

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN IN VITRO DE UN ADENOVIRUS REPLICATIVO CONDICIONAL QUE EXPRESA LAS PROTEÍNAS VIRALES E1A Y E1B

**De Grand Martín, Constanza
De Ramoa, Úrsula Lea**

Tutora:
Dra. María Verónica López

Lugar de trabajo: Laboratorio de Terapia Molecular y Celular, Fundación
Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina.

Diciembre 18, 2013



UADE

UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

*“Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las estrellas.
Ahora sabemos que está en nuestros genes.”*

JAMES WATSON

Agradecimientos

Queremos agradecer de manera especial a la Dra. María Verónica López quien nos guió en este proyecto, a la Fundación Instituto Leloir por abrirnos las puertas, y a la Licenciada Mariela Gangemi junto con el resto de las personas del Laboratorio de Terapia Molecular y Celular por su ayuda.

Resumen

CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE UN ADENOVIRUS REPLICATIVO CONDICIONAL QUE EXPRESE LAS PROTEÍNAS VIRALES E1A Y E1B

En los últimos años la terapia génica ha demostrado ser una herramienta prometedora para el tratamiento del cáncer. Los adenovirus de replicación condicional (CRAds) surgieron como alternativa para el tratamiento específico de este tipo de enfermedades. Una de las maneras de restringir la replicación viral a células cancerosas es a través del uso de promotores específicos que se encuentran activos en las células blanco. Los genes virales tempranos E1A y E1B son requeridos para la correcta replicación viral. La proteína E1A se une a reguladores de la transcripción celular y de esta manera activa y aumenta la transcripción de los genes virales tardíos. Por otro lado, la proteína E1B permite aumentar los niveles de la replicación viral al evitar la apoptosis o el arresto del ciclo celular. En el presente proyecto final de ingeniería se pretendió construir un CRAd que posee los genes E1A y E1B bajo la regulación del promotor de la glucoproteína SPARC. Se utilizó este promotor debido a que la glucoproteína SPARC se encuentra expresada en forma elevada en células tumorales como del estroma de diversos tipos de tumores.

Palabras clave: Cáncer, terapia génica, Adenovirus, CRAd, promotor, E1A, E1B

Abstract

CONSTRUCTION AND *IN VITRO* CHARACTERIZATION OF A CONDITIONALLY REPLICATIVE ADENOVIRUS WHICH EXPRESSES THE VIRAL PROTEINS E1A AND E1B

In the last years, gene therapy has been shown to be a promising tool for the treatment of cancer. Conditionally Replicative Adenoviruses (CRAds) emerged as an alternative for the specific treatment of this kind of illnesses. One way to restrict the viral replication to cancer cells is by using specific promoters that are active in target cells. The early viral genes E1A and E1B are required for the successful viral replication. E1A protein binds to transcriptional factors activating and enhancing the late viral genes transcription. On the other hand, E1B protein allows higher replication rates by preventing apoptosis or cell-cycle arrest. In this engineering final project we tried to build a CRAd in which E1A and E1B genes are under the control of SPARC glycoprotein promoter. We decided to use this promoter because SPARC glycoprotein is overexpressed in both tumor and stroma cells.

Key words: Cancer, gene therapy, adenovirus, CRAd, promoter, E1A, E1B

Tabla de contenidos

INTRODUCCIÓN	8
I. Cáncer	9
II. Terapia génica.....	11
III. Adenovirus.....	14
1. Estructura.....	14
2. Entrada celular	16
3. Organización del genoma y replicación	17
a. Región temprana E1A.....	18
b. Región temprana E1B.....	21
c. Replicación del genoma viral	22
d. MLP (promotor mayor tardío) y la activación de los genes tardíos.....	23
IV. Vectores recombinantes adenovirales.....	25
1. Vectores recombinantes no replicativos	25
2. Virus de replicación condicional	27
a. Ventajas del agregado del gen E1B	28
V. Estroma del tumor.....	29
OBJETIVOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS	33
a. Plásmidos.....	34
b. Líneas celulares	34
c. Bacterias	34
d. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	35
e. Digestión con enzimas de restricción.....	35
f. Preparación de plásmidos	
1. Preparación de pequeña escala	36
2. Preparación de mediana escala.....	37
g. Purificación de fragmentos de ADN y cuantificación.....	37
h. Ligaciones	37

i. Secuenciación de ADN	38
j. Ensayo de muerte celular	38
k. Efecto citopático en monocapa.....	38
l. Análisis bioinformático	39
m. Análisis bioestadístico	39
n. Estrategia de clonado.....	39
RESULTADOS	46
I. Clonado del gen viral E1B en el vector TOPO-TA.....	47
II. Agregado de la señal de poliadenilación al gen E1B	50
III. Generación del vector pShuttle-I-F512-E1ARb-E1BpolyA	54
IV. Ensamblado del genoma viral pVK500C-I-F512-E1ARb-E1BpolyA	57
V. Transfección de células 911 para la obtención de la partícula viral y verificación del ensamblado del genoma viral	64
VI. Caracterización <i>in vitro</i>	65
VII. Evaluación de los costos de la investigación.....	67
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	68
I. Discusión	69
II. Conclusiones	72
REFERENCIAS	73
ANEXO	80
I. Análisis de la secuencia	81
II. Evaluación de los costos de la investigación.....	84



INTRODUCCIÓN

I. Cáncer

Cáncer es el nombre general para un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado y la propagación de células anormales (American Cancer Society, 2013); se produce debido a fallas en los mecanismos que controlan el crecimiento y la proliferación celular (Lodish *et al*, 2006) (Figura I.1).

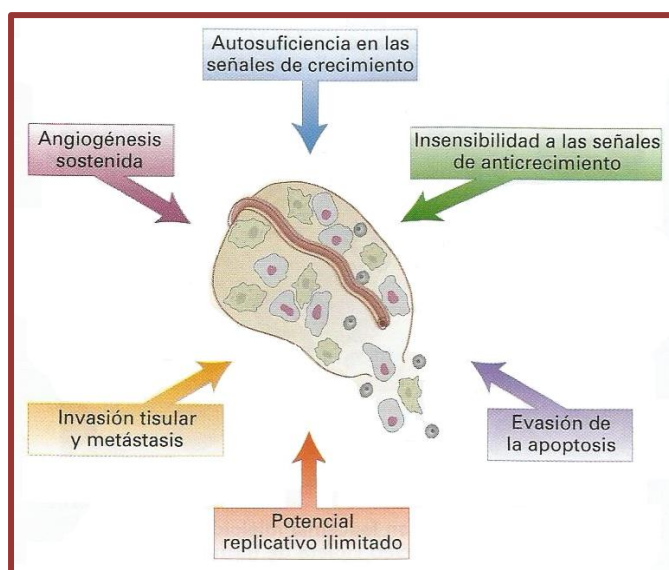


Figura I.1 - Generalidades de los cambios en las células que causan cáncer. Como se muestra aquí, durante la carcinogénesis se pueden alterar seis propiedades celulares fundamentales para dar origen al cáncer. Estas propiedades celulares alteradas se originan por cambios genéticos (Figura adaptada de Lodish *et al*, 2006).

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en 2008 causó 7,6 millones de defunciones (aproximadamente un 13% del total). Los tipos de cáncer más frecuentes son diferentes en el hombre y en la mujer (Figura I.2). Aproximadamente un 70% de las muertes por cáncer registradas en 2008 se produjeron en países de ingresos bajos y medios. Se prevé que las muertes por cáncer sigan aumentando en todo el mundo y alcancen la cifra de 13,1 millones en 2030 (Organización Mundial de la Salud, 2013).

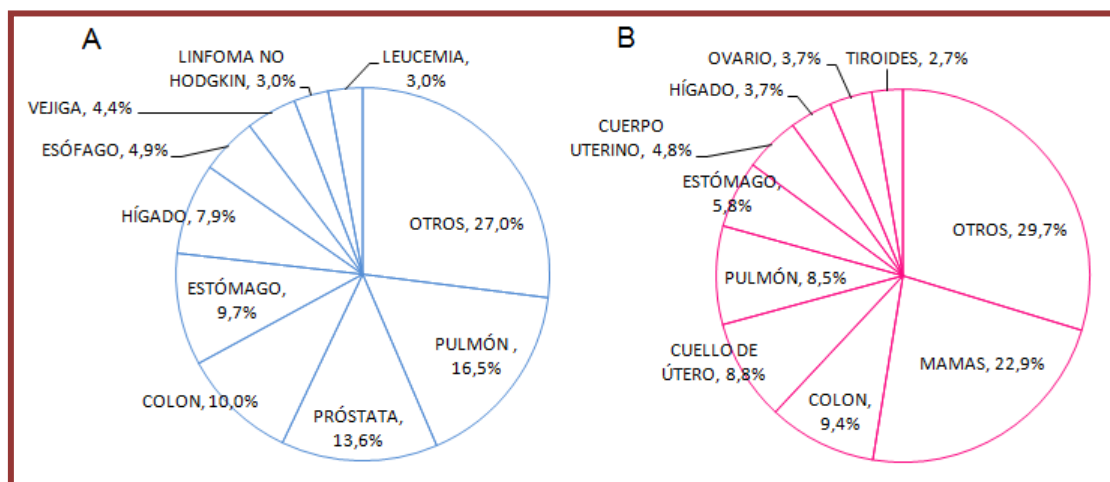


Figura I.2 - Tipos de cáncer que afectan con más frecuencia a hombres (A) y mujeres (B). Cada porcentaje mostrado en la figura corresponde a la relación entre la incidencia de un tipo de cáncer y el número total de casos nuevos de cualquier tipo de cáncer, a nivel mundial durante 2008. (GLOBOCAN, 2008).

Los últimos estudios indican que en Argentina existe una incidencia de 206 casos nuevos de cáncer por año cada 100.000 habitantes, estimación que corresponde para ambos sexos. Este dato determina que, en relación al resto del mundo, la Argentina se encuentra en un nivel medio-alto de incidencia de cáncer (Instituto Nacional del Cáncer, 2013).

Las pérdidas de regulación que dan origen a la mayoría o todos los casos de cáncer se deben a daños genéticos. En la aparición del cáncer se han implicado mutaciones en dos amplias clases de genes: los protooncogenes y los genes supresores de tumores. Los protooncogenes son activados para volverse oncogenes mediante mutaciones que los hacen excesivamente activos en la promoción del crecimiento. Los genes supresores de tumores normalmente restringen el crecimiento, por lo que si se dañan se produce un crecimiento inapropiado (Lodish *et al*, 2006).

Las células cancerosas pueden invadir tejidos circundantes, atravesando la lámina basal que define los límites de los tejidos y diseminándose a través del sistema circulatorio para establecer áreas secundarias de crecimiento, proceso conocido como metástasis. Para compensar el aumento de las demandas metabólicas relacionadas con la división celular incontrolada, las células de los tumores primarios y secundarios sintetizan proteínas

proangiogénicas, que dirigen la construcción de nuevos vasos sanguíneos (Langley & Fidler, 2011).

La aparición y el desarrollo del cáncer dependen de la interacción entre la genética del individuo y el medio ambiente. Las posibles causas del cáncer incluyen factores genéticos, factores del estilo de vida como el tabaquismo, la dieta y la actividad física, ciertos tipos de infecciones, y la exposición ambiental a diferentes tipos de productos químicos y de radiación (American Cancer Society, 2013). Estos factores causales pueden actuar juntos o de forma secuencial para iniciar o promover el desarrollo del cáncer.

Si el cáncer no es tratado puede enfermar gravemente e incluso causar la muerte de quien lo padece. Las terapias para tratar el cáncer buscan eliminar los tumores existentes y las células cancerígenas en su totalidad para prevenir la aparición de nuevos tumores. El tratamiento convencional del cáncer se basa en el empleo aislado o en combinación de cirugía, radioterapia y quimioterapia; y en algunos tumores concretos, de tratamientos hormonales e inmunológicos (Muñoz *et al*, 2003). La falta de especificidad de estas prácticas produce en los pacientes la aparición de efectos secundarios adversos que repercuten en su calidad de vida y en su mejoría. Para superar estos inconvenientes se comenzaron a investigar y desarrollar nuevas terapias que actúen únicamente sobre el tejido tumoral.

II. Terapia génica

La terapia génica se define como la introducción o alteración del material genético dentro de una célula u organismo con la intención de tratar o curar una enfermedad. (American Society of Cell & Gene Therapy, 2011). Dicha información genética foránea puede restaurar o complementar funciones defectuosas o, alternativamente, interferir con la expresión de una función genética mutante (Roemer & Friedmann, 1992). Si bien la terapia génica se pensó inicialmente como medio para corregir defectos en genes individuales, los ensayos clínicos muestran que, en los últimos años, su aplicación más importante fue como terapia para el tratamiento del cáncer (Gene Therapy Clinical Trials Worldwide, 2013).

Existen dos modalidades para la introducción de los transgenes en las células diana. El material genético extraño puede ser introducido directamente en el tejido apropiado *in vivo*, o primero puede ser introducido en las células adecuadas *ex vivo* que posteriormente se injertan

en un sitio fisiológicamente relevante del organismo (Roemer & Friedmann, 1992) (Figura II.1).

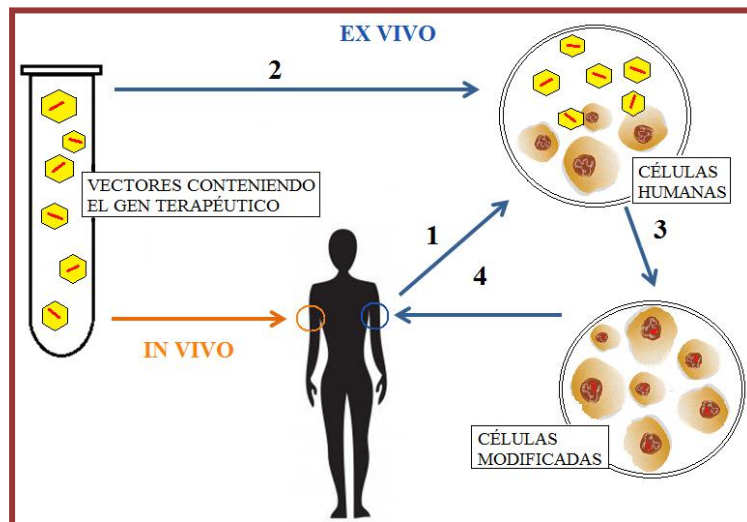


Figura II.1 - Modalidades de Terapia Génica. En la terapia *in vivo* el gen terapéutico es administrado directamente al paciente utilizando un vector de transferencia. En la terapia *ex vivo*, las células son extraídas del paciente (1), son modificadas fuera del organismo por introducción del transgen mediante transducción (2) y, más tarde, las células alteradas (3) son reintroducidas en la persona a tratar (4).

La terapia génica busca la introducción de genes terapéuticos en las células diana, dando lugar a la expresión eficaz y estable de las moléculas terapéuticas y reduciendo al mínimo los efectos secundarios adversos. Esto se puede lograr usando vectores virales y no virales. Los parámetros más importantes a considerar para elegir un vector de terapia génica incluyen: las limitaciones de tamaño para la inclusión de transgenes, la pureza y el título del vector, la eficacia de transducción, la capacidad para infectar células en división y/o en reposo, la expresión a largo plazo de los transgenes, la integración en el genoma del huésped, la necesidad de especificidad de tipo celular o de administración dirigida, la toxicidad asociada a los vectores y la inmunogenicidad (Goverdhana, 2005).

El sistema de transferencia génica no viral más simple es la inyección de ADN plasmídico desnudo. Sin embargo, debido a la rápida degradación por las nucleasas presentes en el suero y el aclaramiento por el sistema de fagocitos mononucleares, la eficiencia de transfección es generalmente baja (Niidome & Huang, 2002). La mayoría de los sistemas de vectores no virales utilizan lípidos catiónicos, polímeros o ambos como portadores. En estos sistemas el ADN cargado negativamente es fuertemente atraído por el lípido o polímero, y

esta interacción provoca la condensación del ADN (Goverdhana, 2005). Se generan de esta manera complejos con carga neta positiva que se pueden asociar con la superficie de la célula que se encuentra cargada negativamente (Felgner, 1987). Como estos complejos son electrostáticamente, pero no específicamente, atraídos por las membranas celulares, la especificidad de estos vehículos es baja (Goverdhana, 2005).

Actualmente, los vectores más utilizados son virus modificados genéticamente para portar el gen terapéutico. Los virus pueden entrar fácilmente en las células y entregan su material genético en el núcleo de las células diana, por lo tanto, en la mayoría de los casos son más eficientes que los sistemas de suministro no virales. La mayoría de los vectores utilizados para la entrega de genes se derivan de patógenos virales humanos que se han hecho no patógenos mediante la supresión de los genes virales esenciales. Por lo general tienen un amplio tropismo, por lo que pueden infectar y entregar sus transgenes codificados a un amplio espectro de células y/o tejidos (Goverdhana *et al*, 2005). Los vectores virales más comúnmente usados para la terapia génica son:

- Adenovirus: son una familia de virus de ADN que se caracterizan por una cápside que contiene un genoma de ADN de doble cadena lineal de 36 Kb. La infección por adenovirus se inicia cuando la proteína de la fibra se une al receptor CAR en la superficie celular. Una vez dentro de la célula, el virión se desmonta, el ADN viral se libera en el núcleo y se mantiene como un episoma (Goverdhana *et al*, 2005).
- Virus adeno-asociado: son parvovirus de ADN lineal de simple cadena. Por lo general, permanecen dentro de los tejidos diana como entidades episomales, aunque se ha demostrado que también pueden integrarse en el genoma de la célula huésped (Goverdhana, 2005). Para poder replicarse en cultivos celulares necesitan de la presencia de un virus de apoyo. Se ha verificado que pueden integrar su material genético en un sitio específico del cromosoma 19 humano (Kotin *et al*, 1990).
- Retrovirus y lentivirus: los vectores derivados de retrovirus y de lentivirus constituyen un grupo de vectores virales de ARN que se pueden integrar en el genoma celular del huésped. Esta capacidad de integración en el ADN del huésped hace que estos vectores sean una opción atractiva para aplicaciones en terapia génica. Una vez que el vector se integra, el transgen de interés se copiará durante la replicación del ADN de

la célula huésped, lo que permite su expresión. Sin embargo, se han documentado casos en los que la expresión del transgen fue silenciada gradualmente con el tiempo. Mientras que los retrovirus pueden infectar sólo células en división, los lentivirus infectan tanto las células que están en división como aquellas que no lo están. Una de las desventajas del uso de estos vectores es que la integración se produce en un sitio al azar, pudiendo esto tener efectos secundarios adversos como la activación de oncogenes, la inactivación de un gen supresor de tumores, o mutagénesis de inserción, lo que puede llevar a la transformación oncogénica de las células diana (Goverdhana *et al*, 2005).

- Virus herpes simplex tipo 1 (VHS-1): son virus con ADN de doble cadena. Las características típicas de los virus del herpes simplex son el gran tamaño de su genoma (152 Kb), su neurotropismo y la fase latente del ciclo de vida, lo que significa que el genoma viral se mantiene en forma de episoma en el núcleo de la célula durante el tiempo de vida del organismo huésped (Lundstrom, 2003). La capacidad de estos virus de establecer una infección latente dentro de las neuronas ha conducido a un interés en su uso como un vector de suministro de genes neuronales (Lachmann & Efstathiou, 1999).

En este proyecto se utilizará como vector de transferencia génica al adenovirus y en las siguientes secciones se procederá a describir su biología, estructura y los vectores recombinantes adenovirales.

III. Adenovirus

1. Estructura

El adenovirus (Figura III.1) es un virus sin envoltura que, de acuerdo a la clasificación de Baltimore, pertenece a la clase I por poseer ADN lineal de doble cadena. Su peso molecular es de ~150 MDa y su diámetro es de ~95 nm, sin incluir sus fibras salientes. Su genoma, de ~36 Kb, codifica más de 40 proteínas diferentes; sin embargo se ha demostrado que sólo 12 de ellas son constitutivas de la partícula viral. El adenovirus está compuesto por dos elementos estructurales principales, la cápside externa y el núcleo (core). La cápside tiene simetría icosaédrica y está formada por

uniones no covalentes entre las proteínas II, III, IIIa, IV, VI, VIII y IX. En el core, el genoma está condensado y asociado con las proteínas V, VII y X (o mu) y los extremos 5' terminal del ADN están covalentemente unidos a la proteína terminal (TP) (Smith *et al*, 2010). Además de los componentes de la cápside y del core, dentro de la partícula viral son incorporadas aproximadamente 10 copias de una cisteína-proteasa adenoviral, que juega un rol importante en la maduración del virus y su entrada a la célula.

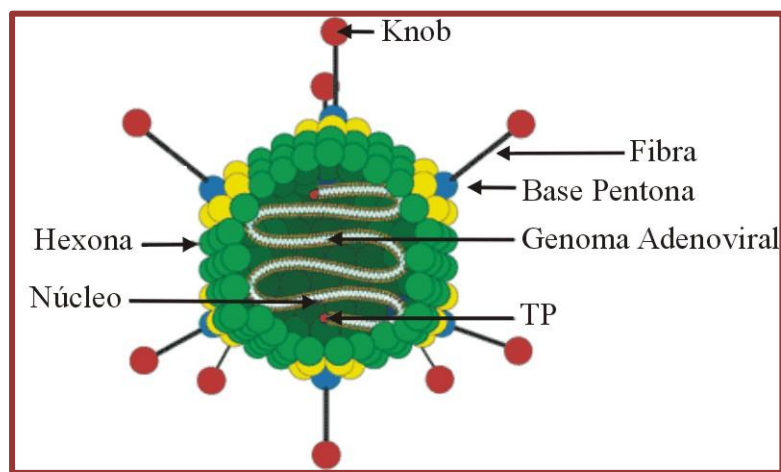


Figura III.1 - Estructura de la partícula viral- (Figura adaptada de Hakkarainen & Hemminki, 2005)

El polipéptido II al trimerizarse forma el capsómero, componente principal de la cápside (también conocido como hexón, por estar unido a otras 6 moléculas vecinas). En los vértices de la cápside icosaédrica todos los adenovirus poseen un complejo pentón (llamado así por estar unido a 5 hexonas), el cual está formado por la base pentona y por la fibra. La base pentona es un homo-pentámero del polipéptido III; esta estructura posee la secuencia conservada RGD (Arg-Gly-Asp) utilizada para la interacción con integrinas αV . La fibra está formada por un trímero de polipéptido IV. En su estructura se distinguen tres segmentos principales: la cola N-terminal, el eje central y el dominio C-terminal, que forma el pomo (knob) distal. El knob en la mayoría de los serotipos tiene alta afinidad por el receptor celular CAR (Coxsackie and adenovirus receptor). El resto de las proteínas constituyentes de la cápside ayudan a su estabilización. Adicionalmente, el extremo C-terminal clivado del polipéptido VI es un cofactor de la proteasa viral (Stewart, 2002).

2. Entrada celular

En la mayoría de los Adenovirus el receptor celular CAR media la adhesión del virus a la célula para luego facilitar su entrada. CAR es una proteína transmembrana miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas que se expresa en el área basolateral de las células epiteliales polarizadas justo por debajo de las uniones estrechas. Las uniones a CAR ocurren en las superficies laterales del dominio knob de la fibra, existiendo asociación multivalente. Estas uniones se ven facilitadas por la flexibilidad que confiere el dominio eje a la fibra. El dominio intracelular de CAR no aparenta estar involucrado en la infección adenoviral. Hay evidencia de la existencia de otras interacciones moleculares que median la unión, como por ejemplo CD46, ácido salicílico y algunos GAG's (Smith et al, 2010).

Poco tiempo luego de la unión a receptores de la superficie celular, el adenovirus es internalizado por la célula en un compartimiento endosomal. Las integrinas son proteínas heterodiméricas conformadas por las subunidades α y β unidas de manera no covalente, que reconocen el motivo RGD presente en diversas proteínas de matriz extracelular y también en el complejo pentón. La asociación de múltiples integrinas $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ al complejo pentón es la responsable de desencadenar la señalización que culmina con la internalización del virus. Dicha asociación induce la activación de múltiples moléculas de señalización intracelular, incluyendo la quinasa fofatidilinositol 3-OH (PI3K), p130CAS, y la familia Rho de GTPasa pequeñas. Estas moléculas inducen la polimerización de los filamentos de actina, proceso requerido para la internalización del virus dentro de vesículas recubiertas de clatrina (Smith *et al*, 2010).

El compartimiento endosomal en el que se internalizó el adenovirus es luego permeabilizado; en su interior los vértices del virus son disociados (Smith *et al*, 2010) y el escape del resto de la partícula viral hacia el citoplasma celular es facilitado por la cola de la subunidad $\beta 5$ de la integrina (Stewart, 2002).

El destino final del genoma viral es el núcleo. Luego de la traslocación a lo largo de los microtúbulos utilizando un mecanismo dependiente de dineína, el adenovirus se asocia al complejo del poro nuclear. Allí el virus sufre una mayor pérdida de la cápside proteica y el genoma viral es traslocado dentro del núcleo (Smith *et al*, 2010) (Figura III. 2).

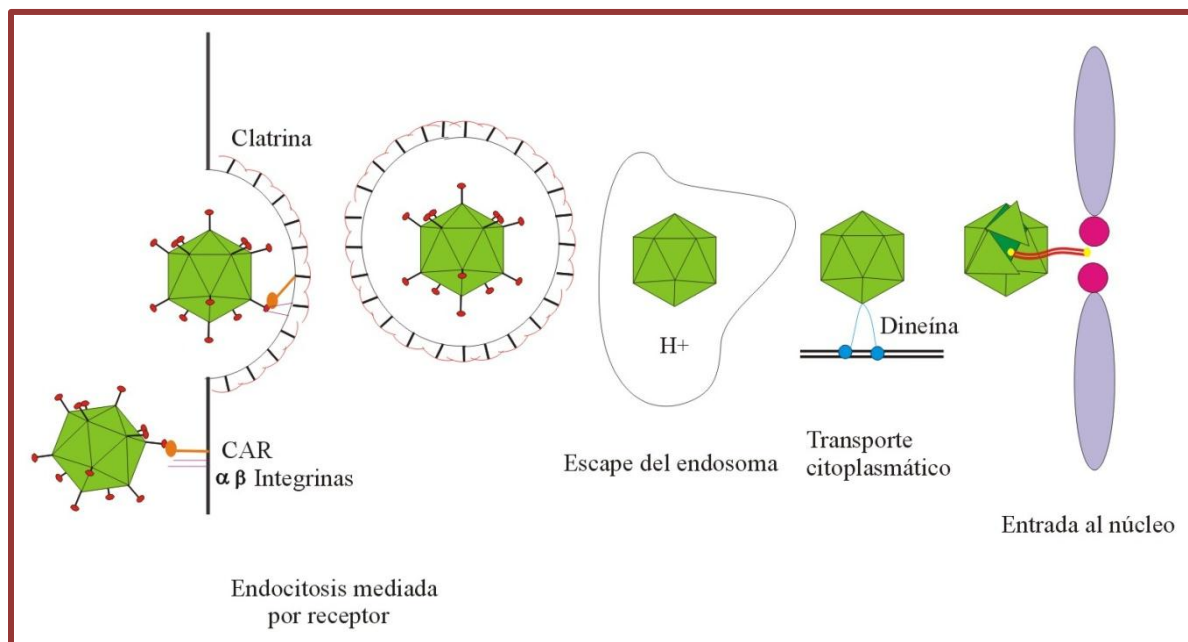


Figura III.2 - Entrada celular- Adhesión mediada por CAR, endocitosis mediada por clatrina, liberación del endosoma (la disminución del pH no está demostrada que sea necesaria *in vivo*), transporte por microtúbulos mediado por dineína y entrada al núcleo a través del poro nuclear (Figura adaptada de Berk, 2007).

Dentro del núcleo, el genoma viral se posiciona de manera adyacente a determinadas estructuras nucleares mediante unión de la TP a la matriz nuclear. Se piensa que esta unión posiciona el genoma de manera tal que permite la expresión de los genes tempranos y la replicación del ADN viral (Evans & Hearing, 2010).

3. Organización del genoma y replicación

El genoma del adenovirus posee un solo cromosoma y sus genes se encuentran organizados de manera tal que producen un gran número de proteínas necesarias para la propagación utilizando un espacio genético limitado. Los orígenes de replicación se encuentran en las primeras 50 pb de las repeticiones terminales invertidas (ITRs). La

naturaleza invertida de estos ITRs juega un rol fundamental en la replicación del ADN. Una secuencia de activación del empaquetamiento en *cis* (ψ) se encuentra en el extremo izquierdo del genoma y dirige la encapsidación polar del ADN dentro de la cápside. El genoma adenoviral contiene una región temprana inmediata (E1A), cuatro unidades transcripcionales tempranas (E1B, E2, E3 y E4), dos unidades retrasadas (IX y IVa2), y una unidad tardía que produce cinco familias de ARNs mensajeros (L1 a L5) (Figura III.3). Todas las unidades transcripcionales utilizan la ARN polimerasa II para su transcripción. El genoma viral también contiene genes que codifican para los ARN no codificantes VAI y VAII los cuales son transcritos por la ARN polimerasa III (Evans & Hearing, 2002).

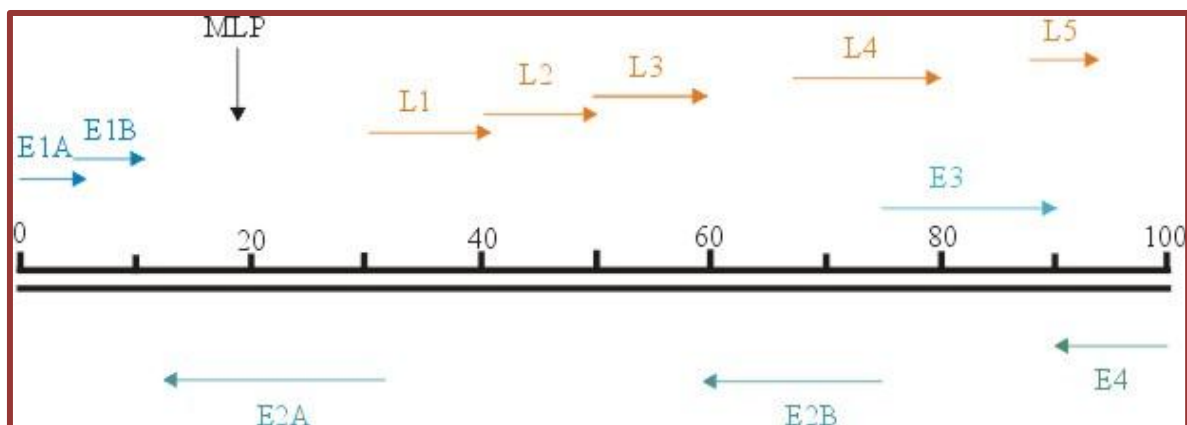


Figura III.3 - Genoma del adenovirus- El genoma posee aprox. 36 Kb, los números de 0 a 100 presentes en la figura son unidades relativas del mapa. Se encuentra anotados los productos de transcripción (Figura adaptada de Russell, 2000).

a. Región temprana E1A

Es la primera unidad transcripcional en ser expresada luego de que el cromosoma viral alcance el núcleo. Está controlada por un elemento de regulación constitutivo. Esta región genera dos transcritos en la etapa temprana de la infección y tres más en etapas tardías debido al corte y empalme alternativo (en inglés *splicing*), los cuales parecen no presentar una función diferente a las primeras (Figura III.4). Los primeros polipéptidos, llamados proteínas E1A grande y pequeña, de 289 y 243 residuos, poseen cinco dominios conservados denominados región N-terminal, CR1, CR2, CR3 y CR4, con excepción de CR3 que no está presente en la especie de menor

tamaño de E1A (Figura III.5). Las proteínas de E1A no se unen al ADN, pero si lo hacen a factores de transcripción y proteínas reguladoras aumentando la tasa de transcripción. Al poder activar genes en *trans*, usualmente estas proteínas E1A son conocidas como *trans-activadores*.

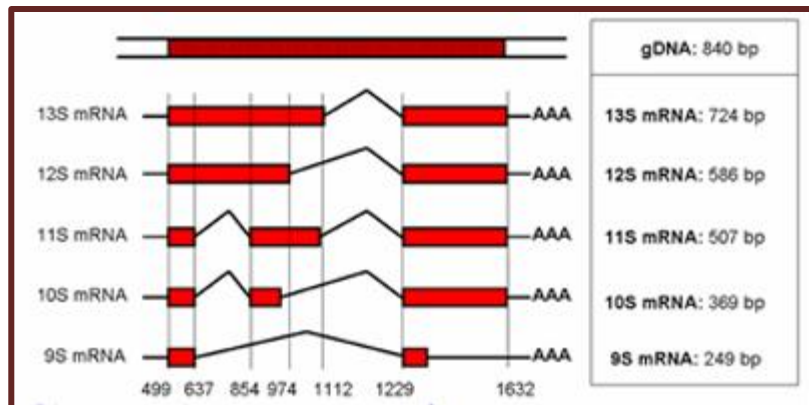


Figura III.4-Patrones de corte y empalme del gen E1A del Ad5-Los exones se representan como rectángulos rojos, los intrones como líneas negras, y la señal de poliadenilación se muestra como "AAA". Las posiciones de los exones e intrones correspondientes a sus ubicaciones en el ADN genómico de Ad5 están indicadas por debajo de los rectángulos rojos (Figura adaptada de NorgenBiotecCorp, 2013).

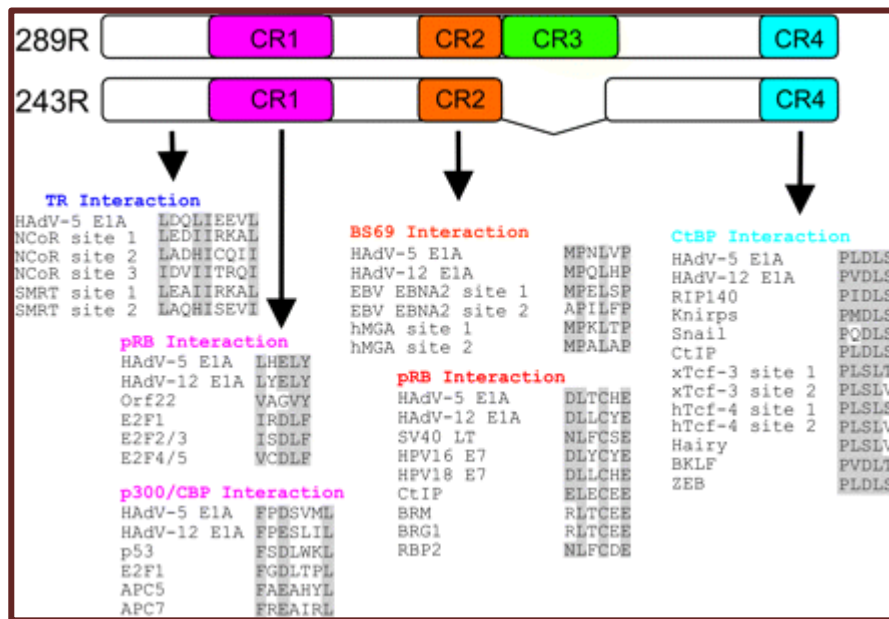


Figura III.5-Mapa de E1A y sus regiones conservadas- El transcrito primario del gen E1A del Ad5 sufre *splicing* alternativo para producir dos ARNm que codifican dos proteínas de 289 y 243 residuos. El análisis comparativo de las secuencias de las proteínas E1A de diferentes serotipos de adenovirus humano identificó regiones de conservación (CR1 a CR4), que se indican por las áreas de color. Se muestran algunos motivos de interacción encontrados dentro de E1A (Pelka *et al*, 2008).

La proteína E1A de 289 residuos es responsable, mediante su dominio CR3 al cual se le unen diferentes factores de transcripción, de activar los promotores virales tempranos. Estos promotores poseen sitios de unión de factores activadores de la transcripción celular río arriba de su caja TATA. La proteína E1A de 243 residuos activa la transcripción específicamente del promotor temprano E2 que contiene dos sitios invertidos de unión a E2F.

E2F pertenece a una familia de factores celulares esenciales del ciclo celular y éstos son modulados por la familia de proteínas retinoblastoma que cuando se encuentran unidas previenen la entrada a la fase S del ciclo celular. Las proteínas E1A se unen a las proteínas de la familia retinoblastoma mediante CR1 y CR2, impidiendo su unión a E2F, el cual queda libre y genera una activación constitutiva a partir de los sitios de unión a E2F en los promotores tempranos del virus y también activa promotores celulares. Además la familia retinoblastoma es hiperfosforilada en presencia de proteínas E1A debido a que éstas bloquean la acción de inhibidores de

CDK y por lo tanto no pueden inhibir la activación de E2F. Otra de las funciones asociadas a la acción de las regiones N-terminal y CR1 es la de unirse a diversos complejos proteicos modeladores de la estructura de la cromatina, lo que favorece la transcripción (Wong et al, 2010).

b. Región temprana E1B

E1B está comprendida entre 1714-3509 pb del genoma en el Ad5. Codifica dos proteínas E1B 19k y E1B 55k.

E1B 19k tiene una función homóloga a Bcl-2 y puede unirse a Bax (Wong *et al*, 2010), una proteína citosólica proapoptótica. La unión de Bax a Bak y su oligomerización sobre la cara citosólica de la membrana externa de la mitocondria genera poros que permiten la liberación de citocromo c y otras proteínas que inducen la vía intrínseca de la apoptosis (Alberts *et al*, 2010). Cuando E1B 19k bloquea a Bax, se inactiva la vía apoptótica.

E1B 55k está involucrada en la inhibición de p53, el transporte de ARNm viral y el bloqueo del ARNm celular.

E1B 55k interactúa con E4orf6 (viral) y proteínas celulares para formar un complejo E3 ubiquitina ligasa que marca a p53 para su degradación en el proteosoma. Otro sustrato de este complejo es el complejo MRN que está implicado en la reparación de ADN por ruptura de la doble cadena. La actividad de MRN en ausencia de E4orf6 deberá ser inhibida por el virus ya que puede generar concatómeros mal orientados. E1B 55k produce inducción de agresomas que no sólo generan el secuestro y degradación de p53 sino que además aumentan la degradación de MNR.

En ausencia de la expresión de E4orf6, E1B 55k inhibe la activación de la transcripción mediada por p53. E1B 55k se une con gran afinidad y especificidad a p53, estabilizándola y aumentando su concentración. Esta unión se genera en un dominio de represión, por lo que transforma a p53 en un represor de los genes que activa. Además de éste, existen por lo menos dos mecanismos más de represión sobre p53 y ambos involucran la acetilación y deacetilación de las histonas.

Es posible que otro sustrato del complejo E1B 55k/E4orf6 sea mRNP, proteína que está involucrada en el transporte y la regulación de la traducción. Esta interacción degrada mRNP estimulando así la exportación y traducción de ARNm virales tardíos (Berk, 2005).

En conclusión, E1B es importante porque favorece la replicación viral evitando que la célula huésped muera por apoptosis o se arreste su ciclo celular.

c. Replicación del ADN viral

La replicación del ADN viral es un evento que surge como resultado de la interacción organizada entre proteínas virales, factores celulares y el ADN viral. La proteína E1A activa la transcripción del promotor temprano E2; los productos de este gen, Ad Pol, pTP y DBP, son necesarios para la síntesis del nuevo ADN. Los factores celulares como NFI, NFII y Oct-1 son los encargados de aumentar la afinidad de las proteínas virales por el ADN, incrementar la eficiencia de la iniciación y la elongación y de estabilizar la interacción de los complejos formados, por ejemplo el complejo Ad Pol-pTP en el origen de replicación.

El origen está ubicado en los primeros 50 pb de los ITR's (ambos son activos) y es donde comienza la síntesis con una doble hebra lineal hasta su final. El producto de dicha replicación es un duplex de ADN conteniendo una hebra parental y una hija, y otra hebra más que queda como simple cadena. En una segunda ronda de replicación la hebra simple cadena se circulariza por auto complementariedad de los ITR's formando una estructura de doble cadena en su extremo que es reconocida por la misma maquinaria de iniciación que en el primer paso y genera como producto una segunda doble hebra completa (Berk, 2007 ; Evans & Hearing, 2002).

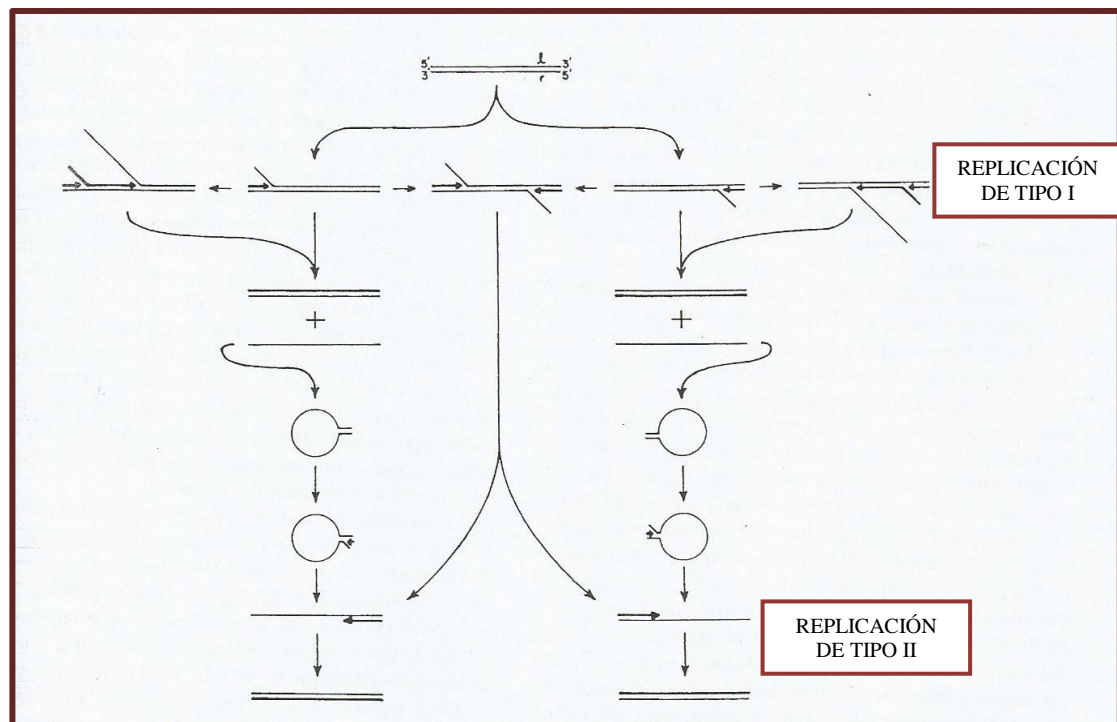


Figura III.6 – Replicación del ADN adenoviral- La replicación del Tipo I se refiere a aquella que comienza con el duplex de ADN. La replicación de Tipo II es aquella que se inicia a partir de una hebra simple cadena circularizada por autocomplementariedad de los ITR's (Figura adaptada de Berk, 2007)

d. MLP (promotor mayor tardío) y la activación de los genes tardíos

La región codificante tardía está organizada en una sola unidad transcripcional cuyo transcrito es procesado utilizando diferentes sitios de poliadenilación y de corte y empalme, que generan alrededor de 20 ARNm distintos. Estos mensajeros son agrupados en cinco familias, L1 a L5 basadas en el uso común de la señal de poliadenilación. Cada familia contiene una región no traducida “líder tripartita” generada del corte y empalme de tres exones seguida de un ORF que usualmente no posee intrones.

Los genes tardíos comienzan a expresarse eficientemente luego de una ronda de la replicación del ADN viral. Son activados por las proteínas E1A. Los factores que contribuyen a la activación retrasada del MLP son: un cambio conformacional en

cis del cromosoma viral y la expresión de un factor de transcripción codificado por el virus (Berk, 2007).

La secuencia líder tripartita es utilizada para la traducción de los mensajeros virales independientemente del factor de iniciación celular eIF4. La infección con el adenovirus lleva al bloqueo de dicho factor por medio de una proteína tardía llamada 100K, impidiendo de esta manera la traducción de los mensajeros celulares.

Los mensajeros tardíos codifican proteínas que son parte de la estructura de la cápside, que están involucradas en el ensamblado de la partícula viral o que tienen un rol regulatorio.

IV. Vectores recombinantes adenovirales

El cáncer es la segunda causa más común de muerte en el mundo occidental. Modalidades de tratamiento actuales incluyen la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, pero éstos son limitados en su eficacia terapéutica. Por lo tanto, nuevas modalidades terapéuticas son necesarias para el tratamiento de esta enfermedad. La terapia génica con vectores virales representa un enfoque prometedor y los vectores de adenovirus humanos tienen potencial como herramientas terapéuticas para nuevos regímenes de tratamiento (Oosterhoff & Beusechem, 2004).

1. Vectores recombinantes no replicativos

Los adenovirus pueden infectar una amplia variedad de tipos de células y tejidos, tanto a células en división como a aquellas que no se estén dividiendo; en la actualidad son relativamente fáciles de preparar y purificar (Danthinne & Imperiale, 2000). Por ello se los ha usado extensivamente como vectores de genes. El genoma viral puede almacenar pocos Kb de ADN pasajero sin afectar su estabilidad o su infectividad, pero la introducción de secuencias más largas requiere la eliminación de algunos genes. Existen por lo menos tres clases de adenovectores recombinantes que se diferencian principalmente en los genes que se tienen que deletionar para poder albergar el ADN foráneo; todos ellos son usados en terapia génica (FiguraIV.1).

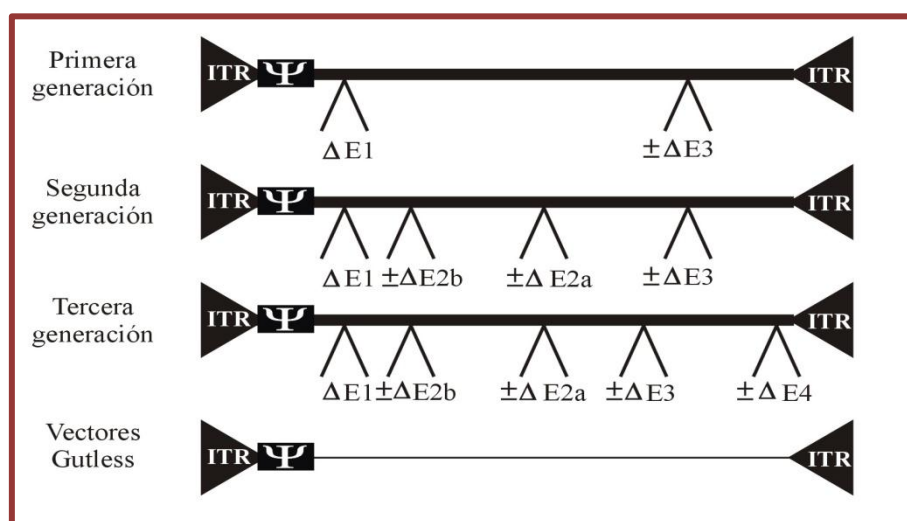


Figura IV.1 - Representación esquemática de los distintos tipos de adenovectores- Los ITRs están simbolizados por triángulos y la señal de encapsidación por rectángulos. Se muestran los genes deletados. El vector gutless carece de todos los genes virales y el espacio disponible para introducir secuencias foráneas está representado con una línea fina.

Los adenovirus de primera generación están basados en la sustitución de las regiones E1 y/o E3 por el material génico que se desea transferir. Como se mencionó anteriormente, la región E1 es necesaria para la expresión del resto de los genes virales y la replicación del ADN viral. Por lo tanto la producción de los virus recombinantes se realiza en cultivo de células que expresen los productos de dichos genes, como las líneas celulares 293, 911 o PER.C6. La región E3 codifica proteínas que no son imprescindibles para la replicación viral por lo que no es necesario que la línea celular empaquetadora las aporte. Los adenovirus deletados en E1 admiten transgenes de hasta 5,1 Kb y los deletados en E1 y E3 insertos de hasta 8,2 Kb (Danthinne & Imperiale, 2000). La infección con este tipo de vectores genera en el organismo huésped una respuesta inmunitaria potente contra la cápside y contra el transgen, por ello solo se puede lograr una expresión transiente. Además, proteínas similares a E1 presentes en el huésped podrían permitir la expresión de genes E2, por lo tanto, la replicación del ADN viral, la síntesis de proteínas tardías y por ende la producción de nuevas partículas virales infectivas sería posible (Russell, 2000).

Los vectores adenovirales que se desarrollaron en segunda instancia poseen además el gen E2 deletado, por lo que la capacidad de replicación viral queda afectada y en ellos es posible insertar un transgen más grande.

Se han construido vectores más sofisticados: vectores de tercera generación que poseen más deletaciones y vectores denominados gutless en los cuales el genoma carece de todos los genes virales y sólo conserva las secuencias ITR y de encapsidación. Estos virus pueden transportar secuencias exógenas de hasta 37 Kb. Algunas ventajas del uso de este tipo de vectores es que se detecta la expresión del transgén dos años después de su administración en animales; además no inducen una respuesta inmune significativa lo que permite su administración repetida. Sin embargo, la construcción y producción de estos adenovirus requiere el uso de un adenovirus helper que aporte todos los elementos que actúan en trans (Narvaiza *et al.*, 2003).

Otra estrategia para terapia génica es la utilización de virus que no tengan alterada su capacidad de replicación pero que sólo puedan hacerlo específicamente en el tejido deseado; a ellos se los denomina CRAds. A continuación se detallarán sus características.

2. Virus de replicación condicional

El uso de adenovirus defectuosos en la replicación como vectores ha demostrado hasta el momento moderada eficacia anti-tumoral debido a la mala capacidad de transducción y de penetración en masas tumorales sólidas. Para superar esta limitación, se han desarrollado adenovirus de replicación condicional (CRAds). En el caso del cáncer, se espera que los CRAds se repliquen sólo en las células cancerosas y las destruyan a través del proceso natural de replicación adenoviral. Además, la progenie de virus generada y liberada por las células cancerígenas infectadas y lisadas puede infectar las células tumorales vecinas. A través de varias rondas de replicación y lisis de las células, el tumor puede ser finalmente destruido (Oosterhoff & Beusechem, 2004).

Una manera de restringir la replicación viral específicamente a las células tumorales es mediante la introducción de modificaciones genéticas que anulan las funciones virales que son esenciales para la replicación en las células normales, pero son redundantes en las células cancerígenas. En la mayoría de los casos, esto implica deleciones en las regiones E1A y E1B (Oosterhoff & Beusechem, 2004).

El CRAd de este tipo más extensamente estudiado es el denominado *dl1520* u *Onyx-015* que contiene una deleción de 827 pares de bases en el gen E1B 55k y una mutación puntual en el nucleótido 2022, lo que resulta en la anulación de la expresión de E1B 55k. Como se mencionó antes, una de las funciones de E1B 55k es unirse a la proteína supresora de tumores p53. Esta unión inhibe la actividad transcripcional de p53 y promueve su degradación. La expresión de E1B 55k durante la fase temprana de replicación del adenovirus inhibe la apoptosis inducida por p53 para así evitar la muerte celular prematura. *Onyx-015* no puede inactivar p53 por lo tanto, se espera que el virus se replique sólo en las células que carecen de p53 funcional. En la mayoría de los tipos de cáncer, p53 es disfuncional (Khuri *et al*, 2000).

Otro enfoque para limitar la replicación viral a las células cancerosas es mediante la regulación transcripcional de la expresión de los genes virales esenciales para la replicación

viral mediante el uso de promotores no virales específicos de tumor o de tejido. Se han desarrollado varios CRAds específicos de tejidos en los cuales se coloca el gen esencial E1A bajo el control de un promotor exógeno que es preferencialmente activo en las células tumorales (Oosterhoff & Beusechem, 2004) (Figura IV.2). Esta estrategia fue la seleccionada para el desarrollo del adenovirus construido en este proyecto.

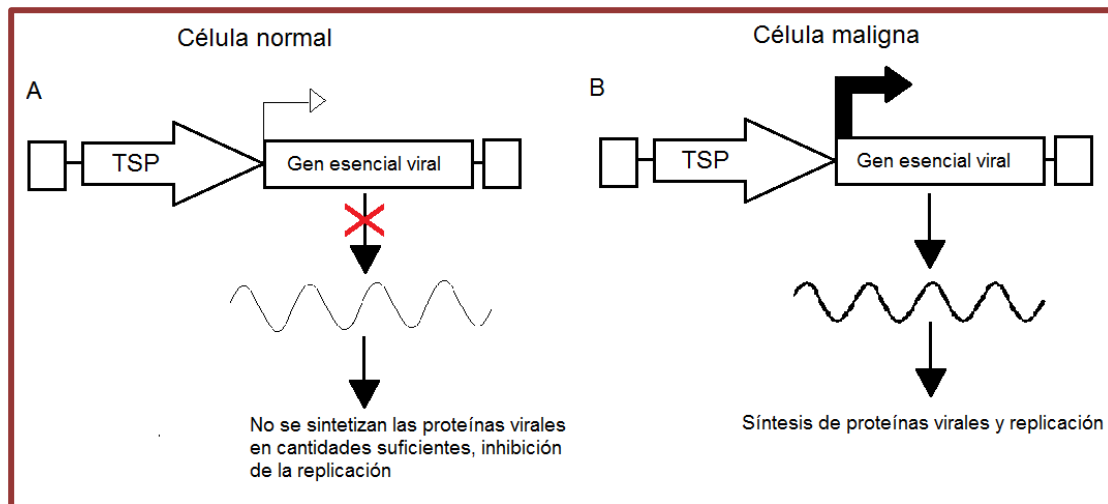


Figura IV.2 - Representación esquemática de la replicación selectiva de los CRAds en células de tumor usando un promotor específico de tumor (TSP)- Mediante la regulación de la expresión de un gen viral esencial, en particular E1A, vía un promotor de expresión específico de tumor (TSP) que conduce a la replicación, los virus se replicarán en las células malignas (B), pero no en las células normales (A).

Como el tumor está compuesto tanto por células malignas como por fibroblastos, células endoteliales e inflamatorias, una estrategia es utilizar un promotor específico que posea una elevada actividad en todos los componentes del tumor para poder, de esta manera, eliminar tanto las células malignas como el tejido que favorece su desarrollo. Un promotor que cumple con esto es el promotor de la glucoproteína SPARC. En la sección V se describirá el microambiente tumoral y la proteína SPARC.

a. Ventajas del agregado del gen E1B al CRAd

El agregado del gen E1B a un CRAd que utilice un promotor específico favorece la replicación viral al evitar la apoptosis o el arresto celular. Como resultado se llevan adelante una mayor cantidad de ciclos replicativos antes de la lisis celular

que permiten la generación de más partículas virales y una mayor amplificación del efecto oncolítico.

V. Estroma del tumor

El microambiente tumoral es un regulador crucial del desarrollo del tumor. Este concepto ha sido propuesto por Paget hace muchos años como la hipótesis del suelo y la semilla (Albini & Sporn, 2007). Los tumores heterogéneos son órganos que además de las células malignas están compuestos por fibroblastos asociados a los tumores, células endoteliales e inflamatorias (Albini & Sporn, 2007; Sugimoto *et al*, 2006). Estas células que se encuentran acompañando a las células tumorales son las que proveen el suelo en el cual las células malignas crecerán, invadirán y metastatizarán (Ronnov-Jessen *et al*, 1996) (Chlenski *et al*, 2006) (Kalluri & Zeisberg, 2006). Las células malignas y estromales se comunican entre sí a través de interacciones célula-célula, célula-matriz y de la secreción de factores solubles que proveen una red de conexión intratumoral que es indispensable para que el tumor crezca (Kalluri & Zeisberg, 2006). Si bien gran parte de estos hechos se conocen desde hace algunos años sólo recientemente la investigación en cáncer comenzó a entrever como las células tumorales y estromales se comunican y co-conspiran en el desarrollo del tumor (Marx, 2008).

El incremento de la expresión de SPARC ha sido descrito en una variedad de cánceres los cuales incluyen colon, esófago, páncreas, mama, pulmón, vejiga, riñón y melanoma (ver (Rumpler, 2003; Clark, 2008; Podhajcer, 2008 y las referencias que allí se mencionan). En general la sobreexpresión de SPARC, ya sea por la célula maligna o los fibroblastos o células endoteliales del entorno tumoral se asocia a un mal pronóstico en los diferentes tipos de cánceres (Podhajcer, 2008; Infante 2007; Kato, 2001). Las muestras de melanoma primario o metastático expresan altos niveles de SPARC tanto en las células malignas como en los fibroblastos y endotelios asociados, mientras que los nevus displásicos, nevus malignos y melanocitos normales muestran una expresión de SPARC muy baja o indetectable (Ledda, 1997).



OBJETIVOS

Objetivos

El desarrollo y la progresión de un tumor sólido hacia un fenotipo maligno (metastático) dependen fundamentalmente de las interacciones entre las células tumorales y las células del microambiente del tumor. Nuestra hipótesis general es que un medicamento de transferencia génica debe estar diseñado de tal forma que sea activo tanto en la célula maligna como en la célula del estroma que soporta su crecimiento y ayuda a su dispersión metastática.

Por esto, el objetivo general de este proyecto final de ingeniería es la construcción de un adenovirus oncolítico que pueda replicarse en los principales componentes de un tumor mediante la expresión de las proteínas virales E1A y E1B dirigidas por un promotor activo en el tumor y en el estroma.

A continuación se describirán los objetivos específicos que permitirán llevar a cabo este trabajo:

- Objetivo específico 1: *Clonado del gen de la proteína E1B en un vector plasmídico tipo shuttle.*

Se amplifica por PCR el gen viral E1B utilizando como molde el ADN del virus silvestre. Se diseña la estrategia de clonado para el vector resultante pshuttle-SPp-E1A-E1B.

- Objetivo específico 2: *Obtención del genoma viral por co-transformación en bacterias del vector plasmídico tipo shuttle y un plásmido que contiene el resto del genoma viral.*

Se linealiza el vector pshuttle-SPp-E1A-E1B/pshuttle-SPp-E1A-IRES-E1B con la enzima *PmeI* y posteriormente se co-transforman junto con el vector pVK-500C 5/3 las bacterias BJ5183. Con el vector resultante pAd-SPp-E1A-E1B, se transforman bacterias DH5 α electromax (Invitrogen) para amplificarlo.

- Objetivo específico 3: *Recuperación y amplificación del adenovirus en células eucariotas.*

El plásmido pAd- SPp-E1A-E1B se linealiza con la enzima *PacI* y posteriormente se transfecta usando lipofectamina LTX (Invitrogen) en células eucariotas 911. Luego de 10-15

días se espera obtener efecto citopático. Posteriormente el virus se clona y se amplifica en células 293 y se purifica usando un doble gradiente de cloruro de cesio. Se corrobora el clonado del virus mediante secuenciación del mismo.

- Objetivo específico 4: *Caracterización in vitro del adenovirus obtenido.*

El virus purificado se caracteriza *in vitro*. Para ello se cuantifica el efecto oncolítico del virus en líneas celulares: SKOV3, SKOV3-Luc, OV4y HMEC.

- Objetivo específico 5: *Evaluación de los costos de la investigación.*

Se realiza un estudio de los costos de esta investigación.



MATERIALES Y MÉTODOS

a. Plásmidos

Se utilizó el vector pVK500C 5/3 (Krasynkh, 1996) para la obtención del gen viral E1B mediante una PCR.

Para clonar el gen E1B y su posterior subclonado en otro vector se utilizó el vector pCRTM4-TOPO[®] TA (InvitrogenTM) que permite el clonado en 5 minutos y en un solo paso de productos de amplificación por PCR con *Taq*-polymerase.

La señal de poliadenilación SV40 fue obtenida del vector pGL3-Promoter (Promega Corp.).

El genoma viral fue obtenido mediante la tecnología de ADN recombinante. En este proyecto se utilizó el vector pVK500C 5/3 que contiene el genoma viral y el vector pShuttle-I-F512E1ARbE1BpolyA (vector de transferencia). Ambos vectores poseen brazos que permiten la recombinación en bacterias *Escherichia coli* de la cepa BJ5183.

b. Líneas celulares

Para la generación del stock viral se utilizaron las células 911, son células humanas de retinoblastos embrionarios (HER) con un plásmido que contiene 79-5789 pb del genoma del Ad5 (Fallaux *et al*, 1996). Éstas fueron crecidas en medio DMEM/F12 suplementado con 10 % SFB.

Los ensayos de caracterización fueron realizados en células SKOV3, SKOV3-Luc, OV4 y HMEC.

c. Bacterias

Para la amplificación del TOPO-E1B se utilizaron bacterias JM109D3H. Los siguientes vectores utilizaron bacterias ElectroMAXTM DH5 α -ETM Cells (InvitrogenTM) que son electrocompetentes y deficientes en recombinasas.

Las bacterias electrocompetentes fueron transformadas a 1300 volt durante 2ms, luego se las dejó en medio de recuperación a 37 °C por una hora.

Las bacterias competentes químicas JM109 fueron transformadas mediante choque térmico, expuestas 1:30 minutos a 42 °C y luego puestas en hielo. Se recuperan en medio SOC durante una hora a 37 °C.

d. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las PCRs se realizaron en mesada estéril, exclusiva para esta técnica, utilizando los termocicladores Minicycler (MJ Research Inc., Whaltam, MA) o PTC-200 (MJ Research Inc., Whaltam, MA). En la siguiente tabla (tabla d.1) se detalla el molde utilizado, los cebadores (*primers*) y las condiciones de reacción para las amplificaciones.

Molde	Producto	Primers		Condiciones		
		F	R	Ciclos	T (°C)	Tiempo (min)
pVK500C HEK293 pShuttle- F512E1aRb- E1B	E1B	GCTCGAGGCGT GTGTGGTTAAC GCC	CTCTAGATC AATCTGTATC TTCATCGCTA GAGCC	1	95	5
				35	94	1
					57	1
					72	1,45
				1	75	10
1	4	Todo el tiempo				
pVK500C- I-F512- E1ARb- E1B	F512	CGACGCGTGCA GCTTGTCTTGTC	CGAGATCTG CTCTCCGGG CAG	1	95	5
				35	94	45 seg
					60	30seg
					70	30 seg
				1	72	10
	1	4	Todo el tiempo			
	E4	ACAAGCTCCTC CCGCGTTAG	ACTACGTCC GGCGTTCCA T	1	95	5
				35	94	45 seg
					60	30 seg
					70	30 seg
1				72	10	
1	4	Todo el tiempo				

Tabla d.1- Reacción en cadena de la polimerasa- Se detallan los moldes, productos obtenidos, primers sentido (F) y antisentido (R) y las condiciones de temperatura empleadas en cada reacción.

e. Digestión con enzimas de restricción

Todas las restricciones fueron realizadas en las condiciones indicadas por el proveedor. En caso de realizar digestiones con dos enzimas diferentes se seleccionó el *buffer* en el cual ambas enzimas poseían actividad óptima. Cuando no posible, se realizaron dos

reacciones de restricción independientes, entre las cuales se realizó una precipitación con etanol. El resultado de la restricción se verificó por separación electroforética en geles de agarosa 1% en solución TAE (40 mM Tris-acetato, 2 mM Na₂EDTA.2H₂O, pH 8,5) conteniendo bromuro de etidio (0,5 µg/µl) y visualizados con luz UV en trans-iluminador (Ultraviolet Products Inc., Upland, CA). Cuando fue necesario precipitar alguna de las enzimas se lo hizo con dos volúmenes de etanol 100%, y NaCHOOH 0.3 N. Esta mezcla se incubó durante una hora a -20 °C, se centrifugó, luego se lavó el pellet con 200 µl de etanol 70%, y por último se resuspendió en agua.

f. Preparación de plásmidos

Las purificaciones plasmídicas de pequeña y mediana escala se realizaron mediante el método de lisis alcalina. Las purificaciones de mediana escala fueron empleadas en digestiones con enzimas de restricción para su posterior uso en ligaciones.

1. Preparación de pequeña escala

Se centrifugó 1 ml de medio de cultivo durante 30 segundos a 13000 r.p.m., se descartó el medio y se resuspendió el pellet bacteriano en 100 µl de solución P1 (25 mM Tris PH 8, 10 mM EDTA). Después de 5 minutos se agregaron 200 µl de solución P2 (0,2 N NaOH, 1% Peso/Volumen SDS), se mezcló por inversión suave y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µl de solución P3 (KCHOOH 5M PH 5,3), se mezcló por inversión suave y se colocó en hielo durante 15 minutos. Se centrifugó durante 15 minutos a 21000 g, se recuperó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol 100%. Se incubó a -20 °C por 30 minutos y luego se centrifugó por 10 minutos a 21000 g, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 400 µl de etanol 70% V/V. Posteriormente se centrifugó 5 minutos a máxima velocidad, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente durante 5 minutos. Por último se resuspendió en 30 µl de agua bidestilada.

2. *Preparación de mediana escala*

Se centrifugó 100 ml de medio de cultivo durante 20 minutos a 2400 r.p.m., se descartó el medio y se resuspendió el pellet bacteriano en 5 ml de solución P1 (25 mM Tris PH 8, 10 mM EDTA). Después de 5 minutos se agregaron 5 ml de solución P2 (0,2 N NaOH, 1% Peso/Volumen SDS), se mezclaron por inversión suave y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 5 ml de solución P3 (KCHOOH 5M PH 5,3), se mezclaron por inversión suave y se colocaron en hielo durante 15 minutos. Se centrifugó durante 20 minutos a 2400 r.p.m., se recuperó el sobrenadante y se agregaron 0,6 Volúmenes de iso-propanol. Se dejó precipitar a temperatura ambiente por 10 minutos y luego se centrifugó por 10 minutos a 10000 r.p.m. a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavo el pellet con 1 ml de etanol 70% V/V. Se centrifugó 5 minutos a máxima velocidad, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. Por último se resuspendieron en 200 µl de agua bidestilada.

g. Purificación de fragmentos de ADN y cuantificación

La purificación de los productos de una restricción se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa y corte del fragmento de agarosa para la purificación del mismo a través del kit comercial QIAquick spin (QIAGEN, GmbH, Hilden, Alemania). Para cuantificar los fragmentos de ADN utilizados en una ligación se utilizó la cuantificación por gel a partir del análisis densitométrico de las intensidades de los fragmentos de masa conocida del 1kb ladder (Invitrogen o el producido por FIL) o de la mezcla de seis fragmentos con extremos romos denominado Low Mass DNA Ladder (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

h. Ligaciones

Para el clonado del producto de amplificación por PCR que utilizó como molde ADN genómico de células 293 o al plásmido pVK500c se escogió el kit comercial TOPO® TA Cloning® Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA).

Para el resto de los clonados se utilizó ADN Ligasa del bacteriófago T4 (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) según los protocolos del proveedor. Se utilizó una relación inserto:vector de 3:1 y la siguiente fórmula para calcular los ng de inserto:

$$\left[\frac{ng \text{ de vector} \times Kb \text{ de inserto}}{Kb \text{ de vector}} \right] \times \left[\text{relación} \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} \right] = ng \text{ inserto}$$

Se utilizó como mínimo 50 ng de vector y como máximo 200 ng y 20 Unidades de ADN ligasa para ligar extremos cohesivos con un volumen final de 20 μ l. Se incubó a temperatura ambiente durante una hora y se colocó a 4 °C hasta el momento de realizar la transformación bacteriana.

i. Secuenciación de ADN

Los fragmentos amplificados por PCR y clonados se secuenciaron en el Servicio de secuenciación provisto por la Fundación Instituto Leloir, utilizando los cebadores universales T3 y T7, presentes en el plásmido TOPO-pCR4 (Invitrogen™) que flanquean los productos clonados.

Los plásmidos pShuttle-I-F512-E1ARb-E1polyA y pVK500C-I-F512-E1ARb-E1polyA fueron secuenciados por el laboratorio coreano Macro Gen.

j. Ensayo de muerte celular

Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de 4×10^4 células/pocillo. Al otro día las células fueron infectadas con dosis crecientes del CRAd, en 200 μ l de medio DMEM conteniendo 2% de SFB. Luego de 4 hs de infección se agregaron 0,8 ml de medio DMEM conteniendo 15% de SFB con o sin TNF- α . Posteriormente se agregaron 100 μ l de PBS conteniendo MTS (dilución 1/15) y se incubó durante 4 hs. Se evaluó posteriormente la absorbancia del sobrenadante a 490 nm con el lector de micro-placas Bio-Rad modelo 550 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU)

k. Efecto citopático en monocapa

Se sembraron células en 24 pocillos a una densidad de 4×10^4 células/pocillo. Al otro día las células fueron infectadas con dosis crecientes del CRAd en 200 μ l de medio DMEM conteniendo 2% de SFB. Luego de 4 hs de infección se agregaron 0,8 ml de medio DMEM

conteniendo 15% de SFB. La cantidad de virus utilizada varió desde 0,1 a 1000 partículas virales por célula (MOI). El efecto citopático se evaluó mediante la tinción con cristal violeta (solución 0,75% en 40% de metanol) de las células viables 10 días después de la infección.

l. Análisis bioinformático

Para el diseño de los primers y el diseño de los plásmidos *in silico* se utilizó el programa Vector NTI Advance TM 11.0 (Invitrogen Corporation, 2008).

Para analizar la secuencia E1B del plásmido TOPO-E1B obtenida por secuenciación, se utilizó el programa informático de alineamientos de secuencias de tipo local BLAST (NCBI)

m. Análisis bioestadístico

Para evaluar el efecto del CRAd sobre la cantidad de células vivas se aplicó un análisis de la varianza de un factor (ANOVA). Las comparaciones entre tratamientos se efectuaron mediante el Test de Tukey. Se consideraron significativas las pruebas con un $p < 0.05$. El programa estadístico utilizado fue Infostat (Universidad de Córdoba, Argentina).

n. Estrategia de clonado

A continuación se describirá el diseño de un casete de expresión que lleve el promotor específico F512 y los genes E1A y E1B. Este vector fue utilizado posteriormente para llevar a cabo una recombinación con un plásmido que contiene los genes virales y de esta manera obtener el genoma adenoviral para luego recuperar en una línea celular las partículas virales. Además, se considerará la introducción de una señal de poliadenilación aguas abajo del gen E1B para lograr su correcta expresión.

En primer lugar se diseñaron los cebadores para poder amplificar el gen E1B mediante PCR. Dichos cebadores fueron seleccionados para que flanqueen al gen E1B desde los 1563pb a los 3509pb según el genoma completo del adenovirus C serotipo 5 y además se les agregaron los sitios de restricción *XhoI* y *XbaI* que nos permitieron realizar posteriormente su escisión del primer vector de clonado.

El producto de la amplificación por PCR deberá ser clonado en un vector TOPO TA (pCR4) (Figura n.1). Luego de la amplificación en bacterias, el TOPO-E1B se tendrá que digerir con las enzimas *SpeI* y *XhoI* para poder liberar el fragmento deseado (Figura n.2).

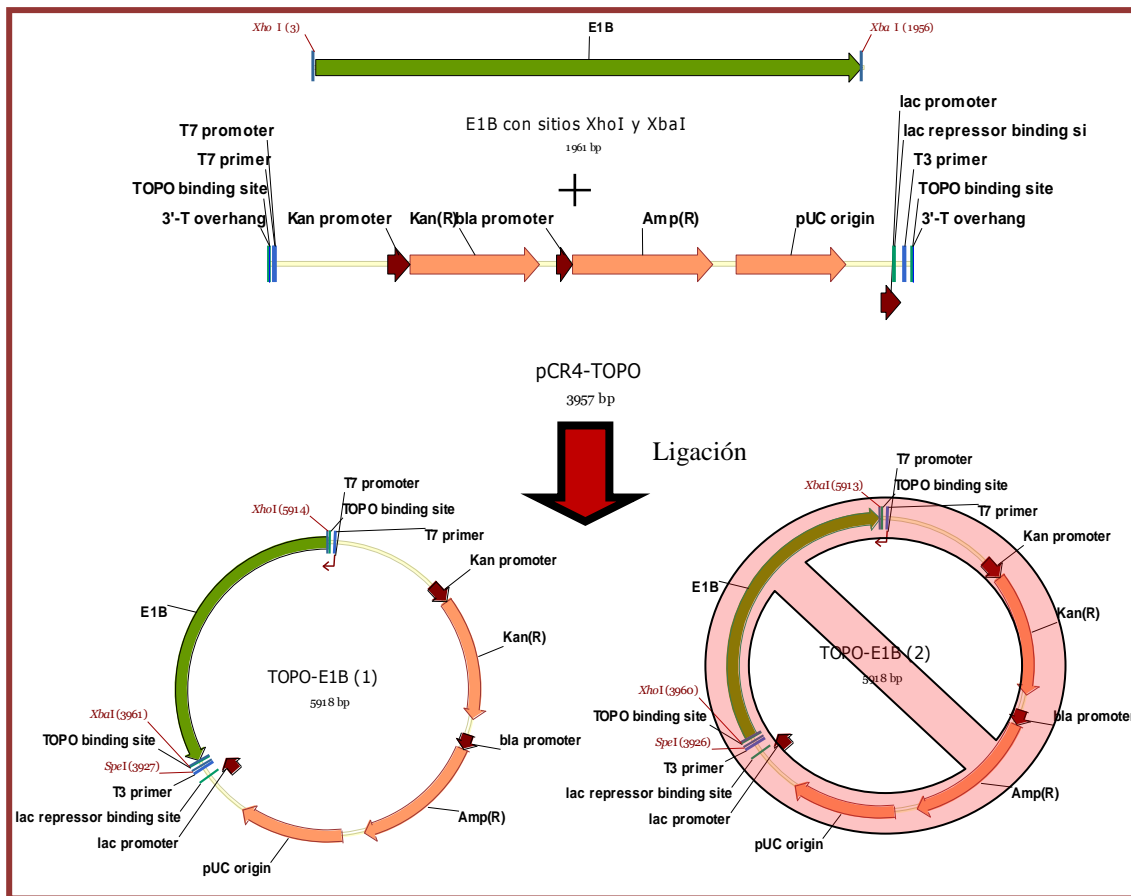


Figura n.1 - Ligación de E1B con pCR4-TOPO- Como producto de esta ligación se generarán dos vectores TOPO-E1B (1) y TOPO-E1B (2) con diferente orientación del inserto. El vector buscado es el TOPO-E1B (1) porque de él se puede escindir el gen usando las enzimas *XhoI* y *SpeI*.

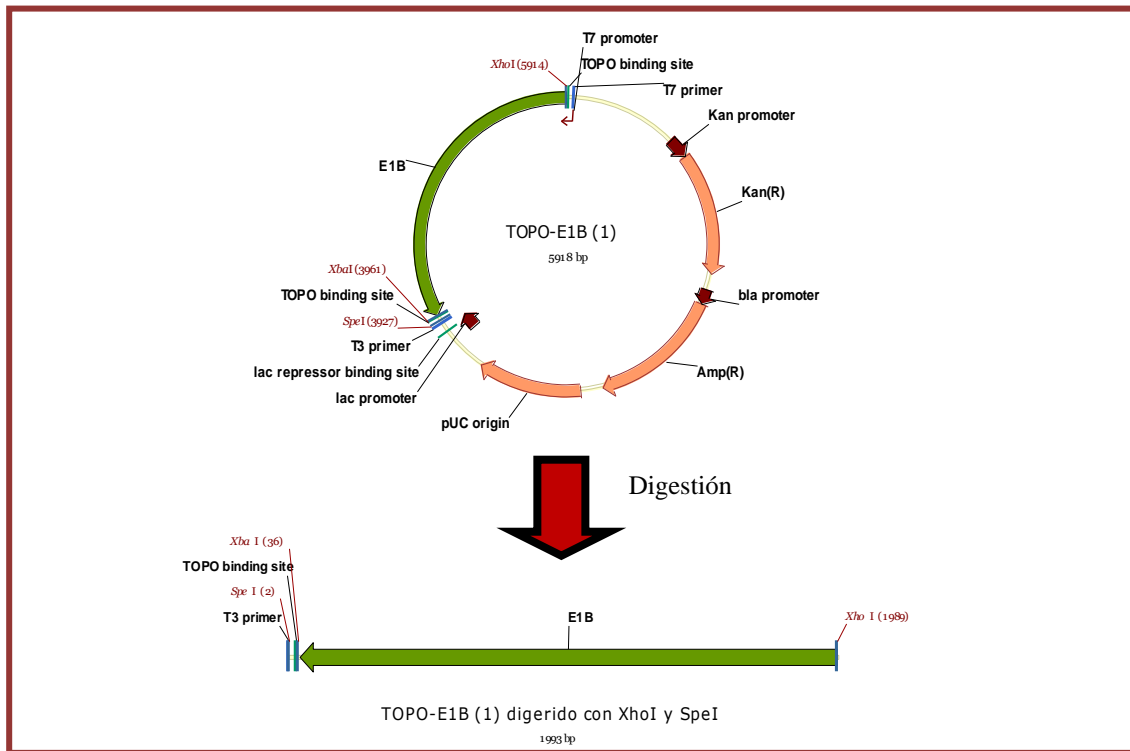


Figura n.2 - Digestión del TOPO-E1B con *XhoI* y *SpeI*.

El vector pGL3-promoter que contiene el gen de la luciferasa, aportará al gen E1B la señal de poliadenilación. Para clonar el gen E1B dentro de dicho vector, se lo debe digerir con las enzimas *XhoI* y *XbaI* (Figura n.3). *XbaI* (del vector pGL3-promoter) y *SpeI* (del inserto) poseen extremos cohesivos.

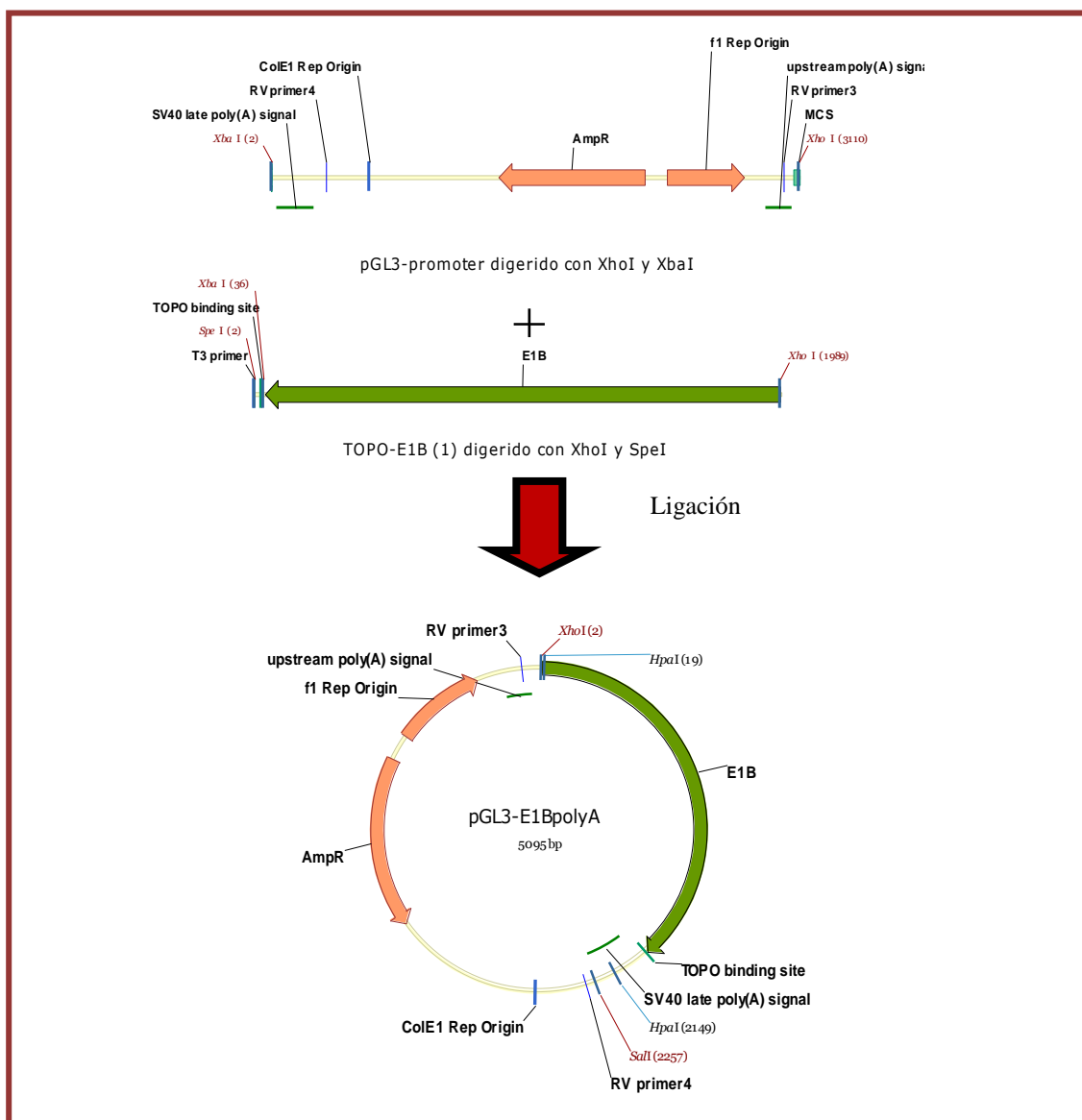


Figura n.3 - Ligación del pGL3-promoter digerido con *XhoI* y *XbaI* con E1B escindido del TOPO-E1B (1).

Una vez generado el vector pGL3-E1BpolyA se tendrá que digerir con las enzimas *XhoI* y *Sall* para poder insertar el gen E1BpolyA en el vector pShuttle-I-F512E1ARb. Para poder clonar el inserto en el vector, este último se digerirá con las enzimas *HpaI* y *Sall*. La enzima *HpaI* deja extremos romos mientras que *Sall* deja un extremo protuberante. El vector pShuttle-I-F512E1ARb-E1BpolyA debe ser linealizado con la enzima *PmeI* (Figura n.4). Ver la sección resultados.

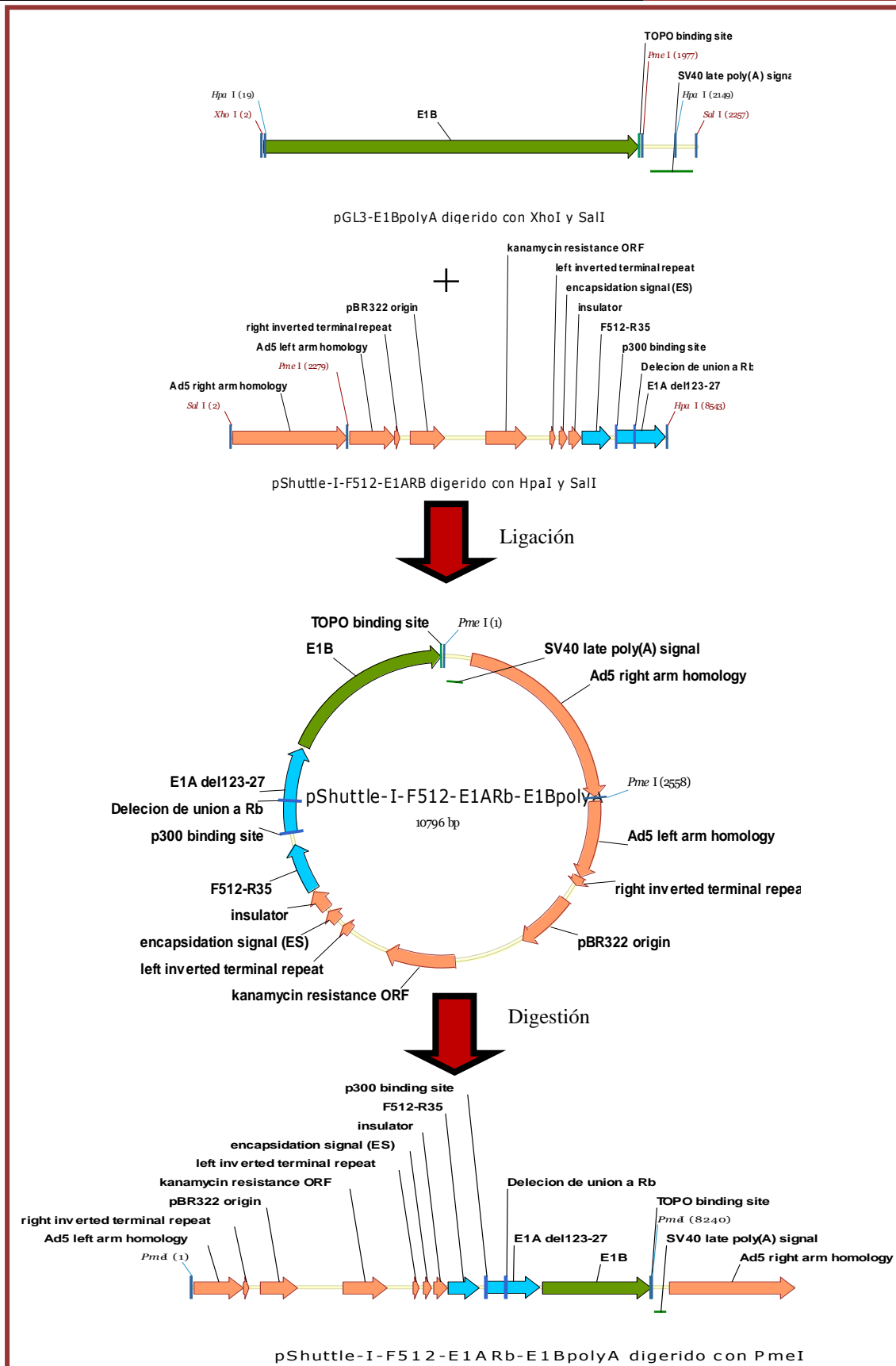


Figura n.4 - Generación del vector pShuttle-F512E1ARb-E1BpolyA.

Como último paso, se deben cotransformar bacterias *E.coli* de la cepa BJ5183 con los vectores pShuttle-I-F512E1ARb-E1BpolyA linealizado y pVK500C para, mediante recombinación homóloga, obtener el genoma adenoviral (Figura n.5).

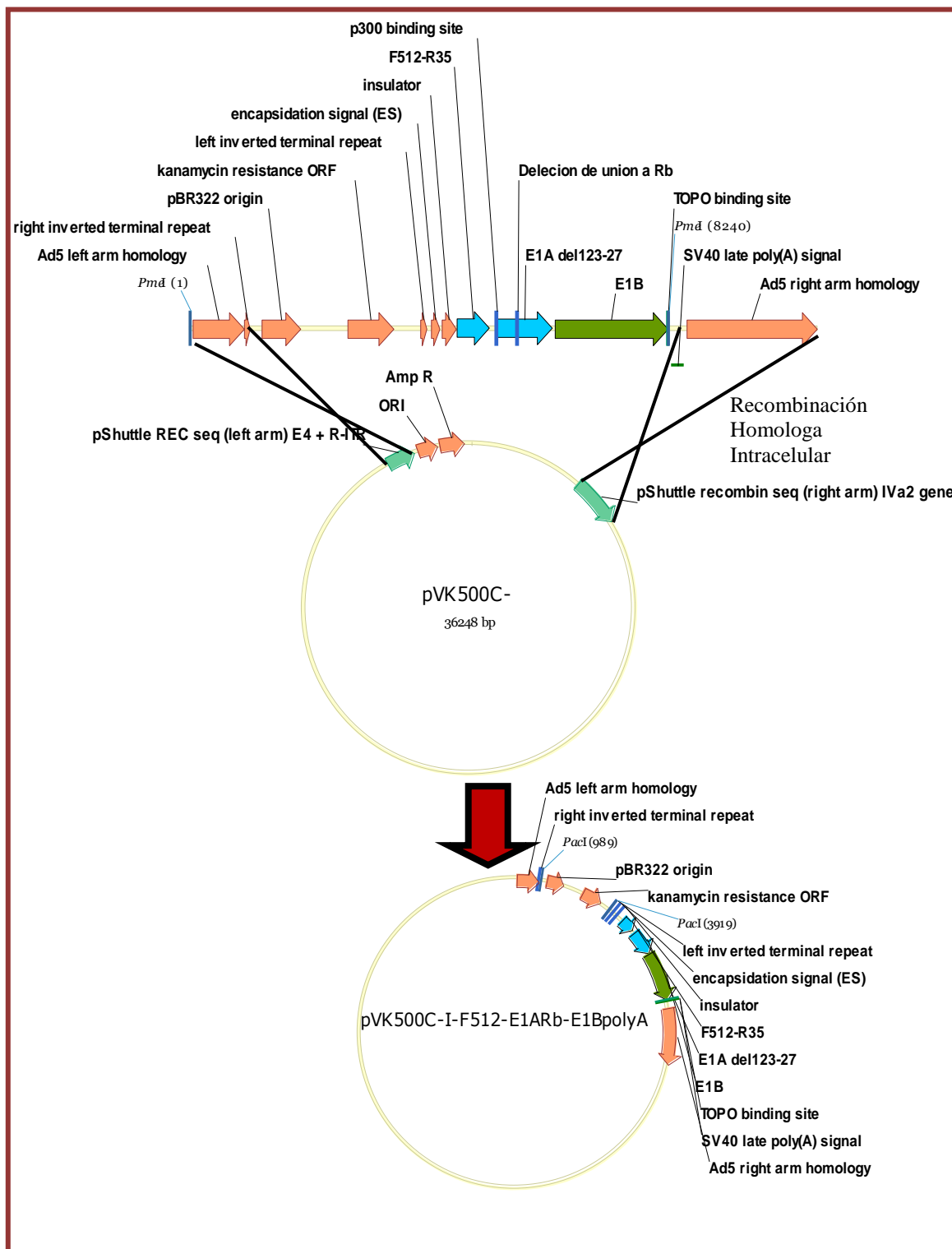


Figura n.5- Recombinación homóloga para generar el genoma adenoviral.



RESULTADOS

I. Clonado del gen viral E1B en el vector TOPO TA

Si bien la estrategia de clonado se ha detallado completamente en materiales y métodos es importante mencionar que el fin de nuestro trabajo es generar un casete de expresión que cuente con el promotor específico F512 y los genes E1A y E1B para luego poder realizar una recombinación con un plásmido que contenga los genes virales y que de esta manera se obtenga el genoma adenoviral para luego obtener las partículas virales.

Comenzamos por la obtención del gen E1B. En primer lugar, utilizando el software vector NTI se diseñaron los cebadores (en adelante utilizaremos la palabra en inglés *primers*) para amplificar el gen E1B. Los primers enviados a sintetizar fueron los siguientes:

E1B-F: GCTCGAGGCGTGTGTGGTTAACGCC

E1B-R: CTCTAGATCAATCTGTATCTTCATCGCTAGAGCC

Dichos primers fueron diseñados de manera tal que flanqueen al gen E1B desde los 1563 pb hasta los 3509 pb según el genoma del adenovirus tipo 5 (AY339865.1, Genbank) y se agregó en el extremo 5' de cada primer un sitio de reconocimiento para enzimas de restricción; a E1B-F se le agregó la secuencia de reconocimiento de *XhoI* y a E1B-R la secuencia de reconocimiento *XbaI*.

En segundo lugar se procedió a la amplificación por PCR utilizando dos moldes diferentes, uno de ellos, ADN genómico de células HEK293 (que tienen integrado la secuencia adenoviral E1), y el otro, ADN plasmídico de un vector que contiene todos los genes adenovirales y al cual llamamos pVK500 C 5/3. En la Imagen I.1 se muestra el resultado de dicha amplificación. La banda esperada era de ~1950 pb y ésta se logró con el molde de las células HEK293 (ver la calle 4 en la Imagen I.1). Nos sorprendió el tamaño que encontramos en la amplificación del molde pVK500 C 5/3 y decidimos continuar con el producto de PCR de HEK293. Sin embargo, decidimos clonar también el producto de mayor tamaño para enviarlo a secuenciar.

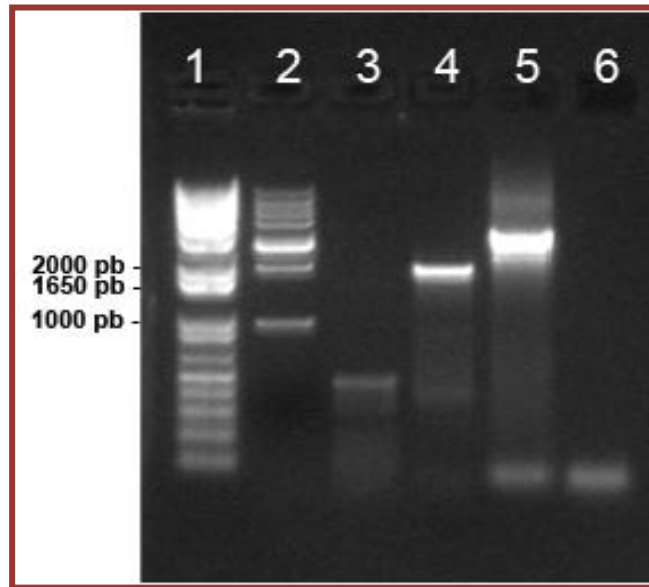


Imagen I.1-Amplificación por PCR del gen E1B- Las tres primeras calles corresponden a marcadores de peso molecular. La calle 4 al producto de amplificación del ADN genómico de células HEK293. La calle 5 corresponde al producto de amplificación del ADN plasmídico (pVK500 C 5/3) y la calle 6, al blanco, que es el control negativo de la PCR.

Para comenzar los clonados, fue necesaria la purificación por gel de los productos amplificados. Se utilizó el kit QIAquick spin de QIAGEN. En la Imagen I.2 se muestran ambos productos luego de la purificación, a partir de la cual se cuantificó el ADN purificado.

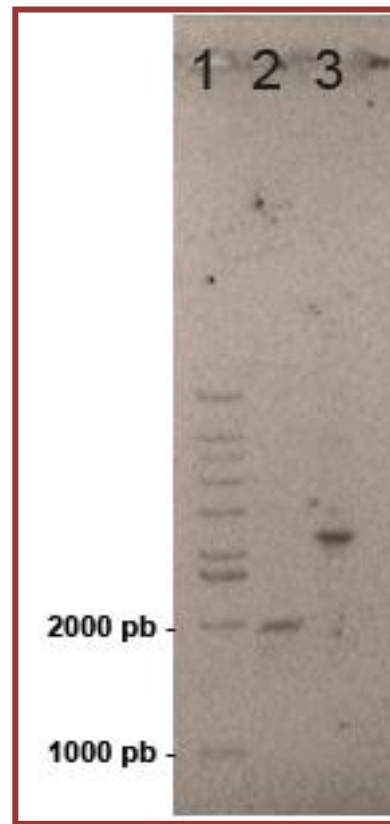


Imagen I.2- Purificación del gen E1B- La primera calle corresponde al marcador de peso molecular (5µl). La calle 2, al producto de amplificación del ADN genómico de HEK293 (10 µl); la calle 3 corresponde al producto de amplificación del pVK500 C 5/3 (10 µl).

Luego se clonaron los productos de PCR en un vector TOPO TA (pCR4) y se transformaron bacterias *E.coli* DH5α-electromax (Invitrogen) con dicho plásmido por medio de una electroporación.

Más tarde se incubaron en medio de recuperación por una hora a 37 °C para que expresen la resistencia a kanamicina y se recuperen; por último, se sembraron las células en placas de Petri con agar conteniendo medio LB con kanamicina (50µg/ml). Se obtuvieron 16 colonias, 4 correspondientes a las bacterias transformadas con TOPO-E1B (clones 1 al 4) que utilizó como molde a pVK500 C 5/3 y 12 correspondientes a las bacterias transformadas con TOPO-E1B (clones 5 al 16) del molde HEK293. Los clones se picaron y crecieron durante toda la noche en medio LB suplementado con kanamicina. Se extrajo el ADN plasmídico y se digirió con la enzima *EcoRI* para verificar que los fragmentos clonados fuesen de los tamaños esperados. En la Imagen I.3 se muestra el resultado de dicha restricción.

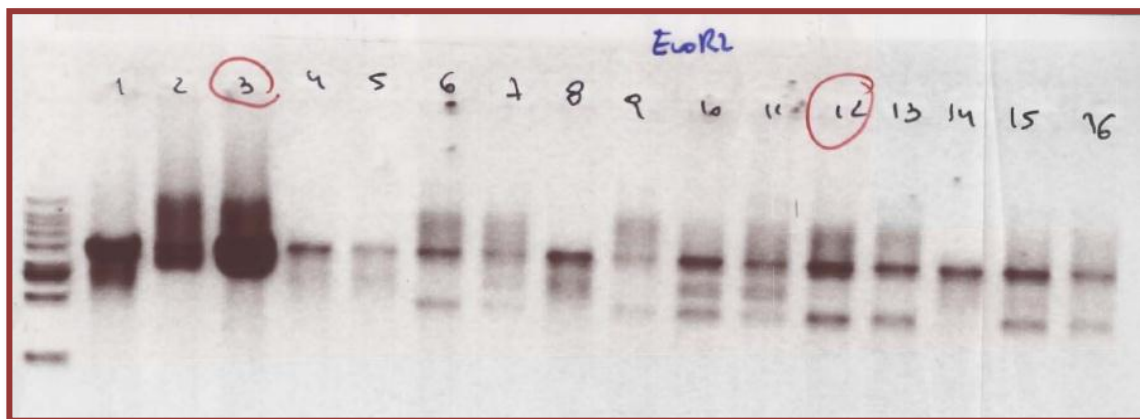


Imagen I.3- Digestión del TOPO-E1B con *EcoRI*- La primera calle corresponde al marcador de peso molecular. Las calles 1-4 corresponden a las digestiones del TOPO-E1B que utilizó como molde para levantar el gen E1B a pVK500 C 5/3 y las calles 5-16 corresponden al ADN digerido que utilizó como molde a HEK293. Se señalan los clones seleccionados para continuar con los clonados.

De todos los clones considerados positivos (2, 3, 6, 9, 12, 13, 15, 16), se seleccionaron los clones 3 y 12 para continuar con el trabajo. Estos se crecieron en 50 ml de medio LB y se realizó una nueva preparación de su ADN plasmídico. Para corroborar fehacientemente que el fragmento clonado es el gen E1B, se envió a secuenciar el ADN plasmídico de cada uno de estos clones. Para ello se utilizaron los primers universales T3 y T7 y se demostró que efectivamente se encontraba clonado el gen E1B en el clon 12. El análisis detallado de la secuencia se encuentra en el Anexo I.

II. Agregado de señal de poliadenilación al gen E1B

Para la correcta expresión de los genes clonados que van a ser expresados en células eucariotas, se requiere que cuenten con diferentes señales reconocidas por la maquinaria molecular de expresión. Una de ellas es la señal de poliadenilación ubicada río abajo del gen.

Para conseguir que el gen E1B contenga la señal de poliadenilación, se lo introdujo en el plásmido pGL3-promoter que la posee río abajo del gen de la luciferasa, el cual fue escindido durante la digestión.

Se digirieron los plásmidos TOPO-E1By pGL3-promoter con las enzimas de restricción *XhoI* y *XbaI*. Debido a que se utilizaron dos enzimas de distintos proveedores y que ambas tenían actividad óptima en distintas soluciones amortiguadoras de pH (*buffers*), las

digestiones se realizaron secuencialmente, previa purificación de los productos intermedios mediante precipitación.

El plásmido pGL3-promoter fue digerido y se obtuvieron las bandas esperadas de 1953 y 3142 pb. Los plásmidos TOPO-E1B de los clones 3 y 12 no fueron digeridos por una de las enzimas, ya que al realizar la corrida electroforética sólo se observó una banda correspondiente al plásmido linealizado (Imagen II.1). Esta digestión fue repetida varias veces, e inclusive con más de una preparación plasmídica. Al analizar las hojas de datos de las enzimas de restricción se observó que *XbaI* es sensible a metilación. Entonces se presumió que el sitio *XbaI* del TOPO-E1B se encontraba metilado y no pudo ser digerido por la enzima. Dado que el vector pGL3-promoter había sido preparado previamente en el laboratorio usando bacterias mutadas para la metilasa, no tuvimos problemas para cortarlo.

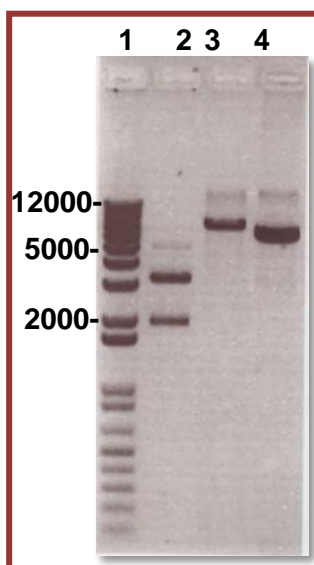


Imagen II.1 – Digestión de los plásmidos con *XbaI* y *XhoI*. La calle 1 corresponde al marcador de peso molecular 1 Kb plus. La calle 2 corresponde al plásmido pGL3-promoter digerido. Las calles 3 y 4 corresponden a los plásmidos TOPO-E1B provenientes de los clones 3 y 12 digeridos, cuyo resultado no fue el esperado.

Debido a que en ese momento no se contaba con bacterias competentes metilasa negativas y a que se necesitaba avanzar en el proyecto se decidió cambiar la estrategia de clonado. Entonces se digirió el TOPO-E1B con las enzimas *XhoI* y *SpeI*, que al cortar deja un extremo cohesivo compatible con el de *XbaI* permitiendo la ligación de dichos extremos (Figura II.1) Finalmente se lograron obtener las bandas de las longitudes esperadas de 1987 y 3931 pb.

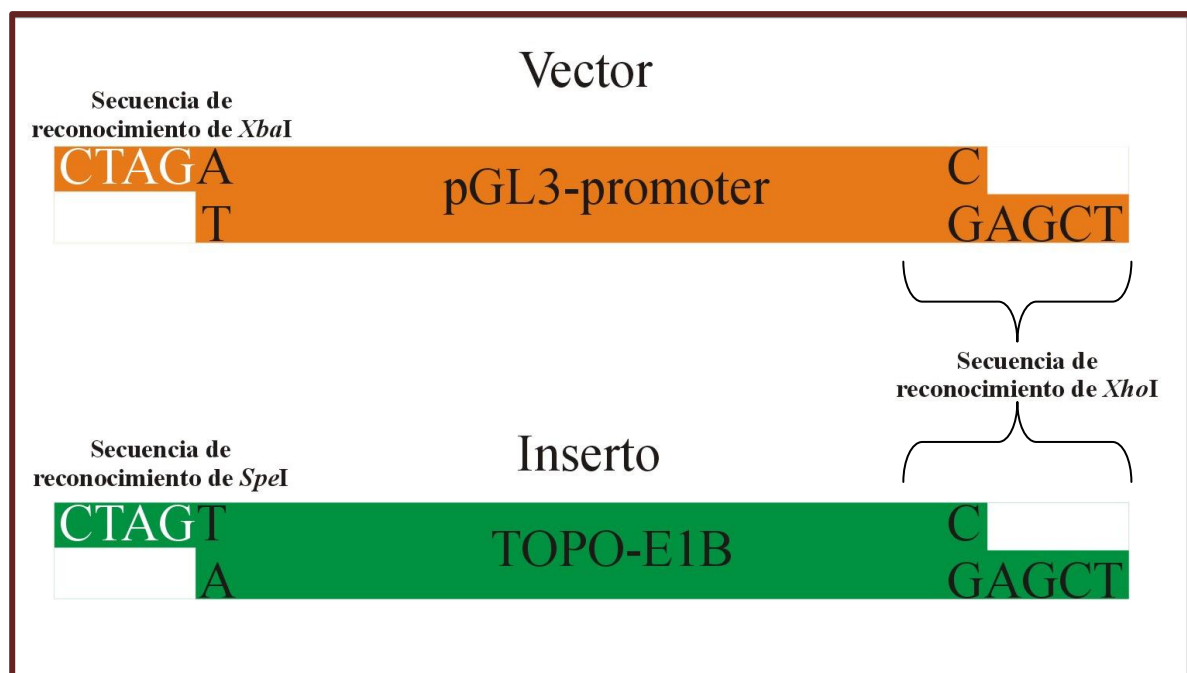


Figura II.1 – Secuencias de las enzimas de restricción utilizadas para la ligación del vector pGL3-promoter con el inserto E1B- Se destacan las secuencias de las enzimas utilizadas en la digestión del pGL3-promoter (*XhoI* y *XbaI*) y en la digestión del TOPO-E1B (*XhoI* y *SpeI*). En blanco se distingue la complementariedad entre los extremos cohesivos que dejan las enzimas *XbaI* y *SpeI*.

Se purificaron la banda de 3142 pb de la digestión del plásmido pGL3-promoter y la banda de 1987 pb de la digestión del TOPO-E1B proveniente del clon 12 (Imagen II.2) y se procedió a la ligación para generar el plásmido pGL3-E1BpolyA. Se utilizó como control negativo una reacción de ligación sin inserto. En referencia al clon 3, cabe aclarar que no se continuó utilizando porque no se pudo obtener mediante secuenciación la información necesaria para determinar si contenía el gen E1B o si dicho gen se encontraba interrumpido por una secuencia desconocida.

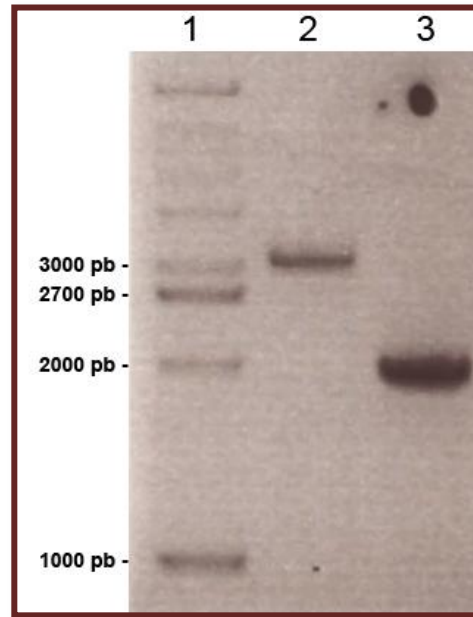


Imagen II.2- Purificación del gen E1B- La primera calle corresponde al marcador de peso molecular (5µl). La calle 2 corresponde a la banda de 3142 pb de la digestión del plásmido pGL3-promoter (10 µl). La calle 3, a la banda de 1987 pb de la digestión del TOPO-E1B (10 µl).

Mediante electroporación se transformaron las bacterias electrocompetentes DH5α. Se preparó ADN plasmídico de 9 colonias y se digirió con la enzima de restricción *AvaII* para corroborar el perfil, 4 bandas de 222, 613, 2009 y 2251 pb. Se eligió el clon 5 (foto no mostrada) para continuar con la caracterización debido a que su perfil es el que más se asemejó al buscado.

Se realizaron dos digestiones con *KpnI* y *PstI* para corroborar que efectivamente el clon 5 corresponde al plásmido buscado (Imagen II.3). Ambas enzimas poseen dianas de restricción tanto en el inserto como en vector. Los perfiles de bandas dieron como se esperaba. Con *KpnI* se obtuvieron dos bandas de 522 y 4573 pb. Con *PstI* se obtuvieron 3 bandas de 669, 1035 y 3391pb.

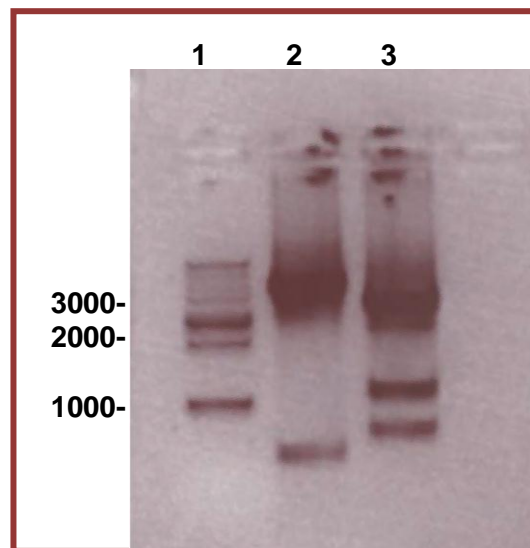


Imagen II.3 – Digestión del plásmido pGL3-E1BpolyA del clon 5- La calle 1 corresponde al marcador de peso molecular. La calle 2 corresponde a la digestión de dicho plásmido con la enzima *KpnI*. La calle 3 corresponde a la digestión con la enzima *PstI*.

III. Generación del vector pShuttle-I-F512E1ARb-E1BpolyA

Para la construcción del adenovirus de replicación condicional se utilizó un sistema de recombinación homóloga en bacterias BJ5183. Para esto fue necesario el ensamblado del plásmido pShuttle-I-F512E1ARb-E1B que incluyó en su estructura los genes E1A y E1B regulados por el promotor específico F512 ubicados entre brazos de recombinación.

Para escindir el gen E1B junto con la señal de poliadenilación desde el pGL3-E1BpolyA, se procedió a digerirlo con las enzimas de restricción *XhoI* y *SalI* en simultáneo, debido a que ambas tienen una actividad óptima en el mismo buffer. En paralelo, el plásmido pShuttle-I-F512E1ARb fue cortado con las enzimas *HpaI* y *SalI* secuencialmente y desfosforilado con la enzima CIP (fosfatasa de intestino de ternero) para evitar religación.

El vector pShuttle-I-F512E1ARb posee una delección en el gen E1A que impide que su producto se una a la proteína retinoblastoma. Éste es un segundo freno para impedir la replicación viral en células no tumorales, en las cuales la proteína retinoblastoma se encuentra activa (López *et al* 2012).

Luego de purificar la banda de 2225pb del pGL3-E1BpolyA y la banda de 8541pb del pShuttle-I-F512E1ARb se las cuantificó para su posterior clonado. Se realizó la reacción de ligación para unir el inserto E1BpolyA al vector y así generar la construcción pShuttle-I-

F512E1ARb-E1BpolyA. Luego se transformaron bacterias, se extrajo el ADN plasmídico y se lo digirió con *EcoRI*.

Se encontró que el clon 1 (Imagen III.1) correspondiente a la transformación realizada con la reacción de ligación de pShuttle-I-F512E1ARb-E1BpolyA presentaba el perfil buscado y se lo seleccionó para continuar la caracterización.

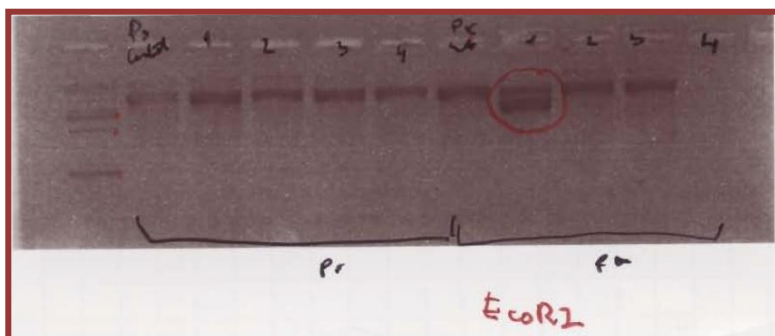


Imagen III.1 – Digestión de pShuttle-F512E1ARb-E1BpolyA con *EcoRI*. La calle 8 corresponde al clon seleccionado (clon 1).

Dicho clon fue amplificado y su ADN plasmídico fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* para confirmar que los fragmentos generados coinciden con los esperados para la construcción buscada (Imagen III.2). La digestión con *EcoRI* generó los fragmentos buscados de 5154, 3071 y 2571pb. La digestión con *HindIII* también fue satisfactoria, generando dos fragmentos de 8450 y 2346pb.

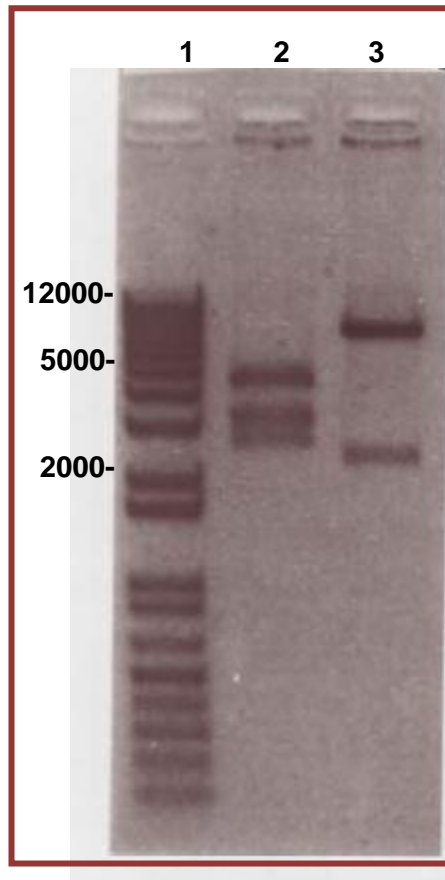


Imagen III.2 – Digestión del plásmido pShuttle-F512E1ARb-E1BpolyA del clon 1 con *EcoRI*, y *HindIII*- La calle 1 corresponde al marcador de peso molecular. La calle 2 corresponde al pShuttle-F512E1ARb-E1B digerido con *EcoRI*. La calle 3 corresponde al pShuttle-F512E1ARb-E1BpolyA digerido con *HindIII*.

Finalmente se realizó una PCR del ADN del clon 1 con los primers E1B-F y E1B-R (Imagen III.3) y se corroboró la presencia del gen E1B en el plásmido.

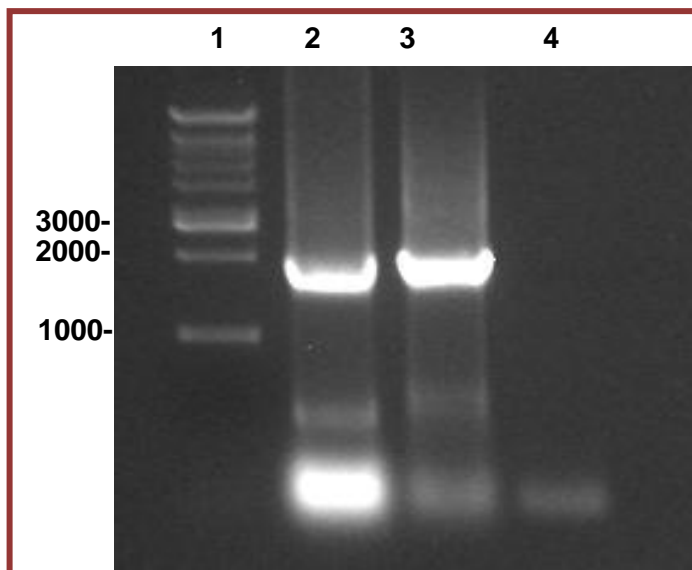


Imagen III.3 – Corroboración de la presencia del gen E1B en el vector pShuttle-F512E1ARb-E1BpolyA - Se realizó una PCR utilizando como molde al vector. La calle 1 corresponde al marcador de peso molecular, las calles 2 y 3 corresponden a dos reacciones de PCR del clon 1 con los primers E1B-F y E1B-R. La calle 4 corresponde al blanco.

IV. Ensamblado del genoma viral pVK500C-I-F512-E1ARb-E1BpolyA

Se utilizó un sistema de recombinación homóloga para ensamblar el genoma viral. Este sistema utilizó el vector de transferencia pShuttle-I-F512-E1ARb-E1BpolyA para colocar mediante una recombinación el casete de expresión (I-F512-E1ARb-E1BpolyA) en el esqueleto del genoma viral, que viene armado en otro plásmido llamado pVK500C 5/3 (Figura n.5 de la sección materiales y métodos).

El plásmido pShuttle-I-F512E1ARb-E1B debía ser linealizado con *PmeI* para permitir la recombinación dentro de las bacterias BJ5183.

En este punto nos encontramos con uno de los mayores problemas del proyecto, ya que la secuencia de corte de esta enzima está presente en la secuencia E1BpolyA y al realizar la digestión se observaban en el gel dos bandas de 8239 y 2557 pb (Imagen IV.1).

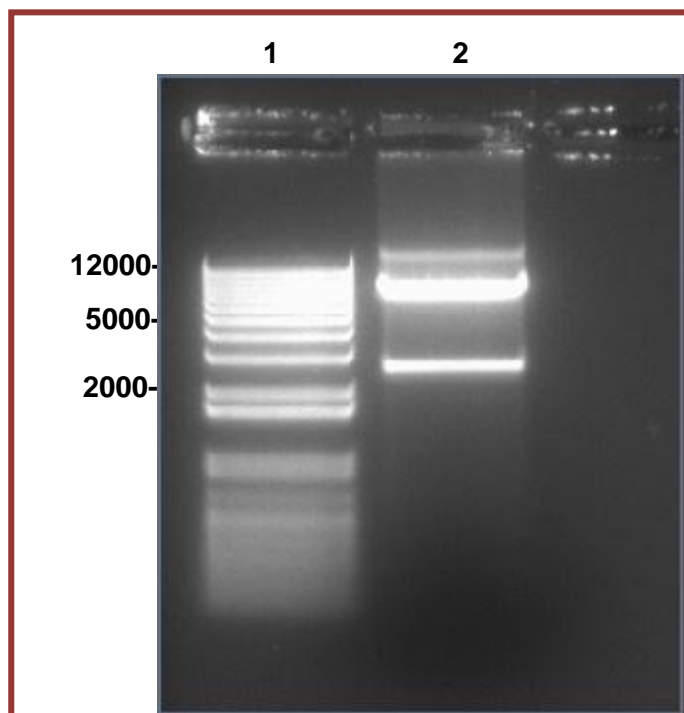


Imagen IV.1– Digestión de pShuttle-F512E1ARb-E1BpolyA con *PmeI*. La calle 1 corresponde al marcador de peso molecular. La calle 2 corresponde a la digestión enzimática.

Debido a esto se forjaron tres nuevas estrategias. La primera estrategia consistió en linealizar el plásmido pShuttle-I-F512E1ARb-E1BpolyA utilizando *ApaI*. Como muestra la Figura IV.1, la diana de restricción para la enzima seleccionada se encuentra dentro del brazo derecho de recombinación, con lo cual la recombinación probablemente se vería afectada. Se llevó a cabo la cotransformación del plásmido pShuttle-F512E1ARb-E1BpolyA y pVK500C 5/3 esperando que la reacción de recombinación se lograra utilizando por un lado el brazo de recombinación izquierdo, y por el otro, un fragmento del brazo de recombinación derecho del pShuttle-F512E1ARb-E1BpolyA (Figura IV.2). La segunda estrategia que desarrollamos consistió en digerir el pShuttle-I-F512E1ARb-E1BpolyA con la enzima de restricción *SnaBI* que posee una diana de restricción dentro del brazo izquierdo de homología (Figura IV.1); esperando que luego de la cotransformación, la recombinación homóloga se realice entre el brazo izquierdo de recombinación y el origen de replicación pBR322 (Figura V.3). La tercera estrategia incluye la digestión parcial del vector pShuttle-I-F512E1ARb-E1BpolyA con *PmeI*.

El objetivo de esta estrategia es obtener el vector cortado únicamente en el sitio que se encuentra entre los brazos de recombinación para que ésta pueda efectuarse (Figura IV.1).

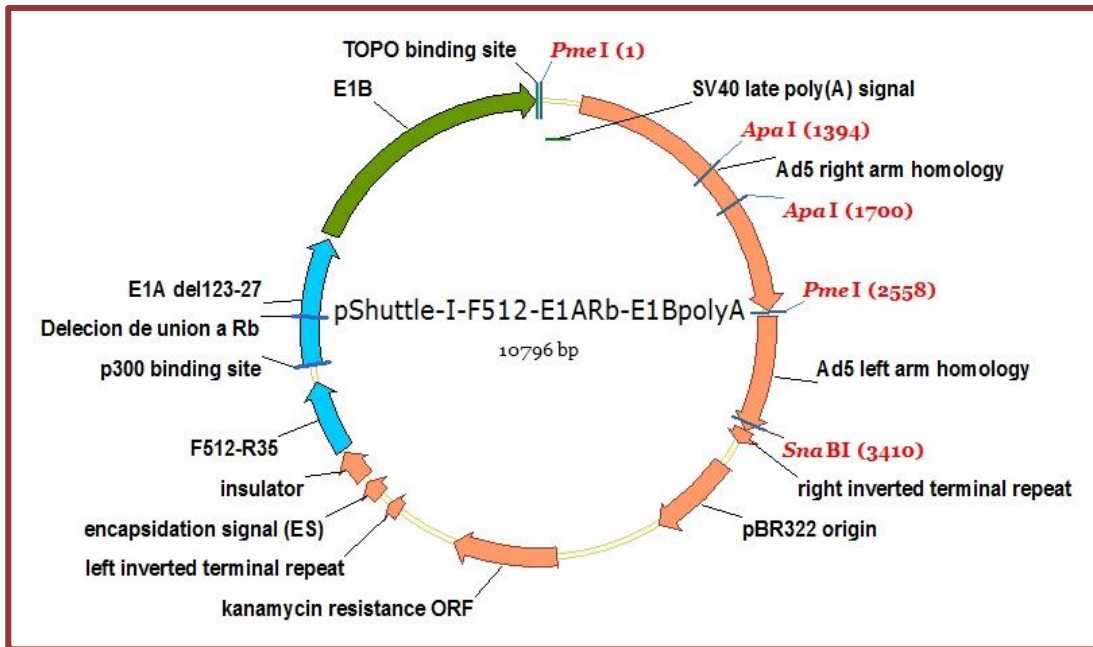


Figura IV.1 – pShuttle-F512E1ARb-E1B - Tres estrategias. En la figura se destacan las dianas de restricción utilizadas para poder linealizar el vector en las tres nuevas estrategias de recombinación.

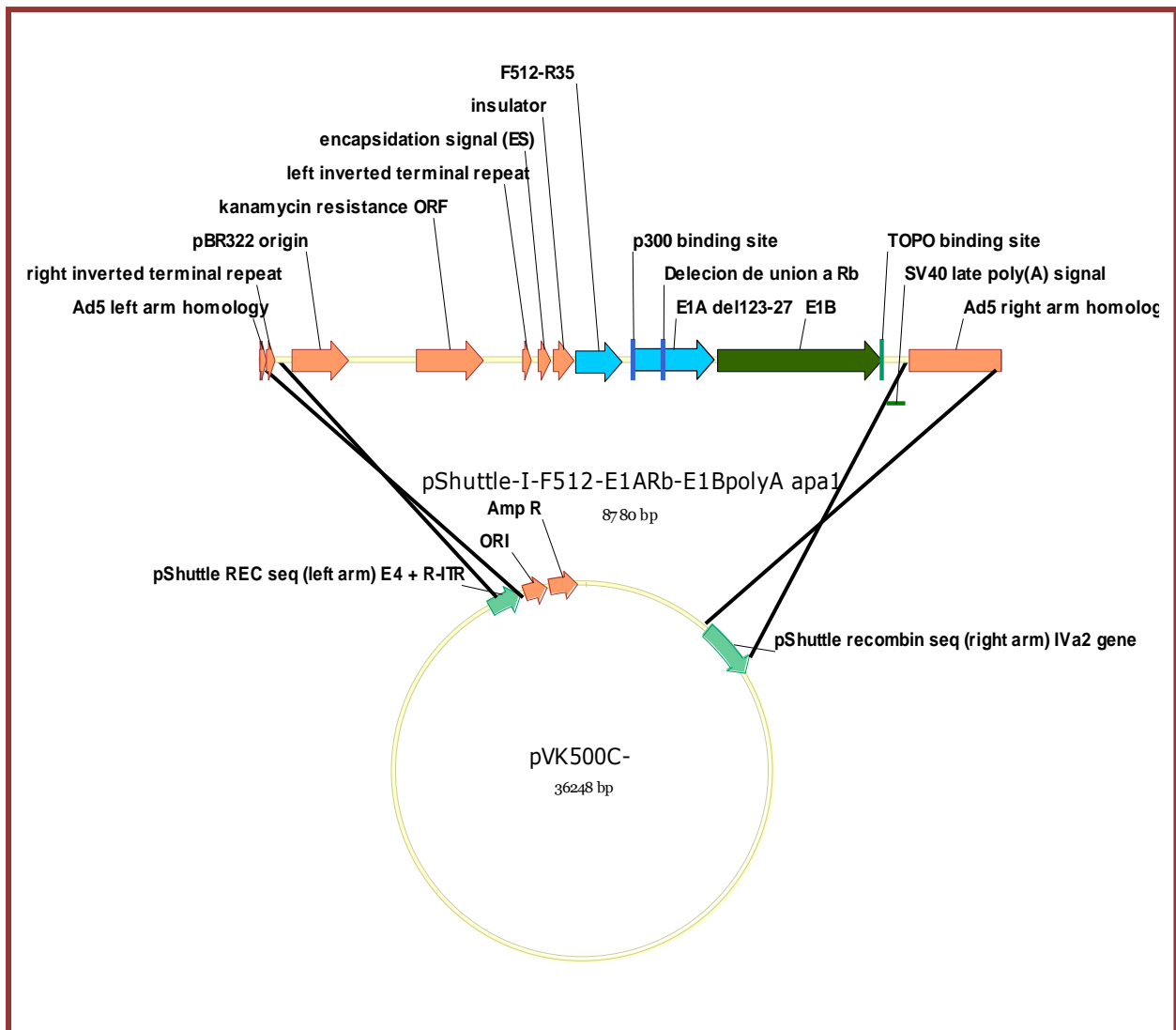


Figura IV.2 - Recombinación esperada de la estrategia de recombinación 1 - Se espera que la recombinación se dé por el brazo de recombinación izquierdo y por una parte del brazo de recombinación derecho.

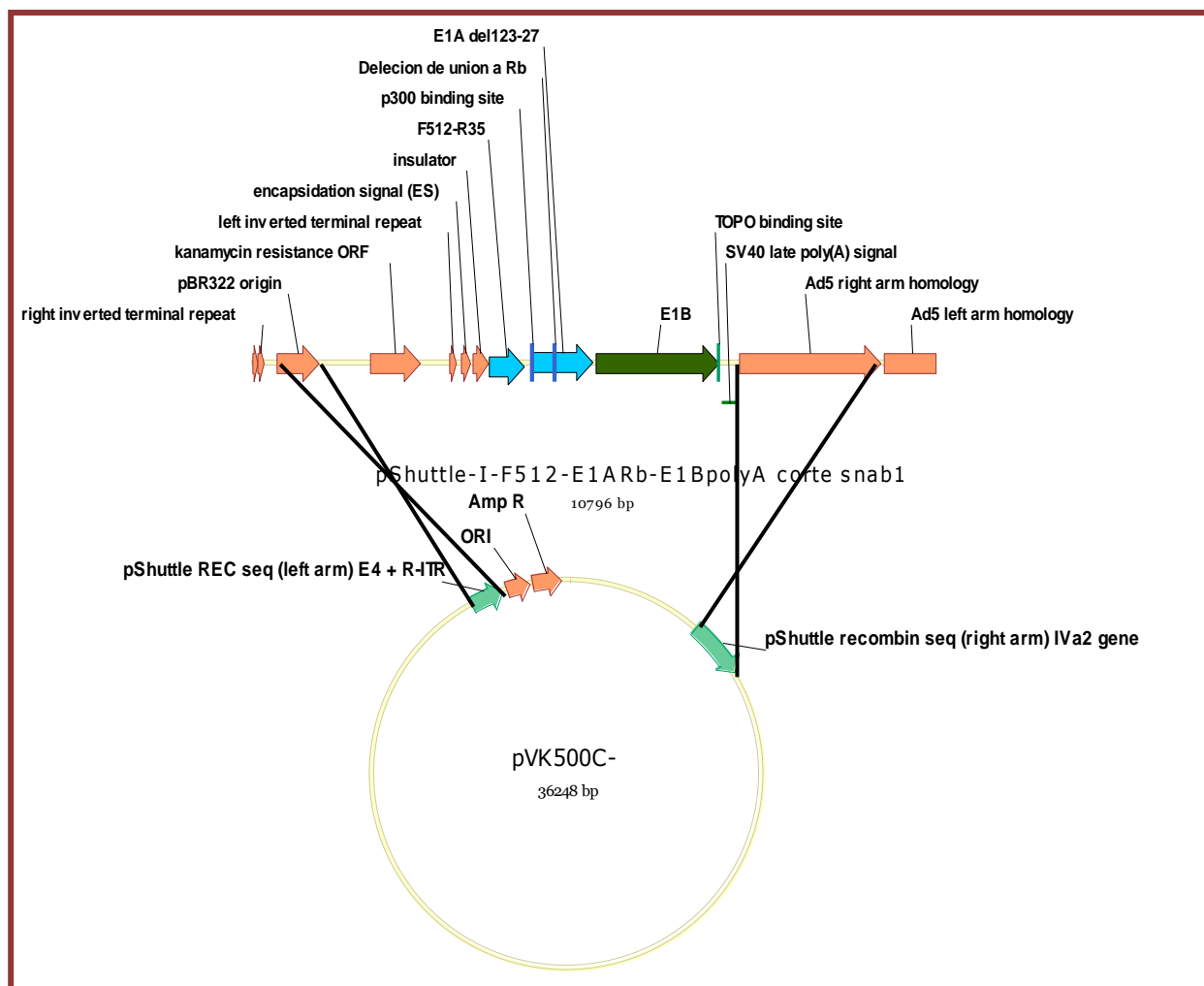


Figura IV.3 - Recombinación esperada de la estrategia de recombinación 2 - Se espera que la recombinación se dé por el origen de replicación y por el brazo de recombinación derecho.

Luego de las cotransformaciones correspondientes a las dos primeras estrategias se crecieron las bacterias y se seleccionaron 20 clones obtenidos mediante la primera y 10 obtenidos por la segunda. La selección se realizó utilizando el antibiótico kanamicina cuya resistencia se encuentra codificada en el vector pShuttle-I-F512E1ARb-E1BpolyA, de modo que sólo podían crecer aquellas bacterias que contenían dicho vector o el producto de recombinación.

Sólo dos clones presentaron el perfil de bandas buscado con la digestión con *HindIII*. Los clones llamados clon 3-4 y clon 3-8 (Imagen IV.2) correspondientes a la segunda estrategia fueron los seleccionados para su amplificación en bacterias DH5 α que no permiten nuevas recombinaciones.

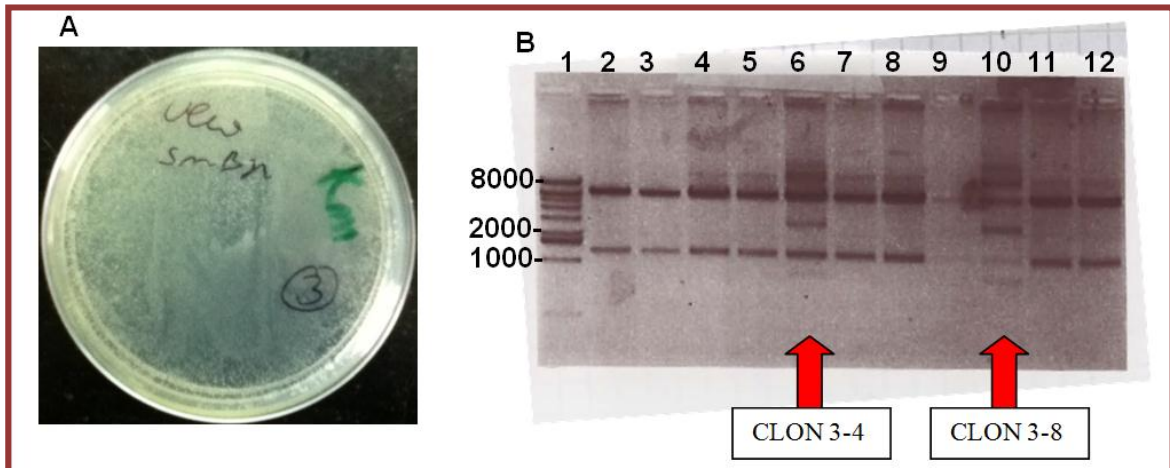


Imagen IV.2 – a) Colonias obtenidas luego de la cotransformación con pVK500C y pShuttle-F512E1ARb-E1BpolyA linealizado con *SnaBI*. b) Digestión de pVK500C-F512-E1ARb-E1BpolyA con *HindIII*. Las calles 6 y 10 presentan el perfil de bandas buscado y corresponden a los clones 3-4 y 3-8, los cuales provienen de las cotransformaciones con pVK500C y pShuttle-F512E1ARb-E1BpolyA linealizado con *SnaBI* (estrategia 2).

Debido a que las bacterias electrocompetentes utilizadas en el laboratorio estaban teniendo baja eficiencia decidimos también utilizar bacterias competentes para shock térmico y aplicamos los dos métodos: electroporación y transformación química.

Para corroborar el perfil esperado con *HindIII* se seleccionaron 3 clones correspondientes a las diferentes transformaciones (Imagen IV.3).

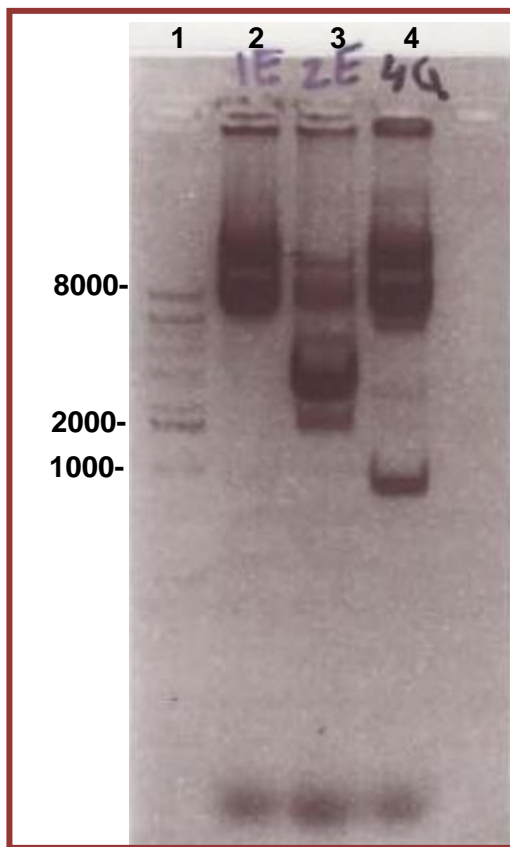


Imagen IV.3– Digestión de pVK500C -F512-E1ARb-E1B con *Hind*III. Las calles 2 y 3 corresponden a los clones electroporados y la calle 4 al de shock térmico.

Estos vectores fueron transfectados en células 911 pero la ausencia de partículas virales luego de 15 días en esta etapa final del proyecto, nos condujo a realizar la tercera estrategia de recombinación. Esta consistió en la digestión parcial del pShuttle-I-F512E1ARb-E1BpolyA con la enzima *Pme*I. Se realizaron tomas de muestra a diferentes tiempos, cortando la digestión al introducir los tubos eppendorf en nitrógeno líquido. Se decidió que el tiempo más conveniente para obtener el ADN lineal fue de 165 minutos. Se pueden observar dos bandas de alto peso molecular a las que nombramos UP y DOWN que corresponderían al plásmido en sus formas lineal y nickeada. Se realizó una digestión preparativa y dichas bandas fueron purificadas y cuantificadas por separado (Imagen IV.4). Con ambos productos y el plásmido pVK500C 5/3 se realizaron dos cotransformaciones de células BJ5183. Más tarde se seleccionaron 40 clones, sus plásmidos fueron purificados y digeridos con la enzima *Hind*III para buscar un perfil de bandas correspondiente al producto de la recombinación. En ninguno de los clones se encontró dicho perfil.

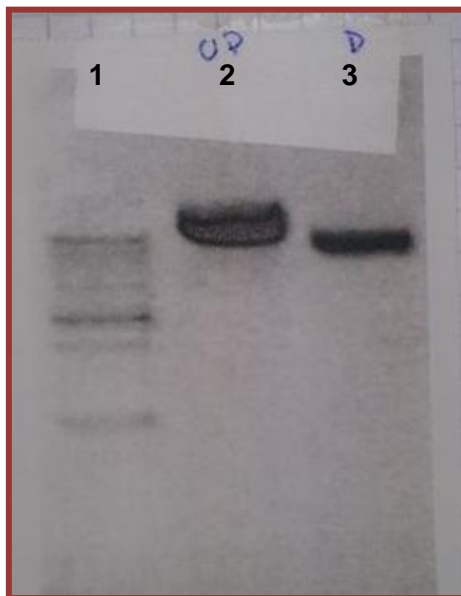


Imagen IV.4 -Purificación y cuantificación de las bandas UP y DOWN de la tercera estrategia- La calle 1 corresponde al marcador de peso molecular (5 μ l). La calle 2 corresponde a la banda UP (1 μ l). La calle 3 corresponde a la banda DOWN (2 μ l).

V. Transfección de células 911 para la obtención de la partícula viral y verificación del ensamblado del genoma viral

El ADN plasmídico obtenido en el paso anterior a partir de la segunda estrategia (linealización del pShuttle-I-F512E1ARb-E1BpolyA con *Sna*BI) fue digerido con la enzima de restricción *Pac*I para linealizarlo y con el resultado de la reacción se transfectaron mediante lipofección células 911 a la espera de en aproximadamente 12-15 días observar efecto citopático.

Luego del período de espera no se observó efecto citopático en ninguna placa. Por este motivo fue que se forjó la tercera estrategia para el ensamblado del genoma viral. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, no se obtuvieron resultados positivos.

Debido a esto se decidió verificar el ensamblado del genoma viral. Para ello se diseñaron dos reacciones de PCR para verificar la presencia de secuencias que se encuentren tanto en el vector pVK500C 5/3 como en el casete de expresión del pShuttle-I-F512E1ARb-E1BpolyA. Las secuencias seleccionadas fueron F512 del casete de expresión y E4 del

pVK500C 5/3. Como molde para las reacciones se utilizaron plásmidos obtenidos a partir de diferentes clones conseguidos a partir de la segunda estrategia. Solamente el pVK500C-I-F512-E1ARb-E1BpolyA debía dar positivo para ambas secuencias. En la Imagen V.1 se verifica que los clones llamados 8Cy 4Q poseen ambas secuencias, lo que sugeriría que dichos clones poseen al vector pVK500C-I-F512-E1ARb-E1BpolyA. Por otro lado, es importante mencionar que las secuenciaciones realizadas en el Instituto Leloir, como en el laboratorio coreano Macro Gen no arrojaron positividad para el gen E4 (secuencias no mostradas).

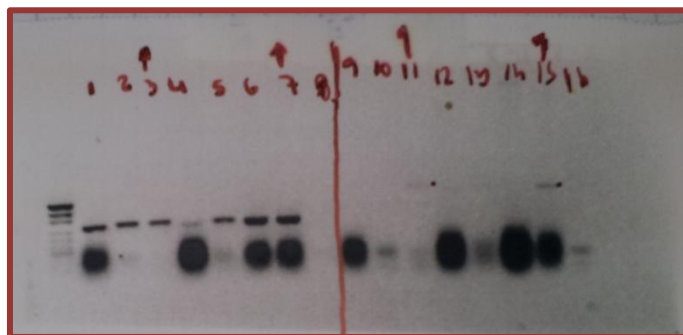


Imagen V.1–PCR para la verificación del ensamblado del genoma viral- En las calles 1 a 8 se observan los productos de las amplificaciones de la secuencia E4 y en las calles 9 a 16 los de la secuencia F512. Las calles 3 y 11 corresponden al clon 8C. Las calles 7 y 15 corresponden al clon 4Q. Las calles 8 y 16 corresponden a los blancos de reacción. El resto de las calles corresponden a otros clones que no poseían el constructo buscado.

Como nuestros objetivos incluían la caracterización de los virus obtenidos y no se contaba con los mismos decidimos realizar la caracterización del virus Ad-F512v4 con el que contaba el laboratorio; la misma se detalla a continuación.

VI. Caracterización *in vitro*

Se evaluó el efecto lítico mediado por la replicación del CRAd. Para ello se realizaron ensayos de sobrevida celular con dosis creciente del virus. El primer ensayo consistió en la medida de la viabilidad por el método MTS a los 6 días de infección. El segundo de ellos fue la evaluación a los 10 días de infección mediante la tinción con cristal violeta de las células que permanecieron adheridas a la placa.

Mediante el ensayo de MTS se encontró evidencia de que en las líneas celulares OV4 y SKOV3 el tratamiento con un MOI: 100 y un MOI: 1000 provoca mayor muerte de células que el tratamiento con un MOI menor. A su vez el tratamiento con MOI: 1000 genera mayor muerte celular que el tratamiento con MOI: 100. No se observaron diferencias significativas en la cantidad de células vivas luego de los tratamientos con MOIs: 0.0, 0.1, 1.0 y 10.0 (Figura VII.1).

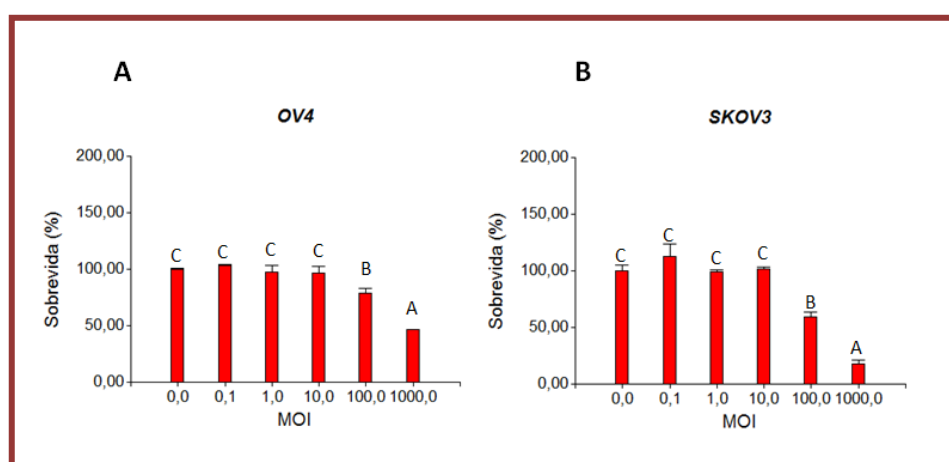


Figura VI.1 – Efecto lítico del CRAd. Análisis de sobrevivencia celular a dosis crecientes de Ad-F512v1. La figura A) corresponde al ensayo en células OV4, la figura B) corresponde con SKOV3. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Mediante el ensayo de viabilidad celular con cristal violeta se apreció el poder lítico del virus. Un grupo de células fue tratado con dosis crecientes de virus; mientras que otro grupo fue tratado, además, con TNF- α . Este tratamiento buscó mostrar diferencias en el efecto lítico del virus, ya que el mismo presenta una regulación de la replicación modulada a nivel transcripcional por el TNF- α (Viale *et al.*, 2012). Sin embargo, a simple vista no pudo apreciarse esta diferencia, excepto en las células OV4 a MOI de 10 (Imagen VI.1).

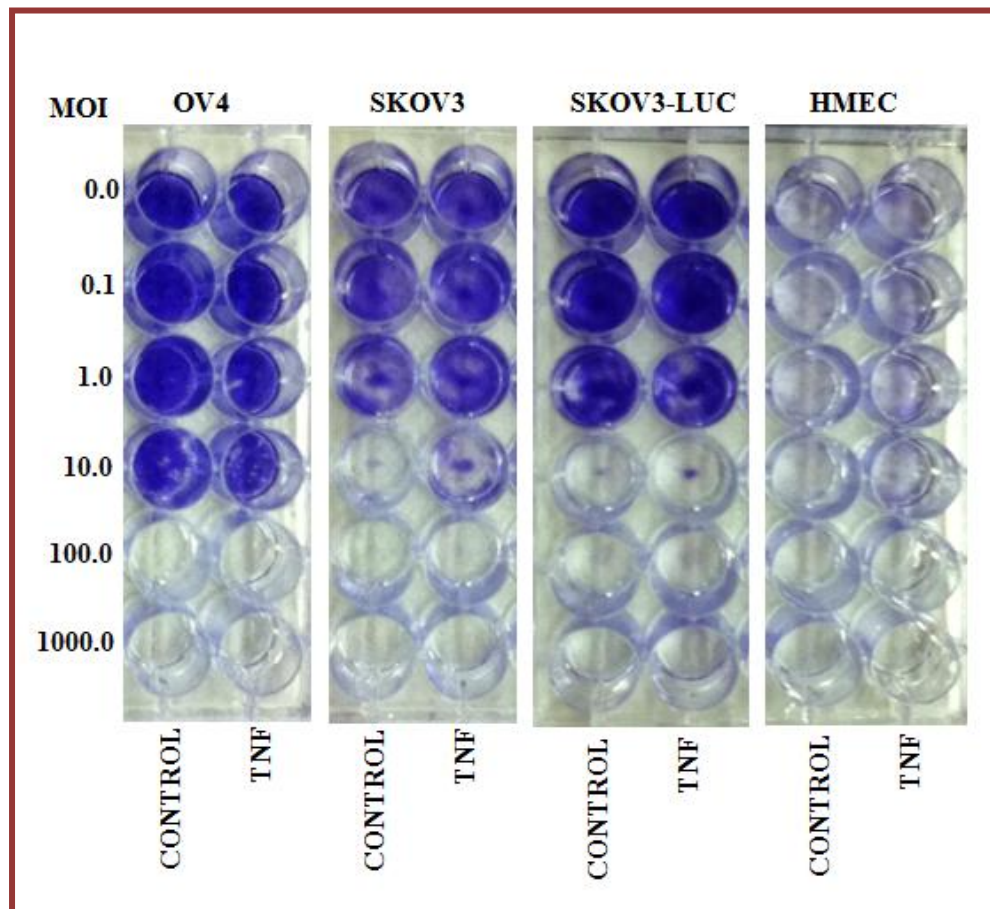


Imagen VI.1 – Efecto del Ad-F512 sobre células tumorales - Las líneas celulares fueron infectadas con MOIs crecientes del CRAd. La sobrevivencia se evaluó por fijación a los 10 días post-infección y posterior tinción con cristal violeta. Se verifica el efecto lítico del virus.

VII. Evaluación de los costos de la investigación

El costo total fue de: \$ 87.871,90 y las horas hombre invertidas fueron aproximadamente 240. Una evaluación más extensa se detalla en el Anexo II.



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

I. Discusión

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Aproximadamente un 70% de las muertes por cáncer registradas en 2008 se produjeron en países de ingresos bajos y medios. Se prevé que las muertes por cáncer sigan aumentando en todo el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2013).

Existen varias terapias para tratar esta enfermedad, pero muchas de ellas tienen la desventaja de no ser específicas y en su curso de acción pueden producir efectos secundarios no deseados que afectan la calidad de vida y mejoría de los pacientes.

Los avances en la terapia génica en los últimos años han demostrado su utilidad como tratamiento específico para combatir distintos tipos de cáncer (Gillet *et al*, 2009). Esto ha incentivado el desarrollo de diferentes tipos de vectores virales. En un principio los vectores utilizados fueron no replicativos pero luego, con el afán de aumentar la eficiencia, se comenzaron a utilizar vectores replicativos (Danthinne & Imperiale, 2000). Esto último implicó introducir en el genoma de los vectores métodos de control estrictos para evitar la replicación en células normales. De esta manera surgieron los adenovirus de replicación condicional que pretenden dirigir su replicación mediante mutaciones en genes virales esenciales o mediante promotores específicos.

En este proyecto final de ingeniería se introdujo el gen E1B al adenovector pShuttle-I-F512-E1ARb previamente diseñado. Se ha demostrado que la expresión de los genes que permiten la replicación viral pueden ser específicamente regulados mediante la introducción de promotores activos en las células tumorales y del estroma (Wang *et al*, 2008). El vector pShuttle-I-F512-E1ARb utilizado contiene un fragmento del promotor de SPARC, específico para células tumorales y células del estroma del tumor, que dirige la expresión del gen E1A (López, 2009; López *et al*, 2012). El gen E1B se insertó aguas abajo del gen E1A esperando que sea regulado por el mismo promotor.

E1B es un gen necesario para conseguir una alta eficiencia de la replicación viral. Posee dos productos: E1B 19k, el cuál inactiva la vía apoptótica mediada por Bax; y E1B 55k, que está involucrado en la inhibición de p53, el transporte de ARNm viral y el bloqueo del ARNm celular. Un rol crucial que posee E1B 55k es el de desregular el ciclo celular durante la infección lítica. Los mutantes que fallan en la expresión de este gen se replican pobremente, produciendo aproximadamente 35 veces menos progenie viral que el virus silvestre. En

síntesis, el gen E1B permite al virus superar las restricciones impuestas por las células sobre la replicación viral (Goodrum et al, 1996).

A fin de clonar el gen E1B en el adenovector, se desarrolló una estrategia de clonado. El gen E1B se obtuvo haciendo una PCR que utilizó como molde ADN genómico de células HEK293. Para su correcta expresión se introdujo la señal de poliadenilación río abajo del gen E1B. Dicha señal se obtuvo a partir de un vector de expresión que la contenía río abajo del gen de la luciferasa. Posteriormente se insertó la secuencia E1B-polyA en el vector pShuttle-I-F512-E1ARb y el constructo formado fue linealizado para lograr finalmente, mediante recombinación homóloga con el vector pVK500C, el genoma viral. Fue un desafío linealizar el vector pShuttle-I-F512-E1ARb-E1B, debido a que la secuencia E1B-polyA insertada en éste poseía la misma diana de restricción que la que el vector tenía diseñada para linealizarlo. Por este motivo se forjaron tres estrategias para poder linealizarlo. La segunda estrategia que consistió en linealizarlo con la enzima *SnaBI* fue la que generó el producto con el cual continuamos el proyecto.

Se pudo corroborar a través de una amplificación por PCR del gen E1B utilizando como molde ADN plasmídico extraído de las bacterias que fueron transformadas con el constructo pShuttle-I-F512-E1ARb-E1B, que efectivamente el gen E1B estaba clonado.

Luego de la recombinación homóloga se transfectaron células 911 con el genoma viral a la espera de obtener partículas virales. Una vez transcurridos los 15 días no se observó el efecto citopático esperado, que es normalmente causado por la presencia de partículas virales. Por este motivo se realizó un experimento para verificar el ensamblado del genoma viral, que consistió en dos PCRs que amplificaban secuencias presentes tanto en el plásmido pVK500C como en el casete del plásmido pShuttle-I-F512-E1ARb-E1B. Dos clones dieron positivo para ambas secuencias, lo que sugeriría que dichos clones poseen al vector pVK500C-I-F-512 E1ARb-E1B.

Una de las hipótesis que explicaría la ausencia de partículas virales a la hora de transfectar las células 911 es que durante la recombinación homóloga en bacterias, el genoma viral haya perdido una secuencia vital para lograr el correcto ensamblado del virus. Otra hipótesis es que el genoma viral sea muy grande por el agregado del gen y por ende su encapsidación sea dificultosa, tornando necesario generar muchas placas de células transfectadas hasta lograr ver un evento de rescate viral.

Consideramos que sería necesario realizar más ensayos para corroborar estas hipótesis.

Como nuestros objetivos incluían la caracterización de los virus obtenidos y no se contaba con los mismos, decidimos realizar la caracterización del virus Ad-F512v1. Se verificó el efecto lítico del virus en diferentes líneas tumorales, así como también en presencia de TNF α que mimetiza un estado fisiológico de inflamación, al cual debería responder nuestro promotor quimera con un motivo respondedor a NF κ B (Viale *et al.*, 2012).

De haber obtenido nuestro virus, primero debería haber corroborado la expresión de E1B. Esto lo hubiéramos hecho mediante un Western Blot, de células infectadas con dicho virus. Posteriormente hubiéramos corroborado si su actividad lítica superaba a la actividad oncolítica del virus parental AdF512v1 y finalmente, hubiésemos comprobado si esta mejora del virus podría verse reflejada en un ensayo *in vivo* con animales inmunodeprimidos portando metástasis intraperitoneales de cáncer de ovario.

Según el estudio realizado el costo total de esta investigación fue de \$87.871,90 y se invirtieron 240 horas hombre.

II. Conclusiones

El objetivo general de este proyecto final de ingeniería implicó la construcción de un adenovirus oncolítico que pueda replicarse en los principales componentes de un tumor mediante la expresión de las proteínas virales E1A y E1B dirigidas por un promotor activo en el tumor y en el estroma. A partir de los resultados obtenidos podemos concluir que:

- El clonado del gen de la proteína E1B en el vector plasmídico pShuttle-I-F512-E1ARb fue exitoso. Se pudo amplificar correctamente el gen E1B, introducirlo en un vector TOPO-TA y más tarde adicionarle la secuencia de poliadenilación al gen E1B mediante su introducción en el plásmido pGL3-promoter.
- Se obtuvo el genoma viral por co-transformación en bacterias del vector plasmídico pShuttle-I-F512-E1ARb-E1B y el plásmido pVK500C 5/3 que contiene el resto del genoma viral.
- No se logró recuperar ni amplificar el adenovirus en células eucariotas.
- Se logró la caracterización *in vitro* del adenovirus Ad-F512v1. Se corroboró su efecto oncolítico en líneas celulares: SKOV3, SKOV3-Luc, OV4 y HMEC.
- El costo total de la investigación fue de \$ 87.871,90.



REFERENCIAS

ALBERTS, Bruce; JOHNSON, Alexander; LEWIS, Julian; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WALTER, Peter; WILSON, John; HUNT, Tim; DURFORT I COLL, Mercè; LLOBERA I SANDE, Miquel. *Biología molecular de la célula*. 5a ed. Barcelona: Omega, 2010. Capítulo 18, Apoptosis. ISBN 9788428215077.

ALBINI, A. & SPORN, M.B. *The tumour microenvironment as a target for chemoprevention*. Nat Rev Cancer, 2007. 7(2): p. 139-47.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer causes. [en línea]. [consulta 2 oct. 2013]. <<http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/index>>.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2013. [en línea]. [consulta 2 oct. 2013]. <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-036845.pdf>>

AMERICAN SOCIETY OF CELL & GENE THERAPY. ©200-2011. [en línea]. [consulta 2 oct. 2013]. <<http://www.asgct.org/general-public/educational-resources/terminology>>

BERK, Arnold J. *Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus*. Oncoge, 2005, **24**, p. 7673-7685

BERK, Arnold J. Adenoviridae. En FIELDS, Bernard N; **et al.** *Virology*. Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

CHLENSKI, A., et al., *SPARC enhances tumor stroma formation and prevents fibroblast activation*. Oncogene, 2007. 26(31): p. 4513-22.

CLARK, C.J. & SAGE, E.H. A prototypic matricellular protein in the tumor microenvironment - Where there's SPARC, there's fire. J Cell Biochem, 2008.

- DANTHINNE, X. & IMPERIALE, M.J. *Production of first generation adenovirus vectors: a review*. *Gene Therapy*, 2000. **7**: p 1707–1714.
- EVANS, Jared D. y HEARING, Patrick. *Adenovirus Replication*. En CURIEL, David y DOUGLAS, Joanne. *Adenoviral vector for gene therapy*. California, EEUU 2002: Academic Press. Capítulo 3, P 39-70 ISBN 0-12-199504-6
- FALLAUX, F.J., KRANENBURG O., CRAMER S.J., HOUWELING A., VAN ORMONDT H., HOEBEN R.C., VAN DER EBA.J. *Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors*. *Hum Gene Ther*. 1996. **20** ; 7(2):p.215-22.
- FELGNER, Philip L.,GADEK, Thomas R.,HOLM,Marilyn,ROMAN, Richard,CHAN, Hardy W.,WENZ, Michael, NORTHROP, Jeffrey P.,RINGOLDS, GORDON M. and & DANIELSEN, Mark; *Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 1987; **84**: p. 7413-7417.
- GENE THERAPY CLINICAL TRIALS WORLDWIDE. Updated July 2013. [en línea]. [consulta 18 oct. 2013].<<http://www.abedia.com/wiley/>>.
- GLOBOCAN 2008. IARC 2010. [en línea]. [consulta 2 oct. 2013].<<http://globocan.iarc.fr/>>
- GOVERDHANA, S.;PUNTEL, M.;XIONG, W.;ZIRGER, J. M.; BARCIA, C.; CURTIN, J. F.; SOFFER, E. B.; MONDKAR, S.; KING, G. D.; HU, J.; SCIASCIA, S. A.; CANDOLFI, M.; GREENGOLD, D. S.; LOWENSTEIN, P. R. & CASTRO, M. G.; *Regulatable Gene Expression Systems for Gene Therapy Applications: Progress and Future Challenges*. *MolTher*, 2005 ;**12**(2): p. 189–211.
- HAKKARAINEN, Tanja & HEMMINKI, Akseli. *Enhancement of cancer gene therapy with modified viral vectors and fusion genes*. *Gene Therapy and Molecular Biology*. 2005. (9):p.153-168.

INFANTE, J.R., et al., *Peritumoral fibroblast SPARC expression and patient outcome with resectable pancreatic adenocarcinoma*. J Clin Oncol, 2007. 25(3): p. 319-25.

INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER. Estadísticas. Argentina, febrero 2013 [en línea]. [consulta 2 oct. 2013].<<http://www.msal.gov.ar/inc/index.php/acerca-del-cancer/estadisticas>>.

KALLURI, R. & ZEISBERG M., *Fibroblasts in cancer*. Nat Rev Cancer, 2006. 6(5): p. 392-401.

KATO, Y., et al., *Induction of SPARC by VEGF in Human Vascular Endothelial Cells*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001. 287(2): p. 422-426.

KOTIN, Robert M.; SINISCALCO, Marcello; SAMULSKI, R. Jude; ZHU, Xiaodong; HUNTER, Lynne; LAUGHLIN, Catherine A.; MCLAUGULIN, Susan; MUZYCZKA, Nicholas; ROCCHI, Mariano & BERNS, Kenneth I.; *Site-specific integration by adeno-associated virus*. Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 1990; **87**: p. 2211-2215.

KHURI, Fadlo R; NEMUNAITIS, John; GANLY, Ian; ARSENEAU, James; TANNOCK, Ian; ROMEL, Larry; GORE, Martin; IRONSIDE, Janet; MACDOUGALL, R.H.; HEISE, Carla; RANDLEV, Brita; GILLENWATER, Ann; BRUSO, Patricia; KAYE, Stanley; KI HONG, Waun & KRIN, David. *A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer*. **NATURE MEDICINE**, 2000. **6(8)**:p. **879-885**.

LACHMANN, Robin H. & EFSTATHIOU, Stacey. *Use of herpes simplex virus type 1 for transgene expression within the nervous system*. Clinical Science, 1999; **96**: p. 533-541.

- LANGLEY, Robert R. & FIDLER, Isaiah J. *The seed and soil hypothesis revisited—The role of tumorstroma interactions in metastasis to different organs*. Int. J. Cancer, 2011. **128**: p. 2527–2535.
- LEDDA, F., et al., The expression of the secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) is associated with the neoplastic progression of human melanoma. J Invest Dermatol, 1997. 108(2): p. 210-4
- LODISH, Harvey; BERK, Arnold; MATSUDAIRA, Paul; KAISER, Chris A.; KRIEGER, Monty; SCOTT, Matthew P.; ZIPURSKY, S. Lawrence y DARNELL, James. *Biología molecular y celular*. 5a ed. Buenos aires: médica panamericana, 2006. Capítulo 23, cáncer. P. 935-943. Isbn 950-06-1374-3.
- LÓPEZ, M Verónica; RIVERA, Ángel A; VIALE, Diego L; BENEDETTI, Lorena; CUNEO, Nicasio; KIMBALL, Kristopher J; WANG ,Minghui; DOUGLAS , Joanne T; ZHU ,Zeng B; BRAVO , Alicia I; GIDEKEL, Manuel; ALVAREZ, Ronald D; CURIEL ,David T; PODHAJCER, Osvaldo L. *A Tumor-stroma Targeted Oncolytic Adenovirus Replicated in Human Ovary Cancer Samples and Inhibited Growth of Disseminated Solid Tumors in Mice*. Mol Ther, 2012. 20(12):p. 2222-33.
- LÓPEZ, M.V., VIALE, D.L., CAFFERATA, E.G.A., BRAVO, A.I., CARBONE, C. *et al.* (2009) *Tumor Associated Stromal Cells Play a Critical Role on the Outcome of the Oncolytic Efficacy of Conditionally Replicative Adenoviruses*. PLoS ONE 4(4): e5119.
- LUNDSTROM, Kenneth; *Latest development in viral vectors for gene therapy*. TRENDS in Biotechnology, 2003; **21** (3): p. 117-122.
- MARX, J., *Cancer biology. All in the stroma: cancer's Cosa Nostra*. Science, 2008. 320(5872): p. 38-41.

MUÑOZ, A.; MAÑÉ J. M. VITERI A.; BARCELÓ R.. *Introducción al tratamiento oncológico: indicaciones e intención de los tratamientos*. GacMed Bilbao, 2003; **100**:p.133-138

NARVAIZA I; MAZZOLINI G.; QIAN C; PRIETO J; MELERO I. *Vectores adenovirales de primera generación, el vector por excelencia en inmunoterapia génica del cáncer*. *Inmunología*, 2003. **22**:p. 225-242.

NIIDOME, T. & HUANG, L.; *Gene Therapy Progress and Prospects: Nonviral vectors*. *Gene Therapy*. 2002; **9**: p. 1647–1652.

NORGEN BIOTEC CORP. Updated July 2013. [en línea]. [consulta 25 oct. 2013]. <<http://norgenbiotek.com/display-resource.php?ID=234/>>.

OOSTERHOFF D. y VAN BEUSCHEM V.W. *Conditionally replicating adenoviruses as anticancer agents and ways to improve their efficacy*. *Journal of experimental therapeutics and oncology* 2004. **4**, p 37-57.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. ©2013. Nota descriptiva N° 297. [en línea]. [consulta 2 oct. 2013]. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>>.

PELKA, Peter; ABLACK, Jailal ; FONSECA, Gregory J ; YOUSEF, Ahmed F; MYMRYK, Joe S. *Intrinsic Structural Disorder in Adenovirus E1A: a Viral Molecular Hub Linking Multiple Diverse Processes*. *Journal of virology*. 2008. (82):p. 7252–7263

PODHAJECER, O.L., et al., *The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host*. *Cancer Metastasis Rev*, 2008.

ROEMER, Klaus & FRIEDMANN, Theodore; *Concepts and strategies for human gene therapy*. *Eur. J. Biochem*, 1992; **208**: p. 211 -225 (1992)

- RONNOV-JESSEN, L., PETERSEN, O.W., BISSELL, M.J. *Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction*. *Physiol Rev*, 1996. 76(1): p. 69-125.
- RUMPLER, G., et al., *Identification of differentially expressed genes in models of melanoma progression by cDNA array analysis: SPARC, MIF and a novel cathepsin protease characterize aggressive phenotypes*. *Exp Dermatol*, 2003. 12(6): p. 761-71.
- RUSSELL C. W., *Update on adenovirus and its vectors*. *Journal of General Virology*, 2000. 81: p. 2573-2604.
- SALLES, Arleen; *Reflexiones sobre la bioética y la biotecnología*. *Perspectivas bioéticas*. Nobuko, 2012. 32: p. 81-95.
- SMITH Jason G; *Adenovirus*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2010. 343: p. 195-224.
- STEWART, Phoebe L; *Adenovirus Structure*. En CURIEL, David T. & DOUGLAS Joanne T. *Adenoviral Vectors for Gene Therapy*, 2002. 1a. ed. USA: Elsevier Science, 2002, p. 39-70. ISBN 0-12-199504-6.
- SUGIMOTO, H., et al., *Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment*. *Cancer Biol Ther*, 2006. 5(12): p. 1640-6.
- WONG H.H, LEMONIE N.R y WANG Y. *Oncolytic viruses for cancer therapy: Overcoming the obstacles*. *Viruses* 2010, 2, p.78-106.

ANEXO

I. Análisis de la secuencia

En el siguiente análisis se presentan los fragmentos secuenciados de los clones 3 y 12. Las secuencias obtenidas fueron enfrentadas a la base de datos del GenBank mediante un BLASTn, el cual compara una secuencia de nucleótidos contra una base de datos que contenga también secuencias nucleotídicas. Además se resaltaron los sitios de reconocimiento de las enzimas *XbaI* y *XhoI* para demostrar su presencia.

CLON 3

```
>clon3----t3
TTGATCAGTTAAAACGAATTCGCCCTTCTCTAGATCAATCTGTATCTTCATCGCTAGAGC
CAAACCTCAGCGCGGGTGCAGGCCAGCACCAAGTGATCGGGCCTCAGCTCCTCGGTCACAT
CCAGCATCACAGGCTGGTTCCATAATGTTTACCGCCACACTCGCAGGGTCTGCACCTGG
TGCGGGTCTCATCGTACCTCAGCACCTTCCAGATCTTCATGGTCATGTCGAACACCCCGT
TCAGGTTACCTTGGACATGCTCTCGGGCTCAAGCAATATCTTAGTGTGACTCAAATTGC
ATTGGTAAGGTAGGAACACCCCTCCTGTTACCCAAATGCAAGGAACAGCGGGTCAGTA
TGTATGCTCAAACACTGGCCAGGCCTTGCGAGAGTGGCTGGCTACGTGAATGGTCTTCA
GCAGGTGACAGTTGCCGTCGAGCAGGTCAGCATCTGAGAGGCCCTGTCTCGCAGTTGC
CACATACCATGTTATGCTTAATCACAGCCACGCTTTTCACTAGCATGAAGCAACCACAGT
CGGAGGCCACATTTGTGGCGCACCTGGAGTTACCCTCAGACAGGATACCCAAGGTACACC
TTTCAAAGAGGCATTTCTTAATTGAAGCCCTGCTTTTGGGGGACACACCACCCCTTCC
AGCAGCAGTAAAAGGCACAGCCCCGAACCTTACATCGGTCCAGGCTTCCACACAGGTAT
TGTTAAAACCCATAGAAGCTTACACCGTGTAGGATAATGGTTGGTATTGGCCAGGAAAAC
CCGGACCGCTAAAAATTGGGGGCCAGTAAACCTTTACATTATTAATAACCAACTCCCGT
CCCATGCCCAAGGCATTGAATGAAATCCCCCTTATTGATCTTTTATCAAAAATTCAT
TAAGTTTAAAAGTAAGAATACAACATCTTGTTCATATTGATCCAGAAGTGGATTGTTCCGC
TCAAAAAAAAAATATCAAATT
```

TCTAGA→ Es la secuencia de reconocimiento de *XbaI*.

Como la secuencia de reconocimiento *XbaI* es seguida por una secuencia TC, la dammetilasa GATC generará una metilación que bloqueará el sitio *XbaI*.

```
>clon3----t7
TAATTCGGGCCGCGATTTCGCCCTTGTCTCGAGGCGTGTGTGGTTAACGCCTTTGTTTGCTG
AATGAGTTGATGTAAGTTTAAATAAAGGGTGAGATAATGTTTAACTGCATTTCCGTTTCAT
TGGGGCGGGGCTTAAAGGGTATATAATGCGCCGTGGGCTAATCTTGGTTACATCTGACCT
CATGGAGGCTTGGTATTTCTTGGATATTC
```

CTCGAG→Es la secuencia de reconocimiento de *XhoI*.

En la siguiente tabla (tabla 1) se detallan los valores obtenidos mediante los análisis BLASTn de cada una de las secuenciaciones del TOPO-E1B proveniente del clon 3, obtenidas utilizando los primers universales T3 y T7. Dichos valores corresponde al alineamiento entre el fragmento secuenciado y el genoma completo del Adenovirus c serotipo 5 humano. Se llegó a la conclusión de que el gen clonado es efectivamente E1B. Se consideraron buenos alineamientos aquellos que entregan un e-value < 1e-8. Como no se pudo secuenciar el inserto en toda su longitud, no fue posible determinar si existe una secuencia interrumpiendo dicho gen. Esta conjetura proviene de que el tamaño observado del producto de PCR obtenido desde backbone es mucho mayor al esperado, de aproximadamente 1950pb.

Tabla 1- Estadísticos BLASTn de la secuenciación del clon 3

Clon 3			
Secuenciación con	AccesionNumber	Score	E-Value
T3	gbAY339865.1	1379	0.0
T7	gbAY339865.1	266	6e-68

CLON 12

```
>clon12-----t3
CAATCTATATATTTCAATGCCGCGATTACGATTTCGCCCTTCTCTAGATCAATCTGTATCT
TCATCGCTAGAGCCAAACTCAGCGGGTGCAGGCCAGCACCAAGTGATCGGGCCTCAGC
TCCTCGGTACATCCAGCATCACAGGCTGGTTCCTAATATGTTTACCGCCACACTCGCAG
GGTCTGCACCTGGTGCAGGCTCATCGTACCTCAGCACCTTCCAGATCTTCATGGTCATG
TCAAACACCCCGTTCAGGTTACCTTGGACATGCTCTCGGGCTCAAGCAATATCTTAGTG
TGACTCAAATTGCATTGGTAAGGTAGGAACACCCCTCCTGTTACCCAAATGCAAGGAA
CAGCGGGTCAGTATGTTATGCTCAAACACTGGCCAGGCCCTTGCAGAGTGGCTGGCTACG
TGAATGGTCTTCAGCAGGTGACAGTTGCCGTCAGCAGGTGACATCTGAGAGGCCCTG
TCCTCGCAGTTGCCACATACCATGTTATGCTTAATCACAGCCACGCTTTTCACTAGCATG
AAGCAACCACAGTCGGAGGCCACATGTTGGCGCACCTGGAGTTACCCTCAGACAGGATA
CCCAAGGTACACCTTTCAAAGAGGCATTTCTTAATTGAAGCCCTGCTTTTGGGGCGACAC
ACCACCTCCTTCCAGCAGCAGTAAAAGGCACAGCCCCGAACCTTACATCGGTCCAGGCT
TCCACACAGGTATTGTTAAACCCATAGAAGCTTACACCGTGTAGGATAAGGTTGGTATTG
GCCAGGAAAACCGTACCGCTAAAATTGGGGGCCAGTAAACCTTACATTCATAATACCAC
CCCGTCCCATGCCAAGCAACCCCGGGCACATATTTTATCATGCCTACATCTAAGGCCA
CCCTATCTCGTATCTATCTCCAACCTCCGGCCCCGGATTCCCCCGAGAAT
```

TCTAGA → Es la secuencia de reconocimiento de *Xba*I.

Como la secuencia de reconocimiento *Xba*I es seguida por una secuencia TC, la dammetilasa GATC generará una metilación que bloqueará el sitio *Xba*I.

```
>clon12-----t7
GTGTTTATTTTACTTTAGTGGGTACGGCGGATCGCCCTTGCTCGAGGCGTGTGTGGT
TAACGCCTTTGTTTGTGAATGAGTTGATGTAAGTTTAAATAAAGGGTGAGATAATGTTTA
ACTTGCATGGCGTGTAAATGGGGCGGGCTTAAAGGGTATATAATGCGCCGTGGGCTAA
TCTTGGTTACATCTGACCTCATGGAGGCTTGGGAGTGTGTTGGAAGATTTTTCTGCTGTGC
GTAACCTTGCTGGAACAGAGCTCTAACAGTACCTCTTGGTTTTGGAGGTTTTCTGTGGGGCT
CATCCCAGGCAAAGTTAGTCTGCAGAATTAAGGAGGATTACAAGTGGGAATTTGAAGAGC
TTTTGAAATCCTGTGGTGAGCTGTTTGATTCTTTGAATCTGGGTCACCAGGCGCTTTTCC
AAGAGAAGGTCACCAAGACTTTGGATTTTTCCACACCGGGGCGCGCTGCGGCTGCTGTTG
CTTTTTTGAGTTTTATAAAGGATAAATGGAGCGAAGAAACCCATCTGAGCGGGAGGTACC
TGCTGGATTTCTGGCCATGCATCTGTGGAGAGCGGTTGTGAGACACAAGAATCGCCTGC
TACTGTTGCTTCCGTCCGCCCGGGCGATAATACCGACGGAGGAGCAGCAGCAGCAGCAGG
AGGAAGCCAGGCGGGCGGGCAGGAGCAGAGCCCATGGAACCCGAGAGCCGGCCTGGACC
CTCGGGAATGAATGTTGTACAGGTGGCTGAACTGTATCCAGAAGTGAAGCGCATTTTGAC
AATTACAGAGGATGGGCAGGGGCTAAGGGGGTAAAGAGGGAGCGGGGGGCTTGTGAGG
CTACAGAGGAGGCTAGGAAATCTAGCTTTAAGCTTTATGAACCAGACACCGGTCTGAAGT
GTATACTTTTTCAACAGATCAGGAATATTGCGCCTAATTGAAGCCTTTGAATCCGTGTGC
GTC
```

CTCGAG → Es la secuencia de reconocimiento de *XhoI*

En la siguiente tabla (tabla 2) se detallan los valores obtenidos mediante los análisis BLASTn de cada una de las secuencias del TOPO-E1B proveniente del clon 12, obtenidas utilizando los primers universales T3 y T7. Dichos valores corresponden al alineamiento entre el fragmento secuenciado y el genoma completo del Adenovirus c serotipo 5 humano. Se llegó a la conclusión de que el gen clonado es efectivamente E1B. Se consideraron buenos alineamientos aquellos que entregan un e-value < 1e-8

Tabla 2- Estadísticos BLASTn de la secuenciación del clon 12

Clon 12			
Secuenciación con	AccessionNumber	Score	E-Value
T3	gbAY339865.1	1492	0.0
T7	gbAY339865.1	1503	0.0

II. Evaluación de los costos de la investigación

“En principio, la actitud de la bioética progresista es la más adecuada en sociedades progresistas como la nuestra. Pero es crucial que ésta no olvide su carácter. La bioética debe siempre mantener una actitud cuestionadora, reconociendo que alguno de los objetivos que persigue la ciencia no están necesariamente relacionados con la obtención de conocimiento o la promoción del beneficio de los seres humanos sino que tienen que ver con fuerzas económicas que frecuentemente deben ser frenadas. En suma, es importante que la bioética no se convierta en enemiga de la libertad, de la ciencia y del progreso, pero es igualmente importante que tenga presente el rol que deba cumplir como defensora de la sociedad, tomando en cuenta que toda investigación tiene un costo y ese costo debe ser asumido sólo luego de una deliberación cuidadosa sobre todas sus posibles implicancias” (Salles, 2012).

El quinto objetivo de este proyecto fue calcular los costos totales de la investigación. Se calculó el costo de los insumos, el alquiler, los servicios, y el salario. Los resultados indican que el costo total fue de: \$87.871,90.

El costo de los insumos fue de: \$ 42.871,90, pero cabe aclarar que respecto a algunos materiales fue menor la cantidad usada, generándose un stock que puede servir para continuar con esta investigación o para futuros proyectos.

Las horas hombre invertidas fueron aproximadamente 240. A pesar de que este proyecto fue desarrollado en un lapso de ocho meses, sabemos que es factible distribuir estas horas en un período de tres meses. Por lo tanto, cálculos del salario y del alquiler fueron basados en esta suposición. El costo total del alquiler de un laboratorio de 15m² fue de \$ 30.000; el mismo incluye los servicios de luz, gas, agua, agua desionizada, teléfono, internet, limpieza, equipos compartidos y cuarto de cultivos compartido. El costo total del salario asociado a las 240 horas invertidas fue de \$ 15.000.

En la siguiente tabla se detallan los materiales comprados.

Materiales	Cantidades de venta	Precio Unitario	Unidad	Cantidad Comprada	Unidad	Costo de la Compra
Pipetas descartables 5ml	Pack de 250 pipetas	\$ 1,53	pipeta	250	pipetas	\$ 382,50
Pipetas descartables 10ml	Pack de 250 pipetas	\$ 2,40	pipeta	250	pipetas	\$ 600,00
Tips con filtro 1000ul	1000 unidades por bolsa	\$ 0,16	tip	1000	tips	\$ 160,00
Tips con filtro 200ul	1000 unidades por bolsa	\$ 0,16	tip	1000	tips	\$ 160,00

Tips con filtro 20ul	1000 unidades por bolsa	\$ 0,16	tip	1000	tips	\$ 160,00
Tips con filtro 10ul	1000 unidades por bolsa	\$ 0,16	tip	1000	tips	\$ 160,00
Tips con filtro 200ul	1000 unidades por bolsa	\$ 0,16	tip	1000	tips	\$ 160,00
Tips con filtro 20ul	1000 unidades por bolsa	\$ 0,16	tip	1000	tips	\$ 160,00
Tips con filtro 10ul	1000 unidades por bolsa	\$ 0,16	tip	1000	tips	\$ 160,00
Tips sin filtro 1000ul	1000 unidades por bolsa	\$ 0,16	tip	1000	tips	\$ 160,00
Tubos Eppendorf 1.5ml	500 tubos por bolsa	\$ 0,08	tubo	500	tubos	\$ 40,00
Tubos Eppendorf 0.2ml	500 tubos por bolsa	\$ 0,08	tubo	500	tubos	\$ 40,00
Tubos Falcon 50ml	500 tubos por bolsa	\$ 3,70	tubo	500	tubos	\$ 1.850,00
Tubos Falcon 15ml	500 tubos por bolsa	\$ 3,70	tubo	500	tubos	\$ 1.850,00
Placas p100	20 placas	\$ 25,00	placa	20	placas	\$ 500,00
Placas p150	20 placas	\$ 30,00	placa	20	placas	\$ 600,00
Multiwell 96	50 unidades	\$ 17,56	unidad	50	multiwells	\$ 878,00
Multiwell 12	50 unidades	\$ 17,56	unidad	50	multiwells	\$ 878,00
DMEM/F12	10 x 1lt	\$ 706,15	litro	1	litro	\$ 706,15
Suero Fetal Bovino (Natocor)	Frasco de 500 ml	\$ 327,28	frasco	1	frasco	\$ 327,28
EDTA (0,5M EDTA pH8 500ml)	Frasco de 500 ml	\$ 686,60	frasco	1	frasco	\$ 686,60
HEPES	100 gr/frasco	\$ 6,65	gr	100	gr	\$ 665,00
PBS	500 gr/frasco	\$ 0,75	gr	500	gr	\$ 375,00
Tripsina 0.25% EDTA (100 ml)	40 unidades/tubo	\$ 3.466,40	tubo	1	tubo	\$ 3.466,40
Loading Buffer	3 unidades de 1 ml	\$ 111,20	ml	3	ml	\$ 333,60
Marcador de Peso Molecular (1kb)	500 ul	\$ 0,40	ul	500	ul	\$ 200,00
Bromuro de Etidio	10 ml	\$ 39,31	ml	10	ml	\$ 393,10
Buffer TAE 40X	1 lt	\$ 662,32	lt	1	lt	\$ 662,32
Agarosa	100gr	\$ 10,95	gr	100	gr	\$ 1.095,00
MTS	100 gr	\$ 6,65	gr	100	gr	\$ 665,00
Taq Polimerasa	500 unidades/tubo	\$ 795,00	tubo	1	tubo	\$ 795,00
Tween	100 ml	1,41	ml	100	ml	\$ 141,00
Guantes de Latex	100 unidades	0,331	unidad	200	unidades	\$ 66,20
Etanol	1 lt	138,63	lt	1	lt	\$ 138,63
Isopropanol	1 lt	138,63	lt	1	lt	\$ 138,63
SDS	100 gr	3,1	gr	100	gr	\$ 310,00
Agua Roux	2 lt	47,5	2 lt	2	lt	\$ 95,00
XhoI	5.000 unidades/tubo	650	tubo	1	tubo	\$ 650,00
KpnI	4.000 unidades/tubo	600	tubo	1	tubo	\$ 600,00

PstI	10.000 unidades/tubo	600	tubo	1	tubo	\$ 600,00
XbaI	3.000 unidades/tubo	650	tubo	1	tubo	\$ 650,00
SpeI	500 unidades/tubo	630	tubo	1	tubo	\$ 630,00
SnaBI	500 unidades/tubo	550	tubo	1	tubo	\$ 550,00
ApaI	5.000 unidades/tubo	650	tubo	1	tubo	\$ 650,00
BglII	2.000 unidades/tubo	550	tubo	1	tubo	\$ 550,00
EcoRI	10.000 unidades/tubo	550	tubo	1	tubo	\$ 550,00
PmeI	500 unidades/tubo	680	tubo	1	tubo	\$ 680,00
HindIII	10.000 unidades/tubo	550	tubo	1	tubo	\$ 550,00
PacI	250 unidades/tubo	640	tubo	1	tubo	\$ 640,00
Primers E1B	1 base	3,5	base	58	bases	\$ 203,00
Primers E4	1 base	3,5	base	39	bases	\$ 136,50
Primers F512	1 base	3,5	base	45	bases	\$ 157,50
pCR4-TOPO TA (Invitrogen)	20 preps/tubo	6000	tubo	1	tubo	\$ 1.719,65
pGL3-Promoter	20µg	2473,14	unidad	1	unidad	\$ 2.473,14
ElectroMAX DH5α-E (Invitrogen)	1 tubo 0,5 ml	2502,5	tubo	1	tubo	\$ 2.502,50
Medio SOC	100ml	910	tubo	1	tubo	\$ 910,00
Kanamicina	1 paquete 5g	690	paquete	1	paquete	\$ 690,00
Ampicilina	1 frasco 20 ml	490	frasco	1	frasco	\$ 490,00
NaOH (0,1 N)	1 ampolla	260,1	ampolla	3	ampolla	\$ 780,30
KCHOOH	1 frasco	669,3	frasco	1	frasco	\$ 669,30
LowMass DNA Ladder	1 tubo	510	tubo	1	tubo	\$ 510,00
ADN Ligasa (NEB)	20.000 unidades/tubo	640	tubo	1	tubo	\$ 640,00
DNTPs	25µmol/DNTP	1530	unidad	1	unidad	\$ 1.530,00
Lipofectamina	1 tubo 0,1 ml	535,2	tubo	1	tubo	\$ 535,20
HCl (0,1 N)	Frasco de plastico	274,4	l	1	frasco	\$ 274,40
Columna de purificación (QUIAGEN)	15 unidades/caja	530	caja	1	caja	\$ 530,00
Cristal violeta (MERK)	25gr	662	tubo	1	tubo	\$ 662,00
TOTAL MATERIALES:						\$ 42.871,90

Tabla Anexo II - Detalle del costo de los materiales.