

**Facultad de
Ciencias Exactas**
Departamento de
Ciencias Biológicas



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA**

Silenciamiento de la proteína BIRC6 mediado por baculovirus para el tratamiento de cáncer de mama triple negativo (TNBC)

Santiago Manuel Gómez Bergna

Director: Matías Luis Pidre

Co-directora: Ma. Florencia Gottardo

Instituto de Biotecnología y Biología Molecular
(IBBM)

Laboratorio de Procesos Biotecnológicos

2020

**Facultad de
Ciencias Exactas**
Departamento de
Ciencias Biológicas



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA**

Silenciamiento de la proteína BIRC6 mediado por baculovirus para el tratamiento de cáncer de mama triple negativo (TNBC)

Santiago Manuel Gómez Bergna

**Director: Matías Luis Pidre
Co-directora: Ma. Florencia Gottardo**

**Instituto de Biotecnología y Biología Molecular
(IBBM)**

Laboratorio de Procesos Biotecnológicos

2020

Agradecimientos

Este trabajo cierra esta etapa de mi vida y se pudo concluir gracias a muchísima gente que me acompañó y apoyó durante todos estos años, y a distintas posibilidades que se me fueron dando.

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad pública, gratuita y de calidad, que me permitió estudiar una carrera, y finalmente graduarme. En especial a la Facultad de Ciencias Exactas y a la Universidad Nacional de La Plata por permitirme formar parte de ellas.

Al Consejo Interuniversitario Nacional (CIN) por haberme otorgado la beca de estímulo a las vocaciones científicas.

Al Dr. Víctor Romanowski por permitirme realizar mi tesina de grado en el Laboratorio de Virología Molecular del IBBM.

Al Laboratorio de Oncología Molecular de la Universidad Nacional de Quilmes y a sus integrantes por el asesoramiento técnico y por permitirme usar las instalaciones para realizar parte de mi trabajo.

A mis compas de VA Abrilita, Pau, Leslie, Meli, Pablito, Laura, Tomás y Leti por recibirme tan bien, acompañarme y apoyarme durante este proceso. Siempre estando ahí con un mate, una ayuda, o un chiste para que esta responsabilidad de hacer un trabajo final, se vuelva mucho más llevadera.

A mis directores Mati y Flor (¡¡y que directores!!), gracias por haberme permitido realizar mi trabajo final con ustedes, por acompañarme siempre, por darme su apoyo y estar ahí cuándo hacía falta. Gracias también por ayudarme a formarme como profesional y como persona. Son lo mejor de lo mejor, excelentes científicxs y personas, y esto no hubiera sido posible sin ustedes ahí. ¡¡Gracias!!

A mis viejos, Inés y Pedro, gracias por acompañarme siempre, por permitirme estudiar y apoyarme en todo momento. Por las enseñanzas, por los valores, por guiarme y por estar ahí siempre que lo necesité. Gracias, por todo el cariño y por todas las posibilidades que me dieron para permitirme llegar hasta acá.

A mis hermanos, Flor, Emi, Tomi, gracias por estar siempre, por acompañarme durante todo este proceso, por bancarse todos mis cambios de humor, ansiedad y todo lo que ustedes saben durante todos estos años. Flor que me bancó días enteros hablándole de baculovirus y cáncer, Emi por bancarme también y por ayudarme con el diseño de este trabajo, y Tomi por siempre estar para dar una mano. Sin ustedes esto tampoco hubiese sido posible, son mis pilares. ¡Gracias!

A mis abuelos, a mi abuela Margarita que sigue acá y a mis abuelos Juancho, Aurora y Pedro que ya no están. Gracias a ustedes, por haberme acompañado y guiado siempre desde dónde pudieron más cerca o más lejos, pero siempre presentes.

A mis amigxs de la vida que siempre me acompañaron y estuvieron ahí en todo momento. Que se bancaron mis crisis facultativas (y las no facultativas también), y con los que siempre pude contar. Guille, Tati, Mati, Aldu, Pau, Agus, Pau, Micke, Andrés y muchxs más que fueron parte de esta etapa. Gracias a ustedes!

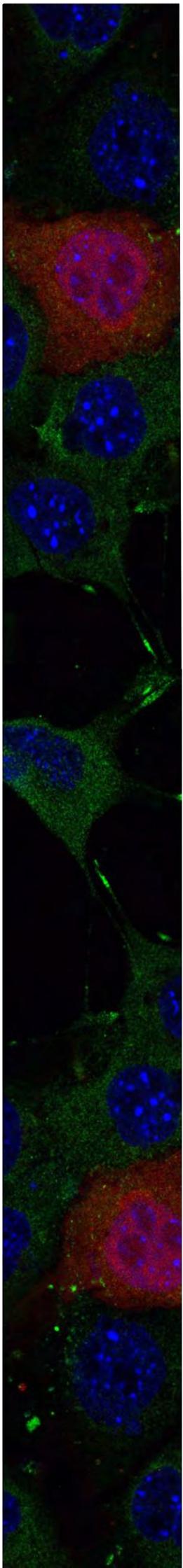
A lxs amigxs que me dio la Facultad, Cami, Manu, Clau y Mili acompañándome desde el principio y a mis amigxs Jero, Billy, Lu Vottero, Lu Delfino, Ian, Tincho, Mari, Magui, Juli, Emi, Debo, Juan, Feli, Lucas y todxs lxs demás que me crucé en esta hermosa etapa. ¡Gracias! Hicieron que fuese muchísimo más llevadera y que me lleve recuerdos alucinantes.

A mis tíos y mis primos, que son un millón y que me alegran los días. Mi familia correntina y mi familia platense, gracias a ustedes en parte estoy dónde estoy.

A mis colegas y amigxs que me dio la Extensión Universitaria, Flor U., Ceci DC, Nati, Mica, Percu, Cami, lxs Ivis, y todxs lxs demás! El EMISA, proyecto que desde que formo parte me hacen sentir súper a gusto y me enseñaron muchísimo sobre la profesión, el rol de la ciencia en la sociedad, y el tipo de ciencia que quiero, para qué y para quién. Las responsabilidades que tenemos, lo afortunadxs que somos y que esta lucha es colectiva, y que lo colectivo siempre es mejor. Gracias a ustedes por acompañarme y ayudarme a formar una mirada tan crítica sobre nuestras realidades.

Índice

Introducción General.....	6
Cáncer	6
Cáncer de mama	8
Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis (IAP)	9
BIRC6	10
BIRC6 y cáncer de mama triple negativo	11
Terapia génica.....	11
Silenciamiento génico	12
Vectores virales y no virales	13
Biología de los Baculovirus	15
Generación y uso de baculovirus recombinantes	16
Baculovirus silenciador del gen <i>birc6</i> : AcMNPV-shBirc6.....	18
Hipótesis.....	21
Objetivos	21
Objetivo general	21
Objetivos específicos.....	21
Materiales y métodos	23
Materiales.....	23
Métodos	24
Resultados.....	30
Discusión	43
Conclusiones	48
Perspectivas	48
Bibliografía	51



Introducción General

Introducción General

Cáncer

El cáncer comprende un grupo de más de 100 enfermedades que se desarrolla en el tiempo y que involucra la división descontrolada de una masa de células en el cuerpo. Aunque podría desarrollarse en cualquier tejido del cuerpo, y cada tipo de cáncer tiene sus propiedades únicas, los procesos básicos por los que se produce son similares en todas las formas de la enfermedad.

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo [1]. En Argentina, el cáncer presenta una incidencia de 212 casos por cada 100.000 habitantes (considerando ambos sexos y todos los tumores a excepción de piel no melanoma en 2018) alcanzando así el séptimo lugar en Latinoamérica. Esto corresponde a más de 125.000 casos nuevos de cáncer en ambos sexos por año, con porcentajes similares tanto en hombres como en mujeres [2]. En la **Figura 1** observamos los valores de incidencia de cáncer y mortalidad a nivel mundial y en Argentina. A nivel mundial el cáncer con más incidencia son el de pulmón y el de mama ocupando cada uno casi el 12% del total entre ambos sexos. A su vez, el cáncer de pulmón presenta la mayor tasa de mortalidad, seguido por el colorrectal, el de estómago, el de hígado y en quinto lugar el de mama. En Argentina el cáncer con mayor incidencia es el de mama con un 17% del total entre ambos sexos, y un 32% dentro del total del cáncer femenino, en segundo lugar encontramos el colorrectal con un 13% entre ambos sexos y un 15% en el total del cáncer masculino (siendo así el más incidente) y un 11% dentro del total de cáncer femenino, luego le sigue el de próstata, pulmón, riñón, páncreas, cérvix, estómago y vejiga entre otros [3–5].

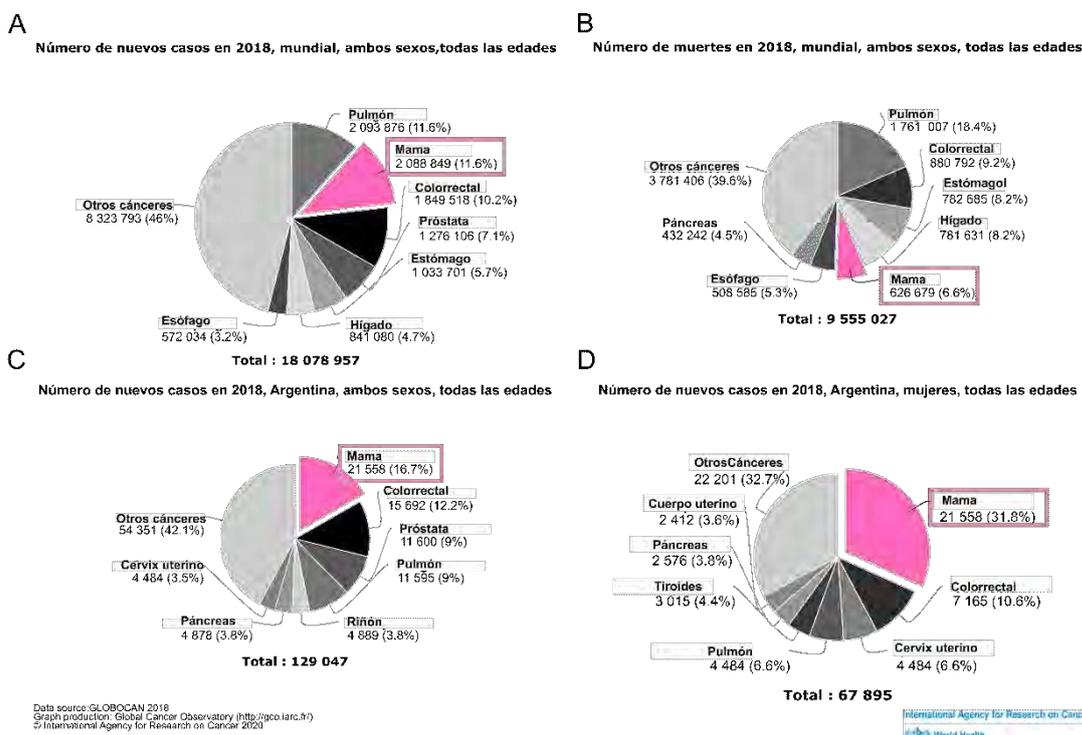


Figura 1. Gráfico de torta de porcentajes de incidencia (A) y mortalidad (B) de los distintos tipos de cáncer a nivel mundial. Incidencia de distintos tipos de cáncer en Argentina considerando ambos sexos (C) y considerando solo el sexo femenino (D). GLOBOCAN 2018, Global Cancer Observatory), International Agency for Research on Cancer 2020.

El cáncer comienza cuando una célula evade los mecanismos normales de regulación de la división y apoptosis, y comienza a proliferar desreguladamente. Un tumor consiste en una masa de células formada principalmente por estas células anormales que pueden permanecer

en el tejido en el que se originaron, o bien pueden invadir tejidos cercanos (tumor maligno). Asimismo, puede suceder que las células alcancen los vasos sanguíneos o linfa y así se diseminen haciendo metástasis y estableciendo nuevos tumores en otros tejidos distantes (Figura 2) [6].

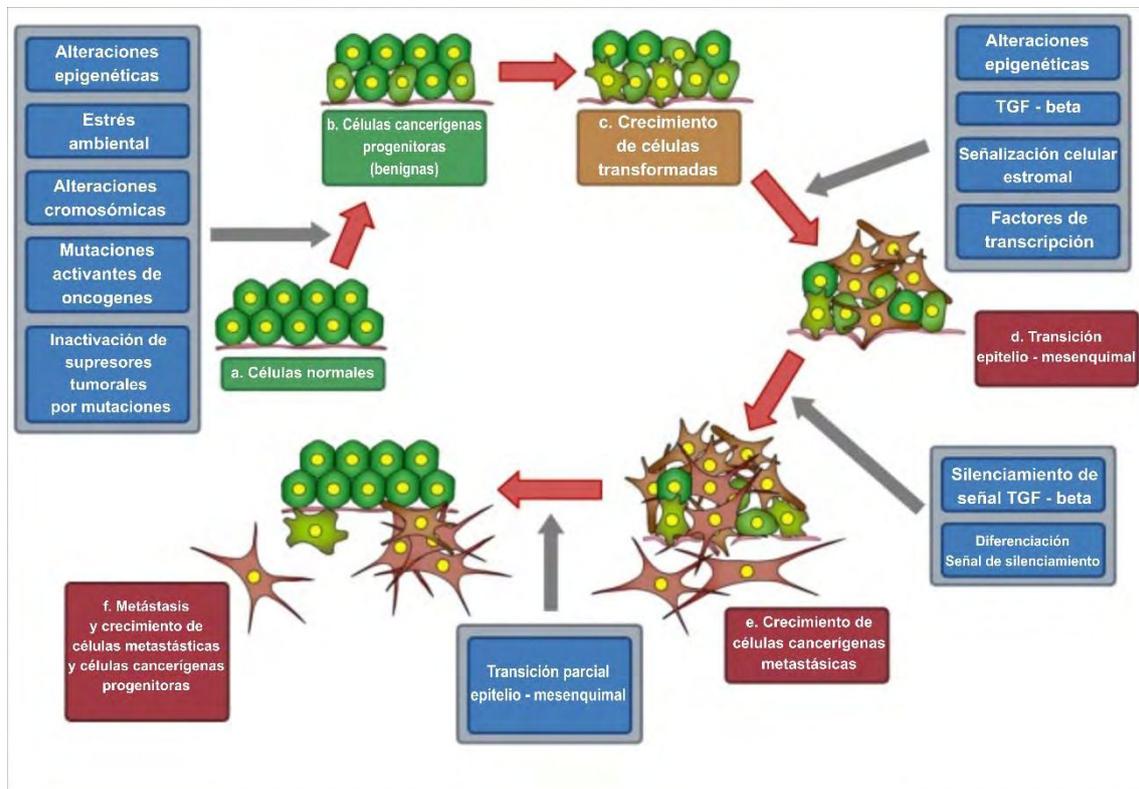


Figura 2. Representación esquemática de los procesos que ocurren para la transformación de células normales en células malignas, seguido de la diseminación y metástasis[7].

El cáncer puede presentar ciertos síntomas comunes, algunos son generales tales como la pérdida de peso involuntaria, fatiga inusual, dolor inusual y otros son síntomas focales como puede ser aparición de bultos/nódulos, lesiones cutáneas no cicatrizantes, sangrado inusual, tos de origen inusual, entre otros dependiendo el tipo particular de cáncer[8].

Como se mencionó previamente, las células y los organismos tienen diversos mecanismos regulatorios para controlar que una célula no se vuelva maligna y termine generando un tumor. Sin embargo, la acumulación de mutaciones puede llevar a la desregulación de esos mecanismos y facilitar la transformación de una célula normal en una célula tumoral.

Existen ciertas alteraciones genéticas que facilitan la generación y acumulación de mutaciones en otras regiones del genoma. Mutaciones deletéreas en genes ligados a la reparación del DNA y a la estabilización del mismo, o la activación de oncogenes, son factores con grandes implicancias en estos procesos. Un ejemplo lo constituyen mutaciones en los genes BRCA1/2 que generan una predisposición para el desarrollo del cáncer de mama[9].

Además, los factores ambientales y dietarios también pueden influir en la aparición y en el desarrollo del cáncer. Exposiciones reiteradas a contaminantes tales como los agrotóxicos [10–13], metales pesados y/o efluentes no tratados de la industria petroquímica [14] pueden llevar a la aparición y progresión del cáncer. También dietas con altos contenidos de azúcares o de grasas sostenidas en el tiempo pueden influir en el desarrollo de este conjunto de enfermedades[15–17]. Los mecanismos no son iguales en todos los casos, pero generalmente

involucran la generación de estrés oxidativo en las células y el posterior daño del DNA debido a la presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS) llevando así a la generación y acumulación de mutaciones. Además, puede haber desregulación de diferentes vías de señalización, favoreciendo la proliferación, adhesión y migración, e inhibiendo la apoptosis.

Cáncer de mama

Dentro de los diferentes tipos de cáncer se encuentra el cáncer de mama, que es el que presenta el mayor porcentaje de incidencia dentro de las mujeres tanto a nivel nacional como a nivel mundial, teniendo un 32% de incidencia en el total del cáncer detectado en Argentina y 24% de incidencia a nivel mundial, además de ser el que presenta mayor índice de mortalidad dentro de las mujeres[3,4]. El cáncer de mama puede clasificarse en distintos subtipos según sus diferencias etiológicas, presentaciones clinicopatológicas, características moleculares y en la respuesta a terapias. En general el receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2) son los marcadores más utilizados para clasificar el cáncer de mama invasivo y así poder predecir su desarrollo y seleccionar estrategias terapéuticas óptimas[18].

El cáncer de mama triple negativo (TNBC por sus siglas en inglés) se caracteriza por carecer de estos tres receptores[19]. Típicamente es observado en mujeres jóvenes afroamericanas e hispánicas que tienen una mutación en el gen BRCA1. Este tipo de cáncer se caracteriza por un perfil molecular distintivo, naturaleza agresiva y la falta de blancos terapéuticos efectivos[20–26]. Representa aproximadamente entre el 10 y 20% del cáncer de mama diagnosticados, y comparado con los que son receptores de hormonas positivos, tiene una peor prognosis, con una historia natural agresiva[27–32]. El TNBC a diferencia de los tumores que son receptores hormonales positivos tiene un patrón de diseminación que afecta principalmente al cerebro y a los pulmones, generando así metástasis en dichos sitios, pero la prevalencia de metástasis en los huesos es baja[33–35]. Este cáncer está asociado además con un mayor riesgo de recurrencia distante, predominantemente en los primeros dos años luego del diagnóstico[33,35]. También es más destructivo, con mayores tasas de recaída comparado con otros tipos de cáncer de mama, y muestra frecuentemente metástasis en las vísceras y el sistema nervioso central[36,37]. El TNBC se presenta predominantemente como carcinomas ductales invasivos, caracterizados por poca diferenciación, alta capacidad proliferativa, un gran tamaño tumoral, y una mayor tasa de nodos positivos[35,38]. Es el tipo de cáncer de mama más dificultoso para tratar debido a que los tumores se vuelven resistentes a las terapias, además de que no se han encontrado al momento blancos terapéuticos específicos. Este tipo de tumores se tratan generalmente con escisión quirúrgica, radioterapia y quimioterapia usando agentes citotóxicos. Sin embargo, no se han establecido aún regímenes óptimos para tratar esta patología.

Aunque hay muchos agentes químicos dirigidos y anticuerpos monoclonales bajo investigación, la mayoría fallan en alcanzar resultados terapéuticos satisfactorios. La falta de biomarcadores para estratificar TNBC e identificar pacientes con tumores sensibles a determinadas terapias dirigidas, es una de las razones para estos resultados desalentadores [22,39]. Experiencias previas y esfuerzos actuales sugieren que agentes individuales no resultan efectivos para tratar el TNBC. Utilizarlos combinados con otras terapias podría ser un modo de neutralizar la resistencia intrínseca o adquirida de esta patología[19]. Al presentar una heterogeneidad tan grande tanto intratumoralmente, como entre los distintos tumores de TNBC, en sumatoria con la resistencia intrínseca o adquirida a la quimioterapia, resulta prioritario el desarrollo de terapias dirigidas.

Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis (IAP)

La apoptosis es el proceso de muerte celular programada, que se encuentra evolutivamente conservado en todos los animales [40]. Este programa está regulado genéticamente y juega un rol importante en el desarrollo y la homeostasis [41]. La desregulación de las vías apoptóticas está implicada en la patogénesis de diversas enfermedades humanas, incluyendo el cáncer, enfermedades autoinmunes, infecciones virales, enfermedades neurodegenerativas y SIDA [42]. La apoptosis también regula directamente la tumorigénesis. Muchas veces algunas células evitan los mecanismos normales de la apoptosis para prevenir su autodestrucción, lo que termina en el desarrollo de células tumorales [43,44]. Este programa se encuentra estrictamente regulado por una serie de cascadas de señalización bajo la influencia de tres factores críticos: IAP, antagonistas de IAP y caspasas [45]. En la **Figura 3** se esquematizan las vías apoptóticas y los puntos regulados por las IAP.

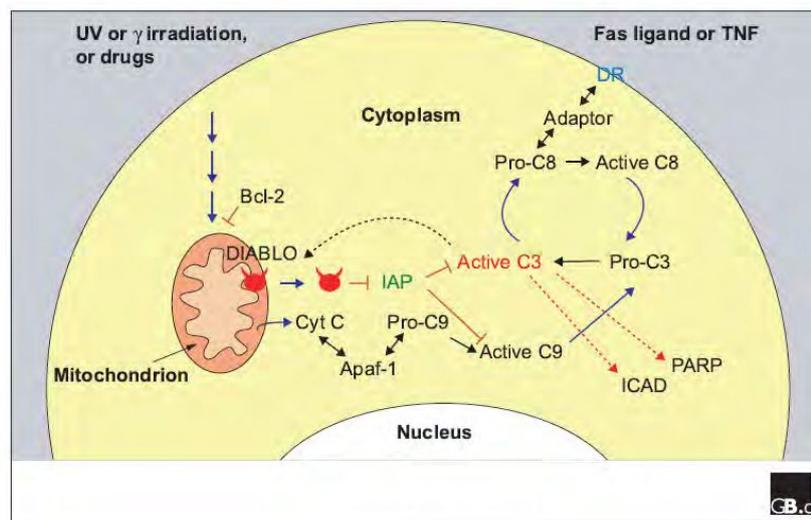


Figura 3. Representación esquemática de las vías intrínsecas y extrínsecas de la apoptosis, y los puntos en los que intervienen las IAP (verde)[46].

Las IAP o proteínas inhibidoras de la apoptosis son un grupo de proteínas anti- apoptóticas conservadas entre muchas especies. Las primeras IAP fueron identificadas a partir de genomas baculovirales [47,48]. Hasta el momento hay 8 IAP identificadas en humanos: DIAP-1, DIAP2/dILP, NAIP, c-IAP-1/HiAP-2/hMIHB, c-IAP-2/HiAP-1/hMIHC, XIAP, Survivin y BIRC6 [49–56]. Los miembros de esta familia presentan un motivo funcional común denominado BIR (Baculoviral IAP repeat) [48]. Los dominios BIR son módulos proteicos interactivos, que contienen una secuencia de 70 aminoácidos ricos en cisteína e histidina, con propiedades de unión distintivas necesarias para la actividad anti-apoptótica de la mayoría de las IAP [57]. Se reportó que este dominio es capaz de unirse a las caspasas e inhibir su actividad [58–60]. Las IAP contienen entre uno y tres dominios BIR y a menudo pueden presentar un dominio del tipo RING – finger o dominio de ubiquitina ligasa (**Figura 4**). Estas proteínas fueron identificadas en varios organismos multicelulares desde *Drosophila* hasta en mamíferos, pero no están presentes en plantas, levaduras, protozoos o *C. elegans*. La cercana relación entre IAP presentes en los organismos mencionados y los inhibidores de apoptosis baculovirales sugiere que estos últimos pueden haber sido adquiridos por los virus a través de la transferencia génica desde células de insecto hospedadoras [61]. Las IAP son capaces de inhibir las caspasas, y a su vez la proteína SMAC/DIABLO es antagonista de la función de las IAP [62–64]. El dominio RING no se encuentra en todas las IAP, pero muchas poseen otros dominios tales como el dominio de unión a ubiquitina

o el dominio de repeticiones ricas en leucina, que generalmente media interacciones proteína – proteína. Como es de esperarse, una familia de proteínas con estructuras y dominios tan variables también exhibe un amplio rango de funciones, y se sabe que los miembros de esta familia regulan muchos procesos celulares, tales como la progresión del ciclo celular, regulación transcripcional, inmunidad y apoptosis [65]. El dominio RING y su actividad E3 ligasa asociada es central para la función de varias IAP. La unión de ubiquitina a las proteínas, llamada “cascada de ubiquitinación” o simplemente “ubiquitinación”, puede llevar a la degradación vía proteosoma de las proteínas modificadas, varias de las cuales son reclutadas por los dominios BIR [66].

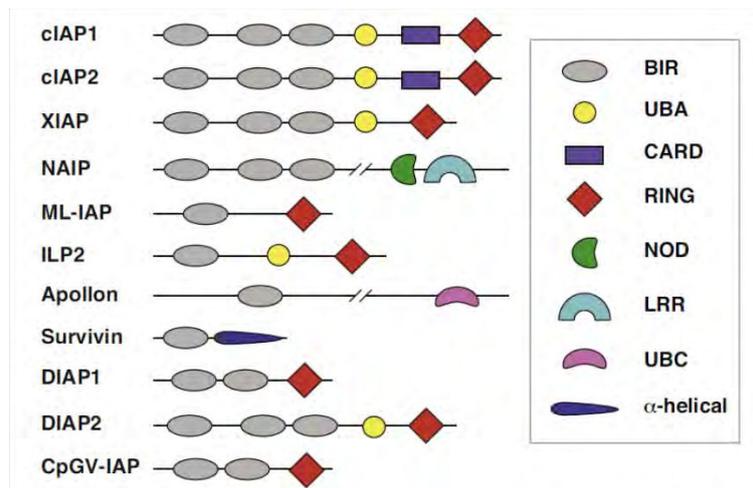


Figura 4. Esquema de la estructura modular de las IAP. Con un óvalo gris se representa el dominio BIR característico[65].

BIRC6

Entre las IAP encontramos a BIRC6 (Baculoviral IAP repeat containing 6, también conocida como Apollon o BRUCE en ratón). Ésta es una proteína de aproximadamente 530 kDa que contiene un dominio BIR en su región N- terminal, una región media grande desestructurada, y un dominio ubiquitina ligasa en su extremo C- terminal (UBC). Diferentes trabajos de investigación han descrito que BIRC6 desempeña un rol dual como una IAP anti-apoptótica y como una ubiquitina ligasa E2/E3 quimérica. BIRC6 es capaz de catalizar la ubiquitinación independiente de E3 a diferentes proteínas blanco como SMAC/DIABLO y Caspasa- 9, entre otras [67–69]. BIRC6 no solo inhibe a la proteína pro-apoptótica SMAC, sino que también se une a la pro- caspasa- 9 e inhibe su clivaje [68,70]. Asimismo, a través de su dominio BIR puede unirse e inhibir caspasas activas, incluyendo caspasas 3, 6, 7 y 9 [68,70–72].

Además de su función como proteína inhibidora de la apoptosis, BIRC6 es un regulador importante de la citocinesis y juega un rol importante en la proliferación celular[73] BIRC6 se encuentra asociada a membrana y se localiza en los compartimentos del Golgi y en el sistema vesicular [72]. Las IAP también tienen un rol crítico en el control de la supervivencia y muerte celular regulando factores de señalización cruciales como la vía de NF-κB [74]. BIRC6 además participa en procesos tales como la autofagia regulando la fusión del autofagosoma con el lisosoma [75,76]. En la **Figura 5** se muestra un esquema de los distintos procesos en los que interviene BIRC6.

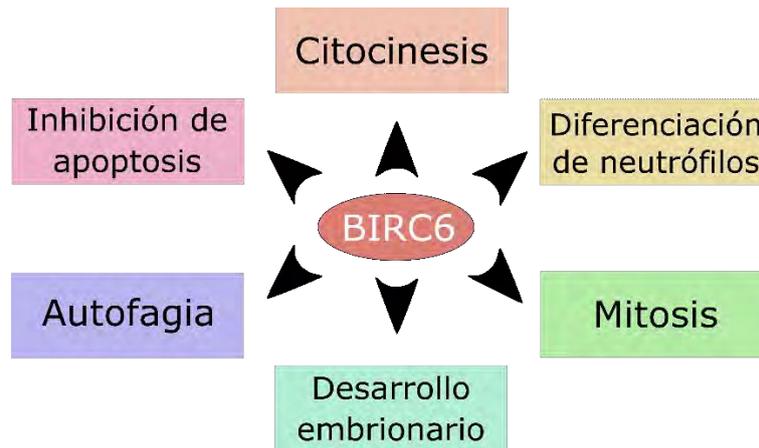


Figura 5. Esquema que resume los procesos en los que interviene BIRC6[77].

BIRC6 y cáncer de mama triple negativo

Como se mencionó anteriormente la apoptosis es el proceso de muerte celular programada, por lo que la evasión de la misma puede conducir a la carcinogénesis. Las células tumorales son conocidas por aumentar su supervivencia y proliferación sobre expresando proteínas anti-apoptóticas o inactivando proteínas pro-apoptóticas [78]. Una de las familias de proteínas anti-apoptóticas son los IAP. Éstas son capaces de regular no solo las vías apoptóticas en sí mismas, sino que también regulan el ciclo celular, la inflamación mediada por el cáncer, invasión tumoral y metástasis [79,80]. Diferentes grupos de investigación demostraron que las IAP se encontraban sobre expresadas en varios tipos de células tumorales, y se cree que podrían estar relacionadas con la tumorigénesis, la resistencia a los tratamientos y un peor pronóstico[81]. En particular, la proteína BIRC6, se encontró sobre expresada en tejidos tumorales de carcinomas gástricos [82], leucemia mieloide aguda [83], cáncer colorrectal [84], cáncer de mama [85], cáncer de cerebro [86], cáncer de próstata [87], cáncer de pulmón [88], y cáncer de ovario [89], entre otros. Además, se encontró que, a mayor sobreexpresión de la misma, menor es el nivel de diferenciación y de muerte celular [89] por lo que se cree que podría jugar un rol importante en la oncogénesis [83–88,90–93]. Además, se encontró una relación entre la sobreexpresión de IAP con la quimiorresistencia de algunos tipos celulares [88,94,95] y se logró recuperar la sensibilidad a dichas terapias mediante el silenciamiento o inhibición de dichas proteínas. Esto posiciona a las IAP, y particularmente a BIRC6, como un posible blanco terapéutico para combatir distintos tipos de cáncer. En particular, aquellos que más frecuentemente desarrollan quimiorresistencia, como es el caso de TNBC, y en los cuáles aún no se encuentra validado BIRC6 como blanco terapéutico.

Terapia génica

En el caso de patologías complejas, como es el caso de algunos tumores, que aún no se ha desarrollado un tratamiento eficaz y los tratamientos actuales tienen como objetivo evitar el progreso de la enfermedad, resulta de suma necesidad desarrollar terapias dirigidas que permitan afectar blancos específicos cada vez más puntuales. Dentro de las terapias que se encuentran en estudio podemos encontrar la inmunoterapia, por ejemplo, que utiliza anticuerpos para bloquear e inhibir la formación de estructuras puntuales; el uso de inhibidores sintéticos para bloquear vías de señalización dentro de la célula; o la terapia génica.

La terapia génica consiste en el tratamiento de diferentes desórdenes o patologías a través de la transferencia de material genético específicamente diseñado hacia el interior de las células a

tratar. Estos fragmentos de DNA ingresados tienen como objetivo modificar alguna propiedad fenotípica de la célula en la que ingresan con el fin de tratar una condición[96]. La terapia génica puede utilizar diversos mecanismos para generar este cambio en la célula blanco. Uno de ellos puede ser la inserción o delección de fragmentos de DNA para generar un *knock-out* y lograr que un gen no se exprese, otro puede ser la edición génica, que hace uso de nucleasas específicas, como por ejemplo el sistema CRISPR/Cas, en el que mediante una sonda de RNA se ubica una región específica de un gen y se le realizan diversas alteraciones *in situ*. Además, podemos encontrar sistemas que disminuyan la expresión de un gen, por ejemplo, utilizando RNA de interferencia que utilizan los mecanismos de silenciamiento génico propios de la célula[96–99]. En la **Figura 6** se muestran los distintos pasos que debe seguir un vector para que la terapia génica sea efectiva.

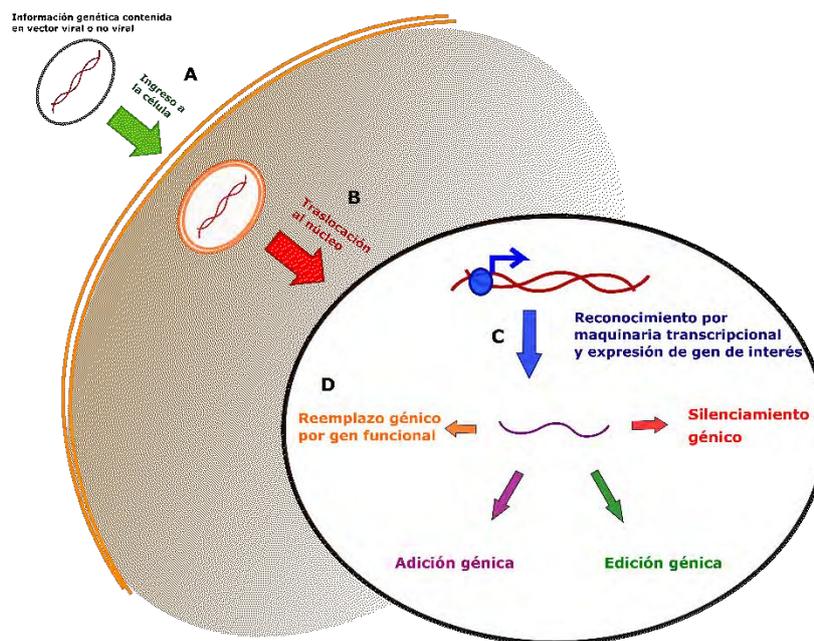


Figura 6. Representación de los pasos necesarios para poder llevar a cabo una terapia génica. Dentro de estos encontramos el ingreso a la célula (A), seguido de la traslación al núcleo (B), reconocimiento por maquinaria transcripcional y expresión (C) y efectivización del proceso esperado (D). Esquema armado basándose en las aplicaciones propuestas por Wang (2014)[100].

Silenciamiento génico

Existen diferentes estrategias para inhibir la función de una proteína. Algunas de ellas están basadas en la inhibición directa de la misma ya sea utilizando inhibidores naturales o sintéticos, o utilizando anticuerpos. Otras están basadas en la manipulación del genoma, por ejemplo, insertando o delecionando partes del mismo y generando genes *knock-out*. Por último, hay estrategias que se basan en afectar los mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales. Esto se conoce como silenciamiento génico y se basa en conducir el secuestro o la degradación de los mRNA generados a partir de un gen, utilizando RNA de interferencia (RNAi) [101]. El mecanismo de acción de este sistema consiste principalmente en una función de silenciamiento post-transcripcional altamente conservada mediada por moléculas de RNA de doble hebra (dsRNA). El silenciamiento de un gen determinado puede obtenerse de dos formas: utilizando directamente moléculas de dsRNA que por algún método son introducidas en el interior de las células (siRNA) o bien utilizando moléculas de DNA que codifiquen para una molécula pequeña

de RNA con estructura secundaria de horquilla, *short hairpin* RNA (shRNA), y de este modo la especie de RNA que media el silenciamiento se expresa directamente en el interior de la célula.

Para llevar adelante la expresión de un shRNA es necesario diseñar de forma meticulosa el vector que será utilizado para vehiculizarlo [102,103]. En primer lugar, es necesario elegir un promotor adecuado que controle la transcripción. El promotor más utilizado es el promotor del RNA pequeño nuclear U6 que es reconocido por la RNA polimerasa III. Dicha RNA polimerasa es la encargada de sintetizar moléculas de RNA pequeños en la célula y diversos trabajos han demostrado que es muy eficiente en la transcripción de shRNA. Un shRNA típico se encuentra conformado por una región doble cadena de entre 19 y 25 pb complementarios con la secuencia blanco, conectados entre sí por un *loop* simple cadena de entre 5 y 10 pb. Finalmente, la construcción del vector debe incorporar una secuencia terminadora de la transcripción que sea reconocida por la RNA polimerasa III. Una vez expresado el shRNA la molécula de dsRNA resultante es procesada por la proteína Drosha en el núcleo y por Dicer en el citoplasma, haciendo que pierda el *loop*. Finalmente, una de las hebras del RNA doble hebra resultante es cargado por el complejo formado por RISC y AGO2 y así híbrida con el mRNA blanco y lo cliva o lo secuestra, inhibiendo la traducción del mismo (**Figura 7**).

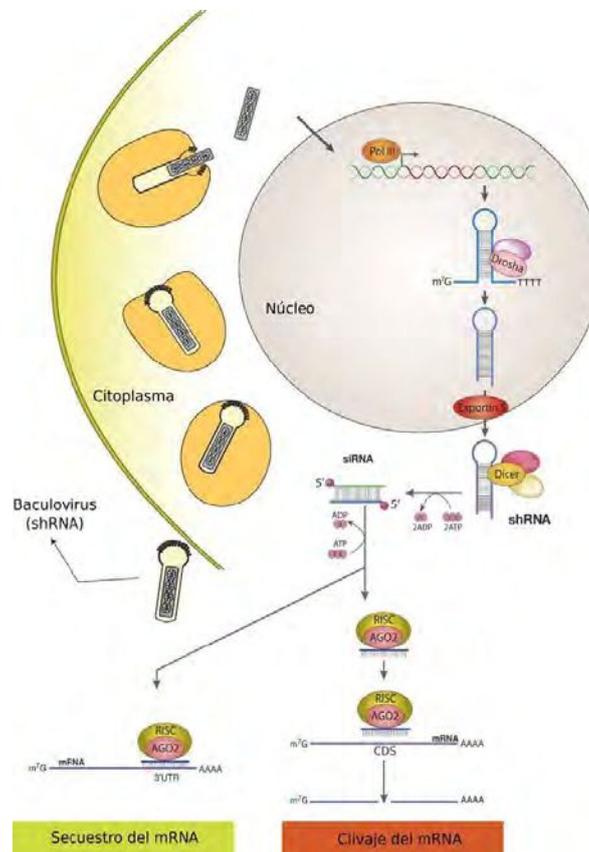


Figura 7. Esquema del proceso de silenciamiento mediado por baculovirus. Se muestran las distintas etapas desde el ingreso del vector, la translocación al núcleo, la expresión del shRNA y el resultado del silenciamiento llevando al secuestro o clivaje[104].

Vectores virales y no virales

Para lograr que las moléculas de DNA que codifican para el shRNA diseñado puedan ingresar a las células blanco existen diferentes estrategias. Dos grandes categorías contemplan aquellas que utilizan vectores virales y las que utilizan vectores no-virales. El vector es el vehículo que es utilizado para introducir material genético foráneo en el interior de la célula.

Los vectores no virales por lo general están constituidos por plásmidos y otras moléculas de DNA y requieren de distintos métodos para facilitar su ingreso a la célula blanco. Estos métodos tienen como ventaja la seguridad, presentan una baja inmunogenicidad y toxicidad, fácil manufactura y administración y, en principio, no tienen limitación en el tamaño de DNA a insertar, aunque esto último dependerá de la naturaleza del vector elegido. La mayor desventaja que tienen los vectores no virales es la baja eficiencia de transfección o ingreso a las células blanco. Dentro de los polímeros más utilizados encontramos polímeros sintéticos catiónicos que son capaces de neutralizar las cargas negativas del DNA, lo que le otorga propiedades como protección de las DNAsas y facilita el ingreso, como por ejemplo el polietilenglicol (PEG) o polietiliminina (PEI) [96,97]. Además, es posible conjugarlos a residuos tales como azúcares, anticuerpos, péptidos y folato para aumentar la eficiencia de transfección y facilitar la salida del endosoma y el ingreso al núcleo [105]. Asimismo, podemos encontrar polímeros naturales como pueden ser la ciclodextrina, quitosano, colágeno, gelatina y alginato. Estos últimos presentan como ventaja que pueden ser degradados y remodelados por enzimas secretoras de las células; no son tóxicos y son rápidamente incorporados[96,97]. Otro método consiste en el uso de lípidos catiónicos para facilitar el ingreso del DNA a la célula[106].

Los vectores virales, por su parte, son en esencia virus modificados y como tales poseen la capacidad de ingresar a las células que infectan, introducir su material genético y dirigirlo al núcleo. Los vectores virales deben cumplir con ciertas condiciones para poder ser utilizados. En primera medida, que el vector sea capaz de ingresar a la célula blanco permitiendo que el material genético cumpla su función. El nivel de bioseguridad necesario para su manipulación es un aspecto que debe considerarse al momento de elegir un vector viral: el riesgo de generar alguna patología en el usuario o su capacidad de integrarse en el genoma de la célula blanco son aspectos que deben analizarse con rigurosidad. Por último, la inmunidad preexistente que el organismo blanco de la terapia posea contra el vector debe ser mínima para que esta no interfiera con el *delivery* génico. Además debe ser fácil de producir y procesar y tener una vida útil razonable[96,97,99,107–109]. Miembros de múltiples familias virales han sido utilizados como vectores. Entre ellos podemos encontrar retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados y baculovirus, entre otros. Dentro del género retrovirus encontramos γ -retrovirus, lentivirus y spumavirus [110]. Estos virus pueden introducir fragmentos de DNA de hasta 9 kpb, pero presentan la desventaja de que pueden insertarse en el genoma y generar mutagénesis, generando así transmisión a partir de líneas germinales[96,99]. Otros vectores muy utilizados son los derivados de Adenovirus, que resultan herramientas atractivas dado que su infección es autolimitada y no fatal [111]. Pueden introducir fragmentos de hasta 30 kpb [112], sin embargo presentan una expresión limitada y una inmunidad preexistente elevada [99,113]. Los virus adeno-asociados también son muy utilizados como vectores, estos son parvovirus del género Dependovirus [114]. Son virus no envueltos con una cápside icosaédrica que contiene un genoma a DNA lineal simple hebra[96,97]. Estos virus son deficientes en su replicación y requieren de otros virus para replicarse y diseminarse [111] por lo que son muy utilizados para terapia génica *in vivo*. Sin embargo, sólo son capaces de introducir fragmentos de DNA de hasta 4,5 kpb y generan una respuesta inflamatoria moderada [99]. Finalmente, un grupo de virus que se han empezado a utilizar con mayor frecuencia son los baculovirus, que si bien son patógenos naturales de insectos, son capaces de transducir células de mamífero, donde el genoma permanece como un elemento episomal no replicativo[115].

Si bien los vectores basados en retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados presentan una gran eficiencia de transducción en las células de mamífero, es necesario trabajar con niveles de bioseguridad mayores para garantizar un manejo seguro de los mismos, además los pacientes

presentan inmunidad preexistente ya que son patógenos de mamíferos muy comunes, por lo que parte de las partículas virales introducidas serán destruidas. En algunos casos además, existe la posibilidad de que se integren en el genoma de las células blanco [116–118]. En este sentido, los baculovirus constituyen una herramienta de utilidad ya que presentan una baja inmunidad preexistente, no tienen ningún efecto tóxico en las células de vertebrados ni perturban el crecimiento celular, no pueden replicar en las mismas por lo que no hay riesgo de contraer una infección y al no ser patógenos de mamíferos se puede utilizar en laboratorios con niveles de bioseguridad 1 y 2 (dependiendo del transgén que expresen) [119].

Biología de los Baculovirus

Los baculovirus son virus específicos de artrópodos y han sido aislados a partir de unas 600 especies diferentes de insectos. Son un grupo muy diverso de virus con DNA doble hebra, circular, superenrollado y con un tamaño de genoma que varía entre 80 y 180 kpb que codifican entre 90 y 180 genes [120]. El genoma está empaquetado en una nucleocápside con forma de bastón de entre 230 y 385 nm de largo y entre 40 y 60 nm de diámetro [121,122]. Las nucleocápsides, a su vez, se encuentran envueltas en una membrana lipoproteica dando como resultado partículas virales con forma de bastón (*baculus*).

Estos virus realizan su ciclo infectivo en Lepidópteros, Himenópteros y Dípteros. Pertenecen a la familia *Baculoviridae* [123] que puede clasificarse en cuatro géneros [124]. Los virus infectivos de Lepidópteros se dividen en Alfa y Betabaculovirus abarcando los *nucleopolyhedrovirus* (NPVs) y *granulovirus* (GVs) respectivamente, mientras que los que infectan los géneros *Hymenoptera* y *Diptera* se llaman Gamma y Deltabaculovirus respectivamente [121,125].

En la mayoría de los baculovirus mejor caracterizados, los viriones presentan dos fenotipos durante el ciclo de infección: viriones derivados de cuerpos de oclusión (ODV) y viriones brotantes (BV). Aunque ambos tienen una estructura de la nucleocápside similar, difieren en el origen y la composición de sus envolturas y en el rol que cumplen en el ciclo de vida viral. Una característica distintiva de los baculovirus consiste en la formación de cuerpos de oclusión dentro de la célula que infectan [126,127]. Los cuerpos de oclusión son altamente estables y pueden resistir condiciones ambientales adversas, permitiendo que los viriones continúen siendo infectivos prolongadamente en el ambiente. Los cuerpos de oclusión se componen por una matriz cristalina compuesta de una proteína mayoritaria llamada poliedrina en NPVs y granulina en GV. Cuando el insecto en estadio larval ingiere material foliar contaminado con los cuerpos de oclusión, estos se desintegran en el intestino medio liberando los ODV que inician la primoinfección en el tejido epitelial.

Los baculovirus regulan su expresión génica de un modo fase- dependiente. Así comienzan con la fase inmediatamente temprana, luego la temprana tardía, la tardía y la muy tardía [128]. A diferencia de otros virus que codifican sus propias polimerasas, los baculovirus utilizan el sistema de transcripción de la célula hospedadora para expresar sus genes “inmediatamente tempranos” pero luego de iniciar la replicación del DNA propio sólo dependen de su RNA polimerasa para transcribir los genes “tardíos” y “muy tardíos”. Esto sugiere que tanto la maquinaria transcripcional viral como la del hospedador se ven afectadas para priorizar la expresión de los genes de fase muy tardía [120].

El ciclo infectivo en el epitelio del intestino medio finaliza con la producción del segundo fenotipo viral: los BV o viriones brotantes que llevarán a cabo la infección sistémica en la larva.

El ingreso de los BV de AcMNPV (Virus de la nucleopoliedrosis de *Autographa californica*), el baculovirus más estudiado, a la célula hospedadora es mediado por una glicoproteína viral denominada GP64 que interacciona con un receptor celular poco caracterizado. Esta interacción permite el ingreso del virus a través del proceso de endocitosis dependiente de clatrina y la subsecuente acidificación de la vesícula endosomal internalizada. Dicha variación en el pH genera un cambio conformacional en la proteína viral GP64 que acerca tanto la membrana del virión como la membrana vesicular dando como resultado la fusión de ambas. De este modo, la nucleocápside viral es liberada al citoplasma y migra al núcleo celular donde el DNA resulta accesible a la maquinaria de transcripción permitiendo el inicio de la cascada transcripcional. (Figura 8)

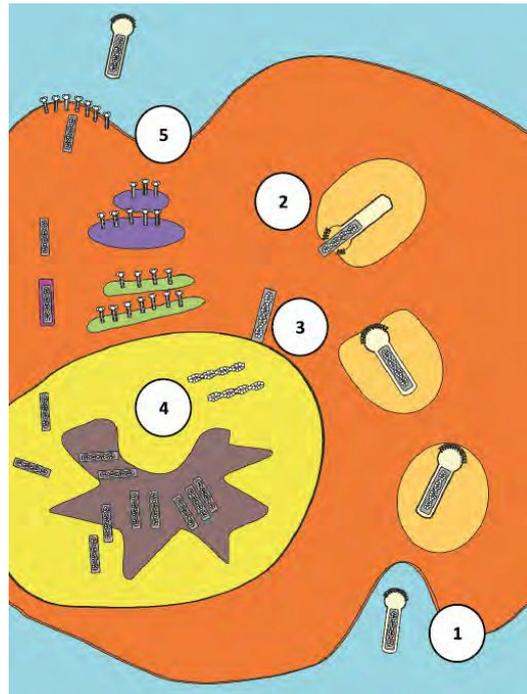


Figura 8. Esquema de ciclo infeccioso de baculovirus en células de insecto. Ingreso a la célula (1), fusión de membranas mediado por GP64 (2), traslocación al núcleo (3), replicación del DNA viral (4) y generación de viriones brotantes (5)[104].

En particular, dentro del género de los Alfabaculovirus AcMNPV es el más utilizado para aplicaciones biotecnológicas. AcMNPV puede transducir ciertas líneas celulares de vertebrados, donde el genoma permanece como un elemento episomal no replicativo[115].

Generación y uso de baculovirus recombinantes

Los baculovirus fueron ampliamente utilizados como una herramienta de expresión génica por más de treinta años, basándose en su habilidad para expresar altos niveles de proteínas recombinantes en células de insecto. Posteriormente, se observó que los baculovirus además son capaces de entrar en una variedad de líneas celulares de mamíferos y conducir a la expresión de diferentes genes foráneos bajo el control de promotores de mamífero[129–134]. En la **Figura 9** se muestran las distintas aplicaciones de los baculovirus recombinantes. Los baculovirus modificados ofrecen una buena alternativa a los virus de mamíferos para su utilización en estrategias de terapia génica y medicina regenerativa ya que el genoma viral se mantiene temporalmente, sin replicación episomal ni integración [135–137], además el desarrollo de

nuevas tecnologías para construir baculovirus modificados, permite una generación sencilla de los mismos [138].

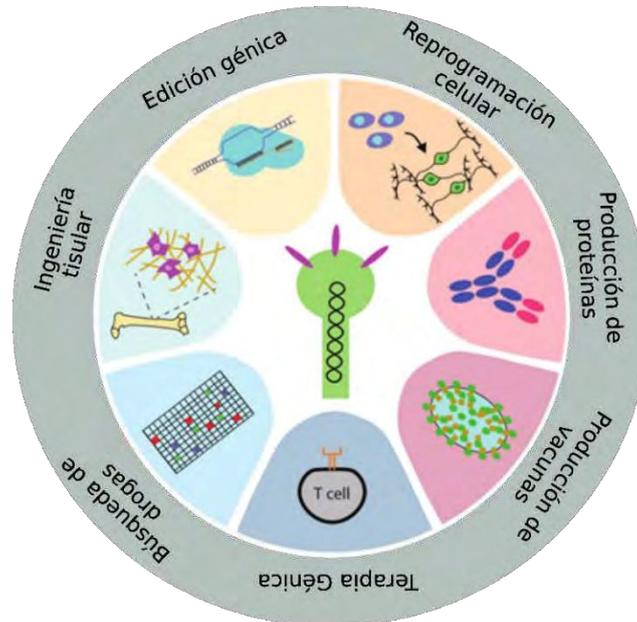


Figura 9. Esquematación de los distintos campos de aplicación en los que se utilizan los baculovirus. Figura adaptada a partir de Mansouri y colaboradores [139].

Los sistemas de expresión basados en vectores baculovirales (BEVS) suelen estar basados en AcMNPV [120,138,140–145]. En los BEVS utilizados para producción de proteínas recombinantes en células de insecto, se utilizan los promotores de los genes muy tardíos, poliedrina (polh) y p10 por su fuerte actividad promotora inducida por la infección[146,147]. Además, los baculovirus tienen un tropismo amplio que les permite ingresar no solo a células de insecto hospedadoras, sino que a su vez en diferentes tipos celulares de mamífero. El ingreso ocurre a través de la interacción de la glicoproteína de superficie viral GP64 y múltiples receptores celulares [148]. Diversos estudios han demostrado que GP64 puede unirse a los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) presentes en la superficie de diferentes tipos celulares de vertebrados [149]. Además se reportó que GP64 puede interactuar con los fosfolípidos de la membrana y que el ingreso a las células de mamífero puede ser inhibido por el tratamiento con lípidos cargados negativamente como el ácido fosfatídico y el fosfatidilinositol [134]. Luego de unirse a moléculas de la superficie celular, los baculovirus pueden ser internalizados por medio de balsas lipídicas, o bien, podría involucrar endocitosis y/o macropinocitosis[150–152].

En cuanto a la estimulación de la respuesta inmune, AcMNPV presenta una fuerte actividad adyuvante que promueve la generación de una robusta respuesta inmune humoral y celular estimulando la producción de interferones (IFN) y citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, ni la proteína GP64 recombinante purificada ni las partículas baculovirales inactivadas resultaron inmunogénicas [140,142,143,153]. Se ha demostrado con posterioridad que la respuesta podría ser causada por la internalización del genoma a DNA de AcMNPV, que contiene motivos de metilación CpG, comparable con el genoma de *E. coli* y Herpes simplex virus [141]. Este patrón puede ser reconocido por las células de la inmunidad innata vía TLR9 y conducir a la inducción de la inmunidad adquirida antitumoral, que puede incluir la activación de linfocitos citotóxicos específicos de tumor (CTL), células *Natural Killer* (NK) o la producción de anticuerpos [143].

AcMNPV ha sido ampliamente utilizado como vector de expresión de genes heterólogos y recientemente como vector de terapia génica antitumoral. Algunos ejemplos incluyen su utilización como un vector para la expresión de la toxina A de *Diphtheria* con el objetivo de eliminar células malignas de glioma en el cerebro [154] y para la expresión de la enzima timidina kinasa de *Herpes simplex virus* (HSVtk) que conduce a la muerte celular en presencia de ganciclovir. Esta última estrategia fue empleada para eliminar glioblastoma [155]. Además, se han utilizado baculovirus AcMNPV recombinantes capaces de silenciar el gen ratina (HNr), que es el homólogo murino de la humanina (HN), en modelos *in vitro* e *in vivo* para el tratamiento de tumores pituitarios[156]. Existen diferentes estrategias para generar baculovirus AcMNPV recombinantes que se valen de diferentes metodologías cada una de ellas con sus ventajas y sus limitaciones. La mayoría se basan en la doble recombinación homóloga de los genomas baculovirales con vectores de transferencia que poseen el gen de interés flanqueado por secuencias de DNA viral. Uno de los sistemas más utilizados es el que hace uso del bAcGOZA (genoma baculoviral capaz de replicar en *E. coli*). Este replicón bacteriano que contiene el genoma completo de AcMNPV es deficiente en el gen esencial ORF1629 que codifica para una proteína de la cápside necesaria para la infección viral. Entonces, este bAcGOZA se co-transfecta en células de insecto con un plásmido de transferencia que posee el gen de interés flanqueado por las dos regiones homólogas para poder recombinar y conteniendo el ORF1629 funcional en una de ellas, de modo tal que sólo aquellos baculovirus que recombinaron con el vector de transferencia pueden generar viriones brotantes viables (**Figura 10**) [157]. Este sistema contempla mejoras tecnológicas que simplificaron los procedimientos tediosos para generar y aislar virus recombinantes y convirtieron al sistema de expresión basado en baculovirus en un método seguro y fácil de utilizar[158].

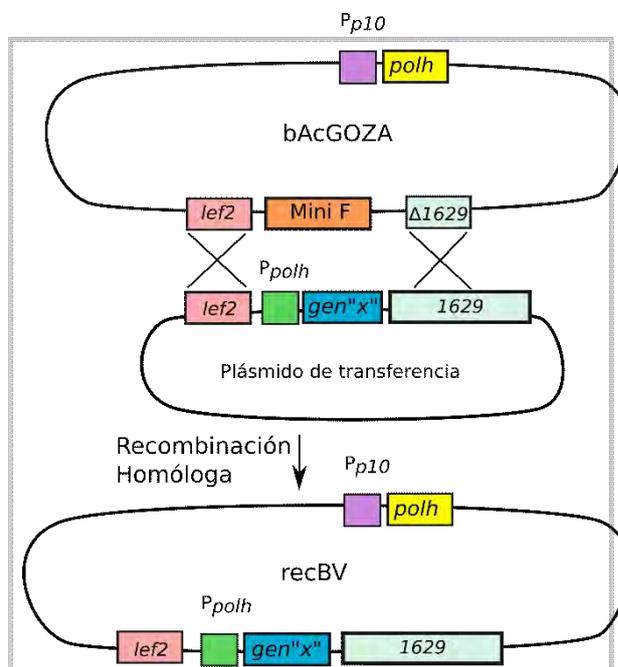


Figura 10. Representación del proceso de generación de baculovirus recombinantes. Con cruces (x) se esquematizan las recombinaciones homólogas esperadas. Pp10 : Promotor p10; polh : gen de poliedrina; lef2: gen lef2 ; 1629: ORF1629; gen "x": gen de interés; Mini F: origen de replicación bacteriano; recBV : virión brotante recombinante[77].

Baculovirus silenciador del gen *birc6*: AcMNPV-shBirc6

En nuestro laboratorio se generó un baculovirus AcMNPV recombinante mediante doble recombinación homóloga en células de insecto utilizando el sistema bAcGOZA. Este baculovirus codifica para un shRNA diseñado para silenciar el gen *birc6*. El shRNA utilizado hibrida con la región 3'UTR del mRNA de Birc6 y en estudios previos se pudo observar que es capaz de

disminuir la expresión del mismo en células de adenocarcinoma de pulmón humano e inducir niveles significativos de apoptosis [77].

Además, sabemos que el shRNA presenta un 90% de identidad con el homólogo murino de BIRC6, BRUCE, por lo que este podría ser capaz de silenciar el gen y de este modo, ser utilizado en estudios *in vitro* e *in vivo* con modelos murinos. El alineamiento se muestra en la **Figura 11**.

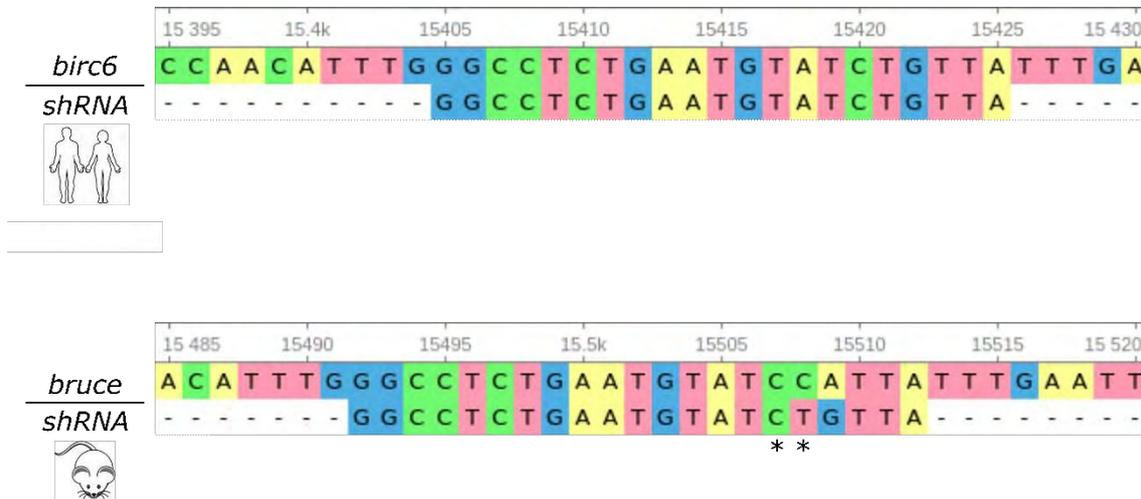
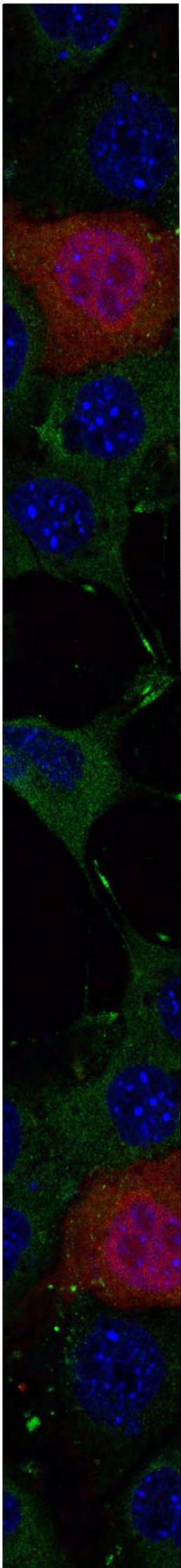


Figura 11. Alineamientos del shRNA construido con el gen humano *birc6* (parte superior) y con el gen murino *bruce* (parte inferior). Con asteriscos (*) se marcan las diferencias presentes entre el shRNA y la secuencia del gen.

En el presente trabajo nos proponemos evaluar el rol de BIRC6 en TNBC. Para llevar adelante este cometido utilizaremos el baculovirus recombinante que expresa un shRNA contra BIRC6, descrito anteriormente, con el fin último de desarrollar una posible terapia antitumoral.

Hipótesis y objetivos



Hipótesis

El silenciamiento de la expresión del gen *birc6* mediado por la transducción por baculovirus AcMNPV recombinantes es capaz de inducir la apoptosis de células de TNBC e interferir con procesos celulares básicos necesarios para la proliferación y el crecimiento tumoral.

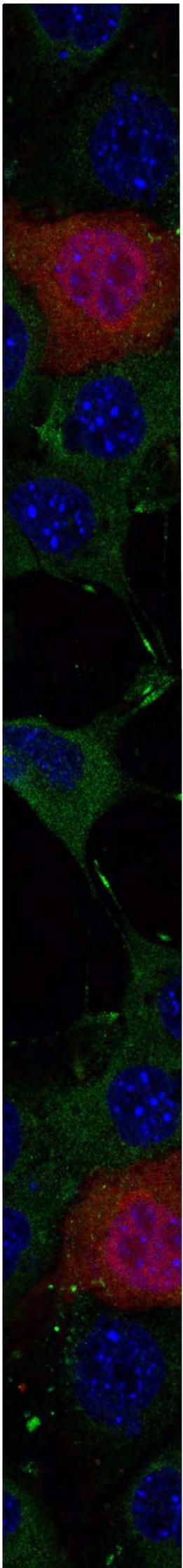
Objetivos

Objetivo general

Realizar diversos estudios preclínicos en modelos *in vitro*, *in vivo* e *in silico* para evaluar el efecto del silenciamiento de la proteína BIRC6 mediado por baculovirus recombinantes para el tratamiento de cáncer de mama triple negativo (TNBC).

Objetivos específicos

- ✓ Evaluar la transducción de diferentes líneas celulares de TNBC (F3II, MDA-MB-231) mediada por baculovirus.
- ✓ Explorar la combinación de baculovirus con polímeros cargados (PEI) para mejorar la eficiencia de transducción.
- ✓ Evaluar el efecto del silenciamiento de BIRC6 mediado por el baculovirus recombinante.
- ✓ Evaluar el efecto del silenciamiento de BIRC6 sobre la apoptosis.
- ✓ Estudiar el efecto del silenciamiento de BIRC6 sobre la progresión tumoral, y metástasis en modelos singénicos murinos.
- ✓ Estudiar la expresión de BIRC6 y de las vías de señalización con las que interactúa en bases de datos de transcriptómica de pacientes de TNBC.



Materiales y Métodos

Materiales y métodos

Materiales

Soluciones

Todas las soluciones preparadas fueron esterilizadas por tratamiento de calor en autoclave a 121°C a 1 atmósfera de sobrepresión. Las soluciones termolábiles fueron esterilizadas por filtración con filtro de diámetro de poro de 22 µm. El agua utilizada para la preparación de las soluciones fue bidestilada, filtrada por columna de intercambio iónico y esterilizada en autoclave.

Kit para el ensayo de TUNEL

Se utilizó el kit comercial DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega Corporation, USA).

Medios para cultivo de células de insectos

Medio de Grace, Thermo-Fisher / Life Sciences / Invitrogen (Grand Island, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Bioser, Buenos Aires, Argentina).

Medio para el cultivo de células de mamífero

MEM, Gibco, suplementado con 10% de suero fetal bovino (Bioser, Buenos Aires, Argentina).

Líneas celulares utilizadas

Se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- Células F3II de carcinoma mamario triple negativo murino. Las mismas fueron adquiridas gracias al Laboratorio de Oncología Molecular de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ)[159].
- Células MDA-MB-231 de carcinoma mamario triple negativo humano. La misma fue adquirida gracias al Laboratorio de Oncología Molecular de la UNQ.

Metilcelulosa

Para los ensayos de titulación de baculovirus se utilizó metilcelulosa al 1x para el medio de titulación Grace.

Polietilenimina (PEI)

Para los ensayos de transducción con PEI se utilizó una solución de PEI 1mg/ml de la marca (Polysciences inc).

Baculovirus recombinantes utilizados

Para los ensayos *in vitro* e *in vivo* se utilizaron baculovirus recombinantes generados en nuestro laboratorio. Los baculovirus fueron generados mediante el sistema bAcGOZA (**Figura 10**), y contenían el gen codificante para la proteína fluorescente roja dTomato bajo el promotor ie1 de citomegalovirus (ie1CMV) lo que permite la identificación visual de las células de insecto infectadas y de las células de mamífero transducidas. Además, Ac-shBirc6 codifica para un shRNA diseñado para ser complementario a la región 3'UTR del gen *birc6* humano bajo la acción del promotor U6 de mamífero. Ac-shRNA(-) es un baculovirus control que no codifica para ningún shRNA (**Figura 12**).

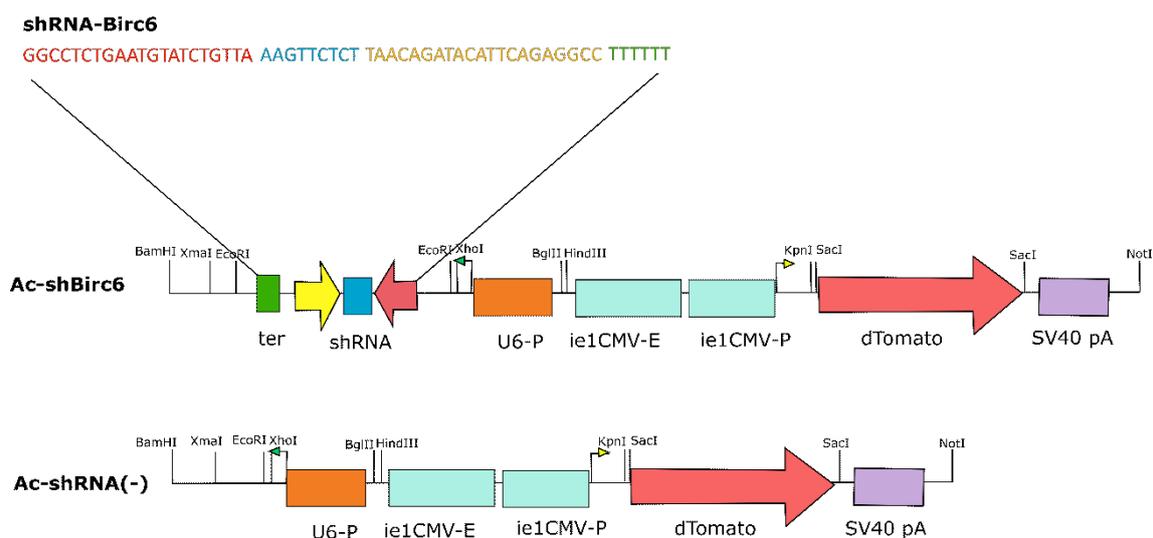


Figura 12. Esquema de las construcciones genéticas introducidas en el baculovirus Ac-shBirc6 y el baculovirus control Ac-shRNA(-) respectivamente[77].

Ratones utilizados en ensayos *in vivo*

Para los ensayos *in vivo* se utilizaron ratones hembra BALB/c de 8 semanas de edad.

Anticuerpos utilizados

Anticuerpos primarios		
Nombre	Target	Especie
α-BIRC6	BIRC6	Cabra

Anticuerpos secundarios		
Nombre	Target	Fluoróforo
α-cabra	cabra	Alexa 488

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para la detección de la proteína BIRC6.

Métodos

Mantenimiento de células

Las células High FiveTM (BTI-TN-5B1-4) se mantuvieron a 27 °C en medio de Grace (InvitrogenTM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Internegocios).

Las células MDA-MB-231 y F3II (líneas celulares de carcinoma mamario triple negativo humano y murino, respectivamente) se cultivaron en medio de cultivo D-MEM con SFB 10 % suplementado con aminoácidos MEM (10 µl/ml), y L-glutamina (2 mM).

Métodos que involucran manipulación de baculovirus en cultivo celular

Para el mantenimiento de virus en cultivo celular, se siguieron los protocolos sugeridos en los libros de referencia “*Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*”[160] y “*Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols*”[161].

Preparación de los inóculos de viriones brotantes

Se infectaron células High Five™ con los recBV Ac-shBirc6 y Ac-shRNA (-) y luego de 72 hs se colectó el sobrenadante. Se clarificaron los sobrenadantes de cultivo centrifugando a 14.000 x g durante 5 minutos, luego se volvieron a centrifugar los viriones brotantes a 21.000 x g durante 60 minutos a 4°C y fueron resuspendidos en PBS.

Titulación de los baculovirus recombinantes

Se utilizó el método de la dilución terminal. El título se definió como la dilución a la que solo el 50% de los pocillos presentan signos de infección, en este caso detectada por la expresión de la proteína roja fluorescente dTomato. En una placa de 12 pocillos se cultivaron células High Five hasta alcanzar un 60% de confluencia. Se las incubó con 1 ml de la dilución de viriones correspondiente durante 1 hora en agitación suave. Pasado el periodo de incubación de le agrego 4 ml de medio de titulación Grace a cada pocillo. Se incubaron a 27 °C monitoreándolas diariamente hasta lograr detectar signos de infección. Se determinó un título de aproximadamente 10⁹ para todos los baculovirus recombinantes.

Transducción de células F3II y MDA-MB-231

Se tomó una alícuota de viriones brotantes del baculovirus de interés y se diluyó en PBS 1X, para alcanzar una multiplicidad de transducción de 500. Esta suspensión de viriones recombinantes se usó para transducir células F3II y MDA-MB-231 cultivadas en placas de 24 wells. Las células se incubaron en presencia de viriones recombinantes por 2 horas con agitación suave. Pasado este tiempo se completó cada well con 500 µl de medio D-MEM con 10% de SFB y se incubaron a 37°C, monitoreándolas cada 24 horas. El volumen de viriones brotantes del que se parte dependerá de la multiplicidad de transducción deseada en cada caso.

Transducción de células F3II y MDA-MB-231 con PEI.

Se tomó una alícuota de viriones brotantes del baculovirus de interés y se diluyó en PBS 1X, para alcanzar una multiplicidad de transducción de 500. Esta suspensión de viriones recombinantes se usó para transducir células F3II y MDA-MB-231 cultivadas en placas de 24 wells. Las células se incubaron en presencia de viriones recombinantes con 2 o 1.25 µl de PEI por 2 horas con agitación suave. Pasado este tiempo se completó cada well con 500 µl de medio D-MEM con 10% de SFB y se incubaron a 37°C, monitoreándolas cada 24 horas. El volumen de viriones brotantes del que se parte dependerá de la multiplicidad de transducción deseada en cada caso.

Detección de BIRC6 por inmunofluorescencia

Para llevar a cabo la técnica de inmunofluorescencia se utilizaron insertos circulares estériles de vidrio colocados dentro de cada pocillo de placas de cultivo celular de 12 pocillos. En el caso de los pocillos de células tratados con baculovirus, 48 horas luego de la transducción, se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS 1X. Las células se fijaron con PFA 4% durante 10 min, seguido de otro lavado con PBS 1X. Para la permeabilización, las células se incubaron de 5 a 10 min con Fix and Perm Buffer de BD. Se lo retiró y se lo lavó nuevamente con PBS 1X. Luego, las células se incubaron con una solución de bloqueo conteniendo PBS, 0,05% de Tween-20 y 5% de SFB durante 40 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con PBS 1X.

A continuación, se incubó con una dilución 1:100 preparado en PBS-BSA 2,5% del anticuerpo primario policlonal anti-BIRC6, en una cámara húmeda durante 1 hora. Luego de sucesivos lavados con una solución de PBS 1X, los preparados se incubaron con una dilución 1:100 del anticuerpo secundario anti-cabra conjugado a Alexa-488 durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Con el propósito de teñir el DNA nuclear, una vez permeabilizadas las células, se incubaron con el colorante DAPI 1:5000 durante 10 min, luego se lavaron 3 veces con PBS 1X pH 7,4. Finalmente, los preparados fueron montados con líquido de montaje y

cubreobjetos para ser observados con posterioridad en un microscopio de epifluorescencia Nikon E200.

Microscopía confocal

Las imágenes se tomaron con el microscopio Leica TCS SP5 II. Este microscopio está equipado con un objetivo UV HCX PL APO CS 63.0x 1.40 oil, laser de helio/neon de 543 nm, láser de argón/ion de 488 nm y el software LAS AF versión 2.2.1 4842. Las imágenes se procesaron usando el software ImageJ (NIH).

Ensayo de apoptosis mediante la técnica de TUNEL

Las células F3II fueron sembradas sobre cubreobjetos en placas de 24 pocillos (1×10^5 células/ml/pocillo) y fueron cultivadas durante 24 hs. Al día siguiente se agregó el Ac-shBirc6 (m.o.t = 500 -multiplicidad de transducción-). A las 48 o 72 horas de la transducción se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS 1X. Cada inserto se fijó con PFA 4% durante 25 minutos a 4°C, seguido de dos lavados con PBS 1X de 5 minutos cada uno. Para la permeabilización se incubó durante 5 minutos con Triton X-100 0,2%. Nuevamente se lavó 2 veces con PBS 1X durante 5 minutos. Se les agregó 100µl de buffer E, y se incubó a temperatura ambiente por 5-10 minutos. Luego, se colocaron se incubaron con 50 µl de la mix de reacción que contiene la enzima TdT, en una cámara humidificada durante 60 minutos a 37 °C, cuidando que desde este paso en adelante los insertos no se expusieran a la luz. Posteriormente se incubó durante 15 minutos con 2x SSC, para detener la reacción. Seguidamente, se lavó 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos. Finalmente, los preparados fueron montados con líquido de montaje y cubreobjetos para ser observados con posterioridad en un microscopio de epifluorescencia Nikon E200.

Ensayos de progresión tumoral *in vivo* con ratones BALB/c singénicos

Todos los procedimientos que involucraron manipulación de animales fueron llevados a cabo por la Dra. María Florencia Gottardo y el Dr. Matías Luis Pidre. La observación de pulmones para el recuento de metástasis y el procesamiento de datos fueron realizados por mí. Se inocularon 10 ratones hembra BALB/c singénicos de 8 semanas de edad con 2×10^5 células F3II por ratón y se lo dejó crecer 22 días, hasta alcanzar un volumen de 200 mm³ aproximadamente. Transcurrido este tiempo, se inyectaron intratumoralmente 100 µl de Ac-shBirc6 (título viral = 2×10^9) o Ac-shRNA(-) (título viral = 5×10^8). El tamaño tumoral fue determinado cada dos días con un calibre y estimado de acuerdo con la fórmula: $[\text{ancho}^2 \times \text{longitud}]/2$ (mm³). Cuando el volumen del tumor alcanzó aproximadamente 500 mm³ (día 45), los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, los tumores fueron retirados, fijados en para-formaldehído al 4% (PFA).

Recuento de metástasis en ratones BALB/c singénicos

Luego del sacrificio, a partir de los ratones previamente inoculados con las células F3II, y tratados con Ac-shBirc6 o el baculovirus control, se extrajeron los pulmones y se fijaron con solución de Bouin. Posteriormente se procedió a realizar el recuento de metástasis bajo la lupa.

Análisis bioinformático de la expresión de BIRC6 utilizando diversas bases de datos y plataformas.

Para analizar la expresión de BIRC6 se utilizaron las plataformas UCSCXena [162] y cBioPortal [163,164] y las bases de datos TCGA TARGET GTEx, TCGA Pan-Cancer [165–168] y Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium (Breast Cancer , METABRIC)[169,170]. TCGA TARGET GTEx fue seleccionada debido a que es la única que presenta datos transcriptómicos de tejido normal de voluntarias sanas y tejido de tumores primarios de pacientes con cáncer de mama. Las bases de datos TCGA Pan-Cancer (PANCAN) y Breast Cancer (METABRIC, Nature 2012 & Nat Commun 2016) fueron seleccionadas en función del número de muestras que contenía cada una, y de los distintos parámetros que permitían evaluar. En el caso

de TCGA Pan-Cancer y TCGA-Target-GTEX se utilizaron los datos de RNAseqV2 normalizados utilizando la cuantificación RSEM [171]. En el caso de Breast Cancer (METABRIC) se utilizaron los datos de expresión de mRNA en z-Scores relativo a todas las muestras (log microarray) llevado a cabo en la plataforma Illumina HT-12 v3 (Illumina_Human_WG-v3) [170]. Para el análisis de las alteraciones en el número de copias (CNV) TCGA y METABRIC usan Affymetrix Genome-Wide SNP array 6.0 para hallar variaciones somáticas en el número de copias (CNVs) [172]. Una media del logaritmo en base 2 del cociente se asignó por segmento a regiones génicas e intergénicas de acuerdo a las anotaciones de METABRIC. En este sentido al aplicar el logaritmo en base 2 a las CNVs obtenidas por el algoritmo GISTIC2 se considera que $\log_2(\text{CNV}) > 1$ son amplificaciones, $1 > \log_2(\text{CNV}) > 0.5$ son ganancias, $0.5 > \log_2(\text{CNV}) > -0.5$ son diploides, $-0.5 > \log_2(\text{CNV}) > -1$ son deleciones, $\log_2(\text{CNV}) < -1$ son deleciones profundas.

Análisis bioinformático de la expresión de BIRC6 en muestras de tejido normal de voluntarias sanas y tejido de tumores primarios.

Para estos análisis se utilizó la base de datos TCGA TARGET GTEX y la plataforma UCSCXena. Se filtraron aquellas muestras que correspondían a tejidos mamarios y evaluó la expresión de BIRC6 en condiciones de tejido normal y tejido de tumores primarios. La comparación se realizó utilizando el z-score relativo a todas las muestras.

Análisis bioinformático de correlación de la expresión de BIRC6 y el tipo de muestra con atributos moleculares en bases de datos.

Para estos análisis transcriptómicos se hizo uso de la base de datos TCGA Pan-Cancer (PANCAN) y la plataforma UCSCXena y cBioPortal. Para esto se filtraron aquellas muestras correspondientes a BRCA y se evaluó la expresión de BIRC6 y de diferentes moléculas involucradas en las vías apoptóticas. En el análisis se dividieron las muestras en dos grupos: alta expresión de BIRC6 (≥ 11.1) y baja expresión de BIRC6 (< 11.1). Además, se realizó el análisis para distintos tipos de cáncer de mama: Receptor de hormonas positivo /HER2 positivo, receptor de hormonas negativo /HER2 positivo, receptor de hormonas positivo/HER2 negativo y receptor de hormonas negativo/HER2 negativo. Los puntos de corte para considerar esto fueron: expresión $\text{ESR1} \geq 10$, expresión $\text{PGR} \geq 7$ y expresión $\text{HER2} \geq 14$ para considerarlos receptores positivos.

Análisis bioinformático de correlación de la expresión y CNV de BIRC6 con atributos clínicos en bases de datos.

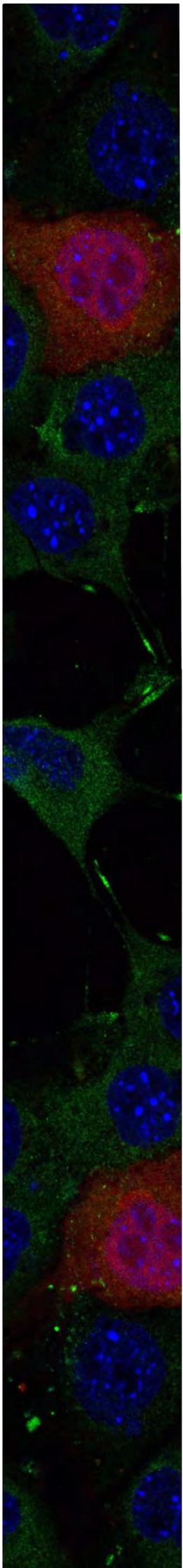
Para estos análisis se hizo uso de la base de datos Breast Cancer (METABRIC, Nature 2012 & Nat Commun 2016) y la plataforma cBioPortal. Se utilizó al gen *birc6* como query y se evaluó la correlación de distintas variaciones en el número de copias (CNV) con la expresión de BIRC6 y diversos atributos clínicos de interés.

Análisis bioinformático de correlación de la expresión de BIRC6 y la expresión de proteínas reguladoras y efectoras de la apoptosis.

Para estos análisis se hizo uso de la base de datos TCGA Pan-Cancer (PANCAN) y las plataformas UCSCXena y cBioPortal. En este sentido, se filtraron aquellas muestras correspondientes al estudio BRCA y se comparó la expresión de BIRC6 en función de dos grupos: alta expresión de BIRC6 (≥ 11.1) y baja expresión de BIRC6 (< 11.1), con la expresión de Bax, Bcl-2, Casp9, Casp3, Casp8, TP53, Cyt C, NFkB1 y DIABLO. Se realizaron análisis de correlación analizando la correlación de Pearson.

Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos de los ensayos *in vitro* e *in vivo* se hizo uso del programa GraphPad PRISM8®. Para el análisis de los datos bioinformáticos se hizo uso de la herramienta R y RStudio [173], y de las herramientas provistas por las plataformas UCSCXena y cBioPortal. Para los ensayos de transducción con PEI tanto con las células F3II y MDA-MB-231 se realizó el experimento por triplicado y se observaron al menos 5 campos en cada condición, se realizó un *t-Test* de dos colas despareado utilizando como punto de corte un p-valor < 0.05. Para los ensayos de TUNEL se realizó el experimento por duplicado, se utilizó un test de χ^2 utilizando como punto de corte un p-valor < 0.05. En el ensayo *in vivo* exploratorio se utilizó un n= 5 por cada grupo experimental. Para el análisis de la progresión tumoral y del cociente tumoral se usó un análisis de regresión múltiple utilizando como punto de corte p-valor < 0.05. Para el análisis del volumen tumoral al día 45 se utilizó un T-Test de dos colas despareado utilizando como punto de corte un p-valor < 0.05. Para el análisis de la expresión de BIRC6 en muestras de voluntarias sanas y muestras de tejido de tumores mamarios se usó un n= 1275 (n = 1099 tumores primarios; n= 176 tejido mamario normal) y se realizó un *t-Test* utilizando un punto de corte de p-valor < 0.05. Para el análisis de la expresión de BIRC6 en función del número de copia se utilizó un n= 2173 (n= 232 Deleciones; n= 1818 Diploides; n= 111 Ganancias; n= 12 Amplificaciones), se realizó un ANOVA múltiple seguido de un TukeyHSD utilizando en ambos casos un punto de corte de p-valor < 0.05. Para analizar las CNV de *birc6* en función de la presencia/ausencia de receptores se utilizó un n= 2140 para evaluar el receptor de estrógeno (n=1617 ER+ ; n= 523 ER-), n= 1980 para evaluar el receptor de progesterona (n= 1040 PR + ; n= 940 PR -) y n= 1980 para evaluar el receptor HER2 (n= 247 HER2 + ; n= 1733 HER2 -), en todos los casos se realizó el test de χ^2 agrupando aquellas CNV que implicaban un aumento del número de copias (ganancias y amplificaciones) por un lado, y aquellas que no lo implicaban (deleciones y diploides) por otro, usando un punto de corte de p-valor < 0.05. Para correlacionar las CNV con la edad de diagnóstico y con el Índice de Pronóstico de Nottingham se usó un n= 2173 (n= 232 Deleciones; n= 1818 Diploides; n= 111 Ganancias; n= 12 Amplificaciones) y se realizó un ANOVA múltiple seguido de test de TukeyHSD usando un punto de corte de p-valor < 0.05 en ambos casos. Para correlacionar las CNV con el Grado Histológico Neoplásico se usó un n= 2072 (n= 174 Grado 1; n= 851 Grado 2; n= 1047 Grado 3) se utilizó el test de χ^2 agrupando aquellas CNV que implicaban un aumento del número de copias del gen (ganancias y amplificaciones) por un lado, y aquellas que no lo implicaban (deleciones y diploides) por otro, usando un punto de corte de p-valor < 0.05. Para evaluar la correlación entre las CNV y el tratamiento con quimioterapia o radioterapia se usó un n= 1980 (n= 1173 Tratadas; n= 807 No Tratadas) en el caso de la radioterapia y un n= 1980 (n= 411 Tratadas; n= 1569 No Tratadas) en el caso de la quimioterapia. En ambos casos se realizó el test de χ^2 agrupando aquellas CNV que implicaban un aumento en el número de copias (ganancias y amplificaciones) por un lado, y aquellas que no lo implicaban (deleciones y diploides) por otro, usando un punto de corte de p-valor < 0.05. Para los análisis de correlación de expresión de BIRC6 con las proteínas de las vías apoptóticas se usó un n= 1211 (n= 697 Alta Expresión de BIRC6; n= 514 Baja Expresión de BIRC6), para los análisis se realizaron *t-test* para la expresión de cada gen en cada condición y se usó un punto de corte de p-valor < 0.05. Además, se realizaron análisis de correlación utilizando el coeficiente de correlación de Pearson, considerando como punto de corte un p-valor < 0.05.



Resultados

Resultados

Las células de carcinoma mamario triple negativo murino (F3II) son susceptibles a ser transducidas por baculovirus AcMNPV recombinantes.

Los baculovirus son capaces de transducir células de mamífero [115,129–133], sin embargo, no todas las líneas celulares son susceptibles a ser transducidas y la eficiencia de transducción varía entre distintas líneas. Debido a esto, cómo las células F3II, correspondientes a carcinoma mamario triple negativo murino, iban a ser utilizadas para llevar adelante el presente trabajo, se procedió a evaluar si las mismas eran susceptibles a ser transducidas por el baculovirus AcMNPV recombinante. Para esto se incubaron cultivos celulares de la línea F3II con suspensiones del baculovirus. La **Figura 13** muestra capturas fotográficas de una microscopía de epifluorescencia en las que pueden observarse células fluorescentes rojas, que evidencian la expresión de la proteína recombinante dTomato codificada en el genoma baculoviral. Estos resultados muestran que los baculovirus son capaces de transducir la línea celular F3II.

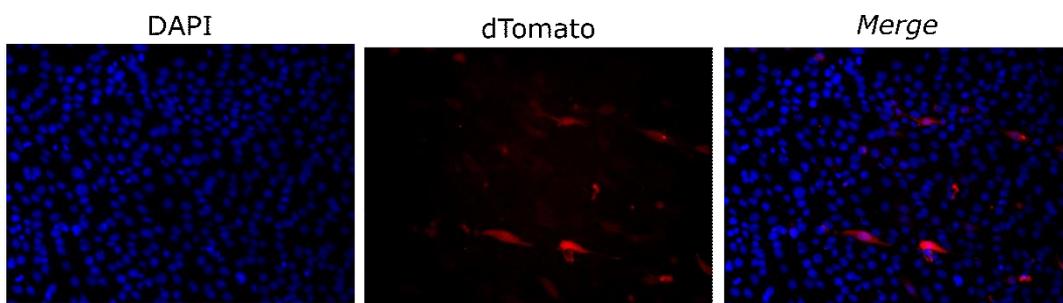


Figura 13. Transducción del Baculovirus (Ac-shBirc6) en células de carcinoma mamario murinas. Transducción de baculovirus Ac-shBirc6 en células F3II incubadas durante 48 hs., utilizando una multiplicidad de transducción (MOT) de 500 virus/célula. Microscopía de fluorescencia, paneles derecha: DAPI, medio: gen reportero *dTomato*; izquierda: *Merge*.

Debido a que el uso de polímeros cargados, tales como la polietilenimina (PEI) puede facilitar el ingreso de DNA desnudo a la célula [174–179] y que la transducción mediada por baculovirus podría verse aumentada con el uso de los mismos, se procedió a evaluar el efecto del PEI como aditivo en la mezcla de transducción viral. Los resultados se muestran en la **Figura 14** en la que puede observarse que el porcentaje de células transducidas por el baculovirus Ac-shBirc6 en ausencia de PEI fue de 6,45% y que al utilizar PEI la transducción de las células se vio inhibida. Probablemente el PEI posea algún efecto virucida o inhiba el ingreso de los virus a las células.

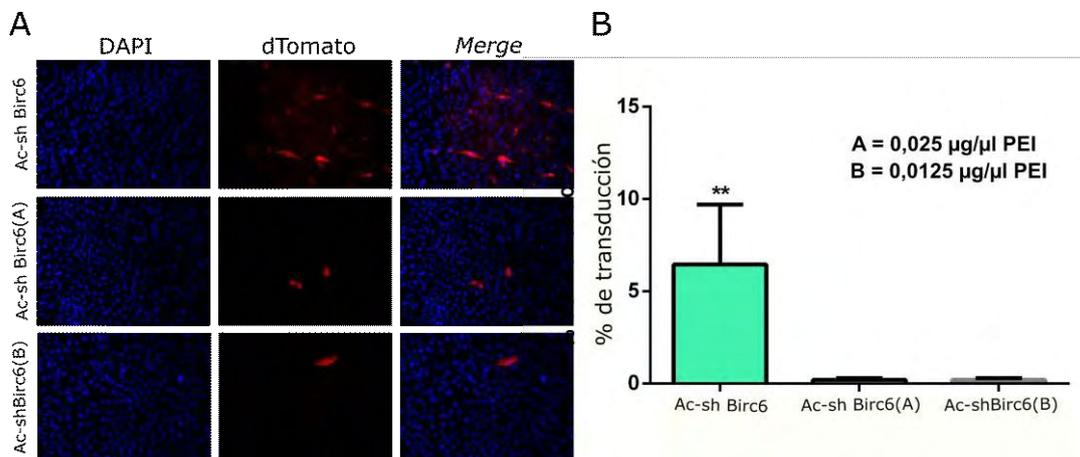


Figura 14. Transducción del Baculovirus (Ac-shBirc6) en células F3II en presencia de PEI. (A) Microscopía de fluorescencia con células F3II transducidas utilizando una multiplicidad de transducción (MOT) de 500 baculovirus/célula sin PEI (panel superior) y 0,025 µg/µl de PEI (panel medio) y 0,0125 µg/µl de PEI (panel inferior) durante 48 hs. (B) Cuantificación de células F3II transducidas con Ac-shBirc6 incubadas en presencia de PEI durante 48 hs. Two-tailed unpaired t-test** p < 0.01.

Ac-shBirc6 es capaz de inducir el silenciamiento de *birc6* e inducir la apoptosis en células de carcinoma mamario triple negativo murino.

Se procedió a evaluar el silenciamiento de la proteína BIRC6 mediante inmunofluorescencia indirecta. Nuevamente, se incubaron células F3II con el baculovirus Ac-shBirc6 con una MOT de 500 virus/célula y 48 hs p.t. se realizaron inmunofluorescencias indirectas para detectar BIRC6. En la **Figura 15** se observan micrografías confocales representativas de los resultados obtenidos. En las mismas se observa que en aquellas células transducidas, que expresan la proteína fluorescente dTomato (rojo), BIRC6 (verde) se ve disminuida (flechas). Esto indica una disminución en la cantidad de la proteína, derivado probablemente del silenciamiento producido por el shRNA.

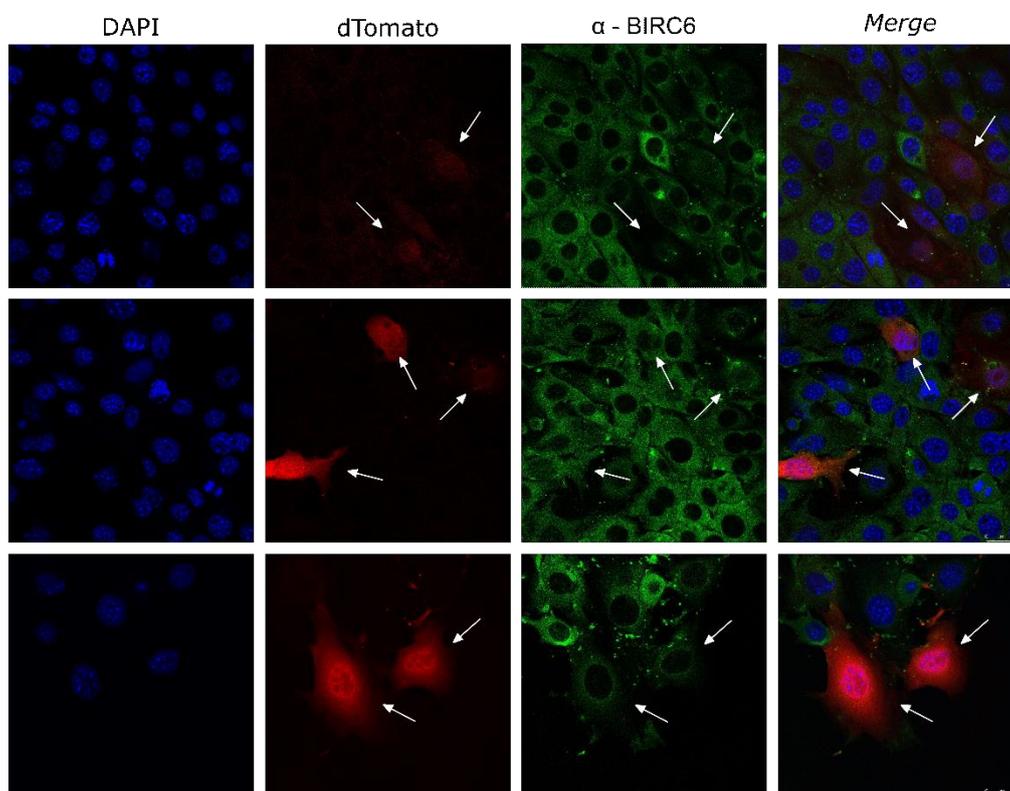


Figura 15. Expresión de BIRC6 en células F3II transducidas con Ac-shBirc6 por microscopía confocal. Células F3II fueron transducidas utilizando una multiplicidad de transducción de 500 baculovirus/célula durante 48 hs y fueron fijadas con *Fix&Perm* (BD). La expresión de Birc6 fue detectada por inmunofluorescencia. En el panel de fotos se observa Izquierda a derecha: DAPI (azul) – proteína reportera dTomato (rojo) – BIRC6 (verde) – *Merge*. Las flechas blancas señalan las células efectivamente transducidas.

Para caracterizar el efecto del silenciamiento mediado por el baculovirus Ac-shBirc6 en los niveles de apoptosis de las células F3II transducidas se realizó un ensayo de TUNEL. Para esto se incubaron células F3II con los baculovirus Ac-shBirc6 o Ac-shRNA (-). Posteriormente se cuantificaron las células apoptóticas en cada condición. Los resultados se muestran en la **Figura 16**. Las células fluorescentes verdes son células TUNEL positivas, es decir, células apoptóticas. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre las células tratadas con el baculovirus que codifica el shRNA (Ac-shBirc6) y el baculovirus control (Ac-shRNA (-)).

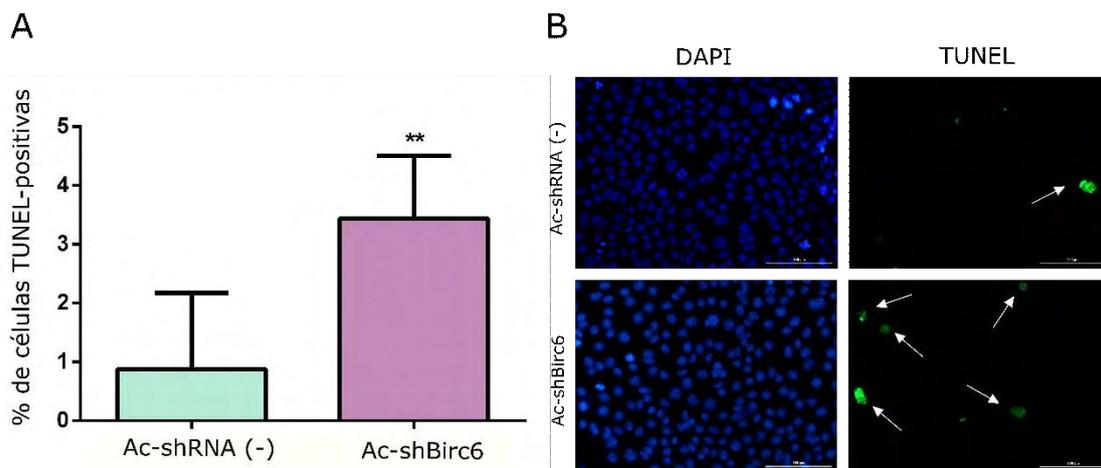


Figura 16. Efecto de Ac-shBirc6 sobre la apoptosis de células F3II. (A) Células F3II fueron incubadas durante 48 hs con Ac-shRNA (-) y Ac-shBirc6. La apoptosis fue evaluada por el método de TUNEL. (A) Cada columna representa el porcentaje \pm IC de células F3II TUNEL-positivas ($n \geq 950$ células/grupo). χ^2 . ** $p < 0.01$. (B) Fotos representativas de TUNEL. Paneles izquierda: DAPI; paneles derecha: Células TUNEL positivas (apoptóticas).

Ac-shBirc6 es capaz de inducir un efecto antitumoral en tumores mamarios murinos.

Para evaluar efectivamente la capacidad antitumoral del baculovirus recombinante, y basándonos en los resultados obtenidos *in vitro*, se realizaron ensayos *in vivo* en ratones BALB/c singénicos utilizando células F3II para generar tumores heterotópicos subcutáneos. Para ello, 200.000 células F3II fueron inoculadas en el flanco derecho de los ratones BALB/c, una vez establecido el tumor, los animales fueron inyectados por vía intratumoral (2 inyecciones de 50 μ l por ratón) con BV control Ac-shRNA(-) o BV recombinante (Ac-shBirc6) con un título viral de 2×10^9 viriones/ μ l en el caso de Ac-shBirc6 y 5×10^8 viriones/ μ l en el caso de Ac-shRNA(-). Medimos la progresión tumoral durante 45 días post-inoculación (**Figura 17 A, B y C**). El día 45 se compararon los volúmenes tumorales entre ambos grupos (**Figura 17 D**) y se llevó a cabo un recuento de nódulos metastásicos en los pulmones de los individuos de cada grupo luego del sacrificio (**Figura 17 E**). En la **Figura 17** se observa que hay diferencias estadísticamente significativas en la progresión tumoral entre ambos grupos a partir del día 39, el tratamiento con Ac-shBirc6 disminuye la progresión tumoral. Al día 45, los volúmenes del grupo tratado con el baculovirus control fue de $1451 \pm 97,83$ mm^3 mientras que la del grupo tratado con Ac-shBirc6 fue de $968,7 \pm 163,7$ mm^3 , lo que resulta en volúmenes estadísticamente distintos. No obstante, no se observaron diferencias significativas entre la cantidad de nódulos pulmonares metastásicos encontrados entre ambos grupos. Por lo tanto, la inhibición del BIRC6 disminuye la progresión y volumen tumoral, y no modula, al menos en las condiciones evaluadas, la metástasis en carcinoma mamario murino.

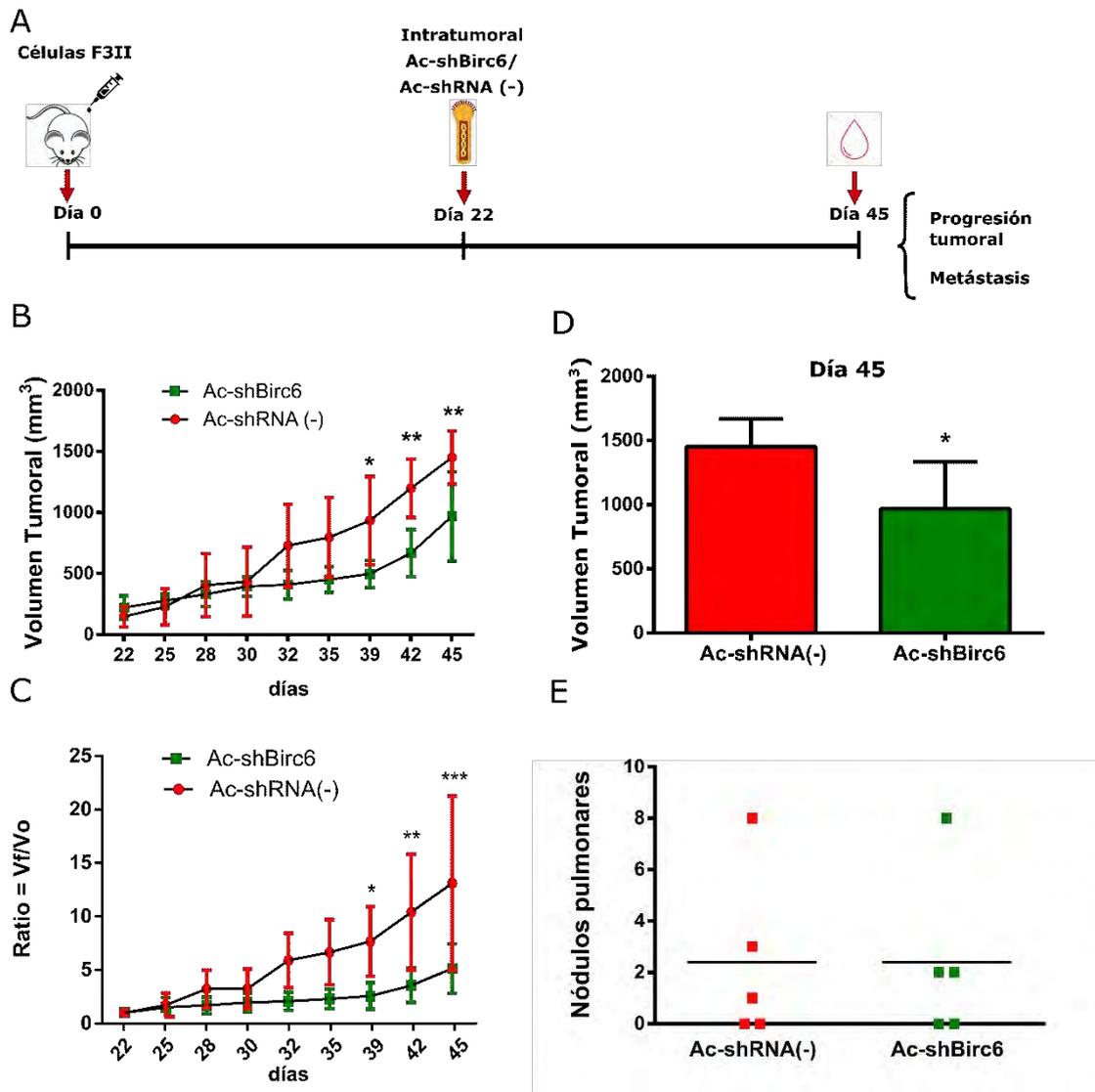


Figura 17. Efecto del silenciamiento génico de *birc6* mediado por baculovirus sobre la progresión tumoral y metástasis en tumores heterotópicos singénicos. Ratones BALB/c fueron inoculados con células F3II de manera subcutánea (2×10^5 células/ratón). Cuando el volumen tumoral alcanzó aproximadamente los 200 mm³, se les inyectó intratumoralmente los baculovirus control (Ac-shRNA (-)) o los baculovirus que codifican para el shBirc6 (Ac-shBirc6) (A). El crecimiento tumoral se evaluó hasta el día 45 post-inoculación. Se muestra la comparación entre cada grupo en el panel B y la comparación de los cocientes (V_f/V_i) panel C. Al día 45 se evaluó la diferencia de volumen tumoral entre ambos grupos (D). Una vez que los ratones fueron sacrificados se procedió a realizar el recuento de metástasis (E). Análisis de regresión múltiple ($n = 5$ animales por grupo) * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ contra Ac-shRNA (-) (C) * $p < 0.05$ Two-tailed unpaired *t*-test (D).

Las células de carcinoma mamario triple negativo humano son susceptibles a ser transducidas por baculovirus AcMNPV recombinantes.

Los resultados obtenidos a partir de la experimentación con modelos murinos fueron prometedores y permitieron plantear la posibilidad de aplicar el baculovirus recombinante como agente de terapia génica para el tratamiento de TNBC en humanos. De este modo, para continuar el trabajo se decidió evaluar la capacidad del virus de transducir una línea celular humana de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231). Para esto se cultivaron células en monocapa y se incubaron con el baculovirus Ac-shBirc6. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 18**. La presencia de células fluorescentes rojas evidencia la expresión de la proteína recombinante dTomato, lo que indica que dichas células fueron transducidas por los baculovirus.

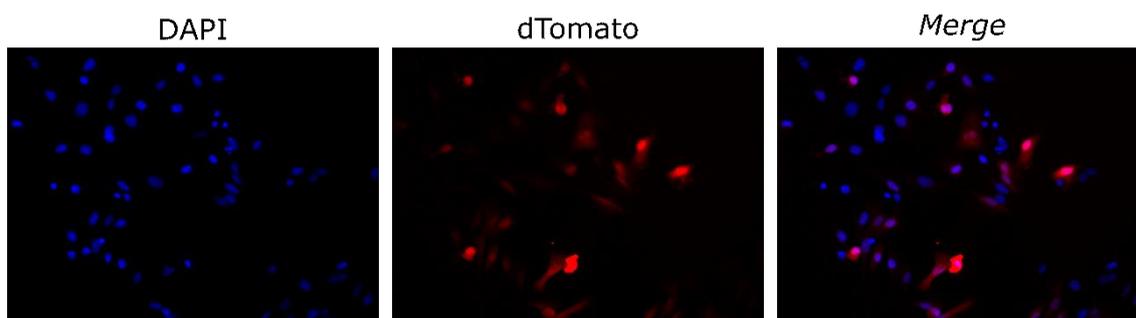


Figura 18. Transducción del Baculovirus (Ac-shBirc6) en células de carcinoma mamario humanas. Transducción de baculovirus Ac-shBirc6 en células MDA-MB-231 incubadas durante 48 hs., utilizando una multiplicidad de transducción (MOT) de 500 virus/célula. Microscopía de fluorescencia, paneles derecha: DAPI, medio: expresión del gen reportero *dTomato*; izquierda: *Merge*.

Así cómo se realizó con la línea murina, se procedió a evaluar el efecto del PEI en la transducción. En la **Figura 19** se observa que la transducción alcanza un 39%, además se observan diferencias estadísticamente significativas entre aquellas que se incubaron con y sin PEI. Nuevamente el PEI muestra un efecto inhibitorio en la transducción reforzando la hipótesis de una posible actividad virucida.

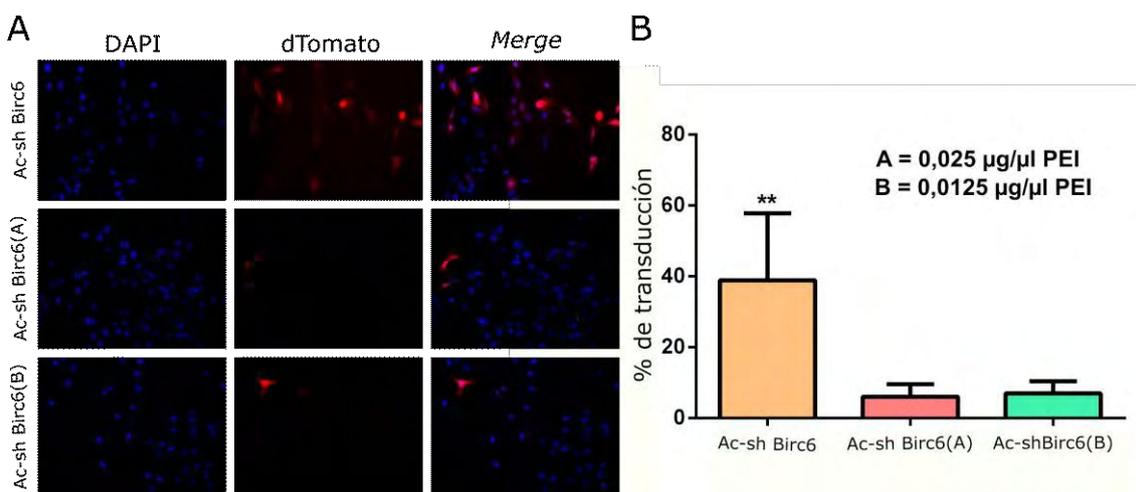


Figura 19. Transducción del Baculovirus (Ac-shBirc6) en células MDA-MB-231 en presencia de PEI. (A) Microscopía de fluorescencia con células MDA-MB-231 transducidas utilizando una multiplicidad de transducción de 500 baculovirus/célula sin PEI (panel superior) y 0,025 µg/µl de PEI (panel medio) y 0,0125 µg/µl de PEI (panel inferior) durante 48 hs. (B) Cuantificación de células MDA-MB-231 transducidas con Ac-shBirc6 incubadas en presencia de PEI durante 48 hs. Two-tailed unpaired t-test** p < 0.01.

Ac-shBirc6 es capaz de silenciar *birc6* en células de cáncer de mama triple negativo humano.

Una vez demostrada la capacidad de los baculovirus de transducir las células se procedió a evaluar el silenciamiento de la proteína BIRC6 mediado por Ac-shBirc6. Para esto se incubaron cultivos celulares de la línea MDA-MB-231 con baculovirus recombinantes Ac-shBirc6 o Ac-shRNA (-) y se detectaron de forma cualitativa los niveles de expresión de la proteína BIRC6 por inmunofluorescencia. En la **Figura 20** se observa que las células transducidas con el baculovirus que codifica para el shRNA contra BIRC6 presentan una disminución cualitativa de la fluorescencia verde, dada por el fluoróforo Alexa-488, lo que evidencia una menor cantidad de BIRC6. Esto probablemente se deba al silenciamiento mediado por Ac-shBirc6.

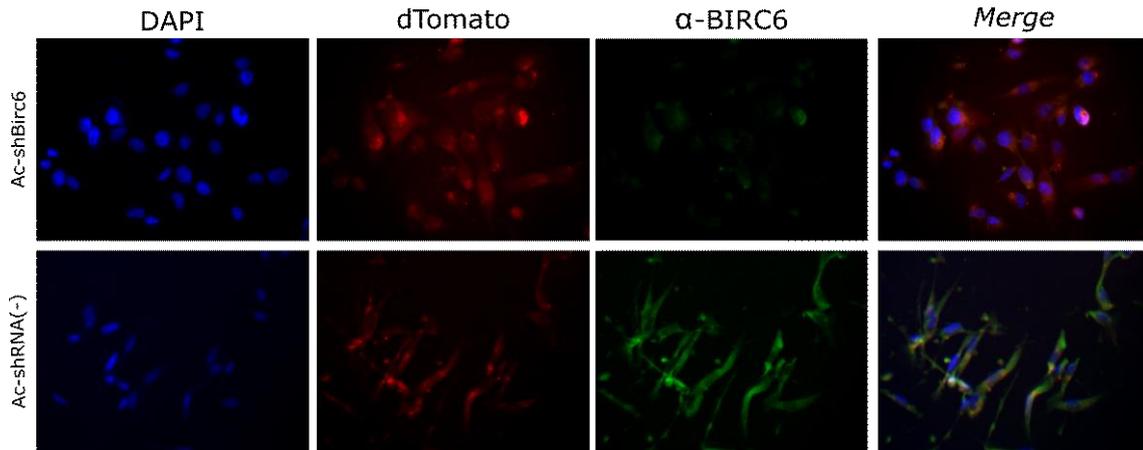


Figura 20. Expresión de BIRC6 en células MDA-MB-231 transducidas con Ac-shBirc6 por microscopía confocal. Células MDA-MB-231 fueron transducidas utilizando una multiplicidad de transducción (MOT) de 500 baculovirus/célula durante 48 hs y fueron fijadas con *Fix&Perm* (BD). La expresión de Birc6 fue detectada por inmunofluorescencia. En el panel de fotos se observa Izquierda a derecha: DAPI (azul) – proteína reportera dTomato (rojo) – Birc6 (verde) – Merge.

Birc6 está sobre expresado en muestras de pacientes con cáncer de mama.

Con el fin de evaluar el rol de BIRC6 en muestras de cáncer mamario humano, se procedió al estudio de bases de datos transcriptómicos mediante métodos de análisis *in silico*.

Para este estudio se utilizó la plataforma *UCSC Xena* para analizar la base *TCGA TARGET GTEx* que contiene datos de 1278 pacientes.

Se procedió a comparar la expresión de *birc6* en muestras provenientes de tumores primarios de pacientes con cáncer de mama y muestras de tejido normal de voluntarias sanas. El resultado se muestra en la **Figura 21**. Observamos que hay un aumento en la expresión en aquellas muestras de tumores primarios con respecto al tejido normal de las voluntarias sanas. Presentando las pacientes con cáncer una mediana del z-score de 0.113, mientras que el tejido normal de las voluntarias sanas presenta una mediana en el z-score de -0.372.

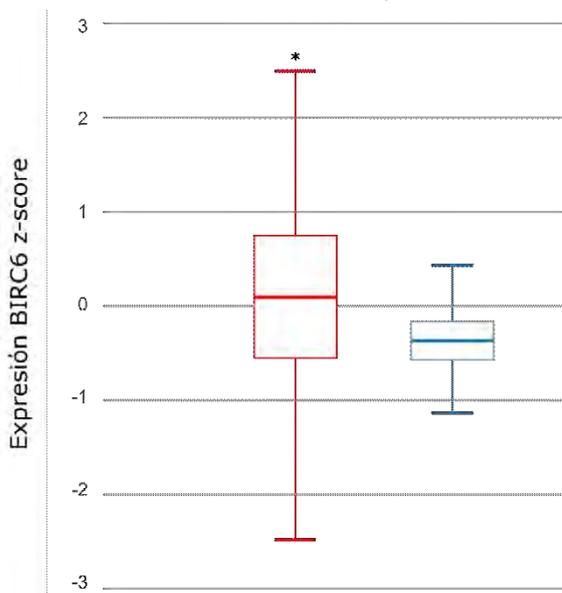


Figura 21. Expresión de *birc6* en muestras provenientes de pacientes con cáncer de mama y voluntarias sanas. Dotblot obtenido con *UCSC Xena* en el que se muestra la expresión de *birc6* expresada como z-score correspondiente a muestras de pacientes con cáncer (rojo, n= 1099) o muestras de voluntarias sanas (azul, n= 176). T-test *p-value <0.001.

Las alteraciones en el número de copias de *birc6* se correlacionan con el estado de los receptores hormonales de estrógeno y progesterona.

Para evaluar la implicancia en la alteración del gen de interés *birc6* en los atributos clínicos de pacientes, se procedió a realizar un análisis bioinformático utilizando el dataset *Breast Cancer (METABRIC, Nature 2012 & Nat Commun 2016)* en la plataforma cBioPortal. Dicha base contiene datos de 2509 pacientes con sus respectivos datos genómicos, transcriptómicos y atributos clínicos.

En primera medida decidimos evaluar si un aumento o una disminución en el número de copias del gen *birc6* implicaba algún cambio en su expresión. Las CNV se dividieron en 4 grupos: amplificaciones, ganancias, diploides y deleciones y se realizó una ANOVA múltiple seguida de un test Tukey HSD para comparar la expresión del gen en cada caso. Se encontró una relación directa entre el número de copias y la expresión, siendo así que aquellas muestras que tienen amplificaciones son las que tienen niveles de expresión más altos y las que poseen deleciones los niveles de expresión más bajos. Los resultados se muestran en la **Figura 22**.

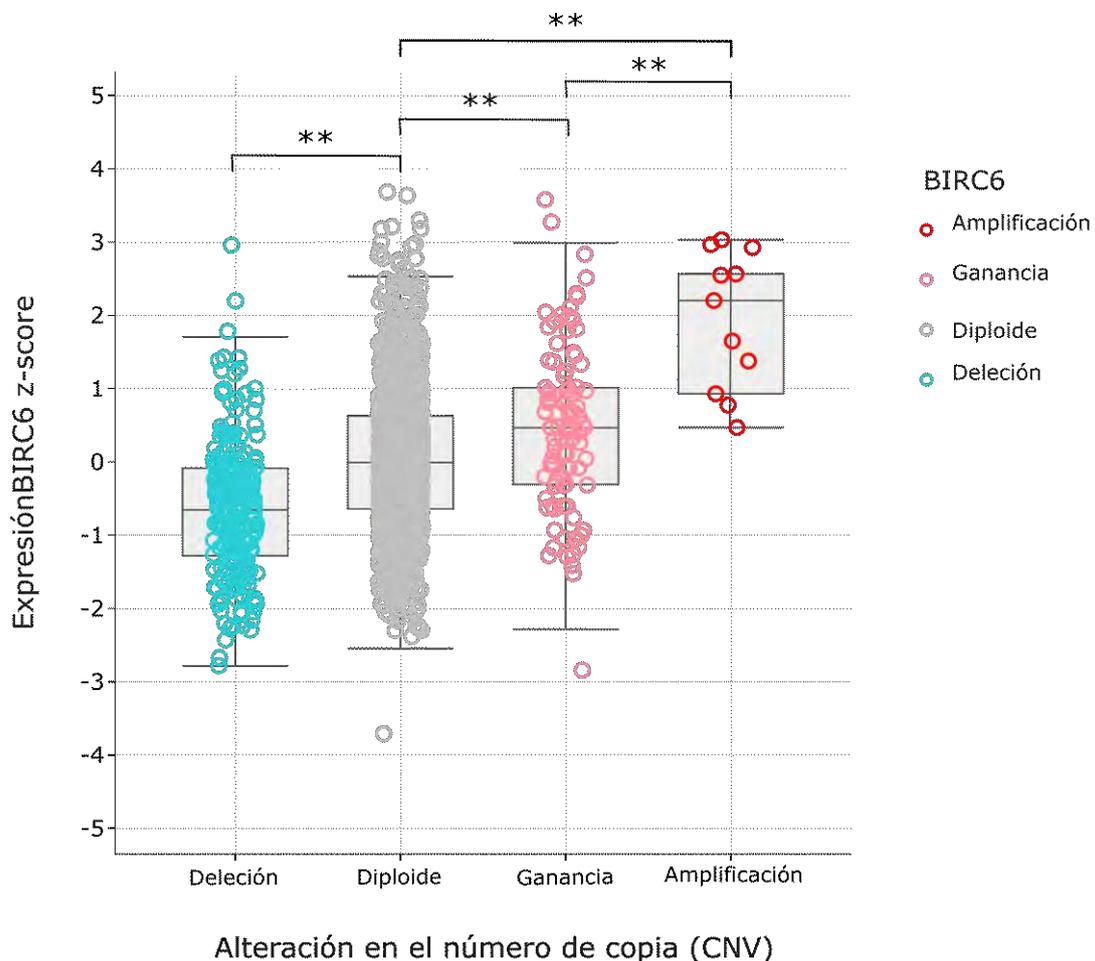


Figura 22. Efecto del CNV en la expresión del gen *birc6*. DotPlot obtenido utilizando cBioPortal. En el eje vertical se observa la expresión de *birc6* normalizada con el Z-score. En el eje horizontal se muestra cada tipo de alteración en el número de copias. ANOVA múltiple seguida de TukeyHSD ** p-value < 0.001.

Para continuar el estudio decidimos evaluar el efecto de CNV en la presencia o ausencia de receptores de estrógenos (ER), progesterona (PR) y factor de crecimiento epidérmico 2 (HER2). La ausencia de dichos receptores en el cáncer de mama implica un fenotipo mucho más agresivo y la imposibilidad de utilizar terapias hormonales para detener su desarrollo.

Los resultados se muestran en la **Figura 23**. En la misma observamos que tanto en las muestras ER (-) y PR (-) hay una mayor proporción de amplificaciones y ganancias en el CNV con respecto a aquellas muestras ER (+) y PR (+) respectivamente. Además, observamos que no hay diferencias entre aquellas muestras HER2+ y HER2-.

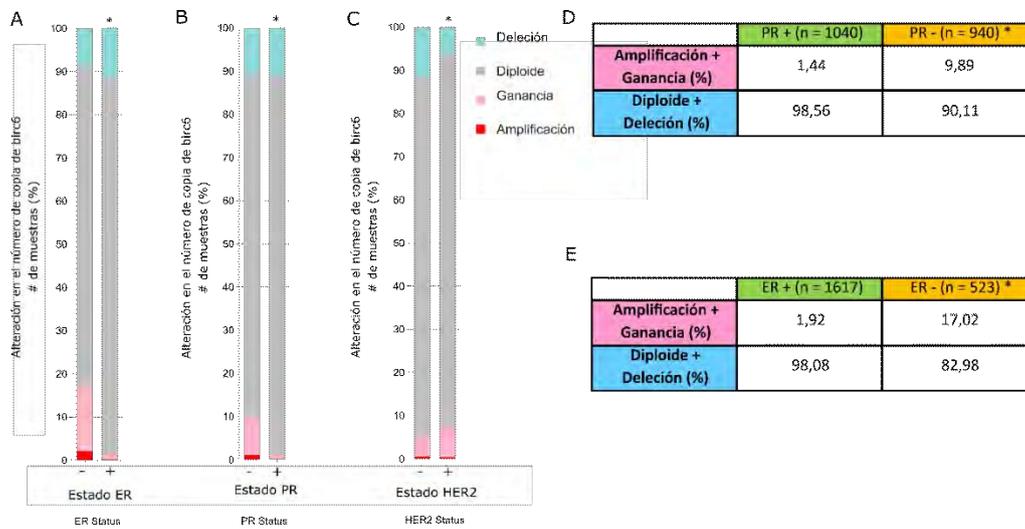


Figura 23. Efecto de CNV de *birc6* sobre el fenotipo de las muestras. Gráfico de barras obtenido con cBioPortal. Porcentaje de muestras con amplificaciones, ganancias, diploidía y deleciones en aquellos tumores ER positivos y negativos (A), en aquellos PR positivos y negativos (B) y en aquellos HER2 positivos y negativos (C). Tablas con valores porcentuales de cada CNV en tumores PR positivos y negativos (D) y en tumores ER positivos y negativos (E). χ^2 *p-value < 0.001.

El incremento en el número de copias de *birc6* resulta en fenotipos más agresivos y resistentes.

Para profundizar el estudio evaluamos el promedio de las edades a las que fueron diagnosticadas las pacientes que poseían las distintas CNV. Se observó que aquellas pacientes con aumentos en el CNV tienden a tener diagnósticos a edades más tempranas que aquellas pacientes que mantuvieron la diploidía o tuvieron deleciones en el gen. Los resultados se muestran en la **Figura 24**.

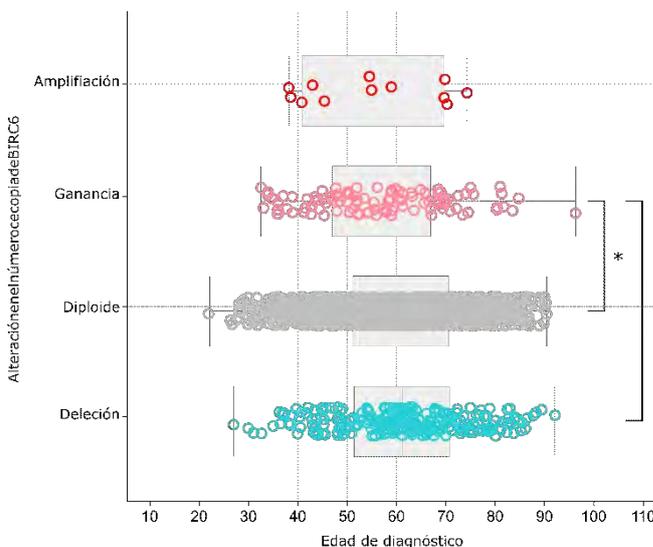


Figura 24. Efecto de la variación en el CNV en la edad de diagnóstico de las pacientes. Gráfico obtenido con la plataforma cBioPortal en el que se grafican las distintas CNVs en función de la edad de diagnóstico. En el eje vertical se muestran las CNVs, en el eje horizontal la edad. Rojo: amplificaciones; rosa: ganancias; gris: diploides; celeste: deleciones. ANOVA múltiple seguida de TukeyHSD *p-value < 0.05.

Para continuar el análisis evaluamos el efecto de la CNV sobre dos parámetros que reflejan el pronóstico de la persona una vez diagnosticada, estos son el Índice de Nottingham, que, a mayor índice, peor es el pronóstico, y el Grado Histológico Neoplásico, que a mayor grado mayor agresividad. Se evaluaron los datos de índice de pronóstico de Nottingham, que toma el tamaño del tumor, el estadio ganglionar y el grado histológico siguiendo la fórmula: **0.2 x Tamaño del tumor (cm) + Estadío ganglionar (1,2,3) + Grado histológico (1,2,3)** y según el resultado el pronóstico puede ser *favorable* ($NPI < 3.4$), *intermedio* ($3.5 < NPI < 5.4$) o *desfavorable* ($NPI > 5.4$)[180]. Se observó que aquellas pacientes con amplificaciones presentan un índice de Nottingham más elevado que el resto de las condiciones, tendiendo a tener un pronóstico desfavorable (**Figura 25 A**). Además, podemos ver que muestras con Grado Histológico 3, hay una mayor proporción de pacientes con amplificaciones y ganancias en el gen, con respecto a las muestras con Grados Histológicos 1 y 2 (**Figura 25 B y C**).

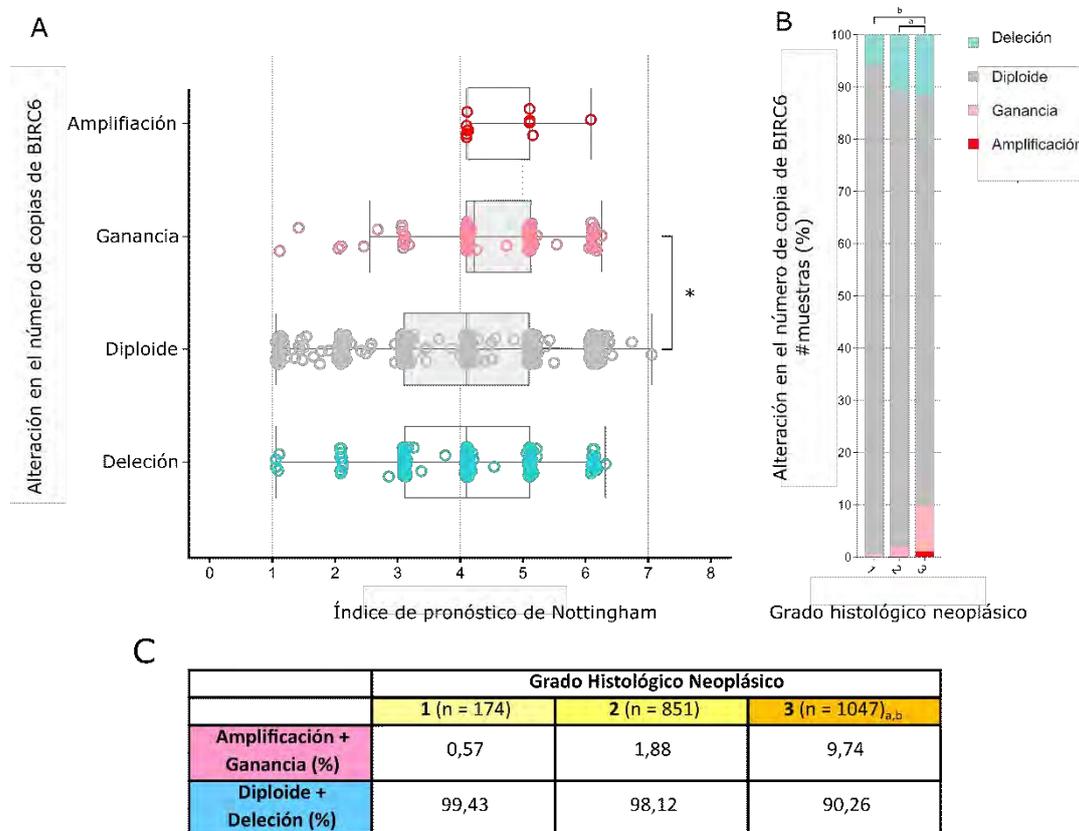


Figura 25. Efecto de la CNV sobre la prognosis. Gráficos obtenidos a partir de la plataforma cBioPortal. Gráfico de CNV en función del Índice de pronóstico de Nottingham (A), gráfico de CNV en función del Grado histológico neoplásico (B) y valores porcentuales de cada CNV en los distintos Grados Histológicos Neoplásicos (C). Rojo: amplificaciones; rosa: ganancia; gris: diploidía; celeste: deleciones. ANOVA múltiple seguida de TukeyHSD *p-value < 0.001 (A). χ^2 a, p-value < 0.001 vs Grado Histológico Neoplásico 2; b, p-value < 0.001 vs Grado Histológico Neoplásico 1(B).

Para finalizar el análisis decidimos evaluar el efecto de las CNV en la resistencia de la quimioterapia y radioterapia, que es muy frecuente en carcinomas mamarios triple negativos. Para esto comparamos el tipo de CNV que tenían las muestras que provenían de pacientes que habían recibido o no quimioterapia o radioterapia. Los resultados se muestran en la **Figura 26**. En la misma, se observa que, tanto al evaluar quimioterapia como radioterapia, en aquellas muestras provenientes de pacientes que recibieron alguna de las dos terapias, había una mayor amplificación y ganancia con respecto a aquellas que no habían recibido.

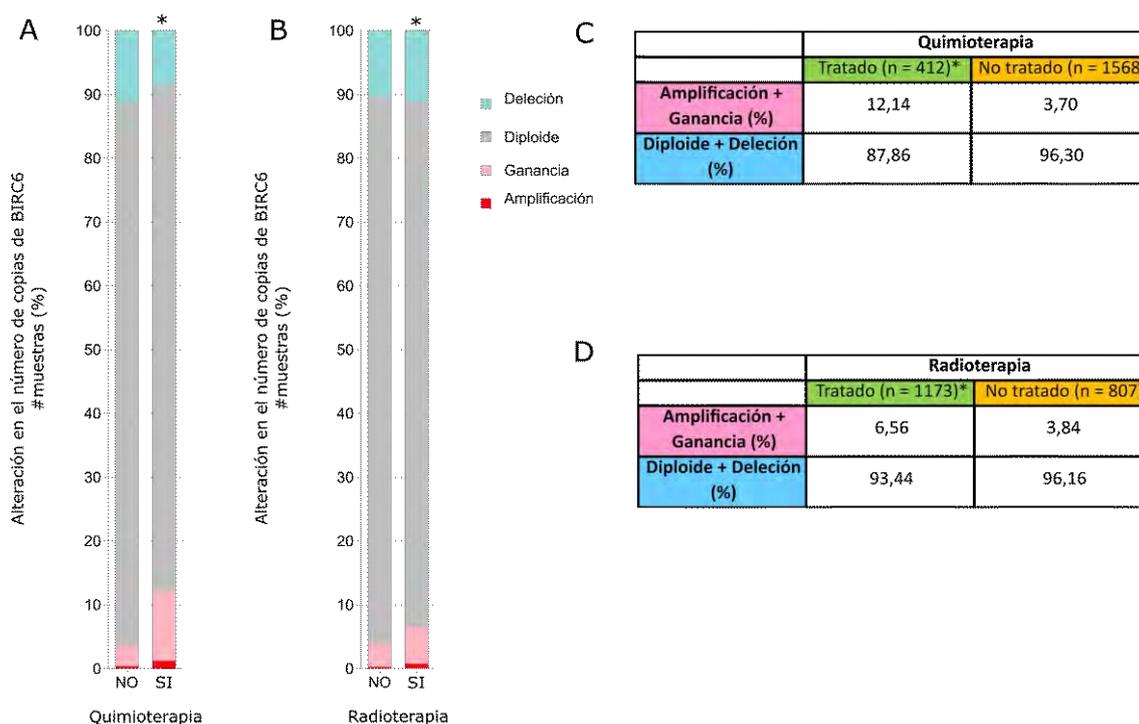


Figura 26. Efecto de CNV sobre la quimio y radio resistencia. Gráfico obtenido de la plataforma cBioPortal. Gráfico de CNV en *birc6* en función de haber recibido o no quimioterapia (A) o radioterapia (B). Tabla con valores porcentuales de cada CNV en función de si la paciente fue tratada o no con quimioterapia (C) o radioterapia (D). Rojo: amplificaciones; rosa: ganancias; gris: diploidía; celeste: deleciones. X^2 * p-value < 0.01 (C) . X^2 * p-value < 0.001 (D)

La expresión de *birc6* se correlaciona con la expresión de las moléculas involucradas en las vías apoptóticas.

Para este estudio se utilizó la base de datos *TCGA PanCancer* que contiene datos de 1236 pacientes con cáncer de mama.

Considerando el efecto reportado de BIRC6 sobre la apoptosis, y nuestros resultados del efecto pro-apoptótico de la inhibición de BIRC6 por Ac-shBIRC6 en modelos celulares murinos, decidimos evaluar el efecto de la expresión de *birc6* sobre la expresión de distintas moléculas involucradas en vías apoptóticas, utilizando datos correspondientes a pacientes. De este modo, utilizando los datos colectados en *TCGA PanCancer* evaluamos la expresión de Bax, Bcl-2, Caspasa 9, Caspasa 3, Caspasa 8, TP53, Citocromo C, NFκB1 y DIABLO en condiciones de alta expresión o baja expresión de *birc6* (**Figura 27A**). Además, se analizó si existía alguna correlación entre la expresión de *birc6* y las distintas moléculas (**Figura 27B**), agrupando posteriormente las pacientes según 4 criterios: Receptor de hormonas positivo o negativo (HR + o HR-) y HER2 positivo o negativo (HER2+ o HER2-) (**Figura 27C**). Los resultados se muestran en la **Figura 27**. En la misma vemos que aquellas muestras con alta expresión de *birc6* presentan menor expresión de Bax, de Caspasa 9, de Citocromo C y de DIABLO, y mayor expresión de Bcl-2, Caspasa 3, Caspasa 8 y NFκB1 con respecto a aquellas muestras con baja expresión de *birc6*. Además, observamos que no hay diferencias en la expresión de TP53 entre ambos grupos.

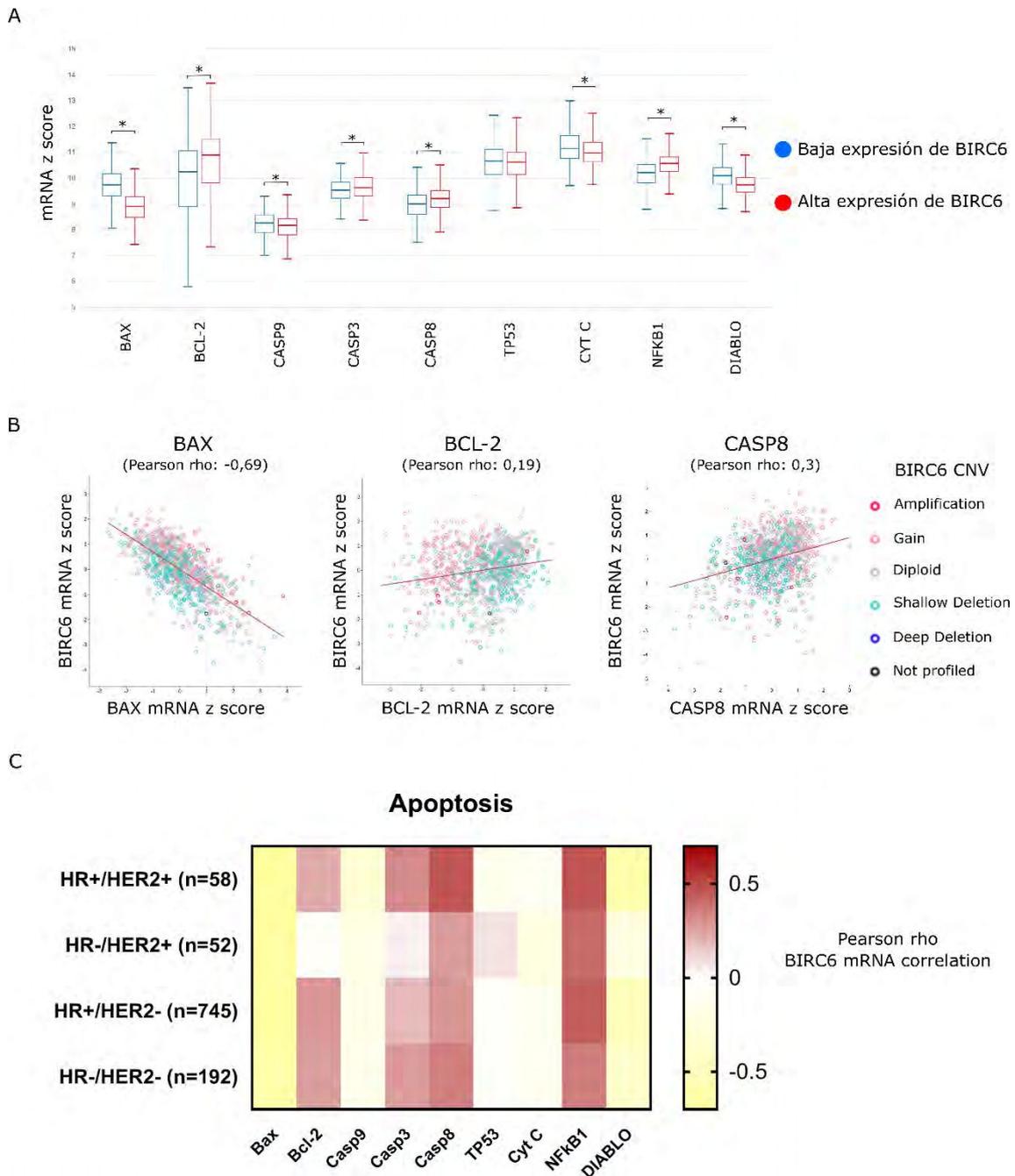
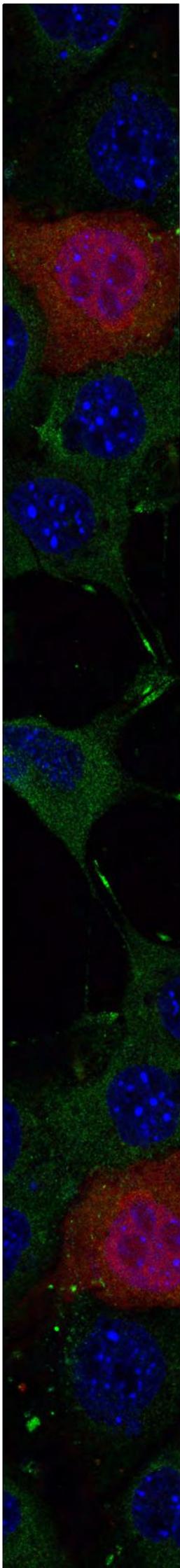


Figura 27. Efecto de la expresión de *birc6* sobre la expresión de moléculas involucradas en vías apoptóticas. En la figura observamos un *boxplot* en el que se comparan la expresión de distintos genes expresados como z-scores según dos grupos: alta expresión de *birc6* (n= 697) y baja expresión de *birc6* (n= 514) (A). Además, se muestran *dotblots* en los que se muestra la correlación entre la expresión de *birc6* y la expresión de BAX, BCL-2 y Caspasa 8. Sobre cada gráfico se muestra el coeficiente rho de Pearson y una línea de tendencia (B). Por último, se muestra un *Heatmap* en el que se ilustra el grado de correlación para cada gen con respecto a *birc6*, en cada subgrupo (C). T-test *p-value< 0.001 (A). Pearson correlation p-value< 0.05 (C).

En resumen, con todos los experimentos realizados pudimos determinar que los modelos utilizados son susceptibles a ser transducidos por los baculovirus recombinantes, que los mismos son capaces de inducir el silenciamiento tanto en líneas celulares humanas como murinas y que dicho silenciamiento aumenta los niveles de apoptosis de las células murinas. Además, el tratamiento de ratones con tumores heterotópicos con dichos baculovirus disminuye la progresión tumoral, ejerciendo un efecto anti- tumoral. Por último, los ensayos *in silico*

permitieron el estudio del rol de BIRC6 en distintos atributos de TNBC. Eso lo posiciona como un buen target terapéutico y nos aventura a pensar en aplicar el baculovirus para una terapia génica.



Discusión

Discusión

En el presente trabajo nos propusimos estudiar los efectos del silenciamiento de la proteína BIRC6 mediado por baculovirus recombinantes de AcMNPV en modelos de cáncer de mama triple negativo (TNBC), así como evaluar la implicancia clínica de alteraciones en la expresión de la misma.

Para llevar adelante los objetivos planteados, en primer lugar, fue necesario evaluar si nuestros modelos celulares eran susceptibles a ser transducidos por los baculovirus. En este sentido, realizamos ensayos de transducción en las líneas F3II y MDA-MB-231 (murinas y humanas, respectivamente) y comprobamos la capacidad transductora de los baculovirus recombinantes utilizando como gen reportero la proteína dTomato. Si bien observamos que ambas líneas eran susceptibles a ser transducidas, la eficiencia de transducción fue diferente. Esta diferencia no fue algo inesperado ya que existen numerosos trabajos en los que se ha demostrado que, si bien los baculovirus son capaces de transducir células de mamífero, la eficiencia puede variar entre distintas líneas celulares debido a que el ingreso podría estar mediado por diversos mecanismos [150–152,181]. Posteriormente evaluamos el efecto del agregado de PEI en la eficiencia de transducción en ambas líneas celulares, ya que, si bien se sabe que el mismo presenta efecto virucida [182], también se sabe que aumenta el ingreso inespecífico de ADN desnudo en las células [174–179]. Debido a esto, el PEI podía aumentar la eficiencia de transducción facilitando el ingreso, por algún mecanismo diferente a la endocitosis, más allá de que los viriones no fueran viables. En ambos casos observamos que la transducción se veía fuertemente inhibida por lo que pudimos comprobar que primó el efecto virucida frente al ingreso inespecífico. Esto plantea a futuro la necesidad de idear otras estrategias para aumentar la eficiencia de transducción, para así lograr una terapia más efectiva. Una posibilidad podría ser expresar en la superficie de los baculovirus proteínas que interaccionen con receptores específicos de mamífero y así lograr un ingreso más eficiente [149,181].

Una vez comprobado que las células eran susceptibles a la transducción mediada por baculovirus, corroboramos la funcionalidad del shRNA para silenciar el gen de interés. En el caso de la línea murina el alineamiento del shRNA con la secuencia complementaria al 3' UTR del mRNA del gen *birc6* reveló un 90 % de identidad, mientras que en el caso del mRNA humano el shRNA fue 100% idéntico. A continuación, se realizaron inmunofluorescencias indirectas en ambas líneas celulares transducidas con los baculovirus para detectar BIRC6. Observamos cualitativamente que la cantidad de proteína disminuía cuando las células eran transducidas con el baculovirus silenciador. Si bien este es un resultado positivo, sigue siendo preliminar y es necesario validarlo utilizando otras metodologías que permitan cuantificar el grado de silenciamiento tales como RT-q-PCR para cuantificar el mRNA de *birc6* o bien citometría de flujo o Western-Blot para determinar los niveles de expresión de la proteína.

Una vez que se demostró la capacidad de los baculovirus de ingresar a las células e inducir el silenciamiento de BIRC6, procedimos a evaluar el efecto de dicho silenciamiento sobre la apoptosis. BIRC6 forma parte de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) y su función consiste en secuestrar y conducir a la degradación de las moléculas efectoras de la apoptosis, evitando que la misma ocurra [67,68,70,183]. De este modo, nuestra hipótesis consistió en que el silenciamiento de dicha proteína induce la apoptosis en las células tumorales transducidas. Para esto, se realizaron ensayos de TUNEL para poner en evidencia la apoptosis tardía en células F3II previamente tratadas con Ac-shBirc6 o As-shRNA (-) y se procedió a cuantificar el porcentaje de células apoptóticas en cada caso. Al compararlas encontramos diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados demuestran que el silenciamiento

de la proteína BIRC6 efectivamente tiene el efecto deseado de inducir apoptosis en la línea celular de TNBC murina. Para lograr un resultado más robusto, proponemos validar las evidencias obtenidas por TUNEL mediante otra técnica como la relación de los niveles de Bax y Bcl-2 medida por Western-Blot [156].

Posteriormente, se evaluó el efecto del silenciamiento de *birc6* mediado por baculovirus en modelos de experimentación *in vivo*, para comprobar si el tratamiento interfería con la progresión tumoral y el desarrollo de la enfermedad. La desregulación de la apoptosis es uno de los eventos que puede llevar a que una célula normal se vuelva tumoral, pero no el único. Numerosos estudios han demostrado que la inducción de la apoptosis en estas células podría servir para disminuir la progresión tumoral [184]. Sin embargo, esto no siempre es suficiente ya que en el desarrollo tumoral intervienen otros procesos tales como el aumento en la adhesión, en la migración y en la proliferación [185]. Por ello la experimentación con modelos murinos se vuelve imprescindible para determinar el efecto antitumoral del tratamiento en un contexto fisiológico de la enfermedad. De este modo, se inocularon células F3II en ratonas BALB/c, y luego de que se formaran los tumores, se inyectaron los baculovirus Ac-shBirc6 o Ac-shRNA (-) intratumoralmente. Se siguió la progresión tumoral y al día 43 post-inoculación se encontraron diferencias significativas en el volumen tumoral y en el Cociente (V_f/v_i) entre aquellos ratones tratados con Ac-shBirc6 con respecto a los tratados con el virus control. Esto indica que el silenciamiento de *birc6* mediado por baculovirus tiene un efecto inhibitorio sobre la progresión tumoral. Además, los ratones tratados con Ac-shBirc6 tenían una menor dispersión en los volúmenes tumorales que los ratones control. Por lo tanto, el baculovirus Ac-shBirc6 ejerce un efecto antitumoral. Estos resultados son análogos a los obtenidos por Gottardo & Pidre y colaboradores, que aplicaron un baculovirus AcMNPV recombinante capaz de silenciar el péptido mitocondrial humanina (HNr) en modelos murinos de tumores pituitarios. En dicho trabajo, aplicaron intratumoralmente el baculovirus y observaron también una disminución en la progresión tumoral y un aumento en la sobrevivencia de los ratones tratados [156]. Adicionalmente, realizamos un recuento de macro metástasis pulmonar. Si bien no se encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado y el grupo control, consideramos que las condiciones evaluadas no fueron suficientes para determinar el efecto del tratamiento sobre la metástasis, ya que es conveniente aumentar el tiempo en el que se realizó el ensayo a 60 días, y aumentar en n (el número de ratones utilizados) para que se observaran diferencias en las micro y macro metástasis entre ambos grupos [186,187]. Por ende, sería importante realizar un nuevo ensayo más prolongado para poder poner en evidencia si presenta un efecto anti-metastásico, también sería de interés realizar otro que nos permita evaluar la sobrevivencia. Finalmente es importante remarcar que el ensayo realizado tuvo un carácter exploratorio y que, si bien los resultados obtenidos son alentadores, es necesario realizar repeticiones.

Finalmente, para concluir este estudio evaluamos las posibles correlaciones entre diferentes atributos clínicos y los niveles de expresión de *birc6* utilizando bases de datos que contenían información transcriptómica sobre muestras de pacientes. Comenzamos analizando la expresión de *birc6* en diferentes tejidos, y hallamos un nivel de expresión mayor en muestras provenientes de carcinomas mamarios, con respecto a aquellas muestras correspondientes a tejido sano. Esto podría implicar que un aumento en la expresión de *birc6* llevaría a que las células sean capaces de evadir los mecanismos fisiológicos de apoptosis y puedan volverse cancerígenas.

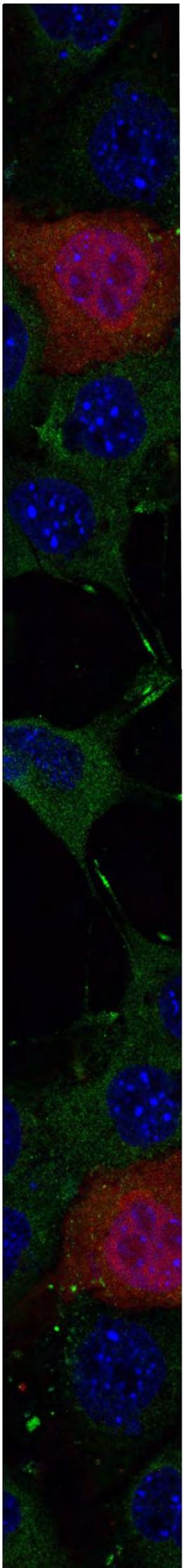
Posteriormente, determinamos que las variaciones en el número de copia (CNV) del gen *birc6* se correlacionaban con la expresión del mismo. De este modo, aquellas muestras que presentaban deleciones, tenían el nivel de expresión más bajo y aquellas que presentaban

amplificaciones (CNV>2) eran las que tenían el mayor nivel de expresión[188]. Por ese motivo los análisis posteriores se realizaron en función de la variación del número de copias. Encontramos una mayor proporción de amplificaciones y ganancias en el número de copias de *birc6* en aquellas muestras que eran ER- y PR- con respecto a ER+ y PR+ respectivamente. La pérdida de los receptores hormonales lleva a que los tumores adquieran fenotipos mucho más agresivos [27,29–32,189,190], sugiriendo de este modo un posible paralelismo entre la expresión de BIRC6 y ciertos fenotipos más agresivos. Luego, comparamos las CNV con la edad a la que fueron diagnosticadas las pacientes. Aquellas pacientes con amplificaciones o ganancias en el número de copias de *birc6* presentaban una tendencia a ser diagnosticadas a edades más tempranas que las pacientes que presentaban deleciones o no tenían alteraciones. Diversos trabajos demostraron una correlación entre la expresión de BIRC6 y el pronóstico del paciente, además de una implicancia de BIRC6 en etapas tempranas del desarrollo del cáncer. En cáncer colorrectal por ejemplo [191], de próstata [87,192], y de ovario [89], entre otros. Teniendo en cuenta esto, se analizó el grado histológico neoplásico y el índice de pronóstico de Nottingham en las distintas muestras en relación con el CNV [180,193,194]. Observamos que aquellas muestras con amplificaciones o ganancias, presentaban una tendencia a tener peores pronósticos y a estar en grados neoplásicos más avanzados. Esto, junto a la pérdida de los receptores, dan idea de que un aumento en el número de copias de *birc6* podría llevar al desarrollo temprano y a la generación de un fenotipo más agresivo de cáncer de mama.

Para continuar con el análisis, decidimos evaluar el perfil de CNV en aquellas pacientes que habían recibido quimioterapia o radioterapia ya que está reportado que *birc6* podría colaborar con los mecanismos de resistencia a esas terapias en otros tipos de cáncer [88,92]. Encontramos que en las muestras de las pacientes que habían recibido quimioterapia o radioterapia había una mayor proporción de amplificaciones y ganancias con respecto a aquellas muestras de pacientes que no habían recibido ninguna de ellas. Esto podría indicar que un aumento en el número de copias de *birc6* guardaría algún tipo de relación con la quimio y / o radio resistencia. Estos resultados provenientes del análisis transcriptómico deben ser validados evaluando por ejemplo la expresión de BIRC6 en muestras histológicas provenientes de biopsias realizadas a pacientes de TNBC.

Por último, evaluamos el estado de las vías apoptóticas en condiciones de alta o baja expresión de *birc6* y evaluamos la correlación de distintas proteínas involucradas en las mismas, en distintos tipos de carcinomas mamarios. Para la selección de los genes analizados nos basamos en que BIRC6 interactúa con diferentes CASPASAS y SMAC/DIABLO, sugiriendo algún tipo de correlación en la expresión de los mismos, y también, estar regulando otros puntos de la vía que no estén directamente relacionados. Además, Jinyu Ren y colaboradores reportaron que el gen *birc6* es capaz de regular a la proteína p53 y la vía apoptótica mitocondrial [71]. En este sentido, evaluamos la correlación de la expresión de BIRC6 y la expresión de los genes *bcl-2*, *bax*, *casp9*, *casp3*, *casp8*, *diablo* *nfkb1* y *tp53*. Observamos que la expresión de genes anti-apoptóticos tales como *bcl-2* y *nfkb1* se veía aumentada cuándo la expresión de *birc6* era alta y que genes pro-apoptóticos tales como *bax*, *casp9* y *diablo* se veían disminuidos. Además, encontramos que había una alta correlación entre la expresión de BIRC6 y los distintos efectores. Si bien algunas proteínas pro-apoptóticas como las CASPASA 8 y la CASPASA 3 tienden a aumentar su expresión al aumentar la expresión de *birc6*, el balance neto resulta en una inhibición de la apoptosis. Probablemente, estas proteínas se encuentren sobre-expresadas para intentar contrarrestar el efecto anti-apoptótico derivado de la alta expresión de BIRC6. También cabe mencionar que BIRC6 regula las caspasas a nivel proteico, por lo que un aumento en la transcripción de los genes no necesariamente resulta en un aumento en la actividad de las proteínas.

En su conjunto, los resultados *in vitro*, *in vivo* e *in silico* obtenidos sugieren que BIRC6 estaría involucrado en la regulación de los mecanismos apoptóticos en el cáncer de mama triple negativo y que alteraciones en el número de copias y en su expresión, podrían guardar relación con el desarrollo de la patología y la aparición de fenotipos más agresivos y menos sensibles a las distintas terapias. En este sentido, Ac-shBirc6 al ser capaz de transducir e inducir el silenciamiento de *birc6* en células de cáncer de mama triple negativo tanto murino como humano, podría servir como un posible vector de terapia antitumoral, logrando así no solo un efecto en la inducción de la apoptosis de las células tumorales, sino también logrando que los tumores adquieran fenotipos menos agresivos y se vuelvan sensibles a las terapias convencionales. En este sentido, nos proponemos avanzar en estudios que permitan explorar la utilización de Ac-shBirc6 de forma combinada con quimioterapia y/o radioterapia tanto en ensayos *in vitro* como en ensayos *in vivo*.



Conclusiones y Perspectivas

Conclusiones

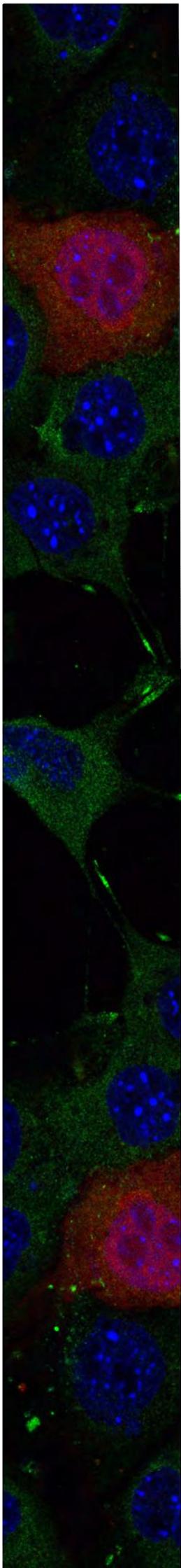
Cómo conclusiones de este trabajo podemos destacar:

- Todas las líneas celulares utilizadas como modelo (F3II y MDA-MB-231) resultaron susceptibles a ser transducidas por baculovirus AcMNPV recombinantes.
- La presencia de PEI inhibió la transducción de las células F3II y MDA-MB-231 por parte de baculovirus recombinante, por lo que no se aconseja su uso para aumentar la eficiencia de la misma.
- El baculovirus recombinante que codifica para el shRNA específico para *birc6* fue capaz de inducir la apoptosis en las células transducidas, aumentando los niveles de la misma con respecto a las células tratadas con el baculovirus control, indicando que la proteína BIRC6 ejerce una acción anti-apoptótica en estas células.
- El tratamiento con el baculovirus recombinante Ac-shBirc6 fue capaz de disminuir la progresión tumoral en un modelo murino de TNBC.
- La proteína BIRC6 está sobreexpresada en tumores primarios provenientes de pacientes con cáncer de mama con respecto al tejido normal de voluntarias sanas y guarda una fuerte correlación con el aumento de la expresión de proteínas anti-apoptóticas.
- El aumento en el número de copias del gen *birc6* se correlaciona con un fenotipo más agresivo, resistente a distintas terapias convencionales asociado a un peor pronóstico en cáncer de mama.
- Considerando los resultados obtenidos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* postulamos a BIRC6 como un posible blanco terapéutico para TNBC.

Perspectivas

- Mejorar la especificidad y eficiencia de transducción del baculovirus.
- Evaluar por métodos cuantitativos la disminución de los niveles de BIRC6 determinando la cantidad del mRNA mediante RT-qPCR, y de la proteína por citometría de flujo o Western Blot.
- Profundizar el estudio del efecto del silenciamiento de BIRC6 sobre la apoptosis: relación Bax/Bcl-2 por Western Blot, evaluación de apoptosis temprana evaluando diferentes marcadores por citometría de flujo (potencial de membrana mitocondrial utilizando el colorante JC-1 y exposición superficial de fosfatidilserina utilizando Anexina V).
- Evaluar el efecto del baculovirus en la adhesión, migración y proliferación de células tumorales.
- Evaluar el efecto de la inhibición de BIRC6 sobre la metástasis de ratones tratados, en tiempos experimentales mayores y con mayor número de animales.
- Evaluar el efecto de la inhibición de BIRC6 en modelos *in vivo* de TNBC concomitante con la remoción quirúrgica con material residual, quimioterapia y/o radioterapia.
- Confirmar en ensayos *in vitro* e *in vivo* los resultados hallados *in silico*, especialmente aquellos vinculados a la resistencia a terapias convencionales y la expresión de receptores hormonales.
- Evaluar el efecto de la inhibición de BIRC6 sobre la infiltración inmunológica en cortes histológicos de los tumores murinos luego del tratamiento.

Si bien el presente trabajo tuvo como finalidad evaluar el efecto terapéutico del silenciamiento de la expresión de la proteína inhibidora de la apoptosis BIRC6 en distintos procesos relacionados con el cáncer, considero que resulta importante también poner especial énfasis en aquellos aspectos que pueden llevar a la prevención del cáncer. Los hábitos alimenticios, tales como el consumo de alimentos con alto contenido de azúcares o de grasas sostenido en el tiempo [15–17], la contaminación ambiental derivada del uso inadecuado de compuestos químicos nocivos y la falta de tratamientos a los efluentes derivados de las grandes industrias y otras actividades como la agropecuaria que resultan en una alta exposición a distintos contaminantes tales como los agrotóxicos [10–13], metales pesados y compuestos orgánicos derivados de la industria petroquímica [14], entre otros, son factores que colaboran con la aparición y el agravamiento de este conjunto de enfermedades. Por ello, además de la búsqueda de tratamientos eficaces, es necesario mitigar estos factores ambientales de forma radical para revertir la tendencia creciente en la incidencia de estas y otras patologías.



Bibliografía

Bibliografía

1. Forouzanfar MH, Afshin A, Alexander LT, Biryukov S, Brauer M, Cercy K, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388: 1659–1724. doi:10.1016/S0140-6736(16)31679-8
2. Estadísticas - Incidencia | Argentina.gob.ar.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68: 394–424. doi:10.3322/caac.21492
4. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*. Wiley-Liss Inc.; 2019. pp. 1941–1953. doi:10.1002/ijc.31937
5. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, et al. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2018.
6. (US) NI of H, Study BSC. *Understanding Cancer*. 2007.
7. Sarkar S, Horn G, Moulton K, Oza A, Byler S, Kokolus S, et al. Cancer development, progression, and therapy: An epigenetic overview. *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2013. pp. 21087–21113. doi:10.3390/ijms141021087
8. Scheel BI, Holtedahl K. Symptoms, signs, and tests: The general practitioner's comprehensive approach towards a cancer diagnosis. *Scand J Prim Health Care*. 2015;33: 170–177. doi:10.3109/02813432.2015.1067512
9. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes and Diseases*. Chongqing yi ke da xue, di 2 lin chuang xue yuan Bing du xing gan yan yan jiu suo; 2018. pp. 77–106. doi:10.1016/j.gendis.2018.05.001
10. Alavanja MCR, Bonner MR. Occupational pesticide exposures and cancer risk: A review. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*. NIH Public Access; 2012. pp. 238–263. doi:10.1080/10937404.2012.632358
11. Weichenthal S, Moase C, Chan P. A Review of Pesticide Exposure and Cancer Incidence in the Agricultural Health Study Cohort. *Environ Health Perspect*. 2010;118: 1117–1125. doi:10.1289/ehp.0901731
12. Alavanja MCR, Ross MK, Bonner MR. Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. *CA Cancer J Clin*. 2013;63: 120–142. doi:10.3322/caac.21170
13. Bassil KL, Vakil C, Sanborn M, Cole DC, Kaur JS, Kerr KJ. Cancer health effects of pesticides: Systematic review. *Canadian Family Physician*. College of Family Physicians of Canada; 2007. pp. 1705–1711.
14. Parsa N. Environmental factors inducing human cancers. *Iranian Journal of Public Health*. *Iranian Journal of Public Health*; 2012. pp. 1–9.

15. Pal D, Banerjee S, Ghosh AK. Dietary-induced cancer prevention: An expanding research arena of emerging diet related to healthcare system. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications; 2012. pp. 16–24. doi:10.4103/2231-4040.93561
16. Campbell TC. Cancer Prevention and Treatment by Wholistic Nutrition. *J Nat Sci*. 2017;3.
17. Wiseman MJ. Nutrition and cancer: Prevention and survival. *Br J Nutr*. 2019;122: 481–487. doi:10.1017/S0007114518002222
18. Li L, Zhong Y, Zhang H, Yu H, Huang Y, Li Z, et al. Association between oral contraceptive use as a risk factor and triple-negative breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Mol Clin Oncol*. 2017;7: 76–80. doi:10.3892/mco.2017.1259
19. Kalimutho M, Parsons K, Mittal D, López JA, Srihari S, Khanna KK. Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer: Combating a Stubborn Disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36: 822–846. doi:10.1016/j.tips.2015.08.009
20. Cancer Registry J, Nimri Ayoub Al-Sayaideh Marwan Al-Zaghal Wafa Halasa Kamal Arqoub O, Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, et al. Triple Negative Breast Cancer – An Overview NIH Public Access. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98: 10869–74. doi:10.4172/2161-1041.S2-001.Triple
21. Anders CK, Abramson V, Tan T, Dent R. The Evolution of Triple-Negative Breast Cancer: From Biology to Novel Therapeutics. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2016;36: 34–42. doi:10.14694/edbk_159135
22. Shao F, Sun H, Deng C-X. Potential therapeutic targets of triple-negative breast cancer based on its intrinsic subtype. *Oncotarget*. 2017;8: 73329–73344. doi:10.18632/oncotarget.20274
23. Hammond MEH, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of Oncology Practice*. American Society of Clinical Oncology; 2010. pp. 195–197. doi:10.1200/JOP.777003
24. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast. *J Clin Oncol*. 2013;31: 3997–4013. doi:10.1200/JCO.2013.50.9984
25. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology*. John Wiley and Sons Ltd; 2011. pp. 5–23. doi:10.1016/j.molonc.2010.11.003
26. O’Toole SA, Beith JM, Millar EKA, West R, McLean A, Cazet A, et al. Therapeutic targets in triple negative breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*. *J Clin Pathol*; 2013. pp. 530–542. doi:10.1136/jclinpath-2012-201361
27. Chacón RD, Costanzo M V. Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*. BioMed Central Ltd.; 2010. p. S3. doi:10.1186/bcr2574
28. Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, McMichael JF, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490: 61–70. doi:10.1038/nature11412
29. Reis-Filho J, Lakhani S. Breast cancer special types: why bother? *J Pathol*. 2008;216: 394–398. doi:10.1002/path.2419

30. Perou CM, Sørile T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Resch CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406: 747–752. doi:10.1038/35021093
31. Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L. Triple-negative breast cancer: Disease entity or title of convenience? *Nature Reviews Clinical Oncology*. *Nat Rev Clin Oncol*; 2010. pp. 683–692. doi:10.1038/nrclinonc.2010.154
32. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2010;363: 1938–1948. doi:10.1056/NEJMra1001389
33. Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, Theriault RL, Edge SB, Wong YN, et al. Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer*. 2012;118: 5463–5472. doi:10.1002/cncr.27581
34. Dent R, Hanna WM, Trudeau M, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;115: 423–428. doi:10.1007/s10549-008-0086-2
35. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007;13: 4429–4434. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-3045
36. Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JGM, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res*. 2008;68: 3108–3114. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5644
37. Criscitiello C, Azim HA, Schouten PC, Linn SC, Sotiriou C. Understanding the biology of triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*. 2012;23. doi:10.1093/annonc/mds188
38. Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K, Jones C, Gillett CE, Hanby A, et al. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: Patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res*. 2007;9: R4. doi:10.1186/bcr1636
39. Lebert JM, Lester R, Powell E, Seal M, McCarthy J. Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer. *Curr Oncol*. 2018;25: S142–S150. doi:10.3747/co.25.3954
40. Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*. 1994;76: 777–779. doi:10.1016/0092-8674(94)90350-6
41. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science (80-)*. 1995;267: 1445–1449. doi:10.1126/science.7878463
42. Thompson C. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science (80-)*. 1995;267: 1456–1462. doi:10.1126/science.7878464
43. Williams GT. Programmed cell death: Apoptosis and oncogenesis. *Cell*. 1991;65: 1097–1098. doi:10.1016/0092-8674(91)90002-G
44. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon B V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer Therapy. *Cancer*. 1994;73: 2013–2026. doi:10.1002/1097-0142(19940415)73:8<2013::AID-CNCR2820730802>3.0.CO;2-J
45. Wong RSY. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. *BioMed Central*; 2011. p. 87. doi:10.1186/1756-9966-30-87
46. Verhagen AM, Kratina TK, Hawkins CJ, Silke J, Ekert PG, Vaux DL. Identification of

- mammalian mitochondrial proteins that interact with IAPs via N-terminal IAP binding motifs. *Cell Death Differ.* 2007;14: 348–357. doi:10.1038/sj.cdd.4402001
47. Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol.* 1993;67: 2168–2174. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8445726>
 48. Birnbaum MJ, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol.* 1994;68: 2521–2528. doi:10.1128/jvi.68.4.2521-2528.1994
 49. Vucic D, Fairbrother WJ. The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer. *Clinical Cancer Research.* 2007. pp. 5995–6000. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0729
 50. Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutter G, Yaraghi Z, Farahani R, et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell.* 1995;80: 167–178. doi:10.1016/0092-8674(95)90461-1
 51. Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, V. Goeddel D. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell.* 1995;83: 1243–1252. doi:10.1016/0092-8674(95)90149-3
 52. Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, et al. A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* 1996;15: 2685–94.
 53. Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, et al. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature.* 1996;379: 349–353. doi:10.1038/379349a0
 54. Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93: 4974–4978. doi:10.1073/pnas.93.10.4974
 55. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.* 1997;3: 917–921. doi:10.1038/nm0897-917
 56. Clem RJ, Duckett CS. The iap genes: Unique arbitrators of cell death. *Trends in Cell Biology.* Elsevier Ltd; 1997. pp. 337–339. doi:10.1016/S0962-8924(97)01088-X
 57. Eckelman BP, Drag M, Snipas SJ, Salvesen GS. The mechanism of peptide-binding specificity of IAP BIR domains. *Cell Death Differ.* 2008;15: 920–928. doi:10.1038/cdd.2008.6
 58. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature.* 1997;388: 300–304. doi:10.1038/40901
 59. Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 1997;16: 6914–6925. doi:10.1093/emboj/16.23.6914
 60. Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS, et al. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem.* 1998;273: 7787–7790. doi:10.1074/jbc.273.14.7787
 61. Huang Q, Deveraux QL, Maeda S, Salvesen GS, Stennicke HR, Hammock BD, et al.

- Evolutionary conservation of apoptosis mechanisms: Lepidopteran and baculoviral inhibitor of apoptosis proteins are inhibitors of mammalian caspase-9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97: 1427–1432. doi:10.1073/pnas.97.4.1427
62. Verhagen AM, Coulson EJ, Vaux DL. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol*. 2001;2: REVIEWS3009. doi:10.1186/gb-2001-2-7-reviews3009
 63. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000;102: 33–42. doi:10.1016/S0092-8674(00)00008-8
 64. Silke J, Ekert PG, Day CL, Hawkins CJ, Baca M, Chew J, et al. Direct inhibition of caspase 3 is dispensable for the anti-apoptotic activity of XIAP. *EMBO J*. 2001;20: 3114–3123. doi:10.1093/emboj/20.12.3114
 65. Budhidarmo R, Day CL. IAPs: Modular regulators of cell signalling. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;39: 80–90. doi:10.1016/j.semcdb.2014.12.002
 66. Vaux DL, Silke J. IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2005. pp. 287–297. doi:10.1038/nrm1621
 67. Bartke T, Pohl C, Pyrowolakis G, Jentsch S. Dual role of BRUCE as an antiapoptotic IAP and a chimeric E2/E3 ubiquitin ligase. *Mol Cell*. 2004;14: 801–811. doi:10.1016/j.molcel.2004.05.018
 68. Hao Y, Sekine K, Kawabata A, Nakamura H, Ishioka T, Ohata H, et al. Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function. *Nat Cell Biol*. 2004;6: 849–860. doi:10.1038/ncb1159
 69. Sekine K, Hao Y, Suzuki Y, Takahashi R, Tsuruo T, Naito M. HtrA2 cleaves Apollon and induces cell death by IAP-binding motif in Apollon-deficient cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;330: 279–285. doi:10.1016/j.bbrc.2005.02.165
 70. Qiu X-B, Markant SL, Yuan J, Goldberg AL. Nrdp1-mediated degradation of the gigantic IAP, BRUCE, is a novel pathway for triggering apoptosis. *EMBO J*. 2004;23: 800–810. doi:10.1038/sj.emboj.7600075
 71. Ren J, Shi M, Liu R, Yang QH, Johnson T, Skarnes WC, et al. The Birc6 (Bruce) gene regulates p53 and the mitochondrial pathway of apoptosis and is essential for mouse embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102: 565–570. doi:10.1073/pnas.0408744102
 72. Hauser HP, Bardroff M, Pyrowolakis G, Jentsch S. A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J Cell Biol*. 1998;141: 1415–1422. doi:10.1083/jcb.141.6.1415
 73. Pohl C, Jentsch S. Final stages of cytokinesis and midbody ring formation are controlled by BRUCE. *Cell*. 2008;132: 832–845. doi:10.1016/j.cell.2008.01.012
 74. Fulda S. Inhibitor of Apoptosis (IAP) proteins in hematological malignancies: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2014. pp. 1414–1422. doi:10.1038/leu.2014.56
 75. Ikeda F. The anti-apoptotic ubiquitin conjugating enzyme BIRC6/BRUCE regulates autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*. 2018;14: 1283–1284. doi:10.1080/15548627.2018.1471311

76. Jia R, Bonifacino JS. Negative regulation of autophagy by uba6-birc6-mediated ubiquitination of Ic3. *Elife*. 2019;8. doi:10.7554/eLife.50034
77. Marchesini A. Silenciamiento del inhibidor de apoptosis BIRC6 mediado por baculovirus con potencial terapéutico contra adenocarcinoma pulmonar. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Universidad Nacional de La Plata. 2019.
78. Koff JL, Ramachandiran S, Bernal-Mizrachi L. A time to kill: Targeting apoptosis in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2015. pp. 2942–2955. doi:10.3390/ijms16022942
79. Gyrd-Hansen M, Meier P. IAPs: From caspase inhibitors to modulators of NF-κB, inflammation and cancer. *Nature Reviews Cancer*. *Nat Rev Cancer*; 2010. pp. 561–574. doi:10.1038/nrc2889
80. Church DN, Talbot DC. Survivin in solid tumors: Rationale for development of inhibitors. *Curr Oncol Rep*. 2012;14: 120–128. doi:10.1007/s11912-012-0215-2
81. Mohamed MS, Bishr MK, Almutairi FM, Ali AG. Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. *Apoptosis*. 2017;22: 1487–1509. doi:10.1007/s10495-017-1429-4
82. Salehi S, Jafarian AH, Montazer M, Moghbeli M, Forghanifard MM. BRUCE Protein, New Marker for Targeted Therapy of Gastric Carcinoma. *J Gastrointest Cancer*. 2017;48: 151–155. doi:10.1007/s12029-016-9874-9
83. Ki WS, Choi J, Yu KH, Sang JL, Kim HJ, Soo HL, et al. Overexpression of Apollon, an antiapoptotic protein, is associated with poor prognosis in childhood de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2007;13: 5109–5114. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0693
84. Bianchini M, Levy E, Zucchini C, Pinski V, Macagno C, De Sanctis P, et al. Comparative study of gene expression by cDNA microarray in human colorectal cancer tissues and normal mucosa. *Int J Oncol*. 2006;29: 83–94. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16773188>
85. Lopergolo A, Pennati M, Gandellini P, Orloff NI, Poma P, Daidone MG, et al. Apollon gene silencing induces apoptosis in breast cancer cells through p53 stabilisation and caspase-3 activation. *Br J Cancer*. 2009;100: 739–746. doi:10.1038/sj.bjc.6604927
86. Chen Z, Naito M, Hori S, Mashima T, Yamori T, Tsuruo T. A human IAP-family gene, Apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;264: 847–854. doi:10.1006/bbrc.1999.1585
87. Low CG, Luk ISU, Lin D, Fazli L, Yang K, Xu Y, et al. BIRC6 Protein, an Inhibitor of Apoptosis: Role in Survival of Human Prostate Cancer Cells. *PLoS One*. 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0055837
88. Dong X, Lin D, Low C, Vucic EA, English JC, Yee J, et al. Elevated expression of birc6 protein in non-small-cell lung cancers is associated with cancer recurrence and chemoresistance. *J Thorac Oncol*. 2013;8: 161–170. doi:10.1097/JTO.0b013e31827d5237
89. Wang L, Chen YJ, Hou J, Wang YY, Tang WQ, Shen XZ, et al. Expression and clinical significance of BIRC6 in human epithelial ovarian cancer. *Tumor Biol*. 2014;35: 4891–4896. doi:10.1007/s13277-014-1641-6
90. Chu L, Gu J, Sun L, Qian Q, Qian C, Liu X. Oncolytic adenovirus-mediated shRNA against Apollon inhibits tumor cell growth and enhances antitumor effect of 5-fluorouracil. *Gene*

Ther. 2008;15: 484–494. doi:10.1038/gt.2008.6

91. Van Houdt WJ, Emmink BL, Pham T V., Piersma SR, Verheem A, Vries RG, et al. Comparative proteomics of colon cancer stem cells and differentiated tumor cells identifies BIRC6 as a potential therapeutic target. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10: 1–11. doi:10.1074/mcp.M111.011353
92. Ismail EAR, Mahmoud HM, Tawfik LM, Habashy DM, Adly AAM, El-Sherif NH, et al. BIRC6/Apollon gene expression in childhood acute leukemia: Impact on therapeutic response and prognosis. *Eur J Haematol*. 2012;88: 118–127. doi:10.1111/j.1600-0609.2011.01734.x
93. Lamers F, Schild L, Koster J, Speleman F, Øra I, Westerhout EM, et al. Identification of BIRC6 as a novel intervention target for neuroblastoma therapy. *BMC Cancer*. 2012;12: 285. doi:10.1186/1471-2407-12-285
94. Connolly K, Mitter R, Muir M, Jodrell D, Guichard S. Stable XIAP knockdown clones of HCT116 colon cancer cells are more sensitive to TRAIL, taxanes and irradiation in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009;64: 307–316. doi:10.1007/s00280-008-0872-x
95. Holt S V., Brookes KE, Dive C, Makin GWJ. Down-regulation of XIAP by AEG35156 in paediatric tumour cells induces apoptosis and sensitises cells to cytotoxic agents. *Oncol Rep*. 2011;25: 1177–1181. doi:10.3892/or.2011.1167
96. Scheller EL, Krebsbach PH. Gene therapy: Design and prospects for craniofacial regeneration. *Journal of Dental Research*. International Association for Dental Research; 2009. pp. 585–596. doi:10.1177/0022034509337480
97. Keeler AM, ElMallah MK, Flotte TR. *Gene Therapy 2017: Progress and Future Directions*. Clinical and Translational Science. Blackwell Publishing Ltd; 2017. pp. 242–248. doi:10.1111/cts.12466
98. Sinclair A, Islam S, Jones S. *Gene Therapy: An Overview of Approved and Pipeline Technologies*. CADTH Issues in Emerging Health Technologies. Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; 2016.
99. Gonçalves GAR, Paiva R de MA. *Gene therapy: advances, challenges and perspectives*. Einstein (Sao Paulo, Brazil). Instituto de Ensino e Pesquisa Albert Einstein; 2017. pp. 369–375. doi:10.1590/S1679-45082017RB4024
100. Wang D, Gao G. State-of-the-art human gene therapy: Part II. gene therapy strategies and clinical applications. *Discov Med*. 2014;18: 151–161.
101. Barata P, Sood AK, Hong DS. RNA-targeted therapeutics in cancer clinical trials: Current status and future directions. *Cancer Treat Rev*. 2016;50: 35–47. doi:10.1016/j.ctrv.2016.08.004
102. Bofill-De Ros X, Gu S. Guidelines for the optimal design of miRNA-based shRNAs. *Methods*. Academic Press Inc.; 2016. pp. 157–166. doi:10.1016/j.ymeth.2016.04.003
103. Liu YP, Karg M, Herrera-Carrillo E, Berkhout B. Towards Antiviral shRNAs Based on the AgoshRNA Design. Zhou X, editor. *PLoS One*. 2015;10: e0128618. doi:10.1371/journal.pone.0128618
104. Pidre ML. *Vectores baculovirales combinados: exposición superficial de antígenos y transducción de genes*. Universidad Nacional de La Plata. 2017. doi:10.35537/10915/60494

105. Lee M, Kim SW. Polyethylene glycol-conjugated copolymers for plasmid DNA delivery. *Pharmaceutical Research*. 2005. pp. 1–10. doi:10.1007/s11095-004-9003-5
106. Ramamoorth M, Narvekar A. Non viral vectors in gene therapy - An overview. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*; 2015. pp. GE01–GE06. doi:10.7860/JCDR/2015/10443.5394
107. Verma IM, Weitzman MD. GENE THERAPY: Twenty-First Century Medicine. *Annu Rev Biochem*. 2005;74: 711–738. doi:10.1146/annurev.biochem.74.050304.091637
108. Kay MA. State-of-the-art gene-based therapies: The road ahead. *Nat Rev Genet*. 2011;12: 316–328. doi:10.1038/nrg2971
109. Balakrishnan B, Jayandharan G. Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy. *Curr Gene Ther*. 2014;14: 86–100. doi:10.2174/1566523214666140302193709
110. Chang AH, Sadelain M. The genetic engineering of hematopoietic stem cells: The rise of lentiviral vectors, the conundrum of the LTR, and the promise of lineage-restricted vectors. *Molecular Therapy*. 2007. pp. 445–456. doi:10.1038/sj.mt.6300060
111. Zhang X, Godbey WT. Viral vectors for gene delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006. pp. 515–534. doi:10.1016/j.addr.2006.03.006
112. Smith AE. Viral Vectors in Gene Therapy. *Annu Rev Microbiol*. 1995;49: 807–838. doi:10.1146/annurev.mi.49.100195.004111
113. Khan TA, Sellke FW, Laham RJ. Gene therapy progress and prospects: Therapeutic angiogenesis for limb and myocardial ischemia. *Gene Therapy*. 2003. pp. 285–291. doi:10.1038/sj.gt.3301969
114. Carter BJ. Adeno-associated virus vectors in clinical trials. *Human Gene Therapy*. 2005. pp. 541–550. doi:10.1089/hum.2005.16.541
115. Volkman LE, Goldsmith PA. In Vitro Survey of Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus Interaction with Nontarget Vertebrate Host Cells. *Appl Environ Microbiol*. 1983;45: 1085–93.
116. Rothe M, Modlich U, Schambach A. Biosafety challenges for use of lentiviral vectors in gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2013;13: 453–68. doi:10.2174/15665232113136660006
117. Castro MG, Candolfi M, Wilson TJ, Calinescu A, Paran C, Kamran N, et al. Adenoviral vector-mediated gene therapy for gliomas: coming of age. *Expert Opin Biol Ther*. 2014;14: 1241–1257. doi:10.1517/14712598.2014.915307
118. Merten O-W, Schweizer M, Chahal P, Kamen AA. Manufacturing of viral vectors for gene therapy: part I. Upstream processing. *Pharm Bioprocess*. 2014;2: 183–203. doi:10.4155/pbp.14.16
119. Stanford University EH and SD. Recombinant Viral Vector Biosafety Levels. Available: <https://ehs.stanford.edu/reference/recombinant-viral-vector-biosafety-levels>
120. Rohrmann GF. *Baculovirus Molecular Biology*. 3rd, editor. 2013.
121. Ackermann HW, Smirnof WA. A morphological investigation of 23 baculoviruses. 1983.
122. Federici BA. *Ultrastructure of baculoviruses*. CRC Press; 1986.
123. Vago C, Aizawa K, Ignoffo C, Martignoni ME, Tarasevitch L, Tinsley TW. Present status of

- the nomenclature and classification of invertebrate viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1974. pp. 133–134. doi:10.1016/0022-2011(74)90175-X
124. Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, et al. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision Brief Review. *Arch Virol*. 2006;151: 1257–1266. doi:10.1007/s00705-006-0763-6
 125. Hughes KM, Addison RB. Two nuclear polyhedrosis viruses of the Douglas-fir tussock moth. *J Invertebr Pathol*. 1970;16: 196–204. doi:10.1016/0022-2011(70)90060-1
 126. Xeros N. Cytoplasmic polyhedral virus diseases [8]. *Nature*. 1952. p. 1073. doi:10.1038/1701073a0
 127. Paillot A. Sur une nouvelle maladie du noyau ou grasserie des chenilles de *P. brassicae* et un nouveau groupe de microorganismes parasites. *Compt Rend Acad Sci*. 1926; 180–182.
 128. Friesen PD, Miller LK. The regulation of baculovirus gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1986;131: 31–49. doi:10.1007/978-3-642-71589-1_3
 129. Carbonell LF, Klowden MJ, Miller LK. Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. *J Virol*. 1985;56: 153–60.
 130. Hofmann C, Sandig V, Jennings G, Rudolph M, Schlag P, Strauss M. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92: 10099–10103. doi:10.1073/pnas.92.22.10099
 131. Boyce FM, Bucher NLR. Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93: 2348–2352. doi:10.1073/pnas.93.6.2348
 132. Shoji I, Aizaki H, Tani H, Ishii K, Chiba T, Saito I, et al. Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. *J Gen Virol*. 1997;78: 2657–2664. doi:10.1099/0022-1317-78-10-2657
 133. Tani H, Limn CK, Yap CC, Onishi M, Nozaki M, Nishimune Y, et al. In Vitro and In Vivo Gene Delivery by Recombinant Baculoviruses. *J Virol*. 2003;77: 9799–9808. doi:10.1128/jvi.77.18.9799-9808.2003
 134. Tani H, Nishijima M, Ushijima H, Miyamura T, Matsuura Y. Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection. *Virology*. 2001;279: 343–353. doi:10.1006/viro.2000.0699
 135. Chuang CK, Sung LY, Hwang SM, Lo WH, Chen HC, Hu YC. Baculovirus as a new gene delivery vector for stem cell engineering and bone tissue engineering. *Gene Ther*. 2007;14: 1417–1424. doi:10.1038/sj.gt.3302996
 136. Lin CY, Chang YH, Lin KJ, Yen TC, Tai CL, Chen CY, et al. The healing of critical-sized femoral segmental bone defects in rabbits using baculovirus-engineered mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2010;31: 3222–3230. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.030
 137. Lin CY, Chang YH, Kao CY, Lu CH, Sung LY, Yen TC, et al. Augmented healing of critical-size calvarial defects by baculovirus-engineered MSCs that persistently express growth factors. *Biomaterials*. 2012;33: 3682–3692. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.02.007
 138. Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol*. 1993;67: 4566–4579. doi:10.1128/jvi.67.8.4566-4579.1993

139. Mansouri M, Berger P. Multigene delivery in mammalian cells: Recent advances and applications. *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc.; 2018. pp. 871–879. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.01.012
140. Abe T, Takahashi H, Hamazaki H, Miyano-Kurosaki N, Matsuura Y, Takaku H. Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. *J Immunol*. 2003;171: 1133–1139. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12874198>
141. Abe T, Hemmi H, Miyamoto H, Moriishi K, Tamura S, Takaku H, et al. Involvement of the Toll-Like Receptor 9 Signaling Pathway in the Induction of Innate Immunity by Baculovirus. *J Virol*. 2005;79: 2847–2858. doi:10.1128/jvi.79.5.2847-2858.2005
142. Abe T, Kaname Y, Wen X, Tani H, Moriishi K, Uematsu S, et al. Baculovirus Induces Type I Interferon Production through Toll-Like Receptor-Dependent and -Independent Pathways in a Cell-Type-Specific Manner. *J Virol*. 2009;83: 7629–7640. doi:10.1128/jvi.00679-09
143. Gronowski AM, Hilbert DM, Sheehan KCF, Garotta G, Schreiber RD. Baculovirus Stimulates Antiviral Effects in Mammalian Cells. *J Virol*. 1999;73: 9944–9951. doi:10.1128/jvi.73.12.9944-9951.1999
144. Kitajima M, Takaku H. Induction of antitumor acquired immunity by baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus infection in mice. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15: 376–378. doi:10.1128/CVI.00285-07
145. Matsuura Y, Possee RD, Overton HA, Bishop DHL. Baculovirus expression vectors: The requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *J Gen Virol*. 1987;68: 1233–1250. doi:10.1099/0022-1317-68-5-1233
146. Leisy D, Rohrmann G, Beaudreau G. The nucleotide sequence of the polyhedrin gene region from the multicapsid baculovirus of *orgyia pseudotsugata*. *Virology*. 1986;153: 280–288. doi:10.1016/0042-6822(86)90031-0
147. Leisy DJ, Rohrmann GF, Nesson M, Beaudreau GS. Nucleotide sequencing and transcriptional mapping of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus p10 gene. *Virology*. 1986;153: 157–167. doi:10.1016/0042-6822(86)90019-X
148. van Loo ND, Fortunati E, Ehlert E, Rabelink M, Grosveld F, Scholte BJ. Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *J Virol*. 2001;75: 961–970. doi:10.1128/JVI.75.2.961-970.2001
149. Duisit G, Saleun S, Douthe S, Barsoum J, Chadeuf G, Moullier P. Baculovirus vector requires electrostatic interactions including heparan sulfate for efficient gene transfer in mammalian cells. *J Gene Med*. 1: 93–102. doi:10.1002/(SICI)1521-2254(199903/04)1:2<93::AID-JGM19>3.0.CO;2-1
150. Kataoka C, Kaname Y, Taguwa S, Abe T, Fukuhara T, Tani H, et al. Baculovirus GP64-mediated entry into mammalian cells. *J Virol*. 2012;86: 2610–20. doi:10.1128/JVI.06704-11
151. Long G, Pan X, Kormelink R, Vlak JM. Functional Entry of Baculovirus into Insect and Mammalian Cells Is Dependent on Clathrin-Mediated Endocytosis. *J Virol*. 2006;80: 8830–8833. doi:10.1128/jvi.00880-06
152. Matilainen H, Rinne J, Gilbert L, Marjomaki V, Reunanen H, Oker-Blom C. Baculovirus Entry into Human Hepatoma Cells. *J Virol*. 2005;79: 15452–15459.

doi:10.1128/jvi.79.24.15452-15459.2005

153. Beck NB, Sidhu JS, Omiecinski CJ. Baculovirus vectors repress phenobarbital-mediated gene induction and stimulate cytokine expression in primary cultures of rat hepatocytes. *Gene Ther.* 2000.
154. Wang CY, Li F, Yang Y, Guo HY, Wu CX, Wang S. Recombinant baculovirus containing the Diphtheria toxin A gene for malignant glioma therapy. *Cancer Res.* 2006;66: 5798–5806. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4514
155. Balani P, Boulaire J, Zhao Y, Zeng J, Lin J, Wang S. High mobility group box2 promoter-controlled suicide gene expression enables targeted glioblastoma treatment. *Mol Ther.* 2009;17: 1003–1011. doi:10.1038/mt.2009.22
156. Gottardo MF, Pidre ML., Zuccato C, Asad AS, Imsen M, Jaita G, et al. Baculovirus-based gene silencing of Humanin for the treatment of pituitary tumors. *Apoptosis.* 2018;23: 143–151. doi:10.1007/s10495-018-1444-0
157. Je YH, Jin BR, Park HW, Roh JY, Chang JH, Seo SJ, et al. Baculovirus expression vectors that incorporate the foreign protein into viral occlusion bodies. *Biotechniques.* 2003;34: 81–87.
158. Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 2005;23: 567–575. doi:10.1038/nbt1095
159. Alonso DF, Farias EF, Urtreger A, Ladeda V, Del M, Vidal CC, et al. Characterization of F311, a Sarcomatoid Mammary Carcinoma Cell Line Originated From a Clonal Subpopulation of a Mouse Adenocarcinoma. *J Surg Oncol.* 1996.
160. Ó'Reilly D, Miller LK, Luckow VA. Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. undefined. 1992.
161. Murhammer DW, editor. *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols.* New York, NY: Springer New York; 2016. doi:10.1007/978-1-4939-3043-2
162. Goldman MJ, Craft B, Hastie M, Repečka K, McDade F, Kamath A, et al. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nature Biotechnology.* *Nature Research;* 2020. pp. 675–678. doi:10.1038/s41587-020-0546-8
163. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012;2: 401–404. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0095
164. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013;6. doi:10.1126/scisignal.2004088
165. Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, Chatila WK, Luna A, La KC, et al. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell.* 2018;173: 321-337.e10. doi:10.1016/j.cell.2018.03.035
166. Hoadley KA, Yau C, Hinoue T, Wolf DM, Lazar AJ, Drill E, et al. Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. *Cell.* 2018;173: 291-304.e6. doi:10.1016/j.cell.2018.03.022
167. Bailey MH, Tokheim C, Porta-Pardo E, Sengupta S, Bertrand D, Weerasinghe A, et al. Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell.* 2018;173: 371-385.e18. doi:10.1016/j.cell.2018.02.060

168. Grossman RL, Heath AP, Ferretti V, Varmus HE, Lowy DR, Kibbe WA, et al. Toward a Shared Vision for Cancer Genomic Data. *N Engl J Med*. 2016;375: 1109–1112. doi:10.1056/nejmp1607591
169. Pereira B, Chin SF, Rueda OM, Volland HKM, Provenzano E, Bardwell HA, et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nat Commun*. 2016;7. doi:10.1038/ncomms11479
170. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012;486: 346–352. doi:10.1038/nature10983
171. Li B, Dewey CN. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. 2011;12. doi:10.1186/1471-2105-12-323
172. Ha G, Shah S. Distinguishing somatic and germline copy number events in cancer patient DNA hybridized to whole-genome SNP genotyping arrays. *Methods Mol Biol*. 2013;973: 355–372. doi:10.1007/978-1-62703-281-0_22
173. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna Austria.: R Foundation for Statistical Computing; Vienna Austria.; 2020.
174. Boussif O, Lezoualc'H F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92: 7297–7301. doi:10.1073/pnas.92.16.7297
175. Schlaeger EJ, Christensen K. Transient gene expression in mammalian cells grown in serum-free suspension culture. *Cytotechnology*. 1999;30: 71–83. doi:10.1023/a:1008000327766
176. Baldi L, Hacker DL, Adam M, Wurm FM. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: State of the art and future perspectives. *Biotechnology Letters*. *Biotechnol Lett*; 2007. pp. 677–684. doi:10.1007/s10529-006-9297-y
177. Hanzlíková M, Ruponen M, Galli E, Raasmaja A, Aseyev V, Tenhu H, et al. Mechanisms of polyethylenimine-mediated DNA delivery: free carrier helps to overcome the barrier of cell-surface glycosaminoglycans. *J Gene Med*. 2011;13: 402–409. doi:10.1002/jgm.1587
178. Xie Q, Xinyong G, Xianjin C, Yayu W. PEI/DNA formation affects transient gene expression in suspension Chinese hamster ovary cells via a one-step transfection process. *Cytotechnology*. 2013;65: 263–271. doi:10.1007/s10616-012-9483-9
179. Han X, Fang Q, Yao F, Wang X, Wang J, Yang S, et al. The heterogeneous nature of polyethylenimine-DNA complex formation affects transient gene expression. *Cytotechnology*. 2009;60: 63–75. doi:10.1007/s10616-009-9215-y
180. Al jarroudi O, Zaimi A, Brahmi SA, Afqir S. Nottingham prognostic index is an applicable prognostic tool in non-metastatic triple-negative breast cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2019;20: 59–63. doi:10.31557/APJCP.2019.20.1.59
181. Ono C, Okamoto T, Abe T, Matsuura Y. Baculovirus as a Tool for Gene Delivery and Gene Therapy. *Viruses*. 2018;10. doi:10.3390/v10090510

182. Spoden GA, Besold K, Krauter S, Plachter B, Hanik N, Kilbinger AFM, et al. Polyethylenimine is a strong inhibitor of human papillomavirus and cytomegalovirus infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56: 75–82. doi:10.1128/AAC.05147-11
183. Qiu XB, Goldberg AL. The membrane-associated inhibitor of apoptosis protein, BRUCE/Apollon, antagonizes both the precursor and mature forms of smac and caspase-9. *J Biol Chem.* 2005;280: 174–182. doi:10.1074/jbc.M411430200
184. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A target for anticancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG; 2018. doi:10.3390/ijms19020448
185. Cooper GM. *The Development and Causes of Cancer.* 2000.
186. Garona J, Pifano M, Pastroian MB, Daniel •, Gomez E, Ripoll G V, et al. Addition of vasopressin synthetic analogue [V 4 Q 5]dDAVP to standard chemotherapy enhances tumour growth inhibition and impairs metastatic spread in aggressive breast tumour models PKA cAMP-dependent protein kinase Author’s personal copy PR Progesterone. *Clin Exp Metastasis.* 2016. doi:10.1007/s10585-016-9799-5
187. Ripoll G, Giron S, Krzymuski M, Hermo G, Gomez D, Alonso D. Antitumor effects of desmopressin in combination with chemotherapeutic agents in a mouse model of breast cancer. *Anticancer Res.* 2008;28: 2607–2611.
188. Shao X, Lv N, Liao J, Long J, Xue R, Ai N, et al. Copy number variation is highly correlated with differential gene expression: a pan-cancer study. *BMC Med Genet.* 2019;20: 175. doi:10.1186/s12881-019-0909-5
189. Dawson SJ, Provenzano E, Caldas C. Triple negative breast cancers: Clinical and prognostic implications. *Eur J Cancer.* 2009;45: 27–40. doi:10.1016/S0959-8049(09)70013-9
190. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490: 61–70.
191. Hu T, Weng S, Tang W, Xe R, Chen S, Cai G, et al. Overexpression of BIRC6 is a predictor of prognosis for colorectal cancer. *PLoS One.* 2015;10. doi:10.1371/journal.pone.0125281
192. Iris Luk SU, Xue H, Cheng H, Lin D, Gout PW, Fazli L, et al. The BIRC6 gene as a novel target for therapy of prostate cancer: Dual targeting of inhibitors of apoptosis. *Oncotarget.* 2014;5: 6896–6908. doi:10.18632/oncotarget.2229
193. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: The role of histological grade. *Breast Cancer Research.* BioMed Central; 2010. p. 207. doi:10.1186/bcr2607
194. Lee AHS, Ellis IO. The Nottingham prognostic index for invasive carcinoma of the breast. *Pathology and Oncology Research.* Pathol Oncol Res; 2008. pp. 113–115. doi:10.1007/s12253-008-9067-3