

Tesis Doctoral

Caracterización y desarrollo de promotores quimera que permitan la replicación viral específica en el entorno tumoral

Viale, Diego Luis

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Viale, Diego Luis. (2010). Caracterización y desarrollo de promotores quimera que permitan la replicación viral específica en el entorno tumoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Viale, Diego Luis. "Caracterización y desarrollo de promotores quimera que permitan la replicación viral específica en el entorno tumoral". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**CARACTERIZACIÓN Y DESARROLLO DE PROMOTORES QUIMERA
QUE PERMITAN LA REPLICACIÓN VIRAL ESPECÍFICA EN EL
ENTORNO TUMORAL**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el Área de Ciencias Biológicas.

Diego Luis Viale

Director de Tesis: Dr. Osvaldo Luis Podhajcer.

Director Asistente de Tesis: Dra. María Verónica Lopez.

Consejero de Estudios: Dr. Pablo Wappner.

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Terapia Molecular y Celular, Fundación Instituto Leloir,
IIBBA-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

Buenos Aires, 2010.

A mis viejos

Resumen**CARACTERIZACIÓN Y DESARROLLO DE PROMOTORES QUIMERA QUE PERMITAN LA REPLICACIÓN VIRAL ESPECÍFICA EN EL ENTORNO TUMORAL**

Los tumores están compuestos de una masa heterogénea de células tumorales que incluyen células estromales asociadas que pueden convertirse en una barrera para la lograr una terapia exitosa contra la enfermedad. En los últimos años, los Adenovirus Replicativos Condicionales (CRAds) regulados por promotores recombinantes surgieron como una nueva modalidad de terapia para el cáncer. SPARC se encuentra expresada en forma muy elevada tanto en células tumorales como en endotelio y en los fibroblastos activados de tumores. A partir de estos datos, decidimos utilizar al promotor de SPARC para dirigir la replicación de los virus tanto en las células tumorales como en las células que forman parte del tumor. Logramos clonar un promotor que demostró mayor actividad en las células que expresan SPARC (F512) que se utilizó para dirigir la replicación de un CRAd (Ad-F512). Ad-F512 tiene efecto oncolítico en diferentes líneas celulares de melanoma y en ensayos *in vivo* se observó la eliminación de tumores SB2. Por el contrario, los tumores de melanoma A375N, Mel J y el tumor SB2/WI-38, que combina células de melanoma con fibroblastos, su efecto oncolítico es muy reducido. Para aumentar su eficacia adicionamos secuencias de ADN conteniendo elementos de respuesta a diferentes condiciones pato-fisiológicas que caracterizan al tejido tumoral para aumentar la replicación. A partir de los resultados obtenidos, seleccionamos el promotor kBF512HRE conteniendo elementos de respuesta a hipoxia (HRE) y elementos de respuesta a NFκB (κB). Construimos el CRAd Ad-kBF512HRE que eliminó el tumor SB2/WI-38 en todos los ratones pero no se observa el mismo efecto sobre tumores Mel-Les y A375N. A partir de estos resultados se cambió la fibra adenoviral involucrada en el pegado al receptor celular y el virus resultante, Ad-5/3-kBF512HRE tiene efecto anti-tumoral sobre los tumores Mel-Les. Estos resultados indican que la adición de elementos de respuesta a condiciones que caracterizan al tejido tumoral y el cambio de la proteína involucrada en la unión al receptor celular aumentan el efecto terapéutico de un CRAd en las líneas celulares resistentes y, además, pueden sobrepasar la restricción en la replicación que implica la presencia de células estromales.

Palabras Clave: Terapia Génica, Melanoma, CRAd, SPARC, Promotor Quimera.

Abstract

**DESIGN AND CHARACTERIZATION OF CHIMERIC PROMOTERS THAT ALLOWS SPECIFIC
VIRAL REPLICATION WITHIN TUMOR STROMA**

Human tumors are composed of a heterogeneous mass of malignant cells that also include tumor-associated stromal cells that might become a barrier for successful therapies. In the last years, Conditionally Replicative Adenoviruses (CRAds) regulated by recombinant promoters appear as a new modality for cancer therapy. SPARC is over-expressed in tumor cells and associated-endothelial and –fibroblast cells. Due to these results we utilized SPARC promoter for transcriptional regulation due to its over-expression on tumor melanoma cells and tumor associated stromal cells. We cloned a promoter that shows higher transcriptional activity in SPARC-expressing cells (F512) and we used to drive adenoviral replication (Ad-F512). This CRAd shows oncolytic activity in different melanoma cell lines and stromal cells and eliminated SB2 tumors *in vivo*, however, in A375N, Mel J and mixed tumor cell /fibroblast SB2/WI-38, its oncolytic effect was strongly reduced. In order to improve its efficacy we added DNA sequences containing responsive elements to different patho-physiological conditions that characterize tumor tissue to increase its replication. Based on their activity/specificity ratio we selected kBF512HRE, containing Hypoxia Response Elements (HRE) and NFkB response elements (kB). We constructed Ad-kBF512HRE and eliminated SB2/WI-38 tumor in all mice, on the other side, this effect was not observed on A375N and Mel-Les tumors. After this, we changed the adenoviral fiber, protein responsible of cellular receptor attachment. Ad-5/3-kBF512HRE eliminates 2/4 tumors of Ad-kBF512HRE-resistant Mel-Les tumors. These results indicate that addition of enhancer elements responsive to tumor-environmental conditions and fiber change improved the therapeutic effect of a CRAd over resistant cells and might overcome the restriction imposed by the presence of stromal cells.

Keywords: Gene Therapy, Melanoma, CRAd, SPARC promoter, Chimeric Promoter

INTRODUCCIÓN	1
I.1. Cáncer.....	2
I.1.1. Conceptos Generales	2
I.1.2. Efecto del estroma en el crecimiento tumoral	3
I.1.3. Melanoma	5
I.1.4. El tratamiento de la enfermedad	8
I.2. Terapia Génica	10
I.2.1. Adenovirus	13
I.3. Virus de Replicación Condicional	19
I.3.1. Regulación Transcripcional	20
I.3.1.1. SPARC	23
I.3.1.1.1. Propiedades biológicas de SPARC.	23
I.3.1.1.2. El promotor de SPARC.....	25
I.3.1.1.3. Regulación de la expresión de SPARC	27
I.3.1.2. Promotores híbridos o quimeras	29
I.3.1.2.1. Hipoxia	31
I.3.1.2.1.1. Regulación de la actividad de HIF.....	32
I.3.1.2.1.2. Elementos de Respuesta a Hipoxia (HRE).....	32
I.3.1.2.1.3. Relación con la tumorigenicidad	33
I.3.1.2.2. Factor Nuclear kapa B (NFκB)	34
I.3.1.2.3. Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)	35
I.3.2. Regulación Transduccional del adenovirus	37
OBJETIVOS.....	39
RESULTADOS.....	40
Capítulo 1 Selección de un Promotor específico	41
1.1 Resumen	41
1.2 Análisis de la expresión de ARNm de SPARC.....	42
1.3 Análisis de la actividad transcripcional del Promotor Humano del gen SPARC	44
1.3.1 Clonado y caracterización de secuencias promotoras del gen SPARC.....	44
1.3.2 Estudio del promotor F512 mediante analisis mutacional de su secuencia.	51
1.4 Análisis de la actividad transcripcional del Promotor Bovino del gen SPARC.....	55
1.5 Análisis actividad del promotor seleccionado en diferentes líneas celulares.....	57
Capítulo 2 Adenovirus de replicación condicional.....	60
2.1 Resumen	60

2.2 Construcción del Adenovirus Ad-F512	61
2.3 Ensayos <i>in vitro</i>	61
2.4 Ensayos <i>in vivo</i>	66
Capítulo 3 Desarrollo de promotores quimera.....	74
Resumen	74
3.1 construcción de promotores quimera.	75
2.2 Análisis de la actividad de los promotores en el contexto plasmídico.....	76
3.2 Análisis de la actividad de los promotores en el contexto adenoviral.....	79
3.3 Adenovirus de Replicación Condicional	81
3.3.1 Ensayos de viabilidad celular	81
3.3.2 Estudios en modelos <i>in vitro</i> de esferoides	84
3.3.3 Ensayos <i>in vivo</i>	87
3.4 redireccionamiento de los Adenovirus de Replicación Condicional	91
3.4.1 Ensayos <i>in vitro</i>	92
3.4.2 Ensayos <i>in vivo</i>	93
3.5 Ensayo del efecto de los Adenovirus de Replicación Condicional sobre tejidos normales.....	95
DISCUSIÓN.....	97
MATERIALES Y MÉTODOS.....	107
1. Líneas Celulares.....	107
2. Plásmidos	108
2.1 Promotores humanos SPARC.....	109
2.2. Promotores bovinos SPARC	109
2.3. Promotores quimera.....	109
3. Obtención de ADN genómico.....	110
4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	111
5. Digestión con enzimas de restricción.....	112
6. Purificación de fragmentos de ADN	113
Purificación por kit GFX PCR	113
Purificación por columnas de lana de vidrio.....	113
7. Cuantificación de ADN	113
8. Ligaciones.....	114
9. Transformación bacteriana	114
10. Preparación de plásmidos.....	115
Preparación de pequeña escala.....	115
Preparación de mediana escala	116
11. Secuenciación de ADN	116
13 Marcación de sondas por la técnica de “random primer”	116
15. Transfecciones Transientes	117
16. Ensayo de Actividad de Luciferasa	118

Índice

17. Construcción y producción de adenovirus.....	119
18. Producción de los stocks virales.....	122
19. Efecto citopático en monocapa	123
20. Ensayo de muerte celular.....	123
20. Cuantificación de la replicación viral.....	123
22. Estudios <i>In vivo</i>	124
23. Histología	125
REFERENCIAS.....	126

I.1. CÁNCER.

I.1.1. CONCEPTOS GENERALES

En la Argentina, 152 personas cada 100.000 habitantes mueren por año a causa del cáncer. Es la segunda causa de muerte en nuestro país después de las enfermedades cardíacas, representando el 19,5% de los casos [1]. En Estados Unidos desde el año 1950 hasta el año 2000 las enfermedades cardíacas, las enfermedades cerebrovasculares y la neumonía han disminuido su incidencia en la población, mientras que el cáncer se ha mantenido en niveles similares con 201 muertes cada 100.000 habitantes por año [2].

El término cáncer hace referencia a un proceso que se caracteriza por el crecimiento y división desorganizada de células que pueden adquirir la capacidad de invadir tejidos distintos al que les dio origen, denominándose metástasis a estas localizaciones secundarias. Asimismo, se define a la neoplasia como la estructura anormal de un tejido cuyos elementos sustituyen por invasión a los tejidos normales, constituyendo un sistema dinámico con la propiedad de cambiar de localización y gravedad. El término tumor define a una masa celular usualmente neoplásica, aunque también puede poseer características benignas (no neoplásicas) sin capacidad de invasión.

El origen de la enfermedad y los factores que favorecen su desarrollo fueron bastante discutidos a través de los años. Es sabido que los organismos acumulan gran cantidad de mutaciones a través de los años sin desarrollar la enfermedad, sugiriendo que las células humanas poseen mecanismos de control intrínsecos que impiden la tumorigénesis. Es probable entonces especular que una mutación simple no es suficiente para el desarrollo de la enfermedad, por lo que la teoría del origen del cáncer por la acumulación de mutaciones simples sea probablemente correcta en la mayoría de los casos. Una observación que concuerda con esta teoría es que la incidencia de la enfermedad aumenta con relación a la edad [3]. Del mismo modo, estudios epidemiológicos de la cinética de aparición de tumores en poblaciones humanas indican que cuatro a seis eventos limitantes – posiblemente mutaciones somáticas – deben ocurrir para la formación de tumores en humanos [4]. En concordancia con este número, el estudio de la patología del cáncer de colon indica que existen, al menos, de cuatro a seis estados histo-patológicos diferentes, incluyendo los estadios de epitelio hiperplásico, epitelio displásico, varios tipos de

adenoma y finalmente, carcinoma. Cada una de estas transiciones histo-patológicas están acompañadas por mutaciones genéticas específicas necesarias para el desarrollo del siguiente estadio y, por lo tanto para la progresión tumoral [5].

La teoría más ampliamente aceptada para explicar la aparición de la enfermedad es la teoría de selección clonal. Esta teoría plantea que el desarrollo tumoral surge por un proceso similar a la evolución Darwiniana, en la cual, una sucesión de cambios genéticos confiere un tipo de ventaja en el crecimiento o división celular, llevando a la conversión progresiva de células normales en células cancerígenas [6, 7].

A través de los años se observó que el desarrollo de la enfermedad no solo dependía de la célula tumoral *per se* sino también del ambiente celular donde se encuentra y si este favorece la supervivencia y replicación de las células tumorales.

I.1.2. EFECTO DEL ESTROMA EN EL CRECIMIENTO TUMORAL

Como fue mencionado anteriormente, el tumor no solo está compuesto de células tumorales, existen diferentes tipos celulares dentro de este complejo tejido que modifican, de diferentes formas, su crecimiento y capacidad metastásica. Las proteínas y células que forman la matriz del tumor y se ocupan del soporte funcional del tejido se denominan estroma (del griego tapiz), que está compuesto por la matriz extracelular (MEC) y las células estromales. Estas últimas incluyen tanto las células mesenquimales de soporte (fibroblastos y adipocitos), células del sistema vascular (endotelio y pericitos) y del sistema inmune (macrófagos, neutrófilos, células polimorfonucleares, linfocitos) (revisado en [8]).

Hace más de un siglo ya se le otorgaba un rol importante al estroma tumoral en el desarrollo de las metástasis. En 1889, Stephen Paget analizó más de 700 casos de metástasis de cáncer de mama y concluyó que los sitios donde ocurrían las metástasis no podían deberse solo al azar sino que el tejido donde ocurría la metástasis debía proveer alguna ventaja para que la célula tumoral crezca. En este trabajo Paget planteaba que no sólo debía estudiarse a la célula tumoral (semilla) sino al tejido donde ocurría la metástasis (suelo) [9]. De esta forma nació la teoría del “suelo y la semilla” para el crecimiento de las metástasis.

Esta primera hipótesis fue la que inspiró a muchos investigadores en el área de metástasis y luego fue demostrado por diversos trabajos el rol que el estroma cumple

no solo en la metástasis sino también en el inicio, mantenimiento y desarrollo del cáncer (revisado en [10]).

Esta visión central de la célula tumoral como la iniciadora del tumor evolucionó y considera a las células del estroma como involucradas en el inicio y progresión del tumor. En este proceso, la célula tumoral induce cambios estructurales en el estroma mediante la secreción de factores de crecimiento que tienen como resultado la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), la modificación de la estructura de la MEC, aumento en la proliferación de los fibroblastos y un aumento en el reclutamiento de células del sistema inmune (revisado en [11]).

A su vez, esta modificación de las células estromales tiene como consecuencia una modificación de la célula tumoral que influye tanto en el crecimiento como en la invasividad y el potencial metastásico del tumor [12, 13].

El sistema inmune se encuentra también involucrado en el desarrollo del cáncer ya que con frecuencia se generan tumores en áreas de inflamación crónica, ejemplos de esto son la hepatitis C y su relación con el cáncer hepático y la infección con *Helicobacter pylori* y el cáncer de estómago. En el caso de la artritis reumatoide se demostró que las características de los fibroblastos del sinovio reumatoide y los macrófagos asociados con esta enfermedad son similares a las que poseen estas células en el tejido tumoral [14]. En los casos donde no se observa inflamación crónica, las células tumorales producen quimioquinas y citoquinas que atraen a los leucocitos. A su vez, estas células reclutadas producen nuevos factores que también se encuentran involucrados en la promoción del tumor como citoquinas, quimioquinas, proteasas, factores de crecimiento que estimulan la proliferación del endotelio, especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden dañar el ADN, Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) e interferones (INF) (revisado en [15, 16]).

El sistema inmune tiene la capacidad de identificar células cancerosas o pre-cancerosas y eliminarlas antes de que puedan causar algún daño. Pero aún con la presencia de un sistema de vigilancia (*surveillance*) inmune de los tumores, estos se desarrollan en la presencia de un sistema inmune funcional y escapan. Lo que indica que las células tumorales deben inducir un bloqueo del efecto del sistema inmune sobre las células transformadas (revisado en [17]).

En resumen, si el tejido tumoral está compuesto tanto por células tumorales como por fibroblastos, células endoteliales y del sistema inmune formando un tejido mixto, es posible hipotetizar que dirigir la terapia a todos los componentes del tejido tumoral posibilitaría eliminar no solo a las células tumorales sino al tejido que mantiene o favorece el desarrollo de las células tumorales. En este trabajo de tesis se busca desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de melanoma atacando a todos los componentes del tejido tumoral.

I.1.3. MELANOMA

El melanoma o cáncer de piel resulta de la transformación maligna de melanocitos, células de la piel y otros tejidos epiteliales que sintetizan el pigmento melanina.

Los melanocitos derivan de las células de la cresta neural [18] y migran a la piel durante el desarrollo. Estas células se encuentran confinadas a la membrana basal de la epidermis en una distribución no azarosa, y envían dendritas que contactan con queratinocitos presentes en los estratos basales y superficiales de la piel [19] (Figura 1-A). Cada melanocito transfiere melanosomas, que contienen melanina, a través de sus dendritas a aproximadamente 36 queratinocitos. Esta estructura se denomina unidad epidermal de melanina. Una vez en los queratinocitos, el pigmento protege a la piel mediante la absorción y dispersión de la radiación solar [19] (Figura 1-A).

El melanoma es clasificado histológicamente en cinco estadios diferentes según su ubicación y el grado de progresión. El nevus benigno y el nevus displásico se caracterizan por la ruptura del equilibrio celular de la unidad de melanina de la epidermis con un predominio de melanocitos sobre queratinocitos. Estas lesiones iniciales evolucionan al melanoma *in situ*, que crece de forma lateral y confinada a la epidermis, denominando a este estadio Melanoma de crecimiento Radial (RGP). En un estadio más avanzado de la enfermedad este crecimiento es vertical (VGP), atravesando la epidermis, colonizando la dermis y, posiblemente, derivando en metástasis (Figura 1-C). El paso de crecimiento radial (RGP) a vertical (VGP) es crucial en la evolución del melanoma y modifican tanto el pronóstico clínico como el potencial metastásico. Esto correlaciona con el factor predictivo que poseen el ancho y alto de la lesión primaria en la aparición de las metástasis y el resultado clínico [20].

El melanoma de crecimiento radial se puede clasificar como una célula tumoral dependiente del contacto con queratinocitos y factores de crecimientos locales para

crecer. Mientras que en el melanoma VGP las células tumorales escapan del control de los queratinocitos y establecen contactos con fibroblastos y adquieren independencia de factores de crecimiento y anclaje [21].

Cada uno de estos estadios necesita que la célula de melanoma en una primera etapa modifique el estroma en el que se encuentra inmersa, su capacidad de supervivencia, la expresión de receptores para poder lograr el crecimiento hacia el tejido dérmico para luego producir metástasis en otros tejidos (revisado en [22]).

Durante el desarrollo del melanoma los macrófagos activados producen TGF- β , TNF- α , IL-1 α y proteasas extracelulares. Estos factores, a su vez, inducen en las células tumorales la producción de IL-8 y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) [23], favoreciendo la formación de vasos sanguíneos en el tejido tumoral. Estos datos indican que no solo la célula tumoral modula el estroma sino que este último también produce cambios en la célula tumoral que favorece el progreso de la enfermedad.

El melanoma tiende a ocurrir a una menor edad que los otros tumores sólidos [24], ya que en general los pacientes manifiestan la enfermedad entre los 25 y 65 años. A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los tumores en donde se necesita cuatro a seis cambios para el desarrollo de la enfermedad, el melanoma de crecimiento radial solo necesitaría tres cambios para el desarrollo [25]. Permite suponer las razones de su aparición a una menor edad.

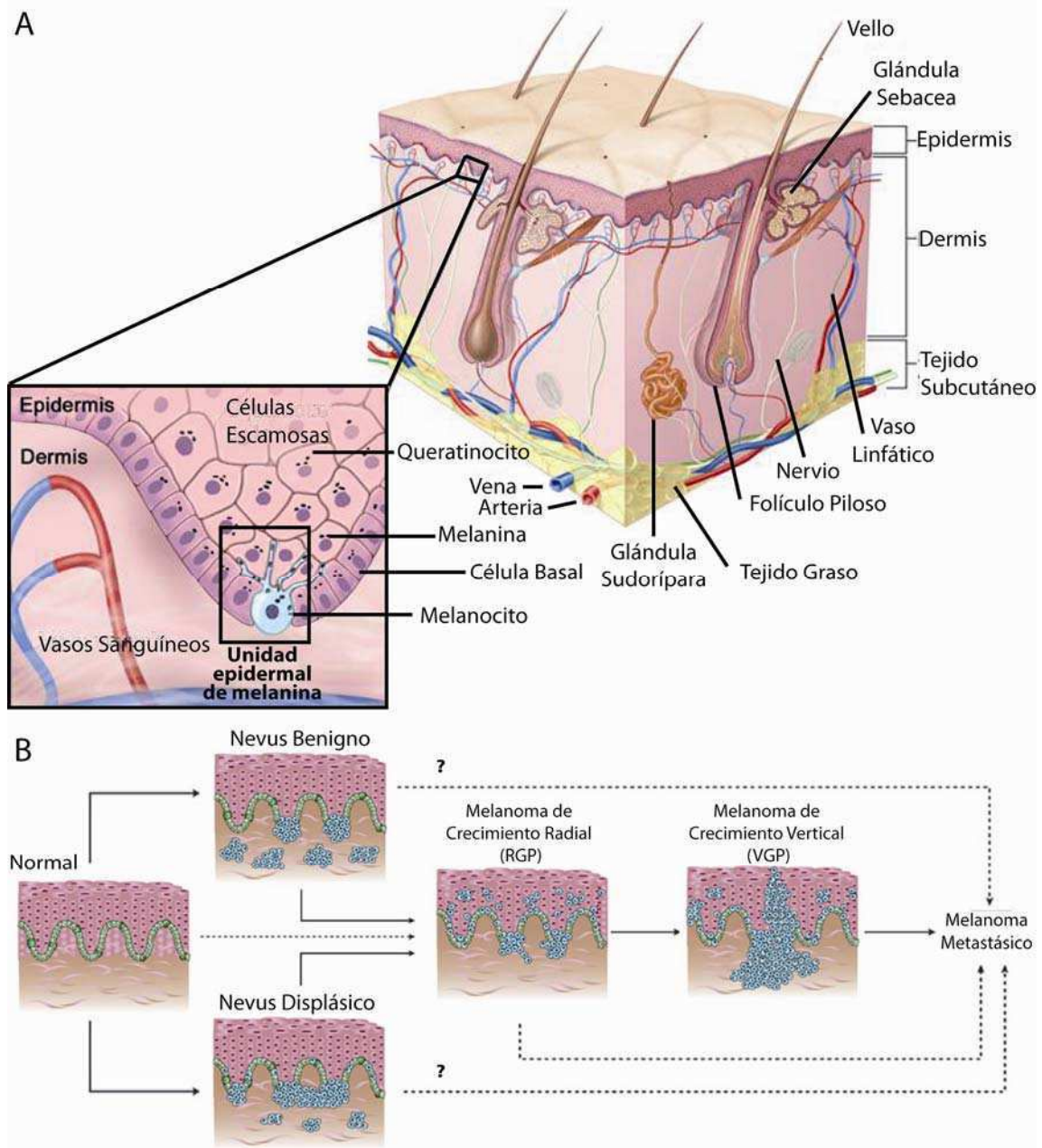


Figura 1. Estructura de la piel y estadios histológicos del melanoma. A) Figura representando la estructura de la piel y posición de los melanocitos, el cuadro delimitador de la figura inferior resalta la unidad epidermal de melanina. B) Figura representativa de los estadios histológicos de la piel humana y su progreso a melanoma metastásico. Las flechas de línea entera indican los pasos a los siguientes estadios histológicos observados y con flechas negras punteadas los posibles saltos de estadios que podrían ocurrir en el progreso de la enfermedad. Figuras adaptadas de A) www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/melanoma/Patient y B) Chin, L *et al*; Nat Rev Cancer (2003) 3 (8) 561

Aunque la cirugía en un estadio temprano es curativa, las terapias médicas utilizadas en la actualidad no mejoran la supervivencia una vez que el tumor se ha diseminado. El melanoma produce metástasis en estadios tempranos del desarrollo tumoral, con características agresivas y refractario a las terapias que se aplican [26].

Si bien la detección temprana, una adecuada cirugía y, en algunos casos, la terapia adyuvante han mejorado los resultados en el tratamiento de melanoma, alrededor del 20% de los pacientes con estadios tempranos de melanoma desarrollan metástasis. Además de ello, el pronóstico de los pacientes con metástasis es bastante sombrío, ya que los pacientes con melanoma estadio IV tiene una sobrevida media de 7-9 meses y menos del 5% sobreviven más de 5 años [27].

La cantidad de muertes causadas por melanoma ha aumentado en Estados Unidos de América durante el período 1990-2006 un 7,07% en hombres y se mantiene en niveles similares en las mujeres, a diferencia de lo que ocurre con otros tumores. Según estadísticas recientes en ese país sobre el total de nuevos casos estimados de cáncer en 2010, el 4,45% serían melanomas y morirían alrededor de 8700 personas [28].

Aún no se ha encontrado una cura definitiva para la mayoría de los que padecen esta enfermedad. El tratamiento involucra diferentes estrategias que mayormente conducen solo a un aumento del tiempo de sobrevida en los enfermos avanzados.

I.1.4. EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD

El objetivo del tratamiento del cáncer es remover todo o la mayor parte posible del tumor y prevenir la reaparición o dispersión del tumor primario.

Existen diferentes terapias para el tratamiento del cáncer y la elección del tipo aplicado depende de las características y localización, la magnitud de la dispersión, edad y sexo del paciente, estado de salud general y preferencias personales de tratamiento. Los tratamientos más usuales en esta enfermedad son: cirugía, radiación, quimioterapia, inmunoterapia y tratamientos hormonales [29, 30].

- a) La cirugía es el procedimiento por el cual se lleva a cabo la remoción de un tumor visible, es el método utilizado con más frecuencia para el tratamiento del melanoma, siendo más efectivo en los estadios iniciales [31], aunque también es utilizado en metástasis localizadas [32].
- b) La radioterapia es un método terapéutico que se basa en la utilización de la energía cedida por una serie de elementos como radioisótopos y rayos gama (γ) que producen radiación ionizante que provoca daños sobre la estructura de la materia viva y, de esta forma, logran la destrucción tumoral. Es utilizada generalmente en

casos en donde el tumor no puede ser removido por cirugía o como terapia adyuvante. En melanoma esta terapia es recomendada para tumores primarios no extirpables por cirugía [33].

c) La quimioterapia utiliza drogas terapéuticas para lograr la destrucción de las células tumorales. La acción de los distintos agentes químicos antitumorales tienen como blancos macromoléculas no enzimáticas (ADN, ARN y proteínas) o bien la alteración de sistemas enzimáticos vitales. Estos agentes se utilizan para la destrucción de células tumorales que se dispersaron (metástasis) o para tumores sólidos. Actualmente, la quimioterapia se utiliza en terapia adyuvante para aumentar la efectividad de otros tratamientos, como por ejemplo en cirugía, donde se utiliza para destruir células tumorales que permanezcan después del procedimiento quirúrgico. Este procedimiento también se ha utilizado para el tratamiento de metástasis diseminadas de melanoma [33].

d) Los protocolos que utilizan hormonas son el tratamiento estándar para los tumores hormono-dependientes. Este tipo de terapia implica el bloqueo de la producción o acción de estas hormonas para reducir el crecimiento tumoral en cáncer de mama [34].

e) La inmunoterapia se basa en la posibilidad de explotar el propio sistema inmune para destruir las células tumorales. Los agentes inmunológicos utilizados incluyen anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos tumorales, proteínas producidas por el propio organismo (interferones, interleucinas, etc.) y vacunas [35]. Estas últimas no previenen la aparición del cáncer sino que se utilizan para estimular el sistema inmune contra células tumorales ya establecidas. En Estados Unidos de América se aprobó la utilización de IL-2 en altas dosis para el tratamiento de pacientes con melanoma avanzado no-removible por cirugía y existen muchas proteínas bajo ensayos clínicos (CTLA-4, INF- α , TNF- α) para esta enfermedad (revisado en [36]).

Uno de los mayores problemas de este tipo de terapias convencionales antitumorales es la falta de especificidad en la eliminación de las células cancerígenas, dando lugar a la generación de efectos colaterales adversos y limitando la dosis terapéutica a utilizar

debido a su toxicidad. Por tal motivo, en los últimos años la búsqueda de terapias alternativas se centró, entre otras, en investigaciones basadas en estrategias de terapia génica que permitieran dirigir el efecto sobre el tejido tumoral.

I.2. TERAPIA GÉNICA

El advenimiento de la tecnología de ADN recombinante en la década del 80, y el aumento de los datos genómicos, a partir de 1990, han contribuido en la identificación de factores genéticos involucrados en la aparición y progresión de enfermedades. Estos avances posibilitaron la búsqueda de potenciales terapias basadas en ingeniería genética y celular [37-39]. La terapia génica se basa en la transferencia de genes a las células de un paciente con el propósito de obtener un efecto terapéutico, ya sea corrigiendo un defecto de origen genético o introduciendo una nueva función. El objetivo final de la terapia génica es el reemplazo de un gen causante de una enfermedad con su contraparte sana o la introducción de un gen terapéutico que elimine la afección [40]. Es un tipo de intervención que utiliza los avances científicos y técnicos producidos en los campos de la microbiología, la virología, la química orgánica, la biología molecular, la bioquímica, la biología celular, la genética y la ingeniería genética.

Existen dos modalidades para la introducción de los genes terapéuticos en las células blanco. En la terapia *ex vivo* las células del mismo paciente o de donantes son modificadas fuera del organismo para luego ser reintroducidas en la persona tratada. En la terapia *in vivo* el gen terapéutico es administrado directamente al paciente utilizando, generalmente, un vector de transferencia (Figura 2).

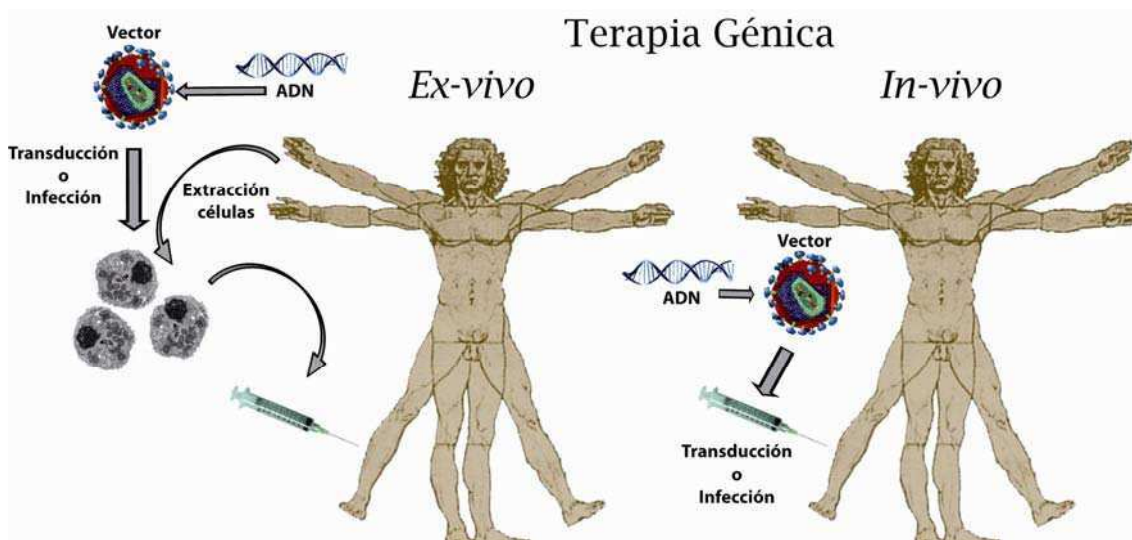


Figura 2. Modalidades de Terapia Génica. En la terapia *ex vivo* las células son extraídas del paciente, modificadas por el tratamiento con un vector conteniendo el ADN deseado y luego re-introducidas en el paciente. En la terapia *in vivo* el vector conteniendo el ADN deseado se aplica directamente y las células son modificadas en el paciente. Imágenes adaptadas de: vector (<http://xnet.rrc.mb.ca/davidb/virology.htm>), ADN (http://www.tecnotic.com/images/914335_dna.jpg).

Para introducir el gen terapéutico, denominado transgén, en la célula blanco se necesita de un vehículo de entrega o vector, denominándose a este proceso de transferencia de material genético transducción. Se clasifica a los vectores utilizados en terapia génica en dos grandes grupos: virales o no virales.

Los vectores no virales utilizan diferentes estrategias para la transferencia del material genético [41]. Uno de estos métodos es la inyección directa del material genético (moléculas de ADN desnudo) en las células blanco [42]. Algunos de los problemas de esta metodología son la baja eficiencia para transferencias *in vivo* y la gran cantidad de material genético que se debe utilizar. Otro método es la utilización de lípidos catiónicos capaces de formar complejos con el ADN, denominados liposomas [43]; en este caso el ADN es incorporado entre las múltiples bicapas lipídicas formadas en las micelas y es liberado posteriormente dentro de la célula [44]. Uno de los problemas de este procedimiento es que existe una baja importante en la eficiencia de transducción *in vitro* con respecto a *in vivo*, no obstante este sistema ya ha sido utilizado para el tratamiento de melanomas y los resultados clínicos han sido prometedores [45].

Actualmente, los vectores más utilizados son virus modificados genéticamente para portar el gen terapéutico. Los virus han evolucionado para encapsular y entregar sus genes de manera efectiva a las células huésped. Desde principios del siglo XX existía la

idea de que los virus en su versión salvaje o *wild type* podrían tener efecto terapéutico sobre el cáncer. El primer reporte describiendo una remisión de cáncer después de una infección con virus Influenza fue realizado hace más de un siglo [46]. En 1912, DePace reporta una remisión de un carcinoma uterino posterior después de la inyección con virus atenuado de la rabia a una paciente que había sido mordida por un perro [47]. A partir de este dato y de ensayos en animales, en el año 1940 se realizó en Nueva York el primer ensayo clínico utilizando el virus atenuado de la rabia en 30 pacientes de melanoma, de los cuales 8 mostraron remisión [48]. Después de este primer ensayo Southam y colaboradores en la década del 50 realizaron ensayos clínicos utilizando diferentes virus, entre ellos, adenovirus, arbovirus, mixovirus y paramixovirus sobre diferentes tipos de cáncer y documentaron el efecto de estos sobre la remisión de algunos tumores [49-53].

A partir de 1980 los científicos explotaron la capacidad de los virus de replicarse mediante la eliminación de los genes virales patogénicos y su reemplazo por genes terapéuticos. Las células blanco del tratamiento son transducidas con el vector viral, que descarga su material genético conteniendo el transgén terapéutico. Algunos de los diferentes virus utilizados como vectores en terapia génica son:

a) Retrovirus: estos virus producen copias de ADN doble cadena a partir de su genoma de ARN, que se integran en el ADN de la célula blanco. Las mayores restricciones de estos virus son su bajo título de producción, la incapacidad de transducir células que no se dividen y el riesgo de mutagénesis insercional [54].

b) Adenovirus: constituidos por una cápside sin envoltura de membrana lipídica y genoma de ADN doble cadena que se mantiene como episoma luego de la infección o transducción. Estos virus poseen la ventaja de poder producirse en títulos elevados [55]: Una de las ventajas de este virus es el bajo nivel de integración en el genoma celular en cultivos celulares [56] e *in vivo* [57]. Una de las desventajas para su uso en determinadas aplicaciones es la expresión transiente del transgén y su elevada inmunogeneicidad, lo cual tiene como consecuencia la eliminación del virus y, por ende, del gen terapéutico.

c) Virus adeno-asociado: virus sin envoltura con genoma ADN simple cadena que pueden insertar su material genético en un lugar específico del cromosoma 19 humano [58]. Las desventajas de este vector son el bajo título de producción y la posibilidad de

co-purificar el virus deseado con el virus-helper (adenovirus o herpes simple) usado para su producción. No obstante, los métodos de producción de este vector han sido perfeccionados y han posibilitado reducir estas desventajas [59].

d) Virus Herpes Simple: virus a ADN doble cadena con envoltura que transducen específicamente neuronas y esta propiedad del virus se utiliza para dirigir el efecto terapéutico a este tipo celular [60].

e) Virus Vacuna (*Vaccinia Virus*): Este virus ha sido utilizado para la transferencia de antígenos asociados a tumor en pacientes. Con el uso de este virus se observa una inducción de linfocitos T contra el antígeno transferido en los pacientes. También ha sido utilizado para la transferencia de genes inmuno-moduladores a pacientes de melanoma primario, obteniendo resultados prometedores [61].

f) Newcastle Disease Virus: Es un virus envuelto con genoma de ARN negativo simple cadena que causa enfermedades en aves [62] mientras que en humanos solo causa fiebre aguda [63]. Este virus se utilizó en melanoma, obteniendo un aumento en la sobrevivencia de los pacientes tratados con el virus [64].

En esta tesis de doctorado se utilizará como vector de transferencia génica al adenovirus y en la siguiente sección se describirá su estructura, función y biología.

I.2.1. ADENOVIRUS

El adenovirus fue aislado por primera vez en el año 1953 a partir de cultivos de tejido adenoide humano debido a su efecto lítico en cultivos *in vitro* [65].

Los adenovirus son virus sin envoltura o sin membrana lipídica con un genoma linear de ADN doble cadena de alrededor de 36 kilobases (revisado en [66]). Estos virus corresponden a la familia *Adenoviridae* y los virus humanos consisten en más de 50 serotipos distintos que se categorizan en 6 sub-grupos (A-F) basados en su propiedades de hemaglutinación, capacidad oncogénica en ratones, homología de secuencia de ADN y organización de genoma (Figura 3-A) [67]. La estructura de la partícula viral consiste en una cápside exterior de simetría icosaédrica y un núcleo interno formado por nucleoproteínas. La proteína más representada en la cápside viral es hexón y en cada uno de los doce vértices de la estructura viral se encuentra la proteína penton base. Esta proteína sirve de punto de anclaje, mediante una unión no

covalente, de la proteína fibra que protruye de la estructura como una antena [68] (Figura 3-B).

El genoma del adenovirus se encuentra organizado en cinco unidades transcripcionales tempranas (E1A, E1B, E2, E3 y E4), cuatro intermedios (IVa2, IX, VAI y VAII) y una tardía (L1 a 5) con dos extremos de entre 36-120 pares de bases con secuencias complementarias en posición invertida (ITR) (Figura 3-C). La primera unidad transcripcional que se transcribe al ingresar el genoma adenoviral al núcleo celular es E1A. La proteína E1a actúa como factor activador en *trans* de otras unidades transcripcionales que inducen la entrada en fase S de la célula para crear un ambiente propicio para la replicación del virus [69]. Las unidades transcripcionales tempranas, inducidas por la proteína E1a, codifican para proteínas involucradas en inhibir la apoptosis (E1B) [70], replicación del genoma adenoviral (E2A) [71], reversión de la respuesta inmune y persistencia de la célula infectada (E3) [72] y transformación y control del ciclo celular (E4) [73]. La unidad transcripcional tardía (L1 a 5) produce un transcrito primario poli-cistrónico que codifica para las proteínas de la cápside viral (Zhang and Imperiale, 2003 J. Virol. 77, 3586–3594) (Figura 3-C).

El receptor celular primario para la unión de todos los adenovirus, excepto los del grupo B, es la proteína de membrana CAR (Coxsackie and Adenovirus Receptor) [74-76]. La infección celular comienza con la unión del adenovirus a CAR por el extremo de la fibra del serotipo 5 o 2 seguido de la internalización de la partícula viral. La endocitosis del virus es mediada por la unión del motivo RGD expuesto en la proteína pentón base a las integrinas $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$ de la superficie celular [77-80] y es mediada mayormente por un mecanismo dependiente de clatrina [81].

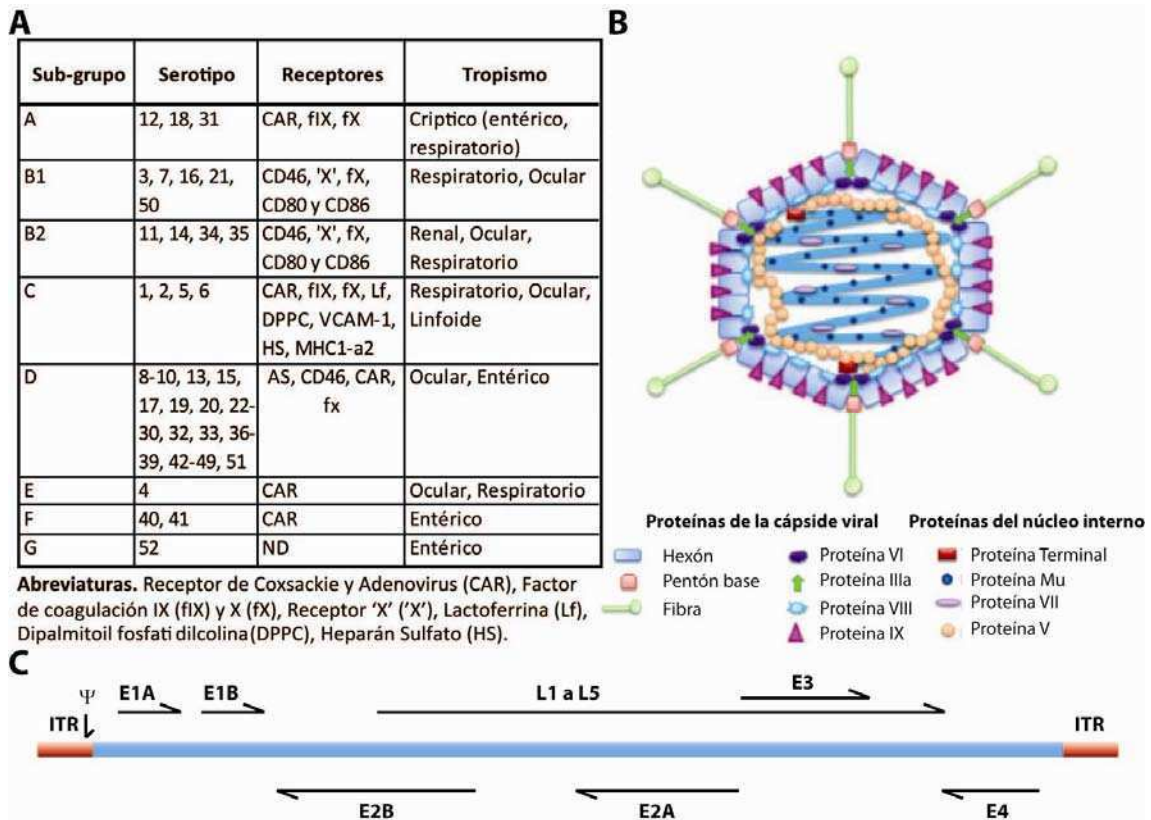


Figura 3. Clasificación y estructura del adenovirus humano. A) Clasificación de los sub-grupos de adenovirus humanos, serotipo y receptores descritos. B) Diagrama de la estructura de un adenovirus. C) Estructura del genoma adenoviral humano con los extremos de repeticiones terminales invertidas (ITR), la señal de encapsidación (Ψ) y sus unidades transcripcionales. Figura B) adaptada de Chailertvanitkul, VA *et al* Curr Opin Biotech (2010) 21 627

A partir de la endocitosis el adenovirus escapa del endosoma mediante permeabilización de la membrana y pasa al citoplasma [82]. Este proceso se origina por la acidificación del medio intra-vacuolar que produce cambios en la estructura de la cápside viral y permite su liberación del endosoma [83]. Una vez en el citoplasma las partículas son transportadas hacia el poro nuclear mediante transporte por microtúbulos [84] y se unen al poro nuclear para permitir el ingreso del genoma adenoviral al núcleo [85]. La proteína hexón se encuentra involucrada en la unión de la cápside viral al poro nuclear y, luego de diferentes procesos, transportar el genoma adenoviral mediante la unión a la histona H1 [83, 85-87]. Una vez que el genoma viral ha ingresado al núcleo, la expresión de los genes tempranos tiene tres objetivos. El primero es la estimulación de la célula para entrar en fase S y, de esta forma, proporcionar el ambiente intracelular que permita la replicación viral. El segundo objetivo es la protección de la célula infectada contra una respuesta antiviral de la

misma célula y del entorno. Y tercero, producir proteínas virales en forma coordinada con proteínas celulares para llevar adelante la replicación del ADN [88].

El primer gen transcripto es E1A y la proteína E1a producida por este gen transactiva la expresión de los otros genes tempranos (E2, E3 y E4) [89] e induce la entrada en fase S de la célula infectada para lograr la replicación del genoma adenoviral [90]. La ausencia del gen E1A provoca la falta de replicación del virus [91]. Esta estrategia puede ser utilizada para lograr una replicación controlada mediante la regulación de la expresión de E1A mediante promotores heterólogos. Los genes tardíos (L1 a L5) codifican para la mayor cantidad de proteínas estructurales involucradas en el armado de la partícula viral.

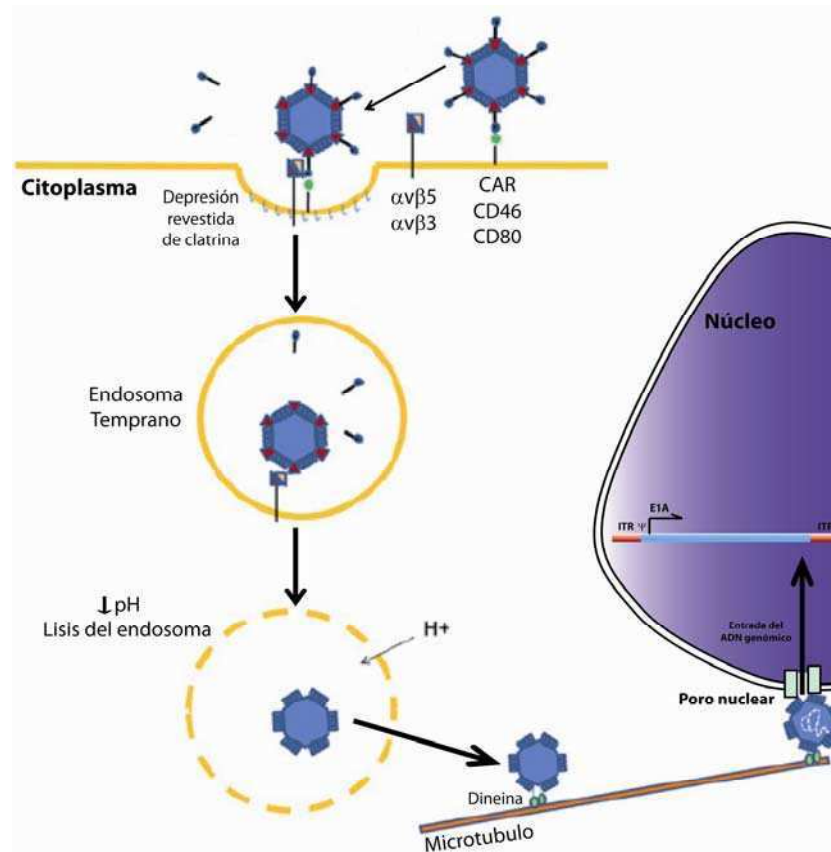


Figura 4. Endocitosis del Adenovirus. El virus se ancla a la membrana citoplasmática mediante los receptores celulares (CAR, CD46, CD80), luego se une a integrinas e induce la invaginación de la membrana para la formación de un endosoma temprano del que escapa para ser transportado al poro nuclear por los microtúbulos. Luego inserta el genoma adenoviral en el núcleo que expresa el gen E1A para continuar con la replicación adenoviral.

El primer ensayo clínico utilizando adenovirus como agente terapéutico se realizó en 1956, muy poco tiempo después del descubrimiento del virus. En este ensayo se inocularon pacientes de carcinoma de cuello uterino por cuatro rutas de

administración con adenovirus de diferentes serotipo (Ad serotipo 1 al 7 y 10). Aunque ninguno de los tratamientos alteró el progreso de la enfermedad, solo en las personas tratadas con virus biológicamente activo (sin calentar), se observó un área de necrosis tumoral y la formación de una cavidad en el tumor en el 65% de los casos. El tratamiento produjo fiebre, malestar y fotofobia solo en 3 de 30 pacientes [92]. En el siguiente ensayo clínico utilizando este virus involucró 14 pacientes con diferentes tipos de cáncer, en este caso el virus utilizado fue el adenovirus de serotipo 14 (en ese momento denominado virus RI-67) por diferentes rutas de administración. En este trabajo se reportaron síntomas clínicos menores y en 2 de los pacientes que presentaron síntomas de fiebre se observó una regresión tumoral transiente. En un tercer estudio se inocularon de forma intra-tumoral o intra-venosa adenovirus salvaje de diferente serotipo (1 al 7 y 9) en 10 pacientes terminales de cáncer cervical. Al igual que en los ensayos anteriores se observaron algunos síntomas menores como fiebre, frío, náuseas, dolor abdominal y articular de forma transiente en algunos pacientes. En 6 de 7 pacientes que fueron a radioterapia en forma posterior al tratamiento con los virus se reportó la destrucción de células tumorales, indicando que la infección viral sensibilizó a las células tumorales al efecto de la radioterapia. De estos siete pacientes, 5 mostraron estabilidad o regresión de la enfermedad por 16-24 meses, mientras que 2 mostraron progresión de la enfermedad [93]. Un posterior seguimiento de estos pacientes demostró que 4 de 10 pacientes seguían vivos y libres de la enfermedad 10 años después [94]. Estos datos de ensayos clínicos indicaron que los adenovirus no tienen ningún efecto grave sobre la salud del paciente y mostraron efecto sobre el tejido tumoral y, en uno de los casos, en la supervivencia de los pacientes.

A partir del advenimiento de las técnicas de recombinación homóloga a fines de los 70s y principios de los 80s, surgió la posibilidad de modificar el genoma de los adenovirus para expresar el gen deseado o atenuar su replicación.

El ADN exógeno puede ser insertado en al menos tres regiones del genoma adenoviral: E1, E3 y la pequeña región comprendida entre E4 y el ITR derecho (Figura 3-C). La primera generación de adenovirus recombinantes poseían deleciones en la región E1 y/o E3, que bloquea su habilidad de replicarse (E1) y genera mayor espacio para el clonado de genes (E3) [91]. Los adenovirus de segunda y tercera generación poseen deleciones en las unidades E1, E2, E3 y E4, que confieren a estos vectores menos

capacidad inmunogénica y mayor capacidad para la inserción de ADN exógeno [95-97]. Los adenovirus de cuarta generación o “gutless” solo contienen las repeticiones ITR y la señal de encapsulación y pueden empaquetar hasta 37 kilobases [98, 99].

El primer ensayo clínico utilizando un adenovirus recombinante no replicativo fue realizado en el año 1993 en pacientes con fibrosis quística. Esta enfermedad es causada por la falta de función de la proteína encargada de la regulación de la conductancia tras-membrana denominada CFTR. Este grupo utilizó un adenovirus recombinante conteniendo el ADNc del gen CFTR normal y utilizaron este vector para transducir el epitelio nasal y bronquial de 4 pacientes. A diferentes tiempos evaluaron los niveles de ARNm y de proteína CFTR en muestras de pacientes y observaron aumento de ambos hasta 10 días pos-tratamiento. El problema de este ensayo fue que después de 10 días se observó una baja en la expresión de CFTR, probablemente debido a la respuesta inmune celular contra proteínas del virus y también una respuesta humoral contra componentes de la cápside viral [100].

En el caso del cáncer el primer adenovirus no replicativo utilizado fue rAd-p53, que contiene un casete de expresión del gen P53 [101]. Este gen se encuentra inactivado en alrededor del 50% de los cánceres humanos (revisado en [102]). El primer ensayo clínico se realizó sobre pacientes con cáncer de cabeza y cuello que logró una reducción o estabilización del tamaño tumoral en 9 de 17 pacientes [103]. Posteriormente se realizaron ensayos clínicos en diferentes tumores y se logró una respuesta completa del 64% en combinación con radioterapia, mientras que la radioterapia sola logró un 19% de respuesta completa [104]. Estos resultados llevaron en 2003 a la aprobación del primer medicamento de terapia génica, Gendicine (rAd-p53), para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello [105].

El mayor problema de esta estrategia es que el efecto depende de los niveles de infección inicial del tejido ya que el virus no posee la capacidad de multiplicarse. En cáncer se hipotetizó que el uso de virus de replicación controlada o condicional en el tejido tumoral podrían beneficiar al tratamiento debido a su capacidad de matar a la célula infectada y, en este proceso, producir una progenie viral capaz de infectar a nuevas células tumorales.

I.3. VIRUS DE REPLICACIÓN CONDICIONAL

Los primeros virus con capacidad de replicación condicional utilizados para el tratamiento del cáncer surgieron a partir de la observación de que el virus de herpes simple (HSV) que no contenía el gen de la timidina quinasa no era capaz de replicarse en células que se encuentren arrestadas o fuera del ciclo celular. A partir de este dato y debido a su neurotropismo, se pensó que este virus podría utilizarse para el tratamiento de células tumorales que se encuentran ciclando como los gliomas. En este trabajo inicial observaron un retraso en el crecimiento y un aumento de la supervivencia de los ratones desnudos en diferentes modelos de glioma tratados con este virus [106].

En 1996 se describe, por primera vez, la utilización de un adenovirus de replicación condicional (CRAd), denominado dl1520 u Onyx-015, con potencial oncolítico para el tratamiento del cáncer [107]. Este virus posee una delección del gen E1B-55k que se encuentra involucrado en la proteólisis de la proteína p53. Esta última proteína aumenta su expresión en células normales ante la replicación del adenovirus, causando un arresto celular. Por otro lado, la proteína p53 se encuentra ausente o no funcional en muchos tumores. Estos datos indicaban que su ausencia favorecería la replicación del virus Onyx-015. Posteriormente se comprobó que no se debía a esta función de la proteína E1B-55k la selectividad por las células tumorales sino a la función que esta cumple sobre el bloqueo de la exportación nuclear de ARNm celulares en las fases tardías de la replicación viral [108]. El primer ensayo clínico utilizando este virus para cáncer de cabeza y cuello se reportó en el año 2000 y a partir de este ensayo inicial se utilizaron diferentes métodos de inyección y en otros tipos tumorales (revisado en [109]). La compañía propietaria de este virus discontinuó el producto debido a una decisión de continuar con el desarrollo de otros productos [110].

Un adenovirus similar a Onyx-015, pero con una delección parcial mayor en la región E3, y denominado H-101 se desarrolló en China. Este virus demostró una mayor respuesta clínica objetiva (parcial o completa) en combinación con quimioterapia que la quimioterapia sola (73% contra 40%) [111]. Estos resultados llevaron a la aprobación de este CRAd como medicamento por China en Noviembre de 2005 [112].

El CRAd Onyx-015 fue el primer adenovirus replicativo utilizado en ensayos clínicos pero, al igual que H101, no poseen secuencias recombinantes adicionales que puedan regular o aumentar su replicación en forma tejido específica. Otro de los problemas del uso de los adenovirus del sub-grupo C (Adenovirus serotipo 2 ó 5) es que la mayoría de las personas desarrollan a temprana edad anticuerpos bloqueantes contra estos adenovirus, neutralizando su actividad [113, 114]. Por otro lado, la mayoría de los virus de estos serotipos administrados por vía endovenosa terminan retenidos en el hígado tanto en ratones [115] como en primates no humanos [116] y no alcanzarían el tejido deseado en número suficiente para lograr el efecto terapéutico deseado.

Existen dos modalidades para sobrepasar estos problemas y lograr una replicación adenoviral específica en las células tumorales. Una estrategia involucra la regulación transcripcional mediante la utilización de secuencias que dirijan la expresión de genes. Otra estrategia involucra la regulación de la unión a los receptores celulares o regulación transduccional.

A partir de la caracterización de regiones regulatorias de la expresión de genes y del conocimiento de secuencias que poseen actividad específica en diferentes tejidos, surgió la posibilidad de acotar la replicación viral al tejido tumoral. En el caso de los adenovirus, la estrategia utilizada implica la regulación de la replicación adenoviral mediante el uso de promotores específicos de tumor o tejido para dirigir la expresión del gen E1A, implicado en la replicación viral (revisado en [117]).

I.3.1. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL

La falta de especificidad tisular en cuanto a la expresión del gen terapéutico y la regulación de la expresión génica constituyen unos de los principales problemas que deben ser solucionados en el desarrollo de esta rama de la de terapia génica. Como ya se mencionó, una de las estrategias para solucionar este problema es la utilización de elementos reguladores o promotores celulares específicos [118].

Otra dificultad a resolver en la terapia génica es el tiempo de actividad (expresión) del transgén, ya que en desordenes monogénicos es importante que la actividad del transgén sea perdurable, mientras que en los tratamientos contra el cáncer la expresión del transgén debe concluir al momento de la eliminación de la enfermedad. Estas necesidades pueden abordarse mediante la elección del vector utilizado o el

desarrollo de estrategias para la regulación de la transcripción del transgén. En el caso de los vectores para el tratamiento de enfermedades monogénicas la utilización de un virus que se integre al ADN genómico (retrovirus, virus adeno-asociado) sería más útil que un adenovirus, ya que la probabilidad de mantener la expresión es mayor en los primeros [119]. Por otro lado, para enfermedades como el cáncer no sería en principio necesaria la expresión estable ya que lo que se pretende es crear una respuesta inmediata antitumoral y la concomitante memoria inmunológica que permitiría eliminar posibles reapariciones del tumor. En cuanto a la regulación transcripcional del transgén, en cáncer la regulación depende de la cantidad de producto génico que se necesita para “curar” el padecimiento; esto puede ser abordado mediante la utilización de un elemento transcripcional específico o promotor transcripcional.

Se define a los promotores o regiones promotoras a las secuencias de ADN genómico que se encuentran aguas arriba de la secuencia transcrita y constituyen los elementos centrales en el proceso del control transcripcional. La función regulatoria aportada por otros elementos que contribuyen al control de la transcripción, tales como activadores (enhancers) o supresores, debe ser integrada en el contexto de un promotor para modificar la expresión génica [120]. Debido a la especificidad requerida en el desarrollo de tratamientos de terapia génica para cáncer, los promotores activos en un amplio rango de células como el promotor de Citomegalovirus (CMV), poseen un uso limitado debido a la dificultad que existe para lograr la transducción específica de un tipo celular determinado. Si se utilizara este tipo de promotores el transgén se expresaría en cualquier célula transducida por el vector eliminando la especificidad del tratamiento. El empleo de promotores o elementos reguladores que posean actividad transcripcional específica de tejido es una estrategia que intenta resolver este problema, limitando la expresión del gen terapéutico sólo al tejido deseado.

Los criterios utilizados para la selección de promotores en terapia génica del cáncer están basados en la tasa de actividad y especificidad tisular que poseen [121, 122]. Un promotor se considera apropiado para ser utilizado en terapia génica del cáncer cuando la actividad transcripcional del gen que regula está aumentada en el entorno tumoral.

La clasificación entre promotor tejido-específico o tumor-específico es bastante confusa. La definición de promotor específico de tumor se basa en el hecho de que

ciertos promotores son activos en muy bajos niveles o están inactivados en el tejido normal, pero se expresan en altos niveles en su contraparte tumoral.

Una clasificación en la cual se incluyen gran número de promotores de posible uso en terapia génica de cáncer fue propuesta por Nettelbeck y colaboradores [121]:

- a) Promotores específicos de cáncer: específicos del proceso maligno que no muestran ninguna especificidad de tejido.
- b) Promotores de tipo tumoral: promotores de genes que poseen poca o ninguna actividad en las células normales de un organismo adulto bajo condiciones no patológicas, pero son activos o aumentan su actividad en cierto tipo de tumores. Generalmente son promotores de genes que codifican para antígenos onco-fetales que tienen especificidad tisular definida (por ejemplo: PSA [antígeno específico de próstata] y CEA [antígeno carcinoembrionario expresado en hepatomas y cáncer de colon]).
- c) Promotores activos en condiciones fisiológicas particulares que pueden ocurrir en áreas tumorales, como por ejemplo promotores que se activan en regiones donde los niveles de oxígeno son reducidos, donde existen procesos inflamatorios, etc.
- d) Promotores específicos de células del endotelio vascular tumoral.

Entre los promotores que han sido utilizados en terapia génica podemos mencionar a ErbB-2 [123], Ciclooxigenasa 2 [124], α -fetoproteína [125], Antígeno Específico de próstata [126, 127], Antígeno carcinoembrionario [128] y promotor midkine [129], entre otros. Uno de los promotores específicos de melanoma descritos es el promotor del gen tirosinasa, enzima involucrada en la producción de melanina [130]. También se ha utilizado el promotor de survivina [131], EGR-1 [132] y PEG-3 [133]. Todos estos promotores se caracterizan por tener una expresión específica o elevada en las células tumorales, pero el tejido tumoral no solo se encuentra formado por las células tumorales.

Si el tejido tumoral está compuesto tanto por células tumorales como por fibroblastos, células endoteliales y del sistema inmune formando un tejido mixto que es diferente al estroma de un tejido normal, es posible hipotetizar que al utilizar un promotor que posea alta actividad en todos los componentes del tejido tumoral se eliminar no solo a

las células tumorales sino al tejido que mantiene o favorece el desarrollo de las células tumorales.

Diversos estudios demuestran que la sobreexpresión de SPARC se encuentra asociada con la progresión maligna de diferentes tipos de tumores, entre ellos cáncer de mama, colorectal [134] y, en melanomas [135, 136], entre otros. Además, esta proteína también se encuentra sobreexpresada en células endoteliales y fibroblastos asociados al tumor [137].

I.3.1.1. SPARC

SPARC es una proteína de secreción, ácida y rica en cisteínas que pertenece a un grupo de factores asociados a la matriz extracelular (MEC) que regulan la interacción matriz-célula. El gen que codifica la proteína SPARC muestra un alto grado de conservación evolutiva, presentando el gen humano un 92% y 38% de identidad con respecto a su contraparte en ratones y nematodos, respectivamente [138].

SPARC fue descrita por primera vez en el año 1981 por J. Termine y colaboradores e inicialmente fue denominada Osteonectina ya que fue caracterizada como un producto presente en tejido óseo [139]. En el año 1984 otro grupo caracterizó la misma proteína en medio de cultivo de células endoteliales bovinas, humanas y porcinas, como así también en líneas murinas malignas o transformadas y en neoplasmas humanos, denominándola en este caso proteína 43K [140]. Cabe destacar que en este trabajo no observó una expresión uniforme de la proteína en las distintas líneas celulares de neoplasmas humanos testeadas. En el año 1986 otro grupo clonó y caracterizó a SPARC a partir de endodermo fetal murino y recién a partir de este trabajo se le atribuyó una función estructural y antigénicamente relacionada a la proteína 43K [141].

La proteína SPARC se encuentra altamente conservada desde anfibios a humanos con un 70% de homología [142] y también se encuentra en *D. melanogaster* [143] y *C. elegans* [138].

I.3.1.1.1. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE SPARC.

SPARC es una proteína de 298-304 aminoácidos, constituyendo los primeros 17 aminoácidos la secuencia señal de secreción, compuesta por tres dominios.

SPARC modula la adhesión celular a través de un posible receptor aún no identificado, que participaría en una cascada de señalización asociada a la formación de adhesiones focales [144]. SPARC se encuentra íntimamente relacionada con la adhesión y migración celular ya que puede interactuar directamente con algunos de los componentes de la MEC, como la vitronectina, para modular la adhesión celular [145] y colágeno [146, 147]. Se expresa en situaciones en donde se inician cambios dinámicos en los contactos célula-célula o célula-matriz, como en la remodelación y/o renovación de tejidos en organismos adultos y durante el desarrollo embrionario [137]. SPARC afecta la progresión tumoral en diferentes niveles. En el caso de las primeras etapas del melanoma, SPARC se encuentra involucrada en la inducción de la expresión de proteínas involucradas en la transformación oncogénica de los melanocitos [148]. También fue demostrado por nuestro laboratorio y otros que SPARC se encuentra involucrado en la transición epitelio-mesenquimal del melanoma [148-150]. En estadios más avanzados de la progresión tumoral, SPARC producida por las células tumorales o por el estroma (endotelio, sistema inmune o fibroblastos), se encuentra involucrada en el escape tumoral mediante la inhibición de la inmunovigilancia y la promoción de la angiogénesis [136, 151-155] (Figura 5).

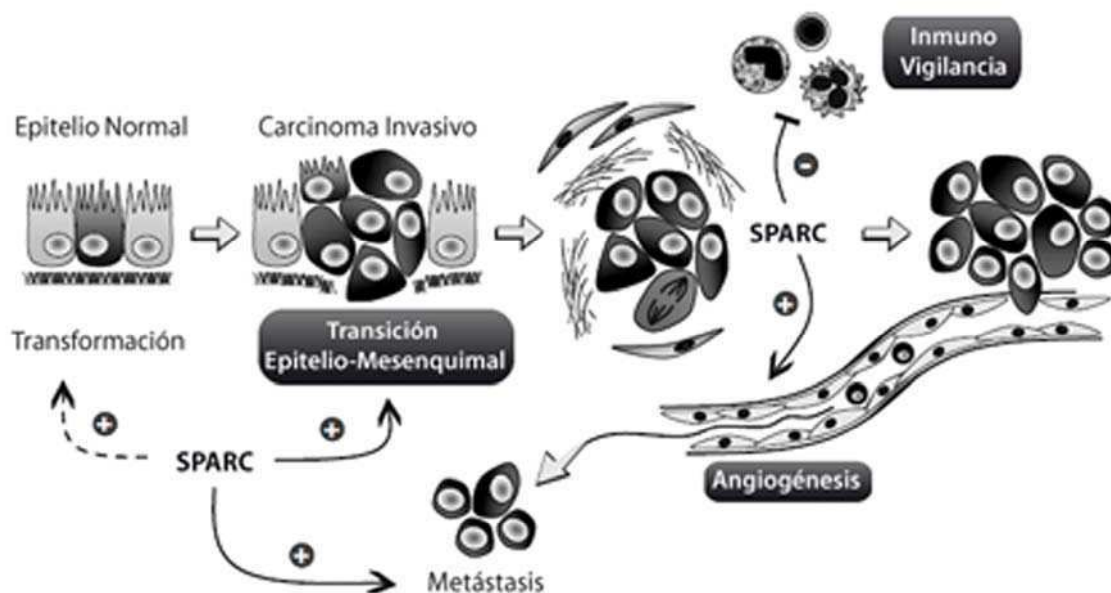


Figura 5. Efectos de SPARC durante la progresión tumoral. SPARC se encuentra asociado a diferentes pasos del progreso tumoral. (Adaptado de Podhajcer, OL y col. (2008) Cancer Metastasis Rev).

I.3.1.1.2. EL PROMOTOR DE SPARC

El gen de SPARC se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 5 en humanos [156] (Figura 6), en la región central del cromosoma 11 en ratones [141] y en el cromosoma 7 en bovinos [157].

Los promotores de SPARC humano [158], murino [159] y bovino [160] han sido clonados y caracterizados. La comparación entre estos promotores muestra que, al igual que lo observado a nivel del gen, existe una alta homología de secuencia.

Se observó también que los promotores de SPARC humano y bovino, carecen de una caja TATA consenso, elemento que se encuentra en muchos promotores de genes eucariotas [161]. Ambos promotores contienen dos cajas GGA (Figura 6), de las cuales, la caja GGA1 exhibe una gran similitud entre las dos especies.

Si bien el promotor de SPARC humano contiene diferentes dominios regulatorios, Hafner y colaboradores (1995) observaron que la caja GGA1 es necesaria y suficiente para obtener una máxima actividad transcripcional, mientras que el elemento espaciador que separa las dos cajas GGA posee un efecto negativo sobre su expresión [158]. Es importante destacar que este grupo ha demostrado que en humanos la región promotora que contiene sólo las cajas GGA no es suficiente por sí sola para conferir especificidad de expresión en diferentes líneas celulares, lo contrario ocurre con una región similar del promotor bovino, la cual confiere tal especificidad en células de origen bovino [162].

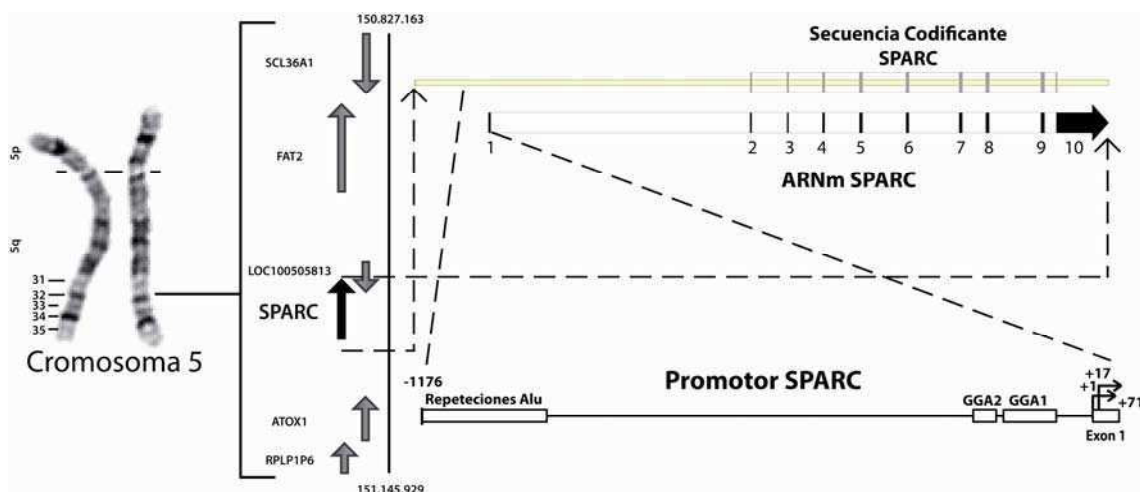


Figura 6. Ubicación y estructura del gen y promotor de SPARC humano. El gen de SPARC se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 5 (5q) en la cadena anti-sentido. El gen de SPARC de 25510 pares de bases contiene 10 exones y la secuencia codificante

comienza en el exón 2. El promotor de SPARC posee dos cajas GGA (GGA1 y 2) y 2 sitios de inicio de la transcripción (+1 y +17).

Young y colaboradores (1989) aislaron la región promotora del gen SPARC bovino, caracterizaron el sitio de inicio de la transcripción y analizaron la presencia de posibles secuencias consenso de unión de factores de transcripción en esta región y en el primer exón. Demostraron la presencia de una caja GC ubicada entre las bases -211 a -189 con posibles sitios de unión al factor de transcripción SP1, además de esta caja, localizaron un sitio sensible a nucleasa S1 en la posición -55 del promotor, aguas abajo de la caja GGA1 [160]. Las regiones de ADN sensibles a la actividad de esta proteína se consideran indirectamente implicadas en la regulación de la actividad transcripcional de un gen, debido a que su estructura se encontraría más relajada para la unión de factores de transcripción, posibilitando el corte de la hebra por la nucleasa S1, que sólo corta ADN simple cadena [163].

Domínguez y colaboradores (1991) describieron la región comprendida entre las bases -504 a +11 del promotor bovino como un elemento positivo para la transcripción de SPARC en células fetales bovinas. Este fragmento también confiere expresión específica, mostrando mayor actividad en células con mayor nivel de expresión de ARNm de SPARC. Observaron también que sólo las cajas GC y GGA1 no son suficientes para la máxima expresión de SPARC en células de hueso bovinas, y que la región localizada entre las bases -927 a -504 produce una dramática inhibición de la transcripción [162].

El promotor bovino de SPARC posee actividad transcripcional en líneas celulares de distintas especies, en células humanas fetales y adultas su actividad es 8,7 y 3,2 veces más alta respectivamente en comparación a un plásmido control (sin promotor), mientras que en sarcoma osteogénico murino su actividad aumenta 6,9 veces [160]. Estos resultados indican una alta conservación de la regulación transcripcional de este gen en distintas especies, lo que permitiría la utilización del promotor bovino como herramienta para la introducción de genes terapéuticos en células humanas.

Existen trabajos que describen factores de transcripción involucrados en la regulación de la transcripción de SPARC en gallina, como el factor transcripcional AP-1[164]. En un trabajo posterior, este mismo grupo de investigación demuestra que v-jun inhibe la expresión de SPARC al unirse a SP1 y SP3, estos últimos involucrados en la activación

de la transcripción de SPARC, mediante la formación de un complejo ADN-SP1/3-v-jun [165]. Del mismo modo, en el promotor de SPARC bovino se describió que AP-2, o una proteína relacionada, interacciona específicamente con dos regiones del promotor [162]. Describen también a SP1 y un factor, denominado GGA, que se une por debajo de la caja GGA1 específicamente en células de hueso que producen altos niveles de ARNm de SPARC, no encontrando este factor en células que no producen el ARNm de SPARC [166].

En el promotor humano existen muy pocos reportes de factores de transcripción involucrados en la regulación de la transcripción. Se describió la unión de AP-1 en la región -1051 a -1045, aunque no participa en la regulación de la actividad del promotor y, además describen a la región -120 a -70 como la involucrada en el aumento de la expresión de SPARC debido a la sobreexpresión de c-jun. SP1 y SP3 se unen en esta región del promotor aumentando su actividad, por lo que proponen un modelo por el cual c-jun actuaría a través de la activación de la transcripción de SP1. Además de este, proponen otro modelo en el cual la acción de c-jun se desarrolla de manera indirecta a través de la posible unión a secuencias consenso de AP-1, causando el reclutamiento de histonas de-acetiladas y posibilitando la activación de la transcripción [167].

I.3.1.1.3. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE SPARC

Como se mencionó anteriormente, en el adulto la expresión de SPARC se limita a tejidos en procesos de reparación, remodelación, cicatrización y enfermedad. De hecho, se observó una correlación entre una elevada expresión de SPARC y diversas patologías como metástasis, artritis, diabetes y enfermedades renales [168]. Se describió también que la sobreexpresión de SPARC está asociada a la progresión maligna de diversos tipos de tumores, tales como el cáncer de mama [169], linfoma de manto celular [170], esófago de Barret y carcinoma de esófago [171, 172], el cáncer colorectal [134], astrocitomas [173], gliomas [174], meningiomas [175], mieloma múltiple [176], hepatocarcinomas [177] y melanomas [135, 136]. SPARC también se encuentra expresada en forma muy elevada en endotelio y fibroblastos activados de tumores *in vivo* [137, 178].

Existen ciertos tipos tumorales en los cuales la expresión de SPARC es muy baja o nula. En cáncer de ovario de origen epitelial tanto las células tumorales como el epitelio

normal no expresan SPARC mientras que las células del estroma asociadas a las células tumorales expresan altos niveles de esta proteína, particularmente en la interfase del estroma reactivo y la región tumoral invasiva. La ausencia de expresión de SPARC en el estroma normal indicaría que la sobreexpresión de esta proteína por parte del estroma adyacente al tumor estaría estimulada por la presencia de las células tumorales invasivas [179]. De la misma manera, en células tumorales de páncreas los niveles de expresión de SPARC son mínimos o nulos aunque, al igual que en el caso anterior, los fibroblastos del estroma adyacentes al epitelio neoplásico expresan altos niveles de SPARC. Se demostró que la baja expresión de SPARC en las células tumorales pancreáticas es consecuencia de un proceso de metilación de regiones ricas en nucleótidos GC (islas CpG) en el primer exón del gen de SPARC. Se observó además que, el tratamiento de las células tumorales pancreáticas con proteína SPARC exógena suprime el crecimiento. Existen evidencias de que el factor que aumenta la expresión de SPARC en los fibroblastos del estroma es secretado por las células tumorales, ya que la expresión de SPARC en los fibroblastos aumenta cuando se los co-cultiva con células pancreáticas en un sistema que inhibe el contacto entre las células [180]. Si bien en ambos trabajos encuentran que SPARC, agregada al medio de cultivo, causa una disminución en la tasa de crecimiento de las células tumorales, se podría asumir que la elevada producción de SPARC por parte de las células del estroma favorecería la progresión tumoral debido a la creación de un microambiente más permisivo para el crecimiento e invasión tumoral [181].

De hecho, ensayos *in vitro* demuestran que SPARC induce metástasis en hueso a partir de células de cáncer de próstata como consecuencia de un aumento en la invasión, migración y activación de proteasas en estas células tumorales [182].

Existen numerosos trabajos en los que se describen cambios en los niveles de expresión de SPARC debido a diversos factores (Figura 7). Entre los que producen un aumento de la expresión de SPARC podemos mencionar a la dexametasona [183], el ácido retinoico [184], TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante) [185], Fibronectina [186], Activina [187], PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) e IGF (factor de crecimiento similar a insulina) [188] y la sobreexpresión de c-jun en una línea de cáncer de mama (MCF-7) [167].

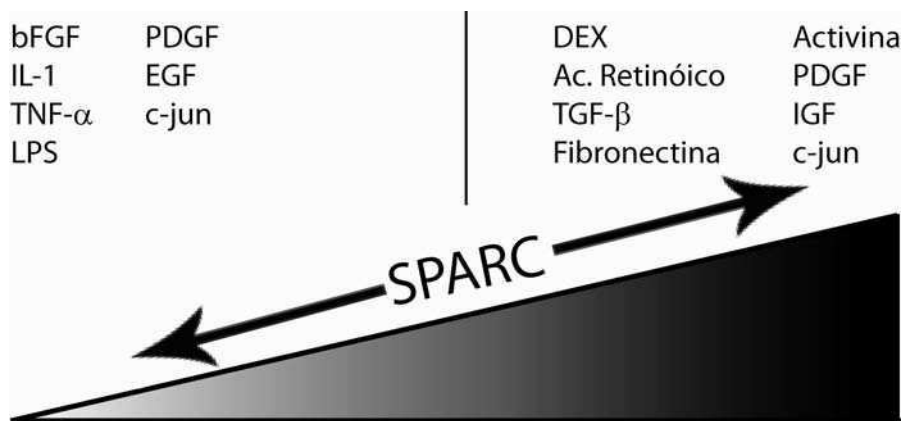


Figura 7. Factores que modifican la expresión de SPARC.

Entre los factores que inducen una disminución en la síntesis de SPARC podemos mencionar a bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico) [189], Interleucina-1, TNF- α (factor de necrosis tumoral) y Lipopolisacáridos [190], EGF (factor de crecimiento epitelial) y PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) [191]. A su vez, c-jun ha sido descrito también como un factor que produce una disminución en la expresión de SPARC en fibroblastos embrionales de rata [192], al igual que en fibroblastos embrionales de gallina [193]. En este último trabajo demuestran que la reducción en la expresión de SPARC está relacionada con la formación de tumores *in vivo*, ya que si en líneas transformadas con v-jun, en donde la expresión de SPARC disminuye, vuelven a expresar SPARC a niveles cercanos a los que poseen los fibroblastos normales, estos pierden la capacidad de desarrollar fibrosarcomas locales.

Por lo antes expuesto, consideramos que los elementos reguladores que activan la transcripción de SPARC podrían ser utilizados para dirigir la replicación de CRAbs de modo selectivo tanto en el entorno tumoral.

Otra de las estrategias que se puede utilizar para aumentar la transcripción del gen E1A es la utilización de promotores recombinantes conteniendo elementos de respuesta a diversas condiciones fisio-patológicas que se manifiestan en el tejido blanco, en este caso, el melanoma. Estos promotores conteniendo secuencias de diferente origen se denominan promotores híbridos o quimera.

1.3.1.2. Promotores híbridos o quimeras

Los promotores híbridos o quimera están formados por elementos de distinto origen que pueden ofrecer mayor especificidad, así como la posibilidad de aplicación en un amplio rango de tipos tumorales complementando y potenciando las propiedades de

los diferentes componentes [194]. Un problema frecuente en la generación de vectores con promotores tejido o tumor-específicos es que, generalmente, estos poseen baja actividad transcripcional debido a las grandes distancias que separan al elemento de inicio de la transcripción de los activadores o “enhancers” [195]. Para superar esta dificultad una de las estrategias utilizadas es la combinación de elementos transcripcionales de distinto origen, aumentando la actividad a través de activadores o “enhancers” y, al mismo tiempo, manteniendo la especificidad [196]. Una característica de estas construcciones es su flexibilidad ya que elementos de distinto origen pueden ser combinados en diverso orden, número y orientación, logrando así una optimización de la regulación génica [197].

Numerosos trabajos utilizan elementos de distinto origen combinados para lograr especificidad tisular dirigida a ciertos tipos celulares como células de músculo liso [198], neuronas noradrenérgicas [199] y células de músculo esquelético [200]. Varios trabajos utilizan combinaciones de promotores y activadores específicos de hígado para encontrar la mayor activación y, al mismo tiempo, mantener la especificidad por este tejido [201, 202]. Otra combinación utilizada es el agregado al promotor específico de próstata (PSA) de elementos de respuesta a andrógenos (ARE), activando la transcripción en presencia de estas hormonas [203]. El agregado de activadores virales aguas arriba de un promotor específico es otra metodología desarrollada para lograr un aumento de la transcripción tejido específica [204, 205].

Los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) ya han sido utilizados para potenciar la actividad transcripcional de un promotor o elemento respondedor en condiciones de hipoxia. Hernandez-Alcoceba y colaboradores han utilizado los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) para potenciar la respuesta de un promotor conteniendo elementos de respuesta a estrógeno (ERE) en tumores de mama [206]. Estos mismos elementos de respuesta a hipoxia han sido combinados con elementos de respuesta a radiación [207] y con promotores específicos de endotelio y elementos inducibles por citoquinas (NF κ B) [208]. La combinación de estos elementos posibilita un aumento de la actividad transcripcional de los promotores en condiciones de hipoxia.

Esta estrategia incrementa las posibilidades de encontrar un promotor que tenga elevada actividad y, a su vez, especificidad. Existen diferentes condiciones fisiopatológicas que caracterizan al tejido tumoral que pueden ser utilizadas para

aumentar la actividad del promotor de SPARC seleccionado para aumentar su actividad transcripcional.

I.3.1.2.1. HIPOXIA

Ha sido descrito que el tejido tumoral posee bajos niveles de presión parcial de oxígeno con respecto a la observada en tejidos normales [209]. Esta condición es característica de tejidos de rápido crecimiento que superan la velocidad de formación de nuevos vasos sanguíneos o neo-angiogénesis, dando lugar al fenómeno denominado hipoxia. La hipoxia es una característica común en muchos tumores sólidos, jugando un rol importante en la resistencia tumoral a la quimioterapia citotóxica y a la radiación ionizante [210, 211]. Como se mencionó anteriormente, los tejidos tumorales poseen una tensión de oxígeno media de 1,3-3,9% , mientras que en tejidos normales la tensión de oxígeno media varía entre 3,1 y 8,7% [209]. La existencia de hipoxia tumoral se encuentra asociada con un comportamiento más agresivo del tumor [212]. El bajo nivel de oxígeno representa una paradoja para el crecimiento tumoral ya que, por un lado la falta de oxígeno produce un efecto negativo sobre el crecimiento celular y por otro, las respuestas fisiológicas asociadas a la hipoxia conducen a adaptaciones que aumentan el perfil tumorigénico, como por ejemplo, la ventaja selectiva que poseen las células con mutaciones en genes relacionados a apoptosis. De hecho, se ha demostrado que la hipoxia lleva a la selección de células que sobreexpresan la proteína anti-apoptótica Bcl-X [213].

El proceso de crecimiento tumoral se caracteriza por un rápido crecimiento de las células malignas y, al mismo tiempo, alteraciones en el microambiente que las rodea. Este deterioro del entorno está causado principalmente por la incapacidad de la vasculatura local de proveer el oxígeno y los nutrientes necesarios para el desarrollo de las células tumorales [214]. El factor involucrado en la regulación de la respuesta a hipoxia se identificó a través de la investigación de la Eritropoyetina, una proteína que aumenta sus niveles en condiciones de hipoxia [215]. La secuencia de ADN responsable de la inducción de Eritropoyetina bajo condiciones de hipoxia fue identificada y se denominó HRE (Hipoxia Responsive Element o Elemento Respondedor a Hipoxia) [216] y la proteínas que se unen a este elemento de respuesta a hipoxia, denominada HIF-1 o HIF-2 (Hipoxia Inducible Factor 1 o Factor Inducible por Hipoxia 1), fueron purificadas, clonadas y descritas como hetero-dímeros [217, 218]. La estructura de

ambas proteínas es similar, pero mientras HIF-1 α se expresa en la mayoría de los tejidos, HIF-2 α se expresa sólo en algunos tejidos [219].

I.3.1.2.1.1. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE HIF.

Actualmente se sabe que la regulación de la respuesta celular a los bajos niveles de oxígeno es llevada a cabo por los complejos hetero-diméricos HIF-1 o HIF-2 y la regulación de la actividad es muy similar (revisado en [220]). El complejo HIF-1 está formado por las subunidades HIF-1 α o y ARNT (*Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*), también denominado HIF-1 β [221]. Este complejo proteico se une a secuencias conservadas conocidas como HRE [222] que se encuentran en regiones de genes tales como VEGF (Factor de crecimiento del endotelio vascular), gen que se activa durante el proceso de angiogénesis [223]; EPO (Eritropoyetina) involucrado en la estimulación de la eritropoiesis [216]; GLUT-1, un transportador de glucosa y Fosfoglicerato Quinasa 1, implicado en el metabolismo de energía [224]. La expresión de estos genes confiere a las células la capacidad de adaptarse a bajos niveles de oxígeno [225].

Bajo condiciones donde la tensión de oxígeno es normal (normoxia), HIF-1 α o HIF-2 α son rápidamente degradados [219]. La regulación de la estabilidad de HIF-1 α recae en la proteína supresora de tumor von Hippel-Lindau (VHL), que se une a HIF-1 α cuando esta es hidroxilada en normoxia por una proliil-hidroxilasa [226] en el residuo prolina 564 [227, 228] y lleva a la ubiquitinación y degradación de la proteína por la vía del proteosoma [229]. En condiciones de hipoxia, HIF-1 α se estabiliza y sus niveles aumentan [230], mientras que la fracción degradada (ubiquitinada) disminuye [231]. El cambio en los niveles de HIF-1 α desencadena la transcripción de genes específicos debido a la unión de las dos subunidades de HIF-1 a los elementos de respuesta a hipoxia (HRE) en los promotores de estos genes blanco.

I.3.1.2.1.2. ELEMENTOS DE RESPUESTA A HIPOXIA (HRE)

HIF-1 o HIF-2 activan los genes inducidos por condiciones de hipoxia a través de la unión al ADN en los elementos denominados HRE que poseen una secuencia consenso de unión. Wang y Semenza describieron la secuencia 5'-TACGTGCT-3' de la región 3' del gen de Eritropoyetina como la región involucrada en la unión de HIF-1 [218]. Los elementos HRE del promotor del gen VEGF humano se localizan en la región promotora entre los nucleótidos -985 a -939. Estos elementos revelan un alto grado de

conservación con respecto a los que poseen los promotores de VEGF en rata y ratón, especialmente en las bases que contienen el sitio de unión a HIF-1 y las repeticiones (A/C)ACAG que lo flanquean [222]. En los promotores de Fosfoglicerato Quinasa 1 y Lactato Deshidrogenasa A se encontró la misma secuencia consenso que activa la transcripción de estos genes en condiciones de hipoxia [224], al igual que en los promotores de otras enzimas de la vía glicolítica [232]. La caracterización de elementos de respuesta a hipoxia en estos y otros genes permitió ajustar la secuencia consenso de unión de HIF-1 a la formada por la secuencia 5'-TACGTG-3'.

I.3.1.2.1.3. RELACIÓN CON LA TUMORIGENICIDAD

Diversos trabajos indican que la pérdida de actividad de HIF-1 se correlaciona con un incremento en la latencia tumoral y disminución de la densidad vascular [233-236]. Un ejemplo son los teratocarcinomas que no expresan la proteína HIF-1 α , que inyectados en forma subcutánea en ratones desnudos (*nude*) poseen un tamaño tumoral menor al de teratocarcinomas con expresión normal de HIF-1 α . Contrariamente, la sobreexpresión de HIF-1 α lleva a una disminución de la latencia tumoral y a un incremento de la densidad vascular, volumen vascular y flujo sanguíneo [237]. Diversos tipos de tumores exhiben sobreexpresión de la proteína HIF-1 α , Zhong y colaboradores encontraron sobreexpresión de HIF-1 α en el 53% de los tumores primarios analizados y en 69% (13 de 19) de los tipos tumorales comparados con su contraparte normal [238]. Dicho aumento tiene un importante significado biológico debido a que HIF-1 α e HIF-2 α son factores que activan la angiogénesis, proceso necesario en un entorno de rápido crecimiento celular como es el tejido tumoral. Típicos ejemplos de dichos procesos son hemangioblastomas [239], carcinoma renal [240] y cáncer de próstata [241], donde los niveles de HIF-1 α se encuentran dramáticamente aumentados. En melanoma ha sido reportado que HIF-1 α e HIF-2 α se encuentran expresado en 28% y 65% de los casos analizados [242]. También se relacionó en melanoma a la hipoxia con un incremento del potencial metastásico mediante un aumento de la expresión del receptor de la urokinasa activadora del plasminógeno (uPAR) [243], a través del aumento en la expresión de Interleuquina-8 [244] o una baja en la expresión de moléculas de adhesión de la superficie celular [245]. A su vez la sobreexpresión de HIF-1 α está relacionada con mutaciones en varios genes supresores de tumor incluyendo p53, PTEN y von Hippel-Lindau [237, 246, 247]. Siguiendo esta lógica, todos los tumores de crecimiento rápido activarían este factor de transcripción debido a las

condiciones de hipoxia creadas durante el crecimiento neoplásico, donde el aumento del tamaño tumoral excede la tasa de renovación en la irrigación sanguínea.

Por lo antes descrito, la utilización de promotores con motivos de respuesta a hipoxia representaría una gran ventaja para el desarrollo de estrategias de terapia génica para dirigir la expresión de genes terapéuticos a cualquier tipo de tumores en un estado avanzado de desarrollo [248].

La efectividad de esta estrategia ya ha sido reportada por Binley y colaboradores, quienes utilizaron un adenovirus de replicación deficiente en el cual la expresión del gen reportero lacZ se encuentra bajo el control de HRE. En este trabajo demostraron una baja expresión basal del transgén en normoxia y una alta inducción en hipoxia, con niveles equivalentes a los obtenidos con el promotor CMV [249]. Este y otros investigadores han utilizado estos elementos para dirigir la expresión de genes suicidas [249, 250] y la replicación viral de un adenovirus [251].

I.3.1.2.2. FACTOR NUCLEAR KAPA B (NFκB)

Otra de las características del tejido tumoral es la presencia de numerosas células del sistema inmune que producen proteínas pro-inflamatorias que inducen al factor transcripcional NFκB.

NFκB es una familia de proteínas que regulan la expresión de genes relacionados con inmunidad innata, inflamación y apoptosis. El factor transcripcional NFκB esta compuesto por 5 diferentes sub-unidades que conforman homo- o hetero-dímeros con diferentes propiedades de unión al ADN y activación o represión de la transcripción (revisado en [252]). Los sitios de unión para este factor transcripcional se encuentran en cientos de genes que responden en forma diferencial a su activación. En las células normales los complejos de NFκB se encuentran secuestrados en citoplasma y, por lo tanto, permanecen inactivos. A partir de estímulos como LPS, IL-1α o TNFα, NFκB se acumula en forma activa en el núcleo e induce la transcripción de genes [253].

La primera evidencia que unía a NFκB con la promoción de la progresión tumoral, especialmente en los tumores relacionados con procesos inflamatorios, fue el aumento de la expresión de genes anti-apoptóticos mediado por TNF-α a través de la vía NFκB [254, 255].

A partir de estos primeros datos, se han descrito niveles elevados de NFκB en muchos tumores [256]. En el caso del melanoma este factor ha sido reportado como constitutivamente activo en melanoma metastásico [257], con 4 veces mayor actividad que en melanocitos. También ha sido descrito como un factor importante para el desarrollo de los vasos en el inicio de la enfermedad mediando la comunicación entre la célula tumoral y la vasculatura tumoral [258].

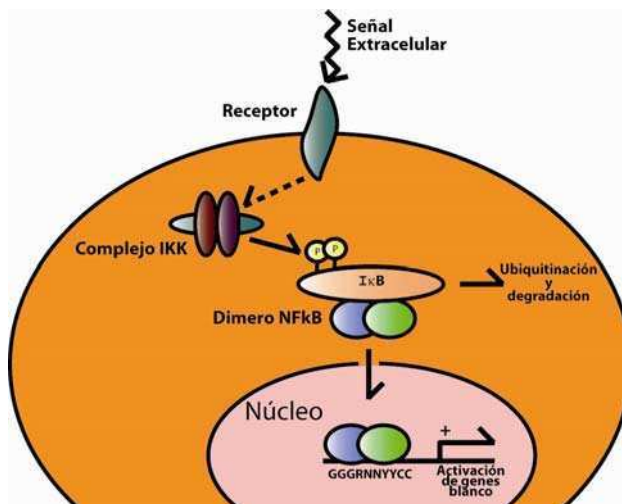


Figura 8. Activación del factor transcripcional NFκB. El estímulo por una proteína extracelular de un receptor activa indirectamente al complejo IKK que fosforila al factor IκB. Ante la fosforilación, IκB libera al dímero de factores NFκB y permite la entrada al núcleo que activa la transcripción de los genes blanco de este factor transcripcional.

En el caso del melanoma maligno ha sido reportado que la alta actividad de NFκB se debe a una mayor actividad del factor IKK, que conduce a una rápida degradación de IκB y, de esta manera, favorece la localización nuclear y actividad de NFκB [259, 260] (Figura 8). A su vez, muchos genes involucrados en la progresión maligna de este tejido y regulados por este factor transcripcional, como IL-8, se encuentran sobre-expresados en los estadios más adversos [173].

Por lo tanto, la adición de elementos de respuesta a NFκB al promotor de SPARC seleccionado posibilitaría un aumento de la actividad transcripcional en melanoma y de esta manera, conduciría a una mayor replicación viral.

I.3.1.2.3. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Otra de las características pato-fisiológicas que caracterizan al melanoma es la presencia de un ambiente oxidante en el tejido tumoral.

El término Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) abarca una gran cantidad de moléculas. Los radicales libres son especies químicas conteniendo uno o dos electrones desapareados. En el caso del oxígeno, que posee 2 electrones desapareados, reacciona para formar estructuras parcialmente reducidas como anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\cdot OH$) o Peroxinitrito ($ONOO^-$). La relación entre especies oxidantes o reductoras en la célula, el balance Redox, cumple un rol importante en las vías de señalización y en la expresión de genes a través de la modulación de factores de transcripción [261]. La célula posee diferentes enzimas para regular el balance Redox como la Superóxido Dismutasa (SOD), que convierte el O_2^- en H_2O_2 que puede ser luego convertido a H_2O por la catalasa o la glutatión peroxidasa acoplada a la glutatión reductasa [262].

El daño al ADN causado por ROS tiene un rol importante en la iniciación de la carcinogénesis y la transformación maligna (revisado en [263]). Los radicales hidroxilo reaccionan con pirimidinas, purinas y proteínas de la cromatina y producen la modificación de las bases, inestabilidad genómica y alteración en los niveles de expresión de genes (revisado en [264]).

El melanoma posee una capacidad anti-oxidante reducida debido a una menor actividad de las enzimas catalasa, Manganese Superóxido Dismutasa (MnSOD) y Glutatión-s-transferasa con respecto a los melanocitos [265-267]. La cantidad absoluta de anión superóxido en melanoma es 4 veces mayor que melanocitos [268].

De la misma manera, las células de melanoma expuestas a estrés oxidativo externo responden aumentando la expresión de NF κ B [257].

Muchos genes regulados por señales redox poseen secuencias respondedoras a ROS (ROSre) en sus promotores (revisado en [269]). Se describió que el gen VEGF-A se encuentra regulado por el estrés oxidativo y que el promotor de este gen posee un sitio de unión a los factores transcripcionales SP1/SP3 en las posiciones -88/-50 involucrados en este proceso de activación [270].

Debido a que muchos agentes tóxicos, entre ellos las drogas quimioterapéuticas y la radiación, generan Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) la utilización de elementos de respuesta a esta condición podrían favorecer una respuesta terapéutica (revisado en [271]).

Por lo tanto, la combinación de ROSre con el promotor de SPARC podría aumentar su actividad transcripcional bajo condiciones de altos niveles de ROS.

I.3.2. REGULACIÓN TRANSDUCCIONAL DEL ADENOVIRUS

Aunque la mayoría de los vectores adenovirales de serotipo 2 o 5 utilizados en terapia génica infectan muchas células diferentes, el problema de esta estrategia es que existen muchos tipos celulares con muy baja o ninguna expresión del receptor CAR, como las células endoteliales [272] y muchos tumores avanzados [273-275].

En el caso de melanoma, se ha descrito que las líneas celulares poseen expresión de CAR mientras que en los extractos de tumores primarios o metastásicos expresan muy bajos niveles o no lo expresan [276, 277]. Para sobrepasar las dificultades de la falta de infección en las células que no expresan el receptor CAR, una de las estrategias es la modificación de la proteína fibra [273-275, 278].

Los adenovirus del sub-grupo B no utilizan la proteína CAR para el anclado a la célula, y existen varios receptores celulares descritos que median su unión a la célula blanco (Figura 3-A). El receptor celular de membrana CD46 cumple funciones de regulación del sistema de complemento [279] y une a los adenovirus del grupo B [280]. Este receptor se expresa en todas las células en humanos pero se encuentra sobre-expresada en tumores y en las líneas tumorales [281]. Por lo tanto, el uso de la fibra quimera conteniendo la base y el tallo de la fibra de serotipo 5 y el cuello de la fibra de serotipo 3 (5/3) ya ha sido descrito [282] y posibilita la infección de las células de melanoma que no expresan el receptor CAR [283, 284]. Esta hipótesis ha sido también demostrada en modelos de cáncer gástrico [285], glioma [286] y ovario [287].

Con respecto a la viroterapia del cáncer con adenovirus, aunque se obtuvieron resultados muy prometedores en ensayos *in vivo* en modelos de ratones, los ensayos clínicos utilizando CRAds demostraron un avance pobre en el tratamiento a menos que fueran combinados con quimio- o radio-terapia [288]. Lo que indica que muchos aspectos en el desarrollo de CRAds deben ser mejorados para lograr un mayor efecto oncolítico. Uno de los problemas que deben ser abordados es la eficiencia de distribución del virus en el tejido tumoral, esto se debe a la presencia de barreras físicas como el tejido conectivo y las células endoteliales dentro del tejido así como la alta presión intra-tumoral [289-291]. Una de las maneras de lograr una mayor

replicación en este ambiente sería mediante el uso de promotores que posean alta actividad transcripcional y permitan replicar al CRAd tanto en las células tumorales como en el tejido conectivo y las células endoteliales que se encuentran en este tejido. Por lo antes expuesto, consideramos que el promotor de SPARC así como elementos reguladores que se activan en condiciones de hipoxia, activación del factor NF κ B o bajo la presencia de altos niveles de ROS podrían ser utilizados para dirigir la replicación de CRAds mediante la regulación de la expresión del gen E1A de modo selectivo en el entorno tumoral.

Otro de los problemas que abordaremos es la pérdida de expresión del receptor CAR en el melanoma y para lograr esta utilizaremos una fibra quimera que aumente la infectividad en las células que no expresan CAR.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis doctoral consiste en el desarrollo de adenovirus oncolíticos de replicación condicional (del inglés *Conditionally Replicative Adenovirus*, CRAd) en el entorno tumoral. Los objetivos específicos que permitirán llevar a cabo este trabajo de tesis han sido divididos en los siguientes objetivos parciales:

- A. Caracterización de la actividad transcripcional de diferentes fragmentos del promotor del gen SPARC en términos de potencia y especificidad con el propósito de seleccionar el fragmento más adecuado para el desarrollo de un CRAd.
- B. Construcción y caracterización de la actividad *in vitro* e *in vivo* de un CRAd cuya replicación este regulada por el fragmento promotor seleccionado según el punto A.
- C. Construcción y caracterización de la actividad *in vitro* e *in vivo* de un CRAd basado en promotores quimeras conteniendo el fragmento del promotor de SPARC seleccionado en A, combinado con elementos de respuesta a especies reactivas de oxígeno (ROSre), a hipoxia (HRE) o sitios de unión de NFκB (κB).
- D. Caracterización de la actividad *in vitro* e *in vivo* de un CRAd con cambios en la fibra de la cápside viral para su re-direccionamiento.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1 SELECCIÓN DE UN PROMOTOR ESPECÍFICO

1.1 RESUMEN

El objetivo principal de esta tesis es el desarrollo de un adenovirus que pueda replicarse en los tres componentes principales del tumor: célula tumoral, fibroblastos y endotelio. La regulación de la replicación viral de un CRAAd se puede lograr mediante la regulación transcripcional de la expresión del gen E1A. El primer objetivo de esta tesis involucra la selección de un promotor para regular la expresión de este gen. Se seleccionó el promotor del gen SPARC debido a su expresión elevada tanto en células tumorales como en las células que componen el estroma tumoral. Para lograr este objetivo se clonaron y caracterizaron, mediante ensayos de actividad luciferasa, diferentes fragmentos de los promotores del gen SPARC humano y bovino. A partir del análisis de deleciones y mutaciones de los diferentes fragmentos clonados se seleccionó la región -513/+35 del promotor de SPARC humano (F512) para regular la transcripción del gen E1A viral y, de esta forma, la replicación condicional de un adenovirus.

1.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARNm DE SPARC

Uno de los objetivos iniciales de esta tesis fue establecer un sistema para evaluar la actividad transcripcional de los diferentes fragmentos del promotor de SPARC. Para ello se determinaron los niveles de expresión del ARNm de SPARC en diferentes líneas celulares y a partir de estos resultados, se estableció un modelo *in vitro* en donde se evaluó la actividad y especificidad de los diferentes fragmentos del promotor del gen SPARC. Se analizó la expresión del ARNm de SPARC mediante PCR en tiempo real en líneas celulares de melanoma, cáncer de mama, de cérvix y colorrectal así como también en líneas normales, estromales y transformadas. A partir de este análisis pudimos determinar que todas las líneas de melanoma expresan niveles intermedios a altos de SPARC, mientras que las líneas de cáncer de páncreas, mama o colon expresan muy bajo niveles o resulta indetectable (Tabla 1). Además de las líneas tumorales, se cuantificó el ARNm de SPARC en líneas normales procedentes de diferentes tejidos así como también en fibroblastos adultos. Con respecto a los fibroblastos de piel de adulto CCD-1140Sk se observó una expresión intermedia de SPARC. A diferencia de los melanocitos y las células normales de colon que expresan bajos niveles de SPARC, las células epiteliales normales de mama MCF-12A no lo expresan.

Debido a que SPARC se expresa también en el estroma tumoral decidimos evaluar la expresión del ARNm de SPARC en diferentes líneas celulares que fueron aisladas a partir de células del estroma tumoral o que poseen características que las asemejan a las células estromales asociadas a un tumor, como fibroblastos embrionarios [292] o células micro-endoteliales transformadas [293]. Los fibroblastos aislados de melanoma, Malme-3, expresan altos niveles de SPARC, mientras que los fibroblastos embrionarios de pulmón, WI-38 y HFL-1, o las células micro-endoteliales transformadas mediante el uso del Antígeno T, HMEC-1, expresan niveles intermedios de SPARC (Tabla 1). Dentro de esta caracterización también se evaluaron líneas transformadas como las células WI-38VA, también transformadas con el Antígeno T, que poseen niveles de expresión menores a la célula parental WI-38. Así como las células HEK293 de riñón que expresan niveles bajos y los queratinocitos HaCaT que expresan muy bajos niveles de SPARC (Tabla 1).

A partir de estos resultados seleccionamos tres líneas celulares con diferentes niveles de expresión de ARNm de SPARC para encarar el análisis de la actividad de los diferentes fragmentos promotores de SPARC. Dado que no todas las líneas celulares con las que contamos se transfectan de forma eficiente, el criterio de selección de las líneas también tuvo en cuenta el nivel de transfección mediante lípidos catiónicos. Escogimos una línea celular de melanoma que expresa altos niveles de SPARC, A375N, y dos líneas que expresan muy bajos niveles de SPARC como las líneas de cáncer de mama y cuello uterino, T47D y HeLa, respectivamente. Con estas tres líneas celulares se realizaron los ensayos en donde se evaluaron los niveles de actividad y especificidad transcripcional de los elementos de ADN clonados a partir de la región promotora del gen de SPARC humano y bovino.

Tipo Celular	Procedencia	Línea Celular	Expresión Relativa	DE	n
Cancer	Melanoma	A375N	100,00		3
		SB2	31,20	8,11	3
		Mel-J-N	23,65	2,97	3
		MEL888	15,23	0,61	3
		IIB-MEL-LES	7,36	0,58	3
	Cancer de Pancreas	BxPC3	0,00	0,00	2
		MIA Paca-2	0,00	0,00	3
	Cancer de Mama	T-47D	0,15	0,04	3
		MCF-7	0,00	0,00	2
		MDA-231	0,00	0,00	2
	Cancer de Cervix	HeLa	0,08	0,02	3
	Carcinoma Hepatocelular	Hep3B	0,01	0,00	3
	Cancer de Colon	HCT-116	0,35	0,25	3
		CaCO2	0,19	0,08	3
		LoVo	0,07	0,02	2
HT-29		0,08	0,00	3	
T84		0,47	0,08	2	
Normales	Melanocitos	NHM	8,00	4,42	2
	Epitelio de Colon	CCD841	4,03	1,12	3
	Epitelio de Mama	MCF12-A	0,00	0,00	2
Fibroblastos	Fibroblasto de Piel Adulto	CCD1140Sk	41,70	6,09	4
	Fibroblasto de Melanoma	Malme-3	78,00	4,60	2
	Fibroblasto de Pulmón Embrional	HFL-1	11,13	5,32	3
	Fibroblasto de Pulmón Embrional	WI-38	19,47	1,67	3
Transformadas	Micro-endotelio Transformado	HMEC	23,12	3,60	4
	Fibroblasto de Pulmón Embrional	WI-38VA	12,68	5,05	3
	Riñon Embrional	HEK293	5,77	2,70	3
	Queratinocitos	HaCaT	0,05	0,05	2

Tabla 1. Niveles de expresión de ARNm de SPARC. Se cuantificó mediante PCR en tiempo real la expresión del ARNm de SPARC en las diferentes líneas celulares. Los datos se expresan como porcentaje en relación a los niveles de expresión obtenidos en la línea celular A375N. En la tabla también se muestra el desvío estándar inter-experimental (DE) y el número de experimentos realizados (n).

1.3 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR HUMANO DEL GEN SPARC

1.3.1 Clonado y caracterización de secuencias promotoras del gen SPARC

Los adenovirus recombinantes poseen poco espacio físico para el agregado de secuencias de ADN, ya que si se supera el 5% del tamaño original del genoma viral las partículas virales no se ensamblan correctamente [294]. Es por esta razón que en general el clonado de secuencias regulatorias en adenovirus requiere de un estudio

previo para acotar el tamaño de los promotores a clonar. Este estudio consiste básicamente en la selección de la mayor actividad promotora así como también el menor tamaño de las mismas.

En estudios previos del grupo se había aislado un segmento del promotor de SPARC (-1176/+71) que incluía el primer exón completo, el cual demostró tener mayor actividad transcripcional en las líneas que expresan el ARNm de SPARC [295]. A partir de este promotor se intentó encontrar un fragmento de menor tamaño con una mayor actividad y/o especificidad. De esta manera se podría clonar en un adenovirus y se posibilitaría el agregado de nuevas secuencias a la región regulatoria y/o a la región codificante de un gen recombinante.

Con el propósito de disminuir el tamaño del promotor de SPARC (-1176/+71) decidimos iniciar un análisis *in silico* de la secuencia. A partir de este análisis pudimos encontrar varias secuencias putativas de ADN que se describen como involucradas en la regulación de la transcripción como SOX5, S8, el receptor de estrógeno (ERR) y SMAD4. También pudimos observar la presencia de sitios de unión de los factores SP1, C/EBP α , Ets2 y Runx2 en la región cercana al sitio de inicio de la transcripción (Figura 9). Con respecto a las secuencias involucradas en el inicio de la transcripción, pudimos observar en este análisis la presencia de secuencias similares a una caja TATA (TATA-like), 2 iniciadores (INR1 e INR2) y una región DPE (Figura 9).

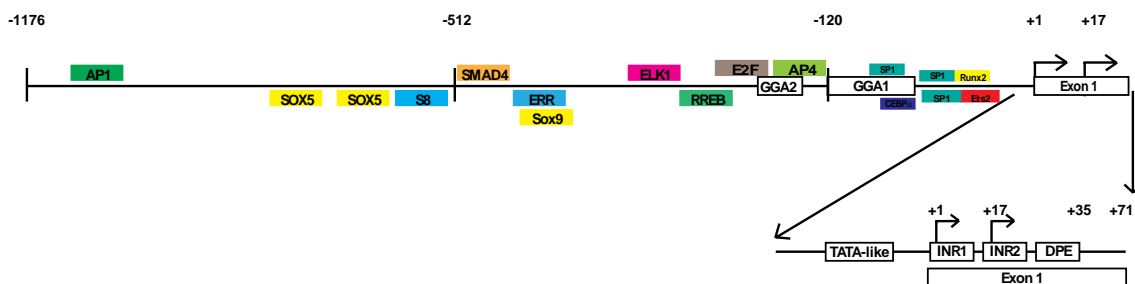


Figura 9. Análisis *in silico* de la secuencia del promotor de SPARC humano. Se analizó la secuencia del promotor mediante el programa MatInspector (www.genomatix.de) en búsqueda de secuencias consenso de unión de factores transcripcionales involucrados en la regulación de la transcripción. Se grafican por sobre la línea los sitios ubicados en la cadena sentido y por debajo en la cadena anti-sentido.

Es importante resaltar que no se ha descrito a la fecha ningún promotor humano que contenga los elementos TATA y DPE activos combinados en un promotor e involucrados en el inicio de la transcripción. Es por ello que se decidió encarar un

análisis más detallado de la región involucrada en el inicio de la transcripción o *core promoter*. Revisando los datos de extensión con cebadores (del inglés *primer extension*) de la bibliografía observamos que el promotor murino de SPARC podría estar utilizando ambos elementos, TATA y DPE, para iniciar la transcripción [159]. Sin embargo, no pudimos encontrar este análisis para el promotor humano dado que en la bibliografía solo se publicó la descripción escrita del ensayo de extensión con cebadores en células de carcinoma de pulmón sin la figura correspondiente [158]. Por lo tanto, debimos encarar nuestro análisis de *extensión con cebadores* en células de melanoma y demostramos que el promotor humano de SPARC inicia su transcripción desde dos sitios que concuerdan con los modelos de inicio de la transcripción para promotores conteniendo tanto caja TATA como la región DPE (Figura 10-A y B). A partir del análisis de las proporciones de las bandas en diferentes geles pudimos cuantificar que el 34% de la transcripción inicia desde la posición +1 (INR1) y el 66% inicia desde la posición +17 (INR2) (Figura 10-C).

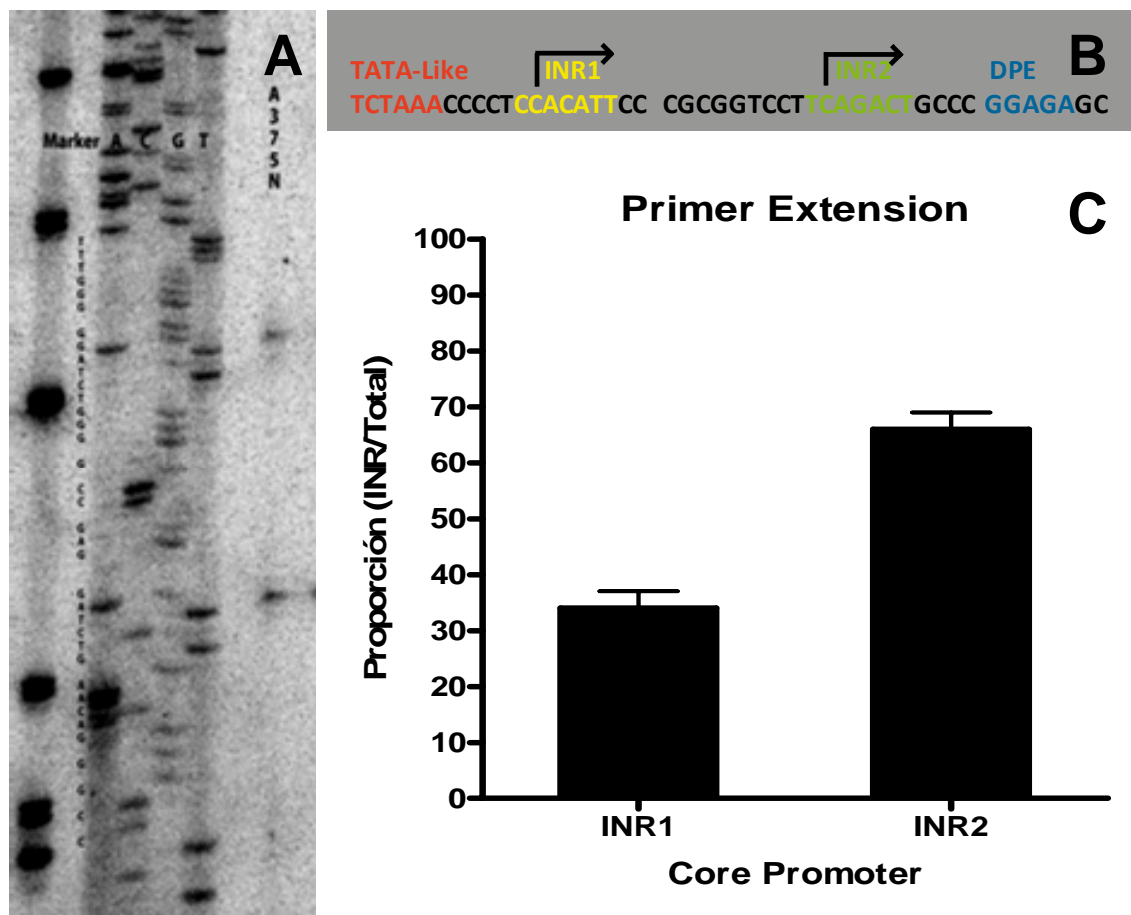


Figura 10. Sitios de inicio de la transcripción del gen SPARC. A) Extensión con cebadores (*Primer extension*) del ARNm de SPARC humano realizado sobre la línea de

melanoma A375N. **B)** Estructura del sitio de inicio de la transcripción del promotor de SPARC obtenido a partir de análisis *in silico* y de los datos obtenidos por *primer extension*. **C)** Proporción de ARNm que inicia desde los diferentes sitios INR del promotor de SPARC.

Con el objeto de aumentar la especificidad del promotor clonado y disminuir su tamaño decidimos realizar diferentes deleciones desde el extremo 5' y 3' del promotor de SPARC humano a partir de las posiciones de los elementos TATA-like, DPE y GGA1 dentro de la secuencia del promotor..

Estas deleciones fueron realizadas mediante amplificación por PCR y cebadores específicos de la secuencia promotora de SPARC (-1176/+71) (Figura 11-A). Con respecto a las deleciones desde el extremo 5', en los promotores denominados -1176/+XX se conservó toda la región regulatoria clonada inicialmente (Figura 11-A). Mientras que en los promotores denominados -513/+XX se deleccionó la región -1176/-513 (Figura 11-B) y en los promotores denominados -120/+XX se deleccionó la región -1176/-120 (Figura 11-C).

Se realizaron diferentes construcciones que contenían las deleciones desde el extremo 3': En los promotores denominados -XX/+71 se conservó el exón 1 completo mientras que en las secuencias denominadas /+35 se deleccionó el exón 1 hasta la región DPE. En los promotores denominados /+28 se deleccionó hasta el INR2 y en el caso del promotor denominado -512/+23 se deleccionó también el INR2, conservando solo los elementos TATA-like e INR1 (Figura 11). Se clonaron cada uno de los fragmentos aguas arriba del gen de la enzima luciferasa en el plásmido pGL3-basic que se uso como gen reportero (PROMEGA Corp.). Se utilizó el plásmido sin promotor pGL3-basic como control de actividad transcripcional inespecífica o basal y el plásmido con el promotor del virus SV40 como control positivo de actividad transcripcional. Los datos de actividad de luciferasa fueron expresados relativos a la actividad del vector vacío (pGL3-basic) o del promotor viral SV40.

En la Figura 3 se muestra la actividad promotora de los diferentes fragmentos en las líneas celulares A375N como control positivo, HeLa y T47D como controles negativos. El análisis de los resultados de la actividad transcripcional de los fragmentos nos permitió determinar que:

- a- La delección desde el extremo 3' del promotor de SPARC (+71 a +28) provoca un aumento de la actividad en detrimento de la especificidad en los promotores que contienen hasta la base -1176 (Figura 11-A).
 - b- Existe una región inhibitoria de la transcripción entre las bases -1176/-513, dado que su delección provoca un incremento de la actividad transcripcional (comparar Figura 11-A y -B).
 - c- La región +23/+28 es necesaria para la actividad transcripcional de los promotores que incluyen hasta la base -513 (Figura 11-B).
 - d- La delección de la región -513/-120 produce pérdida de la especificidad (comparar Figura 11-B y C).
 - e- La región +28/+71 produce una activación inespecífica en la líneas celulares HeLa y T-47D en ausencia de la región -1176/-120 (Figura 11-C).
- A partir de este estudio destacamos que el promotor -513/+35 provee una mejor relación actividad / especificidad (comparar Figura 11-A, -B y -C).

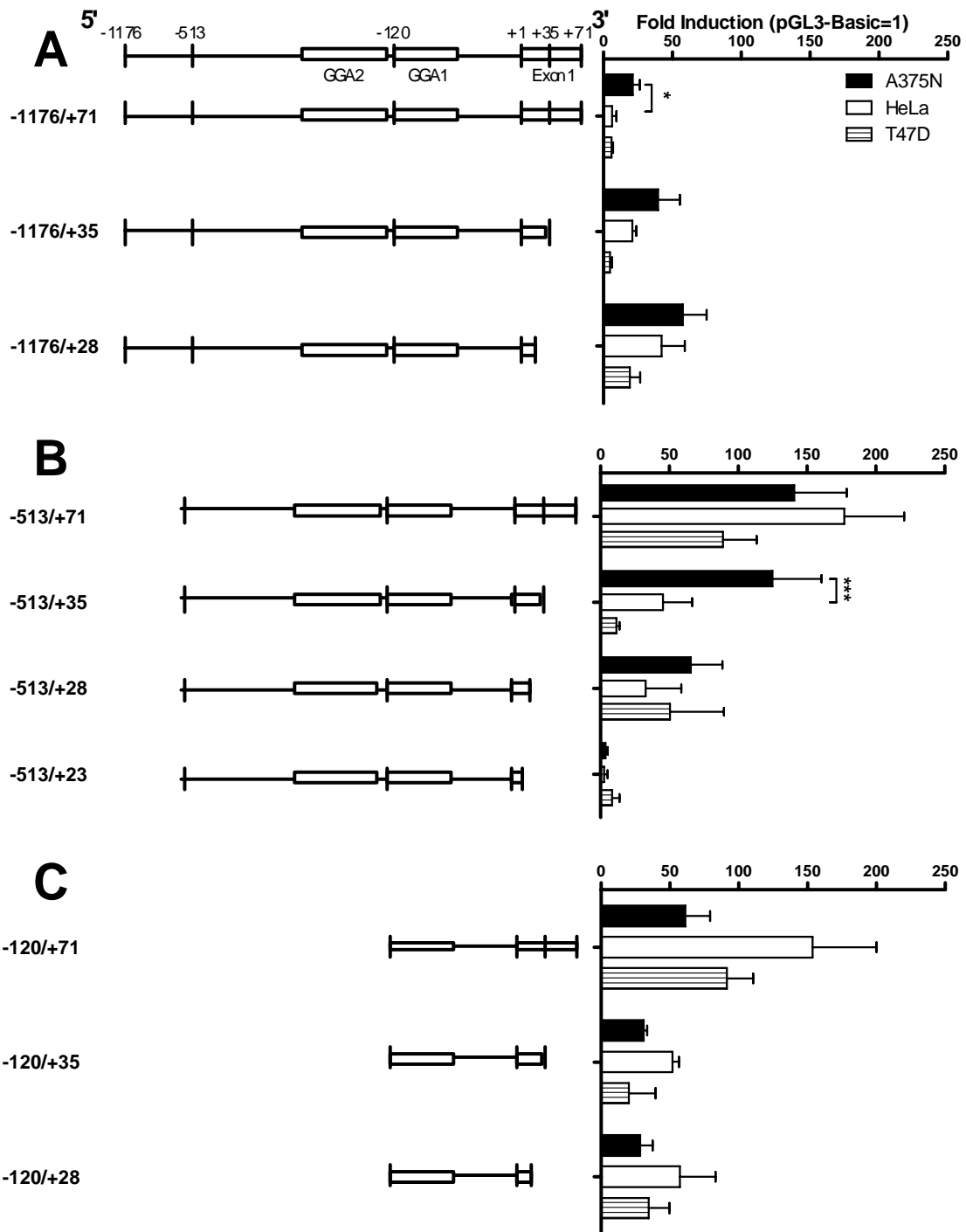


Figura 11. Caracterización de las regiones del promotor -1176/+71 y sus deleciones 5' y 3'. Deleciones desde el extremo 3' del promotor **A)** -1176/+71, **B)** -512/+71 y **C)** -120/+71. Se realizaron transfecciones transientes de las líneas celulares A375N, HeLa y T47D con las diferentes construcciones. Los datos son expresados relativos a la actividad transcripcional del plásmido sin promotor pGL3-basic y representa los datos de al menos 3 experimentos independientes. Las columnas representan la media y las barras el desvío estándar. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de dos vías y las diferencias significativas son expresadas como * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

Con el propósito de encontrar la región mínima promotora involucrada en el inicio de la transcripción del gen SPARC continuamos delecionando el fragmento -120/+35. Se construyeron dos promotores, -88/+35 y -70/+35, de tal forma de que incluyan o no la caja GGA1 (Figura 12). Los ensayos de la actividad de luciferasa fueron realizados únicamente en la línea celular A375N dado que los niveles de actividad transcripcional del promotor -120/+35 en las 3 líneas celulares fue similar. Observamos que el promotor de SPARC puede iniciar la transcripción a partir del fragmento conteniendo los nucleótidos -88/+35 pero no desde -70/+35 que contiene la deleción por debajo de la caja GGA1 (-120/-70). Este resultado indicaría que el inicio de la transcripción requeriría de la unión de los factores de transcripción SP-1 (+) y/o C/EBP(-) en los sitios ubicados en esta región por el análisis *in silico* (Figura 9).

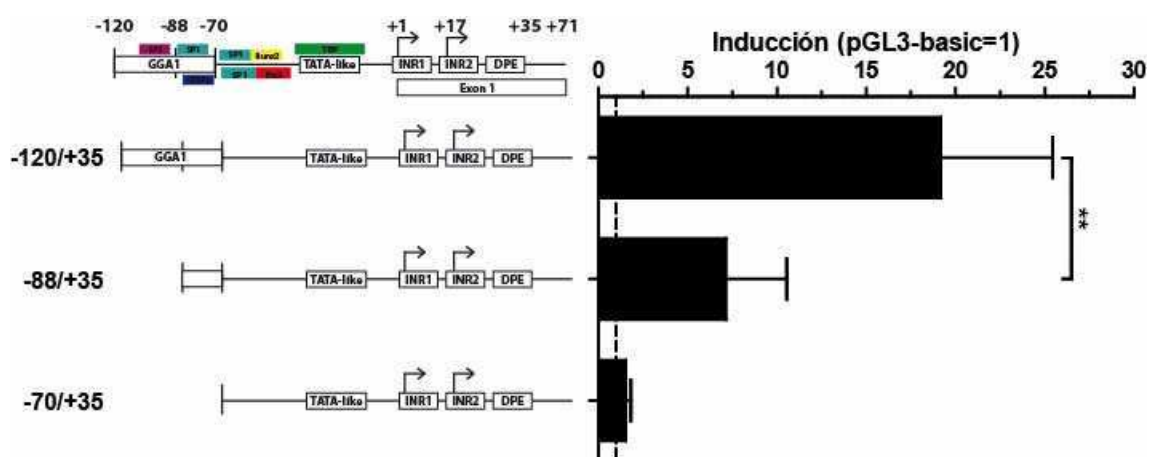


Figura 12. Caracterización de la región promotora mínima. Identificación de la región promotora mínima aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción mediante ensayos de actividad luciferasa de diferentes deleciones del promotor -120/+35 en la línea celular A375N. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía y las diferencias significativas son expresadas como * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

De esta manera pudimos concluir que el promotor mínimo de SPARC que produce actividad transcripcional debe contener los nucleótidos -88/+28 (Figura 11-B y Figura 12).

El análisis de los diferentes fragmentos promotores nos permitió seleccionar la región comprendida entre las bases -513/+35 para regular la transcripción el gen E1A en el adenovirus. En adelante denominaremos a este promotor F512. El promotor F512 fue

utilizado para el estudio mutacional de su secuencia con el propósito de incrementar su actividad manteniendo su especificidad.

1.3.2 Estudio del promotor F512 mediante análisis mutacional de su secuencia.

Como se ha mencionado en la sección anterior, una estrategia para mejorar la actividad/especificidad de un promotor puede ser a través de mutaciones o deleciones internas dentro de su secuencia. A partir del análisis de la secuencia del promotor F512 seleccionado pudimos observar que contiene secuencias similares a una caja TATA denominada TATA-like (TCTAAA) y una secuencia con solo 1 base diferente a la secuencia consenso del elemento regulador de la transcripción denominado Elemento Promotor Distal (DPE) (Figura 9 y revisado en [296]). En la bibliografía se describe que los elementos TATA y DPE insertados en un promotor artificial pueden ser regulados en forma diferencial y específica por diferentes enhancers [297]. Es por ello que para dilucidar su relación con la actividad promotora de SPARC se decidió encarar un análisis más profundo de los elementos que componen la región involucrada en el inicio de la transcripción o *core promoter*. Nuestra hipótesis, basada en el análisis de la secuencia, los sitios de inicio de transcripción caracterizados y los datos bibliográficos de las distancias consenso planteaba la posibilidad de que este promotor inicie la transcripción mediante 2 sistemas. El primero involucra el uso de la caja TATA-like y el iniciador (INR2) (Figura 13-B), mientras que el otro modelo involucra el uso del iniciador restante (INR1) y la región similar a la secuencia DPE (Figura 13-C).

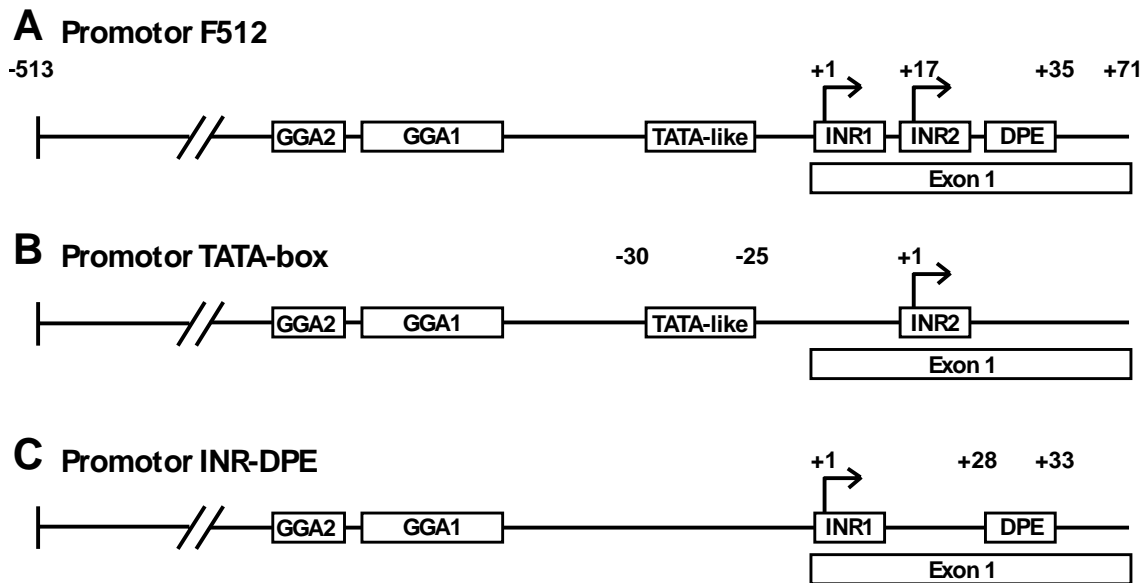


Figura 13. Modelos de inicio de la transcripción del promotor de SPARC. A) Estructura del promotor F512. Modelos de inicio de la transcripción mediante B) caja TATA o C) mediante la región DPE. Los números de los nucleótidos se expresan relativos al sitio de inicio de la transcripción en cada modelo.

A los efectos de estudiar la participación en el inicio de la transcripción de los motivos antes mencionados se realizaron ensayos de mutación. Para ello se realizaron mutaciones dirigidas (mutantes nulas o consenso) sobre las regiones TATA-like y DPE de F512, así como también de los iniciadores (INR1 e INR2) fundamentada en estudios realizados sobre el promotor de la deoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT) [298]. Este promotor, al igual que el promotor de SPARC, fue descrito como un promotor del tipo “TATA-less” o sin caja TATA. Los autores demostraron que el agregado de una caja TATA consenso en la región -25/-30 de este promotor inducía un aumento moderado de la transcripción [298]. Las diferentes mutantes fueron obtenidas mediante técnicas de PCR con cebadores conteniendo las mutaciones y clonadas en el vector pGL3-basic para analizar su actividad transcripcional.

A partir del análisis de la actividad transcripcional de estos promotores pudimos observar que la mutación sin sentido de la caja TATA-like (denominada TATANull) disminuye un 82% la actividad de este promotor (Figura 14-A). Del mismo modo, la mutación de la secuencia INR2 (INR2null) o DPE (DPEnull) disminuyen un 60% o 48% la actividad del promotor, respectivamente (Figura 14-A). Mientras que la doble mutación de los elementos TATA y DPE (TATADPEnull) disminuye un 87% la actividad

del promotor. Por el contrario, la mutación de la secuencia INR1 no modifica la actividad transcripcional de este promotor (Figura 14-A).

Como mencionamos anteriormente la caja TATA-like del promotor de SPARC parecería ser un elemento importante del promotor ya que tanto la mutación que genera una secuencia consenso de caja TATA (TATAcons) como la que genera una secuencia nula (TATAnull) disminuye en forma muy marcada su actividad (Figura 14-B). Por lo tanto, la secuencia TATA-like sería una región regulatoria importante para la actividad transcripcional de este promotor y su mutación a una caja TATA-consensuada no tiene como consecuencia un aumento en la actividad transcripcional. En este análisis también se evaluó la actividad transcripcional del promotor F512/+23 (con la secuencia TATA-like original), que no es activo y el promotor F512+23 (TATAcons) que posee una mutación a una secuencia de caja TATA consenso. Podemos observar que el promotor conteniendo solo la caja TATA consenso puede iniciar la transcripción sin la necesidad de las bases +23/+38, lo que indicaría la necesidad de estas bases para el inicio de la transcripción mediada por la caja TATA-like (no consenso) (Figura 14-B). El agregado de una secuencia TATA consenso (TATAcons) al promotor de SPARC disminuye su actividad en el promotor -513/+35 y aumenta la actividad del promotor sin actividad -513/+23 (Figura 14-B).

Por otro lado, la secuencia DPE del promotor de SPARC posee una actividad similar a la secuencia consenso mientras que el mutante nulo induce una disminución de la actividad (Figura 14-C). Esto indica que la región que identificamos como DPE es importante para la actividad transcripcional del promotor dado que la mutación hacia una secuencia nula reduce su actividad transcripcional hasta un 40% de la actividad del promotor F512 mientras que la mutación a una secuencia consenso aunque disminuye levemente su actividad, no resulta estadísticamente significativa (Figura 14-C). Cabe destacar que este ensayo de mutaciones se realizó también sobre la línea HeLa, que no expresa SPARC y la relación de actividad transcripcional entre los diferentes promotores mutantes muestra los mismos resultados (datos no mostrados).

Estos datos concuerdan con los obtenidos por extensión con cebadores, en donde observamos que la actividad mediada por el elemento promotor TATA-box es del 66% (Figura 10-C), mientras que la mutación de este elemento en los plásmidos conteniendo promotores sin sentido (TATAnull) reduce un 82% la actividad

transcripcional del promotor (Figura 14-B). Del mismo modo, la actividad mediada por el elemento promotor INR1-DPE produce un 34% de la actividad transcripcional de este promotor dual (Figura 10-C) y su mutación reduce su actividad al 45% de la actividad (Figura 14-C).

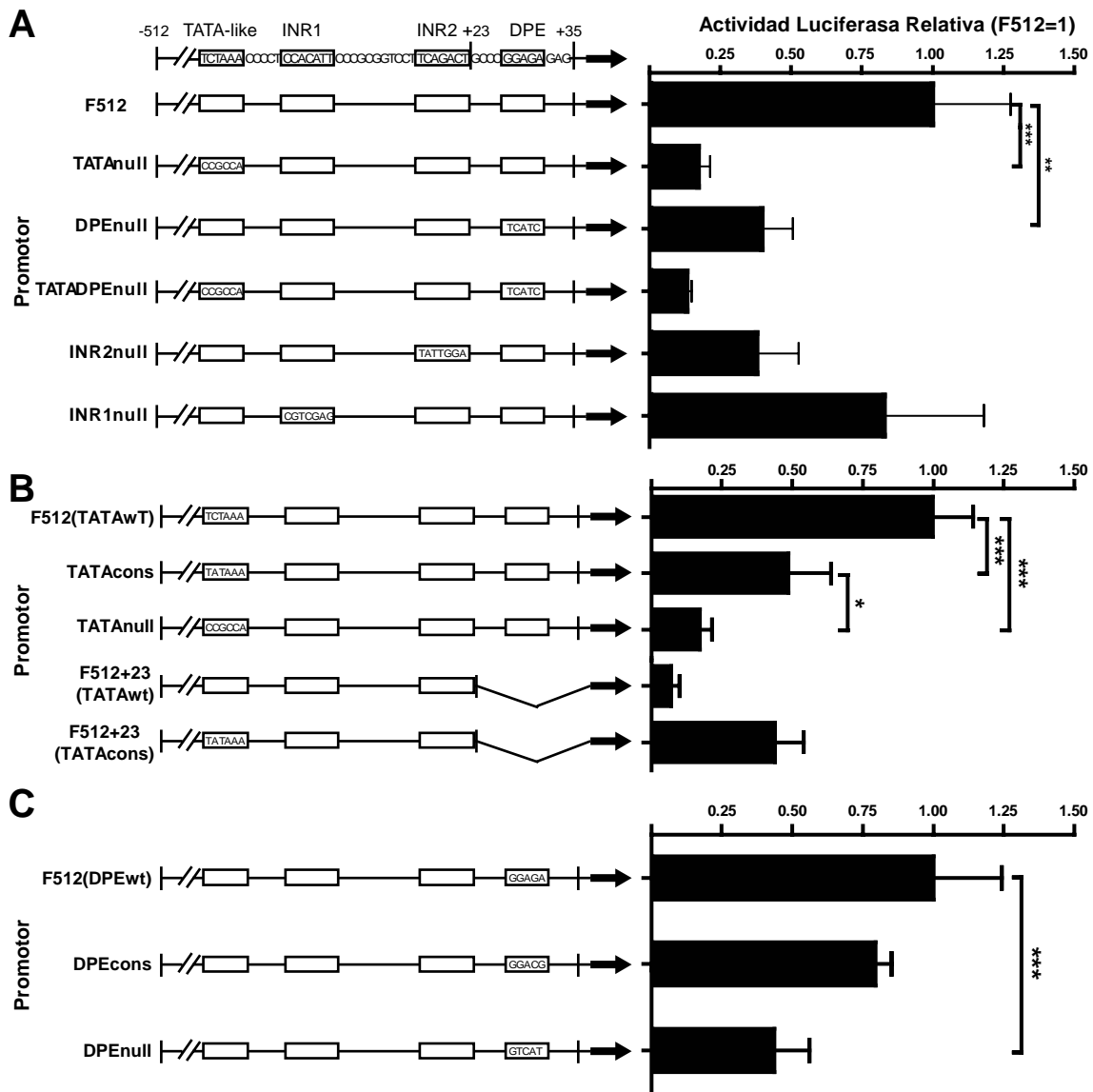


Figura 14. Caracterización regiones core promotor del promotor de SPARC humano. A) Caracterización de mutantes nulos. Actividad luciferasa relativa de las mutaciones nulas de las regiones involucradas en el inicio de la transcripción del promotor de SPARC

B) Caracterización de la caja TATA. Actividad luciferasa relativa de las diferentes mutaciones de la secuencia *wt* (TCTAAA) del elemento TATA-like del promotor de SPARC por secuencias descritas como caja TATA consenso (TATAAA) o nula (GCGCCA) para la activación del inicio de la transcripción en los promotores F512 y -512/+23.

C) Caracterización de la región DPE. Actividad luciferasa relativa de las diferentes mutaciones de la secuencia *wt* (GGAGA) de la región DPE del promotor de SPARC por secuencias descritas como consenso (GGACG) o nulas (GTCAT) para la activación del inicio de la transcripción de estos promotores.

Los datos se expresan relativos a la actividad del promotor F512. En el gráfico se muestra la secuencia consenso del promotor de SPARC y se detallan las secuencias de las mutaciones realizadas (rectángulo). Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía y las diferencias significativas son expresadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Estos resultados nos permiten concluir que las regiones TATA-like, INR2 y DPE del promotor de SPARC humano son importantes para el inicio de la actividad transcripcional. Además, la actividad promotora requiere de las secuencias *wild type* de los elementos TATA-like y DPE ya que la mutación a una secuencia nula o consensuada disminuyen la actividad transcripcional del promotor.

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que las modificaciones de los elementos del *core promoter* de SPARC no incrementan su actividad (Figura 14-A, -B y -C) y por lo tanto decidimos continuar con el uso del promotor F512 tal cual fue clonado inicialmente (Figura 11-B).

1.4 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL PROMOTOR BOVINO DEL GEN SPARC

Tanto el gen como el promotor de SPARC presentan una alta homología de secuencia desde humanos a murinos [159]. Existe un nivel de homología de secuencia del 73% entre las bases -1000 a +71 o +74 (que incluye el exón 1) del promotor de SPARC humano y bovino, respectivamente (datos no mostrados). Dominguez y colaboradores realizaron deleciones sobre el promotor bovino y demostraron actividad específica en las líneas celulares bovinas analizadas [162]. Como parte de esta tesis se decidió analizar si las regiones homólogas del promotor bovino se comportarían con mayor especificidad que el promotor humano F512 sobre líneas celulares humanas. Es por ello que se realizó sobre el promotor bovino de SPARC el mismo análisis de deleciones desarrollado en el promotor humano (Figura 11).

Se alinearon las secuencias de los promotores humano y bovino y por homología de secuencia se clonaron los promotores conteniendo las bases -518/+35 (CowON -518/+35), -518/+74 (CowON -518/+74) y -128/+35 (CowON -128/+35) (Figura 15-A). Los promotores fueron analizados en las mismas líneas celulares y se adicionó una nueva línea de melanoma con menor expresión de SPARC.

Observamos que el promotor CowON -518/+74 demuestra menor actividad que CowON -518/+35 de la misma manera que ocurre con el promotor humano

conteniendo hasta el nucleótido +71 (Figura 15-B). Esto indicaría que al igual que en el promotor humano la región que comprende desde la base +35 al último nucleótido del exón 1 (+35/+74 en el promotor bovino) posee un efecto inhibitorio sobre la actividad transcripcional de estos promotores. El promotor CowON -128/+35 posee una actividad transcripcional elevada en todas las líneas celulares evaluadas, aunque la actividad transcripcional del elemento no es más elevada en las líneas que no expresan SPARC (HeLa y T47D) como ocurría en el promotor humano (comparar Figura 15-B y Figura 11-C). Aunque se observa más especificidad que en el promotor humano (Figura 11-C) la actividad transcripcional en las líneas T-47D y HeLa de CowON-128/+35 es mayor que en el promotor CowON-518/+74 (Figura 15-B).

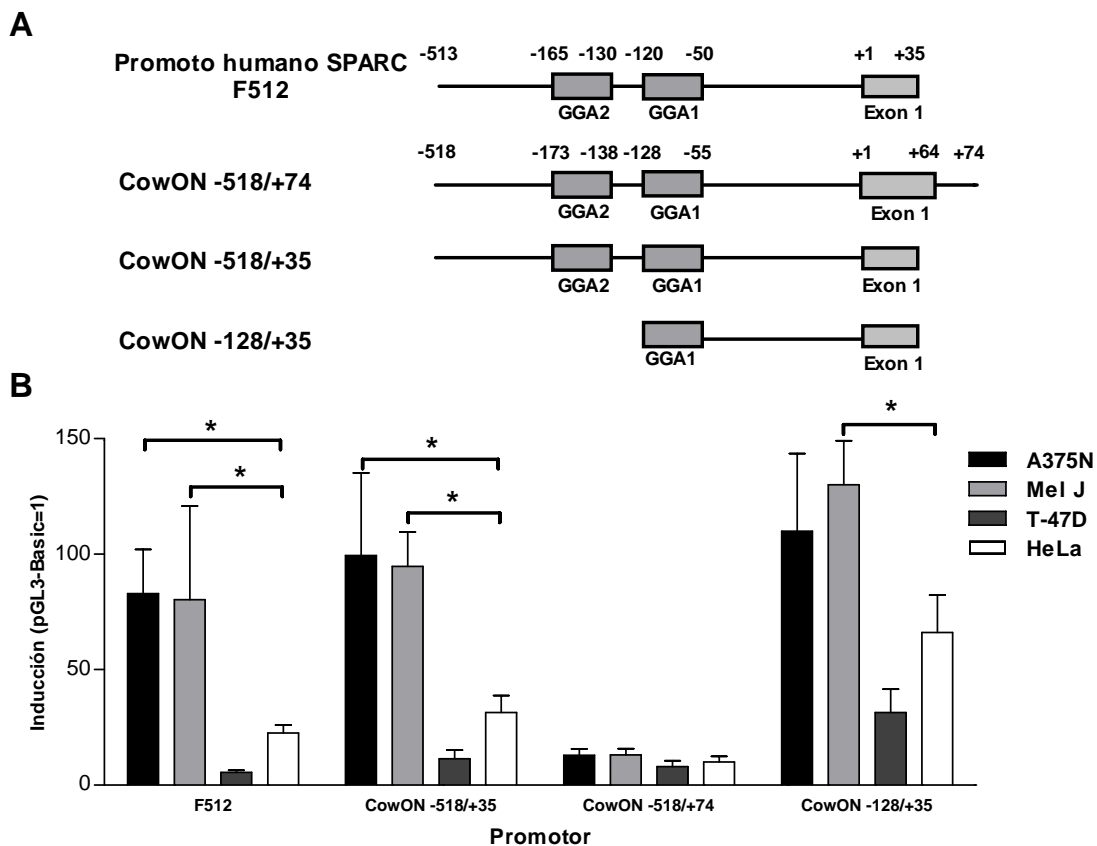


Figura 15. Caracterización promotor bovino SPARC A) Diagrama de los diferentes deletiones del promotor construidas. B) Ensayos de actividad luciferasa de las deletiones del promotor bovino de SPARC y del promotor F512 humano. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de dos vías y las diferencias significativas son expresadas como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A partir de estos resultados podemos concluir que la actividad transcripcional del promotor bovino CowON -518/+35 es muy similar a la obtenida con el promotor humano F512 y ambos demuestran mayor actividad en las líneas que expresan SPARC. Dado que el promotor humano F512 provee la mejor relación actividad / especificidad en las líneas humanas analizadas, decidimos seguir adelante con esta secuencia para los estudios ulteriores incluida la construcción de los CRAds.

1.5 ANÁLISIS ACTIVIDAD DEL PROMOTOR SELECCIONADO EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES

Como se mencionó, F512 resultó ser el candidato para dirigir la expresión del gen E1A en un CRAd. Dado que los datos de actividad fueron obtenidos utilizando solamente las líneas celulares A375N, T47D y HeLa se decidió extender este análisis a un número mayor de líneas celulares para seguir evaluando su actividad / especificidad. Se seleccionaron líneas celulares caracterizadas por el nivel de expresión del ARNm de SPARC mediante la cuantificación por PCR en tiempo real (Tabla 1) y en este caso, se normalizaron los datos por la actividad del promotor viral SV40. Se utilizó la actividad de este promotor debido a que tiene una actividad transcripcional similar en todas las líneas celulares evaluadas. La actividad de F512 resultó mayor en las líneas celulares de melanoma que expresan el ARNm de SPARC, del mismo modo, en la línea endotelial bovina BAEC o en la línea de fibroblastos transformados WI-38VA, que expresan SPARC, se observó actividad transcripcional elevada. Por el contrario las líneas LoVo, T-47D y HeLa, que expresan muy bajos niveles o no expresan el ARNm de SPARC, la actividad transcripcional fue mucho menor (Figura 16).

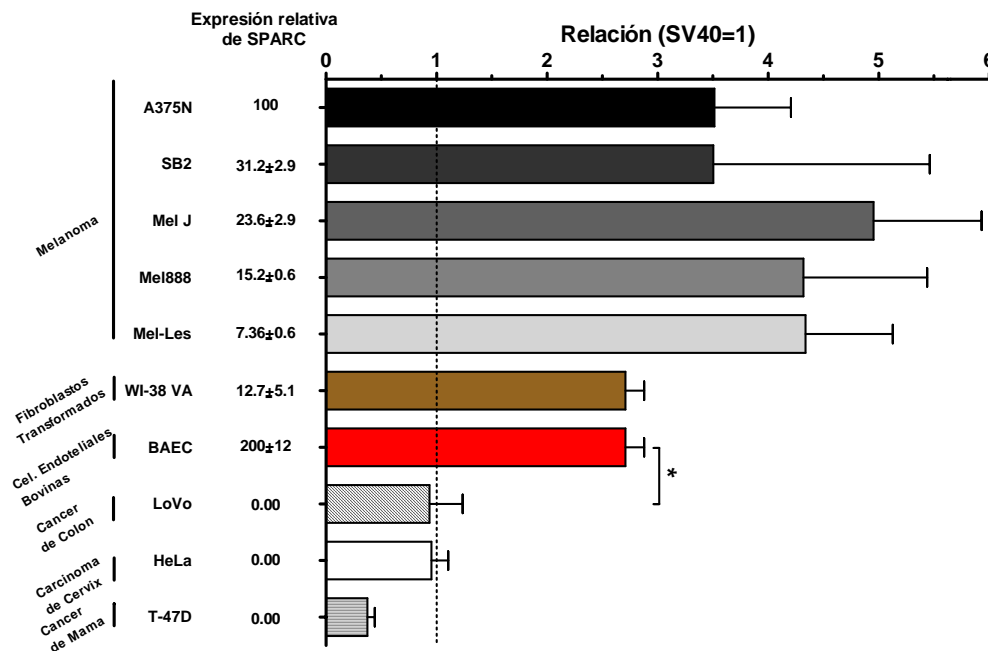


Figura 16. Actividad transcripcional del promotor F512. Ensayo de actividad luciferasa del promotor F512 en diferentes líneas celulares con diferentes niveles de expresión del ARN mensajero de SPARC. Los datos son expresados como niveles relativos de actividad luciferasa con respecto a la actividad obtenida con el promotor SV40. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía y las diferencias significativas son expresadas como * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$).

Si bien el promotor F512 es activo en las líneas que expresan SPARC, la relación entre la expresión de ARNm de SPARC y la actividad transcripcional del promotor no fue lineal. Sin embargo, pudimos observar una relación entre los niveles de actividad con respecto al promotor SV40 y los niveles de expresión de SPARC; así, en la Figura 17 se muestra que si la expresión de ARNm de SPARC es menor al 5% de la expresión de la línea celular A375N, los niveles de actividad transcripcional son menores o iguales al promotor SV40, mientras que si los niveles de expresión son mayores al 5%, la actividad transcripcional es 2,5 a 5 veces mayor al promotor SV40.

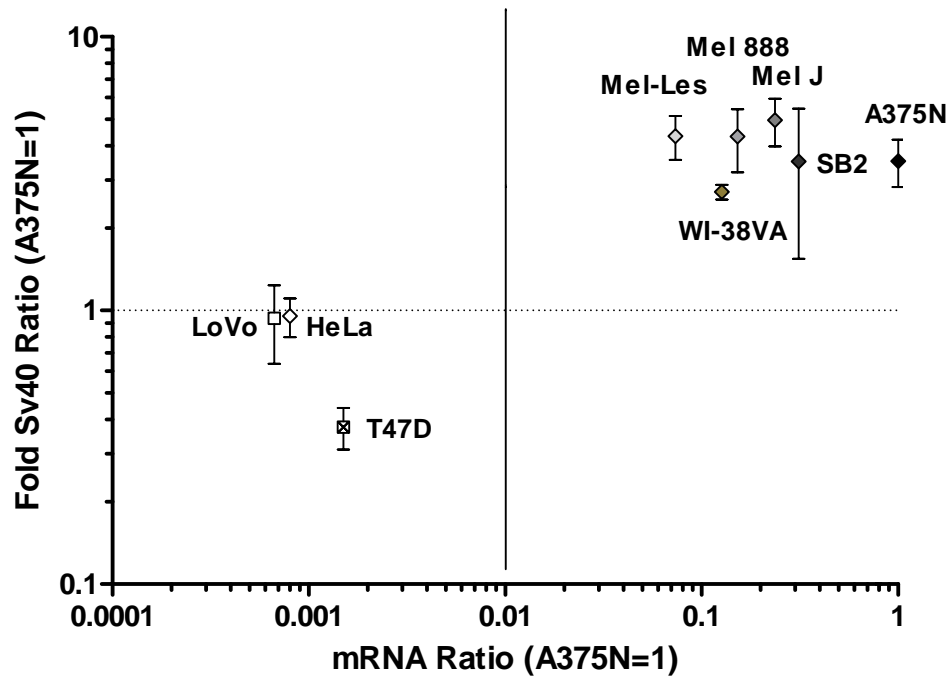


Figura 17. Relación entre la actividad transcripcional del promotor de SPARC y los niveles de expresión del ARNm de SPARC.

A partir de estos estudios se seleccionó la región del promotor humano de SPARC - 513/+35(F512), que posee la mejor relación actividad / especificidad, para la regulación de la transcripción del gen E1A en los CRAds.

CAPÍTULO 2 ADENOVIRUS DE REPLICACIÓN CONDICIONAL

2.1 RESUMEN

En el capítulo anterior se describió el análisis que permitió la selección del promotor F512 para regular la replicación viral. En este capítulo se detalla la construcción y caracterización *in vitro* e *in vivo* del CRAAd Ad-F512. Se evaluó la actividad lítica mediante ensayos de sobrevivencia celular con dosis creciente del CRAAd en líneas celulares tumorales, estromales y normales. El efecto lítico *in vivo* de Ad-F512 se evaluó en tres modelos xenogénicos de melanoma en ratones desnudos.

2.2 CONSTRUCCIÓN DEL ADENOVIRUS Ad-F512

Para construir el CRAAd Ad-F512 se utilizó el sistema de recombinación homóloga en células eucariotas mediante la transfección en células embrionarias de riñón (HEK293). Brevemente, el CRAAd se produce mediante la co-transfección de un plásmido linearizado conteniendo el casete de expresión del gen E1A regulado por F512 que contiene una región del genoma adenoviral (pAd-F512-E1A) junto a una región del genoma adenoviral restringido con la enzima *Clal* que incluye una región homologa al plásmido. La recombinación se produce en las células HEK293 (Figura 18), y el adenovirus recombinante se purifica utilizando un doble gradiente de cloruro de cesio y se caracteriza mediante restricción del genoma adenoviral seguido de su secuenciación. También se determinó la relación de partículas virales totales e infectivas mediante la medida de la Densidad Óptica a 260 y la dosis infectiva 50/ cultivo celular (TCID50).

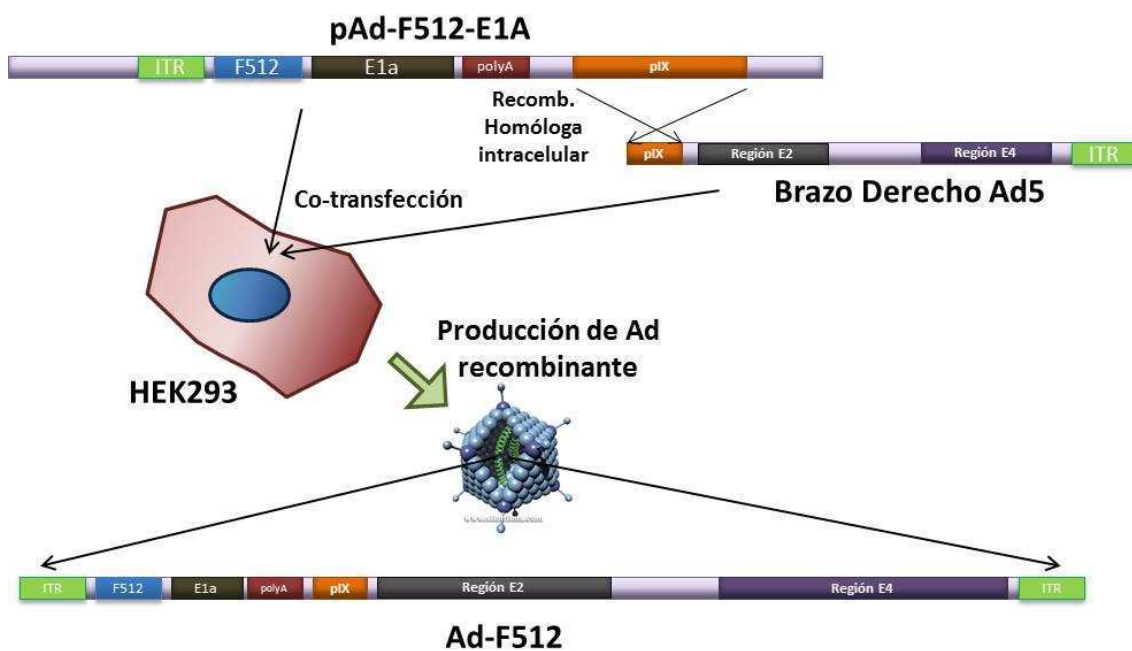


Figura 18. Método de producción de adenovirus recombinantes en células HEK293.

2.3 ENSAYOS *IN VITRO*

Antes de iniciar los ensayos de actividad oncolítica de AdF512 realizamos ensayos de infectividad viral. Es conocido que la infección celular, es decir el ingreso del virus a través de receptores de membrana, es uno de los determinantes iniciales que definen la posterior replicación viral [299]. Para evaluar dicha infectividad se utilizó el

adenovirus reportero Ad- β -gal y se evaluó el nivel de infectividad celular mediante la tinción de las células con x-Gal (**Figura 19 - D**).

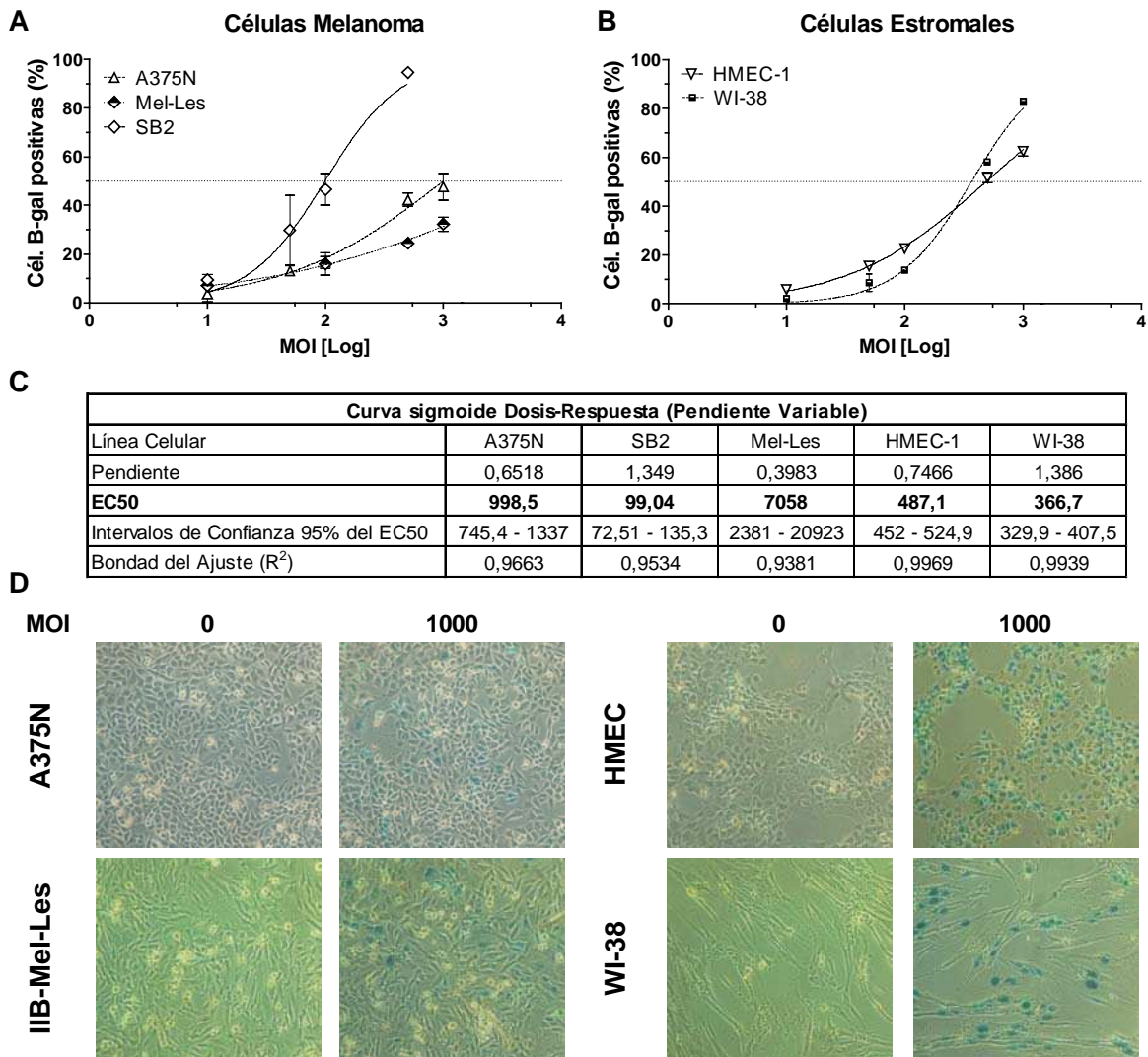


Figura 19. Niveles de infectividad. Las células de melanoma A) A375N, Mel-Les y SB-2 y las células de endotelio y fibroblastos B) HMEC-1 y WI-38 fueron infectadas con dosis creciente de virus (MOI 10 a 1000) y luego de 48 horas las células fueron fijadas, teñidas con X-Gal y se contaron las células positivas. C) Regresión no lineal de los datos obtenidos para calcular la dosis necesaria para infectar al 50% de las células (EC50). D) Fotos representativas de las células control (MOI 0) o infectadas con el Ad- β -gal (MOI 1000) teñidas con X-gal.

A partir de este análisis pudimos observar que las líneas celulares de melanoma son infectadas a diferentes niveles. SB-2 posee niveles de infectividad 10- y 70-veces mayores que A375N y Mel-Les, respectivamente. Las células WI-38 y HMEC poseen niveles intermedios de infectividad 4,9- y 4,7-veces menores a la línea SB-2 (**Figura 19- A y B**).

Luego de haber evaluado la infectividad en las diferentes líneas celulares se inició la caracterización de la actividad lítica de Ad-F512. El efecto lítico del virus fue evaluado

in vitro mediante la infección de distintas líneas celulares con dosis crecientes del virus. Se cuantificó el efecto lítico mediante dos ensayos independientes. El primero de ellos fue la evaluación de la viabilidad a los 10 días de infección mediante la tinción con cristal violeta de las células que permanecieron adheridas a la placa. El segundo ensayo consistió en la medida de la viabilidad por el método de MTT o MTS a los 6 días de infección.

Los ensayos fueron realizados utilizando diferentes líneas de melanoma, cáncer de páncreas y de mama y se incluyó el adenovirus salvaje Ad5-wt como control positivo de replicación lítica. Observamos efecto lítico en las líneas de melanoma que expresan altos niveles de SPARC y en una de carcinoma de páncreas (MIA PaCa-2) a una MOI promedio de 500-100, mientras que en las líneas de cáncer de mama y en la línea de páncreas BxPC3 que no expresan SPARC (Tabla 1) no se observó efecto lítico de Ad-F512 (**Figura 20**). Es importante destacar que los niveles de infección también afectan el efecto lítico del Ad5-wt; la muerte de células A375N e Mel-Les con Ad5-wt es 2 órdenes de magnitud menor al observado sobre SB2 y Mel888, mientras que en Mel-J-N es 1 orden de magnitud menor. Las líneas de cáncer de mama, que no expresan SPARC, son lisadas por el Ad5-wt y el Ad-F512 no tiene ningún efecto, indicando que el efecto lítico de Ad-F512 es mayor en las células que expresan SPARC (Figura 20).

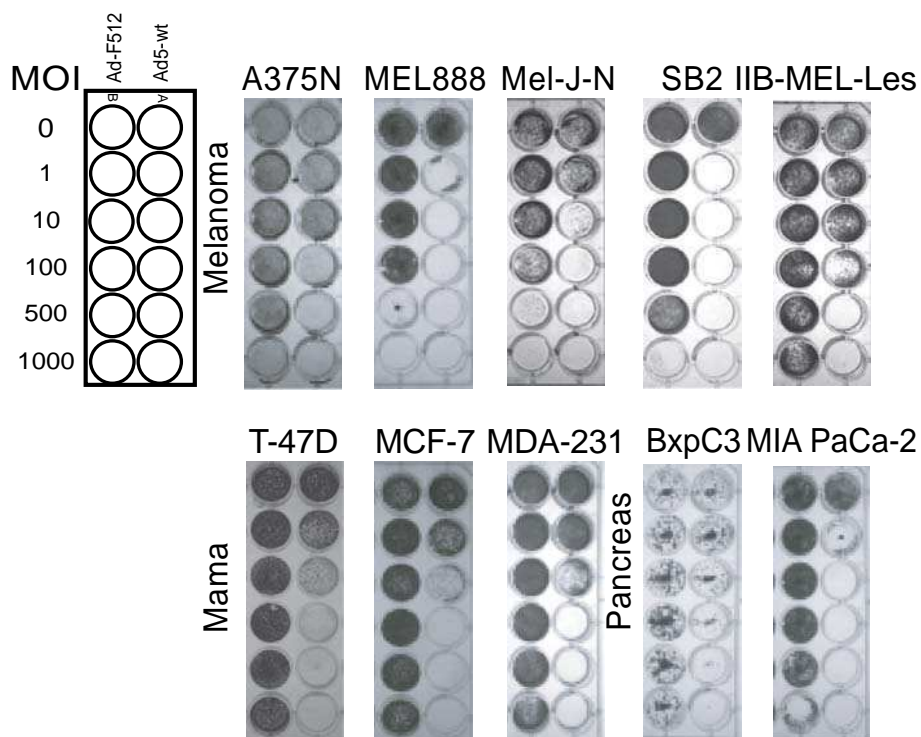


Figura 20. Efecto de Ad-F512 sobre células tumorales. Las líneas celulares fueron infectadas con MOIs crecientes de Ad-F512 o Ad5-wt. La sobrevivencia se evaluó mediante tinción con cristal violeta y fijación a los 10 días pos-infección. Las fotos son representativas de las diferentes líneas celulares.

Debido a que el objetivo de nuestros estudios era obtener un vector viral que se replique tanto en las células tumorales como en las células que forman parte del tumor y que también expresan SPARC, se evaluó el efecto del CRAd sobre las células que tienen características similares a las células que conforman el estroma tumoral utilizando como modelos de las mismas fibroblastos embrionarios y células endoteliales transformadas. Observamos actividad oncolítica de Ad-F512 a dosis mayores a las que posee efecto lítico sobre las células tumorales (**Figura 21-C**). Esto indica que el virus no resulta tan efectivo en este tipo de células. En primer lugar esto se puede deber a una reducida infectividad (**Figura 19-A**) y en segundo lugar a una resistencia de la célula a la replicación viral.

Los resultados anteriores demuestran un efecto lítico mayor sobre células que expresan SPARC pero no permiten inferir su actividad sobre células normales. Para evaluar este efecto se realizaron ensayos sobre diferentes líneas normales. En los melanocitos normales se observó una sobrevida mayor al 95% en presencia de Ad-F512 a una MOI de 1000 (**Figura 21-A**). En los ensayos realizados sobre queratinocitos (HaCaT), una línea de fibroblastos adultos (CCD1140) y fibroblastos extraídos de melanoma (Malme-3) no se observa efecto lítico del Ad-F512. Por el contrario, el adenovirus salvaje (Ad5-wt) fue capaz de replicarse y mostró efecto lítico sobre HACAT y, en menor medida, en CCD-1140 y Malme-3M (**Figura 21-B y C**).

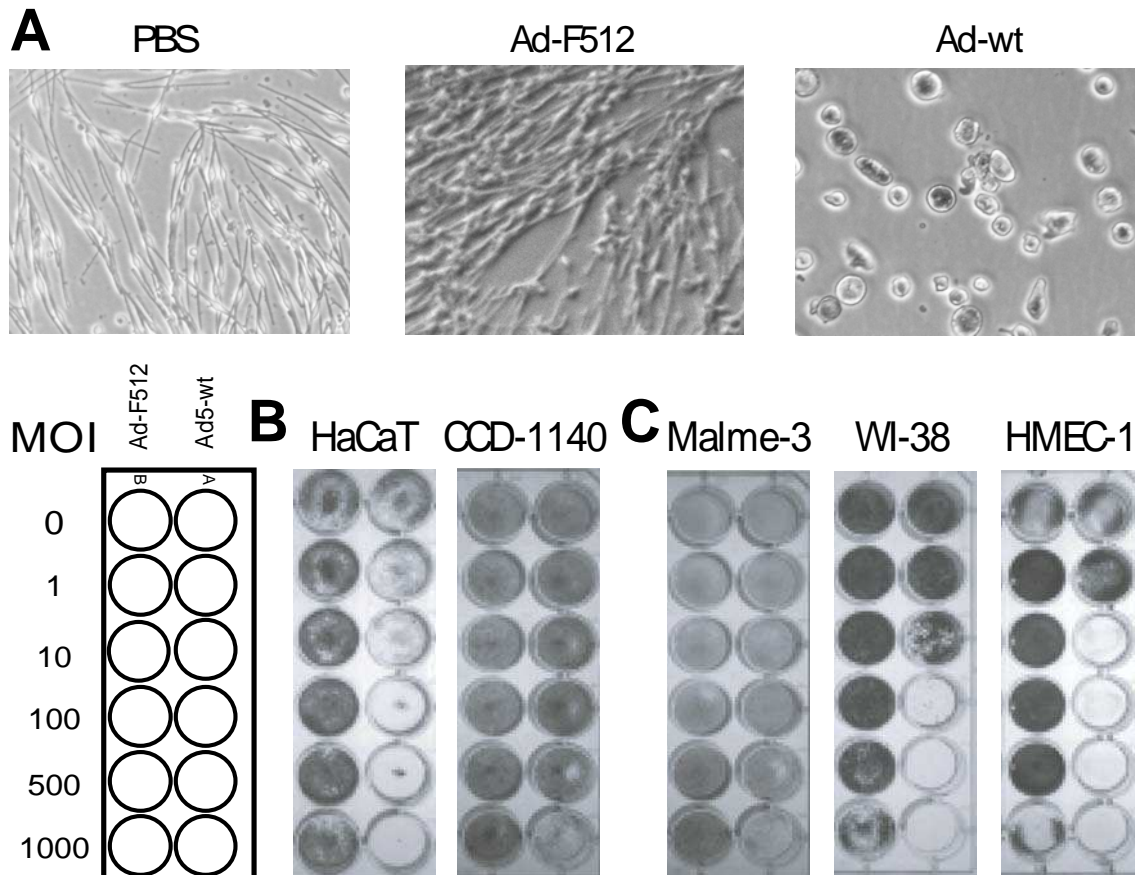


Figura 21. Efecto de Ad-F512 sobre células normales y células con fenotipo de células estromales asociadas a tumor. Las líneas celulares fueron infectadas con MOIs crecientes de Ad-F512 o Ad5-wt. A) Fotos representativas del efecto lítico del CRAd y del Ad-wt sobre la línea de melanocitos normales (NHM) infectadas a una MOI de 1000, B) sobre líneas normales de queratinocitos (HaCaT), fibroblastos de adultos (CCD-1140Sk) y fibroblastos C) Fotos representativas del efecto de los virus sobre y fibroblastos asociados a tumor (Malme-3), embrionarios (WI-38) y células endoteliales (HMEC). La sobrevida se evaluó mediante tinción con cristal violeta y fijación a los 10 días pos-infección.

El efecto lítico de Ad-F512 también se evaluó cuantificando la sobrevida celular en líneas de melanoma, en fibroblastos y endotelio mediante ensayos de MTT. El Ad-F512 mostró, a una dosis de 100 MOI, un mayor efecto lítico sobre células de melanoma SB2 y en menor medida sobre las células A375N. Al igual que lo ocurrido en los ensayos evaluados con cristal violeta (**Figura 21-C**), se observa un efecto lítico sobre la sobrevida de células WI-38 y HMEC a dosis de 1000 pv/célula (**Figura 22**).

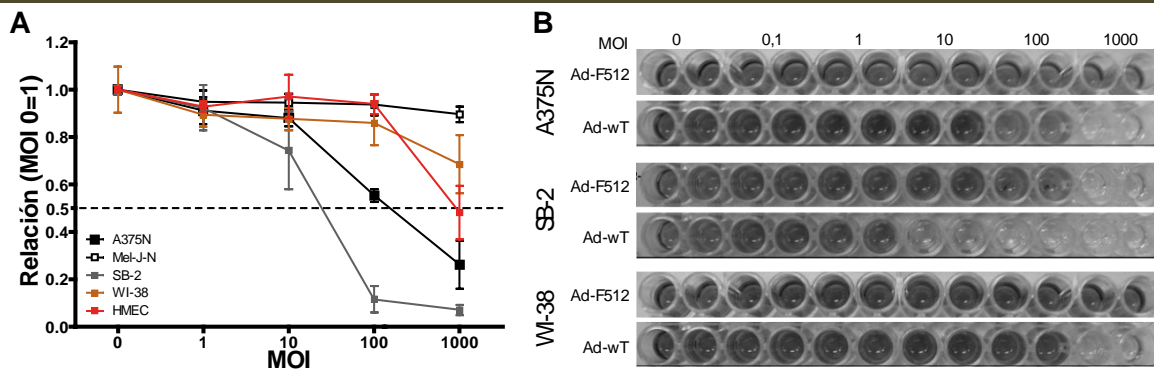


Figura 22. Efecto de Ad-F512 sobre la sobrevida celular. A) Sobrevida relativa al tratamiento control de las líneas celulares de melanoma (A375N, Mel-J-N, SB-2), fibroblasto embrionario (WI-38) y endotelio (HMEC-1) infectadas con dosis crecientes del CRAAd Ad-F512 B) Fotos representativas de los ensayos realizados. Se evaluó la sobrevida mediante ensayos de MTT.

A partir de la demostración de que el Ad-F512 tiene efecto lítico y produce una disminución en la sobrevida de las células tumorales y de fibroblastos y endotelio relacionados al tejido tumoral y de que este efecto lítico se reduce en células normales, decidimos analizar el efecto oncolítico *in vivo* de Ad-F512 utilizando modelos de trasplante xenogénico de células de melanoma humano en ratones desnudos.

2.4 ENSAYOS *IN VIVO*

Los ensayos *in vitro* nos dan una información restringida de la actividad adenoviral y se alejan mucho de una situación de un tumor real. El modelo que actualmente se acerca más a la realidad de la enfermedad es el crecimiento de tumores xenogénicos en ratones desnudos donde se pueden evaluar otras variables como el efecto del tejido circundante y de las células que invaden el tumor y conforman el estroma y los vasos irrigantes. La limitación del modelo es que el estroma que aporta el ratón no es permisivo para la replicación de estos CRAAd humanos, lo que impide evaluar claramente el impacto sobre el tejido normal y la dispersión del CRAAd dentro del tumor.

En una primera etapa evaluamos el efecto del Ad-F512 sobre diferentes modelos de tumores xenogénicos de melanoma trasplantados en ratones desnudos. El protocolo se inicia con la inyección subcutánea de células de melanoma en el flanco de los ratones. Cuando el tumor alcanzó los 100 mm³ se inyectaron 3 dosis de 1×10^{10} partículas virales en forma intra-tumoral. Utilizamos tumores obtenidos a partir de células A375N, Mel-J-N y SB2. Estos tres tipos celulares se caracterizan por permitir

diferente niveles de infección del Ad-5 (Figura 19) y también diferente actividad lítica de Ad-F512 *in vitro* (Figura 22). Ad-F512 no tuvo ningún efecto sobre tumores A375N (Figura 23-A) y solo un efecto parcial sobre tumores Mel-J-N donde se observó solo un retraso en el crecimiento del tumor en 2 de 5 ratones (Figura 23-B) sin cambios significativos sobre la sobrevivida de los ratones (Figura 23-B derecha).

Por el contrario, el tratamiento de tumores SB2 con Ad-F512 demostró un potente efecto anti-tumoral dado que en 3 de 5 ratones desapareció el tumor y en uno de los ratones permaneció libre de tumor por más de 50 días (Figura 23-C). Asimismo, la administración de Ad- β -Gal o de vehículo (PBS) no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento tumoral (Figura 23-C y Figura 24-A y C). En dos experimentos adicionales 2 de 4 y 3 de 5 ratones permanecieron libres de tumor después de 90 días (Figura 24-A y C). Estos datos indican un marcado efecto terapéutico del Ad-F512 sobre el crecimiento del melanoma y se visualiza en la curva de sobrevivida de los diferentes experimentos (Figura 23-C derecha y Figura 24-A y B derecha). En la Figura 24-B se muestran imágenes de 2 animales tratados con el CRAd o un virus no replicativo (Ad- β -Gal) en donde se observa la eliminación del tumor de melanoma únicamente en el ratón tratado con F512.

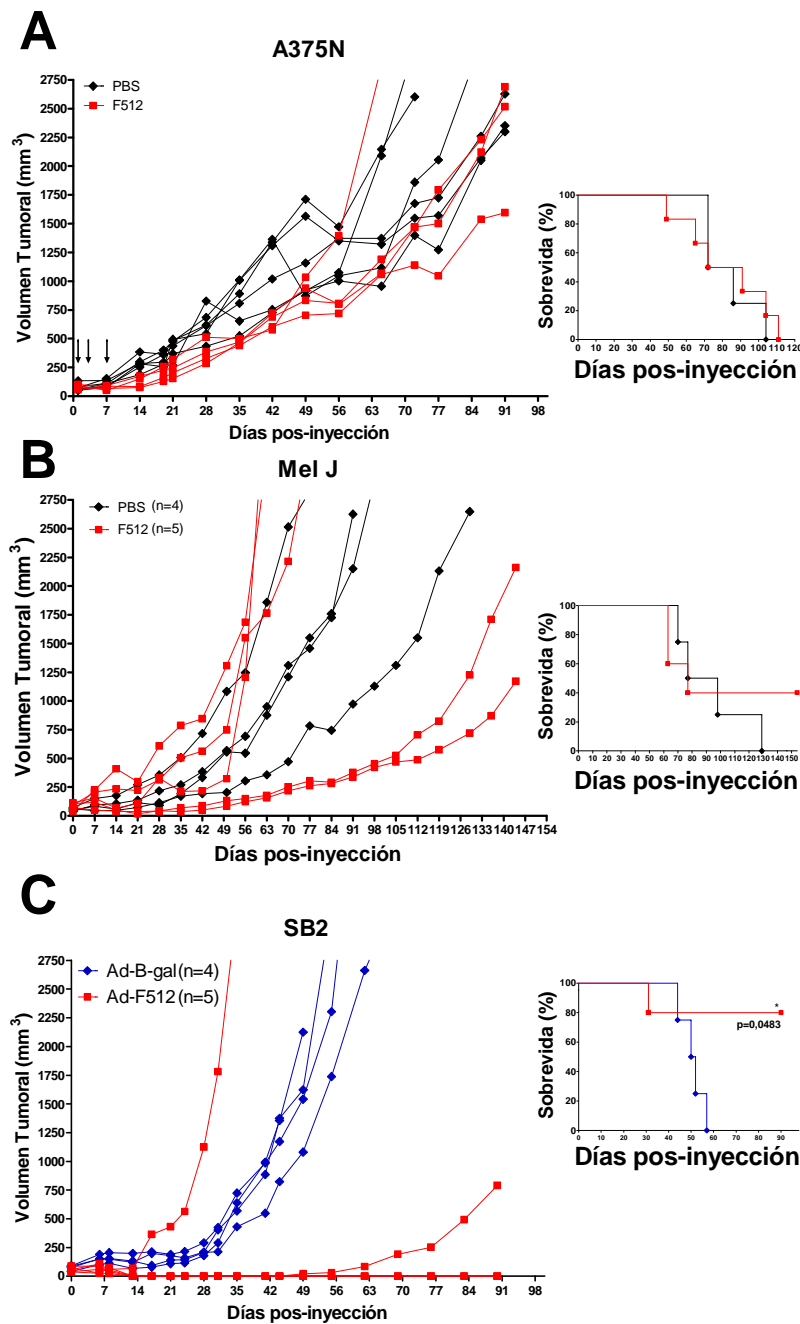


Figura 23. Efecto de Ad-F512 sobre diferentes modelos de melanoma. A) Curvas de crecimiento de animales con tumores A375N tratados con 5 dosis de Ad-F512 o PBS. En el panel derecho se muestra la curva de supervivencia Kaplan-Meier. B) Curvas de crecimiento de animales con tumores Mel J tratados con 5 dosis de Ad-F512 o PBS. En el panel derecho se muestra la curva de supervivencia Kaplan-Meier. C) Curvas de crecimiento de animales con tumores SB2 tratados con Ad-F512 o Ad- β -gal. En el panel derecho se muestra la curva de supervivencia Kaplan-Meier.

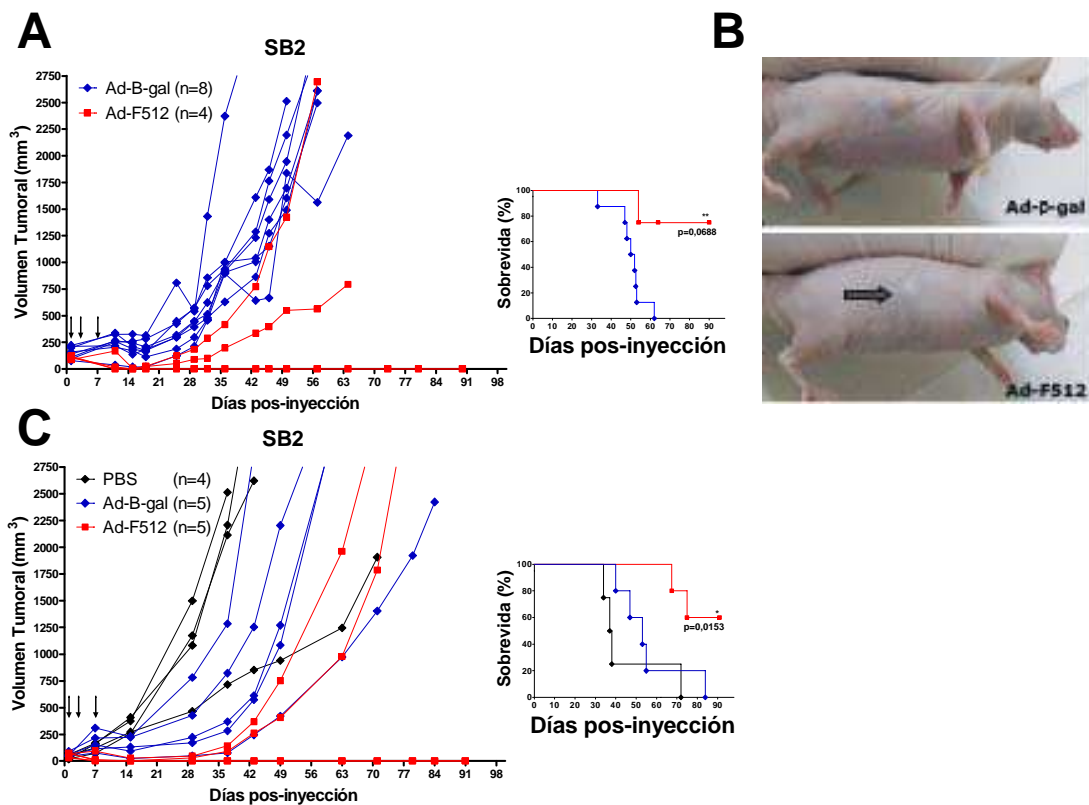


Figura 24. Efecto de Ad-F512 *in vivo* sobre tumores de melanoma. A y C) Curvas de crecimiento de animales con tumores SB2 tratados con 3 dosis de Ad-F512, Ad- β -gal o PBS. En el panel derecho se muestra la curva de supervivencia Kaplan-Meier. B) Fotos representativas de los ratones con tumores SB2 tratados con Ad- β -gal y Ad-F512 a los 14 días de iniciado el tratamiento.

Como mencionamos anteriormente, los tumores humanos son heterogéneos ya que están compuestos no solo por células malignas sino también por fibroblastos, células endoteliales y del sistema inmune. Además, como se mencionó previamente, el modelo de tumores xenogénicos en ratones desnudos tiene la desventaja de que los adenovirus de serotipo 5 tiene muy baja tasa de replicación en tejidos de ratón [300]. Para tratar de acercarnos más a un modelo clínico donde tanto las células malignas como las del entorno pudieran eventualmente ser infectadas y, de esta manera, donde el CRAd pudiera replicarse, generamos tumores compuestos por células malignas que fueron co-administradas con fibroblastos y células endoteliales humanas. A diferencia del efecto lítico de AdF512 sobre tumores SB2, AdF512 fue incapaz de eliminar tumores conformados por células de melanoma y fibroblastos (SB2/WI-38) observándose solo una disminución en la velocidad de crecimiento tumoral (**Figura 25-**

A). Un efecto similar se observó en los tumores formados por células tumorales y micro-endoteliales transformadas SB2/HMEC-1 (**Figura 25-B**).

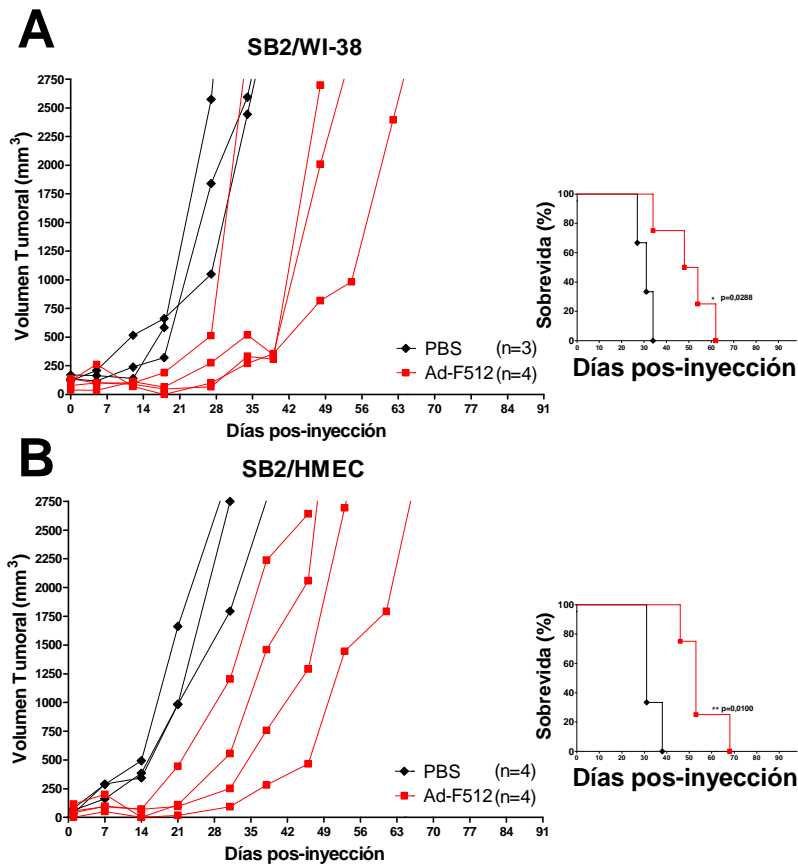


Figura 25. Efecto de Ad-F512 *in vivo* sobre tumores de melanoma conteniendo fibroblastos o endotelio humano. A) Curvas de crecimiento de animales con tumores SB2/WI-38 tratados con 3 dosis de Ad-F512 o Vehículo. En el panel derecho se muestra la curva de supervivencia Kaplan-Meier. B) Curvas de crecimiento de animales con tumores SB2/HMEC tratados con 3 dosis de Ad-F512 o Vehículo. En el panel derecho se muestra la curva de supervivencia Kaplan-Meier.

A partir de estos datos se plantearon diferentes hipótesis para explicar la diferencia en el efecto anti-tumoral del Ad-F512 en los tumores conteniendo estroma comparado con los tumores sin estroma. Nuestra primera hipótesis fue que existe una diferencia en la estructura del tejido tumoral según este presente el estroma o no y esto modificaría su permisividad para la distribución del adenovirus inyectado. Con el propósito de analizar esta hipótesis estudiamos en principio la distribución del adenovirus Ad- β -Gal en los tres tipos tumorales (SB2 solas, SB2/WI-38, y SB2/HMEC-1) mediante tinción con x-Gal. Como Ad- β -Gal no es un virus replicativo, esta medición se hizo a los pocos días de infectado el tumor y este resultado nos daría un panorama de la distribución luego de la primera infección viral.

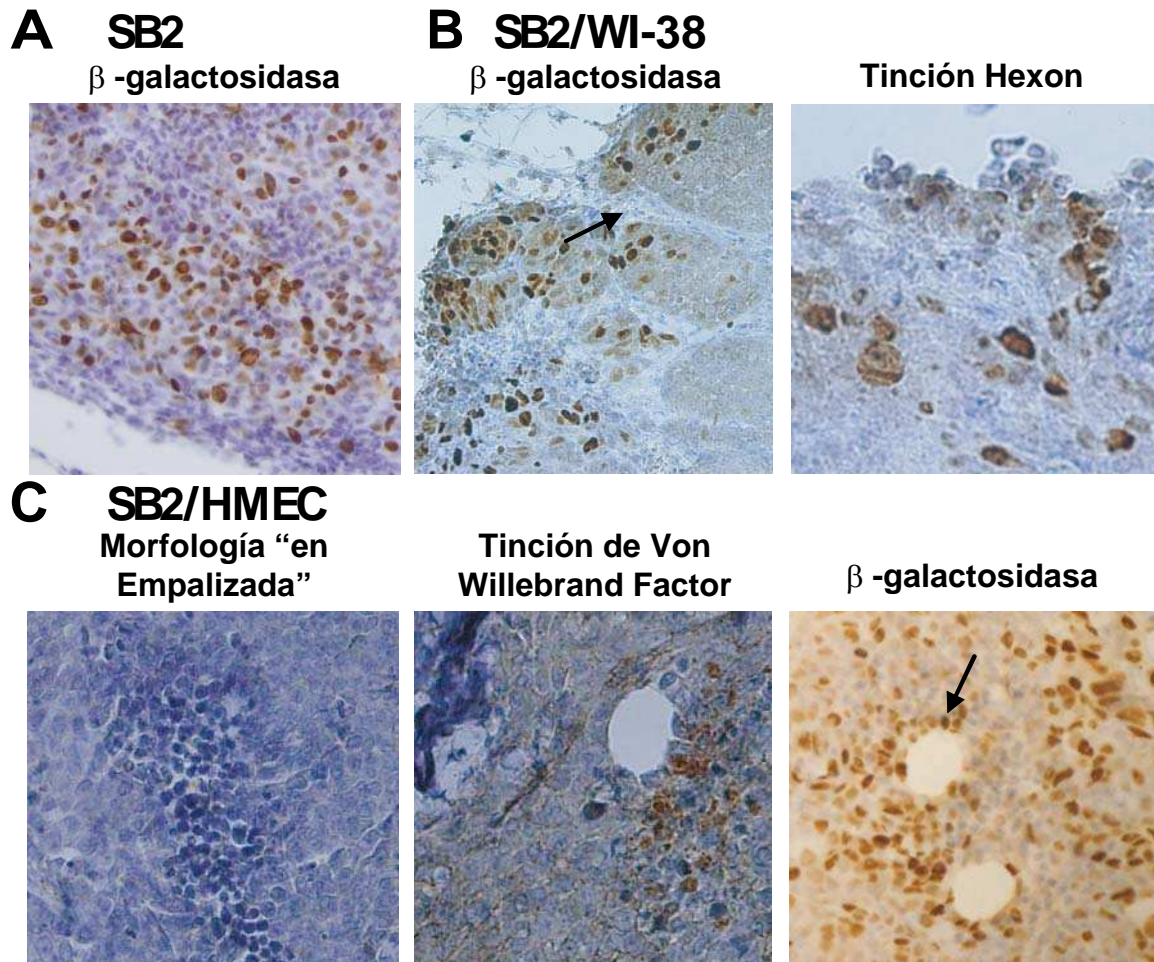


Figura 26 Histología de tejidos de tumores SB2 y tumores mixtos. A) Tinción x-Gal de corte histológico de tumor SB-2 inyectado con Ad- β -gal. B) Tinción x-Gal de corte histológico de tumor SB2/ Wi-38 inyectado con Ad- β gal (izquierda) o tinción HRP de tumor marcado con Ab anti-hexón (derecha). C) Foto representativa de nidos de células micro-endoteliales con la estructura típica de morfología en empalizada (izquierda). Tinción de células endoteliales con Von Willebrand Factor humano (central) y tinción X-Gal de corte histológico de tumor SB2/HMEC inyectado con Ad- β -gal (derecha).

Observamos que en los tumores SB2 inyectados con el adenovector en forma intratumoral la mayor parte del Ad- β -gal se distribuye en la periferia, decreciendo los niveles de transducción hacia el centro del tumor (**Figura 26-A**). Mientras que en tumores SB2/WI-38 se observa una distribución limitada a los nidos de células tumorales pero no se observa tinción de los fibroblastos (**Figura 26-B**). Esto se correlaciona con la baja infectividad que observamos en células WI-38 *in vitro* (**Figura 19-B** y **Figura 21-C**). En los tumores SB2/HMEC-1 se observan grupos de células endoteliales con morfología en "empalizada" y tinción con Von Willebrand Factor (Factor VIII) humano en las inmediaciones de los vasos sanguíneos, indicando una posible diferenciación hacia células endoteliales (**Figura 26-C**). En este caso, las células

endoteliales se marcan con x-Gal, indicando la transducción por el Ad- β -Gal. Esto también se correlaciona con la mayor infectividad *in vitro* de las HMEC-1 con el adenovirus de serotipo 5 a dosis menores a las de WI-38 (**Figura 19-B** y **Figura 21-C**). Aunque no observamos una barrera física como en los tumores SB2/WI38, tampoco observamos efectos antitumorales de AdF512 sobre tumores SB2/HMEC-1.

En estudios realizados por la Dra. María Verónica Lopez, co-directora de mi tesis, se determinó que el medio condicionado de células WI-38 favorece la replicación de AdF512 sobre células de melanoma *in vitro*, mientras que el medio condicionado de HMEC-1 o de las propias células de melanoma no modifica los niveles de replicación. Esto indica que factores producidos por las diferentes estirpes celulares pueden modificar la replicación intra-tumoral del CRAd [301].

Otro de los factores que podría estar afectando la eficacia del tratamiento adenoviral podría ser la velocidad de crecimiento del tumor. Si observamos las curvas de crecimiento de los diferentes tumores podemos observar que los tumores SB2 crecen a una velocidad menor que los tumores SB2/WI-38 y SB2/HMEC-1 (tasa de duplicación del volumen tumoral de 10,61 contra 7,14 y 7,59 días, respectivamente).

Esta observación nos llevó a una segunda hipótesis de que el aumento de la velocidad de crecimiento del tumor podría estar requiriendo otro régimen de administración del CRAd dado que la velocidad de crecimiento tumoral podría exceder la tasa de replicación viral. Es así que decidimos tratar tumores SB2/WI-38 con 3 o 5 inyecciones de Ad-F512 o PBS para luego evaluar el crecimiento tumoral y la sobrevida de los ratones. A diferencia de lo observado en el estudio anterior, en este ensayo la administración del CRAd indujo la eliminación del tumor en un solo animal, aunque no se observaron diferencias significativas en la sobrevida de los ratones entre 3 y 5 dosis, lo que indica que una mayor cantidad de virus Ad-F512 administrado no resulta beneficioso (**Figura 27**).

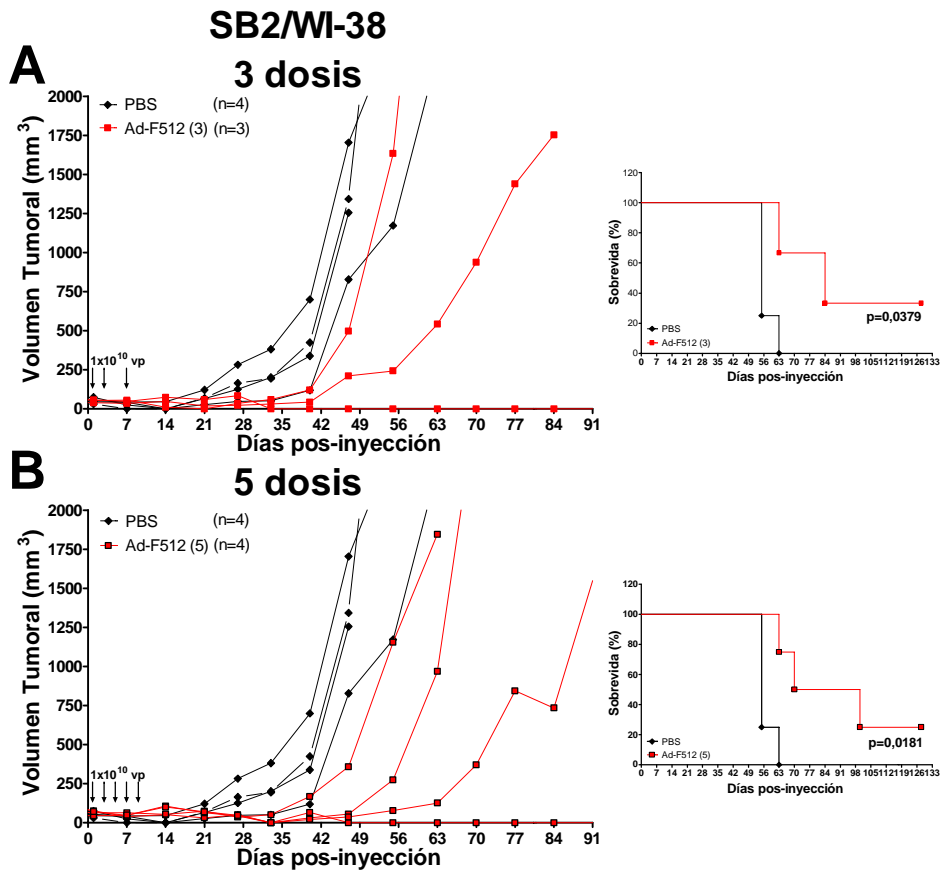


Figura 27. Evaluación del número de dosis de Ad-F512 sobre el efecto anti-tumoral.

A) Curvas de crecimiento de animales con tumores SB2/ WI-38 tratados con 3 dosis de Ad-F512 o PBS. En el panel derecho se muestra la curva de supervivencia Kaplan-Meier. B) Curvas de crecimiento de animales con tumores SB2/ WI-38 tratados con 5 dosis de Ad-F512 o PBS. En el panel derecho se muestra la curva de supervivencia Kaplan-Meier.

Estos datos indicarían que la actividad oncolítica de Ad-F512 podría encontrarse limitada por la estructura del tejido tumoral, la actividad transcripcional del promotor utilizado o por la baja infectividad de los adenovirus recombinantes utilizados. En el siguiente capítulo se describirán las modificaciones realizadas al promotor F512 para aumentar su actividad transcripcional bajo las condiciones fiso-patológicas que caracterizan al tejido tumoral.

CAPÍTULO 3 DESARROLLO DE PROMOTORES QUIMERA.

RESUMEN

El tratamiento con Ad-F512 resultó efectivo en tumores SB2 pero no en tumores A375N, MelJ o en los tumores combinados con fibroblastos SB2/WI-38. Con el propósito de aumentar el efecto anti-tumoral del CRAd construido decidimos utilizar dos estrategias. La primera consistió en aumentar la actividad del promotor F512 mediante la construcción de promotores quimera. Esta estrategia consiste en el agregado de elementos de respuesta a condiciones fisio-patológicas específicas del microambiente tumoral. Con este objetivo, se construyeron diferentes promotores quimera conteniendo elementos de respuesta a NFκB (como modelo de inflamación), hipoxia y especies reactivas del oxígeno (ROS) que están aumentadas en tejidos tumorales tal cual fue demostrado por nuestro grupo [302].

Una estrategia complementaria consistió en la modificación del tropismo viral a partir del cambio de la estructura de la fibra, proteína involucrada en la unión del virus al receptor celular.

A partir de ambas modificaciones se evaluó el efecto citopático *in vivo* e *in vitro* de los CRAds modificados.

3.1 CONSTRUCCIÓN DE PROMOTORES QUIMERA.

El tejido tumoral se caracteriza por, entre otros, una marcada falta de oxígeno [303], altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) [304, 305] y la sobre-expresión de proteínas involucradas en procesos anti-apoptóticos e inflamatorios mediado en parte por NFκB [256].

Con el fin de aumentar la potencia de F512 se decidió incorporar secuencias respondedoras a hipoxia (HRE), a especies reactivas del oxígeno (ROSRE) y a NFκB (κBRE) y clonarlas en diferentes lugares de F512.

Teniendo en cuenta que los elementos de respuesta pueden activar la transcripción a diferentes distancias del inicio de la transcripción encontramos dos posibles regiones. La primera región se encuentra aguas arriba de la secuencia de F512 (Figura 28 - Región 1). La segunda región se seleccionó entre las bases -315/-263 (Figura 28 - Región 2) debido a que no encontramos por predicción ningún sitio de unión a factores transcripcionales. Por otra parte, en esa región existen dos sitios de corte para la enzima de restricción *StuI* que permitían insertar diferentes secuencias de ADN.

Se construyeron promotores quimera con las diferentes modificaciones y se clonaron en el plásmido reportero pGL3-basic (Figura 28).

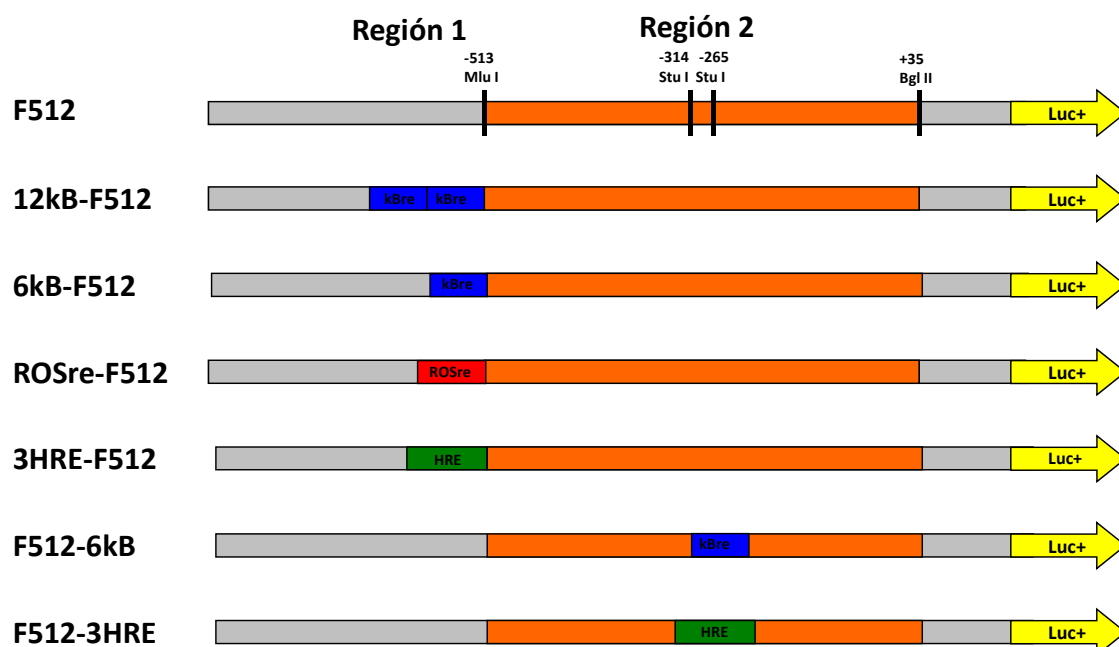


Figura 28. Estructura de los diferentes promotores quimera construidos. Se clonaron casetes conteniendo elementos de respuesta a NFκB (κBre), hipoxia (HRE) o a

especies reactivas del oxígeno (ROSre) en la región 1 o 2 del promotor F512 mediante técnicas de biología molecular.

2.2 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LOS PROMOTORES EN EL CONTEXTO PLASMÍDICO.

Las diferentes construcciones fueron ensayadas en células de melanoma A375N que expresan altos niveles de SPARC y en células de cáncer de mama T47-D que expresan muy bajos niveles de SPARC utilizando luciferasa como gen reportero. En una primera etapa se caracterizaron 6 construcciones conteniendo los sitios HRE, κ B y ROSre en la región 1 o 2 del promotor F512 bajo condiciones de normoxia (Figura 29).

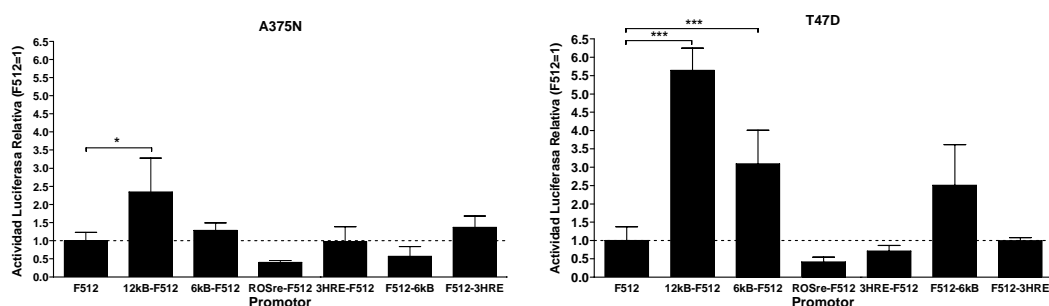


Figura 29. Actividad luciferasa de los promotores quimera bajo condiciones de normoxia. Las células de melanoma (A375N) y de cáncer de mama (T47D) fueron transfectadas con los promotores quimera conteniendo elementos de respuesta a NF κ B (12kB-F512, 6kB-F512 y F512-6kB), a especies reactivas de oxígeno (ROSre-F512) y a hipoxia (3HRE-F512 y HRE-F512) y a las 48 horas se realizaron ensayos de actividad de luciferasa. Los datos se expresan como la actividad de luciferasa relativa al plásmido pGL3-F512. Las columnas representan el promedio de al menos tres experimentos independientes y las barras el DE.

En los promotores conteniendo elementos NF κ B se observa una leve inducción en condiciones de normoxia de la línea A375N cuando posee 12 elementos de respuesta a NF κ B (12kB-F512), mientras que 6 elementos no cambian la actividad transcripcional en la región 1 (6kB-F512) o reducen levemente la actividad en la región 2 (F512-6kB) (Figura 29).

Cabe destacar que el elemento ROSre fue evaluado en el contexto del promotor de SPARC y se observó una disminución del 60% de actividad del promotor F512 cuando se clonó en la región 1 (Figura 29), mientras que cuando intentamos clonarlo en la

región 2 no se obtuvieron clones positivos y aguas arriba de la caja TATA del promotor solo se obtuvieron promotores con la inserción anti-sentido (6 de 7 clones secuenciados); por otra parte, en el único clon con la secuencia sentido el plásmido perdió 700 pares de bases aguas abajo del sitio de inserción. Debido a estos resultados dejamos de lado este elemento.

La siguiente etapa consistió en la evaluación de la actividad de estos promotores bajo condiciones de inducción de los factores transcripcionales que se unen a los elementos clonados. Para esta etapa se seleccionaron los promotores conteniendo 6 (6kBF512) o 12 (12kBF512) elementos de respuesta a NF κ B en la región 1 y los promotores con 3 elementos de respuesta a hipoxia en la región 1 (3HRE-F512) o en la región 2 (F512-3HRE). Para remedar el estado inflamatorio presente en el tejido tumoral, se utilizó TNF- α que aumenta la actividad transcripcional del factor NF κ B. Como se puede observar en la Figura 30 los promotores quimera 6kBF512 y 12kBF512 muestran un aumento de 8,8 y 25,9 veces en la actividad de luciferasa con respecto a la actividad del promotor F512 bajo condiciones de normoxia (Figura 30-A). En el caso de los plásmidos conteniendo elementos HRE, HRE-F512 y F512-HRE, observamos que la actividad bajo condiciones de normoxia se mantiene en los niveles observados en el promotor F512 mientras que bajo condiciones de hipoxia se observa un aumento de la actividad de 6,01 y 6,78 veces con respecto al promotor F512 bajo las mismas condiciones (Figura 30-B). Cabe destacar que en condiciones de hipoxia los elementos HRE generaron una inducción de la actividad transcripcional independientemente de la posición de inserción, ya que la actividad en la región 2 (F512-3HRE), aunque mayor que en la región 1, no demuestra diferencias significativas.

Estos datos nos llevaron a construir un promotor F512 quimera con la presencia de ambos elementos (NF κ B y HRE); por lo tanto, clonamos 3 elementos HRE en los sitios *Stu*I de la región 2 del promotor 12kB-F512, obteniendo el promotor quimera denominado kBF512HRE. Este promotor demostró un aumento de la actividad transcripcional en células A375N bajo condiciones de TNF- α , hipoxia y en ambas condiciones de 20,9, 6,9 y 22,9 veces, respectivamente, con respecto a la actividad transcripcional demostrada por el promotor F512 bajo las mismas condiciones (Figura 30-C).

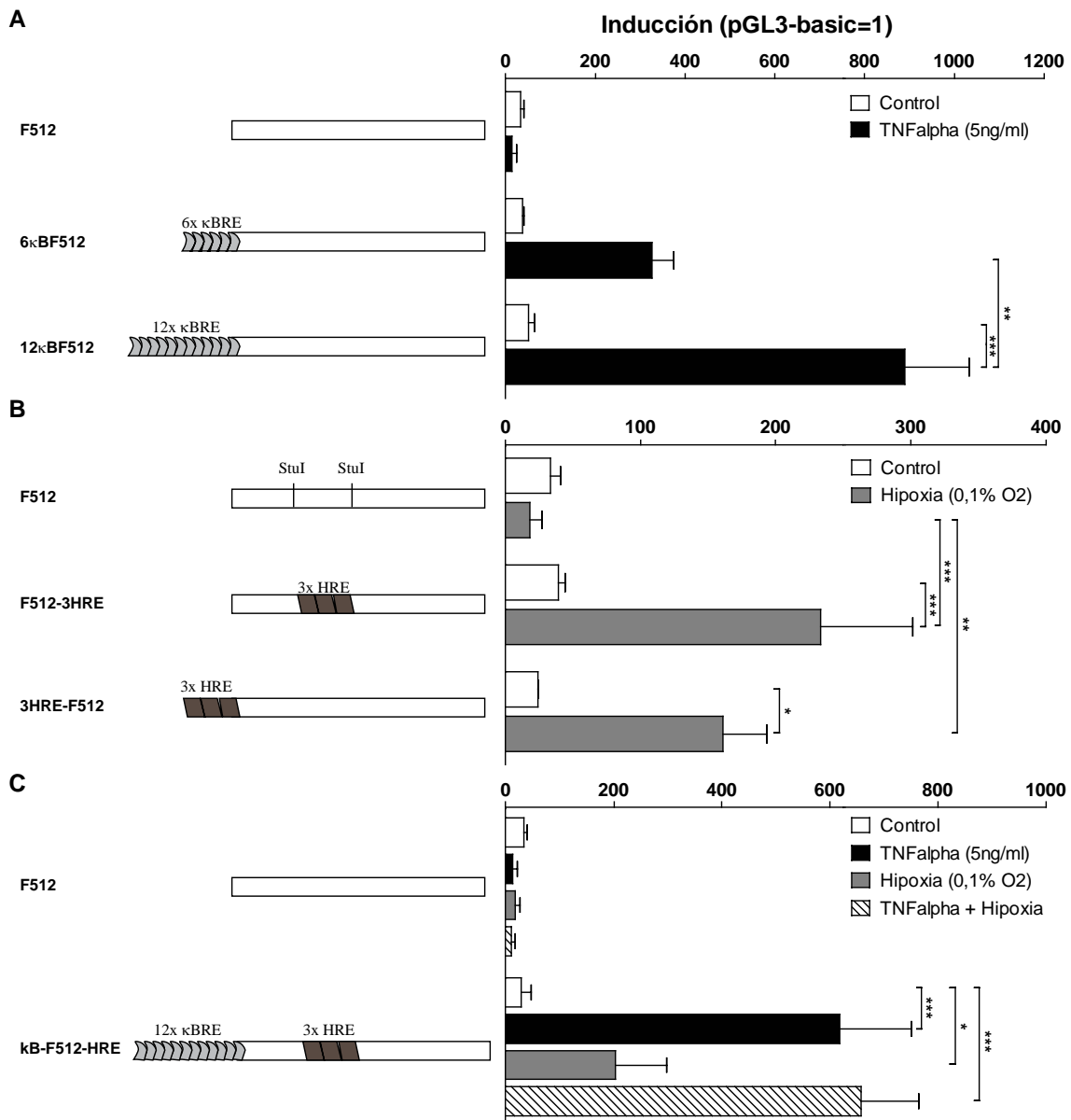


Figura 30. Evaluación de la actividad de los promotores quimera en un contexto plasmídico. Las células de melanoma (A375N) fueron transfectadas con los promotores quimera conteniendo **A)** Elementos de Respuesta al factor NFκB, **B)** Elementos de Respuesta a Hipoxia o **C)** ambos. Se transfectaron 40.000 células con 0,8 μg de ADN plasmídico conteniendo el promotor indicado más 0,1 μg del plásmido pRL-CMV utilizado como control de transfección. A las 4 horas se agregó medio conteniendo SFB y se trató a las células con **A)** y **C)** TNF-α, **B)** y **C)** Hipoxia (0,1% O₂) o **C)** ambos. Después de 48 horas se lisaron las células y se realizó un ensayo de actividad de luciferasa. Los datos son expresados como actividad luciferasa relativa al plásmido sin promotor pGL3-basic. Las columnas representan el promedio de al menos tres experimentos independientes y las barras el DE.

Podemos concluir que la inclusión de los elementos HRE y κB en el promotor F512 aumenta la actividad del mismo bajo condiciones de hipoxia o en presencia de alta

actividad del factor NF κ B, lo que facilitaría la expresión del gen E1A en regiones hipóxicas o inflamatorias y por ende la replicación viral.

La siguiente fase, después de la selección del promotor quimera kBF512HRE, implicó la construcción de adenovirus reporteros para realizar una evaluación de la actividad transcripcional en el contexto adenoviral. La construcción de adenovirus reporteros se realizó debido a que existen estudios de que la actividad transcripcional de un promotor puede variar al ser insertado en un genoma adenoviral debido a la presencia de secuencias activadoras propias del genoma adenoviral [118].

3.2 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LOS PROMOTORES EN EL CONTEXTO ADENOVIRAL

Los adenovirus contruidos se denominaron describiendo el promotor quimera contenido y el gen al cual regulan: Ad-F512-Luc y Ad-I-kBF512HRE-Luc (Figura 31-A). En este último adenovirus se agregó un elemento aislante (*insulator*), que corresponde a la señal de freno transcripcional del gen de la hormona de crecimiento bovina, que fue reportado como inhibidor de los efectos activadores de la secuencia ITR del genoma adenoviral [306] (Figura 31-A). Se utilizó esta última estrategia debido a que las secuencias ITR pueden producir una activación inespecífica del promotor insertado en el genoma adenoviral, causando una activación transcripcional inespecífica. Se evaluó la actividad transcripcional de este promotor bajo condiciones de normoxia, TNF- α , hipoxia e hipoxia+TNF- α en tres líneas celulares de melanoma, WI-38 y HMEC-1. El protocolo seguido fue similar al usado con plásmidos, con la salvedad de que en este caso se relativizaron los datos por la cantidad de miligramos de proteínas de la muestra y los datos fueron referidos a la actividad transcripcional de Ad-F512-Luc bajo condiciones de normoxia.

Al analizar las diferentes líneas celulares pudimos observar que bajo condiciones de normoxia y en el contexto adenoviral, el promotor kBF512HRE tiene los mismos niveles de actividad que F512 en células A375N y HMEC-1 y 2 a 4 veces mayor actividad en SB2, Mel-Les o WI-38 (Figura 31–B columnas blancas normoxia). Cuando las células son tratadas con TNF- α , F512 mantiene niveles de actividad similares a F512 bajo condiciones de normoxia. Mientras que con kBF512HRE se observa un aumento de 31

a 38 veces en células de melanoma; mientras que en WI-38 y HMEC se observa un aumento de 84 y 7 veces, respectivamente (Figura 31 – TNF- α).

Cuando evaluamos los niveles de actividad bajo condiciones de hipoxia, pudimos observar que F512 aumenta levemente su actividad transcripcional con respecto a normoxia en todas las líneas celulares aunque no se observan diferencias significativas (Figura 31 – Columnas grises). Por otro lado, kBF512HRE muestra un aumento de la actividad de 10 a 20 veces en células de melanoma y WI-38, mientras que en células HMEC-1 no se observa aumento de la actividad transcripcional (Figura 31 – Hipoxia).

Al someter a las células a condiciones de hipoxia combinado con la presencia de TNF- α , pudimos observar que los niveles de inducción de F512 y kBF512HRE fueron similares a los obtenidos bajo TNF- α no observándose efectos aditivos (Figura 31 – Hipoxia+ TNF- α).

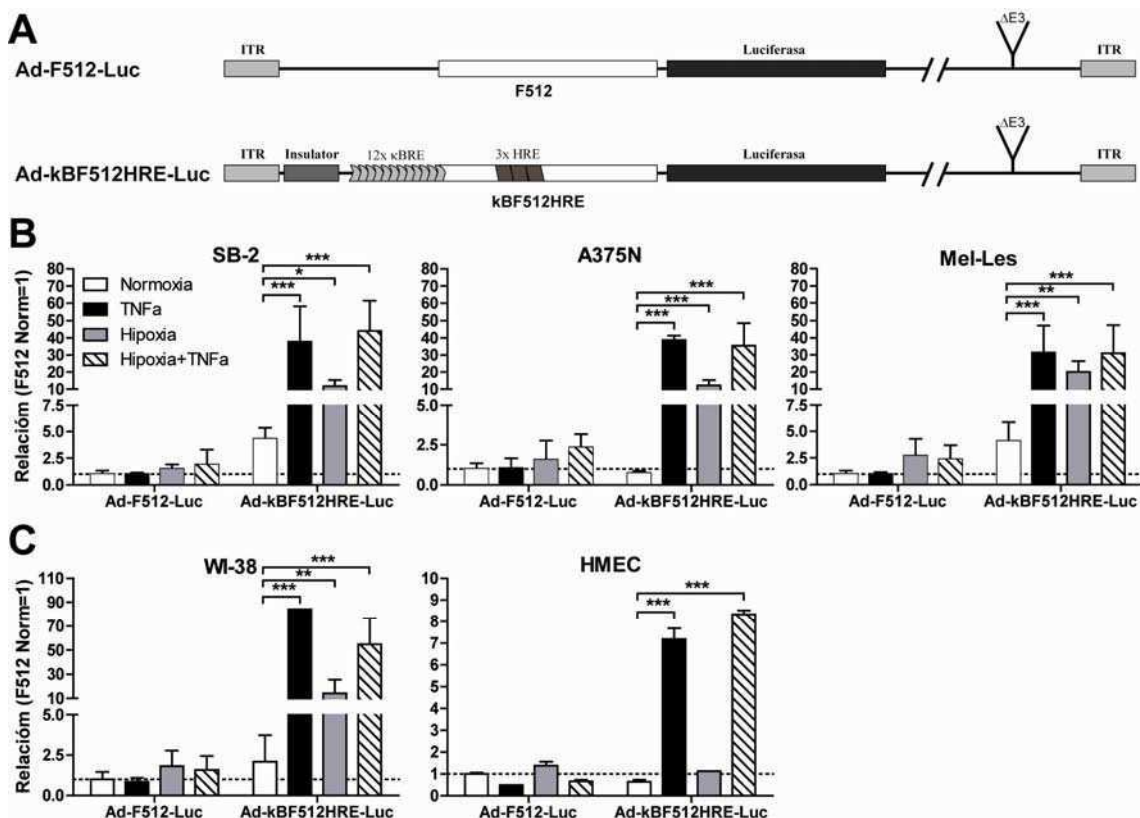


Figura 31. Ensayo de actividad de luciferasa de promotores quimera en el contexto adenoviral. A) Esquema de la estructura del genoma de los adenovirus reporteros Ad-F512-Luc y Ad-kBF512HRE-Luc. Ensayos de actividad de luciferasa de células de melanoma **B**) (SB2, A375N y Mel-Les), **C**) fibroblastos WI-38 y micro-endotheliales HMEC-1 transducidas con Ad-F512-Luc, Ad-kBF512HRE-Luc a una MOI de 500. Las células fueron luego cultivadas bajo condiciones de normoxia, en presencia de TNF- α , hipoxia o hipoxia+TNF- α . A las 72 hrs se lisaron las células y se realizaron los ensayos de actividad de luciferasa. Los datos son expresados como niveles de actividad transcripcional con respecto a Ad-F512-Luc en normoxia.

Al analizar los resultados obtenidos pudimos concluir que los niveles de inducción bajo TNF- α , hipoxia o la combinación de ambos tratamientos, son similares en el contexto adenoviral y en el plasmídico, observándose una menor inducción con hipoxia que con TNF- α ; la combinación de ambos tratamientos no aumenta la actividad transcripcional con respecto a la observada solo bajo TNF- α . Cabe destacar que los niveles de inducción en células A375N en el contexto adenoviral es el doble de la observada bajo contexto plasmídico.

3.3 ADENOVIRUS DE REPLICACIÓN CONDICIONAL

3.3.1 Ensayos de viabilidad celular

La siguiente etapa involucró el desarrollo de los adenovirus de replicación condicional en los cuales el gen E1A se encuentra transcripcionalmente regulado por los promotores seleccionados. Se construyeron los adenovirus Ad-I-kBF512HRE-E1A (respondedor a inflamación e hipoxia) y Ad-HREF512-E1A (respondedor solo a hipoxia). En estudios *in vitro* se determinó la dosis necesaria para eliminar al 50% de las células (IC50) y utilizamos al Ad-wt como punto de comparación. Cabe destacar que un valor superior de IC50 implica una menor actividad lítica. Observamos que las células de melanoma tratadas con los diferentes CRAds bajo condiciones de hipoxia disminuyen o mantienen la dosis necesaria de virus para eliminar al 50% de las células mientras que el Ad-wt mantiene o incluso aumenta su IC50 (Tabla 2). Bajo TNF α e hipoxia la IC50 de Ad-kBF512HRE en las células SB2 es 2,6 y 3 veces menor que en normoxia. Indicando una mayor actividad lítica del virus. En el caso de A375N, Ad-kBF12HRE mantiene su IC50 bajo TNF α y disminuye bajo hipoxia (Tabla 2 – A375N). En el caso de la línea celular WI-38 la IC50 solo disminuye bajo TNF α .

Línea Celular	IC50											
	SB2				A375N				WI-38			
CRAd\Tratamiento	Normoxia	TNF α	Hipoxia	Hipoxia+TNF α	Normoxia	TNF α	Hipoxia	Hipoxia+TNF α	Normoxia	TNF α	Hipoxia	Hipoxia+TNF α
AdWT	3,88	5,01	29,77	5,60	29,33	12,01	30,41	12,54	30,80	12,37	36,42	83,06
Ad-F512	442,40	205,10	335,03	178,30	571,0	242,8	253,1	276,4	529,93	231,70	302,80	1175,00
Ad-kBF512HRE	222,73	83,75	74,37	54,83	340,5	323,1	203,4	302,3	563,40	309,60	641,47	1011,00
Ad-HREF512	321,35	212,50	216,08	173,70	765,3	656,3	436,1	450,7	609,58	1232,60	1525,25	1861,00

Tabla 2. Efecto citopático de los CRAds dirigidos por promotores quimera. Diferentes tipos celulares fueron infectadas con multiplicidades de infección (MOI) crecientes de CRAds y después de 6 días de

cultivo bajo condiciones de normoxia o hipoxia (0.1/ O₂) se evaluó la sobrevivencia celular mediante ensayos de MTT.

Para corroborar que los datos del efecto citopático mostrado en la Tabla 2 se deben a la replicación de los CRAds y no a un efecto del tratamiento decidimos analizar la replicación viral mediante la cuantificación del número de copias del genoma adenoviral. Para ello, se realizaron PCRs en tiempo real sobre muestras de ADN genómico 5 y 72 horas después de la infección viral en normoxia, en presencia de TNF- α , hipoxia o TNF- α mas hipoxia. A las 5 horas se examinó la entrada del virus dentro de la célula mientras que a las 72 horas se cuantificó la replicación viral. Analizando los datos obtenidos observamos que las células SB2 exhiben, en general, una tasa de replicación viral diez veces superior en condiciones de normoxia a la observada con células A375N o WI-38 (comparar Figura 32-A con Figura 32-B, C y D). El agregado de TNF- α solo indujo mayor replicación viral del virus que posee elementos de respuesta kB (Ad-kBF512HRE) en células SB2, mientras que con los virus que no poseen estos elementos (F512 o HREF512) la tasa de replicación viral se mantiene o, incluso, disminuye (Figura 32-A). Bajo condiciones de hipoxia, todos los virus aumentaron su tasa de replicación en células de melanoma, mientras que en WI-38 y HMEC-1 solo se observó aumento con los virus que poseen elementos HRE (2kBF512HRE y HREF512) (Figura 32, comparar columnas normoxia con columnas hipoxia). Bajo condiciones de TNF- α mas hipoxia se observó una leve inducción de la replicación del Ad-F512 en células de melanoma SB2 y A375N, mientras que en WI-38 y HMEC-1 este efecto no se observa. Bajo estas condiciones Ad-kBF512HRE demuestra un aumento en la progenie viral que varía entre 3,3 a 1,5 veces con respecto a Ad-F512 bajo las mismas condiciones. Es importante destacar que la replicación del Ad5-wt disminuye en hipoxia (datos no mostrados y [307]).

Además, Ad-kBF512HRE se replica a una mayor tasa en hipoxia que en presencia de TNF- α en todas las líneas celulares (Figura 32, comparar columnas TNF α con hipoxia). Esto difiere de lo observado con la actividad transcripcional del promotor kBF512HRE en el contexto adenoviral, en donde se observaba mayor actividad transcripcional con TNF- α que en hipoxia (Figura 31).

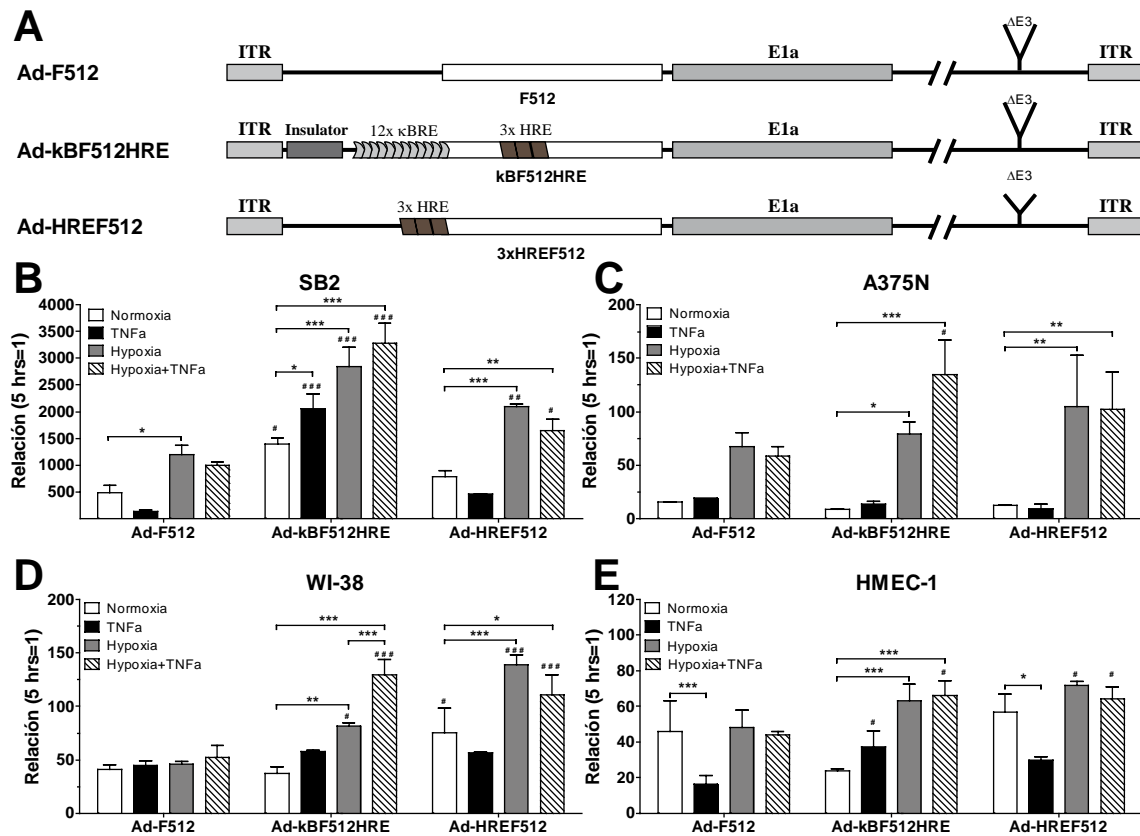


Figura 32. Ensayo de replicación viral. A) Esquema de la estructura de los CRAds Ad-F512, Ad-kBF512HRE y Ad-HREF512. Las células de melanoma, B) SB2 y C) A375N, o las células C) WI-38 y D) HMEC, fueron incubadas con diferentes CRAds (Ad-F512, Ad-kBF512HRE y Ad-HREF512) a una MOI de 500 (A375N, WI-38, HMEC) o 100 (SB2) y después de 4 horas fueron incubadas en normoxia (21% O₂), hipoxia (0,1% O₂), TNF- α (5 ng/ml) o hipoxia más TNF- α . A las 5 y 72 horas se colectaron las células y se extrajo el ADN genómico. Posteriormente, se cuantificó el número de copias de genoma adenoviral mediante PCR en tiempo real. Los datos se expresan como incremento del número de copias de genoma adenoviral con respecto a los niveles encontrados 5 horas post-infección. Las columnas representan la media de, al menos, 3 ensayos independientes y las barras el DE. * <0,05 **<0,01, ***<0,001 representan las diferencias significativas con respecto a normoxia. #<0,05, ##<0,01, ###<0,001 representan las diferencias significativas con respecto a Ad-F512 bajo el mismo tratamiento.

En conclusión, los resultados con los virus no replicativos indicaban que la inserción de los elementos κ B y HRE en el promotor de SPARC aumentaba la actividad transcripcional de estos promotores bajo condiciones de inflamación y/o hipoxia. Este aumento de la actividad transcripcional deriva en un aumento tanto del efecto citopático como de la replicación viral de Ad-kBF512HRE y Ad-HREF512.

3.3.2 Estudios en modelos *in vitro* de esferoides

El modelo de líneas celulares en mono-capa posee bastantes objeciones con respecto a la estructura y función celular, debido a que las células se encuentran en una estructura bidimensional y no en la estructura tridimensional como se encuentran en los tejidos de los que forman parte. El modelo de esferoides se acerca un poco más a la estructura tridimensional de los tejidos y permite evaluar el efecto de la presencia de diferentes uniones celulares, así como también la presencia de hipoxia sobre la distribución y el efecto oncolítico de los CRAds. De modo tal que se armaron esferoides compuestos por células de melanoma, fibroblastos y endotelio. Se eligieron los modelos de A375N y SB2 en presencia o no de fibroblastos para evaluar la replicación viral. Se analizó la replicación adenoviral mediante la cuantificación de copias del genoma adenoviral por técnicas de PCR en tiempo real. Pudimos observar que, al igual que lo ocurrido en células en monocapa (Figura 32-A y B), todos los esferoides de SB2 producen mayor cantidad de copias del genoma adenoviral bajo condiciones de hipoxia. Al igual que lo ocurrido en los ensayos con células en monocapa, los esferoides conteniendo células SB2 producen más copias de genoma adenoviral que los esferoides conteniendo células A375N (Figura 33). Mientras que en esferoides de A375N se observa mayor producción de copias del genoma adenoviral de Ad-kBF512HRE, en esferoides conteniendo células SB2, este aumento no es tan marcado.

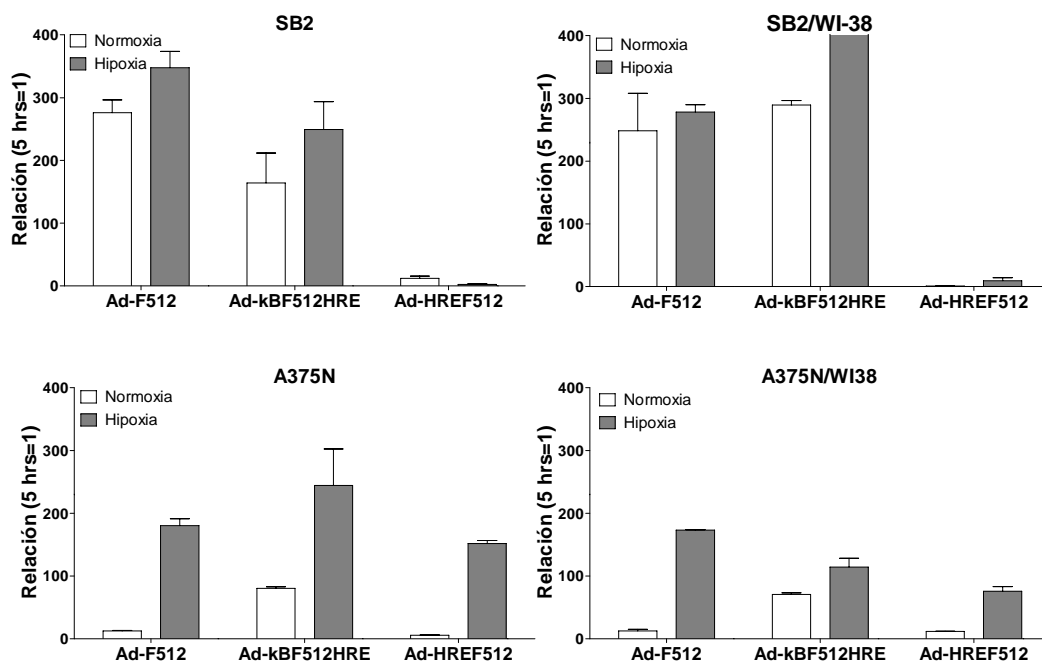


Figura 33. Ensayo de replicación viral sobre esferoides multicelulares. Los esferoides de células de melanoma (SB2 o A375N) solas o mezcladas con fibroblastos embrionarios humanos (SB2/WI-38 o A375N/WI-38) fueron infectados con los diferentes CRAds (Ad-F512, Ad-2kBF512HRE y Ad-HREF512) a una MOI de 500-1000. Después de 5 horas fueron colocados bajo niveles normales de oxígeno (21% O_2) o hipoxia (0,1% O_2). El ADN genómico fue extraído 5 horas o 6 días pos-infección y el número de copias de genoma adenoviral fue evaluado por PCR en tiempo real

Los resultados con esferoides A375N/WI-38/HMEC muestran un aumento en el número de copias de genoma adenoviral de los CRAds conteniendo elementos HRE (Ad-kBF512HRE y Ad-HREF512) bajo condiciones de hipoxia (Figura 34-A) y esto se ve reflejado en una mayor muerte celular (Figura 34-B). Se puede observar sin embargo, que la muerte celular en esferoides es menor a la observada en monocapa (Tabla 2), ya que en el caso de las células en monocapa se necesita una MOI de entre 300-700 de cualquier CRAd en normoxia para eliminar al 50% de las células (IC50) (Tabla 2), mientras que en las células en esferoides una MOI de 1000 ninguno de los CRAds, a excepción de Ad-HREF512, bajo condiciones de normoxia logra alcanzar una eliminación del 50% de las células (Figura 34-B).

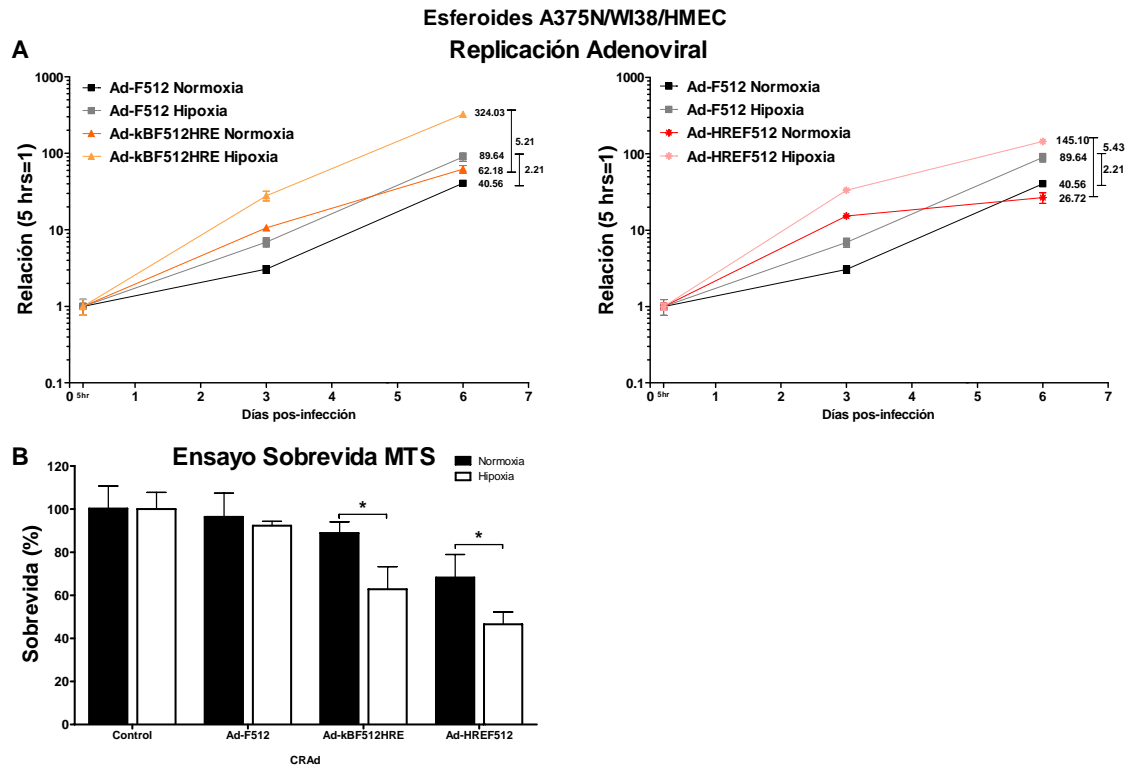


Figura 34. Ensayo de replicación viral y sobrevida celular sobre esferoides multicelulares. **A)** Los esferoides multicelulares conteniendo células de melanoma (A375N), WI-38 (fibroblastos embrionales) y HMEC (micro-endoteliales transformadas) fueron infectados por 5 horas con los diferentes CRAds (F512, 2kB-F512-HRE y HREF512) a una MOI de 1000. Los ADN genómicos fueron extraídos de los diferentes tratamientos a las 5, 72 y 144 horas y la cantidad de copias de ADN genómico adenoviral fueron cuantificadas mediante real-time PCR. **B)** Ensayo de sobrevida mediante técnica de MTS. Los esferoides multicelulares fueron infectados con los diferentes CRAds y a las 144 horas se evaluó la sobrevida mediante MTS.

Estos resultados indicarían que tanto las células malignas como las que componen el estroma tumoral bajo condiciones de hipoxia podrían producir mayor cantidad de copias virales si fueran infectadas por un adenovirus cuya replicación estuviera regulada por los promotores quimera conteniendo sitios HRE. Lo que implicaría una ventaja en tejidos hipóxicos donde se ha descrito que los adenovirus salvajes no pueden replicarse de forma eficiente [308].

3.3.3 Ensayos *in vivo*

Finalmente, analizamos la actividad antitumoral de los CRAds en tumores xenogénicos inducidos en ratones desnudos. En una primera etapa se evaluó el efecto de los CRAds sobre el modelo de melanoma co-inyectado con fibroblastos embrionarios (SB2/WI-38) usando 5 inyecciones como describimos en el Capítulo 2. Tal cual habíamos visto anteriormente, las 5 inyecciones del Ad-F512 solo eliminan el tumor en 2/4 y 1/4 ratones y disminuye el crecimiento en 2/4 y 1/4 en los 2 ensayos *in vivo* realizados. Por el contrario, la administración de Ad-kBF512HRE indujo la eliminación de todos los tumores en ambos ensayos (Figura 35-A y B). Vale destacar que el tratamiento con Ad-kBF512HRE (en ambos ensayos) y Ad-F512 (en un ensayo) producen un aumento significativo en la supervivencia de los ratones (Figura 35-A y B derecha). También se evaluó el efecto de 3 dosis de Ad-kBF512HRE y observamos que 3/4 ratones eliminaron el tumor y solo en 1/4 el tumor creció a una velocidad similar al tratamiento control (datos no mostrados). Estos datos indican que 5 dosis de Ad-kBF512HRE aseguran la eliminación de todos los tumores SB2/WI-38, mientras que 3 dosis eliminan al 75% de los tumores.

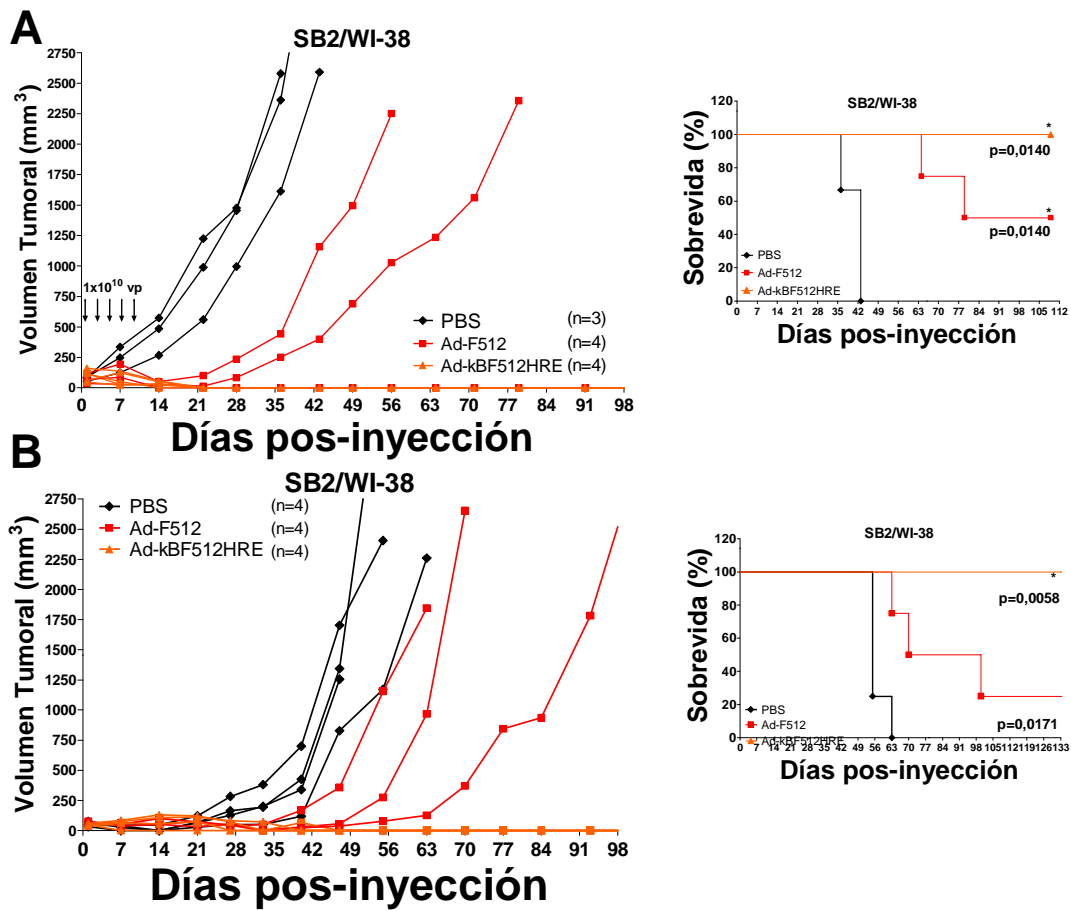


Figura 35. Efecto de Ad-F512 y Ad-kBF512HRE sobre tumores de melanoma conteniendo células estromales. A y B) Curvas de crecimiento de animales con tumores SB2/WI-38 tratados con 5 dosis de vehículo (PBS), Ad-F512 o Ad-kBF512HRE. En el panel derecho se muestra la curva de sobrevivencia Kaplan-Meier.

A partir de estos resultados y los datos obtenidos con un modelo de melanoma resistente al tratamiento con Ad-F512 (A375N) (Figura 23-A), se decidió encarar estudios sobre este modelo con 3 y 5 dosis del virus Ad-kBF512HRE para evaluar su efecto sobre el crecimiento tumoral. En ambas condiciones Ad-kBF512HRE resultó inefectivo en la disminución del crecimiento tumoral (Figura 36-A y B).

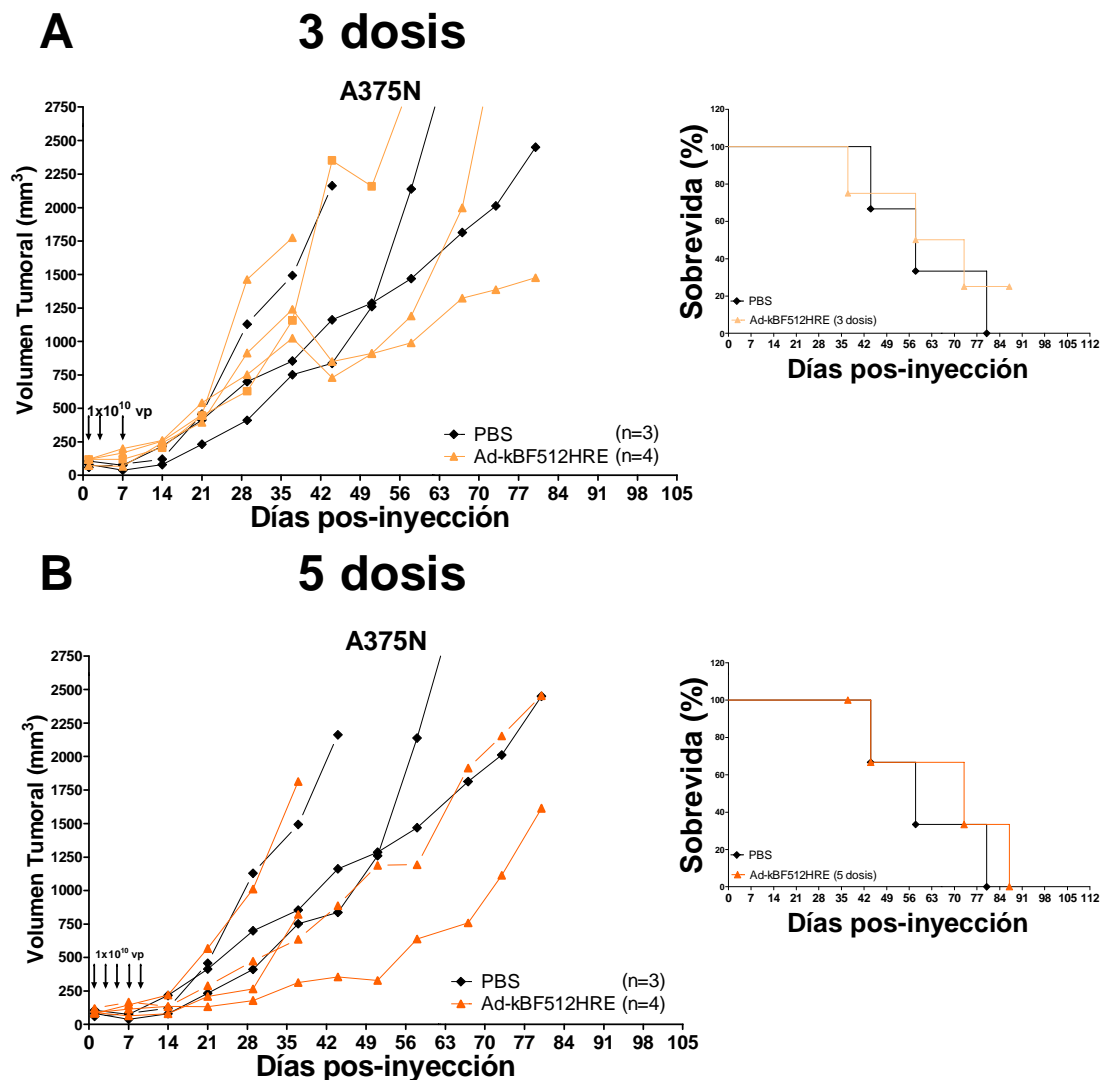


Figura 36. Efecto de la dosis de Ad-kBF512HRE sobre tumores de melanoma A375N. Curva de crecimiento de animales con tumores A375N tratados con 3 (A) o 5 (B) dosis de vehículo (PBS), Ad-F512 o Ad-kBF512HRE. En el panel derecho se muestra la curva de sobrevivida Kaplan-Meier.

A partir de estos resultados y los obtenidos en forma previa en nuestro laboratorio en los que habíamos observado que el medio condicionado de fibroblastos disminuye la sobrevivida de células A375N infectadas con el Ad-F512 [301], decidimos evaluar si los tumores mixtos A375N/WI-38 podrían ser eliminados por Ad-kBF512HRE. Ratones con tumores A375N y A375N/WI-38 fueron tratados con Ad-kBF512HRE (Figura 37). En el caso de los tumores A375N/WI-38 observamos que en 1/5 ratones desaparece el tumor y en 1/5 disminuye la velocidad de crecimiento hasta un tamaño estable,

mientras que en 3/5 crecen igual que el tratamiento control o aún más rápido (Figura 37-B). Aunque bajo tratamiento con Ad-kBF512HRE se observa una reducción en la velocidad de crecimiento tumoral de los tumores A375N/WI38 con respecto a tumores A375N, este efecto no se ve traducido en un aumento significativo de la supervivencia de los ratones tratados (Figura 37-B panel derecho)

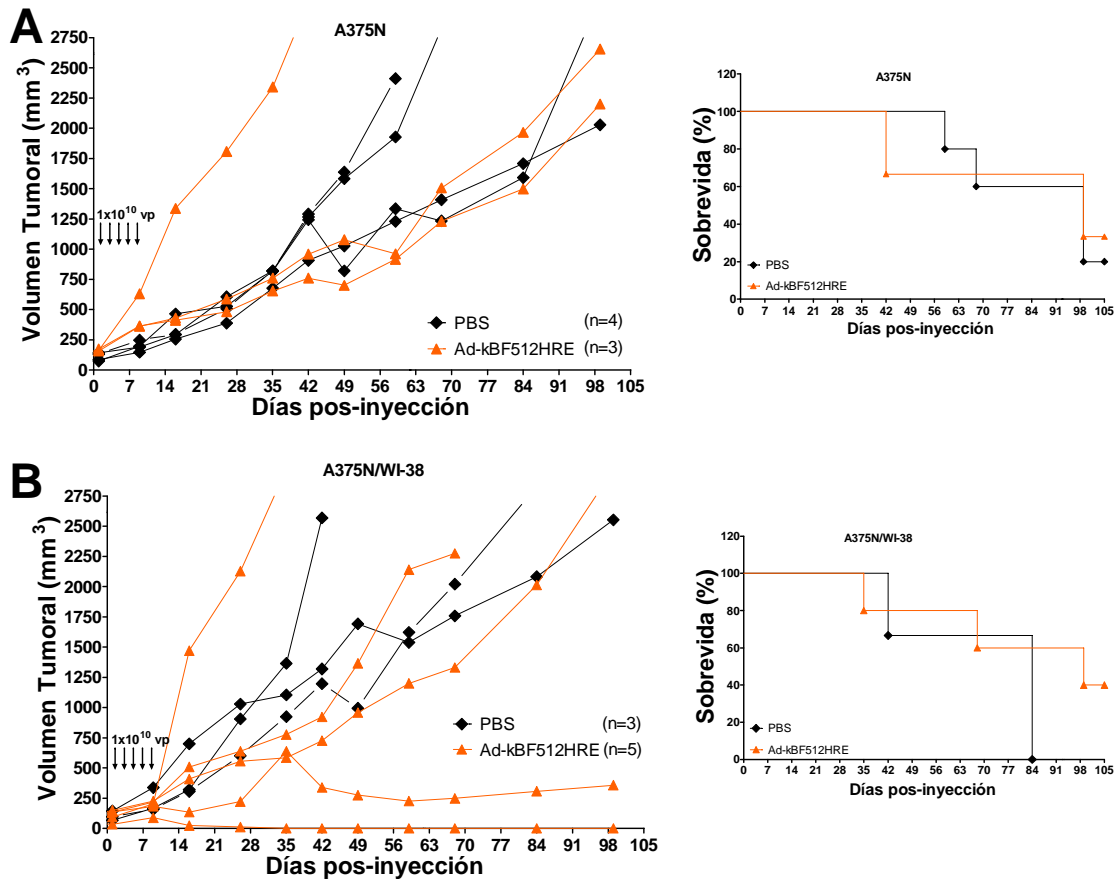


Figura 37. Efecto de Ad-kBF512HRE sobre tumores de A375N y tumores mixtos A375N/ WI-38. A) Curva de crecimiento de animales con tumores A375N tratados con 5 dosis de vehículo (PBS) o Ad-kBF512HRE. En el panel derecho se muestra la curva de supervivencia Kaplan-Meier. **B)** Curva de crecimiento de animales con tumores A375N/ WI-38 tratados con 5 dosis de vehículo (PBS) o Ad-kBF512HRE. En el panel derecho se muestra la curva de supervivencia Kaplan-Meier.

La resistencia casi total de células A375N al tratamiento con el CRAd podría ser explicado por la baja infectividad de las células A375N (Figura 19-A) y por ende, los bajos niveles de replicación adenoviral (Figura 32-B) con el adenovirus de serotipo 5 utilizado para estos ensayos. Es por ello que se decidió encarar el cambio de fibra de 5

a 5/3 debido a su mayor infectividad sobre las células de melanoma (ver más adelante).

3.4 REDIRECCIONAMIENTO DE LOS ADENOVIRUS DE REPLICACIÓN CONDICIONAL

La tasa de replicación de un CRAd depende inicialmente de la posibilidad de infectar la célula blanco. Si un CRAd tiene bajos niveles de infectividad, su capacidad lítica se verá reducida y como consecuencia, su tasa de replicación. Una de las estrategias disponibles para superar estas dificultades consiste en el cambio de la proteína involucrada en el pegado a la superficie celular. El adenovirus humano de serotipo 5 utiliza su proteína fibra para unirse al receptor celular denominado Receptor de Adenovirus y Coxsackie (CAR).

Información previa había demostrado que las células de melanoma poseen baja expresión de CAR [276]. En base a esto, decidimos proceder al intercambio de la fibra 5 por la de otros serotipos de modo tal de que ahora los CRAds pudieran infectar a través de otro receptor con mayor expresión en la superficie celular. Decidimos encarar el análisis de los niveles de expresión de los receptores involucrados en la entrada tanto de los adenovirus de serotipo 5 (CAR), como en la de los adenovirus del sub-grupo B, entre ellos el serotipo 3, 7, 11 y 35 (CD46). Pudimos observar que los niveles de expresión del receptor CAR son mayores en células de melanoma SB2, mientras que A375N expresan niveles intermedios, y células IIB-Mel-Les posee niveles de expresión muy bajos o nulos (Figura 38). Estos datos correlacionan con la tasa de infectividad con el Ad- β -Gal (Figura 19) y con la mayor tasa de replicación del adenovirus de serotipo 5 en la línea SB2 (Figura 32-C).

Con respecto a CD46, se observó expresión en las 3 líneas de melanoma testeadas. Los niveles de expresión de CD46 en células A375N e IIB-Mel-Les son mayores a los de CAR, indicando que el uso de un CRAd conteniendo la fibra quimera 5/3 podría causar un mayor efecto citopático sobre estas células.

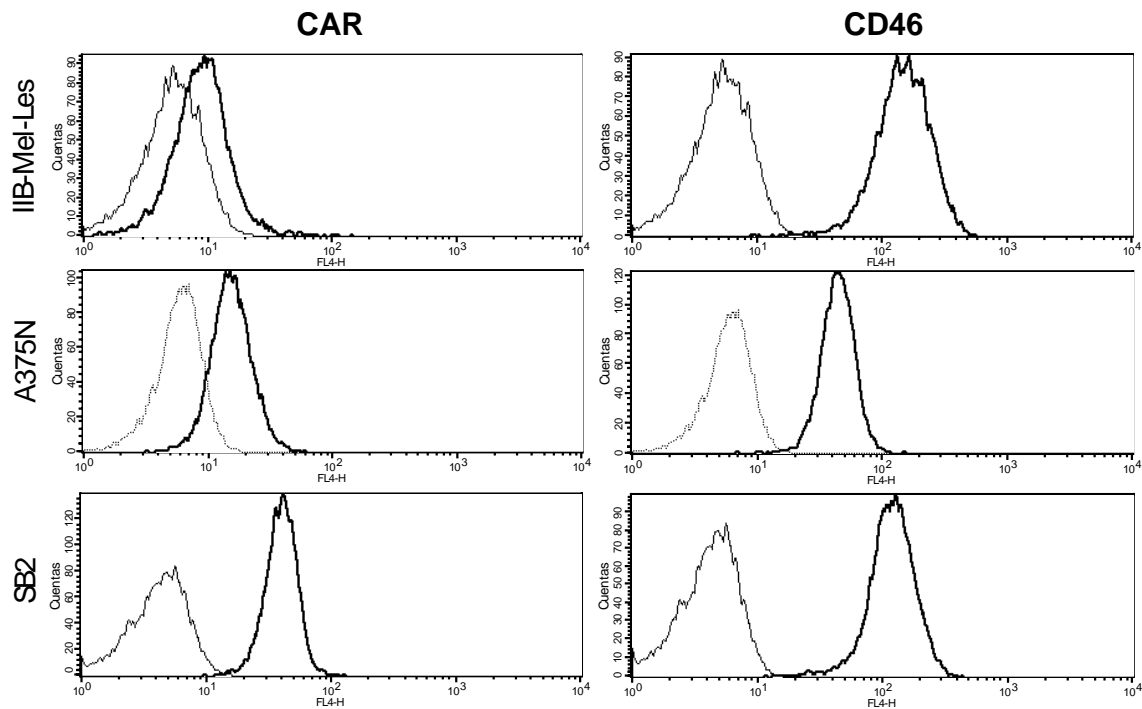


Figura 38. Niveles de expresión de los receptores CAR y CD46 en las líneas celulares de melanoma. Los receptores CAR y CD46 fueron evaluados en las líneas celulares de melanoma Mel-Les, A375N y SB2 mediante citometría de flujo. En línea punteada se muestra la distribución de frecuencia de los niveles de fluorescencia de células marcadas con anticuerpo control y en línea entera las células marcadas con anticuerpo CAR (izquierda) o CD46 (derecha).

A partir de estos resultados decidimos construir el CRAd Ad-5/3-kBF512HRE conteniendo la fibra quimera 5/3 para lograr mayores niveles de infectividad en células resistentes.

3.4.1 Ensayos *in vitro*

Se evaluó el efecto lítico *in vitro* de Ad-5/3-kBF512HRE sobre líneas celulares de melanoma que poseen bajos niveles de infección con el adenovirus serotipo 5 y observamos una mayor lisis de las células mediada por el efecto del cambio de fibra (Figura 39). En células IIB-Mel-Les, Ad-kBF512HRE, de serotipo 5, no tuvo efecto lítico aún a MOI de 1000 mientras que a la misma MOI Ad-5/3-kBF512HRE elimina alrededor de 90% de las células (Figura 39-A). En células A375N se observa un aumento del efecto lítico ya a una MOI de 10, mediada por el cambio de fibra (Figura 39-B).

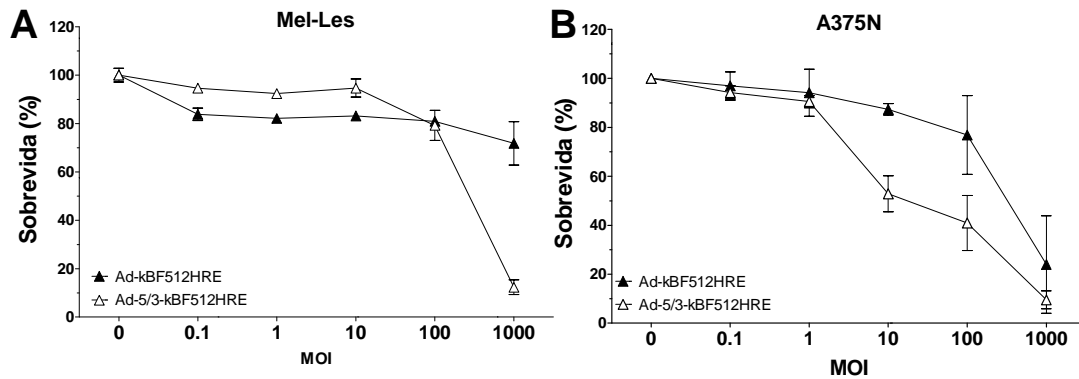


Figura 39. Efecto de Ad-kBF512HRE y Ad-5/3-kBF512HRE sobre la sobrevivencia celular. Las líneas celulares de melanoma **A)** Mel-Les y **B)** A375N fueron infectadas con dosis crecientes de los virus con fibra serotipo 5 (Ad-kBF512HRE y Ad-wt) o fibra quimera 5/3 (Ad-5/3-kBF512HRE y Ad5/3-wt) y se evaluó la sobrevivencia celular a los 6 días mediante ensayos de MTS.

Estos datos sugieren que la utilización de Ad-5/3-kBF512HRE en ensayos *in vivo* podría favorecer un efecto anti-tumoral sobre los tumores de melanoma resistentes al efecto lítico inducido por el cambio de fibra.

3.4.2 Ensayos *in vivo*

A partir de la observación de un aumento del efecto lítico mediado por el cambio de fibra decidimos evaluar si este efecto se traduciría en una disminución del tamaño tumoral mediada por el tratamiento con este nuevo CRAd. Se realizaron ensayos *in vivo* sobre modelos de tumores xenogénicos en ratones desnudos de A375N y Mel-Les. El CRAd con fibra 5, Ad-kBF512HRE, no demostró efecto sobre tumores Mel-Les ni sobre el crecimiento tumoral (Figura 40-A) ni la sobrevivencia de los ratones (Figura 40-C). Por el contrario, el CRAd con fibra quimera 5/3, Ad-5/3-kBF512HRE indujo la desaparición de 2/4 tumores, y la disminución en el ritmo de crecimiento de 1 tumor adicional (Figura 40-B). Al mismo tiempo, el tratamiento con Ad-5/3-kBF512HRE demostró un aumento significativo en la sobrevivencia de los ratones (Figura 40-C).

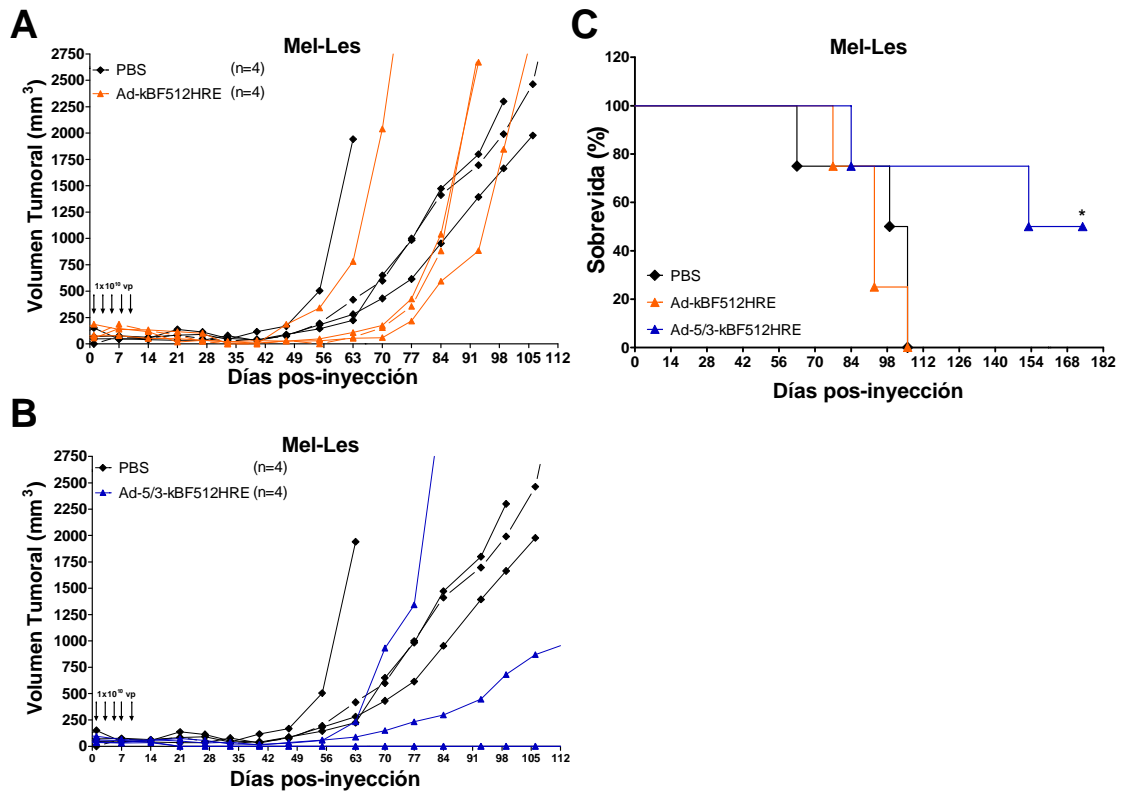


Figura 40. Efecto de Ad-kBF512HRE y Ad-5/3-kBF512HRE sobre tumores de melanoma Mel-Les. Curvas de crecimiento de animales con tumores Mel-Les tratados con 5 dosis de vehículo (PBS) (A y B), Ad-kBF512HRE (A) o Ad-5/3-kBF512HRE (B). C) Curva de sobrevida Kaplan-Meier de los ratones tratados con PBS, Ad-kBF512HRE o Ad-5/3-kBF512HRE.

A partir de estos resultados, se utilizó el mismo diseño experimental para tratar ratones portadores de tumores A375N resistentes al tratamiento con Ad-F512 (Figura 23-A) y Ad-kBF512HRE (Figura 36-A y B, respectivamente). Para nuestra sorpresa y a diferencia de lo observado con MEL-Les, el tratamiento con Ad-5/3-kBF512HRE no modificó el crecimiento tumoral (Figura 41-B) ni aumentó la sobrevida de los ratones (Figura 41-C).

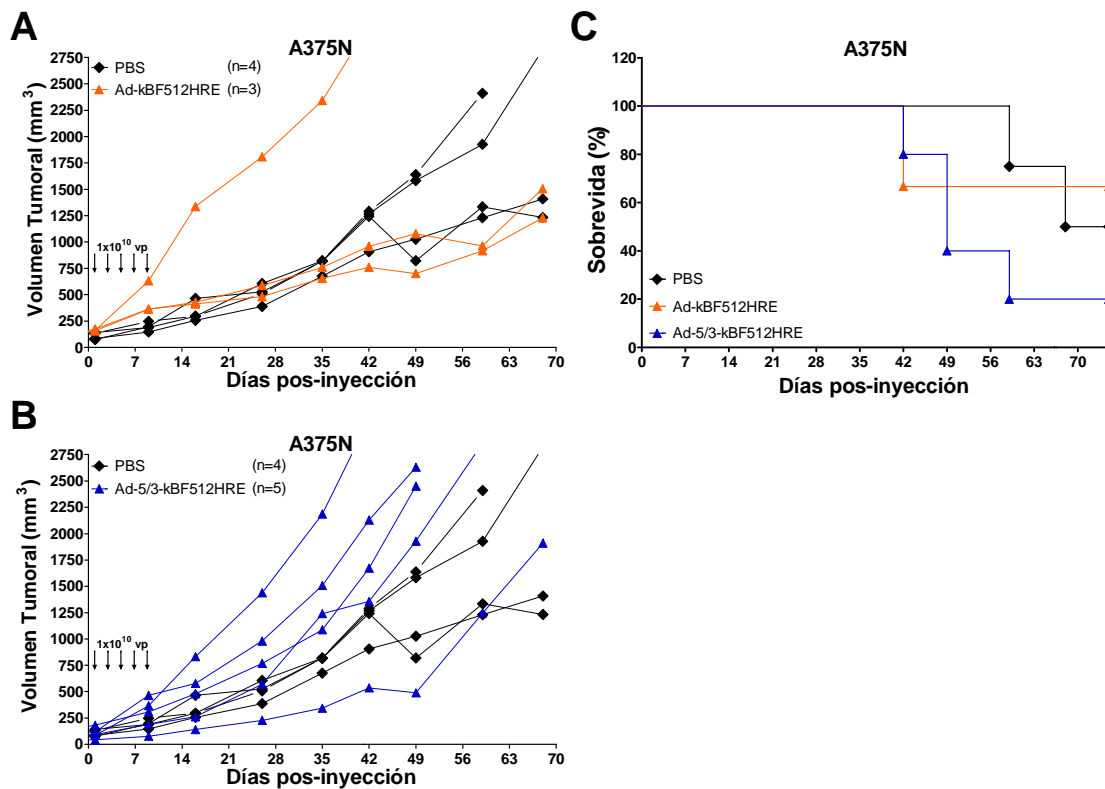


Figura 41. Efecto de Ad-kBF512HRE y Ad-5/3-kBF512HRE sobre tumores de melanoma A375N. Curvas de crecimiento de animales con tumores A375N tratados con 5 dosis de vehículo (PBS) (A y B), Ad-kBF512HRE (A) o Ad-5/3-kBF512HRE (B). C) Curva de supervivencia Kaplan-Meier de los ratones tratados con PBS, Ad-kBF512HRE o Ad-5/3-kBF512HRE.

3.5 ENSAYO DEL EFECTO DE LOS ADENOVIRUS DE REPLICACIÓN CONDICIONAL SOBRE TEJIDOS NORMALES.

La siguiente etapa consistió en evaluar el efecto de estos virus sobre células normales. Debido a que en los tejidos murinos los adenovirus humanos se replican a una muy baja tasa [300], se propuso al hámster sirio como modelo debido a que los adenovirus humanos pueden replicarse en sus tejidos [309]. Por lo tanto realizamos estudios de replicación viral extrayendo los órganos de estos animales para realizar ensayos *in vitro* (Figura 42-A) evaluando la actividad de los promotores (Figura 42-B) y la replicación de los CRAds (Figura 42-C, D y E). Cuando evaluamos la actividad transcripcional de los adenovirus reporteros sobre los tejidos del hámster, observamos que Ad-kBF512HRE-Luc tiene 30 y 58 veces más actividad que Ad-F512-Luc en pulmón y bazo, respectivamente (Figura 42-B). Es interesante que este aumento en la actividad transcripcional del promotor kBF512HRE no se traduce en un aumento de la

replicación viral en bazo, pulmón o hígado (Figura 42-C, D y E, respectivamente). Por el contrario, es de destacar que en todos los órganos analizados se observa entre 2 y 18 veces más replicación del Ad-wt que con cualquiera de los CRAds analizados y en el tejido pulmonar los CRAds, a excepción de Ad-F512, tienen menor cantidad de copias que a las 5 horas, indicando que no hubo replicación.

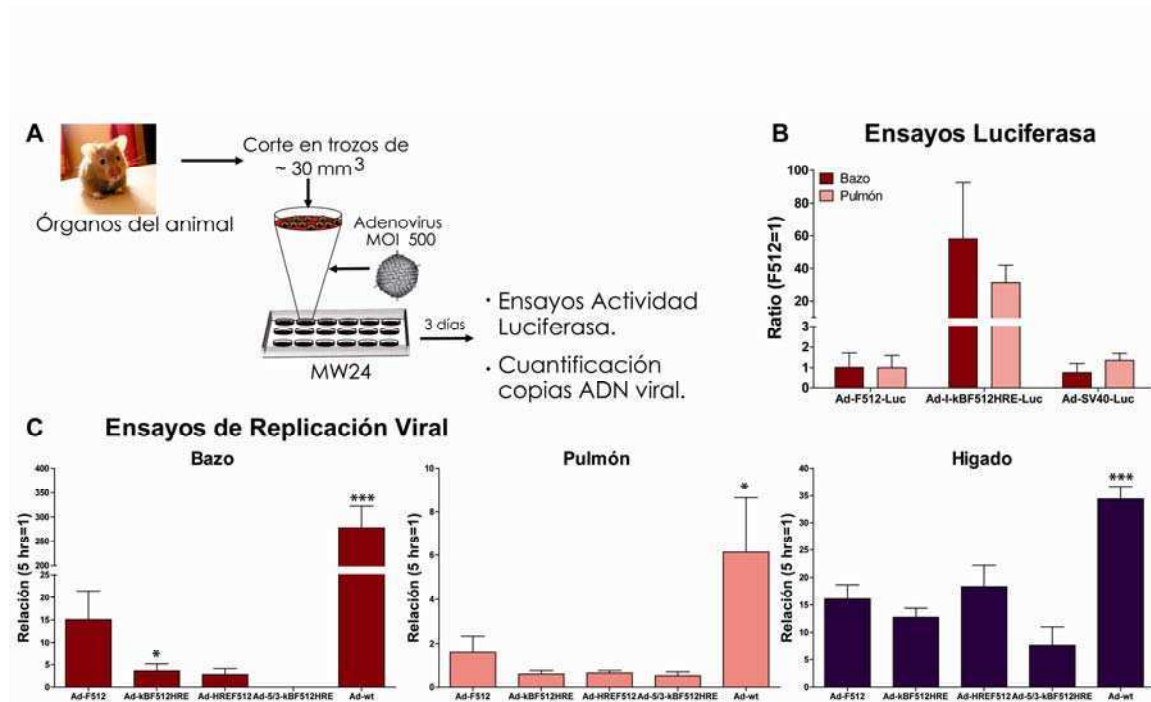


Figura 42. Ensayo *in vitro* actividad transcripcional y replicación sobre tejidos normales. A) Esquema representativo del protocolo realizado sobre los tejidos de hámster analizados. B) Ensayos de actividad de luciferasa sobre los cortes de bazo y pulmón infectados con los adenovirus reporteros Ad-F512-Luc, Ad-kBF512HRE-Luc y Ad-Sv40-Luc. C) Cuantificación de copias de genoma adenoviral de los cortes de tejido infectados con el CRAd indicado mediante PCR en tiempo real en bazo, pulmón e hígado. Las columnas representan la media de 3 ensayos independientes y las barras el DE. * <0,05 **<0,01, ***<0,001 representan las diferencias significativas con respecto a Ad-F512.

Estos datos indican que el uso de estos CRAd no tendría una tasa de replicación muy elevada sobre tejidos normales y que el agregado de elementos de respuesta a hipoxia y NFκB no aumenta la tasa de replicación del CRAd en este tejido normal (Figura 42-C, comparar Ad-F512 con Ad-kBF512HRE y Ad-5/3-kBF512HRE).

DISCUSIÓN

El cáncer es la segunda causa de muerte en Argentina y en Estados Unidos de América [1, 28], en este último país es la enfermedad que causa la mayor pérdida de años de vida en sus habitantes [310]. El melanoma es la enfermedad cuya incidencia más ha aumentado más en el período 1976-2006, con una tasa mayor al 2% anual [311]. Considerando el tratamiento del melanoma, la cirugía tiene buenos resultados en estadios tempranos, la radioterapia solo produce efectos paliativos y al igual que la quimioterapia, no aumenta la sobrevida de los pacientes en estadios avanzados [312]. En los últimos años existieron progresos en el tratamiento mediante inmunoterapia con Interferón- α e IL-2 pero en los estadios avanzados de la enfermedad los tratamientos resultan mayormente paliativos (revisado en [313]). En el caso del melanoma metastásico, donde la sobrevida no supera los 7-9 meses, los tratamientos con IL-2 producen una respuesta completa solo en el 6% de los pacientes con una alta toxicidad asociada al tratamiento [314]. Un reporte más reciente describió una respuesta clínica completa en el 70% de las metástasis inyectadas intra-tumoralmente con IL-2 en 48 pacientes [Weide, 2010 #924]. Si bien algunos tratamientos resultan muy prometedores la recomendación clínica para los pacientes de melanoma metastásico continua siendo la entrada en ensayos clínicos debido a la baja efectividad de los tratamientos disponibles [313].

La terapia génica apareció como una de los posibles tratamientos que podrían ayudar en la cura del cáncer (revisado en [315]). En una primera etapa, las estrategias de tratamiento implicaban el uso de los virus como vectores de genes terapéuticos o de replicación condicional específicamente en la célula tumoral (revisado en [316]). Sin embargo, en los últimos años se volvió a tener en cuenta el efecto del estroma sobre el crecimiento tumoral y es por ello que debía ser considerado al momento de diseñar una estrategia de tratamiento (revisado en [317]). En esta tesis se utilizó una estrategia que tiene en cuenta al estroma como un factor importante en el mantenimiento del tejido tumoral y se buscó dirigir la replicación adenoviral mediante un promotor que tenga actividad tanto en la célula tumoral como las células componentes del estroma tumoral.

Para lograr este objetivo, en una primera etapa se clonaron y caracterizaron diferentes delecciones del promotor de SPARC humano y bovino.

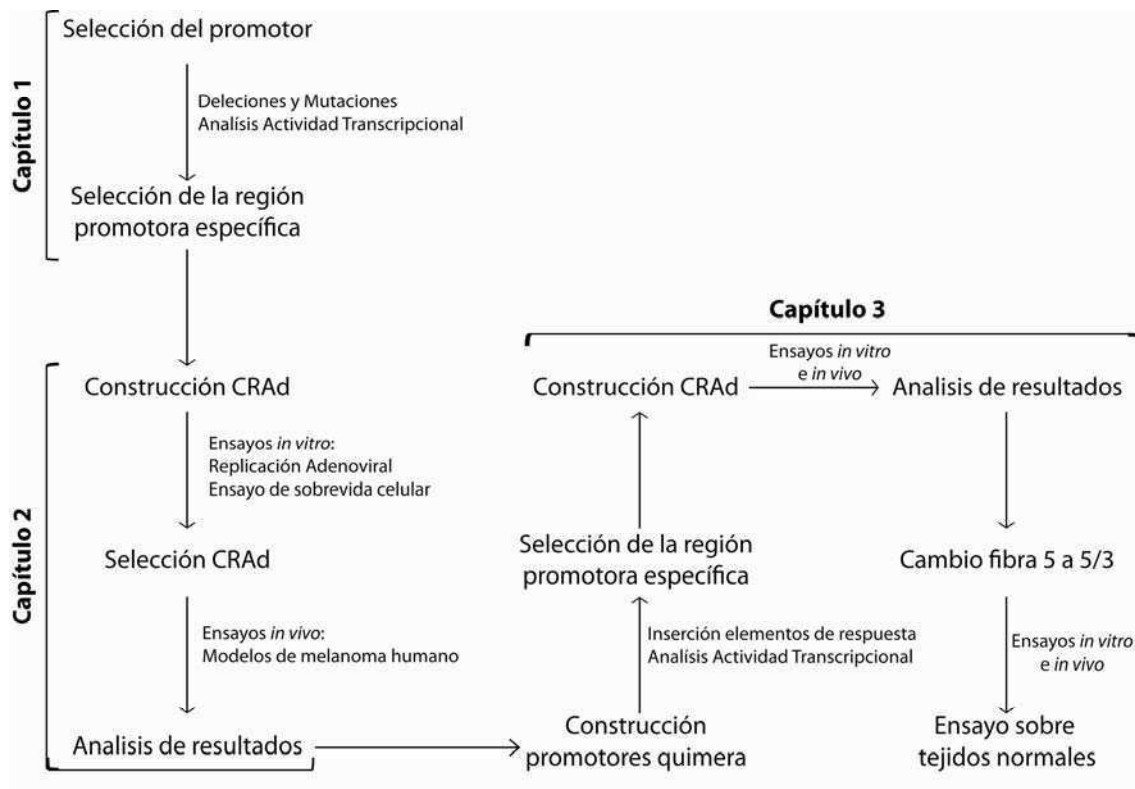


Figura 43. Pasos necesarios para el desarrollo de un CRAd con actividad anti-tumoral en diferentes modelos de melanoma conteniendo estroma.

A fin de evaluar la especificidad de estas construcciones, se realizaron ensayos de actividad transcripcional utilizando líneas celulares tumorales que expresan SPARC (A375N) y líneas celulares tumorales que no lo expresan (T-47D y HeLa). Se seleccionó a partir de estos ensayos un promotor de SPARC (F512) con mayor actividad transcripcional en las células tumorales que expresan SPARC y mucha menor actividad en las líneas que no expresan SPARC.

Al inicio de este trabajo existían descripciones de regulación transcripcional de SPARC mediante resultados indirectos en los que observaban una disminución o aumento de SPARC mediado por el agregado de factores de crecimiento pero no se describía ningún factor transcripcional en el proceso [137, 183, 185, 186, 188-191, 318]. La información del promotor humano de SPARC procedía de dos trabajos realizados sobre células de carcinoma de pulmón [158] y células de cáncer de mama [167]. El resto de la bibliografía existente involucraba estudios con el promotor murino y de gallina de SPARC [160, 162, 164, 166, 184, 319]. Aunque en esta tesis no se abordó la regulación por factores transcripcionales nuestra contribución al campo es la descripción del promotor mínimo de SPARC y de diferentes secuencias que están involucradas en el inicio de la transcripción del promotor humano de SPARC.

El análisis de la estructura del promotor de SPARC nos permitió identificar la secuencia mínima (-88/+28) que puede inducir actividad transcripcional. Este elemento contiene probables sitios de unión para los factores transcripcionales SP1, Runx2, Ets2 y TBP. El sitio SP1 ya ha sido descrito como involucrado en la regulación de la transcripción del promotor de SPARC [167] y durante el desarrollo de esta tesis se describió a los factores RunX2 y al factor Ets2 como reguladores negativos de los niveles de ARNm SPARC en cáncer pancreático y en macrófagos asociados a tumor, respectivamente [320, 321]. A partir del análisis mediante mutaciones y deleciones pudimos identificar secuencias involucradas en el inicio de la transcripción que no han sido descritas hasta la fecha, como una caja TATA no consensuada, 1 INR y una región DPE. Cabe destacar que la secuencia de estos elementos cuando fue mutada tanto a una secuencia nula o consensuada disminuían la actividad del promotor, indicando que las bases diferentes a la secuencias consenso descritas a la fecha (revisado en [296]) no favorecen la actividad del promotor sino que la disminuyen, indicando que la actividad del promotor depende de los elementos de forma secuencia específica.

En un trabajo donde se realizó un análisis sobre la presencia de motivos involucrados en el inicio de la transcripción sobre las base de datos de promotores eucariotas con sitios de inicio de la transcripción probados experimentalmente, 10,4% de los promotores poseen secuencia TATA y 24,7% poseen el elemento DPE. El dato interesante de este reporte es que 2,43% de los promotores contienen ambos elementos, TATA-box y DPE [322]. Indicando que la estructura del promotor de SPARC, conteniendo una secuencia TATA-like y DPE no sería tan inusual en la estructura de los promotores. A la fecha no se ha descrito ningún promotor humano conteniendo ambos elementos pero si en *D. melanogaster* donde el promotor del gen *ftz* contiene ambos elementos, al igual que en el promotor de SPARC, solapados [323].

Nuestros resultados indican que SPARC posee un sistema complejo de regulación de la transcripción debido a que posee una estructura de promotor similar a una caja TATA que posee el motivo TATA-like y otro promotor del tipo DPE solapados en la misma secuencia del promotor humano de SPARC.

Al analizar el promotor bovino de SPARC pudimos observar que la regulación transcripcional es similar a la del humano, aunque la región comprendida entre las bases -120/+74 del promotor bovino posee mayor nivel de regulación de la actividad

transcripcional que el promotor humano. Sin embargo, no se seleccionó este promotor debido a que la actividad transcripcional en las líneas que no expresan SPARC era mayor que en el promotor F512.

Cabe destacar que la especificidad en la expresión de una proteína puede ser regulada a diferentes niveles: transcripción (factores de transcripción), estabilidad del ARNm (miRNA), traducción (miRNA) y estabilidad de la proteína. En este trabajo se evaluó la especificidad con relación al primero de estos procesos ya que, como se mencionó previamente, se buscó caracterizar un promotor que dirija la expresión de un gen específicamente en el entorno tumoral.. En nuestro sistema también puede ocurrir regulación a nivel de la estabilidad del ARNm, ya que nuestra construcción del promotor humano de SPARC involucra hasta las primeras 71 y 74 pares de bases del transcripto primario humano y bovino, respectivamente.

Otra posibilidad de regulación de la expresión de una proteína puede ser a través del bloqueo de la expresión de ARNm mediante la metilación de las regiones promotoras de un gen (revisado en [324]). En diferentes trabajos se ha descrito la metilación del promotor de SPARC en cáncer de páncreas [180, 325], pulmón [326], carcinoma de cuello uterino (incluyendo la línea celular HeLa utilizada en este trabajo) [327], de colon [328] y de ovario [329]. De forma interesante, en neuroblastoma, que posee un origen embriológico similar a los melanocitos, la metilación del promotor de SPARC no se encuentra involucrado en la disminución de la transcripción [330]. En el caso del melanoma no existe ningún estudio sobre la metilación del promotor de SPARC, pero podemos hipotetizar que no se encuentra metilado ya que las células expresan altos niveles de SPARC. En el trabajo realizado en nuestro laboratorio en la línea de páncreas MiaPaCa-2, que no expresa ARNm de SPARC, se observó lisis mediada por el Ad-F512. Este efecto probablemente se deba a que el promotor endógeno de SPARC se encuentra metilado. Ya ha sido descrito que SPARC endógeno provoca una disminución en el crecimiento y migración de células de cáncer pancreático [331]. De esta manera podemos hipotetizar que la línea celular expresa los factores transcripcionales que inducen la transcripción de SPARC pero no se induce la transcripción debido a la metilación de su promotor y, de esta forma, permitirían la replicación del adenovirus bajo estas condiciones.

Otro de las posibles regulaciones post-transcripcionales de un ARNm es mediante el bloqueo de la traducción de un ARNm o su degradación mediada por micro ARNs (miARN) (revisado en [332]). En recientes trabajos se describió la participación del miARN miR-29c en la regulación de la estabilidad del ARNm de SPARC en cáncer nasofaríngeo [333]. La disminución de miR-29a, miR-29b y miR-29c ha sido descrito en neuroblastoma, sarcomas y tumores cerebrales [334]. También se observó en pacientes de melanoma una reducción en la expresión de miR-29c con el progreso de la enfermedad [335]. En el tejido óseo existen altos niveles de expresión de SPARC y se correlacionó a un aumento de miR-29a y miR29c con una disminución de la proteína SPARC pero no del ARNm. Este efecto era mediado por los sitios de miR-29a y miR29c presentes en el 3'UTR del ARNm de SPARC e indican un bloqueo de la traducción del ARNm [336]. También se observó expresión de este miARN en diferentes tejidos normales de ratón [337], lo que indicaría que este elemento estaría involucrado en la ausencia de expresión de SPARC en tejidos normales. Apoyando esta probable regulación, se observó aumento en la expresión de SPARC [338] en un modelo de infarto de miocardio, y en otro trabajo se reportó una disminución de la expresión de miR-29c bajo este modelo [337]. Estos datos indicarían que tanto la metilación del promotor de SPARC como la regulación por miRNA juegan un papel importante en la regulación de la expresión de la proteína SPARC y podrían explicar los niveles mínimos de actividad transcripcional que observamos en nuestro promotor en células que no expresan SPARC, debido a que no existe metilación en los promotores ni nuestras construcciones contienen la región 3'UTR del ARNm de SPARC conteniendo los sitios de miR-29.

A partir de la selección del promotor F512 se construyó un CRAd, Ad-F512, que tiene efecto lítico en células de melanoma que expresan SPARC. Si bien se observó actividad transcripcional en las líneas tumorales que no expresan SPARC, como en T-47D, los niveles de actividad no alcanzan para lograr efecto lítico o replicación del Ad-F512.

En las células normales como melanocitos y los fibroblastos adultos no se observa efecto lítico de Ad-F512 aunque el Ad5-wt muestra efecto lítico. Mientras que en los fibroblastos embrionarios WI-38 y en las células micro-endoteliales transformadas HMEC-1, que tienen un fenotipo similar a las células estromales del tumor, se observa un efecto del Ad-F512.

En los ensayos *in vivo* este CRAd logra eliminar los tumores de melanoma SB2 en el 50% de los ratones, mientras que los tumores compuestos por células A375N y Mel-J-N no se observa efecto del tratamiento. Estos resultados pueden explicarse debido a la baja infectividad de estas células y a la baja tasa de replicación del virus Ad-F512.

A diferencia de la eliminación y el retraso del crecimiento tumoral observado sobre los tumores SB2, en los tumores SB2/WI-38 y SB2/HMEC solo se observa un aumento en la supervivencia de los animales, sin eliminar ninguno de los tumores. Pudimos comprobar que esta falta de efecto podría deberse a una disminución de la actividad transcripcional, debido a que el cultivo de las células SB2 con medio condicionado por las células WI-38 causa una disminución al 85% de la actividad con respecto a la actividad bajo el cultivo sobre su medio condicionado [301].

Es importante resaltar que la mayoría de los trabajos realizados con CRAds solo muestran una reducción del tamaño tumoral a través del tiempo y no la eliminación del tumor como vemos con Ad-F512 sobre el tumor SB2 [339-344]. En los casos donde se menciona eliminación del tumor, el CRAd ha sido cubierto con PEG [345] o expresa algún gen inmuno-activador [346, 347].

A partir de la observación de que el entorno conteniendo fibroblastos o endotelio estaba causando un efecto negativo sobre la replicación del adenovirus en nuestro modelo de melanoma [301], decidimos aumentar la actividad transcripcional de estos promotores mediante el agregado de elementos de respuesta a NF κ B y HRE. Si bien existen muchos trabajos combinando elementos de respuesta a diferentes condiciones que caracterizan al tejido blanco [196, 204, 208, 348-351], nunca se clonaron los elementos dentro de la secuencia de un promotor. En este trabajo se seleccionaron elementos de respuesta a hipoxia, al factor transcripcional NF κ B y a ROS debido a que existían reportes indicando que el melanoma era en donde existía alta actividad del factor NF κ B (REF) y presencia de ROS [268]. Pudimos observar que el clonado de los elementos HRE dentro del promotor de SPARC no generan ninguna variación en la actividad transcripcional de este promotor bajo condiciones de normoxia y aumentan 6-7 veces su actividad bajo condiciones de hipoxia. En un trabajo anterior se clonaron 2 elementos HRE y 2 elementos kB aguas arriba del promotor KDR para aumentar la actividad en células endoteliales, en este trabajo observan 2,6 veces mayor actividad bajo condiciones de hipoxia más TNF- α a las 16 horas [208]. En nuestro caso, en los

ensayos a 72 horas observamos un aumento de alrededor de 20 veces en la actividad transcripcional del promotor kBF512HRE en el contexto adenoviral.

La adición de los elementos HRE y kB sobre el promotor kBF512HRE favorece el efecto lítico de Ad-kBF512HRE bajo condiciones de TNF- α , hipoxia y TNF- α más hipoxia en las células SB2 donde se observa la mayor replicación del virus. De la misma forma, este aumento del efecto lítico se correlaciona con un aumento de la replicación viral. Este aumento de la actividad lítica provocó además la eliminación de 4/4 y 3/3 tumores SB2/WI-38 en ensayos *in vivo*.

Aunque se observó un aumento de la actividad transcripcional del promotor quimera, este aumento no siempre se correlaciona con una mayor replicación adenoviral, como en el caso de A375N en la que se observa un aumento de la actividad transcripcional de 40- y 12- veces con TNF α e hipoxia, mientras que la replicación viral bajo TNF α se mantiene y en hipoxia hay un aumento de la replicación pero no tan marcado. Esto se puede deber a que el TNF α induce un arresto en el ciclo celular en clones de las células A375 [352], de esta manera, impidiendo su ingreso a la fase S del ciclo celular e impidiendo la replicación del virus

Aunque el aumento de la actividad transcripcional derivó en la eliminación de los tumores SB2/WI-38 tratados con Ad-kBF512HRE, no se observó el mismo efecto sobre los tumores A375N o Mel J.

En la mayoría de los experimentos *in vivo* hasta aquí citados y en los subsiguientes se observa en alguno de los ratones tratados un crecimiento del tumor aun mayor que en el tratamiento control. A partir del análisis de los datos de los experimentos pudimos observar que, generalmente, los ratones con este crecimiento acelerado se relacionan con los tumores que tuvieron distribución del virus en el tejido extra-tumoral o perdieron líquido al momento de la inyección. Esta pérdida de líquido significa una menor cantidad de partículas virales dentro del tejido tumoral. Existen modelos de crecimiento tumoral infectados con virus que indican que si la tasa de eliminación del virus es elevada, el crecimiento del tumor puede ser aún más rápido que bajo condiciones normales [353]. Estos modelos podrían ayudar a explicar los datos observados en algunos tumores en los que se observa un mayor crecimiento que el tratamiento control e indicarían que uno de los riesgos de este tipo de terapia es una muy baja infección viral que puede llegar a inducir mayor crecimiento tumoral.

Estos datos de modelos matemáticos y los observados en nuestros experimentos *in vivo* indican que la replicación viral depende mucho de la cantidad de partículas virales que pueden infectar a la célula blanco. Por lo tanto, además de la regulación transcripcional, también es importante aumentar la transducción de las células, ya que la línea A375N se infecta diez veces menos que la línea celular SB2 con los adenovirus de serotipo 5. Se evaluaron los niveles de expresión de los receptores del adenovirus de serotipo 5 (CAR) y del sub-grupo B, que incluye a los adenovirus del serotipo 3 y 35 (CD46) y observamos que las células SB2 expresan altos niveles de CAR, mientras que la línea A375N y Mel-Les expresan muy bajos niveles del mismo. Estos datos se encuentran en relación a la respuesta observada en los modelos *in vitro* e *in vivo*. Los adenovirus de serotipo 5 son los más utilizados y los diferentes trabajos indican que las líneas tumorales de melanoma aisladas de metástasis y los metástasis tumorales extraídas de pacientes tienen generalmente niveles bajos de expresión de CAR [283]. Además de ello el receptor CAR disminuye su expresión bajo condiciones de hipoxia [307, 354], mientras que el receptor CD46 mantiene sus niveles bajo estas condiciones adversas [355].

Con respecto a CD46, receptor del adenovirus de serotipo 3, las líneas celulares A375N y Mel-Les expresan niveles intermedios de este receptor. A partir de estos resultados se decidió utilizar la fibra quimera 5/3 y se construyó el Ad-5/3-kBF512HRE que posee mayor efecto lítico *in vitro*. Cuando este virus se utilizó sobre los tumores Mel-Les el tratamiento elimina al 50% de los tumores y se produce un aumento de la supervivencia de los ratones. Este virus modificado muestra un mejor efecto lítico que el adenovirus de serotipo 5 que no demuestra ningún efecto sobre el crecimiento de los tumores. A diferencia de lo ocurrido en los tumores Mel-Les, Ad-5/3-kBF512HRE no refleja ningún efecto sobre el crecimiento de los tumores A375N ni los tumores A375N/WI-38. A partir de los análisis histológicos pudimos observar que la estructura del tumor formado por las células A375N es más compacta (evaluado por el número de células/área) y con mayor número de fibras de colágeno. Estos datos indican que la capacidad de infección viral, la tasa de replicación viral y la estructura del tejido tumoral influyen en la capacidad de producir efecto lítico sobre los tumores de melanoma, en el caso del modelo de A375N se debe aún modificar el virus o el modo de tratamiento para lograr un efecto. Existen trabajos indicando que el uso de proteínas capaces de modificar la matriz extracelular ayudan a la distribución y

consiguiente replicación del virus [356-358]. Otra de las opciones es el uso de células como vectores para el transporte de los CRAds al tejido tumoral [359, 360], y recientemente se ha publicado que este método disminuye la respuesta inmune contra el adenovirus y aumenta la dispersión y persistencia del virus [361].

Cabe destacar que en este año se realizaron dos ensayos clínicos en pacientes con CRAds conteniendo la fibra quimera 5/3 y en ninguno de los casos se observaron efectos adversos severos sobre los pacientes [362, 363]. Además, en uno de los casos se observó que 8/12 pacientes analizados tuvieron un beneficio clínico objetivo [362].

Dado que el ratón no es un buen modelo para estudiar replicación viral y se dificulta la obtención de tejidos humanos normales para evaluar el efecto de los CRAds, decidimos utilizar el hámster sirio, en donde se replica el adenovirus humano, como modelo [309]. El objetivo de esta etapa era evaluar la bioseguridad de los CRAds seleccionados en tejidos normales. En este ensayo observamos replicación del Ad5-wt y en mucha menor medida de los CRAd conteniendo el promotor F512 o kB512HRE, indicando que estos promotores serían seguros para una terapia en humanos. En un trabajo en el que estudian los niveles de replicación de un virus salvaje con delección de la región E3 (VRX-007) posterior a una inyección intra-tumoral observan muy baja replicación inicial en hígado y pulmón con una caída de la cantidad de partículas infectivas a los 7 días [309]. Nuestros virus poseen la delección de la región E3 y, además, la expresión de E1A está regulada por un promotor heterogéneo, indicando que la replicación no ocurriría en estos tejidos.

Por otra parte creemos que nuestro virus también es seguro ya que en un estudio clínico reciente en el que utilizaron CRAds observaron que la administración intra-tumoral de hasta 1×10^{12} pv no producía un aumento sistémico de TNFa [364], indicando que no existe un efecto sistémico del virus y que el uso de nuestro virus conteniendo elementos de respuesta a NFκB no produciría una replicación inespecífica.

En conclusión, a lo largo de este trabajo fuimos capaces de determinar las regiones más importantes del promotor de SPARC que lo llevan a ser un elemento muy potente para la regulación transcripcional de un CRAd. También demostramos que es posible aumentar su actividad transcripcional a través del agregado de motivos respondedores a hipoxia e inflamación, dos situaciones muy comunes en los tumores sólidos. A partir

de este promotor quimera desarrollamos un nuevo CRAd con mayor actividad lítica y campo de infección. Ad-5/3-kBF512HRE surge de esta tesis como un nuevo vector para ser usado en un tratamiento de terapia génica para el cáncer y está dirigido a todos los tumores sólidos en donde su promotor resulte activo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. LÍNEAS CELULARES

Todas las líneas fueron crecidas con suero fetal bovino (SFB) Natocor (Natocor, Carlos Paz, Argentina). La línea de melanoma humano IIB-Mel J-N fue derivada de la línea celular IIB-Mel J. Esta última fue establecida a partir de melanomas metastásicos humanos [365] y crecida en medio MEL J (Anexo 2) con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Natocor, Carlos Paz, Argentina), 2,5 U/ml de penicilina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) y 2,5 µg/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO). La línea celular de melanoma IIB-Mel-Les [136] fue crecida en medio MEL suplementado con 10% de SFB.

Las células de la línea de melanoma humano A375N, SB-2 y Mel888 fueron gentilmente cedidas por la Dra. Estela Medrano (Baylor College of Medicine's Huffington Center on Aging, Houston, TX, EE.UU.). La línea A375N fue derivada de la línea A375 (ATCC #: CRL-1619) y fue crecida utilizando medio MEL (Anexo 2) suplementado con 10% de SFB (Natocor, Carlos Paz, Argentina). Las líneas celulares de melanoma humano SB-2 [366] y Mel888 fueron crecidas en medio MEL suplementado con 10% de SFB.

Las células HeLa (ATCC #: CCL-2), carcinoma de cuello uterino humano, fueron crecidas en medio DMEM alta glucosa (1 mg/ml Glucosa) suplementado con 10% SFB.

Las células de carcinoma de mama humano T-47D (ATCC #: HTB-133), MCF7 (ATCC #: HTB-22) y MDA-MB-231 (ATCC #: HTB-26), fueron mantenidas en DMEM/F12 suplementado con 5 µg/ml de insulina bovina (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) y 10% SFB.

La línea de carcinoma hepatocelular Hep3B (ATCC #: HB-8064) fue crecida en medio DMEM suplementado con 10% SFB.

Las líneas de cáncer de colon humano, HCT 116 (ATCC #: CCL-247), CaCO2 (ATCC #: HTB-37), T84 (ATCC #: CCL-284), LoVo (ATCC #: CCL-229) y HT-29 (ATCC #: HTB-238) fueron crecidas en medio DMEM/F12 suplementado con 10% SFB.

Las líneas de cáncer pancreático BxPC-3 (ATCC #: CRL-1687) y MIA PaCa-2 (ATCC #: CRL-1420) fueron mantenidas en medio DMEM alta glucosa suplementados con 10% SFB y, en el caso de las células MIA Paca-2, 2,5% Suero equino.

Las células embrionarias de riñón transformadas HEK293 fueron compradas a Microbix (Microbix, Toronto, Canadá) y crecidas en medio DMEM alta glucosa suplementado con 10% SFB. Mientras que las células de retinoblasto embrional 911 fueron gentilmente cedidas por el Dr. van der Eb (Universidad de Leiden, Países Bajos) y fueron crecidas en medio DMEM/F12 suplementado con 10% SFB

La línea de melanocitos normales NHM [367] fueron gentilmente cedidas por Estela Medrano y fueron mantenidas en medio DMEM/F12 suplementado con 10% SFB.

La línea fibroblastos normales de adulto CCD-1140 (ATCC #: CRL-2714) fueron crecidas en medio Iscove suplementado con 10% de SFB. La línea de fibroblastos normales de adulto Malme-3 (ATCC #: HTB-102) fue crecida en medio McCoy 5^a suplementado con 15% de SFB).

La línea de epitelio normal de colon humano CCD841 (ATCC #: CCL-1790) fue crecida en medio DMEM suplementado con 10% SFB.

La línea de epitelio de mama de inmortalización espontánea MCF-12A (ATCC #: CRL-10782) fue crecida en medio DMEM/F12 suplementado con 20 ng/ml EGF, 100 ng/ml de toxina colérica, 10 µg/ml insulina, 500 ng/ml hidro-cortisona (todos los productos de Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.), 9,5% suero equino y 0,5% SFB.

La línea de queratinocitos transformados por calor, HaCaT, fue gentilmente cedida por el Dr. Fernando Larcher (CIEMAT, Madrid, España) y crecida en medio DMEM/F12 suplementado con 10% SFB.

La línea de fibroblastos embrionales de pulmón HFL1 (ATCC #: CCL-153) fue crecida en medio DMEM/F12 suplementado con 10% SFB, mientras que la línea de fibroblastos embrionales de pulmón WI-38 (ATCC #: CCL-75) fue mantenida en medio DMEM/F12 suplementado con 100µM aminoácidos no esenciales y 10% de SFB (Natocor, Carlos Paz, Argentina).

La línea celular de endotelio micro-vascular humano transformado HMEC-1 fue gentilmente cedida por Francisco J. Candal (Center for Disease Control, National Center for Infectious Diseases, Atlanta, GA, EE.UU.) y fue mantenida en medio DMEM alta glucosa suplementado con 10% de SFB (Natocor, Carlos Paz, Argentina).

2. PLÁSMIDOS

Todos los promotores evaluados en este trabajo fueron clonados en el plásmido pCR4-TOPO y posteriormente sub-clonados en el vector pGL3-Basic (Promega Corp., Madison, WI).

2.1 Promotores humanos SPARC

El plásmido pGEM-hSPPr conteniendo el promotor de SPARC desde el sitio -1175 al +71 del promotor de SPARC [295] se utilizó como templado para obtener las diferentes deleciones del promotor humano descritas en la Tabla 4. Brevemente, los amplicones obtenidos fueron sub-clonados en el vector pCR4-TOPO y subclonados mediante la restricción con las enzimas *MluI*/*BglII* en el vector pGL3-basic.

Los promotores conteniendo mutaciones en su secuencia fueron realizados utilizando como templado el plásmido pGL3-513/+35. Brevemente, los amplicones obtenidos fueron clonados en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen), chequeados por secuenciación, y sub-clonados en el vector pGL3-basic utilizando las enzimas *MluI*/*BglII*. En el caso del promotor conteniendo la mutación de las regiones TATA-like 1 y DPE (TATADPEnull) se utilizó como templado el plásmido pGL3-TATAnull utilizando el cebador sentido F512 y el cebador anti-sentido DPEnull, el fragmento conteniendo ambas mutaciones, TATA y DPEnull, fue clonado en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.), secuenciado y clonado en el vector pGL3-basic (PROMEGA).

2.2. Promotores bovinos SPARC

El promotor de SPARC bovino -578/+74 fue obtenido a partir de PCR utilizando como templado ADN genómico de sangre bovina y clonado en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.), obteniendo el plásmido TOPO-CowON-578/+74. Este plásmido se utilizó como templado para obtener las diferentes deleciones desde el extremo 5' y 3' (CowON -518/+35 y CowON -128/+35).

2.3. Promotores quimera

El plásmido pGL3-6kB-F512 fue obtenido mediante la restricción del plásmido pGL3-513/+35 con la enzima *MluI*, rellenado con DNA polimerasa de *E. coli* y clonado del fragmento como *StuI* conteniendo los 6 elementos de respuesta al factor transcripcional NFκB obtenidos del plásmido pGL-k6 ([368]. El plásmido pGL3-12kB-F512 fue clonado por la inserción de 2 fragmentos conteniendo 6 elementos NFκB en la posición sentido del sitio *MluI* rellenado del plásmido pGL3-F512. El plásmido pGL3-

F512-6kB fue clonado por la inserción de los 6 elementos NFκB en los sitios de restricción *StuI* del promotor de SPARC (-315/-263) del plásmido pGL3-F512

El plásmido HIF10 fue construido por la Dra. Mariana Berenstein y consiste en tres elementos de respuesta a hipoxia (HRE) de 47 pares de bases cada uno [222], dos en dirección sentido y uno anti-sentido aguas arriba del promotor mínimo CMV (mCMV).

De este plásmido se extrajeron los 3 elementos HRE mediante restricción con las enzimas *StuI* / *SmaI* y fueron clonados en el sitio *MluI* rellenado o el sitio *StuI* del plásmido pGL3-F512 para obtener los plásmido pGL3-3HREF512 o pGL3-F512-3HRE, respectivamente.

El promotor pGL3-ROSre-F512 fue obtenido mediante el clonado del elemento ROSre del promotor de VEGF humano (correspondiente a las bases -88/-55) obtenido del plásmido VE-LUC, obtenido en nuestro laboratorio [302], mediante la restricción con las enzimas *NotI* / *MluI* y clonado en los sitios *NotI* / *MluI* del plásmido pGL3-F512.

El plásmido pG3-kBF12HRE, conteniendo 12 elementos de respuesta a NFκB aguas arriba del promotor F512 y 3 elementos HRE insertadas en la secuencia del promotor fue construido mediante la restricción del plásmido pGL3-12kB-F512 con la enzima *StuI* y el posterior clonado del elemento *StuI* / *SmaI* conteniendo los 3 elementos HRE del plásmido HIF10.

3. OBTENCIÓN DE ADN GENÓMICO

El ADN genómico utilizado como templado para la amplificación de los promotores de SPARC humano y bovino fue obtenido a partir de linfocitos humanos o bovinos a través del kit de purificación Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp., Madison, WI) bajo las condiciones indicadas por el proveedor.

Se extrajo sangre de un donante humano o bovino (3 ml) con una jeringa heparinizada para evitar la coagulación. Posteriormente, se agregaron 9 ml de Solución de Lisis Celular y mezcló. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para el lisado de los glóbulos rojos, se centrifugó a 2000xG por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet conteniendo leucocitos se resuspendió en el líquido residual mediante agitación con vortex, se agregaron 3 ml de Solución de Lisis Nuclear y se pipeteó 5-6 veces para lisar las células. Se agregó solución conteniendo la proteína RNAsa y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Luego se agregó 1 ml de Solución

Precipitante de Proteínas, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 2000xG durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante, se agregaron 3 ml de isopropanol y centrifugó a 2000xG por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol 70% y se centrifugó nuevamente durante 1 minuto. Se aspiró el etanol, se dejó secar el pellet a temperatura ambiente y luego se resuspendió en 250 µl de Solución Rehidratante de ADN, incubándolo 1 hora a 65°C.

El ADN genómico utilizado para la cuantificación de copias de genoma adenoviral mediante PCR en tiempo real (ver Cuantificación de la replicación viral) se realizó utilizando el kit Illustra™ tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) bajo las condiciones indicadas por el proveedor.

4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Las PCRs se realizaron en mesada estéril, exclusiva para esta técnica, y las condiciones utilizadas se muestran en la **Tabla 3**. Se utilizaron los termocicladores Minicycler (MJ Research Inc.,Whaltam, MA) o PTC-200 (MJ Research Inc.,Whaltam, MA). La puesta a punto de la técnica se realizó mediante la variación de las concentraciones de magnesio (1 a 3 µM), la concentración de cebadores y la temperatura de apareamiento. Los cebadores utilizados se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla I						
Producto	SPARCp	Spdel	Spdelblunt	Spdel1.1Kb		
Condiciones	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo
	1	94°C	3 min.	1	94°C	3 min.
	8	94°C	1 min.	35	94°C	1 min.
		63°C	1,5 min.		63°C	1,5 min.
		72°C	3 min.		72°C	2 min.
	26	94°C	1 min.	1	72°C	10 min.
		61°C	1,5 min.			
		72°C	3 min.			
	1	72°C	10 min.			

Tabla II						
Producto	-120/X			CowONp		
Condiciones	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo
	1	94°C	3 min.	1	94°C	3 min.
	6	94°C	1 min.	33	94°C	1 min.

	31	58°C	1,5 min.	1	56°C	1,5 min.
		72°C	2 min.		72°C	2,5 min.
		94°C	1 min.		72°C	10 min.
		57°C	1,5 min.			
	1	72°C	10 min.			

Tabla 3. Condiciones en las que se realizaron las PCR para amplificar los productos arriba mencionados.

Tabla III	Cebador Sentido			Cebador Antisentido			Tamaño Amplicón
	Nombre	Secuencia	Sitio	Nombre	Secuencia	Sitio	
-1176/+71	SPP5' MluI	GCACGCGTAGCTGGGTGTTGTGG	MluI	R71	GCAGATCTCTCAGTGGCAGGCA	BglII	1263
-1176/+35	SPP5' MluI	GCACGCGTAGCTGGGTGTTGTGG	MluI	R35	CGAGATCTGCTCTCCGGGCAG	BglII	1227
-1176/+28	SPP5' MluI	GCACGCGTAGCTGGGTGTTGTGG	MluI	R28	CGAGATCTGGGCAGTCTGAAGGACC	BglII	1220
-513/+71	F513	CGACGCGTGCAGCTTGTCTTGTC	MluI	R71	GCAGATCTCTCAGTGGCAGGCA	BglII	600
-513/+35	F513	CGACGCGTGCAGCTTGTCTTGTC	MluI	R35	CGAGATCTGCTCTCCGGGCAG	BglII	564
-513/+28	F513	CGACGCGTGCAGCTTGTCTTGTC	MluI	R28	CGAGATCTGGGCAGTCTGAAGGACC	BglII	557
-513/+23	F513	CGACGCGTGCAGCTTGTCTTGTC	MluI	R INR	GCAGATCTAGTCTGAAGGACCGCG	BglII	553
-120/+71	F120	GAACGCGTGGGAGAAGGAGGAG	MluI	R71	GCAGATCTCTCAGTGGCAGGCA	BglII	207
-120/+35	F120	GAACGCGTGGGAGAAGGAGGAG	MluI	R35	CGAGATCTGCTCTCCGGGCAG	BglII	171
-120/+28	F120	GAACGCGTGGGAGAAGGAGGAG	MluI	R28	CGAGATCTGGGCAGTCTGAAGGACC	BglII	164
-88/+35	-88	CACGCGTCAGGAGGAGGAGGACC	MluI	R35	CGAGATCTGCTCTCCGGGCAG	BglII	135
-70/+35	-70	CACGCGTCGGGGTGGAGGGGAGATAG	MluI	R35	CGAGATCTGCTCTCCGGGCAG	BglII	120
TATAnull	F513	CGACGCGTGCAGCTTGTCTTGTC	MluI	TATAnull	CGAGATCTGCTCTCCGGGCAGTCTGAAGGACCGCGGAATG TGGAGGGGTGCGCGGACAGGC	BglII	564
DPEnull	F513	CGACGCGTGCAGCTTGTCTTGTC	MluI	R+35 DPEnull	CGAGATCTGCCGATGACGGGCAG	BglII	564
TATADPEnull	F513	CGACGCGTGCAGCTTGTCTTGTC	MluI	R+35 DPEnull	CGAGATCTGCCGATGACGGGCAG	BglII	564
INR2null	F513	CGACGCGTGCAGCTTGTCTTGTC	MluI	INR2mut	CGAGATCTGGGCTCCAATAGGACCGCGGG	BglII	564
INR1null	F513	CGACGCGTGCAGCTTGTCTTGTC	MluI	INR1mut	CGAGATCTGCGCTCTCCGGGCAGTCTGAAGGACCGCGGGC TCGACGAGGGG	BglII	564
TATAcons	F513	CGACGCGTGCAGCTTGTCTTGTC	MluI	R35 TATA	CGAGATCTGCTCTCCGGGCAGTCTGAAGGACCGCGGAATG TGGAGGGGTTTATA	BglII	564
F512+23 (TATAcons)	F513	CGACGCGTGCAGCTTGTCTTGTC	MluI	INR1 TATA	GCAGATCTAGTCTGAAGGACCGCGGAATGTGGAGGGTTT ATA	BglII	553
DPEcons	F513	CGACGCGTGCAGCTTGTCTTGTC	MluI	R+35 DPEcons	CGAGATCTGCCGCTCTCCGGGCAG	BglII	564
CowON - 518/+74	CowON 5'	CTAGCTAGCCTTCAGTCTGTACAGAGG	NheI	R+35Cow ON	CCGCTCGAGGTCGGACATACCTCAGT	XhoI	608
CowON -518/+35	F-518 CowON	GGACGCGCTTTCAGTCTGTACAGAGG	MluI	3'CowON	GCAGATCTCAAGCTCCGGGCAG	BglII	568
CowON -128/+35	F-128 CowON	GCACGCGTGGGAGAAGGGAGGGGA	MluI	3'CowON	GCAGATCTCAAGCTCCGGGCAG	BglII	179

Tabla 4. Cebadores utilizados para amplificar los productos de PCR.

5. 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 tenían al menos 50% de actividad. De no ser posible, se realizaron dos procesos de restricción independientes, entre los cuales se realizó una extracción Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico de la solución y precipitación con Etanol para el lavado de enzima y sales presentes en la solución. En todos los casos se realizaron las

incubaciones a la temperatura óptima indicada por el proveedor al menos durante 2 horas. El resultado de la restricción se verificó por separación electroforética en geles de agarosa 0,8-1,6/ agarosa en solución TAE (40 mM Tris-acetato, 2mM 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).

6. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

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 GFX PCR (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Para fragmentos con tamaños mayores a 500 pares de bases, la purificación se realizó por columnas de lana de vidrio de fabricación casera.

Purificación por kit GFX PCR

La purificación se realizó bajo las condiciones indicadas por el proveedor (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), utilizando un agente caotrópico que desnaturaliza proteínas, disuelve la agarosa y promueve la unión del ADN doble cadena a una matriz de fibra de vidrio, lo que posibilita el lavado de proteínas y sales para eluir el fragmento en agua bidestilada.

Purificación por columnas de lana de vidrio

Este método se basa en la separación del ADN a través de la centrifugación del fragmento de agarosa, el cual es depositado sobre lana de vidrio dentro de un eppendorf de 0,5 ml perforado en su base. Se centrifugó el fragmento de agarosa a 2500xG durante 5 minutos, lo que posibilitó la elución de la solución TAE conteniendo el fragmento de ADN. Posteriormente se realizó una extracción Fenol:Cloroformo:Alcohol Isoamílico y precipitación con etanol para eliminar RNA, proteínas y sales.

7. CUANTIFICACIÓN DE ADN

Para la cuantificación de los fragmentos de ADN utilizados en una ligación o de los plásmidos utilizados en una transfección transiente se utilizó la cuantificación por gel a

partir del análisis densitométrico de las intensidades de los fragmentos de masa conocida de la digestión completa del fago λ con la enzima *Hind*III (Gibco BRL; Gaithesburg, MD) o de la mezcla de seis fragmentos con extremos romos denominado Low DNA Mass Ladder (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). En el caso de plásmidos para transfecciones transientes también se realizó, además de la cuantificación por geles, una evaluación de la calidad de la preparación mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260nm / 280nm o mediante NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EE.UU.).

8. LIGACIONES

Se utilizó ADN Ligasa del bacteriófago T4 (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) según los protocolos del proveedor. Se utilizaron relaciones inserto:vector de 1:1 hasta 3:1, calculando la razón entre los fragmentos por la siguiente formula:

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

Se utilizó como mínimo 50 ng de vector y como máximo 100 ng y 20 o 100 unidades de ADN ligasa para ligar extremos cohesivos o romos, respectivamente en un volumen final de 10 μ l a 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.

9. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

Para las construcciones plasmídicas utilizadas en ensayos luciferasa se utilizó el método de transformación bacteriana por shock térmico (heat shock) desarrollado por Dagert y colaboradores [369]. Se incubaron 90 μ l de bacterias termocompetentes *E. coli* cepa XL-1 blue en hielo durante 30 minutos con 70-100 ng de ADN plasmídico producto de ligación o 1-5 ng de plásmido circular. Se colocaron las bacterias durante 90 segundos en un baño térmico a 42°C, que induce la formación de poros en la membrana bacteriana, posibilitando el ingreso del ADN plasmídico. Posteriormente se incubaron durante 3 minutos en hielo y 10 minutos a temperatura ambiente. Se

agregaron 0,9 ml de Medio LB (Anexo 2) y se colocaron durante 60 minutos en un agitador a 37°C. Se centrifugó el medio durante 30 segundos a 13000 r.p.m. y se resuspendió el pellet en 0,2 ml de LB, se plaqueó el medio conteniendo las bacterias en una placa de LB agar con el antibiótico deseado (Ampicilina o Kanamicina 50 µg/ml). Se colocaron las placas a 37°C durante 16-18 horas. Se aislaron colonias y se las utilizó como inóculo de crecimiento de 5 ml de medio LB con antibiótico.

Para las construcciones plasmídicas utilizadas para la recombinación homóloga de los genomas adenovirales se utilizaron bacterias electro-competentes (ver Producción de Stock Virales).

10. PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS

En las preparaciones de pequeña escala (1-5 ml) se purificaron los plásmidos por el método de lisis alcalina [370]. Este método también se utilizó para preparaciones de mediana escala (10-100 ml) empleadas en digestiones con enzimas de restricción para su posterior uso en ligaciones, no así en preparaciones para transfecciones transientes en las que se utilizó el kit Plasmid Midi Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania).

Preparación de pequeña escala

Se centrifugaron 1-5 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) conteniendo 10 µg de Ribonucleasa A (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.) (Anexo 2). Después de 5 minutos se agregaron 200 µl de solución P2 (0,2N NaOH, 1/ P/V SDS), se mezcló por inversión suave y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µl de solución P3 (Acetato de Potasio 5M pH 5,3), se mezcló por inversión suave y se colocó en hielo durante 15 minutos. Se centrifugó durante 15 minutos a 13000 r.p.m., se recuperó el sobrenadante y se agregaron 1 ml de iso-propanol. Se incubó a -20°C por 20 minutos y luego se centrifugó por 15 minutos a 13000 r.p.m., se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 400 µl 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 y se resuspendió en 10-50 µl de agua bi-destilada.

Preparación de mediana escala

El protocolo utilizado en preparaciones de mediana escala por lisis alcalina es una modificación del protocolo anterior, variando el volumen de soluciones a utilizar (P1 2 ml, P2 4 ml, P3 2 ml, Isopropanol 3,5 ml, Etanol 70/ 2,5 ml). En este caso se agrega un paso de purificación con solventes orgánicos, Fenol:Clororformo:Alcohol Isoamílico (25:24:1) (Anexo 2) luego de resuspender el plásmido en agua bi-distilada con el fin de remover restos de proteínas y RNA de la solución obtenida.

La preparación de plásmidos para realizar transfecciones transientes se realizó con el kit QIAGEN plasmid Midi Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) que se basa en una modificación del método de lisis alcalina. En este caso se realiza la purificación del plásmido por una columna conteniendo una resina con grupos dietilaminoetanol (DEAE) cargados positivamente a los que se une el ADN plasmídico, permitiendo la remoción de ARN, proteínas e impurezas de bajo peso molecular por lavado con soluciones conteniendo concentraciones medias de sales mientras que el ADN plasmídico permanece unido a la resina, eluyendo sólo a altas concentraciones de sales.

11. SECUENCIACIÓN DE ADN

Los fragmentos amplificados por PCR se secuenciaron en el servicio de secuenciación provisto por la Fundación Instituto Leloir, utilizando cebadores específicos para la secuencia de los promotores SP6 y T7, presentes en los plásmidos pGEM-T easy (Promega Corp., Madison, WI) y pCR-blunt II TOPO (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) que flanquean los productos clonados.

Los adenovirus fueron secuenciados mediante la utilización de los cebadores pShuttle F y pShuttle R (Tabla 4) para identificar el promotor y el gen presente en la secuencia adenoviral.

13 MARCACIÓN DE SONDAS POR LA TÉCNICA DE “RANDOM PRIMER”

La sonda fue marcada con ^{32}P ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, 3000 Ci/mmol, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), por la técnica de “random priming” (Prime-a-Gene Labeling System, Promega Corp., Madison, WI). La técnica se fundamenta en la

desnaturalización del ADN e hibridación al azar con una mezcla de oligonucleótidos de seis pares de bases que actúan como cebadores de la ADN polimerasa. Una vez terminada la reacción de marcación se separó el ADN marcado de los nucleótidos excedentes a través de una cromatografía de filtración molecular en columna con Shephadex G-50, como fase fija y solución amortiguadora TE, como fase móvil. Los valores de radioactividad se midieron y graficaron, obteniéndose dos picos: uno correspondiente al ADN marcado y el otro a los nucleótidos excedentes. Finalmente, las cadenas de ADN marcadas radioactivamente se separaron mediante la adición de hidróxido de sodio a una concentración final de 0,2 N y se agregaron rápidamente a la solución de prehibridación, precalentada a 65 °C.

15. TRANSFECCIONES TRANSIENTES

Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos con una densidad de $3-5 \times 10^4$ células/pocillo. A las 24 horas fueron transfectadas utilizando Lipofectamine2000 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.) según las condiciones indicadas por el proveedor. Cada tratamiento se realizó al menos por duplicado en cada línea celular, incubando 0,8 µg de plásmido tratamiento con 0,1 µg de plásmido pRL-CMV durante 5 minutos con 50 µl de medio DMEM sin antibiótico y, en paralelo, 1 µl de Lipofectamine2000 con 50 µl de medio DMEM sin antibiótico, se mezclaron estas dos preparaciones y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se removió el medio con suero de las células, se lavó con PBS y agregó 200 µl de DMEM alta glucosa sin suero y sin antibióticos; posteriormente se agregó 100 µl de medio conteniendo la mezcla de lipofección y a las 4 horas se agregó 500 µl de medio de cultivo correspondiente a cada línea celular, suplementado con suero fetal bovino. Las células utilizadas para evaluar la actividad luciferasa en condiciones de normoxia fueron mantenidas durante 46 horas en estufa a 37°C con 5% CO₂. Por el contrario, para evaluar la actividad en condiciones de hipoxia 24 horas después del inicio de la transfección, las células fueron incubadas en condiciones de hipoxia durante 18 horas. Esta condición se consiguió al colocar las células en una cámara modular de cultivo (Billups-Rothenberg Inc., Del Mar, CA), la cual se drenó durante 10 minutos con un flujo de 10 l/min. de gas conteniendo 0,1% O₂, 5% CO₂ y N₂ saturando la mezcla, y

luego sellada herméticamente. Posteriormente las células fueron reoxigenadas durante 4 horas y lisadas.

16. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LUCIFERASA

Para realizar este ensayo se utilizó el kit Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega Corp., Madison, WI). Este sistema reportero implica la expresión simultánea de dos enzimas reporteras individuales en un mismo sistema, pudiéndose evaluar la actividad producida por las enzimas luciferasa de la luciérnaga Firefly (*Photinus pyralis*) y del celenterado Renilla (*Renilla reniformis*) en un sólo ensayo secuencial [371].

Cuarenta y seis horas luego de la transfección, se lavaron las células con PBS y se lisaron agregando 100 µl de Passive Lysis Buffer (Promega Corp., Madison, WI) durante 15 minutos en agitación constante, se homogeneizó el lisado mediante pipeteo y se transfirió a un tubo de 1,5 ml. Se centrifugó durante 30 segundos para precipitar agregados proteicos y membranas. Se utilizaron 20 µl del sobrenadante para realizar el ensayo de actividad de luciferasa en una placa blanca de 96 pocillos Lumitrac 600 (Greiner BioOne, Frickenhausen, Alemania). En cada pocillo se agregaron 100 µl de Luciferase Assay Reagent II, utilizado para medir la actividad luciferasa del gen *Firefly* producida por el promotor a evaluar. Se realizó la lectura de la actividad de luciferasa en un luminómetro (Genios, TECAN Group AG, Austria) y luego se agregaron 100 µl de Stop & Glo Reagent. Este reactivo enmascara la actividad luciferasa producida por *Firefly* y activa la producida por el gen luciferasa de *Renilla* producida por el plásmido control que posee promotor CMV; se realizó entonces una nueva lectura en luminómetro (Figura 44).

Los datos se normalizaron de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Unidades Luciferasa Firefly}}{\text{Unidades Luciferasa Renilla}} = \text{Unidades Luciferasa Relativas(RLU)}$$

Esta estrategia permite reducir el error producido debido a diferencias en la viabilidad celular, la eficiencia de la transfección, el volumen de pipeteo y la eficiencia del

proceso de lisis. Se analizaron al menos los resultados de tres experimentos independientes.

Los datos se expresan como cantidad de inducción relativa a la actividad obtenida con el plásmido control pGL3-Basic (sin promotor), actividad relativa al promotor SV40 o al tratamiento control según se especifica en cada figura.

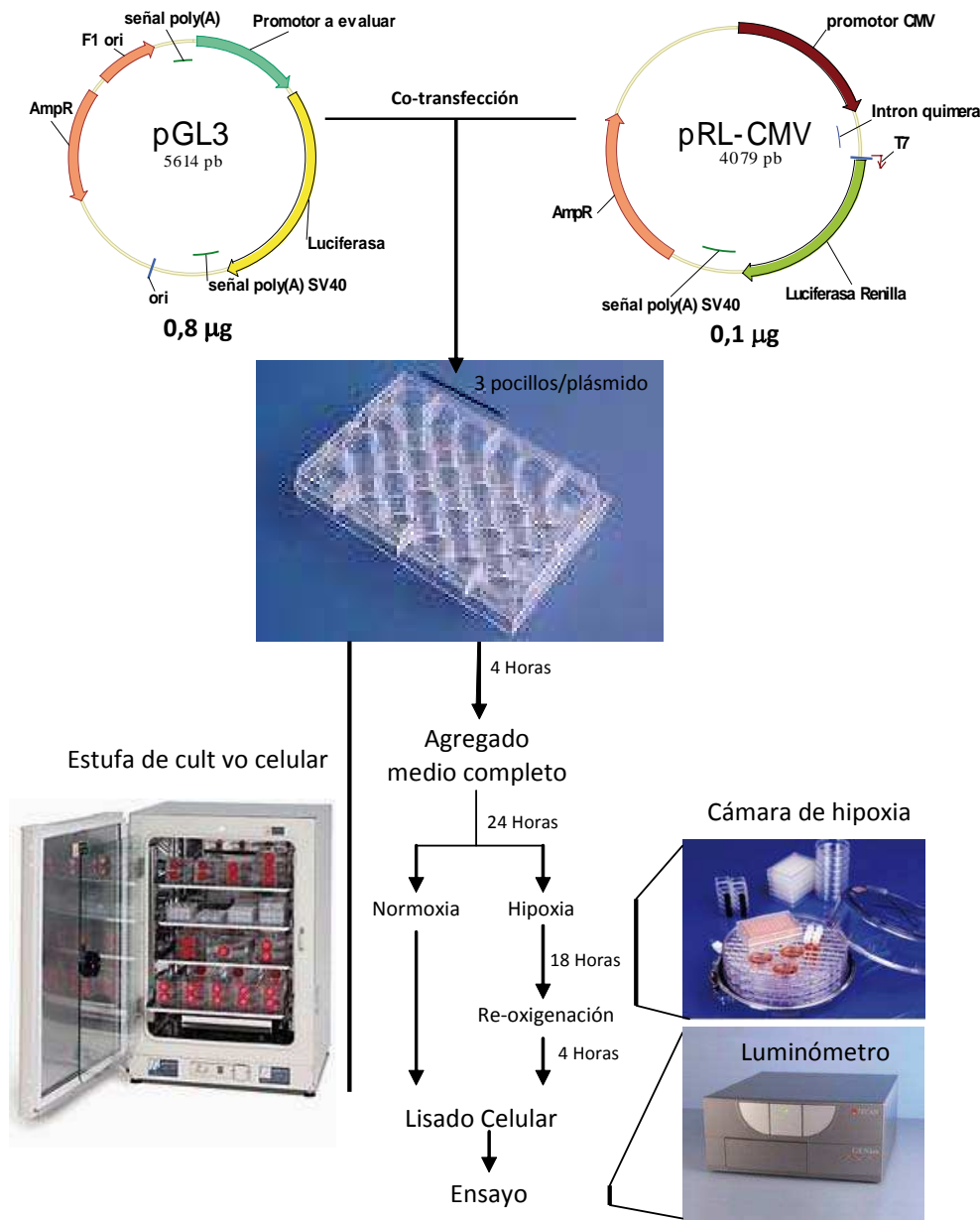


Figura 44. Esquema del protocolo utilizado para la evaluación de la actividad luciferasa de los diferentes promotores.

17. CONSTRUCCIÓN Y PRODUCCIÓN DE ADENOVIRUS

La construcción de los adenovirus recombinantes se realizó mediante dos técnicas diferentes. Ambas técnicas involucran el uso de vectores conteniendo el casete de expresión deseado que recombinan con una región del genoma adenoviral para producir un genoma adenoviral conteniendo los elementos necesarios para su replicación en una célula permisiva. La diferencia entre ambos sistemas es el vector de transferencia utilizado y el sistema de recombinación homóloga. En una primera etapa se utiliza el vector pAd-I-XP [372] y la recombinación homóloga se realizaba sobre células eucariotas. En una segunda etapa se utilizó el sistema pAd-Easy (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.) que utiliza el vector pShuttle como vector de transferencia y la recombinación homóloga se realiza sobre bacterias *E. coli* de la cepa BJ5183.

El Ad-F512 fue producido mediante recombinación homóloga en células eucariotas HEK293 co-transfectadas con el plásmido pAd-F512-E1A linearizado con *FspI* y el genoma adenoviral del Ad- β -gal restringido con la enzima *Clal*, que elimina el casete de expresión del adenovirus, y purificado. El Ad-F512-Luc fue producido de la misma manera utilizando el pAd-F512-Luc como vector de transferencia.

Los CRAds conteniendo promotores quimera fueron construidos mediante el método de recombinación homóloga en células eucariotas. Los vectores de transferencia utilizados se construyeron mediante el sub-clonado del promotor quimera indicado (kBF512HRE o HREF512) en los plásmidos pAd-F512-Luc o pAd-I-F512-E1A en reemplazo del promotor F512 mediante el uso de las enzimas *KpnI* / *BglII*. Después de obtener los plásmidos pAd-kBF512HRE y pAd-HREF512 (-Luc y -E1A) el casete conteniendo promotor y gen fue cortado con las enzimas *SpeI* / *Sall* y clonado en el vector de transferencia pShuttle (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Los plásmidos fueron utilizados para generar los genomas adenovirales mediante la recombinación homóloga en bacterias con el plásmido pAdEasy-1 (Stratagene) para los virus conteniendo fibra del serotipo 5 o con el plásmido pVK500C-5/3 para los virus con fibra quimera 5/3 [373].

En este sistema se utilizó una modificación del sistema descrito

El vector shuttle pADPSY, gentilmente provisto por Jaques Mallet (Francia) contiene un promotor RSV y la región E1A ha sido delecionada [374]. Para mejorar la capacidad de este vector se reemplazó el promotor RSV con un sitio de múltiple clonado (MCS: *SpeI*,

BclI, *KpnI*, *NheI*, *MluI*, *BglII*, *EcoRV*, *Clal*, *SnaBI*, *Sall*) para construir el vector shuttle pAd-Xp. Luego, un fragmento de 234 bp correspondiente al codón de terminación del gen de la hormona de crecimiento bovina [306] fue clonado por PCR e insertado en los sitios *SpeI/KpnI* aguas abajo del ITR en el MCS para crear un nuevo vector shuttle denominado pAd-I-Xp (utilizando los cebadores INSU-F-*SpeI*: INSU-R-*KpnI*). El fragmento de ADN correspondiente al gen E1A (+560/+1632 del genoma de adenovirus 5) fue clonado por PCR a partir de ADN genómico de células HEK293, subclonado en TOPO-pCR4 y. El fragmento *BglII/BamHI* conteniendo el gen E1A fue subclonado en el sitio *BglII* de los vectores shuttle pAd-Xp o pAd-I-Xp, obteniendo los plásmidos pAd-E1A y pAd-I-E1A, respectivamente. Luego se clonó el promotor F512 aguas arriba de E1A en los sitios *MluI/BglII*, obteniendo el plásmido shuttle pAd-F512-E1A.

Este gen fue sub-clonado en el vector pAd-I-F512 para obtener el plásmido pAd-I-F512-E1Awt [372]. El casete entero, I-F512-E1Awt, fue extraído de pAd-I-F512-E1Awt con *SpeI/Sall* y subclonado en el plásmido pShuttle-1 (Stratagene, Inc.) en los sitios *XbaI/Sall* para obtener el vector pShuttle-I-F512-E1Awt. Este vector fue digerido con la enzima *PmeI* y se utilizó para la recombinación homóloga con el plásmido pVK500C 5/3 [375] en las bacterias *Escherichia coli* BJ5183 mediante electroporación [376]. Un clon positivo (pVK500-I-F512-E1Awt 5/3) fue seleccionado, secuenciado y finalmente amplificado mediante la transformación de las células DH5 α (Invitrogen) y se extrajo el ADN mediante el kit DNA-maxiprep (Qiagen, Hilden, Germany). El plásmido pVK500-I-F512-E1Awt 5/3 fue linearizado con *PacI*, purificado mediante precipitación con etanol y transfectado en células 911 usando LTX lipofectamine (Invitrogen). Los adenovirus producidos fueron utilizados para infectar células HEK293 y utilizados para producir el stock como fue previamente descrito [372].

18. PRODUCCIÓN DE LOS STOCKS VIRALES.

Los virus fueron obtenidos por co-transformación y recombinación de los plásmidos en bacterias BJ5183. Brevemente, se utilizaron 50 µl de bacterias BJ5183 para transformar con 50 ng del plásmido pShuttle conteniendo el casete de expresión deseado (KanR) junto a 300 ng del vector genómico adenoviral pAdEasy o pVK500-C (AmpR). Luego se electroporó (1300V, 200Ω, 25µF) y se agregó 1 ml de medio SOC. Se recuperaron las bacterias mediante agitación a 37°C durante 2 horas y se plaquearon sobre placas conteniendo kanamicina para obtener solo los clones de recombinación. Una vez identificados los clones positivos, los plásmidos fueron transformados en bacterias DH5α para incrementar el rendimiento en las preparaciones plasmídicas. Una vez purificados los plásmidos fueron linearizados con la enzima *PacI* y transfectados mediante el uso de Lipofectamine LTX (Invitrogen, Carlsbad, CA) en células 911. Aproximadamente 5 a 14 días después se evaluó el efecto citopático causado por la replicación viral. Las células fueron cosechadas y sometidas a tres ciclos de congelamiento y descongelamiento con el propósito de liberar los virus de su interior. Este primer sobrenadante de virus, llamado crudo, fue utilizado para clonar los virus mediante diluciones límite sobre células HEK293. Una vez obtenidos los virus clonados se secuenció el casete de expresión y se procedió a preparar el stock según el protocolo esquematizado antes descrito. Posteriormente los virus fueron titulados según dos métodos diferentes en células HEK293. En el primero de ellos se plaqueó un MW96 con 2×10^4 células por pocillo y se infectó con las diluciones del stock usando 6 repeticiones por dilución. En el segundo método se plaquearon 1×10^4 células por pocillo y se infectaron con las mismas diluciones pero con 10 repeticiones cada una. Para calcular los títulos se aplicaron las siguientes formulas:

Método 1: $T=10^{X_o + d/2 + d \sum X_i/n}$

En donde X_o = es el número de la última fila completa

X_i =número de wells con CPE de la última dilución

$d=1$ porque es el log de la dilución (en nuestro caso 1/10)

$n=6$ porque es el número de las repeticiones

Método 2: $T=10^{1+d(s-0.5)}$

En donde $d=1$ porque es el log de la dilución (en nuestro caso 1/10) y $S= \Sigma$ de los radios de CPE todas las diluciones (por ejemplo si en la dilución 10^{-8} se observan que 7 pocillos de los 10 sufrieron CPE el radio es 0,7 para esa dilución).

Es importante destacar que para los ensayos *in vitro* e *in vivo* se utilizaron diferentes stocks virales. Los mismos fueron cuantificados como se describió en materiales y métodos (ver también tabla xx). En todos los ensayos que se describen en este capítulo se utilizaron stocks con las mismas partículas virales infectivas. De esta manera se logra el mismo efecto con dos stocks diferentes.

19. EFECTO CITOPÁTICO EN MONOCAPA

Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de 1×10^4 células/ pocillo (la densidad de HMEC-1 fue de 5×10^4 células/ pocillo). Al otro día, las células fueron infectadas con dosis creciente de los CRAds en 200 μ l de medio DMEM/F12 conteniendo 2/ de SFB y luego de 4 horas de infección se agregó 0,8 ml del correspondiente medio conteniendo 10/ de SFB. La cantidad de virus utilizada varía desde 0,1 a 1000 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 [377].

20. ENSAYO DE MUERTE CELULAR

20. CUANTIFICACIÓN DE LA REPLICACIÓN VIRAL

La cuantificación de las copias de genoma adenoviral mediante la amplificación de la región E4 del genoma adenoviral mediante técnicas de PCR en tiempo real fue previamente descrita [378]. Brevemente, la purificación de ADN se realizó utilizando el kit DNeasy Tissue kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA). Los cebadores utilizados para la región del gen E4 fueron el cebador sentido E4se y E4as (Tabla 4). Los controles negativos sin templado fueron realizados en cada serie de reacciones. Para cuantificar el número de copias de genoma adenoviral se utilizó una curva de 10^8 a 10^2 copias de genoma adenoviral.

Los datos se expresaron como copias de genoma adenoviral/ng ADN. La comparación de la tasa de replicación de los diferentes grupos de tratamiento se realizó mediante el test de análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías.

22. ESTUDIOS *IN VIVO*

Se inyectaron en forma sub-cutánea 4×10^6 células SB2, A375N, IIB-Mel-Les o Mel J en uno de los flanco de ratones macho N:NIH(S)-nu de 6 a 8 semanas de edad (obtenidos del bioterio de la Facultad de Veterinaria, Universidad Nacional de La Plata, Argentina o del Bioterio de la Fundación Instituto Leloir). Los tumores conteniendo diferentes tipos celulares fueron producidos mediante la inyección de 4.0×10^6 SB2/ 2×10^6 WI-38, 4.0×10^6 SB2/ 2×10^6 HMEC, 4.0×10^6 SB2/ 2×10^6 WI-38/ 2.0×10^6 HMEC células. Cuando los tumores alcanzaron un volumen promedio de 100 mm^3 se les asignó un tratamiento al azar. Cada tratamiento recibió tres o cinco inyecciones intra-tumorales de 1×10^{10} partículas virales/ratón del CRAAd indicado, del adenovirus control (Ad- β -gal) o vehículo (PBS) en los días 1, 3 y 7 (3 inyecciones) o 1, 3, 5, 7 y 9 (5 inyecciones). Los ratones del grupo control fueron inyectados con Ad- β -gal o vehículo indistintamente ya que ninguno de ellos tiene efecto sobre el crecimiento tumoral. Se estimaron los volúmenes

tumorales mediante medidas manuales con calibre (volumen= $0,52 \times (\text{Diámetro Mayor})^2 \times \text{Diámetro menor}$). Los ratones fueron sacrificados cuando el volumen tumoral alcanzaba los 2000 mm³. Ninguno de estos ratones mostró signos de enfermedad o alguna muestra visible de intoxicación. Los experimentos *in vivo* se realizaron siguiendo los lineamientos institucionales aprobadas por el NIH, todos los animales bajo estudio recibieron agua y comida *ad-libitum*.

23. HISTOLOGÍA

Los estudios histológicos de las muestras de áreas tumorales fueron fijadas en buffer neutral conteniendo 3,7% formol antes de la inclusión en parafina y cortado en secciones de 5 µm. Como alternativa las muestras de áreas tumorales fueron fijadas en para-formaldehído (PFA) 4% por 1 hora y crio-preservadas por una noche en sucrosa 30%, incluidas en OCT, y conservadas a -20°C. Las secciones de 9 µm obtenidas mediante corte por criostato fueron montadas en portaobjetos gelatinizados. Después de la hidratación los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina. Se realizó la inmunohistoquímica para hexón utilizando el anticuerpo anti-hexón adenoviral AB1056 (Chemicon International, Hampshire, UK), para la detección de β-gal se utilizó el anticuerpo de conejo anti-β-galactosidasa A-11132 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) y para Factor VIII se utilizó el anticuerpo de conejo anti-Von Willebruy Factor humano (Dako, Germany) seguido de un anticuerpo biotinilado de burro anti-cabra (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) o un anticuerpo biotinilado de cabra anti-conejo (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), respectivamente. Los anticuerpos secundarios biotinilados fueron usados conjuntamente con el kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) y la reacción fue visualizada mediante la utilización del cromógeno DAB (Dako, Germany). Las secciones fueron teñidas con hematoxilina y fotografiadas en un microscopio Olympus BX60.

REFERENCIAS

1. Min.Salud(Argentina). *Indicadores Básicos 2009*. 2009 [cited 2010 03-11-10]; Available from: http://www.deis.gov.ar/publicaciones/archivos/indicadores_2009.pdf.
2. Weir, H.K., Thun, M.J., Hankey, B.F., Ries, L.A., Howe, H.L., Wingo, P.A., Jemal, A., Ward, E., Anderson, R.N. and Edwards, B.K., *Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(17): p. 1276-99.
3. Little, C.C., *Trends in reported incidence of cancer by age in Connecticut and in New York State (1935-1960)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1965. **54**(6): p. 1779-85.
4. Renan, M.J., *How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data*. Mol Carcinog, 1993. **7**(3): p. 139-46.
5. Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M. and Bos, J.L., *Genetic alterations during colorectal-tumor development*. N Engl J Med, 1988. **319**(9): p. 525-32.
6. Foulds, L., *The experimental study of tumor progression: a review*. Cancer Res, 1954. **14**(5): p. 327-39.
7. Nowell, P.C., *The clonal evolution of tumor cell populations*. Science, 1976. **194**(4260): p. 23-8.
8. Bhowmick, N.A. and Moses, H.L., *Tumor-stroma interactions*. Curr Opin Genet Dev, 2005. **15**(1): p. 97-101.
9. Paget, S., *The Distribution Of Secondary Growths In Cancer Of The Breast*. The Lancet, 1889. **133**(3421): p. 571-3.
10. Pietras, K. and Ostman, A., *Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma*. Exp Cell Res, 2010. **316**(8): p. 1324-31.
11. Tlsty, T.D. and Hein, P.W., *Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(1): p. 54-9.
12. Hu, M. and Polyak, K., *Microenvironmental regulation of cancer development*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(1): p. 27-34.
13. Orimo, A. and Weinberg, R.A., *Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type*. Cell Cycle, 2006. **5**(15): p. 1597-601.
14. Watanabe, N., Ando, K., Yoshida, S., Inuzuka, S., Kobayashi, M., Matsui, N. and Okamoto, T., *Gene expression profile analysis of rheumatoid synovial fibroblast cultures revealing the overexpression of genes responsible for tumor-like growth of rheumatoid synovium*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **294**(5): p. 1121-9.
15. Coussens, L.M. and Werb, Z., *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
16. Kuper, H., Adami, H.O. and Trichopoulos, D., *Infections as a major preventable cause of human cancer*. J Intern Med, 2000. **248**(3): p. 171-83.
17. Swann, J.B. and Smyth, M.J., *Immune surveillance of tumors*. J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1137-46.
18. Bennett, D.C., *Genetics, development, and malignancy of melanocytes*. Int Rev Cytol, 1993. **146**: p. 191-260.
19. Fitzpatrick, T., *Dermatology in general medicine*. 1993: McGraw-Hill, Health Professions Division. 3089.

20. Balch, C.M., Soong, S.J., Gershenwald, J.E., Thompson, J.F., Reintgen, D.S., Cascinelli, N., Urist, M., McMasters, K.M., Ross, M.I., Kirkwood, J.M., Atkins, M.B., Thompson, J.A., Coit, D.G., Byrd, D., Desmond, R., Zhang, Y., Liu, P.Y., Lyman, G.H. and Morabito, A., *Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system*. J Clin Oncol, 2001. **19**(16): p. 3622-34.
21. Hsu, M.Y., Meier, F. and Herlyn, M., *Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host*. Differentiation, 2002. **70**(9-10): p. 522-36.
22. Li, G., Satyamoorthy, K., Meier, F., Berking, C., Bogenrieder, T. and Herlyn, M., *Function and regulation of melanoma-stromal fibroblast interactions: when seeds meet soil*. Oncogene, 2003. **22**(20): p. 3162-71.
23. Torisu, H., Ono, M., Kiryu, H., Furue, M., Ohmoto, Y., Nakayama, J., Nishioka, Y., Sone, S. and Kuwano, M., *Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha*. Int J Cancer, 2000. **85**(2): p. 182-8.
24. Wu, X.C., Chen, V.W., Steele, B., Roffers, S., Klotz, J.B., Correa, C.N. and Carozza, S.E., *Cancer incidence in adolescents and young adults in the United States, 1992-1997*. J Adolesc Health, 2003. **32**(6): p. 405-15.
25. Hearing, V. and Leong, S., *From melanocytes to melanoma: the progression to malignancy*. 2006: Humana Press. 678.
26. Balch, C.M. and Milton, G.W., *Cutaneous melanoma : clinical management and treatment results worldwide*. 1985, Philadelphia: Lippincott. xiii, 538(29-42).
27. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., Murray, T. and Thun, M.J., *Cancer statistics, 2008*. CA Cancer J Clin, 2008. **58**(2): p. 71-96.
28. Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. and Ward, E., *Cancer Statistics, 2010*. CA Cancer J Clin, 2010.
29. NCI2004. www.cancer.gov/cancerinfo/treatment. 2004.
30. Aquiles Estevez, R., Alvarez, C.A. and Chacon, R.D., *Oncología Clínica*. 1978: Ediciones de la Universidad del Salvador. 719.
31. Cascinelli, N., *Margin of resection in the management of primary melanoma*. Semin Surg Oncol, 1998. **14**(4): p. 272-5.
32. Tsao, H., Atkins, M.B. and Sober, A.J., *Management of cutaneous melanoma*. N Engl J Med, 2004. **351**(10): p. 998-1012.
33. Testori, A., Rutkowski, P., Marsden, J., Bastholt, L., Chiarion-Sileni, V., Hauschild, A. and Eggermont, A.M., *Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma*. Ann Oncol, 2009. **20 Suppl 6**: p. vi22-9.
34. Jordan, V. and Furr, B., *Hormone Therapy in Breast and Prostate Cancer*. 2009: Humana Press.
35. Disis, M., *Immunotherapy of cancer*. 2006: Humana Press.
36. Mouawad, R., Seibert, M., Michels, J., Bloch, J., Spano, J.P. and Khayat, D., *Treatment for metastatic malignant melanoma: old drugs and new strategies*. Crit Rev Oncol Hematol, 2010. **74**(1): p. 27-39.
37. Watson, J.D., *The human genome project: past, present, and future*. Science, 1990. **248**(4951): p. 44-9.
38. Anderson, W.F., *Human gene therapy*. Nature, 1998. **392**(6679 Suppl): p. 25-30.
39. Gage, F.H., *Cell therapy*. Nature, 1998. **392**(6679 Suppl): p. 18-24.
40. Dyer, M.R. and Herrling, P.L., *Progress and potential for gene-based medicines*. Mol Ther, 2000. **1**(3): p. 213-24.
41. Glover, D.J., Lipps, H.J. and Jans, D.A., *Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(4): p. 299-310.

42. Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. and Felgner, P.L., *Direct gene transfer into mouse muscle in vivo*. Science, 1990. **247**(4949 Pt 1): p. 1465-8.
43. Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. and Danielsen, M., *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(21): p. 7413-7.
44. Radler, J.O., Koltover, I., Salditt, T. and Safinya, C.R., *Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes*. Science, 1997. **275**(5301): p. 810-4.
45. Bedikian, A.Y. and Del Vecchio, M., *Allovectin-7 therapy in metastatic melanoma*. Expert Opin Biol Ther, 2008. **8**(6): p. 839-44.
46. Dock, G., *The influence of complicating diseases upon leukemia*. Am J Med Sci, 1904. **127**: p. 563-592.
47. DePace, N., *Sulla scomparsa di un enorme cancro vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica*. Ginecologia, 1912. **9**: p. 82-89.
48. Pack, G.T., *Note on the experimental use of rabies vaccine for melanomatosis*. AMA Arch Derm Syphilol, 1950. **62**(5): p. 694-5.
49. Newman, W. and Southam, C.M., *Virus treatment in advanced cancer; a pathological study of fifty-seven cases*. Cancer, 1954. **7**(1): p. 106-18.
50. Southam, C.M., Hilleman, M.R. and Werner, J.H., *Pathogenicity and oncolytic capacity of RI virus strain RI-67 in man*. J Lab Clin Med, 1956. **47**(4): p. 573-82.
51. Southam, C.M. and Moore, A.E., *Clinical studies of viruses as antineoplastic agents with particular reference to Egypt 101 virus*. Cancer, 1952. **5**(5): p. 1025-34.
52. Southam, C.M. and Moore, A.E., *Induced virus infections in man by the Egypt isolates of West Nile virus*. Am J Trop Med Hyg, 1954. **3**(1): p. 19-50.
53. Southam, C.M., Noyes, W.F. and Mellors, R., *Virus in human cancer cells in vivo*. Virology, 1958. **5**(2): p. 395-8.
54. Baum, C., Dullmann, J., Li, Z., Fehse, B., Meyer, J., Williams, D.A. and von Kalle, C., *Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells*. Blood, 2003. **101**(6): p. 2099-114.
55. Nadeau, I. and Kamen, A., *Production of adenovirus vector for gene therapy*. Biotechnol Adv, 2003. **20**(7-8): p. 475-89.
56. Harui, A., Suzuki, S., Kochanek, S. and Mitani, K., *Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors*. J Virol, 1999. **73**(7): p. 6141-6.
57. Stephen, S.L., Montini, E., Sivanandam, V.G., Al-Dhalimy, M., Kestler, H.A., Finegold, M., Grompe, M. and Kochanek, S., *Chromosomal integration of adenoviral vector DNA in vivo*. J Virol, 2010. **84**(19): p. 9987-94.
58. Linden, R.M., Ward, P., Giraud, C., Winocour, E. and Berns, K.I., *Site-specific integration by adeno-associated virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11288-94.
59. Monahan, P.E. and Samulski, R.J., *AAV vectors: is clinical success on the horizon?* Gene Ther, 2000. **7**(1): p. 24-30.
60. Lachmann, R.H. and Efstathiou, S., *Use of herpes simplex virus type 1 for transgene expression within the nervous system*. Clin Sci (Lond), 1999. **96**(6): p. 533-41.
61. Kaufman, H.L., DeRaffele, G., Mitcham, J., Moroziewicz, D., Cohen, S.M., Hurst-Wicker, K.S., Cheung, K., Lee, D.S., Divito, J., Voulo, M., Donovan, J., Dolan, K., Manson, K., Panicali, D., Wang, E., Hörig, H. and Marincola, F.M., *Targeting the*

- local tumor microenvironment with vaccinia virus expressing B7.1 for the treatment of melanoma*. The Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(7): p. 1903-1912.
62. Seal, B.S., King, D.J. and Sellers, H.S., *The avian response to Newcastle disease virus*. Dev Comp Immunol, 2000. **24**(2-3): p. 257-68.
63. Csatory, L.K., Moss, R.W., Beuth, J., Torocsik, B., Szeberenyi, J. and Bakacs, T., *Beneficial treatment of patients with advanced cancer using a Newcastle disease virus vaccine (MTH-68/H)*. Anticancer Res, 1999. **19**(1B): p. 635-8.
64. Batliwalla, F.M., Bateman, B.A., Serrano, D., Murray, D., Macphail, S., Maino, V.C., Ansel, J.C., Gregersen, P.K. and Armstrong, C.A., *A 15-year follow-up of AJCC stage III malignant melanoma patients treated postsurgically with Newcastle disease virus (NDV) oncolysate and determination of alterations in the CD8 T cell repertoire*. Mol Med, 1998. **4**(12): p. 783-94.
65. Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H. and Ward, T.G., *Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture*. Proc Soc Exp Biol Med, 1953. **84**(3): p. 570-3.
66. Davison, A.J., Benko, M. and Harrach, B., *Genetic content and evolution of adenoviruses*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 11): p. 2895-908.
67. Lukashok, S.A. and Horwitz, M.S., *New perspectives in adenoviruses*. Curr Clin Top Infect Dis, 1998. **18**: p. 286-305.
68. Fabry, C.M., Rosa-Calatrava, M., Conway, J.F., Zubieta, C., Cusack, S., Ruigrok, R.W. and Schoehn, G., *A quasi-atomic model of human adenovirus type 5 capsid*. EMBO J, 2005. **24**(9): p. 1645-54.
69. Berk, A.J., *Adenovirus promoters and E1A transactivation*. Annu Rev Genet, 1986. **20**: p. 45-79.
70. Sundararajan, R., Cuconati, A., Nelson, D. and White, E., *Tumor necrosis factor- α induces Bax-Bak interaction and apoptosis, which is inhibited by adenovirus E1B 19K*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 45120-7.
71. de Jong, R.N., van der Vliet, P.C. and Brenkman, A.B., *Adenovirus DNA replication: protein priming, jumping back and the role of the DNA binding protein DBP*. Curr Top Microbiol Immunol, 2003. **272**: p. 187-211.
72. Bennett, E.M., Bennink, J.R., Yewdell, J.W. and Brodsky, F.M., *Cutting edge: adenovirus E19 has two mechanisms for affecting class I MHC expression*. J Immunol, 1999. **162**(9): p. 5049-52.
73. Tauber, B. and Dobner, T., *Molecular regulation and biological function of adenovirus early genes: the E4 ORFs*. Gene, 2001. **278**(1-2): p. 1-23.
74. Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L. and Finberg, R.W., *Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5*. Science, 1997. **275**(5304): p. 1320-3.
75. Roelvink, P.W., Mi Lee, G., Einfeld, D.A., Kovesdi, I. and Wickham, T.J., *Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae*. Science, 1999. **286**(5444): p. 1568-71.
76. Tomko, R.P., Xu, R. and Philipson, L., *HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 3352-6.
77. Chiu, C.Y., Mathias, P., Nemerow, G.R. and Stewart, P.L., *Structure of adenovirus complexed with its internalization receptor, alphavbeta5 integrin*. J Virol, 1999. **73**(8): p. 6759-68.

78. Meier, O., Boucke, K., Hammer, S.V., Keller, S., Stidwill, R.P., Hemmi, S. and Greber, U.F., *Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake*. J Cell Biol, 2002. **158**(6): p. 1119-31.
79. Nemerow, G.R. and Stewart, P.L., *Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery*. Microbiol Mol Biol Rev, 1999. **63**(3): p. 725-34.
80. Wickham, T.J., Mathias, P., Cheresch, D.A. and Nemerow, G.R., *Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment*. Cell, 1993. **73**(2): p. 309-19.
81. Meier, O. and Greber, U.F., *Adenovirus endocytosis*. J Gene Med, 2004. **6 Suppl 1**: p. S152-63.
82. Chardonnet, Y. and Dales, S., *Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. I. Penetration of type 5 and intracellular release of the DNA genome*. Virology, 1970. **40**(3): p. 462-77.
83. Greber, U.F., Willetts, M., Webster, P. and Helenius, A., *Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells*. Cell, 1993. **75**(3): p. 477-86.
84. Suomalainen, M., Nakano, M.Y., Keller, S., Boucke, K., Stidwill, R.P. and Greber, U.F., *Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus*. J Cell Biol, 1999. **144**(4): p. 657-72.
85. Strunze, S., Trotman, L.C., Boucke, K. and Greber, U.F., *Nuclear targeting of adenovirus type 2 requires CRM1-mediated nuclear export*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(6): p. 2999-3009.
86. Saphire, A.C., Guan, T., Schirmer, E.C., Nemerow, G.R. and Gerace, L., *Nuclear import of adenovirus DNA in vitro involves the nuclear protein import pathway and hsc70*. J Biol Chem, 2000. **275**(6): p. 4298-304.
87. Trotman, L.C., Mosberger, N., Fornerod, M., Stidwill, R.P. and Greber, U.F., *Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(12): p. 1092-100.
88. Curiel, D. and Douglas, J., *Adenoviral vectors for gene therapy*. 2002: Academic Press.
89. Flint, J. and Shenk, T., *Viral transactivating proteins*. Annu Rev Genet, 1997. **31**: p. 177-212.
90. Sha, J., Ghosh, M.K., Zhang, K. and Harter, M.L., *E1A interacts with two opposing transcriptional pathways to induce quiescent cells into S phase*. J Virol, 2010. **84**(8): p. 4050-9.
91. Berkner, K.L., *Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes*. Biotechniques, 1988. **6**(7): p. 616-29.
92. Huebner, R.J., Rowe, W.P., Schatten, W.E., Smith, R.R. and Thomas, L.B., *Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix*. Cancer, 1956. **9**(6): p. 1211-8.
93. Georgiades, J., Zielinski, T., Cicholska, A. and Jordan, E., *Research on the oncolytic effect of APC viruses in cancer of the cervix uteri; preliminary report*. Biul Inst Med Morsk Gdansk, 1959. **10**: p. 49-57.
94. Zielinski, T. and Jordan, E., *[Remote results of clinical observation of the oncolytic action of adenoviruses on cervix cancer]*. Nowotwory, 1969. **19**(3): p. 217-21.
95. Amalfitano, A., Hauser, M.A., Hu, H., Serra, D., Begy, C.R. and Chamberlain, J.S., *Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted*. J Virol, 1998. **72**(2): p. 926-33.

96. Lusky, M., Christ, M., Rittner, K., Dieterle, A., Dreyer, D., Mourot, B., Schultz, H., Stoeckel, F., Pavirani, A. and Mehtali, M., *In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted*. J Virol, 1998. **72**(3): p. 2022-32.
97. Moorhead, J.W., Clayton, G.H., Smith, R.L. and Schaack, J., *A replication-incompetent adenovirus vector with the preterminal protein gene deleted efficiently transduces mouse ears*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 1046-53.
98. Hardy, S., Kitamura, M., Harris-Stansil, T., Dai, Y. and Phipps, M.L., *Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination*. J Virol, 1997. **71**(3): p. 1842-9.
99. Lieber, A., Steinwaerder, D.S., Carlson, C.A. and Kay, M.A., *Integrating adenovirus-adeno-associated virus hybrid vectors devoid of all viral genes*. J Virol, 1999. **73**(11): p. 9314-24.
100. Crystal, R.G., McElvaney, N.G., Rosenfeld, M.A., Chu, C.S., Mastrangeli, A., Hay, J.G., Brody, S.L., Jaffe, H.A., Eissa, N.T. and Danel, C., *Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis*. Nat Genet, 1994. **8**(1): p. 42-51.
101. Blagosklonny, M.V. and el-Deiry, W.S., *In vitro evaluation of a p53-expressing adenovirus as an anti-cancer drug*. Int J Cancer, 1996. **67**(3): p. 386-92.
102. Soussi, T. and Lozano, G., *p53 mutation heterogeneity in cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **331**(3): p. 834-42.
103. Clayman, G.L., el-Naggar, A.K., Lippman, S.M., Henderson, Y.C., Frederick, M., Merritt, J.A., Zumstein, L.A., Timmons, T.M., Liu, T.J., Ginsberg, L., Roth, J.A., Hong, W.K., Brusio, P. and Goepfert, H., *Adenovirus-mediated p53 gene transfer in patients with advanced recurrent head and neck squamous cell carcinoma*. J Clin Oncol, 1998. **16**(6): p. 2221-32.
104. Peng, Z., *Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers*. Hum Gene Ther, 2005. **16**(9): p. 1016-27.
105. Pearson, S., Jia, H. and Kandachi, K., *China approves first gene therapy*. Nat Biotech, 2004. **22**(1): p. 3-4.
106. Martuza, R.L., Malick, A., Markert, J.M., Ruffner, K.L. and Coen, D.M., *Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant*. Science, 1991. **252**(5007): p. 854-6.
107. Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A. and McCormick, F., *An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells*. Science, 1996. **274**(5286): p. 373-6.
108. Holm, P.S., Bergmann, S., Jurchott, K., Lage, H., Brand, K., Ladhoff, A., Mantwill, K., Curiel, D.T., Dobbstein, M., Dietel, M., Gansbacher, B. and Royer, H.D., *YB-1 relocates to the nucleus in adenovirus-infected cells and facilitates viral replication by inducing E2 gene expression through the E2 late promoter*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 10427-34.
109. Crompton, A.M. and Kirn, D.H., *From ONYX-015 to armed vaccinia viruses: the education and evolution of oncolytic virus development*. Curr Cancer Drug Targets, 2007. **7**(2): p. 133-9.
110. Onyx Pharmaceuticals Inc., *Historical Timeline* (<http://www.onyx-pharm.com/view.cfm/645/Historical-Timeline>). 2009.
111. Yu, W. and Fang, H., *Clinical trials with oncolytic adenovirus in China*. Curr Cancer Drug Targets, 2007. **7**(2): p. 141-8.

112. Garber, K., *China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(5): p. 298-300.
113. Appaiahgari, M.B., Pandey, R.M. and Vrati, S., *Seroprevalence of neutralizing antibodies to adenovirus type 5 among children in India: implications for recombinant adenovirus-based vaccines*. Clin Vaccine Immunol, 2007. **14**(8): p. 1053-5.
114. D'Ambrosio, E., Del Grosso, N., Chicca, A. and Midulla, M., *Neutralizing antibodies against 33 human adenoviruses in normal children in Rome*. J Hyg (Lond), 1982. **89**(1): p. 155-61.
115. Vrancken Peeters, M.J., Perkins, A.L. and Kay, M.A., *Method for multiple portal vein infusions in mice: quantitation of adenovirus-mediated hepatic gene transfer*. Biotechniques, 1996. **20**(2): p. 278-85.
116. Nunes, F.A., Furth, E.E., Wilson, J.M. and Raper, S.E., *Gene transfer into the liver of nonhuman primates with E1-deleted recombinant adenoviral vectors: safety of readministration*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(15): p. 2515-26.
117. Dorer, D.E. and Nettelbeck, D.M., *Targeting cancer by transcriptional control in cancer gene therapy and viral oncolysis*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(7-8): p. 554-71.
118. Nettelbeck, D.M., *Cellular genetic tools to control oncolytic adenoviruses for virotherapy of cancer*. J Mol Med, 2008. **86**(4): p. 363-77.
119. Lundstrom, K., *Latest development in viral vectors for gene therapy*. Trends Biotechnol, 2003. **21**(3): p. 117-22.
120. Werner, T., *Models for prediction and recognition of eukaryotic promoters*. Mamm Genome, 1999. **10**(2): p. 168-75.
121. Nettelbeck, D.M., Jerome, V. and Muller, R., *Gene therapy: designer promoters for tumour targeting*. Trends Genet, 2000. **16**(4): p. 174-81.
122. Vile, R.G. and Hart, I.R., *Targeting of cytokine gene expression to malignant melanoma cells using tissue specific promoter sequences*. Ann Oncol, 1994. **5 Suppl 4**: p. 59-65.
123. Ring, C.J., Harris, J.D., Hurst, H.C. and Lemoine, N.R., *Suicide gene expression induced in tumour cells transduced with recombinant adenoviral, retroviral and plasmid vectors containing the ERBB2 promoter*. Gene Ther, 1996. **3**(12): p. 1094-103.
124. Nettelbeck, D.M., Rivera, A.A., Davydova, J., Dieckmann, D., Yamamoto, M. and Curiel, D.T., *Cyclooxygenase-2 promoter for tumour-specific targeting of adenoviral vectors to melanoma*. Melanoma Res, 2003. **13**(3): p. 287-92.
125. Arbuthnot, P.B., Bralet, M.P., Le Jossic, C., Dedieu, J.F., Perricaudet, M., Brechot, C. and Ferry, N., *In vitro and in vivo hepatoma cell-specific expression of a gene transferred with an adenoviral vector*. Hum Gene Ther, 1996. **7**(13): p. 1503-14.
126. Pang, S., Taneja, S., Dardashti, K., Cohan, P., Kaboo, R., Sokoloff, M., Tso, C.L., Dekernion, J.B. and Belldegrun, A.S., *Prostate tissue specificity of the prostate-specific antigen promoter isolated from a patient with prostate cancer*. Hum Gene Ther, 1995. **6**(11): p. 1417-26.
127. Rodriguez, R., Schuur, E.R., Lim, H.Y., Henderson, G.A., Simons, J.W. and Henderson, D.R., *Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells*. Cancer Res, 1997. **57**(13): p. 2559-63.
128. Richards, C.A., Austin, E.A. and Huber, B.E., *Transcriptional regulatory sequences of carcinoembryonic antigen: identification and use with cytosine*

- deaminase for tumor-specific gene therapy*. Hum Gene Ther, 1995. **6**(7): p. 881-93.
129. Sakiyama, S., Yu, L., Tomizawa, M., Shimada, H., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Ikematsu, S., Nakagawara, A. and Tagawa, M., *Utilization of the promoter region of the midkine gene as a tool to drive therapeutic genes in a tumor specific manner*. Adv Enzyme Regul, 2003. **43**: p. 57-66.
130. Siders, W.M., Halloran, P.J. and Fenton, R.G., *Transcriptional targeting of recombinant adenoviruses to human and murine melanoma cells*. Cancer Res, 1996. **56**(24): p. 5638-46.
131. Lu, B., Makhija, S.K., Nettelbeck, D.M., Rivera, A.A., Wang, M., Komarova, S., Zhou, F., Yamamoto, M., Haisma, H.J., Alvarez, R.D., Curiel, D.T. and Zhu, Z.B., *Evaluation of tumor-specific promoter activities in melanoma*. Gene Ther, 2005. **12**(4): p. 330-8.
132. Zhou, Y., Song, X., Jia, R., Wang, H., Dai, L., Xu, X., Gu, P., Ge, S. and Fan, X., *Radiation-inducible human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene therapy: a novel treatment for radioresistant uveal melanoma*. Pigment Cell & Melanoma Research, 2010. **23**(5): p. 661-674.
133. Sarkar, D., Su, Z.z., Park, E.S., Vozhilla, N., Dent, P., Curiel, D.T. and Fisher, P.B., *A cancer terminator virus eradicates both primary and distant human melanomas*. Cancer Gene Ther, 2008. **15**(5): p. 293-302.
134. Porte, H., Chastre, E., Prevot, S., Nordlinger, B., Empereur, S., Basset, P., Chambon, P. and Gespach, C., *Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes*. Int J Cancer, 1995. **64**(1): p. 70-5.
135. Ledda, F., Bravo, A.I., Adris, S., Bover, L., Mordoh, J. and Podhajcer, O.L., *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.
136. Ledda, M.F., Adris, S., Bravo, A.I., Kairiyama, C., Bover, L., Chernajovsky, Y., Mordoh, J. and Podhajcer, O.L., *Suppression of SPARC expression by antisense RNA abrogates the tumorigenicity of human melanoma cells*. Nat Med, 1997. **3**(2): p. 171-6.
137. Lane, T.F. and Sage, E.H., *The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions*. Faseb J, 1994. **8**(2): p. 163-73.
138. Schwarzbauer, J.E. and Spencer, C.S., *The Caenorhabditis elegans homologue of the extracellular calcium binding protein SPARC/osteonectin affects nematode body morphology and mobility*. Mol Biol Cell, 1993. **4**(9): p. 941-52.
139. Termine, J.D., Kleinman, H.K., Whitson, S.W., Conn, K.M., McGarvey, M.L. and Martin, G.R., *Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen*. Cell, 1981. **26**(1 Pt 1): p. 99-105.
140. Sage, H., Johnson, C. and Bornstein, P., *Characterization of a novel serum albumin-binding glycoprotein secreted by endothelial cells in culture*. J Biol Chem, 1984. **259**(6): p. 3993-4007.
141. Mason, I.J., Taylor, A., Williams, J.G., Sage, H. and Hogan, B.L., *Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryo parietal endoderm, is related to an endothelial cell 'culture shock' glycoprotein of Mr 43,000*. Embo J, 1986. **5**(7): p. 1465-72.
142. Brekken, R.A. and Sage, E.H., *SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix*. Matrix Biol, 2000. **19**(7): p. 569-80.

143. Martinek, N., Zou, R., Berg, M., Sodek, J. and Ringuette, M., *Evolutionary conservation and association of SPARC with the basal lamina in Drosophila*. Dev Genes Evol, 2002. **212**(3): p. 124-33.
144. Murphy-Ullrich, J.E., Lane, T.F., Pallero, M.A. and Sage, E.H., *SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the Ca(2+)-binding EF-hand*. J Cell Biochem, 1995. **57**(2): p. 341-50.
145. Rosenblatt, S., Bassuk, J.A., Alpers, C.E., Sage, E.H., Timpl, R. and Preissner, K.T., *Differential modulation of cell adhesion by interaction between adhesive and counter-adhesive proteins: characterization of the binding of vitronectin to osteonectin (BM40, SPARC)*. Biochem J, 1997. **324 (Pt 1)**: p. 311-9.
146. Maurer, P., Hohenadl, C., Hohenester, E., Gohring, W., Timpl, R. and Engel, J., *The C-terminal portion of BM-40 (SPARC/osteonectin) is an autonomously folding and crystallisable domain that binds calcium and collagen IV*. J Mol Biol, 1995. **253**(2): p. 347-57.
147. Raines, E.W., Lane, T.F., Iruela-Arispe, M.L., Ross, R. and Sage, E.H., *The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(4): p. 1281-5.
148. Robert, G., Gaggioli, C., Bailet, O., Chavey, C., Abbe, P., Aberdam, E., Sabatie, E., Cano, A., Garcia de Herreros, A., Ballotti, R. and Tartare-Deckert, S., *SPARC represses E-cadherin and induces mesenchymal transition during melanoma development*. Cancer Res, 2006. **66**(15): p. 7516-23.
149. Smit, D.J., Gardiner, B.B. and Sturm, R.A., *Osteonectin downregulates E-cadherin, induces osteopontin and focal adhesion kinase activity stimulating an invasive melanoma phenotype*. Int J Cancer, 2007. **121**(12): p. 2653-60.
150. Sosa, M.S., Girotti, M.R., Salvatierra, E., Prada, F., de Olmo, J.A., Gallango, S.J., Albar, J.P., Podhajcer, O.L. and Llera, A.S., *Proteomic analysis identified N-cadherin, clusterin, and HSP27 as mediators of SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteines) activity in melanoma cells*. Proteomics, 2007. **7**(22): p. 4123-34.
151. Alvarez, M.J., Prada, F., Salvatierra, E., Bravo, A.I., Lutzky, V.P., Carbone, C., Pitossi, F.J., Chuluyan, H.E. and Podhajcer, O.L., *Secreted protein acidic and rich in cysteine produced by human melanoma cells modulates polymorphonuclear leukocyte recruitment and antitumor cytotoxic capacity*. Cancer Res, 2005. **65**(12): p. 5123-32.
152. Lau, C.P., Poon, R.T., Cheung, S.T., Yu, W.C. and Fan, S.T., *SPARC and Hevin expression correlate with tumour angiogenesis in hepatocellular carcinoma*. J Pathol, 2006. **210**(4): p. 459-68.
153. Prada, F., Benedetti, L.G., Bravo, A.I., Alvarez, M.J., Carbone, C. and Podhajcer, O.L., *SPARC Endogenous Level, rather than Fibroblast-Produced SPARC or Stroma Reorganization Induced by SPARC, Is Responsible for Melanoma Cell Growth*. Journal of Investigative Dermatology, 2007. **127**(11): p. 2618-2628.
154. Sangaletti, S., Di Carlo, E., Gariboldi, S., Miotti, S., Cappetti, B., Parenza, M., Rumio, C., Brekken, R.A., Chiodoni, C. and Colombo, M.P., *Macrophage-Derived SPARC Bridges Tumor Cell-Extracellular Matrix Interactions toward Metastasis*. Cancer Research, 2008. **68**(21): p. 9050-9059.
155. Sangaletti, S., Stoppacciaro, A., Guiducci, C., Torrasi, M.R. and Colombo, M.P., *Leukocyte, rather than tumor-produced SPARC, determines stroma and collagen type IV deposition in mammary carcinoma*. J Exp Med, 2003. **198**(10): p. 1475-85.

156. Swaroop, A., Hogan, B.L. and Francke, U., *Molecular analysis of the cDNA for human SPARC/osteonectin/BM-40: sequence, expression, and localization of the gene to chromosome 5q31-q33*. Genomics, 1988. **2**(1): p. 37-47.
157. Findlay, D.M., Fisher, L.W., McQuillan, C.I., Termine, J.D. and Young, M.F., *Isolation of the osteonectin gene: evidence that a variable region of the osteonectin molecule is encoded within one exon*. Biochemistry, 1988. **27**(5): p. 1483-9.
158. Hafner, M., Zimmermann, K., Pottgiesser, J., Krieg, T. and Nischt, R., *A purine-rich sequence in the human BM-40 gene promoter region is a prerequisite for maximum transcription*. Matrix Biol, 1995. **14**(9): p. 733-41.
159. McVey, J.H., Nomura, S., Kelly, P., Mason, I.J. and Hogan, B.L., *Characterization of the mouse SPARC/osteonectin gene. Intron/exon organization and an unusual promoter region*. J Biol Chem, 1988. **263**(23): p. 11111-6.
160. Young, M.F., Findlay, D.M., Dominguez, P., Burbelo, P.D., McQuillan, C., Kopp, J.B., Robey, P.G. and Termine, J.D., *Osteonectin promoter. DNA sequence analysis and S1 endonuclease site potentially associated with transcriptional control in bone cells*. J Biol Chem, 1989. **264**(1): p. 450-6.
161. Breathnach, R. and Chambon, P., *Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins*. Annu Rev Biochem, 1981. **50**: p. 349-83.
162. Dominguez, P., Ibaraki, K., Robey, P.G., Hefferan, T.E., Termine, J.D. and Young, M.F., *Expression of the osteonectin gene potentially controlled by multiple cis- and trans-acting factors in cultured bone cells*. J Bone Miner Res, 1991. **6**(10): p. 1127-36.
163. Vogt, V.M., *Purification and further properties of single-strand-specific nuclease from Aspergillus oryzae*. Eur J Biochem, 1973. **33**(1): p. 192-200.
164. Vial, E., Perez, S. and Castellazzi, M., *Transcriptional control of SPARC by v-Jun and other members of the AP1 family of transcription factors*. Oncogene, 2000. **19**(43): p. 5020-9.
165. Chamboredon, S., Briggs, J., Vial, E., Hurault, J., Galvagni, F., Oliviero, S., Bos, T. and Castellazzi, M., *v-Jun downregulates the SPARC target gene by binding to the proximal promoter indirectly through Sp1/3*. Oncogene, 2003. **22**(26): p. 4047-61.
166. Ibaraki, K., Robey, P.G. and Young, M.F., *Partial characterization of a novel 'GGA' factor which binds to the osteonectin promoter in bovine bone cells*. Gene, 1993. **130**(2): p. 225-32.
167. Briggs, J., Chamboredon, S., Castellazzi, M., Kerry, J.A. and Bos, T.J., *Transcriptional upregulation of SPARC, in response to c-Jun overexpression, contributes to increased motility and invasion of MCF7 breast cancer cells*. Oncogene, 2002. **21**(46): p. 7077-91.
168. Reed, M.J. and Sage, E.H., *SPARC and the extracellular matrix: implications for cancer and wound repair*. Curr Top Microbiol Immunol, 1996. **213 (Pt 1)**: p. 81-94.
169. Bellahcene, A. and Castronovo, V., *Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer*. Am J Pathol, 1995. **146**(1): p. 95-100.
170. Martinez, N., Camacho, F.I., Algara, P., Rodriguez, A., Dopazo, A., Ruiz-Ballesteros, E., Martin, P., Martinez-Climent, J.A., Garcia-Conde, J., Menarguez, J., Solano, F., Mollejo, M. and Piris, M.A., *The molecular signature of mantle cell lymphoma reveals multiple signals favoring cell survival*. Cancer Res, 2003. **63**(23): p. 8226-32.

171. Yamashita, K., Upadhyay, S., Mimori, K., Inoue, H. and Mori, M., *Clinical significance of secreted protein acidic and rich in cysteine in esophageal carcinoma and its relation to carcinoma progression*. *Cancer*, 2003. **97**(10): p. 2412-9.
172. Brabender, J., Lord, R.V., Metzger, R., Park, J., Salonga, D., Danenberg, K.D., Danenberg, P.V., Holscher, A.H. and Schneider, P.M., *Differential SPARC mRNA expression in Barrett's oesophagus*. *Br J Cancer*, 2003. **89**(8): p. 1508-12.
173. Huang, H., Colella, S., Kurrer, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P. and Ohgaki, H., *Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays*. *Cancer Res*, 2000. **60**(24): p. 6868-74.
174. Golembieski, W.A., Ge, S., Nelson, K., Mikkelsen, T. and Rempel, S.A., *Increased SPARC expression promotes U87 glioblastoma invasion in vitro*. *Int J Dev Neurosci*, 1999. **17**(5-6): p. 463-72.
175. Rempel, S.A., Ge, S. and Gutierrez, J.A., *SPARC: a potential diagnostic marker of invasive meningiomas*. *Clin Cancer Res*, 1999. **5**(2): p. 237-41.
176. Hedvat, C.V., Comenzo, R.L., Teruya-Feldstein, J., Olshen, A.B., Ely, S.A., Osman, K., Zhang, Y., Kalakonda, N. and Nimer, S.D., *Insights into extramedullary tumour cell growth revealed by expression profiling of human plasmacytomas and multiple myeloma*. *Br J Haematol*, 2003. **122**(5): p. 728-44.
177. Le Bail, B., Faouzi, S., Boussarie, L., Guirouilh, J., Blanc, J.F., Carles, J., Bioulac-Sage, P., Balabaud, C. and Rosenbaum, J., *Osteonectin/SPARC is overexpressed in human hepatocellular carcinoma*. *J Pathol*, 1999. **189**(1): p. 46-52.
178. Lane, T.F., Iruela-Arispe, M.L., Johnson, R.S. and Sage, E.H., *SPARC is a source of copper-binding peptides that stimulate angiogenesis*. *J Cell Biol*, 1994. **125**(4): p. 929-43.
179. Brown, T.J., Shaw, P.A., Karp, X., Huynh, M.H., Begley, H. and Ringuette, M.J., *Activation of SPARC expression in reactive stroma associated with human epithelial ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 1999. **75**(1): p. 25-33.
180. Sato, N., Fukushima, N., Maehara, N., Matsubayashi, H., Koopmann, J., Su, G.H., Hruban, R.H. and Goggins, M., *SPARC/osteonectin is a frequent target for aberrant methylation in pancreatic adenocarcinoma and a mediator of tumor-stromal interactions*. *Oncogene*, 2003. **22**(32): p. 5021-30.
181. Gilles, C., Bassuk, J.A., Pulyaeva, H., Sage, E.H., Foidart, J.M. and Thompson, E.W., *SPARC/osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines*. *Cancer Res*, 1998. **58**(23): p. 5529-36.
182. Jacob, K., Webber, M., Benayahu, D. and Kleinman, H.K., *Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion: a possible mechanism for metastasis to bone*. *Cancer Res*, 1999. **59**(17): p. 4453-7.
183. Sawhney, R.S., *Expression and regulation of SPARC, fibronectin, and collagen IV by dexamethasone in lens epithelial cells*. *Cell Biol Int*, 2002. **26**(11): p. 971-83.
184. Nomura, S., Hashmi, S., McVey, J.H., Ham, J., Parker, M. and Hogan, B.L., *Evidence for positive and negative regulatory elements in the 5'-flanking sequence of the mouse *sparc* (osteonectin) gene*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(21): p. 12201-7.
185. Wrana, J.L., Overall, C.M. and Sodek, J., *Regulation of the expression of a secreted acidic protein rich in cysteine (SPARC) in human fibroblasts by transforming growth factor beta. Comparison of transcriptional and post-transcriptional control with fibronectin and type I collagen*. *Eur J Biochem*, 1991. **197**(2): p. 519-28.

186. Fujita, T., Shiba, H., Sakata, M., Uchida, Y., Ogawa, T. and Kurihara, H., *Effects of transforming growth factor-beta 1 and fibronectin on SPARC expression in cultures of human periodontal ligament cells*. Cell Biol Int, 2002. **26**(12): p. 1065-72.
187. Damjanovski, S., Huynh, M.H., Motamed, K., Sage, E.H. and Ringuette, M., *Regulation of SPARC expression during early Xenopus development: evolutionary divergence and conservation of DNA regulatory elements between amphibians and mammals*. Dev Genes Evol, 1998. **207**(7): p. 453-61.
188. Chandrasekhar, S., Harvey, A.K., Johnson, M.G. and Becker, G.W., *Osteonectin/SPARC is a product of articular chondrocytes/cartilage and is regulated by cytokines and growth factors*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1221**(1): p. 7-14.
189. Shiba, H., Nakamura, S., Shirakawa, M., Nakanishi, K., Okamoto, H., Satakeda, H., Noshiro, M., Kamihagi, K., Katayama, M. and Kato, Y., *Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation, the expression of osteonectin (SPARC) and alkaline phosphatase, and calcification in cultures of human pulp cells*. Dev Biol, 1995. **170**(2): p. 457-66.
190. Nakamura, S., Kamihagi, K., Satakeda, H., Katayama, M., Pan, H., Okamoto, H., Noshiro, M., Takahashi, K., Yoshihara, Y., Shimmei, M., Okada, Y. and Kato, Y., *Enhancement of SPARC (osteonectin) synthesis in arthritic cartilage. Increased levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and regulation by growth factors and cytokines in chondrocyte cultures*. Arthritis Rheum, 1996. **39**(4): p. 539-51.
191. Shiba, H., Fujita, T., Doi, N., Nakamura, S., Nakanishi, K., Takemoto, T., Hino, T., Noshiro, M., Kawamoto, T., Kurihara, H. and Kato, Y., *Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture*. J Cell Physiol, 1998. **174**(2): p. 194-205.
192. Kraemer, M., Tournaire, R., Dejong, V., Montreau, N., Briane, D., Derbin, C. and Binetruy, B., *Rat embryo fibroblasts transformed by c-Jun display highly metastatic and angiogenic activities in vivo and deregulate gene expression of both angiogenic and antiangiogenic factors*. Cell Growth Differ, 1999. **10**(3): p. 193-200.
193. Vial, E. and Castellazzi, M., *Down-regulation of the extracellular matrix protein SPARC in vSrc- and vJun-transformed chick embryo fibroblasts contributes to tumor formation in vivo*. Oncogene, 2000. **19**(14): p. 1772-82.
194. Nabel, G.J., *Development of optimized vectors for gene therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(2): p. 324-6.
195. Schuur, E.R., Henderson, G.A., Kmetec, L.A., Miller, J.D., Lamparski, H.G. and Henderson, D.R., *Prostate-specific antigen expression is regulated by an upstream enhancer*. J Biol Chem, 1996. **271**(12): p. 7043-51.
196. Lee, S.J., Kim, H.S., Yu, R., Lee, K., Gardner, T.A., Jung, C., Jeng, M.H., Yeung, F., Cheng, L. and Kao, C., *Novel prostate-specific promoter derived from PSA and PSMA enhancers*. Mol Ther, 2002. **6**(3): p. 415-21.
197. Diaz, R.M., Eisen, T., Hart, I.R. and Vile, R.G., *Exchange of viral promoter/enhancer elements with heterologous regulatory sequences generates targeted hybrid long terminal repeat vectors for gene therapy of melanoma*. Journal of Virology, 1998. **72**(1): p. 789-795.

198. Ribault, S., Neuville, P., Mechine-Neuville, A., Auge, F., Parlakian, A., Gabbiani, G., Paulin, D. and Calenda, V., *Chimeric smooth muscle-specific enhancer/promoters: valuable tools for adenovirus-mediated cardiovascular gene therapy*. *Circ Res*, 2001. **88**(5): p. 468-75.
199. Hwang, D.Y., Carlezon, W.A., Jr., Isacson, O. and Kim, K.S., *A high-efficiency synthetic promoter that drives transgene expression selectively in noradrenergic neurons*. *Hum Gene Ther*, 2001. **12**(14): p. 1731-40.
200. Frauli, M., Ribault, S., Neuville, P., Auge, F. and Calenda, V., *Adenoviral-mediated skeletal muscle transcriptional targeting using chimeric tissue-specific promoters*. *Med Sci Monit*, 2003. **9**(2): p. BR78-84.
201. Gehrke, S., Jerome, V. and Muller, R., *Chimeric transcriptional control units for improved liver-specific transgene expression*. *Gene*, 2003. **322**: p. 137-43.
202. Kramer, M.G., Barajas, M., Razquin, N., Berraondo, P., Rodrigo, M., Wu, C., Qian, C., Fortes, P. and Prieto, J., *In vitro and in vivo comparative study of chimeric liver-specific promoters*. *Mol Ther*, 2003. **7**(3): p. 375-85.
203. Wu, L., Matherly, J., Smallwood, A., Adams, J.Y., Billick, E., Beldegrun, A. and Carey, M., *Chimeric PSA enhancers exhibit augmented activity in prostate cancer gene therapy vectors*. *Gene Ther*, 2001. **8**(18): p. 1416-26.
204. Liu, B.H., Wang, X., Ma, Y.X. and Wang, S., *CMV enhancer/human PDGF-beta promoter for neuron-specific transgene expression*. *Gene Ther*, 2004. **11**(1): p. 52-60.
205. Yew, N.S., Przybylska, M., Ziegler, R.J., Liu, D. and Cheng, S.H., *High and sustained transgene expression in vivo from plasmid vectors containing a hybrid ubiquitin promoter*. *Mol Ther*, 2001. **4**(1): p. 75-82.
206. Hernandez-Alcoceba, R., Pihalja, M., Nunez, G. and Clarke, M.F., *Evaluation of a new dual-specificity promoter for selective induction of apoptosis in breast cancer cells*. *Cancer Gene Ther*, 2001. **8**(4): p. 298-307.
207. Greco, O., Marples, B., Dachs, G.U., Williams, K.J., Patterson, A.V. and Scott, S.D., *Novel chimeric gene promoters responsive to hypoxia and ionizing radiation*. *Gene Ther*, 2002. **9**(20): p. 1403-11.
208. Modlich, U., Pugh, C.W. and Bicknell, R., *Increasing endothelial cell specific expression by the use of heterologous hypoxic and cytokine-inducible enhancers*. *Gene Ther*, 2000. **7**(10): p. 896-902.
209. Vaupel, P.W., *Oxygenation of solid tumours*. *Drug Resistance in Oncology*, ed. T.B.A. eds. 1993, New York: Marcel Dekker, Inc.
210. Kennedy, K.A., Teicher, B.A., Rockwell, S. and Sartorelli, A.C., *The hypoxic tumor cell: a target for selective cancer chemotherapy*. *Biochem Pharmacol*, 1980. **29**(1): p. 1-8.
211. Wouters, B.G. and Brown, J.M., *Cells at intermediate oxygen levels can be more important than the "hypoxic fraction" in determining tumor response to fractionated radiotherapy*. *Radiat Res*, 1997. **147**(5): p. 541-50.
212. Brown, J.M., *The hypoxic cell: a target for selective cancer therapy--eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award lecture*. *Cancer Res*, 1999. **59**(23): p. 5863-70.
213. Dong, Z. and Wang, J., *Hypoxia Selection of Death-resistant Cells: A ROLE FOR Bcl-XL*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(10): p. 9215-21.
214. Vaupel, P., Kallinowski, F. and Okunieff, P., *Blood flow, oxygen consumption and tissue oxygenation of human tumors*. *Adv Exp Med Biol*, 1990. **277**: p. 895-905.
215. Goldberg, M.A., Dunning, S.P. and Bunn, H.F., *Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein*. *Science*, 1988. **242**(4884): p. 1412-5.

216. Imagawa, S., Goldberg, M.A., Doweiko, J. and Bunn, H.F., *Regulatory elements of the erythropoietin gene*. Blood, 1991. **77**(2): p. 278-85.
217. Flamme, I., Frohlich, T., von Reutern, M., Kappel, A., Damert, A. and Risau, W., *HIF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels*. Mech Dev, 1997. **63**(1): p. 51-60.
218. Wang, G.L. and Semenza, G.L., *Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia*. J Biol Chem, 1993. **268**(29): p. 21513-8.
219. Wiesener, M.S., Jurgensen, J.S., Rosenberger, C., Scholze, C.K., Horstrup, J.H., Warnecke, C., Mandriota, S., Bechmann, I., Frei, U.A., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Bachmann, S., Maxwell, P.H. and Eckardt, K.U., *Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs*. FASEB J, 2003. **17**(2): p. 271-3.
220. Loboda, A., Jozkowicz, A. and Dulak, J., *HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical*. Mol Cells, 2010. **29**(5): p. 435-42.
221. Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A. and Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5510-4.
222. Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D. and Semenza, G.L., *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(9): p. 4604-13.
223. Minchenko, A., Salceda, S., Bauer, T. and Caro, J., *Hypoxia regulatory elements of the human vascular endothelial growth factor gene*. Cell Mol Biol Res, 1994. **40**(1): p. 35-9.
224. Firth, J.D., Ebert, B.L., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J., *Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6496-500.
225. Semenza, G.L., *Regulation of mammalian O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999. **15**: p. 551-78.
226. Bruick, R.K. and McKnight, S.L., *A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF*. Science, 2001. **294**(5545): p. 1337-40.
227. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S. and Kaelin, W.G., Jr., *HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing*. Science, 2001. **292**(5516): p. 464-8.
228. Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J., *Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation*. Science, 2001. **292**(5516): p. 468-72.
229. Tanimoto, K., Makino, Y., Pereira, T. and Poellinger, L., *Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein*. Embo J, 2000. **19**(16): p. 4298-309.
230. Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. and Ratcliffe, P.J., *The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis*. Nature, 1999. **399**(6733): p. 271-5.

231. Sutter, C.H., Laughner, E. and Semenza, G.L., *Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(9): p. 4748-53.
232. Semenza, G.L., *Transcriptional regulation of gene expression: mechanisms and pathophysiology*. Hum Mutat, 1994. **3**(3): p. 180-99.
233. Jiang, B.H., Zheng, J.Z., Leung, S.W., Roe, R. and Semenza, G.L., *Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension*. J Biol Chem, 1997. **272**(31): p. 19253-60.
234. Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C.J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R.K., Collen, D., Keshert, E. and Keshet, E., *Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis*. Nature, 1998. **394**(6692): p. 485-90.
235. Maxwell, P.H., Dachs, G.U., Gleadle, J.M., Nicholls, L.G., Harris, A.L., Stratford, I.J., Hankinson, O., Pugh, C.W. and Ratcliffe, P.J., *Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(15): p. 8104-9.
236. Ryan, H.E., Lo, J. and Johnson, R.S., *HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization*. Embo J, 1998. **17**(11): p. 3005-15.
237. Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwala, Z.M., Sutter, C.H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L.E., Madan, A., Semenza, G.L. and Bedi, A., *Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha*. Genes Dev, 2000. **14**(1): p. 34-44.
238. Zhong, H., De Marzo, A.M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D.A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W.B., Semenza, G.L. and Simons, J.W., *Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases*. Cancer Res, 1999. **59**(22): p. 5830-5.
239. Zagzag, D., Zhong, H., Scalzitti, J.M., Laughner, E., Simons, J.W. and Semenza, G.L., *Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression*. Cancer, 2000. **88**(11): p. 2606-18.
240. Gnarra, J.R., Tory, K., Weng, Y., Schmidt, L., Wei, M.H., Li, H., Latif, F., Liu, S., Chen, F., Duh, F.M. and et al., *Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma*. Nat Genet, 1994. **7**(1): p. 85-90.
241. Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M.M., Simons, J.W. and Semenza, G.L., *Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics*. Cancer Res, 2000. **60**(6): p. 1541-5.
242. Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Kouskoukis, C., Gatter, K.C., Harris, A.L. and Koukourakis, M.I., *Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha are related to vascular endothelial growth factor expression and a poorer prognosis in nodular malignant melanomas of the skin*. Melanoma Res, 2003. **13**(5): p. 493-501.
243. Rofstad, E.K., Rasmussen, H., Galappathi, K., Mathiesen, B., Nilsen, K. and Graff, B.A., *Hypoxia promotes lymph node metastasis in human melanoma xenografts by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator receptor*. Cancer Res, 2002. **62**(6): p. 1847-53.
244. Kunz, M., Hartmann, A., Flory, E., Toksoy, A., Koczan, D., Thiesen, H.J., Mukaida, N., Neumann, M., Rapp, U.R., Brocker, E.B. and Gillitzer, R., *Anoxia-induced up-*

- regulation of interleukin-8 in human malignant melanoma. A potential mechanism for high tumor aggressiveness.* Am J Pathol, 1999. **155**(3): p. 753-63.
245. Hasan, N.M., Adams, G.E., Joiner, M.C., Marshall, J.F. and Hart, I.R., *Hypoxia facilitates tumour cell detachment by reducing expression of surface adhesion molecules and adhesion to extracellular matrices without loss of cell viability.* Br J Cancer, 1998. **77**(11): p. 1799-805.
246. Krieg, M., Haas, R., Brauch, H., Acker, T., Flamme, I. and Plate, K.H., *Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function.* Oncogene, 2000. **19**(48): p. 5435-43.
247. Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A.R., Ryan, H.E., Johnson, R.S., Jefferson, A.B., Stokoe, D. and Giaccia, A.J., *Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression.* Genes Dev, 2000. **14**(4): p. 391-6.
248. Dachs, G.U., Patterson, A.V., Firth, J.D., Ratcliffe, P.J., Townsend, K.M., Stratford, I.J. and Harris, A.L., *Targeting gene expression to hypoxic tumor cells.* Nat Med, 1997. **3**(5): p. 515-20.
249. Binley, K., Askham, Z., Martin, L., Spearman, H., Day, D., Kingsman, S. and Naylor, S., *Hypoxia-mediated tumour targeting.* Gene Ther, 2003. **10**(7): p. 540-9.
250. Shibata, T., Giaccia, A.J. and Brown, J.M., *Hypoxia-inducible regulation of a prodrug-activating enzyme for tumor-specific gene therapy.* Neoplasia, 2002. **4**(1): p. 40-8.
251. Post, D.E. and Van Meir, E.G., *A novel hypoxia-inducible factor (HIF) activated oncolytic adenovirus for cancer therapy.* Oncogene, 2003. **22**(14): p. 2065-72.
252. Ghosh, S. and Karin, M., *Missing pieces in the NF-kappaB puzzle.* Cell, 2002. **109** **Suppl**: p. S81-96.
253. Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B., *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses.* Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 225-60.
254. Beg, A.A. and Baltimore, D., *An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death.* Science, 1996. **274**(5288): p. 782-4.
255. Van Antwerp, D.J., Martin, S.J., Kafri, T., Green, D.R. and Verma, I.M., *Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB.* Science, 1996. **274**(5288): p. 787-9.
256. Baldwin, A.S., *Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB.* J Clin Invest, 2001. **107**(3): p. 241-6.
257. Meyskens, F.L., Jr., Buckmeier, J.A., McNulty, S.E. and Tohidian, N.B., *Activation of nuclear factor-kappa B in human metastatic melanomacells and the effect of oxidative stress.* Clin Cancer Res, 1999. **5**(5): p. 1197-202.
258. Kashani-Sabet, M., Shaikh, L., Miller, J.R., 3rd, Nosrati, M., Ferreira, C.M., Debs, R.J. and Sagebiel, R.W., *NF-kappa B in the vascular progression of melanoma.* J Clin Oncol, 2004. **22**(4): p. 617-23.
259. Dhawan, P. and Richmond, A., *A novel NF-kappa B-inducing kinase-MAPK signaling pathway up-regulates NF-kappa B activity in melanoma cells.* J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 7920-8.
260. Yang, J. and Richmond, A., *Constitutive IkappaB kinase activity correlates with nuclear factor-kappaB activation in human melanoma cells.* Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4901-9.

261. Biswas, S., Chida, A.S. and Rahman, I., *Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling*. Biochem Pharmacol, 2006. **71**(5): p. 551-64.
262. Harman, D., *Free radicals in aging*. Mol Cell Biochem, 1988. **84**(2): p. 155-61.
263. Wu, W.S., *The signaling mechanism of ROS in tumor progression*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(4): p. 695-705.
264. Jackson, A.L. and Loeb, L.A., *The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer*. Mutat Res, 2001. **477**(1-2): p. 7-21.
265. Borrello, S., De Leo, M.E. and Galeotti, T., *Defective gene expression of MnSOD in cancer cells*. Mol Aspects Med, 1993. **14**(3): p. 253-8.
266. Picardo, M., Grammatico, P., Roccella, F., Roccella, M., Grandinetti, M., Del Porto, G. and Passi, S., *Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells and normal melanocytes from patients with melanoma*. J Invest Dermatol, 1996. **107**(3): p. 322-6.
267. Picardo, M., Maresca, V., Eibenschutz, L., De Bernardo, C., Rinaldi, R. and Grammatico, P., *Correlation between antioxidants and phototypes in melanocytes cultures. A possible link of physiologic and pathologic relevance*. J Invest Dermatol, 1999. **113**(3): p. 424-5.
268. Meyskens, F.L., Jr., McNulty, S.E., Buckmeier, J.A., Tohidian, N.B., Spillane, T.J., Kahlon, R.S. and Gonzalez, R.I., *Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(6): p. 799-808.
269. Liu, H., Colavitti, R., Rovira, I. and Finkel, T., *Redox-dependent transcriptional regulation*. Circ Res, 2005. **97**(10): p. 967-74.
270. Schafer, G., Cramer, T., Suske, G., Kemmner, W., Wiedenmann, B. and Hocker, M., *Oxidative stress regulates vascular endothelial growth factor-A gene transcription through Sp1- and Sp3-dependent activation of two proximal GC-rich promoter elements*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8190-8.
271. Trachootham, D., Alexandre, J. and Huang, P., *Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?* Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(7): p. 579-91.
272. Vincent, T., Pettersson, R.F., Crystal, R.G. and Leopold, P.L., *Cytokine-mediated downregulation of coxsackievirus-adenovirus receptor in endothelial cells*. J Virol, 2004. **78**(15): p. 8047-58.
273. Anders, M., Vieth, M., Rocken, C., Ebert, M., Pross, M., Gretschel, S., Schlag, P.M., Wiedenmann, B., Kemmner, W. and Hocker, M., *Loss of the coxsackie and adenovirus receptor contributes to gastric cancer progression*. Br J Cancer, 2009. **100**(2): p. 352-9.
274. Korn, W.M., Macal, M., Christian, C., Lacher, M.D., McMillan, A., Rauen, K.A., Warren, R.S. and Ferrell, L., *Expression of the coxsackievirus- and adenovirus receptor in gastrointestinal cancer correlates with tumor differentiation*. Cancer Gene Ther, 2006. **13**(8): p. 792-7.
275. Matsumoto, K., Shariat, S.F., Ayala, G.E., Rauen, K.A. and Lerner, S.P., *Loss of coxsackie and adenovirus receptor expression is associated with features of aggressive bladder cancer*. Urology, 2005. **66**(2): p. 441-6.
276. Hoffmann, D., Bayer, W., Heim, A., Potthoff, A., Nettelbeck, D.M. and Wildner, O., *Evaluation of twenty-one human adenovirus types and one infectivity-enhanced adenovirus for the treatment of malignant melanoma*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(4): p. 988-98.
277. Schmitz, M., Graf, C., Gut, T., Sirena, D., Peter, I., Dummer, R., Greber, U.F. and Hemmi, S., *Melanoma cultures show different susceptibility towards E1A-, E1B-*

- 19 kDa- and fiber-modified replication-competent adenoviruses. *Gene Ther*, 2006. **13**(11): p. 893-905.
278. Kim, M., Zinn, K.R., Barnett, B.G., Sumerel, L.A., Krasnykh, V., Curiel, D.T. and Douglas, J.T., *The therapeutic efficacy of adenoviral vectors for cancer gene therapy is limited by a low level of primary adenovirus receptors on tumour cells*. *Eur J Cancer*, 2002. **38**(14): p. 1917-26.
279. Liszewski, M.K., Post, T.W. and Atkinson, J.P., *Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster*. *Annu Rev Immunol*, 1991. **9**: p. 431-55.
280. Gaggar, A., Shayakhmetov, D.M. and Lieber, A., *CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses*. *Nat Med*, 2003. **9**(11): p. 1408-12.
281. Fishelson, Z., Donin, N., Zell, S., Schultz, S. and Kirschfink, M., *Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors*. *Mol Immunol*, 2003. **40**(2-4): p. 109-23.
282. Kawakami, Y., Li, H., Lam, J.T., Krasnykh, V., Curiel, D.T. and Blackwell, J.L., *Substitution of the adenovirus serotype 5 knob with a serotype 3 knob enhances multiple steps in virus replication*. *Cancer Res*, 2003. **63**(6): p. 1262-9.
283. Rivera, A.A., Davydova, J., Schierer, S., Wang, M., Krasnykh, V., Yamamoto, M., Curiel, D.T. and Nettelbeck, D.M., *Combining high selectivity of replication with fiber chimerism for effective adenoviral oncolysis of CAR-negative melanoma cells*. *Gene Ther*, 2004. **11**(23): p. 1694-702.
284. Volk, A.L., Rivera, A.A., Kanerva, A., Bauerschmitz, G., Dmitriev, I., Nettelbeck, D.M. and Curiel, D.T., *Enhanced adenovirus infection of melanoma cells by fiber-modification: incorporation of RGD peptide or Ad5/3 chimerism*. *Cancer Biol Ther*, 2003. **2**(5): p. 511-5.
285. Ono, H.A., Davydova, J.G., Adachi, Y., Takayama, K., Barker, S.D., Reynolds, P.N., Krasnykh, V.N., Kunisaki, C., Shimada, H., Curiel, D.T. and Yamamoto, M., *Promoter-controlled infectivity-enhanced conditionally replicative adenoviral vectors for the treatment of gastric cancer*. *J Gastroenterol*, 2005. **40**(1): p. 31-42.
286. Tyler, M.A., Ulasov, I.V., Borovjagin, A., Sonabend, A.M., Khramtsov, A., Han, Y., Dent, P., Fisher, P.B., Curiel, D.T. and Lesniak, M.S., *Enhanced transduction of malignant glioma with a double targeted Ad5/3-RGD fiber-modified adenovirus*. *Mol Cancer Ther*, 2006. **5**(9): p. 2408-16.
287. Tsuruta, Y., Pereboeva, L., Glasgow, J.N., Rein, D.T., Kawakami, Y., Alvarez, R.D., Rocconi, R.P., Siegal, G.P., Dent, P., Fisher, P.B. and Curiel, D.T., *A mosaic fiber adenovirus serotype 5 vector containing reovirus sigma 1 and adenovirus serotype 3 knob fibers increases transduction in an ovarian cancer ex vivo system via a coxsackie and adenovirus receptor-independent pathway*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(9): p. 2777-83.
288. Yamamoto, M. and Curiel, D.T., *Current issues and future directions of oncolytic adenoviruses*. *Mol Ther*, 2010. **18**(2): p. 243-50.
289. Bilbao, R., Bustos, M., Alzuguren, P., Pajares, M.J., Drozdik, M., Qian, C. and Prieto, J., *A blood-tumor barrier limits gene transfer to experimental liver cancer: the effect of vasoactive compounds*. *Gene Ther*, 2000. **7**(21): p. 1824-32.
290. Harrison, D., Sauthoff, H., Heitner, S., Jagirdar, J., Rom, W.N. and Hay, J.G., *Wild-type adenovirus decreases tumor xenograft growth, but despite viral persistence complete tumor responses are rarely achieved--deletion of the viral E1b-19-kD gene increases the viral oncolytic effect*. *Hum Gene Ther*, 2001. **12**(10): p. 1323-32.

291. Heise, C.C., Williams, A., Olesch, J. and Kirn, D.H., *Efficacy of a replication-competent adenovirus (ONYX-015) following intratumoral injection: intratumoral spread and distribution effects*. *Cancer Gene Ther*, 1999. **6**(6): p. 499-504.
292. Schor, S.L., Schor, A.M., Durning, P. and Rushton, G., *Skin fibroblasts obtained from cancer patients display foetal-like migratory behaviour on collagen gels*. *J Cell Sci*, 1985. **73**: p. 235-44.
293. Tentori, L., Vergati, M., Muzi, A., Levati, L., Ruffini, F., Forini, O., Vernole, P., Lacal, P.M. and Graziani, G., *Generation of an immortalized human endothelial cell line as a model of neovascular proliferating endothelial cells to assess chemosensitivity to anticancer drugs*. *Int J Oncol*, 2005. **27**(2): p. 525-35.
294. Bett, A.J., Prevec, L. and Graham, F.L., *Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors*. *J Virol*, 1993. **67**(10): p. 5911-21.
295. Lopez, M.V., Blanco, P., Viale, D.L., Cafferata, E.G., Carbone, C., Gould, D., Chernajovsky, Y. and Podhajcer, O.L., *Expression of a suicidal gene under control of the human secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) promoter in tumor or stromal cells led to the inhibition of tumor cell growth*. *Mol Cancer Ther*, 2006. **5**(10): p. 2503-11.
296. Juven-Gershon, T. and Kadonaga, J.T., *Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery*. *Dev Biol*, 2010. **339**(2): p. 225-9.
297. Butler, J.E. and Kadonaga, J.T., *Enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs*. *Genes Dev*, 2001. **15**(19): p. 2515-9.
298. Garraway, I.P., Semple, K. and Smale, S.T., *Transcription of the lymphocyte-specific terminal deoxynucleotidyltransferase gene requires a specific core promoter structure*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(9): p. 4336-41.
299. Curiel, D. and Douglas, J.T., *Adenoviral vectors for gene therapy*. 2002, Amsterdam ; Boston: Academic Press. xxviii, 677 71-85.
300. Ganly, I., Mautner, V. and Balmain, A., *Productive replication of human adenoviruses in mouse epidermal cells*. *J Virol*, 2000. **74**(6): p. 2895-9.
301. Lopez, M.V., Viale, D.L., Cafferata, E.G., Bravo, A.I., Carbone, C., Gould, D., Chernajovsky, Y. and Podhajcer, O.L., *Tumor associated stromal cells play a critical role on the outcome of the oncolytic efficacy of conditionally replicative adenoviruses*. *PLoS ONE*, 2009. **4**(4): p. e5119.
302. Policastro, L.L., Ibanez, I.L., Duran, H.A., Soria, G., Gottifredi, V. and Podhajcer, O.L., *Suppression of cancer growth by nonviral gene therapy based on a novel reactive oxygen species-responsive promoter*. *Mol Ther*, 2009. **17**(8): p. 1355-64.
303. Pugh, C.W., *Oxygen sensing in cancer*. *Ann Med*, 2003. **35**(6): p. 380-90.
304. Fruehauf, J.P. and Meyskens, F.L., Jr., *Reactive oxygen species: a breath of life or death?* *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(3): p. 789-94.
305. Meyskens, F.L., Jr., Chau, H.V., Tohidian, N. and Buckmeier, J., *Luminol-enhanced chemiluminescent response of human melanocytes and melanoma cells to hydrogen peroxide stress*. *Pigment Cell Res*, 1997. **10**(3): p. 184-9.
306. Martin-Duque, P., Jezard, S., Kaftansis, L. and Vassaux, G., *Direct comparison of the insulating properties of two genetic elements in an adenoviral vector containing two different expression cassettes*. *Hum Gene Ther*, 2004. **15**(10): p. 995-1002.
307. Shen, B.H. and Hermiston, T.W., *Effect of hypoxia on Ad5 infection, transgene expression and replication*. *Gene Ther*, 2005. **12**(11): p. 902-10.

308. Hay, J.G., *The potential impact of hypoxia on the success of oncolytic virotherapy*. *Curr Opin Mol Ther*, 2005. **7**(4): p. 353-8.
309. Thomas, M.A., *Syrian Hamster as a Permissive Immunocompetent Animal Model for the Study of Oncolytic Adenovirus Vectors*. *Cancer Research*, 2006. **66**(3): p. 1270-1276.
310. National Cancer Institute. *Cancer Trends Progress Report - 2009/2010 Update - Persons Years of Life Lost*. 2010 [cited 2010 22-11-2010]; Available from: http://progressreport.cancer.gov/doc_detail.asp?pid=1&did=2009&chid=96&cid=930&mid=.
311. National Cancer Institute. *Cancer Trends Progress Report - 2009/2010 Update - Incidence*. 2010 [cited 2010 22-11-2010]; Available from: http://progressreport.cancer.gov/doc_detail.asp?pid=1&did=2009&chid=93&cid=920&mid=.
312. Ganesan, P. and Bakhshi, S., *Systemic therapy for melanoma*. *Natl Med J India*, 2010. **23**(1): p. 21-7.
313. National Comprehensive Cancer Network. *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology - Melanoma*. 2010 [cited 2010 23-11-2010]; Available from: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/melanoma.pdf.
314. Atkins, M.B., Kunkel, L., Sznol, M. and Rosenberg, S.A., *High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update*. *Cancer J Sci Am*, 2000. **6 Suppl 1**: p. S11-4.
315. Gillet, J.-P., Macadangdang, B., Fathke, R.L., Gottesman, M.M. and Kimchi-Sarfaty, C., *The Development of Gene Therapy: From Monogenic Recessive Disorders to Complex Diseases Such as Cancer*, in *Gene Therapy of Cancer*, W. Walther and U.S. Stein, Editors. 2009, Humana Press. p. 5-54.
316. Hardcastle, J., Kurozumi, K., Chiocca, E.A. and Kaur, B., *Oncolytic viruses driven by tumor-specific promoters*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2007. **7**(2): p. 181-9.
317. Cody, J.J. and Douglas, J.T., *Armed replicating adenoviruses for cancer virotherapy*. *Cancer Gene Ther*, 2009. **16**(6): p. 473-88.
318. Sturm, R.A., Satyamoorthy, K., Meier, F., Gardiner, B.B., Smit, D.J., Vaidya, B. and Herlyn, M., *Osteonectin/SPARC induction by ectopic beta(3) integrin in human radial growth phase primary melanoma cells*. *Cancer Res*, 2002. **62**(1): p. 226-32.
319. Satyamoorthy, K., Samulewicz, S.J., Thornburg, L.D., Basu, A. and Howe, C.C., *Identification of an intronic enhancer that nullifies upstream repression of SPARC gene expression*. *Nucleic Acids Res*, 1997. **25**(15): p. 3169-74.
320. Kayed, H., Jiang, X., Keleg, S., Jesnowski, R., Giese, T., Berger, M.R., Esposito, I., Lohr, M., Friess, H. and Kleeff, J., *Regulation and functional role of the Runt-related transcription factor-2 in pancreatic cancer*. *Br J Cancer*, 2007. **97**(8): p. 1106-15.
321. Zabuawala, T., Taffany, D.A., Sharma, S.M., Merchant, A., Adair, B., Srinivasan, R., Rosol, T.J., Fernandez, S., Huang, K., Leone, G. and Ostrowski, M.C., *An ets2-driven transcriptional program in tumor-associated macrophages promotes tumor metastasis*. *Cancer Res*, 2010. **70**(4): p. 1323-33.
322. Gershenzon, N.I. and Ioshikhes, I.P., *Synergy of human Pol II core promoter elements revealed by statistical sequence analysis*. *Bioinformatics*, 2005. **21**(8): p. 1295-300.
323. Juven-Gershon, T., Hsu, J.Y. and Kadonaga, J.T., *Caudal, a key developmental regulator, is a DPE-specific transcriptional factor*. *Genes Dev*, 2008. **22**(20): p. 2823-30.

324. Kulis, M. and Esteller, M., *DNA methylation and cancer*. Adv Genet, 2010. **70**: p. 27-56.
325. Gao, J., Song, J., Huang, H., Li, Z., Du, Y., Cao, J., Li, M., Lv, S., Lin, H. and Gong, Y., *Methylation of the SPARC gene promoter and its clinical implication in pancreatic cancer*. J Exp Clin Cancer Res, 2010. **29**: p. 28.
326. Suzuki, M., Hao, C., Takahashi, T., Shigematsu, H., Shivapurkar, N., Sathyanarayana, U.G., Iizasa, T., Fujisawa, T., Hiroshima, K. and Gazdar, A.F., *Aberrant methylation of SPARC in human lung cancers*. Br J Cancer, 2005. **92**(5): p. 942-8.
327. Sova, P., *Discovery of Novel Methylation Biomarkers in Cervical Carcinoma by Global Demethylation and Microarray Analysis*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2006. **15**(1): p. 114-123.
328. Yang, E., Kang, H.J., Koh, K.H., Rhee, H., Kim, N.K. and Kim, H., *Frequent inactivation of SPARC by promoter hypermethylation in colon cancers*. Int J Cancer, 2007. **121**(3): p. 567-75.
329. Socha, M.J., Said, N., Dai, Y., Kwong, J., Ramalingam, P., Trieu, V., Desai, N., Mok, S.C. and Motamed, K., *Aberrant promoter methylation of SPARC in ovarian cancer*. Neoplasia, 2009. **11**(2): p. 126-35.
330. Yang, Q., Tian, Y., Ostler, K.R., Chlenski, A., Guerrero, I., Salwen, H.R., Godley, L.A. and Cohn, S.L., *Epigenetic alterations differ in phenotypically distinct human neuroblastoma cell lines*. BMC Cancer, 2010. **10**(1): p. 286.
331. Guweidhi, A., Kleeff, J.R., Adwan, H., Giese, N.A., Wente, M.N., Giese, T., B?chler, M.W., Berger, M.R. and Friess, H., *Osteonectin Influences Growth and Invasion of Pancreatic Cancer Cells*. Annals of Surgery, 2005. **242**(2): p. 224-234.
332. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
333. Sengupta, S., den Boon, J.A., Chen, I.H., Newton, M.A., Stanhope, S.A., Cheng, Y.J., Chen, C.J., Hildesheim, A., Sugden, B. and Ahlquist, P., *MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(15): p. 5874-5878.
334. Xu, H., Cheung, I.Y., Guo, H.F. and Cheung, N.K., *MicroRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based therapy of human solid tumors*. Cancer Res, 2009. **69**(15): p. 6275-81.
335. Nguyen, T., Kuo, C., Nicholl, M.B., Sim, M.S., Turner, R.R., Morton, D.L. and Hoon, D.S., *Down-regulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma*. Epigenetics, 2011. **6**(3): p. 26-32.
336. Kapinas, K., Kessler, C.B. and Delany, A.M., *miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling*. J Cell Biochem, 2009. **108**(1): p. 216-24.
337. van Rooij, E., Sutherland, L.B., Thatcher, J.E., DiMaio, J.M., Naseem, R.H., Marshall, W.S., Hill, J.A. and Olson, E.N., *Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(35): p. 13027-13032.
338. Wu, R.X., Laser, M., Han, H., Varadarajulu, J., Schuh, K., Hallhuber, M., Hu, K., Ertl, G., Hauck, C.R. and Ritter, O., *Fibroblast migration after myocardial infarction is regulated by transient SPARC expression*. J Mol Med, 2006. **84**(3): p. 241-52.

339. Fecker, L.F., Ruckert, S., Kurbanov, B.M., Schmude, M., Stockfleth, E., Fechner, H. and Eberle, J., *Efficient melanoma cell killing and reduced melanoma growth in mice by a selective replicating adenovirus armed with TNF-related apoptosis inducing ligand*. Hum Gene Ther, 2010.
340. Georger, B., Vassal, G., Opolon, P., Dirven, C.M., Morizet, J., Laudani, L., Grill, J., Giaccone, G., Vandertop, W.P., Gerritsen, W.R. and van Beusechem, V.W., *Oncolytic activity of p53-expressing conditionally replicative adenovirus AdDelta24-p53 against human malignant glioma*. Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5753-9.
341. He, X., Liu, J., Yang, C., Su, C., Zhou, C., Zhang, Q., Li, L., Wu, H., Liu, X., Wu, M. and Qian, Q., *5/35 Fiber-Modified Conditionally Replicative Adenovirus Armed with p53 Shows Increased Tumor-Suppressing Capacity to Breast Cancer Cells*. Hum Gene Ther, 2010.
342. Horst, M., Brouwer, E., Verwijnen, S., Rodijk, M., de Jong, M., Hoeben, R., de Leeuw, B. and Smitt, P.S., *Targeting malignant gliomas with a glial fibrillary acidic protein (GFAP)-selective oncolytic adenovirus*. J Gene Med, 2007. **9**(12): p. 1071-9.
343. Liu, X., Qian, Q., Xu, P., Wolf, F., Zhang, J., Zhang, D., Li, C. and Huang, Q., *A novel conditionally replicating 'armed' adenovirus selectively targeting gastrointestinal tumors with aberrant wnt signaling*. Hum Gene Ther, 2010.
344. Lukashev, A.N., Fuerer, C., Chen, M.J., Searle, P. and Iggo, R., *Late expression of nitroreductase in an oncolytic adenovirus sensitizes colon cancer cells to the prodrug CB1954*. Hum Gene Ther, 2005. **16**(12): p. 1473-83.
345. Doronin, K., Shashkova, E.V., May, S.M., Hofherr, S.E. and Barry, M.A., *Chemical modification with high molecular weight polyethylene glycol reduces transduction of hepatocytes and increases efficacy of intravenously delivered oncolytic adenovirus*. Hum Gene Ther, 2009. **20**(9): p. 975-88.
346. Gonzalez-Carmona, M.A., Lukacs-Kornek, V., Timmerman, A., Shabani, S., Kornek, M., Vogt, A., Yildiz, Y., Sievers, E., Schmidt-Wolf, I.G., Caselmann, W.H., Sauerbruch, T. and Schmitz, V., *CD40ligand-expressing dendritic cells induce regression of hepatocellular carcinoma by activating innate and acquired immunity in vivo*. Hepatology, 2008. **48**(1): p. 157-68.
347. Kanagawa, N., Niwa, M., Hatanaka, Y., Tani, Y., Nakagawa, S., Fujita, T., Yamamoto, A. and Okada, N., *CC-chemokine ligand 17 gene therapy induces tumor regression through augmentation of tumor-infiltrating immune cells in a murine model of preexisting CT26 colon carcinoma*. Int J Cancer, 2007. **121**(9): p. 2013-22.
348. Guo, X., Evans, T.R., Somanath, S., Armesilla, A.L., Darling, J.L., Schatzlein, A., Cassidy, J. and Wang, W., *In vitro evaluation of cancer-specific NF-kappaB-CEA enhancer-promoter system for 5-fluorouracil prodrug gene therapy in colon cancer cell lines*. Br J Cancer, 2007. **97**(6): p. 745-54.
349. Lee, J.Y., Lee, Y.S., Kim, J.M., Kim, K.L., Lee, J.S., Jang, H.S., Shin, I.S., Suh, W., Jeon, E.S., Byun, J. and Kim, D.K., *A novel chimeric promoter that is highly responsive to hypoxia and metals*. Gene Ther, 2006. **13**(10): p. 857-68.
350. Meynier de Salinelles, V., Berenbaum, F., Jacques, C., Salvat, C., Olivier, J.L., Bereziat, G., Raymondjean, M. and Massaad, C., *Design of a chimeric promoter induced by pro-inflammatory mediators in articular chondrocytes*. FEBS Lett, 2002. **518**(1-3): p. 67-71.
351. Poulsen, T.T., Pedersen, N., Juel, H. and Poulsen, H.S., *A chimeric fusion of the hASH1 and EZH2 promoters mediates high and specific reporter and suicide*

- gene expression and cytotoxicity in small cell lung cancer cells.* Cancer Gene Ther, 2008. **15**(9): p. 563-75.
352. Hattori, T., Hayashi, H., Chiba, T. and Onozaki, K., *Activation of two distinct anti-proliferative pathways, apoptosis and p38 MAP kinase-dependent cell cycle arrest, by tumor necrosis factor in human melanoma cell line A375.* Eur Cytokine Netw, 2001. **12**(2): p. 244-52.
353. Paiva, L.R., Binny, C., Ferreira, S.C., Jr. and Martins, M.L., *A multiscale mathematical model for oncolytic virotherapy.* Cancer Res, 2009. **69**(3): p. 1205-11.
354. Kuster, K., Koschel, A., Rohwer, N., Fischer, A., Wiedenmann, B. and Anders, M., *Downregulation of the coxsackie and adenovirus receptor in cancer cells by hypoxia depends on HIF-1alpha.* Cancer Gene Ther, 2010. **17**(2): p. 141-6.
355. Shen, B.H., Bauzon, M. and Hermiston, T.W., *The effect of hypoxia on the uptake, replication and lytic potential of group B adenovirus type 3 (Ad3) and type 11p (Ad11p).* Gene Therapy, 2006. **13**(12): p. 986-990.
356. Kim, J.H., Lee, Y.S., Kim, H., Huang, J.H., Yoon, A.R. and Yun, C.O., *Relaxin expression from tumor-targeting adenoviruses and its intratumoral spread, apoptosis induction, and efficacy.* J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(20): p. 1482-93.
357. Lamfers, M.L., Gianni, D., Tung, C.H., Idema, S., Schagen, F.H., Carette, J.E., Quax, P.H., Van Beusechem, V.W., Vandertop, W.P., Dirven, C.M., Chiocca, E.A. and Gerritsen, W.R., *Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 expression from an oncolytic adenovirus inhibits matrix metalloproteinase activity in vivo without affecting antitumor efficacy in malignant glioma.* Cancer Res, 2005. **65**(20): p. 9398-405.
358. Li, G.C., Yang, J.M., Nie, M.M., Su, C.G., Sun, L.C., Qian, Y.Z., Fang, G.E., Sham, J., Wu, M.C. and Qian, Q.J., *Potent antitumoral effects of a novel gene-viral therapeutic system CNHK300-mEndostatin in hepatocellular carcinoma.* Chin Med J (Engl), 2005. **118**(3): p. 179-85.
359. Garcia-Castro, J., Alemany, R., Cascallo, M., Martinez-Quintanilla, J., Arriero Mdel, M., Lassaletta, A., Madero, L. and Ramirez, M., *Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study.* Cancer Gene Ther, 2010. **17**(7): p. 476-83.
360. Yong, R.L., Shinojima, N., Fueyo, J., Gumin, J., Vecil, G.G., Marini, F.C., Bogler, O., Andreeff, M. and Lang, F.F., *Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas.* Cancer Res, 2009. **69**(23): p. 8932-40.
361. Ahmed, A.U., Rolle, C.E., Tyler, M.A., Han, Y., Sengupta, S., Wainwright, D.A., Balyasnikova, I.V., Ulasov, I.V. and Lesniak, M.S., *Bone marrow mesenchymal stem cells loaded with an oncolytic adenovirus suppress the anti-adenoviral immune response in the cotton rat model.* Mol Ther, 2010. **18**(10): p. 1846-56.
362. Koski, A., Kangasniemi, L., Escutenaire, S., Pesonen, S., Cerullo, V., Diaconu, I., Nokisalmi, P., Raki, M., Rajacki, M., Guse, K., Ranki, T., Oksanen, M., Holm, S.L., Haavisto, E., Karioja-Kallio, A., Laasonen, L., Partanen, K., Ugolini, M., Helminen, A., Karli, E., Hannuksela, P., Joensuu, T., Kanerva, A., and Hemminki, A., *Treatment of cancer patients with a serotype 5/3 chimeric oncolytic adenovirus expressing GMCSF.* Mol Ther, 2010. **18**(10): p. 1874-84.
363. Pesonen, S., Nokisalmi, P., Escutenaire, S., Sarkioja, M., Raki, M., Cerullo, V., Kangasniemi, L., Laasonen, L., Ribacka, C., Guse, K., Haavisto, E., Oksanen, M., Rajacki, M., Helminen, A., Ristimaki, A., Karioja-Kallio, A., Karli, E., Kantola, T.,

- Bauerschmitz, G., Kanerva, A., Joensuu, T., and Hemminki, A., *Prolonged systemic circulation of chimeric oncolytic adenovirus Ad5/3-Cox2L-D24 in patients with metastatic and refractory solid tumors*. *Gene Ther*, 2010. **17**(7): p. 892-904.
364. Nokisalmi, P., Pesonen, S., Escutenaire, S., Sarkioja, M., Raki, M., Cerullo, V., Laasonen, L., Alemany, R., Rojas, J., Cascallo, M., Guse, K., Rajcecki, M., Kangasniemi, L., Haavisto, E., Karioja-Kallio, A., Hannuksela, P., Oksanen, M., Kanerva, A., Joensuu, T., Ahtiainen, L., and Hemminki, A., *Oncolytic adenovirus ICOVIR-7 in patients with advanced and refractory solid tumors*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(11): p. 3035-43.
365. Guerra, L., Mordoh, J., Slavutsky, I., Larripa, I. and Medrano, E.E., *Characterization of IIB-MEL-J: a new and highly heterogenous human melanoma cell line*. *Pigment Cell Res*, 1989. **2**(6): p. 504-9.
366. Verschraegen, C.F., Giovanella, B.C., Mendoza, J.T., Kozielski, A.J. and Stehlin, J.S., Jr., *Specific organ metastases of human melanoma cells injected into the arterial circulation of nude mice*. *Anticancer Res*, 1991. **11**(2): p. 529-35.
367. Medrano, E.E., Yang, F., Boissy, R., Farooqui, J., Shah, V., Matsumoto, K., Nordlund, J.J. and Park, H.Y., *Terminal differentiation and senescence in the human melanocyte: repression of tyrosine-phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase 2 selectively defines the two phenotypes*. *Mol Biol Cell*, 1994. **5**(4): p. 497-509.
368. Adriaansen, J., Khoury, M., de Cortie, C.J., Fallaux, F.J., Bigey, P., Scherman, D., Gould, D.J., Chernajovsky, Y., Apparailly, F., Jorgensen, C., Vervoordeldonk, M.J. and Tak, P.P., *Reduction of arthritis following intra-articular administration of an adeno-associated virus serotype 5 expressing a disease-inducible TNF-blocking agent*. *Ann Rheum Dis*, 2007. **66**(9): p. 1143-50.
369. Dagert, M. and Ehrlich, S.D., *Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells*. *Gene*, 1979. **6**(1): p. 23-8.
370. Wu, R., Grossman, L., Moldave, K., Kaplan, N. and Colowick, N., *Recombinant Dna Part B*. *Methods in Enzymology*; v.100, ed. A. Press. Vol. 1000. 1983, New York: Academic Press. xxvi, 540.
371. Sherf, B.A., Navarro, S.L., Hannah, R.R. and Wood, K.V., *Dual Luciferase Reporter Assay: An Advanced Co-Reporter Technology Integrating Firefly and Renilla Luciferase Assays*. *Promega Notes Magazine*, 1996(57): p. 2-9.
372. Cafferata, E.G., Maccio, D.R., Lopez, M.V., Viale, D.L., Carbone, C., Mazzolini, G. and Podhajcer, O.L., *A Novel A33 Promoter-Based Conditionally Replicative Adenovirus Suppresses Tumor Growth and Eradicates Hepatic Metastases in Human Colon Cancer Models*. *Clin Cancer Res*, 2009.
373. Krasnykh, V.N., Mikheeva, G.V., Douglas, J.T. and Curiel, D.T., *Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism*. *J Virol*, 1996. **70**(10): p. 6839-46.
374. Jakubczak, J.L., Ryan, P., Gorziglia, M., Clarke, L., Hawkins, L.K., Hay, C., Huang, Y., Kaloss, M., Marinov, A., Phipps, S., Pinkstaff, A., Shirley, P., Skripchenko, Y., Stewart, D., Forry-Schaudies, S. and Hallenbeck, P.L., *An oncolytic adenovirus selective for retinoblastoma tumor suppressor protein pathway-defective tumors: dependence on E1A, the E2F-1 promoter, and viral replication for selectivity and efficacy*. *Cancer Res*, 2003. **63**(7): p. 1490-9.
375. Dmitriev, I., Krasnykh, V., Miller, C.R., Wang, M., Kashentseva, E., Mikheeva, G., Belousova, N. and Curiel, D.T., *An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and*

- adenovirus receptor-independent cell entry mechanism.* J Virol, 1998. **72**(12): p. 9706-13.
376. Chartier, C., Degryse, E., Gantzer, M., Dieterle, A., Pavirani, A. and Mehtali, M., *Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in Escherichia coli.* J Virol, 1996. **70**(7): p. 4805-10.
377. Lieber, A., He, C.Y., Kirillova, I. and Kay, M.A., *Recombinant adenoviruses with large deletions generated by Cre-mediated excision exhibit different biological properties compared with first-generation vectors in vitro and in vivo.* J Virol, 1996. **70**(12): p. 8944-60.
378. Kanerva, A., Zinn, K.R., Chaudhuri, T.R., Lam, J.T., Suzuki, K., Uil, T.G., Hakkarainen, T., Bauerschmitz, G.J., Wang, M., Liu, B., Cao, Z., Alvarez, R.D., Curiel, D.T. and Hemminki, A., *Enhanced therapeutic efficacy for ovarian cancer with a serotype 3 receptor-targeted oncolytic adenovirus.* Mol Ther, 2003. **8**(3): p. 449-58.