

# Eficacia de la terapia génica antisentido utilizando oligonucleótidos anti K-ras y antitelomerasa en cáncer colorrectal

S. Lledó, R. Alfonso y S. F. Aliño<sup>1</sup>

Servicio de Cirugía General y Digestiva. Hospital Clínico Universitario. Departamentos de Cirugía y <sup>1</sup>Farmacología. Universidad de Valencia. Valencia.

## RESUMEN

**Objetivo:** evaluar la eficacia de oligonucleótidos anti k-ras y antitelomerasa para detener el crecimiento tumoral en el cáncer colorrectal.

**Material y métodos:** se ha empleado una línea celular establecida de cáncer colorrectal humano (SW 480, ATTC®). Los oligodesoxirribonucleótidos (ODN) utilizados en el presente trabajo presentan modificación fosforotioato con el fin de mejorar su estabilidad en presencia de fluidos biológicos. Hemos utilizado un ODN antitelomerasa (Telp5), y dos ODN anti k-ras (AS-KRAS e ISIS). AS-KRAS actúa en el exón 1 e ISIS actúa a nivel de la unidad terminal de transcripción 5' del oncogen k-ras. Telp5 se une a la subunidad hTR de la telomerasa. Se han aplicado en concentraciones 1, 5, 10 y 20 micromolar, midiendo la viabilidad celular a las 48 y 72 horas de tratamiento. El análisis estadístico y el diseño de los gráficos se han realizado mediante el programa "Analyzing Data with GraphPad Prism-1999". GraphPad Software Inc., San Diego CA®. Para el tratamiento estadístico se ha utilizado el test t de Student.

**Resultados:** la dosis mínima (1 µM) no fue efectiva ni a 48 ni a 72 horas postratamiento. Con la dosis máxima (20 µM durante 48 horas) y utilizando la combinación de AS-KRAS y Telp5 obtuvimos una reducción de la viabilidad celular del 99,67%. El resto de resultados fueron intermedios, dependiendo del tipo de oligonucleótido empleado, la dosis y el tiempo de exposición.

**Conclusiones:** los oligonucleótidos antisentido probados detienen el crecimiento celular en el cáncer colorrectal, siendo la respuesta más eficaz la combinación de ambos y aumentando dicha eficacia con mayor dosis y tiempo de exposición.

**Palabras clave:** Cáncer colorrectal. Oligonucleótidos. Oncogén k-ras. Telomerasa. Terapia antisentido.

## INTRODUCCIÓN

La supervivencia del cáncer colorrectal (CCR) tras la cirugía considerada curativa está marcada por el desarrollo de recidivas locales y a distancia. En resecciones curativas la supervivencia a 5 años varía del 40 al 80% en función de la tasa de recidiva local (1). Con un control local de la enfermedad del 100% las muertes por cáncer serán de un 17%; con un control local del 80% ocurrirán un 31% de muertes (2). Estas recidivas pueden deberse a diseminación de células tumorales durante el proceso quirúrgico (3,4).

El oncogén K-ras se encuentra activado aproximadamente en el 70% de los cánceres colorrectales humanos

(5). Esto es responsable, en parte, del crecimiento incontrolado de las células de CCR (6). Asimismo, su activación se correlaciona con la sobreexpresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), implicado en fenómenos angiogénicos (7).

El ADN telomérico se acorta con cada división celular. En las células normales, se van acortando con cada replicación del ADN, con lo cual los cromosomas se vuelven inestables, las células son incapaces de dividirse y mueren.

Sin embargo, más del 90% de las células cancerosas presentan una actividad telomerasa elevada, lo cual contribuye al crecimiento sin control de las células transformadas (8). La actividad telomerasa se encuentra aumentada en 90-100% de los cánceres colorrectales humanos (9,10). Este hecho se ha propuesto como una vía de desarrollo tumoral alternativa (11).

Las técnicas antisentido para terapia génica consisten en el bloqueo de la expresión de un gen utilizando un oligonucleótido complementario de la secuencia del gen que se desea bloquear (12). El nucleótido antisentido puede sintetizarse químicamente y la forma más simple es generar un pequeño fragmento de DNA, un oligodesoxirribonucleótido. Las secuencias antisentido se diseñan de forma que reconozcan e hibriden con secuencias específicas presentes en el ARNm, de manera que los híbridos de doble cadena generados no pueden ser traducidos por el ribosoma para generar la proteína correspondiente al ARNm y la traducción de la proteína no se llevará a cabo.

En el presente trabajo, los oligodesoxirribonucleótidos antisentido (ODN-AS) han sido diseñados para interferir sobre los genes humanos K-ras y telomerasa (subunidad hTERT). Nuestro propósito ha sido estudiar la inhibición del crecimiento que provocan en una línea celular de cáncer colorrectal *in vitro*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos utilizado la línea celular humana: SW 480 (ATCC. The Global Bioresource Center®) la cual proviene de pacientes con adenocarcinomas colorrectales pri-

marios en estadio B de Dukes. Presenta mutación en el codón 273 del p53 y una mutación en el codón 12 del protooncogén K-ras.

Los estudios de viabilidad celular han sido llevados a cabo utilizando el kit comercial Calceína-AM (*Molecular Probes*). Este procedimiento permite la identificación de las células vivas cuando estas son incubadas en presencia de la calceína modificada. Esto es debido a que la calceína-AM que tiene apantallada su capacidad fluorescente, puede ser recuperada tras su metabolización intracelular, lo cual sólo puede suceder cuando las células están vivas.

Los ODN-AS empleados presentan modificación fosforotioato con el fin de reducir la degradación por las endonucleasas celulares y asegurar su entrada nuclear. Hemos utilizado un ODN-AS antitelomerasa (Telp5) y dos ODN-AS anti k-ras (AS-KRAS e ISIS). Las secuencias de cada oligonucleótido son: ISIS 6957: 5'-CAG TGC CTG CGC CGC GCT CG-3'; AS-KRAS: 5'-AAG TTT ATA TTC AGT CAT-3'; Telp5: 5'-CCC TTC TCA GTT AGG GTT AG-3'.

ISIS 6957 ha sido utilizado previamente por otros grupos (13,14). El AS-KRAS utilizado en el presente estudio, está diseñado contra el exón 1 del oncogén k-ras, mientras que ISIS actúa sobre la unidad terminal de transcripción 5'. El ODN-AS Telp5 actúa sobre el RNA de la subunidad hTR de la telomerasa humana. Los oligonucleótidos fueron utilizados en concentraciones de 1, 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ . La elección de estas dosis se ha basado en las utilizadas por otros grupos (13,15,16), pero tomando en consideración que en nuestros experimentos no se utilizan vectores de transferencia para facilitar el acceso de los ODN-AS a la célula. No se ha descrito citotoxicidad *in vitro* a concentraciones inferiores a 100 mM, ni tampoco toxicidad subaguda significativa en roedores y monos tras dosis intravenosas de hasta 100 mg/kg (12).

Los estudios de viabilidad/toxicidad celular se han realizado utilizando células cultivadas en placas de 96 pocillos, los cuales fueron sometidos a diferentes tratamientos, por triplicado.

Tras un periodo de 24 a 72 horas de incubación con los diferentes ODN-AS, estudiamos el efecto conseguido sobre la viabilidad celular. Hemos utilizado el kit "LIVE/DEAD viabilidad/citotoxicidad" de *Molecular Probes*<sup>®</sup>. El kit contiene calceína modificada (calceína-AM), una sustancia que tiene apantallada la capacidad fluorescente de la calceína y que al penetrar en las células vivas, esta es metabolizada y recupera su capacidad de emitir fluorescencia, la cual se mide en unidades de fluorescencia relativa (UFR).

Para los análisis estadísticos y el diseño de gráficos se ha utilizado el programa "Analyzing Data with GraphPad Prism-1999". *GraphPad Software Inc.*, San Diego CA<sup>®</sup>. Determinada la fluorescencia emitida (UFR) con cada dosis (1, 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ) aplicada durante 48 y 72 horas, se realizó el test de Student comparándolas con las UFR del grupo control. Se asumió una  $p < 0,05$  para establecer diferencias estadísticamente

significativas. Si bien el análisis estadístico se ha realizado utilizando las UFR, los resultados se muestran como porcentaje de viabilidad respecto al grupo control, al que se le supone el 100% de viabilidad, para una mejor comprensión del resultado (Tabla I).

## RESULTADOS

### Caracterización del test de viabilidad celular con calceína-AM

Con el fin de conocer las condiciones óptimas de la técnica en nuestro estudio, las células SW-480 fueron incubadas con calceína durante periodos variables de tiempo y la fluorescencia medida en un citofluorímetro de microplacas. Los resultados (Fig. 1) ponen de manifiesto que el máximo de fluorescencia celular se alcanza a los 40 min de la incubación y por ello, estas condiciones fueron mantenidas en todos los estudios posteriores.

### Viabilidad celular a las 48 horas del tratamiento con ODN-AS

En la figura 2, quedan representados los efectos a las 48 horas de la aplicación de ODN-AS sobre viabilidad celular en función de las concentraciones:

#### 1. Tratamiento con una concentración 20 $\mu\text{M}$ :

—Con el ODN-AS AS-KRAS la viabilidad celular se reduce un 41%.

—Con el ODN-AS Telp5 la viabilidad se reduce un 26%.

—Con la combinación de ambos la viabilidad se reduce un 99,6%.

—Con el ODN-AS ISIS la viabilidad se reduce un 14,52%.

#### 2. Tratamiento con una concentración 10 $\mu\text{M}$ :

—Con ODN-AS AS-KRAS la viabilidad celular se reduce un 32,3%.

—Con ODN-AS Telp5 la viabilidad se reduce un 0,6%.

—Con la combinación de ambos (K-T) la viabilidad se reduce un 34,65%.

—Con el ODN-AS ISIS la viabilidad se reduce en un 6%.

#### 3. Tratamiento con una concentración 5 $\mu\text{M}$ :

—Con ODN-AS AS-KRAS la viabilidad celular se reduce un 32%.

—Con ODN-AS Telp5 la viabilidad celular se reduce un 0%.

—Con la combinación de ambos (K-T) la viabilidad se redujo un 30%.

—Con el ODN-AS ISIS la viabilidad se redujo un 8%.

4. Con una concentración 1  $\mu\text{M}$  la viabilidad no se vio afectada.

La figura 3 ilustra el efecto de los ODN-AS con la máxima concentración aplicada durante 48 horas.

**Tabla I. Análisis estadístico: comparación de la viabilidad (UFR) del grupo control vs. viabilidad (UFR) tras aplicación de ODN-AS**

Control vs. ODN-AS 48 horas	T de Student (p)	Sig	Control vs. ODN-AS 72 horas	t de Student (p)	Sig
AS-KRAS 1 µM	0,0136	**	AS-KRAS 1 µM	1	NS
AS-KRAS 5 µM	0,005	**	AS-KRAS 5 µM	0,0002	***
AS-KRAS 10 µM	0,0005	***	AS-KRAS 10 µM	0,0002	***
AS-KRAS 20 µM	0,0003	***	—	—	—
Telp5 1 µM	1	NS	Telp5 1 µM	1	NS
Telp5 5 µM	1	NS	Telp5 5 µM	0,0002	***
Telp5 10 µM	0,29	NS	Telp5 10 µM	0,0002	***
Telp5 20 µM	0,0007	***	—	—	—
Anti K-T 1 µM	1	NS	Anti K-T 1 µM	1	NS
Anti K-T 5 µM	0,0006	***	Anti K-T 5 µM	0,0001	***
Anti K-T 10 µM	0,0004	***	Anti K-T 10 µM	< 0,0001	***
Anti K-T 20 µM	0,0001	***	—	—	—
ISIS 1 µM	0,0513	NS	ISIS 1 µM	1	NS
ISIS 5 µM	0,0077	**	ISIS 5 µM	1	NS
ISIS 10 µM	0,0136	**	ISIS 10 µM	0,0011	**
ISIS 20 µM	0,0029	**	—	—	—

Telp5 = antitelomerasa; Anti K-T = AS-KRAS + Telp5; Sig = significación estadística; NS = no significativo estadísticamente; p < 0,005 = \*; p < 0,02 = \*\*; p < 0,001 = \*\*\*

### Viabilidad celular a las 72 horas del tratamiento con ODN-AS

En la figura 4 queda representada la disminución de la viabilidad celular aplicando los ODN-AS durante 72 horas:

#### 1. Tratamiento con una concentración 10 µM:

—Con ODN-AS AS-KRAS la viabilidad celular se redujo un 56%.

—Con ODN-AS Telp5 la viabilidad celular se redujo un 54%.

—Con la combinación de los dos (K-T) la viabilidad se redujo un 99,8%.

—Con el ODN-AS ISIS la viabilidad se redujo un 28,5%.

#### 2. Tratamiento con una concentración 5 µM:

—Con ODN-AS AS-KRAS la viabilidad se redujo un 55,57%.

—Con ODN-AS Telp5 la viabilidad se redujo un 54,68%.

—Con la combinación K-T la viabilidad disminuyó un 63,07%.

—Con ODN-AS ISIS la viabilidad no disminuyó.

#### 3. Con una concentración 1 µM no se obtuvo reducción de la viabilidad.

El tratamiento combinado con los oligonucleótidos antisentido AS-KRAS y anti-telomerasa Telp5, provoca una mortalidad prácticamente del 100% de las células tumorales.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la terapia con oligonucleótidos antisentido contra el oncogén K-ras y el gen de la telomerasa, sobre la viabilidad

de una línea celular humana (SW480), derivada de un adenocarcinoma de colon. Los resultados ponen de manifiesto que el tratamiento independiente con cada uno de los ODN-AS es capaz de ejercer efectos inhibidores parciales (50%, aproximadamente) sobre la proliferación celular. Sin embargo, el tratamiento conjunto con ODNs contra K-ras y telomerasa ejercen una importante sinergia que conduce a la pérdida completa de la viabilidad (> 99,5%) de las células tumorales.

Los estudios de citotoxicidad *in vitro*, tienen gran importancia en el desarrollo de nuevos agentes biológicos con actividad citotóxica, preferentemente si los procedimientos tienen elevada sensibilidad y evitan la utilización de los protocolos convencionales basados en la liberación de isótopos radiactivos (comúnmente <sup>51</sup>Cr), previamente incorporados a las células. En el presente trabajo hemos utilizado un test de citotoxicidad por fluorimetría en microplacas, basado en la utilización del fluorocromo calceína, cuya fluorescencia ha sido apantallada mediante la modificación química de la molécula y cuya capacidad fluorescente puede ser recuperada por metabolización activa intracelular, lo cual sólo puede ser llevado a cabo en las células vivas.

Los estudios de citotoxicidad mediante fluorimetría indican que todos los ODN-AS utilizados ejercen significativas reducciones de la viabilidad celular. No obstante, existen diferencias relevantes en cuanto a su eficacia. En relación con los ODN-AS dirigidos contra el oncogén K-ras, debemos señalar que el ISIS, diseñado para actuar sobre el extremo 5'-terminal del RNAm, mostró efectos inhibidores del 30% sobre la viabilidad celular y en las mismas condiciones, el ODN-AS diseñado por nuestro grupo para actuar sobre el exón-1 (AS-KRAS), mostró una actividad inhibidora superior (55%). En ambos casos, el efecto observado parece ser máximo, ya que se alcanza incubando las células durante 72 h con concentra-

ciones 5  $\mu\text{M}$  ODN y no aumenta con concentraciones superiores. Si comparamos los resultados obtenidos con los de otros grupos, se ha descrito reducción de la viabilidad en un 20% bloqueando k-ras mediante ODNs vehiculizados por lípido catiónico a las 48 horas (17). El estudio de Guan Chen y cols. (14), informa de una inhibición de la proliferación celular del 70% tras 72 horas de tratamiento con ODN anti k-ras. En este mismo estudio se utilizó el ISIS 6957, que produjo una inhibición del crecimiento de sólo el 26% con 400 nM tras 72 h de tratamiento. Este estudio utilizó como diana fibroblastos de pulmón humano, y células de cáncer vesical, por lo que los resultados no son totalmente comparables con los nuestros al ser diferente el tipo celular.

Los efectos sobre la viabilidad celular de los ODN-AS frente a la telomerasa pone de manifiesto que estos fueron similares en potencia y eficacia al ODN anti K-ras diseñado en nuestro laboratorio y de igual modo, las dosis de 5 y 10  $\mu\text{M}$  mostraron similares efectos inhibidores sobre la viabilidad, sugiriendo que estas dosis deben representar la eficacia máxima específica del ODN antisentido.

Otros estudios (18-21) demuestran la posibilidad de bloquear la telomerasa, con ODN fosforotioato. El estudio de Herbert (22) demostró inhibición de la actividad telomerasa al 50% con dosis 1 nanomolar vehiculizada por lípidos, o concentraciones micromolar sin lípido. Este estudio actúa también contra la subunidad hTR, pero de nuevo los resultados no son comparables por tratarse de células epiteliales de mama. En el trabajo publicado por Elayadi y cols. (23), se describe tratamiento con ODN fosforotioato antitelomerasa en una línea de linfocitos T tipo Jurkat (leucemia). Tras 36 horas de tratamiento a concentración 0,25 mM la actividad celular decreció en 27%. Con 2 mM la reducción fue del 65%. El tratamiento se realizó en presencia de una sustancia lipídica (lipofectamina). Recientemente, el grupo de Wong (24), ha utilizado ODNs contra la subunidad hTR aplicados a CCR, obteniéndose resultados variados en función del tipo de línea celular utilizada (12-37%).

Los resultados derivados de los estudios con los ODN antisentido frente al oncogén K-ras y telomerasa indican que los ODN-AS diseñados por nosotros se encuadran

entre los de mayor eficacia descritos en la literatura. Además, el ODN AS-KRAS actúa antes en el tiempo que el Telp5, lo cual podría explicarse por las diferentes vías de actuación de cada uno. Sin embargo, la observación más relevante es que la administración conjunta de ambos tipos de ODN-AS genera un efecto sinérgico muy manifiesto que conduce a una inhibición completa (> 99,5%) de la viabilidad celular, lo cual abre una vía muy sugerente en el desarrollo de nuevas estrategias de terapia antisentido, sobre todo considerando que los éxitos alcanzados podrían ser mejorados utilizando vectores de transferencia y por tanto, junto con las ventajas de la mejora de la eficacia de la transferencia celular de los ODN y la reducción de las dosis necesarias para alcanzar el efecto terapéutico, se suma la ventaja de poder entregar de forma simultánea una mezcla de diferentes ODN a la misma célula. Por otro lado, nuestros resultados se han expresado en función de la capacidad de los ODN-AS para inhibir la viabilidad celular, lo cual es una buena aproximación al efecto de la terapia antisentido, pero sería interesante en próximos experimentos cuantificar la expresión de telomerasa y k-ras así como de sus proteínas derivadas tras el tratamiento.

En resumen, la terapia génica utilizando oligonucleótidos antisentido ha demostrado ser eficaz en nuestra experiencia, principalmente gracias a la sinergia observada con el tratamiento combinado, lo cual debe inhibir los mecanismos de expresión de los dos genes estudiados (K-ras y telomerasa), ambos implicados en la inhibición de la viabilidad celular del CCR. Queda por determinar la aplicabilidad, uso y efectos secundarios en modelos *in vivo*. Serán necesarios estudios futuros para evaluar la eficacia terapéutica de estos ODN-AS y/o su combinación utilizando vectores de transferencia, así como esclarecer su potencial utilidad clínica.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido subvencionado en su totalidad mediante la Beca Ayuda a la Investigación de la Fundación Española de Patología Digestiva. Los autores agradecen a la Fundación su apoyo.