>> [Consulta: 23.08.21]



British Society for immunology. *Replicación viral*. <<https://www.immunology.org/es/public-information/bitesized-immunology/pathogens-and-disease/replicación-viral>> [Consulta: 27.08.21]

TERÀPIA GÈNICA

Wikipedia. *Teràpia Gènica*. <https://es.wikipedia.org/wiki/Terapia_génica#Cáncer> [Consulta: 27.08.21]

ZHOU, Jian-Guang; HONG, Xin; HUANG, Cui-Fen. *Recombineering and its application*. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14669518/>> [Consulta: 28.09.21]

THOMASON, Lynn; L COURT, Donald; BUBUNENKO, Mikail; COSTANTINO, Nina; WILSON, Helen; DATTA, Simanti; OPPENHEIM, Amos. *Recombineering: genetic engineering in bacteria using homologous recombination* <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18265390/>> [Consulta: 28.09.21]

VIROTERÀPIA

Idibell. *Programa de Mecanismes Moleculars i Teràpia Experimental en Oncologia (Oncobell)*. <<https://idibell.cat/es/investigacion/area-de-cancer/programa-de-mecanismos-moleculares-y-terapia-experimental-en-oncologia-oncobell/viroterapia-del-cancer-2/>> [Consulta: 13.09.21]

Instituto nacional del cáncer. *Viroterapia oncolítica*. <<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/viroterapia-oncolitica>> [Consulta: 13.09.21]



TREBALLS

LABORDA JAMBRINA, Eduardo (2013). *Aumento de la potencia oncolítica de los adenovirus mediante el uso de virus adeno-asociados y generación de un adenovirus oncolítico canino como tratamiento para la clínica veterinaria y modelo para la clínica humana con adenovirus*. Disponible en: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/120183/elj1de1.pdf?sequence=1> [Consulta: durant tot el treball]

ROVIRA I RIGAU, Maria (2017) *Adenovirus oncoselectius pel tractament del càncer de pàncrees*. Disponible en: <https://www.tesisenred.net/handle/10803/456987#page=1> [Consulta: 20.09.2021]

LLIBRES

CORTES-FUNES, Hernán (2009) *Tratado de oncología, tomos I i II*