

003571  
17



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

# **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

## **FACULTAD DE CIENCIAS**

**Empleo de un Adenovirus con  
Capacidad de Replicación Condicionada  
en el Tratamiento del Cáncer**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**KAORI SUZUKI SATO**

**DIRECTOR DE TESIS: DOCTOR DAVID T. CURIEL**

**México, D. F.**

**Noviembre, 2003**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi hermana *Kimie*,  
quien hizo posible que mi estancia en Estados Unidos  
no interfiriese en la conclusión del Doctorado

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas •  
UNAM a difundir en formato electrónico e imp.  
contenido de mi trabajo recepc

NOMBRE: Kaori Suzuki  
Sato

FECHA: 8 de enero de 2003

FIRMA: Kaori Suzuki

A la memoria de *Reme Cerdeira*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**INDICE**

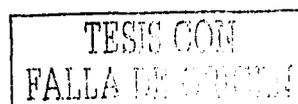
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	
Generalidades	2
1. El cáncer	2
1.1. Definición	2
1.2. Las bases celulares y moleculares del cáncer	3
1.2.1. El ciclo celular	3
1.2.2. La proteína Rb y la familia de las proteínas "bolsillo" (pocket proteins)	6
1.2.3. El factor de transcripción E2F	7
1.2.4. Las alteraciones de las proteínas reguladoras del ciclo celular en el cáncer	8
2. La terapia del cáncer	10
2.1. La terapia génica	11
2.2. La terapia viral	
2.2.1. Historia	13
2.2.2. Virus replicativos como terapia del cáncer	17
3. El Adenovirus	
3.1. Generalidades	18
3.2. Estructura	19
3.3. Ciclo vital	22
3.3.1. Adsorción e internalización	22
3.3.1.a. El receptor de los virus coxsackie y adenovirus (CAR)	23
3.3.1.b. Integrinas $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$	24
3.3.2. La transcripción de los genes tempranos	24
3.3.3. Los genes de expresión tardía	25
3.3.4. Ensamblaje y salida de la progenie: importancia de la proteína mortal del adenovirus (ADP)	25
3.4. Las proteínas adenovirales y su relación con las proteínas	

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

que regulan el ciclo celular	26
4. El adenovirus replicativo como agente oncolítico	
4.1. Fundamentos	27
4.2. El adenovirus Ad5- $\Delta$ 24	30
<b>Hipótesis</b>	<b>31</b>
<b>Objetivos</b>	
General	32
Particulares	32
<b>Material y Métodos</b>	
1. Cultivo celular	33
2. Adenovirus	34
2.1. Construcción	35
2.1.1. Clonaje	36
2.1.2. Transfección de células animales por el método de fosfato de calcio	39
2.2. Amplificación	40
2.3. Purificación	41
2.4. Titulación	
2.4.1. Espectrofotometría (densidad óptica)	41
2.4.2. Ensayo de placa	42
2.4.3. Método espectrofotométrico de O'Carroll modificado	43
2.4.4. Método basado en la transducción de genes reporteros	44
2.5. Caracterización	
2.5.1. Purificación del DNA viral a partir de virus puro	45
2.5.2. Purificación del DNA viral a partir de células infectadas	45
2.5.3. Análisis	
2.5.3.a. PCR y digestión enzimática	47
2.5.3.b. Secuenciación	48



2.5.4. Inmunoprecipitación y detección de proteínas por quimioluminiscencia	49
3. Cuantificación de CAR e integrinas $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$ por citometría de flujo	
4. Estudio de transducción (ensayo de luciferasa)	52
5. Análisis de la replicación del adenovirus <i>in vitro</i> : Incorporación de BrdU	53
6. Ensayos de oncolisis <i>in vitro</i> : células en monocapa	55
6.1. Ensayo de viabilidad celular con XTT	55
6.2. Tinción con solución de cristal violeta	56
6.3. Bloqueo del receptor primario CAR	56
6.4. Estudio del tamaño de las placas citopáticas	57
6.5. Análisis de la dinámica de producción y liberación de la progenie adenoviral	58
7. Modelo tridimensional <i>in vitro</i> : Esferoides	
7.1. Elaboración de esferoides	58
7.2. Análisis de la viabilidad celular	59
7.3. Estudio de la diseminación lateral de los adenovirus en esferoides	60
8. Ensayos de oncolisis <i>in vivo</i>	
8.1. Xenotrasplante subcutáneo de células tumorales humanas en ratones atímicos	60
8.2. Tratamiento local	61
8.3. Tratamiento sistémico	62
8.4. Detección del adenovirus por inmunofluorescencia	63
8.5. Cuantificación del virus en el tejido tumoral	64
8.6. Incremento de la carga adenoviral administrada i.v. al tumor por bloqueo de las células de Kupffer con cloruro de gadolinio	65
8.7. Estudios de biodistribución y farmacocinética del adenovirus	
8.7.1. Localización del adenovirus en el tejido hepático del ratón	66
8.7.2. Depuración del adenovirus de la sangre	67
8.7.3. Depleción de las células de Kupffer por cloruro de gadolinio y efecto en la depuración	68
9. Análisis estadístico	69



## Resultados

1. Caracterización de los virus generados	70
1.1. El nuevo virus Ad5- $\Delta$ 24RGD contiene la delección $\Delta$ 24	70
1.2. El Ad5- $\Delta$ 24RGD posee la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD)	70
1.3. Verificación de estado de E3 en los distintos adenovirus oncolíticos con o sin la modificación de RGD	71
1.4. La secuenciación corrobora la composición genética de los mutantes	73
2. La cuantificación de CAR e integrinas $\alpha$ v $\beta$ 3 y $\alpha$ v $\beta$ 5 en diferentes líneas celulares por citometría de flujo muestra una expresión variable	74
3. La transducción y expresión de luciferasa se correlaciona con los niveles de CAR e integrinas de las células: incremento de la eficiencia del adenovirus que contiene la secuencia RGD	76
4. La delección $\Delta$ 24 provoca la pérdida de la capacidad de la proteína viral E1A para unir pRB: inmunoprecipitación y detección de proteínas por quimioluminiscencia	78
5. Estudios del efecto de la inserción genética del tripéptido RGD	
5.1. La inserción del motivo RGD incrementa la propagación de Ad5- $\Delta$ 24 <i>in vitro</i>	79
5.2. La presencia de RGD aumenta la cantidad de virus producida <i>in vitro</i>	80
5.3. La oncolisis <i>in vitro</i> es incrementada por la inserción de RGD en el Ad5- $\Delta$ 24	80
5.4. El bloqueo del receptor primario CAR no inhibe la oncolisis mediada por el Ad5- $\Delta$ 24RGD	82
6. Efecto de la presencia de la región E3 del adenovirus	
6.1. E3 favorece la dispersión viral: comparación del tamaño de las placas producidas por adenovirus replicativos E3 <sup>+</sup> y E3 <sup>-</sup>	83
6.2. La eficiencia de propagación del adenovirus replicativo incrementa por la presencia de E3: estudio de la dinámica de producción y	

liberación de progenie	84
7. La combinación de los efectos RGD y E3 en el aumento de la oncolisis <i>in vitro</i>	85
8. Propagación del adenovirus de replicación condicionada en un modelo tridimensional <i>in vitro</i> : esferoides	87
9. Análisis del efecto de los adenovirus condicionalmente replicativos <i>in vivo</i> .	
9.1. La inserción de RGD aumenta la capacidad oncolítica del adenovirus administrado localmente	88
9.2. Efecto del gen E3 en la oncolisis <i>in vivo</i>	91
9.3. Cuantificación del adenovirus en el tejido tumoral	92
9.4. El tratamiento sistémico no muestra eficiencia oncolítica	94
9.5. El adenovirus se co-localiza con las células de Kupffer en el hígado	95
9.6. El adenovirus es eliminado rápidamente del torrente sanguíneo en ratones	97
9.7. Efecto del cloruro de gadolinio en la eliminación del adenovirus	99
9.8. El tratamiento con cloruro de gadolinio no incrementa la carga adenoviral que llega al tumor cuando es administrado por vía sistémica	99
<b>Discusión</b>	101
1. La selectividad del adenovirus de replicación condicionada	101
2. Cómo incrementar la infectividad	102
3. La combinación de las dos estrategias	104
4. Cómo incrementar la potencia oncolítica	106
5. Los esferoides	107
6. El modelo animal	108
7. Tratamiento sistémico	111
8. Cómo incrementar la carga viral al tumor. Relación con la respuesta inmune inespecífica	112

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

<b>Conclusiones</b>	115
<b>Bibliografía</b>	116
<b>Agradecimientos</b>	134
<b>Anexo</b>	135

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ABREVIATURAS

---

Ad5	Adenovirus humano serotipo 5
5-FC	5-fluorocitosina
5-FU	5-fluorouracilo
ADP	Proteína mortal del adenovirus (adenovirus death protein)
Bp	Pares de bases
BrdU	Bromodesoxiuridina
CAK	Cinasa activadora de cdk
CAR	Receptor del virus coxsackie y del adenovirus (Coxsackie and adenovirus receptor)
CD	Desaminasa de citosina
Cdk	Cinasa dependiente de ciclina
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CMV	Citomegalovirus
CSF	Factor estimulante de colonias
CPE	Efecto citopático
CR	Región constante
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DNA	Acido desoxirribonucleico
ECM	Matriz extracelular
FACS	Sorting de células por activación por fluorescencia
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GCV	Ganciclovir
GFP	Proteína Fluorescente Verde
HSV-1	Virus herpes simple tipo 1
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
ITR	Repeticiones terminales invertidas
KC	Células de Kupffer
m.o.i.	Multiplicidad de infección
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MLP	Promotor tardío mayor
NK	Célula asesina natural
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PSA	Antígeno prostático específico
pfu	Unidades formadoras de placas
pRb	Retinoblastoma (proteína)
pv	Partículas virales
RGD	Arg-Gly-Asp (arginina-glicina-ácido aspártico)
RLU	Unidades relativas de luz
RNA	Acido ribonucleico
TIL	Linfocitos infiltrantes de tumor
TK	Cinasa de timidina

TL	Linfocito T
TNF	Factor de necrosis tumoral
TU	Unidades de transducción

### **ABREVIATURAS DE MEDIDAS**

---

bp	Pares de bases
g	Gramos
g	Unidades de fuerza de gravedad
h	Horas
kDa	Kilodaltones
L	Litros
M	Moles
$\mu$ Ci	Microcurie
$\mu$ g	Microgramos
min	Minutos
$\mu$ L	Microlitros
mL	Mililitros
mM	Milimoles
ng	Nanogramos
seg	Segundos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**FALTA**

**PAGINA**

**1**

## **INTRODUCCION**

---

### **Generalidades**

A pesar de los importantes avances realizados en la oncología médica en relación a los programas de prevención, los métodos de diagnóstico temprano y las diversas opciones terapéuticas, el cáncer sigue siendo un serio problema de salud pública. La incidencia mundial sigue un curso ascendente y la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha calculado 15 millones de casos nuevos por año para el 2020 y la tasa de mortalidad por este padecimiento en nuestro país ha incrementado gradualmente desde 1958, en que la tasa anual estandarizada por la edad era de 46.8 (por 100,000 individuos) para la población masculina y de 71.9 en la femenina, a 85.4 y 78.9 correspondientemente en 1995 (banco de datos de la OMS <http://www-depdb.iarc.fr/who/menu.htm>). Además, la alta mortalidad de los pacientes oncológicos no se limita a nuestro país, también en otros más desarrollados como Estados Unidos y Alemania aunque las gráficas anuales muestran tendencias descendientes, las tasas siguen estando por encima de 100.

Por otro lado, el cáncer no es solamente un problema de salud pública sino un reto para las ciencias biomédicas. Hace casi 90 años que Theodor Boveri postuló por primera vez que las aberraciones cromosómicas son la causa de los tumores malignos (Balmain, 2001). Desde entonces se han obtenido grandes avances en cuanto al entendimiento de la génesis y la evolución de este padecimiento, así como en las técnicas de biología celular y molecular. No obstante, por el momento, éstos no han sido suficientes para conducir al tratamiento efectivo del cáncer. De manera que, junto con las cifras estadísticas, señalan la necesidad urgente de continuar el estudio de la biología de las neoplasias y de descubrir nuevas opciones terapéuticas.

### **1. El Cáncer**

#### **1.1. Definición**

El cáncer es la consecuencia de la acumulación de anomalías de un grupo concreto de genes, los proto-oncogenes y genes supresores tumorales. Estos codifican proteínas cruciales en las vías de transducción de señales que controlan el ciclo



celular, lo que da lugar a células transformadas caracterizadas por una diferenciación aberrante, una proliferación aumentada y/o supervivencia prolongada y una capacidad de invadir y producir metástasis.

## **1.2. Las bases celulares y moleculares del cáncer**

De manera simplista, el equilibrio de un tejido u órgano está mantenido por la división celular y la apoptosis. Los productos de los genes estimuladores (proto-oncogenes) e inhibidores (supresores de tumores) controlan el número de células que entra al ciclo; mientras que la cifra de las que mueren depende de la actividad de los productos de genes de apoptóticos y anti-apoptóticos. Cuando la señal oncogénica o la anti-apoptótica incrementan y/o la supresora o la apoptótica disminuyen o están ausentes, la balanza se inclina hacia el desarrollo de neoplasias (Foster, 2000). De modo que, aunque el patrón genético y el fenotipo de las células cancerosas son enormemente variables, la alteración de la regulación del ciclo celular es una característica prácticamente patognomónica.

### **1.2.1. El ciclo celular**

El ciclo celular es un conjunto de eventos fisiológicos perfectamente coordinados: crecimiento y diferenciación (G1), duplicación del genoma y segregación a dos células hijas idénticas (S, G2, M) y realización de funciones especializadas y de memoria (G0) (Fig. 1 y 2). La fidelidad con la que se copia el DNA y la oportunidad y precisión de la segregación de cada una de las réplicas para dar origen a dos células equivalentes son esenciales durante la división celular. Es por ello que la progresión del ciclo está regida reacciones de fosforilación y desfosforilación de proteínas llevada a cabo por un grupo de cinasas de serina/treonina conocido como cinasas dependientes de ciclinas (cdk) en cuya regulación participan las ciclinas, los inhibidores de cdk y las proteínas codificadas por los genes supresores de tumores.

TESIS CON  
FALLA DE CANCELACION

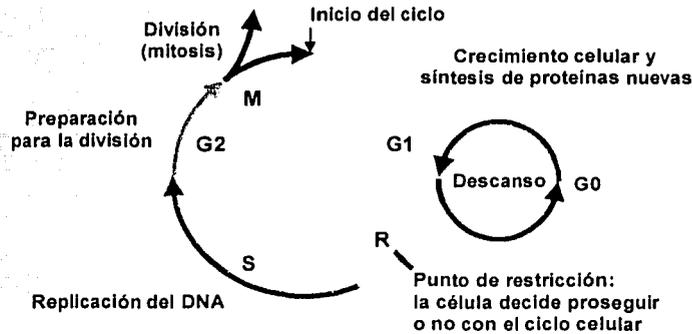


Fig. 1. Esquema del ciclo celular y eventos principales que ocurren durante cada fase.

Las cdk y las ciclinas forman un heterodímero en el que la ciclina activa y define la especificidad del complejo mientras que la cdk cataliza la fosforilación (Elledge, 1996). Estos entran en acción de manera secuencial durante el ciclo celular y fosforilan sustratos específicos esenciales para cada punto de transición.

La transición G1/S depende de la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRb), que ocurre por efecto de las cdk4 y 6. Estas son conocidas como "cdks dependientes de ciclina D" y su asociación y activación se detecta desde la mitad de G1 llegando a un pico máximo cerca de G1/S (Kato *et al.*, 1993). El complejo ciclina E/cdk2 es la que concluye esta fosforilación en la fase tardía de G1 (Hinds *et al.*, 1992; Koff *et al.*, 1992). Cuando la célula entra a la fase S, la degradación de esta ciclina deja libre a cdk2 que se une posteriormente a la ciclina A, que a su vez se une a la cdk1 durante G2 y M. Finalmente, la ciclina B se sintetiza en la fase S y se une a cdk1 para regular la transición G2/M. Ambas, A y B, se acumulan durante la fase M y el término de la mitosis depende de la degradación abrupta de la ciclina B por el sistema de la ubiquitina (King *et al.*, 1994).

TRABAJOS CON  
FALTA DE RESPUESTA



### 1.2.2. La proteína Rb y la familia de proteínas “bolsillo” (pocket proteins)

Dentro de las pocas proteínas cuya relevancia para la progresión del ciclo celular está demostrada está el producto del gen del retinoblastoma, pRb, el sustrato primario de las cdk dependientes de ciclina D y regulador negativo de la transición G1/S. Esta es una proteína nuclear de 110-kD que está presente en la mayoría de las células de los mamíferos, independientemente de su estado quiescente o en división (Goodrich *et al.*, 1991; Zacksenhaus *et al.*, 1993), y su actividad está regida por su estado de fosforilación (Fig. 2). La pRb tiene pocos o ningún grupo fosfato durante G0 y la mayor parte de G1. Los complejos ciclina D/cdk4 y/o 6 en colaboración con los ciclina E/cdk2 se encargan de fosforilarla para la pasar de la fase G1 a la S (Fig 2). El complejo ciclina A/cdk2 la mantiene en este estado durante las fases S y G2 y es desfosforilada por la fosfatasa de proteína 1 hacia el final de la mitosis (Buchkovich *et al.*, 1989; Ludlow *et al.*, 1993). Los fosfatos unidos a la proteína impiden su interacción con otras moléculas y la mantienen inactiva. Sin embargo, en estado de hipofosforilación es capaz de secuestrar y bloquear la acción de diferentes factores de transcripción necesarios para avanzar a la fase S, en particular la familia de E2F, ejerciendo así su función anti-proliferativa (Bandara y La Thangue, 1991; Chellappan *et al.*, 1991; Nevins, 1992) (Fig. 3).

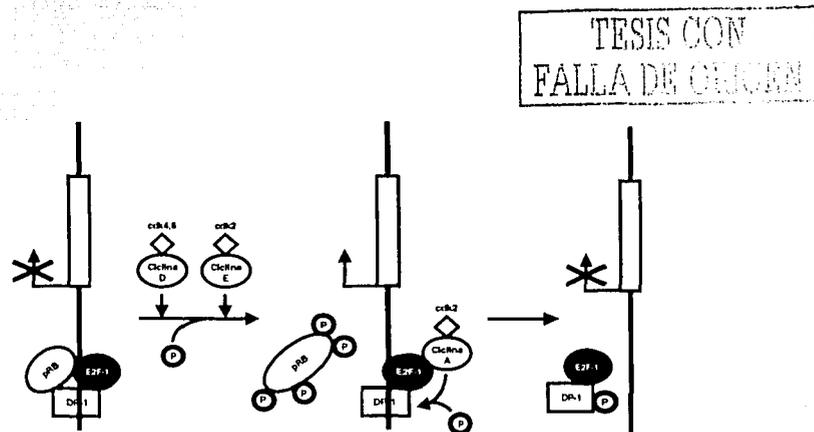


Fig. 3. Mecanismo de la activación de la transcripción controlada por pRb.

Estas asociaciones ocurren a través de diferentes dominios de unión que se conocen como "bolsillos" (pockets) A, B y C. El A/B contiene el sitio para la interacción con proteínas que tienen la secuencia de aminoácidos LXCXE, por ejemplo varias oncoproteínas virales (E1A del adenovirus, Ag T del SV40 y del poliovirus y E7 del virus del papiloma) (Knudsen y Wang, 1997) y Elf-1 (relacionado con la regulación de células T) (Wang *et al.*, 1993); el C se une a c-Abl (producto de un proto-oncogén) (Welch y Wang, 1995) y el bolsillo A/B grande (que incluye a los tres) se une a los factores de transcripción de la familia de E2F (Knudsen y Wang, 1997), así como a c-myc y N-myc (Rustgi *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1993). Cuando pRb se vuelve a fosforilar, estos factores quedan libres y activan los genes involucrados en la continuación del ciclo celular (Slansky y Farnham, 1996).

Dos proteínas, p107 y p130, tienen homología estructural y funcional con pRb y son miembros de la familia de proteínas "bolsillo". Se piensa que aún cuando se unen a las mismas moléculas y hay cierto solapamiento de sus funciones, éstas tienen actividades distintas a pRb durante el ciclo celular (Cobrinik *et al.*, 1993; Zacksenhaus *et al.*, 1993).



### 1.2.3. Factor de transcripción E2F

Es una familia de factores de transcripción con un papel clave en la progresión G1/S. En un inicio se describieron como activadores del gen E2 del adenovirus pero ahora se sabe que regula un grupo amplio de genes: c-myc, N-myc y b-myb, la reductasa del dihidrofolato, la cinasa de timidina, la sintetasa de timidilato, la DNA polimerasa  $\alpha$ , cdk1, ciclina A, el receptor del factor de crecimiento epidérmico e incluso pRb (Kovesdi *et al.*, 1986; Blake y Azizkhan, 1989; Hiebert *et al.*, 1989; Mudryj *et al.*, 1990; Pearson *et al.*, 1991; Ogris *et al.*, 1993; Shan *et al.*, 1994). El grupo consta de 5 isoformas que forman complejos heterodiméricos con DP (1 y 2), lo cual es necesario para unirse a las proteínas "bolsillo" pRb (E2F 1 a 3), p107 (E2F 4) y p130 (E2F 4 y 5) (La Thangue, 1994; Hijmans *et al.*, 1995; Sanchez y Dynlacht, 1996) (Fig. 3). Esta interacción inhibe la capacidad de activar la transcripción de los genes mencionados (Cobrinik *et al.*, 1993; Zamanian y La Thangue, 1993). Además, debido a que comparten el bolsillo A/B del pRb con las oncoproteínas virales (E1A del adenovirus,

Ag T del SV40 y E7 del virus del papiloma humano) (Bagchi *et al.*, 1990; Chittenden *et al.*, 1991), la asociación pRb-E2F puede ser disociada por la presencia de virus.

#### 1.2.4. Las alteraciones de las proteínas reguladoras del ciclo celular en el cáncer

Si existe una característica común a todos los tumores ésta es la alteración de los reguladores del ciclo celular, sobre todo de los de la transición G1/S (Tabla 1). En especial, la pérdida directa de la proteína del retinoblastoma, de los inhibidores de su fosforilación como p16 ó p21, o bien la sobreexpresión de la ciclina D, conducen a la perturbación del control del ciclo celular ejercido por pRb en el 100% de los tumores (Sherr, 1996; Malumbres y Barbacid, 2001). Es por ello que un agente terapéutico que ejerza su acción en esta condición sería sumamente atractivo y el virus oncolítico Ad5- $\Delta$ 24, objeto del presente estudio, es un representante de este grupo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Alteraciones citogenéticas de las neoplasias

Elemento alterado	Tejido u órgano afectado/tumor	Referencia
Cdk2	Colon, recto, hígado, ovario, endometrio	(Kitahara <i>et al.</i> , 1995; Ito <i>et al.</i> , 1998; Marone <i>et al.</i> , 1998; Kohzato <i>et al.</i> , 2001)
Cdk4	Cabeza y cuello, pulmón, colon y recto, hígado, mama, ovario, endometrio, testículo, glioblastos, sangre, osteosarcoma	(He <i>et al.</i> , 1994; Tam <i>et al.</i> , 1994; Ikeda <i>et al.</i> , 1996; Masciullo <i>et al.</i> , 1997; Patel <i>et al.</i> , 1997; Shiozawa <i>et al.</i> , 1997; Lingfei <i>et al.</i> , 1998; An <i>et al.</i> , 1999)
Cdk6	Cabeza y cuello, glioblastoma, sarcoma	(Patel <i>et al.</i> , 1997; Lam <i>et al.</i> , 2000)
Ciclina D	Cabeza y cuello, sistema nervioso central, paratiroides, pulmón, estómago, esófago, colon y recto, hígado, páncreas, mama, endometrio, ovario, próstata, testículo, vejiga, sangre, sarcoma, melanoma	(Rosenberg <i>et al.</i> , 1991; Arnold <i>et al.</i> , 1992; Jiang <i>et al.</i> , 1992; Buckley <i>et al.</i> , 1993; Leach <i>et al.</i> , 1993; Motokura y Arnold, 1993; Nakagawa <i>et al.</i> , 1995; Hall y Peters, 1996; Houldsworth <i>et al.</i> ,

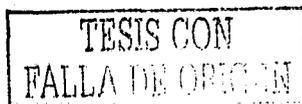
		1997; Masciullo <i>et al.</i> , 1997; Buschges <i>et al.</i> , 1999)
Ciclina E	Pulmón, estómago, colon y recto, hígado, mama, ovario, testículo, vejiga, sangre	(Buckley <i>et al.</i> , 1993; Leach <i>et al.</i> , 1993; Keyomarsi <i>et al.</i> , 1994; Akama <i>et al.</i> , 1995; Kitahara <i>et al.</i> , 1995; Scuderi <i>et al.</i> , 1996; Erlanson <i>et al.</i> , 1998; Del Pizzo <i>et al.</i> , 1999; Datta <i>et al.</i> , 2000; Mishina <i>et al.</i> , 2000; Kohzato <i>et al.</i> , 2001)
Ciclina A	Hígado, astrocitos, sangre, boca, vías urinarias	(Wang <i>et al.</i> , 1990; Paterlini <i>et al.</i> , 1993; Furihata <i>et al.</i> , 1997; Kushner <i>et al.</i> , 1999; Allan <i>et al.</i> , 2000)
Ciclina B	Boca, astrocitos, pulmón, esófago	(Kushner <i>et al.</i> , 1999; Murakami <i>et al.</i> , 1999; Allan <i>et al.</i> , 2000; Soria <i>et al.</i> , 2000)
p15	Pulmón, sangre, hígado, esófago, vejiga glioblastos	(Jen <i>et al.</i> , 1994; Gombart <i>et al.</i> , 1995; Hatta <i>et al.</i> , 1995; Kawamata <i>et al.</i> , 1995; Orlow <i>et al.</i> , 1995; Suzuki <i>et al.</i> , 1995; Lin <i>et al.</i> , 1998)
p16	Cabeza y cuello, hipófisis, glioblastos, pulmón, mesotelio, sangre, esófago, páncreas, hígado, vías biliares, mama, ovárico, endometrio, próstata, testículo, vejiga, osteosarcoma, melanoma	(Caldas <i>et al.</i> , 1994; Cheng <i>et al.</i> , 1994; Hebert <i>et al.</i> , 1994; Hussussian <i>et al.</i> , 1994; Jen <i>et al.</i> , 1994; Schmidt <i>et al.</i> , 1994; Cairns <i>et al.</i> , 1995; Delmer <i>et al.</i> , 1995; Kawamata <i>et al.</i> , 1995; Orlow <i>et al.</i> , 1995; Suzuki <i>et al.</i> , 1995; Yoshida <i>et al.</i> , 1995; Geradts y Wilson, 1996; Hangaishi <i>et al.</i> , 1996; Miller <i>et al.</i> , 1996; Ohno, 1996; Chaubert <i>et al.</i> , 1997; Marchini <i>et al.</i> , 1997; Patel <i>et al.</i> , 1997; Shiozawa <i>et al.</i> , 1997; Lin <i>et al.</i> , 1998)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

p18	Subtipo de oligodendrogliomas, tumores de células germinales de testículo	(Bartkova <i>et al.</i> , 2000; Korshunov y Golanov, 2002)
p19	Glioblastos	(Lam <i>et al.</i> , 2000)
p21	Mama	(Wakasugi <i>et al.</i> , 1997)
p27	Cabeza y cuello, glioblastos, hipófisis, pulmón, esófago, estómago, páncreas, hígado, mama, endometrio, ovario, próstata, testículo, vejiga, sarcoma	(Nakayama <i>et al.</i> , 1996; Masciullo <i>et al.</i> , 1997; Piva <i>et al.</i> , 1997; Del Pizzo <i>et al.</i> , 1999; Ohashi <i>et al.</i> , 1999; Takata <i>et al.</i> , 1999; Tsihlias <i>et al.</i> , 1999; Hayashi <i>et al.</i> , 2000; Tannapfel <i>et al.</i> , 2000; Cipriano <i>et al.</i> , 2001; Kawauchi <i>et al.</i> , 2001)
pRb	Sistema nervioso central, retinoblastoma, osteosarcoma, pulmón, sangre, mama, endometrio, ovario, próstata, testículo, vejiga	(Chaum <i>et al.</i> , 1984; Huang <i>et al.</i> , 1988; Lee <i>et al.</i> , 1988; Horowitz <i>et al.</i> , 1989; Bookstein <i>et al.</i> , 1990; Hensel <i>et al.</i> , 1990; Furukawa <i>et al.</i> , 1991; Strohmeyer <i>et al.</i> , 1991; Issing <i>et al.</i> , 1993; Liu <i>et al.</i> , 1994; Wadayama <i>et al.</i> , 1994; Shapiro <i>et al.</i> , 1995; Hangaishi <i>et al.</i> , 1996; Ueki <i>et al.</i> , 1996; Milde-Langosch <i>et al.</i> , 2001)
p107	Ninguno reportado	(Sherr, 1996)
p130	Cabeza y cuello, pulmón, mama, endometrio	(Helin <i>et al.</i> , 1997; Milde-Langosch <i>et al.</i> , 2001; Tanaka <i>et al.</i> , 2001)

## 2. La terapia del cáncer

El tratamiento oncológico está constituido por acciones multidisciplinarias que se ejecutan de manera simultánea o sucesiva para curar o mejorar la calidad de vida del paciente. En la actualidad, las terapias convencionales -cirugía, quimioterapia, radioterapia y terapia antihormonal- se utilizan con cierto éxito en el manejo de las fases tempranas del padecimiento, pero cuando se trata de las etapas avanzadas y las



recurrencias, aún no hay un tratamiento efectivo. Además, en menor o mayor grado, todas las modalidades coinciden en la falta o escasez de especificidad y/o bajo índice terapéutico y los esquemas mixtos, que por un lado mejoran el resultado, por el otro pueden incrementar los efectos indeseables. Existen otras opciones como la terapia fotodinámica, la hipertermia y las que han sido desarrolladas en la última década basadas en los avances de la biología celular y la genética molecular como la inmunoterapia, los inhibidores de la angiogénesis, la terapia génica y la viral.

## 2.1. La terapia génica del cáncer

La terapia génica consiste en la introducción de ácidos nucleicos (RNA o DNA, en forma de genes, porciones de genes u oligonucleótidos) al interior de las células, lo que altera su expresión génica para prevenir, tratar o cambiar el curso de una patología (Kay *et al.*, 1997).

Las estrategias genéticas empleadas actualmente en el tratamiento del cáncer se pueden clasificar en 3 grupos: la terapia citotóxica, la compensación de mutaciones y la inmunopotenciación genética (Roth y Cristiano, 1997). La primera, conocida también como quimioterapia molecular o suicida, consiste en la transducción de células tumorales con genes de enzimas de origen viral o bacteriano que convierten prodrogas inocuas a antimetabolitos tóxicos. Hasta el momento, las más empleadas son la cinasa de timidina (tk) del virus herpes simple tipo 1 (HSV-1) que metaboliza el ganciclovir (GCV) a trifosfato de GCV y la desaminasa de citosina (CD) de la bacteria *E. coli* que activa el 5-fluorouracilo (5-FU) a 5-fluorocitosina (5-FC) (Chen *et al.*, 1994; Hirschowitz *et al.*, 1995). Una de las ventajas de este tratamiento es que sólo las células transducidas son sensibles al fármaco, lo que limita la toxicidad sistémica que acompaña a la quimioterapia convencional. La segunda estrategia es la compensación de mutaciones, que consiste ya sea en la reposición de genes supresores tumorales alterados o ausentes, como la introducción del gen *p53* a tumores con mutaciones del mismo para restaurar su actividad (Fujiwara *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1994); o bien en la inhibición de oncogenes cuya expresión está anormalmente elevada empleando RNAm u oligonucleótidos anti-sentido, ribozimas o genes que codifican proteínas con función dominante negativa como los anticuerpos de cadena sencilla (Calabretta *et al.*, 1991;

Mukhopadhyay *et al.*, 1991; Scanlon *et al.*, 1991; Deshane *et al.*, 1994). Finalmente, la inmunopotenciación genética trata de robustecer el estímulo antigénico mediante la introducción de genes heterólogos a linfocitos T citotóxicos (CTLs) e infiltrantes de tumores (TIL), células dendríticas, fibroblastos y células cancerosas. Se sabe que la inmunogenicidad de los tumores es relativamente débil debido a la expresión disminuída o ausente de antígenos tumorales, de la presentación de los mismos por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I o bien de la moléculas co-estimuladoras de CTL (Sanda *et al.*, 1995; Garrido *et al.*, 1997). Además, algunas neoplasias son inductoras de citocinas inmunosupresoras como el factor de crecimiento transformante- $\beta$  o IL-10 (Bodmer *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1994). Mediante esta estrategia, se busca despertar o robustecer la respuesta antitumoral ya sea de manera pasiva (genes que codifican citocinas) o activa (genes de moléculas co-estimuladoras y antígenos tumorales) (Schwartz *et al.*, 1992; Tsai *et al.*, 1993; Merrouche *et al.*, 1995).

A pesar de esta amplia gama de abordajes, la baja eficiencia de transducción de genes ha obstaculizado el éxito de la terapia génica (Robbins y Ghivizzani, 1998). Para solucionar este problema, en el caso de los vectores adenovirales se han administrado junto con moléculas policatiónicas o conjugados biespecíficos (Miller *et al.*, 1998; Clark *et al.*, 1999) o se han incorporado modificaciones genéticas en la fibra para incrementar la eficiencia de transducción (Dmitriev *et al.*, 1998), sin embargo, los resultados no han demostrado tener la eficacia esperada.

Con estos antecedentes se propuso la viroterapia para el tratamiento de las neoplasias, es decir, el uso de virus replicativos. Estos conducirían a un incremento en la eficacia, ya que el efecto antitumoral se expande aún iniciando con una dosis pequeña del agente gracias a la replicación viral y la consecuente lisis celular (Vile y Russell, 1994; Kim y McCormick, 1996).

TESIS CON  
FALLA DE ONCOEN

## 2.2. La terapia viral del cáncer

### 2.2.1. Historia

Las primeras observaciones sobre el efecto de los virus en la historia natural del cáncer fueron hechas hace casi un siglo. Dos investigadores independientes, Dock y DePace, advirtieron que algunos tumores remitían después de una infección viral adquirida de forma natural por sus pacientes oncológicos (Dock, 1904; DePace, 1912). En la década de los 20's se demostró que es posible revertir epitelomas en roedores mediante la inoculación del virus de la vacuna (Levaditi y Nicolau, 1923), pero no es hasta después de 3 décadas y tras sucesivos experimentos en modelos animales (Moore, 1949; Southam *et al.*, 1951; Toolan y Moore, 1951) que la terapia viral culmina en la aplicación a pacientes oncológicos (Pack, 1950; Southam y Moore, 1952). Hasta el momento, más de 30 virus han sido empleados experimentalmente en el tratamiento de diversos tipos de neoplasias (Tablas 2a y 2b); sin embargo, algunos problemas como la patogenicidad del virus en los tejidos normales y la ausencia de remisión completa de los tumores fueron apagando el interés por este tipo de terapia. En la actualidad, gracias a los avances en el campo de la virología, la accesibilidad a los genomas virales en forma de plásmidos y la ingeniería genética, los virus se pueden modificar para disminuir el riesgo e incrementar la eficacia de su aplicación clínica y esto ha conducido al resurgimiento de la terapia viral en oncología (Reichard *et al.*, 1992; Mineta *et al.*, 1995; Bischoff *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 1997).

**Tabla 2a. Virus empleados con fines oncolíticos en tumores animales.**

Virus	Modelo animal	Investigador
<b>Arenavirus</b>		
Amapari, Junin, Tacaribe	Roedores	(Mettler <i>et al.</i> , 1982)
<b>Bunyavirus</b>		
Bunyamwera	Roedores	*Koprowski, 1950; (Mettler <i>et al.</i> , 1982)
Congo, Hazara, Uukuniemi	Roedores	
<b>Flavivirus</b>		

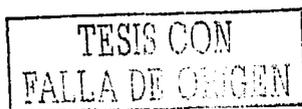
UNA, dengue 2, St. Louis	Roedores y aves	(Mettler <i>et al.</i> , 1982); *Sharpless, 1950; *Koprowski, 1950; (Moore, 1949); (Southam <i>et al.</i> , 1951)
Encefalitis japonesa B y Louping-ill	Roedores y aves	
Encefalitis rusa	Roedor y aves	
Ilheus	Roedores	
West Nile	Roedores y aves	
<b>Herpesvirus</b>		
Hepes simple tipo 1	Roedores	(Moore, 1949)
<b>Ortomixovirus</b>		
Influenza	Roedores	(Moore, 1949)
<b>Paramixovirus</b>		
Enfermedad de Newcastle	Roedores	(Eaton <i>et al.</i> , 1967; Wheelock, 1967)
Sendai	Roedores	
<b>Parvovirus</b>		
Virus minúsculo del ratón	Roedores	(Guetta <i>et al.</i> , 1986)
<b>Picornavirus</b>		
Enterovirus bovino 1	Roedores	(Hodes <i>et al.</i> , 1973; Taylor <i>et al.</i> , 1974)
<b>Poxvirus</b>		
Virus de la vacuna	Roedores	(Levaditi y Nicolau, 1923); (Cassel y Garrett, 1967)
<b>Reovirus</b>		
Reovirus	Roedores	(Coffey <i>et al.</i> , 1998)
<b>Togavirus</b>		
Encefalitis equina del este y encefalitis equina venezolana	Roedores	*Koprowski, 1950
Semiliki Forest	Roedores y conejos	*Koprowski, 1950
Sindbis	Roedores	(Mettler <i>et al.</i> , 1982)

\*Citados en (Southam *et al.*, 1951)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 2b. Virus empleados con fines oncolíticos en líneas celulares y tumores humanos.

Virus	Tipo de tumor/línea celular tumoral	Autor
Adenovirus	Cervicouterino	(Smith <i>et al.</i> , 1956)
	Líneas celulares de cáncer cervicouterino, de colon y osteosarcoma	(Bischoff <i>et al.</i> , 1996)
	Prostático	(Rodríguez <i>et al.</i> , 1997)
	Cabeza y cuello	(HelseyKirn, 2000; Khuri <i>et al.</i> , 2000)
	Pancreático, ovárico, colorrectal (incluyendo metástasis hepáticas), pulmonar, displasias orales, esófago de Barret	(Heise y Kirn, 2000)
	Líneas celulares de glioma	(Fueyo <i>et al.</i> , 2000)
Bunyamwera	Cervicouterino	*Newman, 1954
Dengue	Pancreático, gástrico	*Wheelock, 1964
Ilheus	Tracto gastrointestinal, mamario, melanoma, pulmonar, laríngeo, ovárico, cervicouterino, osteosarcoma, leucemia	*Neuman, 1954
West Nile	Mamario, ovárico, melanoma, osteosarcoma, cervicouterino	*Neuman, 1954
Virus de las enfermedad de Langat y Kyasanur Forest	Leucemia	(Webb <i>et al.</i> , 1966)
Virus Egipto 101, 19 o 21	Adenocarcinoma del tracto gastrointestinal con metástasis a hígado	(Southam y Moore, 1952); *Newman, 1954
Herpesvirus		
Herpes simple tipo 1	Glioma; líneas celulares de meningioma, CA mamario, colorrectal, ovárico, hepatocelular	(Yazaki <i>et al.</i> , 1995; Andreansky <i>et al.</i> , 1998; Todryk <i>et al.</i> , 1999; Coukos <i>et al.</i> , 2000; Markert <i>et al.</i> , 2000; Pawlik <i>et al.</i> , 2000)



Varicela	Leucemia	*Bierman, 1953
Influenza B	Leucemia	*Wheelock, 1964
Enfermedad de Newcastle	Leucemia; melanoma; ovárico, pancreático, melanoma, nasofaríngeo; neuroblastoma; fibrosarcoma	*Wheelock, 1964; *Cassel, 1965; *Newman, 1954; (Reichard <i>et al.</i> , 1992; Pecora <i>et al.</i> , 2002)
Paperas	Testicular, piel, maxilar, gingival, faríngeo, esofágico, gástrico, hepático, rectal, pulmonar, mamario, de pene, uterino (incluyendo metástasis óseas), ovárico, vaginal, tiroideo, osteosarcoma, linfoma, glioma	*Newman, 1954; *Asada, 1974; *Okuno, 1977; *Yumitori, 1982
Sarampión	Linfoma de Hodgkin, Linfoma de Burkitt	*Bluming, 1971
Sendai	Leucemia	*Wheelock, 1964
Parvovirus humano autónomo H1	Osteosarcoma, línea celular de leucemia, células renales transformadas por SV-40, fibroblastos transformados por radiación, carcinógenos químicos o SV-40, HeLa	(Toolan y Ledinko, 1968; Cornelis <i>et al.</i> , 1988; Su <i>et al.</i> , 1988; Telerman <i>et al.</i> , 1993; Faisst <i>et al.</i> , 1998)
Virus minúsculo del ratón	Líneas celulares de CA mamario y fibrosarcoma	(Dupressoir <i>et al.</i> , 1989; Cornelis <i>et al.</i> , 1990)
Coxsackie B	Líneas celulares de CA cervicouterino	*Suskind, 1957
Hepatitis A	Linfoma de Hodgkin Linfoma de Burkitt	*Taqi, 1981
Vacuna atenuada de la rabia	CA cervicouterino; melanoma	(DePace, 1912; Pack, 1950)
Estomatitis vesicular	Melanoma	(Stojdl <i>et al.</i> , 2000)
Virus de la panleucopenia felina	Leucemia	*Bierman, 1953
Semiliki Forest y Sindbis	Leucemia	*Wheelock, 1964

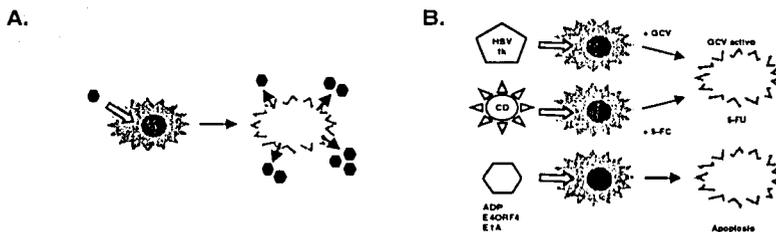
\*Citados en (Sinkovics, 1993)

TESIS CON  
FALLA DE CUBIERTA

## 2.2.2. Virus replicativos como terapia del cáncer

Existe una diferencia fundamental entre los virus empleados en la terapia génica y los que se usan en la viroterapia. En la primera, los virus son empleados como vehículos (vectores) de genes heterólogos terapéuticos para "transducir" las células blanco y su capacidad replicativa se ha abolida mediante mutaciones en regiones genéticas cruciales para esta función. En cambio, los empleados en la terapia viral "infectan" las células tumorales y llevan, salvo pequeñas deleciones, el grupo completo de genes que les permite replicarse (Russell, 1994).

Los mecanismos empleados por los virus replicativos para atacar las células tumorales son: (a) ruptura directa de la célula como consecuencia de la producción y liberación de la progenie (Martuza *et al.*, 1991; Mineta *et al.*, 1995), (b) inducción de apoptosis (Ganly *et al.*, 2001), (c) producción de toxinas constitutivas del virus o codificadas en un gen heterólogo (Rommelaere y Cornelis, 1991; Wildner *et al.*, 1999; Doronin *et al.*, 2000) y (d) mecanismos inmunes, que a su vez se dividen en dos, el incremento de la sensibilidad de la célula neoplásica al ataque de citocinas y otros moduladores del sistema inmune no específico (Gooding, 1994) y la presentación de antígenos virales en la superficie de las células infectadas que las hace blanco de los CTL antígeno-específicos (Fearon *et al.*, 1988) (Fig. 4).



TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACION

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

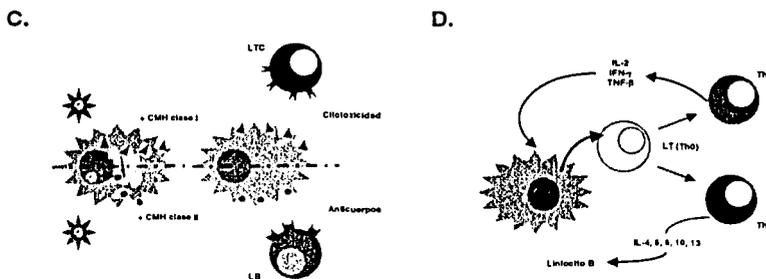


Fig. 4. Mecanismos por los que los virus replicativos atacan las células tumorales. Ruptura directa (A), citotoxicidad por proteínas propias del virus o por proteínas codificadas por transgenes heterólogos (B) y mecanismos inmunes (C y D).

Idealmente, la replicación de estos virus debe ser selectiva en los tumores, es decir, que infecten, se repliquen y destruyan las células malignas de manera similar al silvestre (wild type) pero que no ocurra o sea de manera insignificante en células normales (Pennisi, 1996). En la actualidad, uno de los virus más empleados en la terapia del cáncer es el adenovirus junto con el HSV-1.

### 3. El Adenovirus

#### 3.1. Generalidades

El adenovirus humano fue descubierto y caracterizado en 1953 (Rowe *et al.*, 1953). Pertenece a la familia *Adenoviridae*, género Mastadenovirus y es el agente etiológico de conjuntivitis, enfermedades respiratorias y gastroenteritis pediátricas (Morris *et al.*, 1975; Ginsberg *et al.*, 1991). Aunque hasta el momento no hay evidencias de su oncogenicidad en el ser humano, se sabe que algunos serotipos tienen este potencial cuando son inoculados en dosis altas en roedores recién nacidos (Trentin *et al.*, 1962). Ha sido empleado como modelo para estudiar la regulación de la expresión de genes virales y humanos, la replicación del DNA y control del ciclo celular.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

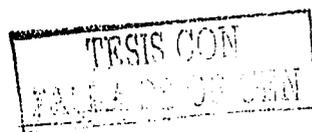
Un ejemplo de ello es el descubrimiento del "splicing" del RNAm (Bachenheimer y Darnell, 1975). En la actualidad, se emplea como un vector para la transferencia de genes en la terapia génica, como vacuna, y recientemente, como agente oncolítico.

Hasta el momento, se conocen 51 serotipos del adenovirus humano y se clasifican en 6 grupos (denominados A - F) en base a la variabilidad genética, el potencial oncogénico y el contenido de G+C en su DNA. Los grupos B y D se subdividen a su vez en BI/BII y DI/DII/DIII dependiendo del patrón de hemaglutinación (Rosen, 1960; Wadell, 1969; Hierholzer, 1973; Wadell *et al.*, 1980). El serotipo que se emplea para la terapia génica y la oncolisis viral es el 5 del subgrupo C (Ad5).

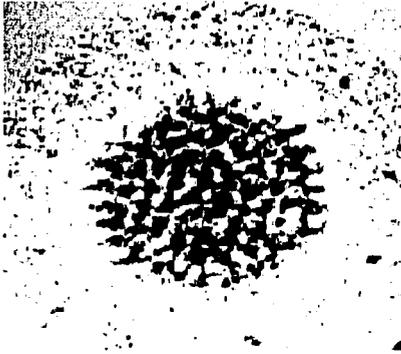
### 3.2. Estructura

El adenovirus tiene una cápside icosaédrica formada por unidades proteicas conocidas como capsómeros: 240 hexones y 12 pentones (Fig. 5). Los hexones forman las paredes del icosaedro y tienen una función estructural. Los pentones se localizan en cada uno de los vértices y están compuestos por 5 subunidades formadas por dos hélices- $\alpha$  que flanquean la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD). Esta forma un asa que protrude de la estructura terciaria del pentón y juega un papel crucial en la internalización del virus a la célula (Mathias *et al.*, 1994).

A partir de los ápices sobresale la fibra, estructura homotrimérica que termina en una estructura globular (knob) misma que está compuesta por cadenas- $\beta$  unidas entre sí por asas flexibles que generalmente son de naturaleza hidrofílica y miran hacia el exterior (Fig. 6). Ésta es la responsable de la interacción con los receptores de la superficie celular durante la adsorción del virus. Los polipéptidos IIIa, VI, VIII y IX también son componentes de la cápside y se les atribuyen las funciones de unión, estabilización y de interacción con los elementos del centro (Nermut, 1975).



A.



B.

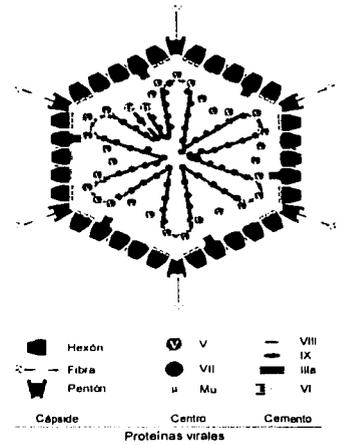
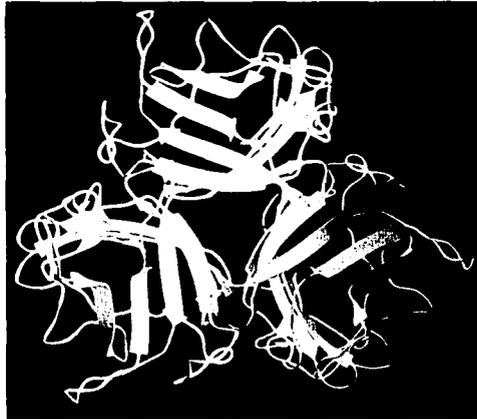


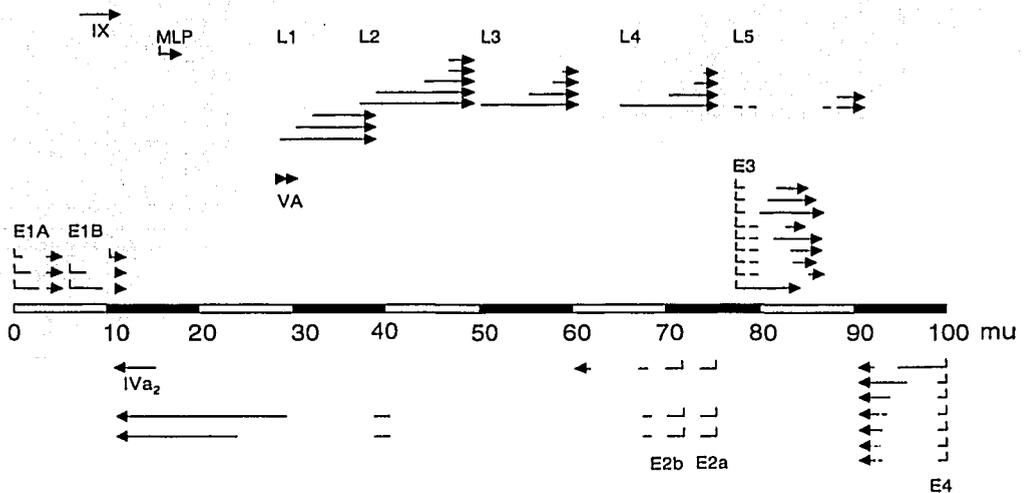
Fig. 5. (A) Micrografía del adenovirus (Horwitz, 1996). (B) Esquema de la estructura del adenovirus (Russell, 2000).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 6. Estructura terciaria del glóbulo (knob) de la fibra del adenovirus tipo 5 (Tomado de Xia et al., 1995).

Cuatro proteínas se encuentran en el interior de la cápside: V, VII, mu y la "proteína terminal" unida covalentemente a los extremos 5' del DNA (Fig. 5B). El genoma del adenovirus es un DNA lineal de cadena doble cuyos extremos contienen repeticiones terminales invertidas (ITR) que constituyen orígenes de replicación idénticos. Este cromosoma viral contiene 5 unidades de transcripción temprana (E1A, E1B, E2, E3 y E4), 2 unidades tempranas retrasadas (IX y IVa<sub>2</sub>), una unidad lenta que genera 5 familias de RNAm tardíos (L1 a L5) que son transcritos por la polimerasa II de RNA, 1 ó 2 (dependiendo del serotipo) genes VA transcritos por la polimerasa III de RNA y una secuencia de empaquetamiento (Shenk, 1996) (Fig. 7).



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 7. Mapa de transcripción del adenovirus. El cromosoma ha sido dividido en 100 unidades de mapa (mu). Las flechas representan los RNAm transcritos con los espacios que corresponden a los puntos de "splicing". Tomado de (Wold y Gooding, 1991). E = genes de transcripción temprana; L = genes de transcripción tardía, MLP = promotor tardío mayor.

### 3.3. Ciclo vital

Los eventos del ciclo vital del adenovirus se dividen en 2 etapas separadas por la replicación del DNA viral: temprana y tardía. En la primera ocurren la adsorción a la célula huésped, la internalización, la transcripción y traducción del grupo temprano de genes (6 a 8 horas); y en la segunda, la expresión de los genes tardíos, el ensamblaje de la progenie del virus y su liberación (4 a 6 horas) (Russell, 2000).

#### 3.3.1. Adsorción e internalización

En el caso de los adenovirus tipos 2 y 5, la interacción inicial ocurre entre el glóbulo (knob) de la fibra y el receptor del virus coxsackie y del adenovirus (CAR) (Bergelson *et al.*, 1997). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que en ausencia de éste, los glucosaminoglucanos derivados de heparán sulfato son suficientes para la adhesión inicial (Dehecchi *et al.*, 2000; Dehecchi *et al.*, 2001). Además, se ha sugerido que el dominio  $\alpha 2$  de la molécula del MHC clase I (Hong *et al.*, 1997), la integrina  $\alpha 5\beta 1$  (Davison *et al.*, 1997) y la  $\alpha M\beta 2$  (Huang *et al.*, 1996) son receptores alternativos del tipo 5 y las sialoglucoproteínas para otros serotipos (Arnberg *et al.*, 2000).

Una vez adherido, el adenovirus interactúa de manera simultánea con las integrinas  $\alpha V\beta 3$  y  $\alpha V\beta 5$  a través de las secuencias RGD de las subunidades del pentón (Chiu *et al.*, 1999). Esta unión desencadena la entrada eficiente (85-90% del virus adsorbido) y rápida (5-10 minutos desde la adsorción) a la célula por endocitosis mediada por receptores (Chardonnet y Dales, 1970). Este proceso avanza gracias a la dinamina, GTPasa citosólica que provoca la constricción de la vesícula para separarse de la membrana celular y formar el endosoma temprano, y a la reorganización de las fibras de actina (Patterson y Russell, 1983; Wang *et al.*, 1998). Posteriormente, el virus escapa de dicha estructura por la permeabilización dependiente de la interacción de las integrinas  $\alpha V\beta 5$  con proteínas del pentón y el descenso del pH en su interior (Wang *et al.*, 2000). A su paso, el virión sufre la desintegración secuencial de sus componentes propiciada por una proteasa viral y el DNA es acarreado hacia el núcleo por la acción de los microtúbulos y la dineína (Dales y Chardonnet, 1973; Leopold *et al.*, 2000). Una

vez dentro, se asocia con la matriz nuclear empleando la proteína terminal, evento crucial para la activación de la transcripción (Schaack *et al.*, 1990).

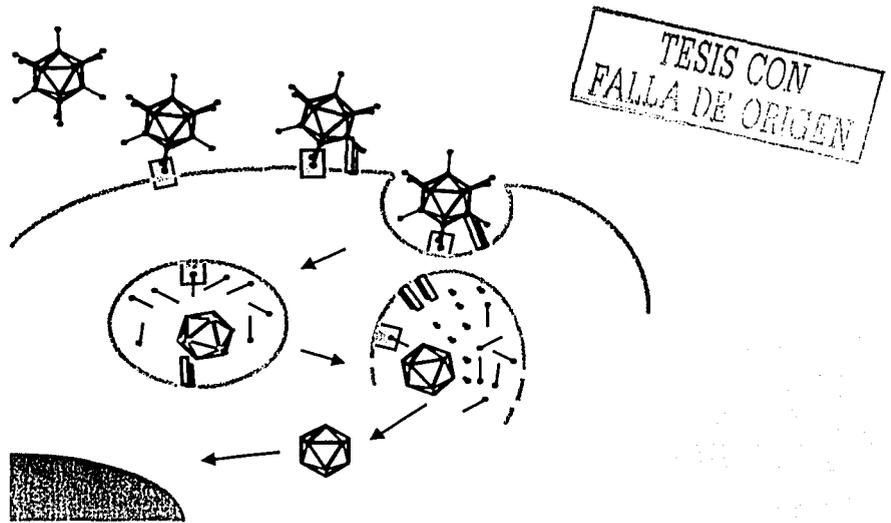


Fig. 8. Fase inicial de la infección por un adenovirus. Adhesión a CAR, unión a integrinas  $\alpha v$ , endocitosis, desensamblaje y entrada del genoma al núcleo.

### 3.3.1.a. El receptor de los virus coxsackie y adenovirus (CAR)

Es el receptor primario del virus coxsackie B y de la mayoría de los más de 50 serotipos de adenovirus (Bergelson *et al.*, 1997; Roelvink *et al.*, 1998). Es una proteína transmembranal de 46 kD perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). Su función celular era desconocida hasta que recientemente se demostró su participación en la formación de uniones intercelulares estrechas constituyendo una barrera contra el movimiento paracelular de solutos (Cohen *et al.*, 2001). Durante la infección, su única función es ser el de punto de adhesión, para lo cual el dominio extracelular es indispensable y suficiente ya que los eventos subsecuentes de internalización dependen de otras moléculas como las integrinas u otros receptores secundarios (Wang y Bergelson, 1999). CAR se expresa en una amplia gama de tejidos pero en las neoplasias existe gran variabilidad y en muchas ocasiones suele ser bajo o estar ausente lo que dificulta la infección por el adenovirus. Esto se ha visto en

tumores de cabeza y cuello (Li *et al.*, 1999), de vejiga (Li *et al.*, 1999), de ovario (You *et al.*, 2001) y glioma (Miller *et al.*, 1998; Asaoka *et al.*, 2000). En particular se ha descrito que en tejidos tumorales primarios es más acentuado que en líneas celulares (Grill *et al.*, 2001). Este es un problema crucial a solventar cuando se emplea el adenovirus para obtener eficacia terapéutica y representa el principal objetivo del presente estudio.

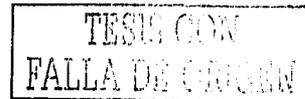
### 3.3.1.b. Integrinas

Son glucoproteínas transmembranales que se encargan de la adhesión de las células a las proteínas de la matriz extracelular (ECM) y el intercambio bidireccional de señales entre ésta y el citoesqueleto. Son moléculas heterodiméricas con una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$  unidas por interacciones no covalentes. Existen 14 subtipos de cadena  $\alpha$  y 9 de  $\beta$ , y diversas combinaciones son posibles aunque no todas existen en la naturaleza. Las secuencias reconocidas por las integrinas son múltiples, dentro de ellas, una subfamilia se une a la secuencia RGD presente en diferentes proteínas de la ECM (Ruoslahti y Pierschbacher, 1987). Como se ha mencionado previamente, el pentón del adenovirus también tiene este tripéptido y lo emplea para la internalización a la célula. En este caso las integrinas involucradas son las  $\alpha v$  que se unen a vitronectina y en especial  $\alpha v \beta 3$  y  $\alpha v \beta 5$  (Wickham *et al.*, 1993; Nemerow y Stewart, 1999) y de manera secundaria,  $\alpha 5 \beta 1$  (Davison *et al.*, 1997) y  $\alpha M \beta 2$  (Huang *et al.*, 1996).

### 3.3.2. La transcripción de los genes tempranos

Una vez en el núcleo se inicia la transcripción del DNA viral. De las 5 unidades de transcripción temprana, la primera en expresarse es E1A. Esta codifica dos proteínas (12S y 13S) que inducen la transcripción y la progresión a la fase S del ciclo celular en el huésped para facilitar la replicación viral. Otras funciones de E1A son la activación de la expresión de otras unidades de transcripción viral y el desencadenamiento de apoptosis. En contraparte, está el gen E1B que codifica las proteínas 19K y 55K. La 19K bloquea la apoptosis inducida por E1A y la 55K, además de unirse a p53, bloquea la acumulación de RNA celular mientras que facilita la de los RNA virales (Babiss *et al.*, 1985). Las 3 proteínas que codifica el gen E2: DBP, pTP y Pol proporcionan la maquinaria de replicación del DNA viral (Hay *et al.*, 1995). Mientras

que el gen E3 codifica siete RNAm que se generan por "splicing" alternativo y cuya transcripción está controlada por un solo promotor (RID $\alpha$  y  $\beta$ , 12.5K, 11.6K, 6.7K, 14.7K y gp19K) (Tollefson *et al.*, 1992). De ellos, 4 traducen proteínas que modulan la respuesta inmune del huésped contra el adenovirus. En particular, la gp19K protege a las células infectadas contra los CTL (Wold y Gooding, 1989), mientras que el complejo RID $\alpha$  y  $\beta$  (antes 10.4K/14.5K) y la gp14.7K contrarrestan la citólisis inducida por el factor de necrosis tumoral (TNF) (Gooding *et al.*, 1988; Gooding *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1997). La gp11.6K se conoce actualmente como "proteína adenoviral mortal" (adenovirus death protein, ADP) (Tollefson *et al.*, 1992) y se explica más adelante con mayor detalle. Finalmente, E4 codifica 6 proteínas denominadas Orf 1 a 6/7 que participan en una amplia gama de procesos: bloqueo de la síntesis de proteínas del huésped (junto con E1B-55K), replicación del DNA viral, regulación de la transcripción, transporte y estabilización del RNAm, síntesis de las proteínas virales tardías, producción de partículas virales infecciosas y la resistencia a la lisis por los CTL (Halbert *et al.*, 1985; Huang y Hearing, 1989; Bridge *et al.*, 1993; Marcellus *et al.*, 1996; Kaplan *et al.*, 1999) (Fig. 7).



### 3.3.3. Los genes de transcripción tardía

Los RNAm tardíos son por lo menos 18 y se agrupan en 5 familias (L1-L5) (Fig. 7) que están bajo el control del promotor tardío mayor (MLP) y se involucran en la producción y el ensamblaje de los componentes de la cápside (Hasson *et al.*, 1989; Larsson *et al.*, 1992). Recientemente se ha atribuido a la proteína L4-100K la capacidad de inhibir a la granzima B contenida en los gránulos de CTLs y prevenir la la apoptosis (Andrade *et al.*, 2001). Por otro lado, los RNAs VA no son traducidos y participan en la traducción de los RNAm virales (Thimmappaya *et al.*, 1982) y la evasión de la respuesta inmune mediada por el interferón- $\alpha$  (Mori *et al.*, 1996).

### 3.3.4. Ensamblaje y salida de la progenie: importancia de la proteína ADP

Una vez que el DNA viral ha replicado y los péptidos estructurales han sido sintetizados, comienza la construcción de los hexones y más lentamente, de los pentones y las fibras. Todas ellas se dirigen y acumulan en el núcleo, donde ocurre se

ensambla una cápside vacía y acto seguido se introduce el material genético con intervención de la señal de empaquetamiento (secuencia rica en AT en el extremo izquierdo del genoma viral) (Hearing *et al.*, 1987). Paralelamente a estos eventos, ocurren cambios en la infraestructura del núcleo como la permeabilización de la membrana nuclear que permite la salida del virus al citoplasma (Rao *et al.*, 1996). Finalmente, la proteína 11.6K o ADP provoca la ruptura de la célula. Como se ha mencionado anteriormente, esta molécula está codificada en el gen E3 y se expresa a partir del promotor E3 desde las etapas tempranas del ciclo vital del virus, pero la expresión se intensifica en los estadios tardíos (20 a 25 horas después de la infección) bajo el control del MLP provocando la liberación de la progenie al exterior (Tollefson *et al.*, 1992).

### **3.4. Las proteínas E1A del adenovirus y su relación con las proteínas que regulan el ciclo celular**

A diferencia de otros virus, el adenovirus es capaz de infectar células diferenciadas y quiescentes. Debido a que los niveles de desoxinucleótidos son bajos en la célula en reposo, el adenovirus tiene que "empujarlas" hacia la fase S para propiciar un ambiente adecuado para la síntesis de su propio DNA a través de la interacción de productos virales con un grupo de proteínas celulares que funcionan como "frenos" del ciclo celular.

Como se mencionó anteriormente, el gen E1 del adenovirus tiene dos unidades de transcripción, E1A y E1B. Los RNAm principales codificados en el gen E1A, 12S y 13S, traducen fosfoproteínas nucleares de 243 y 289 aminoácidos correspondientemente (Fig. 9). Ambas contienen regiones altamente conservadas (CR) entre los diferentes serotipos. Mientras que CR1 y CR2 comparten las funciones de represión transcripcional, inducción de la síntesis de DNA e inmortalización celular; la CR3, que se encuentra solamente en la proteína 13S, es por sí sola suficiente para la activación de la transcripción de genes virales y celulares (Lillie *et al.*, 1986; Moran *et al.*, 1986). Tanto 12S como 13S se asocian con proteínas de la célula que regulan el ciclo celular: p300, p107, p130, pRb, ciclina A y cdk2, entre otras (Yee y Branton, 1985; Harlow *et al.*, 1986; Whyte *et al.*, 1988). En párrafos anteriores se explicó la propiedad

supresiva de pRB y las proteínas "bolsillo" sobre la proliferación y su relación con el factor de transcripción E2F. Cuando el adenovirus infecta la célula, E1A se une a pRB y libera al E2F del complejo pRb-E2F para activar la transcripción del gen E2 y otros que se relacionan con la síntesis de DNA (Chellappan *et al.*, 1992). Esto ocurre gracias a que E1A puede interactuar con cada una de las proteínas celulares enumeradas a través de diferentes segmentos. Por ejemplo, pRb se une al motivo Leu<sub>122</sub>-X-Cys-X-Glu<sub>126</sub> dentro de CR2 y a otra área en CR1. Del mismo modo p107 y p130 interactúan con CR1 y 2, mientras que p300 se une al extremo amino-terminal de la proteína E1A y a una región dentro de CR1 (Boulanger y Blair, 1991; Svensson *et al.*, 1991).

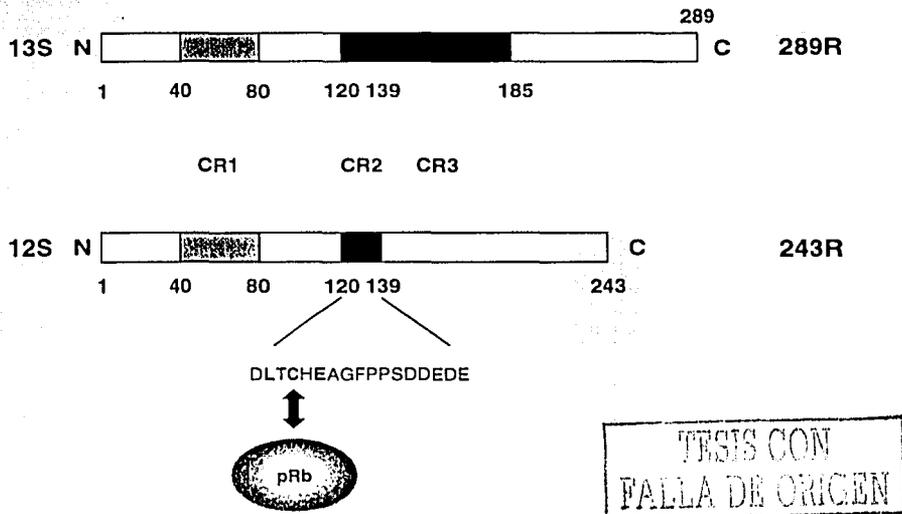


Fig. 9. Proteínas codificadas en el gen E1A. Se representa de manera esquemática la secuencia consenso dentro de CR2 a la que interactúa la pRB. Tomado de Barbeau 1992 (Barbeau *et al.*, 1992).

## 4. El adenovirus replicativo como agente oncolítico

### 4.1. Fundamentos

La primera aplicación clínica del adenovirus como agente oncolítico en el tratamiento de cáncer cervicouterino data de 1956 (Smith *et al.*, 1956). En este estudio,

65% de las pacientes respondieron de manera parcial al tratamiento pero no se observó ninguna remisión completa. El interés actual por el empleo de los adenovirus como agentes replicativos en la terapia antitumoral reside en el amplio conocimiento que se tiene sobre su ciclo vital, la accesibilidad de su genoma en forma de plásmidos, la capacidad de aceptar genes heterólogos, la proliferación rápida en tejidos tumorales humanos *in vitro* y el potencial patogénico bajo.

Las dos estrategias básicas para lograr la replicación selectiva de estos virus en el tejido tumoral se basan en la manipulación de E1A y/o E1B. La primera es el empleo de promotores específicos de tumor para controlar su expresión (Fig. 10). Algunos que han sido empleados hasta el momento son: el del antígeno prostático específico (PSA) en el tratamiento del cáncer de próstata (Rodríguez *et al.*, 1997), el del antígeno carcinoembrionario (CEA) en las neoplasias del tracto gastrointestinal y líneas celulares de cáncer de pulmón (Toyoizumi *et al.*, 2000), el de la  $\alpha$ -fetoproteína en cáncer hepatocelular (Hallenbeck *et al.*, 1999) y la L-plastina en el de ovario (Chung *et al.*, 1999).

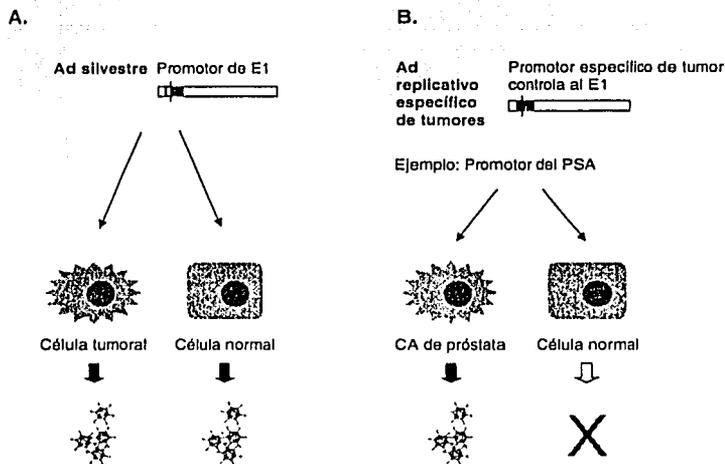


Fig. 10. Construcción de adenovirus de replicación selectiva mediante el empleo de promotores específicos de tumor o de tejido. El virus silvestre replica tanto en células normales como en neoplásicas (A); sin embargo, el virus mutante con el gen E1 bajo el control del promotor específico sólo lo hace en la célula tumoral (B). Ad = adenovirus; CA = cáncer.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La segunda estrategia toma ventaja de las alteraciones genéticas subyacentes en las células tumorales y consiste en provocar deleciones parciales de E1A y/o E1B (Fig. 11). La biología tras esta estrategia es que pRb y p53 son proteínas que funcionan como "frenos" del ciclo celular. Cuando el adenovirus silvestre infecta la célula, las proteínas E1A y E1B se unen a ellas, respectivamente, inhiben sus funciones de detención celular y permiten la replicación tanto de la célula huésped como del virus. En cambio, el adenovirus mutante es incapaz de unirse a pRb o p53 y su replicación se ve bloqueada en células normales; mientras que en las tumorales con alteraciones en las vías de pRb y p53, donde el freno es inexistente de manera inherente, puede hacerlo y conducir a la oncolisis. El representante más notorio de este grupo es el ONYX-015 (Bischoff *et al.*, 1996) que tiene una deleción del gen E1B-55kD y es incapaz de interactuar con p53. Otros adenovirus se han construido en base a este concepto y tienen deleciones que afectan la unión de la proteína E1A a pRb (Fueyo *et al.*, 2000; Heise *et al.*, 2000; Howe *et al.*, 2000). A continuación se explica en detalle uno de estos mutantes.

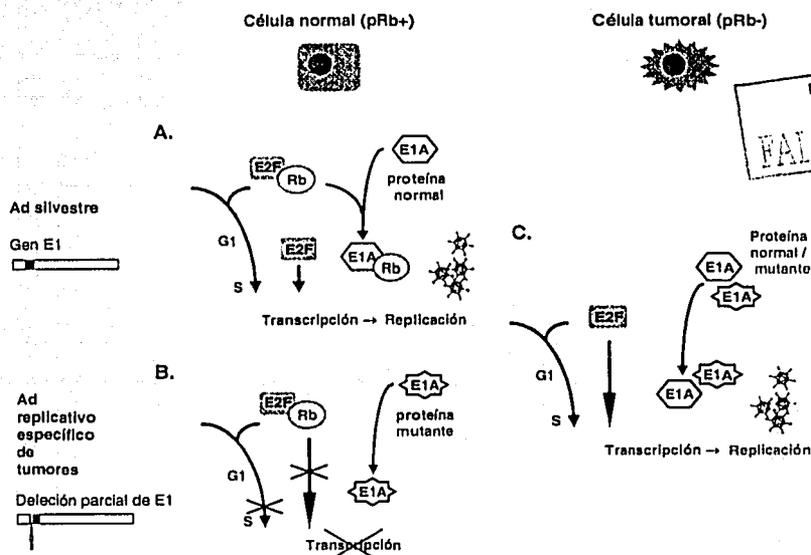


Fig. 11. Construcción de adenovirus de replicación selectiva por la introducción de deleciones parciales de E1 en sitios que codifican porciones de proteínas cruciales para su reproducción en la célula normal pero irrelevantes para hacerlo en las tumorales. En este caso particular, se provoca la deleción en el

CR2 del E1A que interfiere con la interacción de esta proteína con pRB, lo que bloquea su reproducción sólo en células normales.

#### 4.2. El adenovirus Ad5- $\Delta$ 24

El Ad5- $\Delta$ 24 es un adenovirus replicativo que contiene una deleción de 24 pares de bases en la región CR2 del gen E1A, específicamente de las bases 923 a 946 que codifican los aminoácidos L<sub>121</sub>TCHEACF<sub>128</sub> (Fig. 12). Esta deleción provoca la síntesis de una proteína E1A mutante que no es capaz de formar complejos con la pRb (Fueyo *et al.*, 2000).

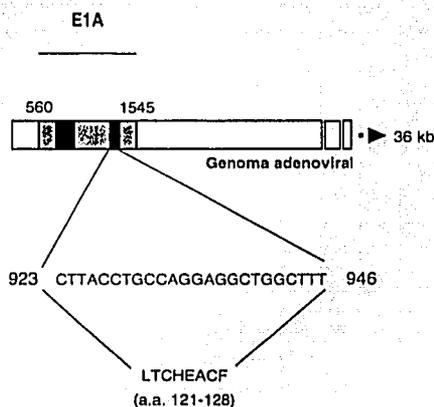


Fig. 12. Esquema de la región E1A del adenovirus mostrando la deleción de 24 bp y los aminoácidos que codifica. Es importante notar que ésta incluye la secuencia consenso L-X-C-X-E de interacción con pRB.

Se ha demostrado la selectividad del mismo en líneas celulares de glioma y sarcoma que presentan alteraciones de la vía de pRb/p16 (Fueyo *et al.*, 2000). En el presente trabajo se ha elegido este virus condicionalmente replicativo para agregar modificaciones que le permitan superar algunos obstáculos que enfrentan este tipo de agentes virales empleados en el tratamiento del cáncer.



## **OBJETIVOS**

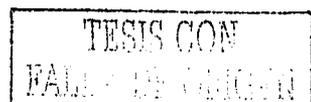
---

### **General**

Incrementar la potencia oncolítica del adenovirus condicionalmente replicativo, Ad5- $\Delta$ 24.

### **Particulares**

1. Introducción genética de la secuencia que codifica el motivo RGD en la fibra del adenovirus de replicación condicionada:
  - a. Estudiar la replicación del DNA de los mutantes RGD del adenovirus.
  - b. Comparar la capacidad oncolítica de los virus RGD *in vitro*.
  - c. Comparar la capacidad oncolítica de los virus RGD *in vivo*.
2. Reincorporación del gen E3:
  - a. Comparar la capacidad oncolítica de los virus E3<sup>+</sup> *in vitro*.
  - b. Comparar la capacidad oncolítica de los virus E3<sup>+</sup> *in vivo*.
3. Estudiar el efecto de los adenovirus condicionalmente replicativos administrados de forma local o sistémica en un modelo *in vivo*.
4. Mejorar la carga adenoviral que alcanza el tumor cuando es administrado por vía sistémica.



## MATERIALES Y METODOS

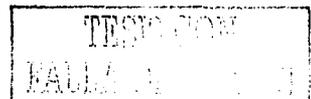
### 1. Cultivo celular

#### *Reactivos, medios y suplementos*

- Dimetil-sulfóxido (DMSO) (Fisher Scientific, Pennsylvania, E. U.)
- Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Mediatech, Virginia, E. U.)
- L-glutamina (Mediatech)
- Nitrógeno líquido (Forma Scientific, Ohio, E. U.)
- Solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) (Mediatech)
- Suero bovino fetal (FBS) (Hyclone, Utah, E. U.)
- Tripsina 0.05%/ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.53 mM (Mediatech)

#### *Líneas celulares*

Línea celular	Tejido de origen	Proveedor
293*	Riñón embrionario humano	Microbix, Ontario, Canadá.
A549	Adenocarcinoma de pulmón	ATCC** CCL-185
D65MG	Glioma	Obsequio de Dr. Igor Dmitriev, Centro de Terapia Génica, Universidad de Alabama en Birmingham. Alabama, E. U.
HeLa	Adenocarcinoma de cérvix	ATCC CCL-2
Hs 766T	Adenocarcinoma de páncreas	ATCC HTB-134
LNCaP	Metástasis de cáncer de próstata a ganglio linfático	ATCC CRL-1740
RD	Rabdomiosarcoma	Obsequio de Dr. Igor Dmitriev, Centro de Terapia Génica, Universidad de Alabama en Birmingham.
Saos-2	Osteosarcoma	ATCC HTB-85
SKOV-3	Adenocarcinoma de ovario	ATCC HTB-77
SKOv3.ip.1	Adenocarcinoma de ovario	Obsequio de Dra. Janet Price M.D., Anderson Cancer Center. Texas, E. U.



\*293 (HEK293), es una línea celular proveniente de riñón embrionario humano transformadas con el 11% del extremo izquierdo del genoma del adenovirus (incluyendo E1A y E1B) (Graham *et al.*, 1977). Son altamente permisivas para la infección y crecimiento de adenovirus. \*\*ATCC (Virginia, E. U.).

### *Material y equipo*

- Baño a 37°C (Fisher Scientific)
- Campana de flujo laminar (Nuair)
- Centrifuga (Beckman GS-6R) (Beckman Coulter, California, E. U.)
- Crioviales (2 mL) (Corning, Nueva York, E. U.)
- Incubadora 37°C equilibrada a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad (Nuair, Minnesota, E. U.)
- Microscopio invertido de contraste de fases (Olympus CK2) (Olympus America Inc., Nueva York, E. U.)
- Microscopio de fluorescencia (Olympus 1X70)

### *Método*

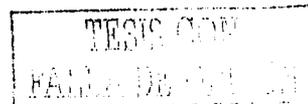
Todas las líneas celulares se cultivaron en DMEM suplementado con 5 ó 10% de FBS inactivado por calor. En ningún caso se emplearon antibióticos. Durante el mantenimiento, se subcultivaron en una proporción de 1:3 a 1:5 de acuerdo a los requerimientos y características de cada célula. Para la criopreservación, se preparó una suspensión de  $2 \times 10^6$  células/mL/criovial en medio completo más DMSO (5%), se congelaron gradualmente y se conservan en nitrógeno líquido (-125°C).

## **2. Adenovirus**

El adenovirus es un patógeno humano, por lo que todos los procedimientos deben de llevarse a cabo en campanas de flujo laminar, usar guantes y todo el material empleado debe de ser descontaminado con un desinfectante antiviral antes de tirarlos como desechos biológicos. Las alícuotas de virus purificados deben de conservarse a -80°C.

Los adenovirus empleados en este trabajo son:

Nombre	E1	E3	Fibra	Promotor
AdCMVLuc	Luciferasa	---	---	CMV***
AdLucRGD	Luciferasa	---	RGD*	CMV



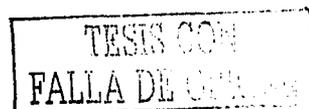
AdGFP	GFP**	---	---	CMV
AdGFP/RGD	GFP	---	RGD	CMV
Ad5-Δ24/GFP (E3')	Delección 24 bp	GFPzeo <sup>6</sup>	---	CMV
Ad5-Δ24 <sup>1</sup>	Delección 24 bp	---	---	---
Ad5-Δ24E3	Delección 24 bp	---	---	---
Ad5-Δ24RGD/GFP(E3')	Delección 24 bp	GFPzeo	RGD	CMV
Ad5-Δ24RGD(E3')	Delección 24 bp	---	RGD	---
Ad5-wt300	---	---	---	---
Ad5-wtGFP	---	GFP	---	CMV
Ad5-wtRGD	---	---	RGD	---

\*RGD = Arg-Gly-Asp; \*\*GFP = proteína fluorescente verde; \*\*CMV = citomegalovirus; <sup>6</sup>GFPzeo = proteína fluorescente verde-gen de resistencia a zeocina (antibiótico de selección); <sup>1</sup>Obtenido del Dr. Juan Fueyo (M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, E. U.).

## 2.1. Construcción de los adenovirus

### *Reactivos y material biológico*

- Agar (Sigma Chemical Co., Missouri, E. U.)
- Cloruro de sodio (Sigma)
- Extracto de levadura (DIFCO)
- Medio S.O.C. (Invitrogen, California, E. U.)
- Tryptona (DIFCO laboratories, Michigan, E. U.)
- Antibióticos: ampicilina (50 µg/mL), kanamicina (30 mg/mL) (Sigma)  
zeocina (25 µg/mL) (Invitrogen)
- Bacterias: BJ5183 (Stratagene, California, E. U.)  
DH5α (Invitrogen)
- Enzimas de restricción (New England Biolabs Inc., Massachusetts, E. U.):  
*AflI, BsrGI, BstXI, ClaI, MfeI, MunI, NdeI, PacI, SphI, Swal, XbaI*
- Plásmidos: pBHG10 (Microbix Biosystems Inc., Ontario, Canadá)  
pShuttle (Stratagene)  
pTG3602 y pTG4050 (Transgene, Estrasburgo, Francia)  
pTracer-SV40 (Invitrogen)  
pXC1 (Microbix Biosystems Inc.)

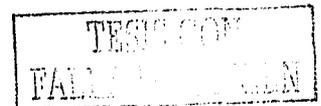


### *Material y equipo*

- Aparato de agitación a 30°C y 37°C (New Brunswick Scientific, Nueva Jersey, E. U.)
- Baño a 42°C (Fisher Scientific)
- Cubetas para electroporación de 2.0 mm (Biorad, California, E. U.)
- Electroporador *E. coli Pulser* (Biorad)
- Equipo de purificación de plásmidos QIAGEN Plasmid Mini, QIAfilter Maxi y Endofree Maxi QIAGEN, California, E. U.)
- Incubador de bacterias a 30°C y 37°C (modelo 12-140) (Quincy Lab, Illinois, E. U.)
- Matraz de Erlenmeyer (Fisher)
- Microcentrífuga (Eppendorf, Nueva York, E. U.)
- Platos de Petri de plástico (Fisher)
- Tubos de poliestireno 17x100 mm con tapa (Fisher)
- Tubos de polipropileno 17x100 mm con tapa (Fisher)

### *Método*

Las recombinaciones homólogas fueron realizadas en *E. coli* por transformación por choque térmico o electroporación. Se incuban en medio S.O.C. por 1 h con agitación (300 rpm) a 30°C (plásmidos >10 kb) o 37°C (<10 kb) para su recuperación y posteriormente se centrifugan, se resuspenden en 100 µL del mismo medio, se extienden sobre una placa de agar Luria-Bertani (LB) (agar+extracto de levadura+NaCl+triptona) suplementada con el antibiótico de selección correspondiente y se incuban hasta que las bacterias crezcan. Se recogen colonias individuales y se inoculan en tubos con 2-3 mL de LB líquido + antibiótico y se agitan a 30°C y 37°C por >8 h. El plásmido se purifica a partir de 1-mL de estos preparados y se analiza por digestión enzimática para elegir la colonia que contiene el DNA correcto. Finalmente, se elabora un cultivo bacteriano de 250 mL y el plásmido se purifica empleando el equipo de QIAGEN.



#### **2.1.1. Clonaje**

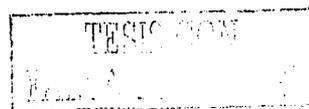
AdCMVLuc y AdGFP Son adenovirus no replicativos con genes reporteros cuya expresión puede ser cuantificada u observada. Sus cassettes de expresión están compuestos por el promotor proveniente del citomegalovirus (CMV) más el gen que codifica la luciferasa de luciérnaga o la GFP y la señal de poliadenilación del SV40.

Estos se subclonaron en el plásmido pXCJL.1 que contiene el extremo izquierdo del genoma del adenovirus (obtenido del Dr. Graham, McMaster University, Hamilton, Canadá) y se recombinó por homología con el plásmido pTG4050 que posee el resto del DNA viral.

El adenovirus replicativo Ad5- $\Delta$ 24 fue obtenido del Dr. Juan Fueyo (The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Texas, E.U.A.) y contiene una delección de 24 bp (Ad5 923 a 946) correspondiente a la secuencia de aminoácidos L<sub>122</sub>TCHEAGF<sub>129</sub> de la proteína E1A que es necesaria para la unión del virus a la pRb de la célula huésped (Fueyo *et al.*, 2000). En primer lugar, el plásmido pXC1- $\Delta$ 24 fue construido por la mutagénesis dirigida del plásmido pXC1 para eliminar las bases 923 a 946 de la unidad de transcripción E1A. El adenovirus fue elaborado por recombinación homóloga de este plásmido con pBHG10. La modificación de las fibras de los virus Ad5- $\Delta$ 24, AdCMVLuc y AdGFP fue realizada por recombinación homóloga de la región E1 que contiene el gen de la luciferasa, de la GFP o el fragmento de E1 del plásmido pXCI- $\Delta$ 24, con pVK503, que consiste en el resto del genoma del virus incluida la fibra mutada con la secuencia RGD. El genoma de cada virus fue liberado del plásmido por digestión con *PacI* y transfectado a células 293 para obtener el adenovirus.

#### Variaciones del Ad5- $\Delta$ 24

Ad5- $\Delta$ 24/GFP Se trata de un adenovirus cuyo gen E3 fue sustituido por el transgén GFP-zeocina y se comporta de forma equivalente a Ad5- $\Delta$ 24. Se construyó el plásmido pE3-GFPzeo mediante la clonación de un fragmento obtenido a partir del plásmido pTracer-SV40 que contiene el promotor de CMV y la secuencia de GFP fusionada con el gen de resistencia al antibiótico de selección, zeocina, en pKOE3A, que es un plásmido diseñado para introducir genes heterólogos en la región E3 del adenovirus. Posteriormente, el fragmento *AflI/SphI* proveniente de pE3-GFPzeo se recombinó por homología con el plásmido pTG4050 (que contiene el genoma viral excepto los genes E1 y E3) para generar pTG4050-GFPzeo. Finalmente, se co-transfectaron células 293 con los plásmidos pXC1- $\Delta$ 24 y pTG4050-GFPzeo para obtener el adenovirus.



Ad5- $\Delta$ 24E3 Este adenovirus es una versión del Ad5- $\Delta$ 24 que conserva el gen E3. Los fragmentos provenientes de la digestión enzimática de pXC1- $\Delta$ 24 (*BsrGI/XbaI* y *XbaI/MfeI*) que contienen la región E1A con la delección de 24 bp y la E1B fueron ligados con el fragmento *BsrGI/MfeI* del plásmido pShuttle dando como resultado pShuttle- $\Delta$ 24. Este se recombinó con pTG3602 (Chartier *et al.*, 1996) para construir el plásmido p $\Delta$ 24E3+.

Ad5- $\Delta$ 24RGD/GFP Esta es una versión idéntica a Ad5- $\Delta$ 24/GFP a excepción de la presencia del motivo RGD en el glóbulo de la fibra. El fragmento *AflII/SphI* proveniente de pE3-GFPzeo fue introducido por recombinación homóloga al plásmido pVK526 descrito arriba (Suzuki *et al.*, 2001) que contiene el genoma adenoviral incluyendo la región E1A con la delección  $\Delta$ 24.

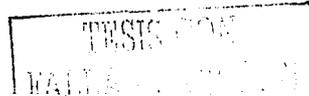
Ad5- $\Delta$ 24RGD Este virus contiene ambos elementos, E3 y RGD, y fue obtenido a partir del plásmido pVK526 que se elaboró por recombinación homóloga del fragmento de E1A que contiene la delección de 24 bp del plásmido pXC1- $\Delta$ 24 con el plásmido pVK503 (que contiene la secuencia adenoviral completa con RGD en la fibra) digerido con *ClaI* (Dmitriev *et al.*, 1998).

#### Derivados del virus silvestre (wild type)

Ad5-wt300 Está reconocido por el Subcomité de Virus del Comité Internacional de Nomenclatura como la cepa referencia del adenovirus humano serotipo 5 (Ad5). Obtenido de ATCC (ATCC No. VR-5).

Ad5-wtGFP Es un Ad5 con el gen E3 sustituido por el transgén que codifica la GFP-zeocina. Se construyó a partir de pTG4050 por recombinación homóloga con un fragmento *AflII/SphI* del plásmido pE3-GFPzeo.

Ad5-wtRGD La composición de este virus es idéntica a la del Ad5 silvestre excepto por la presencia de la secuencia RGD en el glóbulo de la fibra. Se contruyó el plásmido pVK50 (Krasnykh *et al.*, 1998) a partir del plásmido pTG3602 (Chartier *et al.*, 1996) por digestión parcial con *NdeI* e introducción de un "linker" *NdeI/SwaI* (Krasnykh *et al.*,



1998). El plásmido pNEB.PK.F<sub>HI</sub>RGD se elaboró subclonando el fragmento *Bst*XI-*MunI* de pQE.KNOB.RGD<sub>HI</sub>, que contiene la secuencia que codifica RGD-4C, al pNEB.PK3.6 (Dmitriev *et al.*, 1998). pVK503 es el resultado de la recombinación homóloga de pNEB.PK F<sub>HI</sub>RGD con pVK50 digerido con *Swa*I.

### 2.1.2. Transfección de células animales por el método de fosfato de calcio para la producción de adenovirus

El genoma viral de cada construcción fue liberado por digestión con *Pac*I y transfectados a células 293 para generar el correspondiente adenovirus. Los plásmidos fueron transfectados por el método de Chen y Okayama en el que el precipitado formado por el DNA y el fosfato cálcico se acumula lentamente en el medio de cultivo (pH 6.96) durante la incubación por 15 a 24 h en un ambiente bajo en CO<sub>2</sub> (2-4%) (Chen y Okayama, 1987; Chen y Okayama, 1988).

#### Reactivos

- BES 2x, pH 6.96 (1.07 g BES = ácido N,N-bis[2-hidroxietil]-2-aminoetanosulfónico; 1.6 g NaCl; 0.027 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O en 100 mL de agua destilada), filtrado. (Fisher)
- Cloruro de calcio 2.5 M (13.5 g CaCl<sub>2</sub> •6H<sub>2</sub>O en 20 mL de agua destilada). Filtrado. (Sigma)
- DMEM
- FBS
- Células: 293

#### Material y Equipo

- Campana de flujo laminar
- Congelador a -80°C (REVCO, Carolina del Norte, E. U.)
- Dos incubadoras, una a 37°C/3 % CO<sub>2</sub> y otra a 5% CO<sub>2</sub>
- Platos de cultivo de 6 pocillos
- Tubos de microcentrífuga

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### Método

Se siembran las células 293 veinticuatro horas antes del procedimiento en número tal que, en el momento de la transfección, estén a 50% de confluencia (aproximadamente 500,000 células/pocillo). Se cambia el medio de cultivo por uno fresco (2 mL por pocillo) 1-h antes. Se mezclan en un tubo de microcentrífuga: 2-4 µg de DNA/pocillo más 12.5

$\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  2.5 M y la cantidad suficiente de agua bidestilada estéril para completar 125  $\mu\text{L}$ . Posteriormente, se agregan 125  $\mu\text{L}$  de BES 2x, se mezcla y se deja a temperatura ambiente por 20 a 30 min para la formación del co-precipitado. Añadir la mezcla DNA/ $\text{CaCl}_2$ /BES al pocillo gota a gota (total de 250  $\mu\text{L}$ /pocillo) mientras se mueve el plato de cultivo suavemente. Se incuba por 15 a 24h a 37°C y 3% de  $\text{CO}_2$ . Al día siguiente se cambia el medio de cultivo, previa confirmación de la presencia de precipitado. La formación del adenovirus se observa aproximadamente en 6 a 7 días por la presencia de células redondeadas que se despegan del plato fácilmente.

## 2.2. Amplificación de los adenovirus

Cuando se observa la formación de virus, se recogen células y sobrenadante y se tratan con 3 ciclos de congelación/descongelación para liberar el virus del interior de las células. Para amplificar los virus no replicativos (AdCMVLuc, AdLucRGD, AdGFP y AdGFP/RGD) se emplea la línea celular 293, mientras que para los replicativos se emplean las líneas Saos-2 o A549, que carecen de secuencias complementarias a la delección  $\Delta 24$ , cultivadas a 90% de confluencia en platos de tamaño sucesivamente mayor. El sobrenadante por sí mismo puede infectar 5 platos del mismo tamaño del que proviene y el lisado lo hace en 20. Aunque el número de platos depende de cada preparación, en el presente trabajo se emplearon generalmente 20 platos de 150 mm.

### *Material y equipo*

- Centrífuga
- Incubadora a 37°C, 5%  $\text{CO}_2$
- Plato de cultivo de 100 mm de diámetro
- Platos de cultivo de 150 mm de diámetro
- Tubos cónico de centrifugación de 250 mL



### *Método*

Las células se infectan, ya sea con virus purificado a una multiplicidad de infección (m.o.i) de 10 (10 unidades formadoras de placas [pfu]/célula, véase titulación de virus), ya con lisado celular o con sobrenadante de una preparación previa. Después de una incubación de 36 a 48h a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$ , el efecto citopático es evidente en 95-100% y 10-20% de las células se despegan del plato, en ese momento se recogen junto con el

medio en tubos cónicos y se centrifugan a 1,500 rpm a 4°C por 5 min. El sobrenadante se guarda a -80°C para posteriores infecciones. El botón de células se puede guardar congelado en un volumen proporcional (1:2) de medio hasta la purificación del adenovirus.

### 2.3. Purificación del adenovirus

#### *Reactivos*

•Soluciones de cloruro de cesio (Invitrogen):

1.2 g/mL (40g CsCl en 160 mL Tris 50mM pH 8.1)

1.5 g/mL (141.6g CsCl en 220 mL Tris 50mM pH 8.1)

•Tampón de diálisis (HEPES 10 mM, MgCl<sub>2</sub>-6 H<sub>2</sub>O 1-mM, glicerol 10%)

#### *Material y equipo*

•Cassettes de diálisis (Pierce 10,000 MW) (Pierce, Illinois, E. U.)

•Centrífuga (Beckman GS-6R)

•Tubos de centrifugación (Beckman Ultraclear, 14 x 89 mm y 25 x 89 mm)

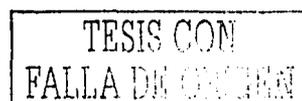
•Ultracentrífuga (Beckman L7)

#### *Método*

El botón de células infectadas se lisa pasándolas por tres ciclos de congelamiento/descongelamiento en un volumen de 15 o 30 mL para liberar los adenovirus y la suspensión se centrifuga a 2,500 rpm por 5 min a 4°C para precipitar los restos celulares. Mientras tanto, se preparan tubos de ultracentrífuga con dos fases de cloruro de cesio, una de 1.5 g/mL en el fondo y otra de 1.2 g/mL sobre ella, y arriba de ellas se vierte la suspensión viral. Se centrifugan los tubos a 18,000 rpm a 4°C por 3 h, de lo que se obtiene una banda de color blanco-opalino de virus. Se extrae la banda y se somete a otro ciclo de purificación empleando el mismo gradiente y una velocidad de 35,000 rpm, a 4°C por más de 18 h. Al final se obtiene una banda nítida de color blanco opalino correspondiente al adenovirus que se extrae y se dializa en un tampón con glicerol a 4°C. Se hace una titulación del número de partículas virales por espectrofotometría (ver más adelante), se hacen alícuotas y se mantienen a -80°C.

### 2.4. Titulación de los adenovirus

#### 2.4.1. Espectrofotometría (densidad óptica)



### *Reactivos*

- Tampón de lectura de densidad óptica (Tris 10 mM, EDTA 1-mM, SDS 0.1%, pH 8.0)

### *Material y equipo*

- Cubetas de cuarzo para espectrofotometría (capacidad de 100  $\mu$ L)
- Espectrofotómetro (Perkin Elmer, MBA 2000, Massachusetts, E. U.)
- Microcentrífuga (Eppendorf)
- Termomezclador (Eppendorf)
- Vortex (Fisher Scientific)

### *Método*

Se toman 5  $\mu$ L de la suspensión viral dializada y se añaden a 95  $\mu$ L del tampón para lectura, se mezcla usando el vortex, se calienta por 5 min a 56°C y se centrifuga 1-min para precipitar el detritus. Se mide la densidad óptica (O. D.) en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm. Se multiplica el valor de O. D. por 20 (factor de dilución) y la cifra resultante equivale a  $1.1 \times 10^{12}$  partículas virales (pv)/mL (Maizel *et al.*, 1968).

## **2.4.2. Ensayo de placa**

### *Reactivos*

- Agarosa de bajo punto de fundición 1.33% en agua (esterilizado en autoclave) (BioWhittaker Molecular Applications, Maine, E.U.)
- Medio de infección (DMEM, glutamina 1%, FBS 2.5%)
- Medio 2x (DMEM 2x, glutamina 2%, FBS 5%)
- Células: 293

### *Material y equipo*

- Campana de flujo laminar
- Incubadora a 37°C y CO<sub>2</sub> 5%
- Platos de 6 pocillos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### *Método*

Brevemente, se siembran células 293 a 90% de confluencia en platos de 6 pocillos y se preparan diluciones seriadas del virus purificado (generalmente  $10^{-3}$  a  $10^{-11}$ ) en medio de infección 1x. Se infectan las células con 1-mL por pocillo y se incuban a 37°C y 5%

CO<sub>2</sub> durante toda la noche. Al siguiente día se cubre la monocapa celular con agarosa 1.33% mezclada en una proporción 1:1 con medio de infección 2x y se vierte medio de cultivo 1x sobre la agarosa polimerizada. Los platos se mantienen en observación por 14 días para contar el número de placas resultantes del efecto citopático del virus en cada pocillo. La unidad empleada en esta titulación es la unidad formadora de placas (pfu)/mL.

### 2.4.3. Método espectrofotométrico de O'Carroll modificado (O'Carroll *et al.*, 2000)

El reactivo BCA se basa en el método de Biuret para cuantificación de proteínas, que consiste en la reducción de un ion Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>1+</sup> por la proteína en un medio alcalino. Dos moléculas de ácido bicinónico del reactivo se combinan con Cu<sup>1+</sup> formando un complejo de color púrpura cuya absorbancia se lee a una longitud de onda de 565 nm.

#### *Reactivos*

- DMEM + FBS 0.5%
- Equipo BCA de cuantificación de proteínas (Pierce)
- Células: 293



#### *Material y equipo*

- Espectrofotómetro
- Miniagitador (MS1 Minishaker/USA Scientific Plastics, Florida, E. U.)
- Platos de cultivo de 96 pocillos

#### *Método*

Se siembran 40,000 células 293 por pocillo en platos de 96 empleando 100 µL de DMEM con 0.5% FBS. Al día siguiente se infectan con diluciones sucesivas (100 µL) en una proporción de 1:5 de la muestra (sobrenadante, lisado celular, lisado tumoral) en estudio. Después de 4 días de la infección, se calcula el número de células no lisadas en base a la cantidad de proteínas en el pocillo, para lo que se aspira el medio cuidadosamente y se agregan 200 µL del reactivo BCA (mezcla 50:1 de las soluciones A y B). Los platos se incuban a temperatura ambiente con agitación por 2 h y se mide la absorbancia a 565 nm. Se elaboran gráficas en base a la concentración de proteína (eje Y) y la dilución (eje X, escala logarítmica) y se traza una línea perpendicular desde el punto en que la gráfica muestra la dosis citotóxica 50 (la concentración de proteína

es 50% del nivel máximo) y el punto de intersección sobre el eje X equivale al título del sobrenadante. El cálculo a realizar es: número de células destruidas (50% del número sembrado inicialmente = 20,000) x (cifra de intersección en el eje X) dividido entre 0.1 (volumen de suspensión viral). El título se expresa en unidades de efecto citopático (CPE)/mL.

#### **2.4.4. Método basado en la transducción de genes reporteros**

(véase también "ensayo de luciferasa")

##### *Reactivos*

- DMEM + FBS 5%
- Luciferina
- Sangre total de ratón
- Adenovirus: AdGFP y AdCMVLuc
- Células: 293

##### *Material y equipo*

- Luminómetro
- Microscopio invertido de fluorescencia
- Platos de cultivo de 96 pocillos
- Tubos

##### *Método*

Se siembran las células en platos de 96 pocillos (200,000 células/pocillo) el día anterior al experimento. Se hacen diluciones seriadas de los adenovirus empleando como diluyente sangre total o plasma de ratón. Se incuban durante 1-h y se adiciona DMEM/FBS. Veinticuatro horas después se observan en el microscopio de fluorescencia y se cuenta el número de células que expresan la proteína fluorescente verde. Se realiza el mismo experimento empleando el virus que expresa luciferasa y se preparan diluciones en PBS para comparar con las preparadas en sangre total heparinizada. Después de 48 h, se lisan las células, se centrifuga y se realiza el ensayo de luciferasa como se ha explicado previamente.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2.5. Caracterización de los adenovirus

El DNA viral purificado a partir de virus puro o de un lisado celular se puede utilizar como molde o plantilla para cualquier técnica de análisis como la secuenciación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la digestión con enzimas de restricción, entre otras.

### 2.5.1. Purificación del DNA a partir de virus purificado

#### *Reactivos*

- Dodecil-sulfato sódico (SDS) 10%
- EDTA 500 mM
- Etanol 70%
- Etanol 70%/acetato de sodio 2%
- Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) (Ambion, Inc., Texas. E. U.)
- Proteinasa K (10 mg/mL)
- TE pH 8.0
- Virus purificado

#### *Material y equipo*

- Microcentrifuga
- Termomezclador
- Tubos de microcentrifuga

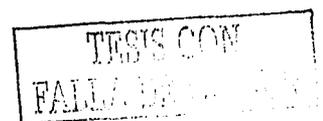
#### *Método*

Un número de  $2 \times 10^{10}$  partículas virales equivale a 1- $\mu$ g de DNA. Tomando en cuenta esta cifra, se añade al volumen requerido de virus purificado, SDS (concentración final 0.5%), EDTA (20 mM), proteinasa K (200  $\mu$ g/mL) y TE necesario para ajustar a 400  $\mu$ L finales. Se incuba por 1-h a 56°C y el DNA se extrae con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, se precipita con una mezcla de etanol y acetato de sodio, se lava una vez con etanol 70%, se seca y se resuspende en agua.

### 2.5.2. Purificación del DNA viral a partir de células infectadas

#### *Reactivos*

- EDTA (500 mM)



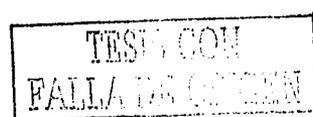
- Espermina-HCl (500 mM) (Sigma)
- Etanol 70%
- Etanol 70%/acetato de sodio 2%
- Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1)
- Proteinasa K (10 mg/mL)
- RNasa A (10 mg/mL)
- SDS 10%
- TE pH 9.0
- TE pH 8.0
- Tampón de lisis celular con desoxicolato (DOC) (etanol 20%, Tris pH 9.0 100 mM, desoxicolato de sodio 0.4%)

### *Material y equipo*

- Microcentrifuga
- Termomezclador
- Tubos de microcentrifuga

### *Método*

La base del método es la precipitación del DNA libre (incluyendo el genoma viral no encapsidado y el celular) para aislar únicamente el DNA viral encapsidado. Células sembradas en un plato de cultivo de 100 mm a 90% de confluencia se infectan con el adenovirus a analizar. Cuando las células se observan redondeadas y flotantes (efecto citopático) se colectan, se centrifugan y el botón se resuspende en 400  $\mu$ L de TE pH 9.0. Se añaden 400  $\mu$ L del tampón DOC y se pasan por la punta de la pipeta 15 veces para romper las células. Se transfiere a un tubo de microcentrifuga y se agregan 8  $\mu$ L de espermina-HCl, se mezcla e incuba por 10 min en hielo. Se observa la aparición de un precipitado blanco correspondiente al DNA no encapsidado y celular. Posteriormente se centrifuga y se toma el sobrenadante en un tubo nuevo. Se adicionan 4  $\mu$ L de RNasa A y se incuba por 10 min a 37°C. Se añaden 60  $\mu$ L de SDS, 40  $\mu$ L de proteinasa K y 20  $\mu$ L de EDTA y se incuba por 1-h a 37°C. Se extrae el DNA viral con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y se precipita con etanol y acetato de sodio. Se lava el DNA con etanol 70%, se centrifuga, se seca y se resuspende en agua o TE pH 8.0.



### 2.5.3. Análisis del DNA viral

#### 2.5.3.a. PCR y digestión enzimática

##### Reactivos

- Agarosa (Sigma)
- Agua desionizada
- Bis-acrilamida (Bio-Rad, California, E. U.)
- N,N,N,N'-Tetrametil-etilendiamina (TEMED) (Bio-Rad)
- Persulfato de amonio
- Tampón Tris base-ácido bórico-EDTA (TBE)
- DNA viral

• Cebadores:	<b>E1a-1</b>	5'-ATTACCGAAGAAATGGCCGC-3'
	<b>E1a-2</b>	5'-CCATTTAACACGCCATGCA-3'
	<b>Fiber-up</b>	5'-CAAACGCTGTTGGATTTATG-3'
	<b>Fiber-down</b>	5'-GTGTAAGAGGATGTGGCAAAT-3'
	<b>AdE3-up</b>	5'-CTAGTTTCGCGCCCTTCTC-3'
	<b>AdE3-down</b>	5'-ACGGGGTTGAAGGTATCTTC-3'

- Enzimas de restricción (New England Biolabs, Inc.):

*Bst*XI

*Pci*I

Buffer 3 y 4

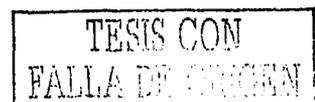
BSA (0.1 mg/mL final)

- *Premix Taq* (TaKaRa Biomedicals, Shiga, Japón)

- contiene:
- Polimerasa *TaKaRa Ex Taq*<sup>TM</sup> 1.25 unidades/25  $\mu$ L
  - Mezcla de dNTP (0.4 mM cada uno)
  - Tampón *Ex Taq*<sup>TM</sup> 2x (TAPS 50 mM, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, 2-mercaptoetanol 2 mM)

##### Material y equipo

- Aparatos de electroforesis, horizontal y vertical (Bio-Rad)
- Termociclador (Perkin Elmer, Geneamp PCR system 2400)
- Termomezclador (Eppendorf)
- Tubos para microcentrífuga (1.5 mL)
- Tubos para PCR (0.2 mL)



### Método

La delección  $\Delta 24$  y la presencia de E3 fueron analizadas por amplificación por PCR de los fragmentos comprendidos entre los cebadores E1a-1/E1a-2 y E3-up/E3-down.

Se mezclan en tubos de PCR:	Agua	para completar 50 $\mu$ L
	DNA	<1 $\mu$ g
	Cebador 1 (20 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ L
	Cebador 2 (20 $\mu$ M)	2.5 $\mu$ L
	Tampón <i>Ex Taq</i> ™	20 $\mu$ L

Las condiciones para el PCR son:	Desnaturalización	95°C	30 seg
	Alineamiento	60°C	30 seg
	Elongación	72°C	1 min

Número de ciclos: 30

Las reacciones de PCR fueron seguidas de digestión con *Bst*XI (productos del par E1a-1/E1a-2) o con *Pci*I (productos de E3-sense/E3-antisense). Posteriormente se corren las muestras en un gel de agarosa al 1%. La presencia de la secuencia RGD en los virus fue analizada por PCR de un fragmento de la fibra comprendido entre los cebadores Fiber-up/Fiber-down en un gel de acrilamida al 6%. Como método adicional, se realizó la secuenciación de las regiones de interés de E1A (CR2), E3 (ADP) y la fibra (RGD). Para ello, se emplearon los mismos oligonucleótidos E1A-1 y Fiber-up empleados en la PCR y para analizar ADP se utilizó el cebador E3-adp.

### 2.5.3.b. Secuenciación

#### Reactivos

- Agua
- Equipo CEQ™ 2000 Dye Terminator Cycle Sequencing (Beckman Coulter, Inc.).
- DNA viral

• Cebadores:	<b>E1a-1</b>	5'-ATTACCGAAGAAATGGCCGC-3'
	<b>Fiber-up</b>	5'-CAAACGCTGTTGGATTATG-3'
	<b>E3-adp</b>	5'-CAGCGACCCACCCTAACAGA-3'

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Material y equipo

- Secuenciador CEQ™ 2000 (Beckman Coulter, Inc.)
- Termociclador (Perkin Elmer)
- Tubos para PCR (0.2 mL)

### Método

Los reactivos deben ser mantenidos en hielo durante la preparación. En un tubo para PCR se mezclan:

Agua	0 – 9.5 $\mu$ L
DNA viral	0.5 – 10 $\mu$ L
Cebador (1.6 $\mu$ M)	2.0 $\mu$ L
Master mix quick start	<u>8.0 <math>\mu</math>L</u>
Total	20 $\mu$ L

Condiciones de PCR:	Desnaturalización	96°C	20 seg
	Alineamiento	50°C	20 seg
	Elongación	60°C	4 min

Número de ciclos: 50

Posteriormente el DNA amplificado se precipita con etanol 95% a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se centrifuga a 14,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Se aspira el etanol y el botón de DNA se lava dos veces con etanol 70% a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se deja secar por 40 min y se resuspende en 40  $\mu$ L de la solución de carga. Las muestras de esta manera preparadas se cargan en platos de 96 pocillos especiales para el secuenciador CEQ™ 2000 y se cubren con una gota de aceite mineral. Se inicia el programa de secuenciación del aparato.

### 2.5.4. Inmunoprecipitación y detección de proteínas por quimioluminiscencia

#### Reactivos

- Bis-acrilamida (Bio-Rad)
- Equipo de detección de ácidos nucleicos por peroxidación de luminol "ECL" (Amersham Pharmacia Biotech, Nueva Jersey, E. U.)
- Fenilmetilsulfonil-fluoruro (PMSF) 1-mM (Sigma)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Leche descremada en polvo
- Metanol
- Persulfato de amonio
- Proteína A/G-agarosa (Santa Cruz Biotech, California, E. U.)
- SDS
- Tampón de carga de proteínas 2x (Tris-HCl 250 mM, pH 6.8; SDS 2%, glycerol 10%, di-tio-treitol [DTT] 20 mM, azul de bromofenol 0.01%)
- Tampón de lisis celular (Tris 50 mM pH 8.0, EDTA 5 mM, NaCl 250 mM, Triton X-100 0.1%)
- TEMED (Bio-Rad)
- Tris-HCl
- Tween 20
- Adenovirus: Ad5-wt300, Ad5- $\Delta$ 24 y Ad5- $\Delta$ 24RGD
- Anticuerpos:
  - ▶ Anticuerpo (IgG<sub>2a</sub>) de ratón anti-E1A (M73) (Oncogene Research, Massachusetts, E. U.)
  - ▶ Anticuerpo anti-pRb (Santa Cruz Biotech)
  - ▶ Anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) (Amersham Pharmacia Biotech)
- Células: A549

### *Material y equipo*

- Cassete metálico para exposición
- Membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad)
- Película para detección de quimioluminiscencia BioMax ML (Kodak, Nueva York, E. U.)
- Revelador de placas radiográficas (Konica QX-70, Konica Medical Imaging, Nueva Jersey, E. U.)

### *Método*

Se siembran células A549 a una confluencia de 85-90% en platos de 100 mm y se infectan con 100 partículas virales (pv)/célula de Ad5-wt300, Ad5- $\Delta$ 24 o Ad5- $\Delta$ 24RGD, más uno de control sin virus. Al día siguiente se colectan las células, se centrifugan, se lisan empleando el tampón de lisis con PMSF, se incuban en hielo por 15 a 30 min y se vuelven a centrifugar. El sobrenadante se pasa a un tubo nuevo con anticuerpo anti-E1A (concentración final de 5  $\mu$ g/mL) y proteína A/G-agarosa y se mezcla durante más de 3 h a 4°C para formar el inmunoprecipitado. Se lava 4 veces con tampón de lisis seguido de centrifugación y finalmente, se resuspende el precipitado en tampón de

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

carga 2x y se calienta a 95°C por 5 min. Las muestras se corren en un gel de acrilamida (7.5 a 10%) y se transfieren a una membrana de PVDF previamente tratada con metanol. Esta se bloquea con TBS-Tween + leche en polvo durante 1-h a temperatura ambiente, se lava y aplica el anticuerpo primario (anti-Rb o anti-E1A, 2 µg/mL en la solución de bloqueo), se vuelve a lavar y se trata con el anticuerpo secundario (anti-ratón-HRP, 1:2000) seguido de otro lavado para ser procesada con los reactivos 1 y 2 del ECL y expuesta a una película para quimioluminiscencia.

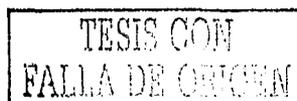
### 3. Cuantificación de CAR e integrinas $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ por citometría de flujo (FACS)

#### *Reactivos*

- Azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) (Sigma)
- Albúmina sérica de bovino (Sigma)
- PBS
- \*PBS + BSA 1% (1-g de albúmina) = PBA
- \*\*PBA +  $\text{NaN}_3$  0.1%
- Tripsina-EDTA (0.05%)
- Anticuerpos:
  - ▶ Anticuerpo ( $\text{IgG}_{2b}$ ) RmCB de ratón (anti-CAR) (obtenido del Dr. Paul Reynolds, Centro de Terapia Génica, Universidad de Alabama en Birmingham, E. U.) (1.3 mg/mL)
  - ▶ Anticuerpo ( $\text{IgG}_{1,1}$ ) LM609 de ratón (anti- $\alpha V\beta 3$ ) (Chemicon International Inc., California, E. U.) (1-mg/mL)
  - ▶ Anticuerpo ( $\text{IgG}_{1,1}$ ) P1F6 de ratón (anti- $\alpha V\beta 5$ ) (Chemicon International Inc.) (1-mg/mL)
  - ▶ Anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Pennsylvania, E. U.) (0.75 mg/mL)
- Células: 293, A549, D65MG, HeLa, LNCaP, RD, SKOV3.ip1

#### *Material y equipo*

- Citómetro de flujo FACScan (Beckton Dickinson)
- Tubos de fondo redondo para FACS (Falcon 35-2054; Beckton Dickinson, Nueva Jersey, E.U.)



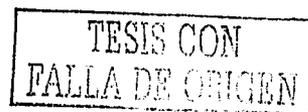
### *Método*

Las monocapas de las células a analizar se lavan con PBS, se despegan de los platos con tripsina y se lavan 2 veces en PBS + albúmina 1% + azida de sodio 0.1% (tampón de lavado). Posteriormente se cuentan y se resuspenden en tubos de fondo redondo por triplicado ( $5 \times 10^5$  células/tubo). Se mezclan con 100  $\mu$ L del anticuerpo primario correspondiente (dilución 1:1000 en PBA) e incuban en hielo por 30 minutos. Se vuelven a lavar 2 veces con el tampón de lavado, se resuspenden y se mezclan con 100  $\mu$ L del anticuerpo secundario conjugado con FITC (dilución 1:50 en PBA). Se incuban en hielo por 30 min, se lavan 2 veces con el tampón de lavado y se resuspenden en 500  $\mu$ L del mismo. La lectura se realiza en un citómetro de flujo FACScan y los datos se analizan con el programa WinMDI 2.8.

## **4. Estudio de transducción (ensayo de luciferasa)**

### *Reactivos*

- Albúmina sérica bovina
- Luciferina (Promega)
- Reactivos para cuantificación de proteínas A, B y S (Bio-Rad)
- Tampón para lisis celular (Promega, Wisconsin, E. U.)
- Adenovirus: AdCMVLuc y AdLucRGD
- Células: A549, HeLa, LNCaP, DMG65, RD y SKOv3.ip1



### *Material y equipo*

- Lector de microplacas basado en espectrofotometría (Molecular Devices Corp., Emax, California, E.U.)
- Luminómetro (Berthold, Lumat LB 9501, Australia)
- Microcentrífuga
- Placa de ensayo de 96 pocillos de fondo plano (Falcon 353915, Nueva Jersey, E.U.)
- Plato de cultivo de 12 pocillos
- Tubos de microcentrífuga
- Tubos de poliestireno para luminometría (No. 55.476, Starsted Inc., Carolina del Norte, E. U.)

### *Método*

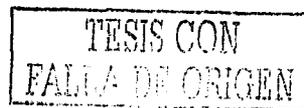
La luciferasa de luciérnaga es una enzima que oxida la luciferina de escarabajo de manera dependiente de ATP. Se emplea como gen reportero debido a que su producto

no requiere modificación postraducciona l y la eficiencia con la que produce luz es alta. Para realizar el ensayo, se transducen las células sembradas en platos de 12 pocillos a una confluencia de 80% con AdCMVLuc o AdLucRGD en dosis crecientes de: 6.25, 12.5, 25, 50 y 100 pv/célula (se calcula por separado para cada línea celular). Después de 48 h, las monocapas se lavan cuidadosamente con PBS, se adiciona una cantidad mínima (200  $\mu$ L en platos de 12 pocillos) de tampón de lisis celular y se despegan del pocillo. Se transfiere el lisado a un tubo de microcentrífuga, se centrifuga por 5 seg a 12,000 x g y el sobrenadante se pasa a un tubo nuevo. Se mezclan 20  $\mu$ L del extracto celular con 100  $\mu$ L del sustrato (luciferina) ambos a temperatura ambiente. Debido a que la emisión de luz decae rápidamente, ésta se mide inmediatamente en un luminómetro por 15-20 seg. El resultado se expresa en unidades relativas de luz (RLU) por  $\mu$ g de proteína, para lo cual se cuantifica la concentración de proteína total en cada muestra empleando reactivos que no son afectados por el detergente presente el tampón de lisis. Este es un método colorimétrico en el que se mezclan tres reactivos (reactivos A, S y B) y la absorbancia de la muestra se cuantifica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm tomando como base una curva estándar de proteína. Los experimentos se realizan por triplicado.

## 5. Análisis de la replicación del adenovirus *in vitro*: incorporación de BrdU

### Reactivos

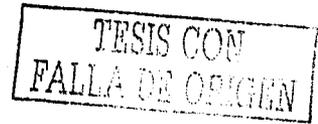
- Bromo-desoxiuridina (BrdU) (Amersham Pharmacia Biotech)
- EDTA (500 mM)
- Espermina-HCl (500 mM) (Sigma)
- Etanol 70% + acetato de sodio 2%
- Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico
- Proteinasa K (10 mg/mL)
- Reactivo ECL (Amersham Pharmacia Biotech)
- RNasa A (10 mg/mL)
- SDS 10%
- SSC 20x (NaCl 3M, citrato de sodio 0.3M, pH 7.2)
- Tampón de lisis celular con desoxicolato (DOC) (etanol 20%, Tris pH 9.0 100 mM, desoxicolato de sodio 0.4%) (Sigma)



- Tampón TBS-T (tris 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.2%) + leche descremada en polvo 5%
- TE (Tris 10 mM, EDTA 1-mM) (pH 9.0)
- Anticuerpos:
  - ▶ Anticuerpo IgG, de ratón anti-BrdU (DAKO Corporation, California, E. U.)
  - ▶ Anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) (Amersham Pharmacia Biotech, Nueva Jersey, E. U.)
- Enzima de restricción: *Hind*III (New England Biolabs)

### Material y equipo

- Cassette metálico para exposición
- Horno al vacío
- Hybond N(+) (Amersham Pharmacia Biotech)
- Película radiográfica (Kodak Biomax ML)
- Revelador de placas radiográficas
- Rotador



### Método

Se preparan células A549 en platos de 6 pocillos a una confluencia de 85-90% y se infectan con los virus Ad5- $\Delta$ 24 o Ad5- $\Delta$ 24RGD a una dosis de 0.01 pv/célula. Posteriormente se mantienen en DMEM con FBS 5% y BrdU (1  $\mu$ Ci/mL). Células de los pocillos correspondientes se recogen a los días 2, 4, 6 y 8 después de la infección por raspado y resuspensión en su medio. Cada uno se centrifuga y el botón celular se resuspende en 200  $\mu$ L de TE pH 9.0. Las muestras se procesan de acuerdo al método de purificación de DNA por espermia previamente explicado. El DNA precipitado con etanol y acetato de sodio se lava con etanol 70%, se seca y finalmente se resuspende en 25  $\mu$ L de TE. Este DNA puede guardarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su digestión.

Una vez que se han obtenido todas las muestras, se digiere un tercio (8  $\mu$ L, equivalente a 600,000 células tratadas) con *Hind*III y se corren en un gel de agarosa al 1%. Se transfieren las muestras a una membrana de nylon por capilaridad por toda la noche en SSC 10x. La membrana se hornea a  $80^{\circ}\text{C}$  al vacío por 90 min y se bloquea con tampón de bloqueo (TBS-T) por 3 h a temperatura ambiente. Se lava y se trata con anticuerpo de ratón anti-BrdU (1:2000) en TBS-T por 1-h. Se da un segundo lavado y se trata con el anticuerpo secundario conjugado a HRP (1:2000) en TBS-T. Se expone al reactivo

ECL por 1-min con previo lavado de la membrana y se expone a una película radiográfica por 3 seg.

## 6. Oncolisis *in vitro*: células en monocapa

El objetivo del estudio es demostrar que dosis bajas de adenovirus son capaces de eliminar células tumorales mediante la replicación misma. Las líneas celulares se siembran en platos de 6 pocillos a 85-90% de confluencia y se infectan con 0.001 ó 0.01 pv/célula de los siguientes adenovirus: AdLucRGD, Ad5- $\Delta$ 24, Ad5- $\Delta$ 24RGD y Ad5-wt300. Después de 8 a 28 días, dependiendo de la línea celular, se realizan los análisis que se describen a continuación.

### 6.1. Ensayo de viabilidad celular con XTT

#### *Reactivos*

- DMEM sin rojo de fenol
- FBS
- PBS
- Tripsina/EDTA (0.05%)
- XTT (3'-[1-(fenilaminocarbonil)-3,4-tetrazolio]-bis-(4-metoxi-6-nitro) benceno ácido sulfónico hidrato de sodio) + 1% metosulfato de fenazina (PMS) (Sigma)

#### *Material y equipo*

- Cámara de Neubauer (Hausser Scientific, Pennsylvania, E. U.)
- Espectrofotómetro
- Incubadora a 37°C, CO<sub>2</sub> 5%
- Microscopio

#### *Método*

Se reconstituye la sal de XTT + PMS en PBS a una concentración de 1-mg/mL. Cuando las células infectadas muestran datos de citopatogenicidad se aspira el medio de cultivo con sumo cuidado y se intercambia por una mezcla de DMEM sin rojo de fenol y una cantidad de XTT equivalente al 20% del volumen de medio de cultivo. Se prepara un grupo de pocillos con células no infectadas (control) y un grupo "blanco" sin células y también se tratan con el misma mezcla. Se incuban por 3 h, al cabo de los cuales se

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

vierten 200  $\mu$ L del medio/XTT de cada muestra a pocillos individuales de un plato de 96 y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm. Las células no infectadas se tratan con tripsina y se cuentan empleando una cámara de Neubauer después de la exposición al XTT. El número de células viables en los pocillos en estudio se calcula en base a la absorbancia y número del grupo control.

## 6.2. Tinción con cristal violeta

### *Reactivos*

- Agua
- Cristal violeta (1% en etanol 70%) (Fisher Scientific)
- Etanol
- Formaldehído neutral 10%

### *Método*

Al finalizar la cuantificación de la viabilidad celular por XTT, se aspira cuidadosamente la totalidad del medio/XTT de las células infectadas y se fijan con formaldehído durante 10 min a temperatura ambiente. Este se retira por aspiración suave, se vierte la solución de cristal violeta y se incuba por 20 min. Se retira la solución y se enjuaga con agua 3 ó 4 veces con el cuidado de no despegar las células. Se secan sobre la mesa de trabajo.

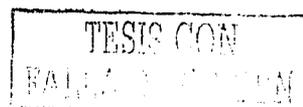
## 6.3. Efecto del bloqueo del receptor primario (CAR)

### *Reactivos*

- Proteína del glóbulo de la fibra del adenovirus tipo 5 purificada (50  $\mu$ g/mL) (obsequio de la Dra. Joanne Douglas, Centro de Terapia Génica, Universidad de Alabama en Birmingham, Birmingham, E. U.)
- Adenovirus: Ad5-wt300 y Ad5-wtRGD
- Células: A549

### *Método*

La fibra es la parte de la cápside del adenovirus a través de la cual se adhiere al receptor primario CAR en la superficie celular. La fibra en solución puede unirse al CAR y bloquear la interacción del adenovirus con la célula.



Se siembran células A549 en platos de 6 pocillos y cuando alcanzan 80% de confluencia se tratan con una solución de la fibra del adenovirus (15  $\mu\text{g}$ /pocillo en 250  $\mu\text{L}$ ). Se incuba a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente se les agrega la suspensión del virus correspondiente Ad5-wt300 o Ad-wtRGD a una dosis de 0.001 pv/célula en 300  $\mu\text{L}$  y se incuba por 30 min más a temperatura ambiente. Se lava 2 veces con PBS y se adiciona 1-mL de DMEM-FBS 2% y se incuba a 37°C por 1-h. Añadir DMEM-FBS 5% y mantener en la incubadora a CO<sub>2</sub> 5% y 37°C. Las células se tiñen con cristal violeta para la evaluación del efecto oncolítico.

#### 6.4. Estudio del tamaño de las placas producidas por adenovirus replicativos con y sin E3

##### *Reactivos*

- Agarosa de bajo punto de fusión al 1.33%
- DMEM 2x con 10% FBS
- PBS
- Adenovirus: Ad5- $\Delta$ 24RGD y Ad5- $\Delta$ 24RGD/GFP
- Células: A549

##### *Material y equipo*

- Computadora (Gateway, California, E. U.)
- Microscopio invertido de fluorescencia (Olympus 1X70)
- Platos de cultivo de 6 pocillos
- Sistema de captura de imágenes digitalizadas (Optronics, MagnaFire, California, E. U.)

##### *Métodos*

Se siembran las células a 85-90% de confluencia y se infectan con los virus a 0.01 pv/célula en 1-mL por pocillo por 18 h. Al día siguiente se aspira el medio, se lava una vez con PBS, se cubren con una mezcla de agarosa y DMEM 2x en proporción 1:1 y se espera la formación de placas. Después de 12 días se toman fotografías de 25 placas en el microscopio a un aumento de 100x. Se imprimen las imágenes y se calcula el área citopática empleando la fórmula:  $\pi$  (eje mayor x eje menor)/4.

## 6.5. Análisis de la dinámica de producción y liberación de progenie adenoviral

### *Reactivos*

- DMEM
- FBS
- Adenovirus: Ad5- $\Delta$ 24GFP y Ad5- $\Delta$ 24E3
- Células: A549

### *Material y equipo*

- Congelador (-80°C)
- Microcentrífuga
- Platos de 6 pocillos
- Tubos de microcentrífuga

### *Método*

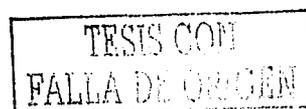
Las células se siembran a una confluencia de 85-90% en platos de 6 pocillos y se infectan con 0.1 pv/célula de los virus. Estas se mantienen en DMEM con 2.5% de FBS hasta la recolección por separado de los sobrenadantes y las células en los días 3, 6 y 9 después de la infección y se mantienen en congelación (-80°C) hasta el análisis. Los botones celulares se resuspenden en 1-mL de DMEM + 2.5% FBS, sometidos a 3 ciclos de congelación/descongelación y se titularon empleando el método de O'Carroll (descrito previamente).

## 7. Modelo tridimensional *in vitro*: esferoides

### *Reactivos*

- Agarosa 3% en agua (esterilizada en autoclave) (Sigma)
- DMEM 1x
- DMEM 2x
- FBS
- PBS
- Tripsina/EDTA
- Células: A549

### *Material y equipo*



- Incubadora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>
- Platos de cultivo: 60 mm y de 48 pocillos

### *Método*

Se prepara una mezcla con partes iguales de agarosa 3% + DMEM 2x/FBS 20% y se polimerizan en los platos de cultivo (4 mL para el plato de 60 mm y 300 µL para los de 48 pocillos). Una vez sólidos se equilibran con DMEM 1x/FBS 10% por una noche. Se prepara una suspensión celular de  $5 \times 10^5$  células en 5 mL y se añaden en el plato de 60 mm. Al cabo de 4 días de incubación, los esferoides se forman de manera espontánea. Con una pipeta estéril se "pescan" esferoides individuales y se colocan en pocillos separados en el plato de 48 pocillos.

## **7.2. Análisis de la viabilidad de los esferoides**

El siguiente es un método que emplea un par de reactivos fluorescentes para evaluar la viabilidad de las células eucarióticas: la calceína y el etidio. La membrana celular es permeable a la primera y una vez dentro, las esterasas convierten la calceína a una forma que emite fluorescencia verde indicando que la célula es viable. El etidio entra a las dañadas, se une a los ácidos nucleicos y da una fluorescencia roja.

### *Reactivos*

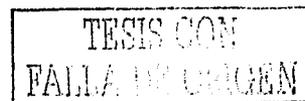
- Calceína (Molecular Probes, Oregon, E. U.)
- Esferoides
- Etidio (homodímero-1) (Molecular Probes)
- PBS

### *Material y equipo*

- Computadora
- Microscopio de fluorescencia
- Plato de cultivo de 96 pocillos
- Programa de captura de imágenes digitalizadas

### *Método*

Se elaboran esferoides de A549 empleando el método descrito, se "pescan" y se colocan de manera individual en pocillos separados en platos de 96 y se mantienen en 50 µL de PBS. Inmediatamente antes del ensayo, se prepara la solución de etidio (4



$\mu\text{M}$ ) y calceína ( $2 \mu\text{M}$ ) en D-PBS estéril y se adicionan  $50 \mu\text{L}$  de la mezcla a las muestras. Se incuban 45 min a temperatura ambiente y se observan en el microscopio de fluorescencia con un filtro de 485 nm para la calceína y de 530 nm para el etidio.

### 7.3. Estudio de la diseminación lateral de los adenovirus en esferoides

#### *Reactivos*

- DMEM
- FBS
- Adenovirus: AdGFP, Ad5-wtGFP, Ad5- $\Delta 24$ /GFP, Ad5- $\Delta 24$ RGD/GFP
- Esferoides de A549

#### *Material y equipo*

- Cámara para imágenes digitalizadas
- Computadora
- Incubadora a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$
- Microscopio invertido de fluorescencia (Olympus 1X70)

#### *Método*

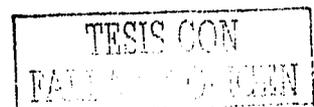
Una vez elaborados los esferoides, se infectan con los 3 virus replicativos y un control ( $n=8$  esferoides en pocillos individuales). La expresión del GFP indica transducción/infección por los virus. Se estudia la dinámica de expresión del GFP diariamente tomando fotografías secuenciales en el microscopio de fluorescencia.

## 8. Ensayos de oncolisis *in vivo*

### 8.1. Xenotrasplante subcutáneo de células tumorales humanas en ratones atímicos

#### *Reactivos, fármacos y biológicos*

- DMEM
- DMEM + FBS 10%
- Ketamina/xilazina ( $10 \text{ mg/mL} + 3 \text{ mg/mL}$ ) (Lloyd Laboratories, Iowa, E.U.)
- PBS
- Tripsina/EDTA 0.05%
- Células: A549



- Ratones: Atímicos NCr-nu/nu, hembras de 6 a 8 semanas (Frederick Cancer Research, Maryland, E.U.).

### *Material y equipo*

- Campana de flujo laminar
- Jeringas de 1-mL con agujas 25G5/8 (MedSaver, Becton Dickinson)
- Jeringas de insulina de 0.5 mL con agujas de 28G1/2 (Becton Dickinson)
- Vernier (nonio o plicómetro) (Bel-Art The Scienceware Company, Nueva Jersey, E. U.)

### *Método*

Las células se despegan de los platos de cultivo empleando tripsina, se neutraliza con DMEM/FBS, se centrifuga, se lavan una vez con PBS y se resuspenden en DMEM sin suero a una concentración, en el caso de A549, de 8 millones de células en 100  $\mu$ L. Los ratones se anestesian con ketamina/xilazina a una dosis de 50 mg/kg administrada por vía intraperitoneal y la suspensión de células se inyecta lentamente debajo de la piel en uno de los flancos, de preferencia el derecho. El crecimiento de los tumores se sigue mediante la medición con un vernier y el volumen se calcula según la fórmula: 0.5 x largo x ancho x alto.

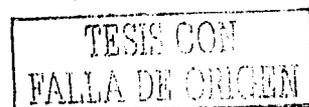
## **8.2. Tratamiento local**

### *Reactivos y fármacos*

- Etanol
- Ketamina/xilazina (10 mg/mL + 3 mg/mL)
- Medio de criopreservación de tejidos TBS (Triangle Biomedical Sciences, Carolina del Norte, E. U.)
- PBS
- Adenovirus: AdLucRGD, Ad5- $\Delta$ 24, Ad5- $\Delta$ 24RGD y Ad5-wt300
- Ratones: Atímicos Ncr-nu/nu, hembras de 6 - 8 semanas de edad

### *Material y equipo*

- Cámara de CO<sub>2</sub> para eutanasia
- Campana de flujo laminar
- Gasas
- Gel para criopreservación de tejidos TBS
- Jeringas de insulina de 0.5 mL con agujas de 28G1/2 (Becton Dickinson)



- Material quirúrgico estéril: tijeras, pinzas, pinzas Kelly rectas
- Moldes de plástico para criopreservación de tejidos (Curtin Mateson Scientific, Inc. Texas, E. U.)

### *Método*

Los adenovirus se administran cuando los nódulos alcanzan un volumen de 60-100 mm<sup>3</sup>, asignándolos a los grupos de tratamiento al azar (incluyendo un grupo control inyectado con el vehículo). Las dosis empleadas fueron las siguientes: 10<sup>7</sup> pv y 10<sup>9</sup> pv resuspendidas en PBS en un volumen de 30 µL se inyectan en una sola ocasión intratumoralmente empleando jeringas de insulina, previa anestesia del ratón, en una sola ocasión. Posteriormente, el crecimiento se sigue midiendo los tumores 2 veces por semana por un periodo de 35 a 40 días. La eutanasia de los animales se realiza cuando el tumor rebasa el tamaño estipulado por las normas éticas del empleo de animales de laboratorio (20% del peso corporal) empleando la asfixia por CO<sub>2</sub>. Al finalizar el experimento, los tumores se disecan y se congelan en OCT para su análisis inmunohistológico (ver más adelante).

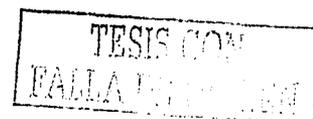
### **8.3. Tratamiento sistémico**

#### *Reactivos, fármacos y biológicos*

- Etanol
- Ketamina/xilazina (10 mg/mL + 3 mg/mL)
- Material de criopreservación TBS
- PBS
- Adenovirus: AdLucRGD, Ad5-Δ24, Ad5-Δ24RGD y Ad5-wt300
- Ratones: Atímicos nu/nu, hembras de 6-8 semanas de edad

#### *Material y equipo*

- Campana de flujo laminar
- Cámara de CO<sub>2</sub> para eutanasia
- Gasas
- Jeringas de insulina de 0.5 mL con agujas de 28G1/2
- Lámpara
- Material quirúrgico estéril: tijeras, pinzas, pinzas Kelly rectas
- Moldes de plástico para criopreservación de tejidos



### *Método*

Se emplea el mismo modelo de xenotrasplante de las células A549 y los adenovirus se administran por una de las venas laterales de la cola cuando los nódulos alcanzan un volumen de 60-100 mm<sup>3</sup>, asignándolos a los grupos de tratamiento al azar (incluyendo un grupo control inyectado con el vehículo). La dosis empleada en el tratamiento intravenoso es de 5x10<sup>8</sup> pv en 100 µL de PBS en dos días consecutivos (dosis total de 10<sup>9</sup> pv) y se administra con una jeringa de insulina bajo anestesia. El resto del protocolo es el mismo que el empleado para la administración intratumoral.

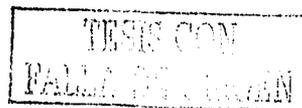
### **8.4. Detección del adenovirus por inmunofluorescencia**

#### *Reactivos y tejidos*

- 2-metil-butano (Fisher Scientific)
- Albúmina (BSA) (Sigma)
- Crystal mount (Biomeda, California, E.U.)
- Esmalte para uñas transparente
- Formaldehído 3% en PBS
- Hoechst 33342 (Hoechst-Aventis, Nueva Jersey, E. U.)
- PBS
- Suero normal de burro (Sigma)
- Tritón X-100 (Sigma)
- Anticuerpos:
  - ▶ Anticuerpo policlonal de cabra anti-hexón de adenovirus (Chemicon International, Inc.)
  - ▶ Anticuerpo anti-cabra de burro conjugado a Alexa Fluor-488 (Molecular Probes, Oregon, E. U.)
- Tumores (A549) provenientes de ratones atímicos nu/nu inyectados subcutáneamente

#### *Material y equipo*

- Computadora
- Criotomo
- Cubetas de vidrio para tinción con cestillo y asa
- Cubreobjetos (Fisher)
- Microscopio de fluorescencia (Olympus 1X70)
- Portaobjetos (Fisher)
- Programa de captura de imágenes digitalizadas



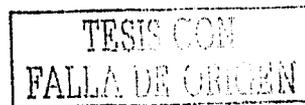
### *Método*

Los tumores se extirpan y se congelan inmediatamente introduciéndolos en un molde de plástico de manera individual y cubiertos con el material de criopreservación TBS. El molde se deposita en 2-metil-butano enfriado en nitrógeno líquido. Se realizan cortes de 5 a 7  $\mu\text{m}$  de espesor en un criotomo y se montan en un portaobjetos. Para ello se introduce en un recipiente que contiene 2-metil-butano, el cual se sumerge en nitrógeno líquido. Se realizan cortes de 5 a 7  $\mu\text{m}$  de espesor en un criotomo y se montan en un portaobjetos. Las muestras se mantienen congeladas ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) hasta la fijación, que consiste en impregnación en formaldehído por 45 minutos a temperatura ambiente seguida de 2 enjuagues con PBS. Las siguientes incubaciones se realizan con las preparaciones colocadas dentro de una cámara húmeda y a temperatura ambiente: tampón de bloqueo (suero normal de burro 10%, BSA 0.1%, 0.05% Tritón X-100 en PBS) por 10 min, anticuerpo primario (BSA 0.01%, 25  $\mu\text{L}$  de anticuerpo de cabra anti-hexón en 4.5 mL de PBS) por 60 min y anticuerpo secundario (BSA 0.01%, 25  $\mu\text{L}$  de anticuerpo de burro anti-cabra conjugado con el fluorocromo Alexa 488 y 25  $\mu\text{L}$  de suero normal de burro en PBS) por 30 min. Se enjuaga con 3 cambios de PBS entre la incubación con el anticuerpo primario y el secundario. Finalmente, se aplica Hoechst 33342 (1x) para teñir los núcleos por 10 min. Se lavan 3 veces con PBS y después de absorber el exceso de líquido del portaobjetos, se aplican 1-2 gotas de crystal mount, se cubren con un cubreobjetos y se sellan con esmalte transparente para uñas. Las preparaciones se observan en un microscopio de fluorescencia y se toman fotografías empleando un programa de imagen digitalizada.

### **8.5. Cuantificación de virus en el tejido tumoral**

#### *Reactivos y fármacos*

- Enzima Liberase Blendzyme 3 (Roche, Indiana, E. U.)
- Etanol
- Ketamina/xilazina (10 mg/mL + 3 mg/mL)
- PBS
- Adenovirus: AdGFP, Ad5- $\Delta$ 24GFP, Ad5- $\Delta$ 24GFP/RGD, Ad5- $\Delta$ 24E3, Ad5- $\Delta$ 24RGD •Células:



•Ratones: Atmicos Ncr-nu/nu, hembras de 6 - 8 semanas de edad

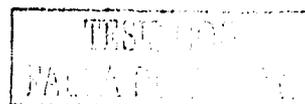
### *Material y equipo*

- Baño a 37°C
- Cámara de CO<sub>2</sub> para eutanasia
- Campana de flujo laminar
- Congelador (-80°C)
- Filtros para jeringa (0.2 µm) (Pall Life Sciences, Michigan, E.U.)
- Jeringas de insulina de 0.5 mL con agujas de 28G1/2 (Becton Dickinson)
- Jeringa de tuberculina (1-mL) (Beckton Dickinson)
- Material quirúrgico estéril: tijeras, pinzas, pinzas Kelly rectas
- Microcentrífuga
- Tubos de microcentrífuga

### *Método*

Al igual que el modelo de xenotrasplante previamente descrito, los adenovirus se administran cuando los nódulos alcanzan un volumen de 60-100 mm<sup>3</sup>, asignándolos al azar en 6 grupos de tratamiento: PBS, AdGFP, Ad5-Δ24GFP, Ad5-Δ24GFP/RGD, Ad5-Δ24E3 o Ad5-Δ24RGD. La dosis empleada fue de 10<sup>7</sup> pv resuspendida en 30 µL de PBS. A los días 3, 6 y 9 después de la administración, se sacrifican 3 animales por grupo empleando CO<sub>2</sub> y los tumores se miden, disecan y congelan a -80°C hasta su análisis. Para ello, los tejidos se descongelan, pesan y cortan finamente con tijeras estériles de manera individual para evitar la contaminación de una muestra a otra. Se agrega una solución de la proteinasa Liberasa Blendzyme 3 (0.1 mg/mL) y se incuba a 37°C con agitación por 1-h. Posteriormente, las muestras se someten a 3 ciclos de congelación/descongelación lo que, además de liberar los adenovirus inactiva la proteinasa, y se centrifuga a 2,500 rpm por 10 min a 4°C. El extracto obtenido se esteriliza por filtración y está listo para ser titulado empleando el método de O'Carroll (descrito anteriormente). El título se expresa en unidades de efecto citopatogénico por gramo de tejido.

## **8.6. Incremento de la carga adenoviral administrada i.v. al tumor por bloqueo de las células de Kupffer con cloruro de gadolinio**



### *Reactivos y fármacos*

- Cloruro de gadolinio (GdCl<sub>3</sub>) (2 mg/mL) (Sigma)
- Etanol
- Gel de criopreservación TBS
- Ketamina/xilazina (10 mg/mL + 3 mg/mL)
- PBS
- Adenovirus: Ad5-Δ24RGD

### *Material y equipo*

- Cámara de CO<sub>2</sub> para eutanasia
- Campana de flujo laminar
- Gasas
- Jeringas de insulina de 0.5 mL con agujas de 28G1/2
- Lámpara
- Material quirúrgico estéril: tijeras, pinzas, pinzas Kelly rectas
- Moldes de plástico para criopreservación de tejidos

### *Método*

Se emplea el modelo de xenotrasplante de las células A549, una vez que los tumores alcanzan 60-100 mm<sup>3</sup>, los ratones se dividieron en 4 grupos al azar (n=6). Dos de los grupos recibieron la administración de 3 dosis de 200 μL de la solución de GdCl<sub>3</sub> 54, 30, 6 h previas a la inyección del adenovirus. Posteriormente se administró el Ad5-Δ24RGD dividida en 2 dosis de 5 x 10<sup>8</sup> pv (total 9x10<sup>9</sup>), de manera que los grupos son: control (PBS), GdCl<sub>3</sub>, Ad5-Δ24RGD y GdCl<sub>3</sub> + Ad5-Δ24RGD. La vía de administración tanto del GdCl<sub>3</sub> como de los virus fue intravenosa (vena dorsal de la cola). El resto del protocolo es el previamente descrito.

## **8.7. Estudios de biodistribución y farmacocinética del adenovirus**

### **8.7.1. Localización del adenovirus en el tejido hepático del ratón**

#### *Reactivos*

- Carbocianina (Cy3) (Amersham)
- Carbonato de sodio
- Cloruro de gadolinio (GdCl<sub>3</sub>) (2 mg/mL)
- Gel de criopreservación de tejidos TBS
- Partículas de látex (2 micras de diámetro) conjugadas con fluoresceína (Sigma)

- Tampón de diálisis (glicerol 10%, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 250 mM)
- Adenovirus: AdCMVLacZ
- Ratones: BALB/c, hembras de 6 a 8 semanas de edad (Charles River, Massachussets, E. U.)

#### *Material y equipo*

- Agitador
- Cassette de diálisis para MW de 6,000 a 8,000 (Pierce Chem. Co. Illinois, E. U.)
- Criotomo (Sciscope-Leica, Iowa, E. U.)
- Jeringas de insulina
- Moldes de plástico para criopreservación de tejidos
- Microscopio de invertido de fluorescencia (Olympus 1X70)
- Portaobjetos y cubreobjetos

#### *Método*

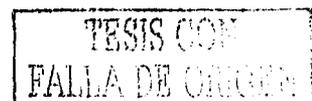
El adenovirus se conjuga de manera covalente con el fluoróforo rojo Cy3 según el método de Leopold (Leopold, 1998). Para ello se prepara una suspensión viral a una concentración de 10<sup>13</sup> pv/mL y se mezcla con el Cy3 reconstituído en carbonato de sodio 0.1 M, pH 9.3 en una proporción 1:9 y se incuban por 30 min. La mezcla se dializa (dos cambios) a 4°C por 24 h en un cassette de diálisis para retirar la Cy3 libre. Se agrega glicerol a una concentración final de 30% y se mantiene a -20°C hasta su uso. Los ratones se inyectan por la vena lateral de la cola con 10<sup>11</sup> pv del adenovirus marcado y 10 min después se administran por la misma vía las partículas de látex. Se esperan 10 min más y un fragmento del hígado se disecciona y congela en TBS. Se realizan los cortes histológicos en el criotomo y se montan en portaobjetos. Las preparaciones se observan al microscopio fluorescente.

En otro experimento se sigue la misma metodología con previo bloqueo de las KC con GdCl<sub>3</sub>. Para ello se emplean 200 µL de GdCl<sub>3</sub> por dosis y se administran por vía i.v. 54, 30 y 6 h antes de la inyección del virus y del látex.

### **8.7.2. Eliminación del adenovirus de la sangre *in vivo***

#### *Reactivos*

- DMEM + FBS 5%
- Heparina (Sigma)



- Ketamina/xilazina (10 mg/mL + 3 mg/mL)
- PBS
- Adenovirus: AdGFP
- Células: A549
- Ratones: Balb/c, hembras de 6-8 semanas de edad

#### *Material y equipo*

- Agujas 30G (Beckton Dickinson)
- Instrumental quirúrgico
- Jeringas (1-mL)
- Lámpara
- Microscopio de fluorescencia
- Plato de 96 pocillos
- Sutura (Vicryl 4-0) (Ethicon, Nueva Jersey, E. U.)
- Tubos de microcentrífuga

#### *Método*

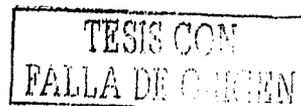
Se anestesia al ratón con ketamina/xilazina a dosis de 100 mg/kg. Se disecciona el abdomen por planos en la línea media y se expone la vena cava inferior. Se inyecta el adenovirus ( $10^{10}$  unidades de transducción) suspendidos en 200  $\mu$ L de PBS. Se toman muestras de sangre a partir de la cola del ratón a diferentes intervalos de tiempo (1, 3, 5, 10, 20, 30 y 60 min). La titulación del virus se realiza con diluciones seriadas de las muestras en platos de 96 pocillos con células A549. Se observan al microscopio a las 24 h y se cuentan las células que expresan la GFP.

### **8.7.3. Depleción de células de Kupffer por cloruro de gadolinio y efecto en la eliminación**

#### *Reactivos*

- Cloruro de gadolinio (2 mg/mL)
- Ketamina/xilazina (10 mg/mL + 3 mg/mL)
- PBS
- Ratones: Balb/c, hembra de 6-8 semanas de edad

#### *Material y equipo*



•Jeringas de insulina

\*Más los mismos reactivos y material empleado el experimento inmediato anterior.

### *Método*

Se bloquean las KC administrando 200  $\mu$ L de la solución de  $GdCl_3$  por vía i.v. a 54, 30 y 6 h antes de la inyección del virus. Posteriormente se realiza el mismo experimento de depuración explicado en el inciso anterior.

### **9. Análisis estadístico**

Todos los cálculos estadísticos (*t* de Student) fueron realizados empleando el programa de análisis de datos y gráfico "Origin" (OriginLab, Massachusetts, E. U. A.).

TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACIÓN

## RESULTADOS

---

### 1. Caracterización de los adenovirus generados

El primer objetivo que nos planteamos fue aumentar la eficacia de un virus oncolítico ya descrito. Para ello modificamos el Ad5- $\Delta$ 24 (Fueyo *et al.*, 2000) con la adición de un tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD) en el glóbulo de la fibra que confiere la capacidad de infectar por vía de las integrinas (Dmitriev *et al.*, 1998). Los adenovirus derivados del Ad5- $\Delta$ 24 se construyeron como se indica en la sección de "Material y Métodos" y se procedió a la determinación de sus características.

#### 1.1. El nuevo virus Ad5- $\Delta$ 24RGD contiene la delección $\Delta$ 24

La delección  $\Delta$ 24 comprende desde la base nucleotídica 923 a la 946 del Ad5 en la región E1A. El producto de la PCR empleando los cebadores E1a-1 (posición 590-609 en el Ad5) y E1a-2 (1637-1656) es de 1,066 bp en los adenovirus con E1A silvestre y de 1,042 bp en los que poseen la delección de 24 bp. La digestión con la enzima de restricción *Bst*XI provoca la pérdida de uno de los sitios de corte resultando en dos fragmentos mayores de 725 y 322 bp en los virus con E1A silvestre y en un fragmento de 1,023 bp en los mutantes  $\Delta$ 24 (Fig. 13B, izquierda y 14B). Además, ambos se cortan en un sitio a 19 bp del extremo izquierdo convencional dando un fragmento pequeño que no se observa en el gel.

#### 1.2. El Ad5- $\Delta$ 24RGD posee la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD)

Del mismo modo, se corroboró la presencia de la secuencia que codifica el nonapéptido que incluye RGD en la región correspondiente a la fibra del adenovirus por PCR. Los cebadores empleados se localizan en las posiciones 32512-32531 (Fiber-up) y 32766-32786 (Fiber-down) y los productos de la reacción fueron analizados en un gel de poliacrilamida. La introducción de las 27 bp que codifican CDCRGDCFC produce una banda de mayor tamaño (274 bp) que las provenientes de las fibras silvestres (247 bp) y migran ligeramente más rápido (Fig. 13B, derecha y 14D).

TESIS CON  
FALLA DE CALIFICACION

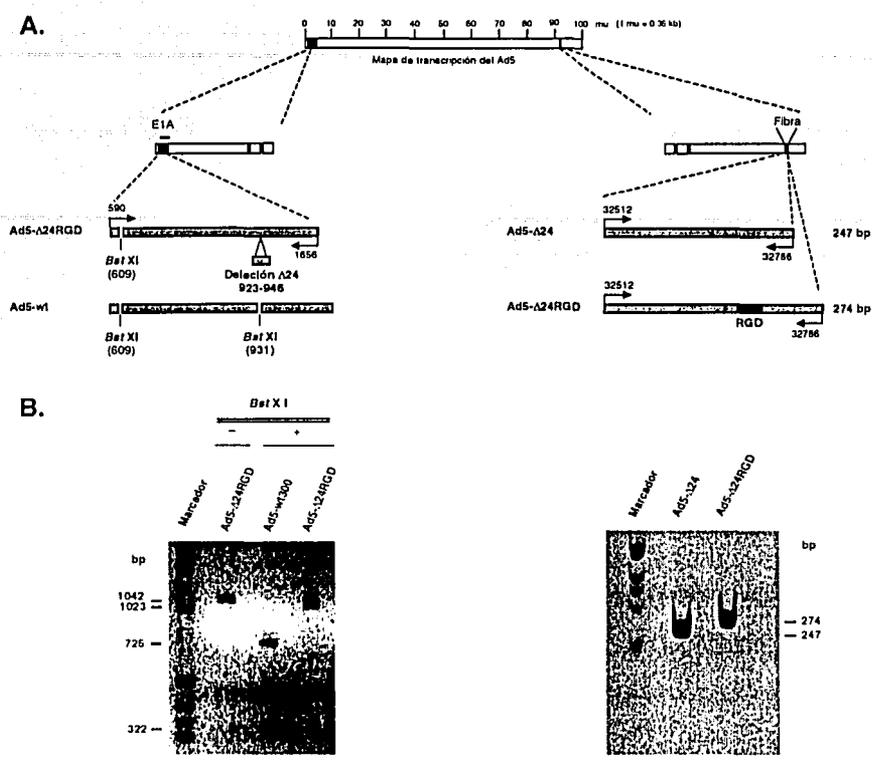


Fig. 13. Esquema representativo de los productos de la amplificación por PCR de la región E1A y la fibra de los adenovirus con y sin las modificaciones genéticas Δ24 y RGD (A). Fragmentos de DNA correspondientes a la PCR en E1A y digestión con *Bst*XI fueron analizadas en un gel de agarosa. El sitio de corte se pierde con la delección Δ24, mostrando una sola banda (B, izquierda). Los provenientes de la fibra se corren en un gel de poliácridamida y se demostró que la banda que pertenece a Ad5-Δ24RGD es de mayor tamaño y corre más lentamente que Ad5-Δ24 (B, derecha).

### 1.3. Verificación del estado de E3 en los distintos adenovirus oncolíticos con o sin la modificación de RGD

Además de aumentar la infección con RGD buscamos estudiar el papel de la ADP en la potencia oncolítica. Para ello generamos adenovirus con y sin E3 y RGD (Fig. 14A). Los productos de la PCR empleando los cebadores AdE3-up y AdE3-down tienen un tamaño de 3,999 bp en los virus que contienen el gen E3 silvestre (Ad5-wt300, AdΔ24E3<sup>+</sup> y Ad5-Δ24RGD) y de 3,111 bp en los virus en donde éste ha sido reemplazado por el cassette que codifica la GFP-zeocina bajo el promotor de CMV. El sitio de corte de la enzima *Pci*I se localiza dentro de la secuencia que codifica la ADP y

la ausencia de E3 (incluyendo ADP) provoca la pérdida de éste, de modo que cuando los DNAs son expuestos a *PciI*, los virus E3 positivos se fragmentan en 2 bandas (2,548 bp y 1,452 bp) y no se observa ningún cambio en los E3 negativos (Fig. 14C).

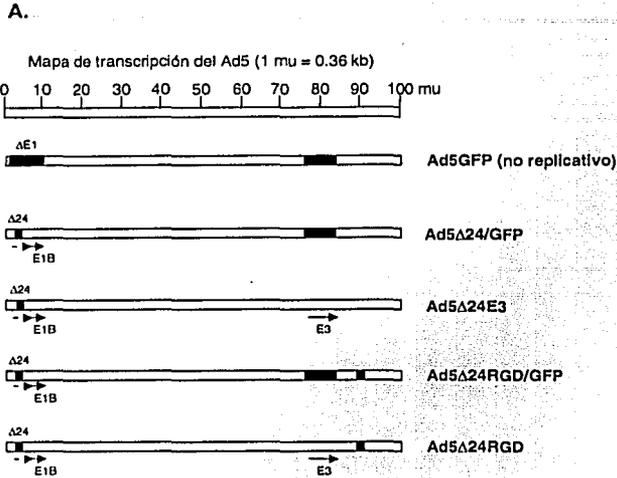
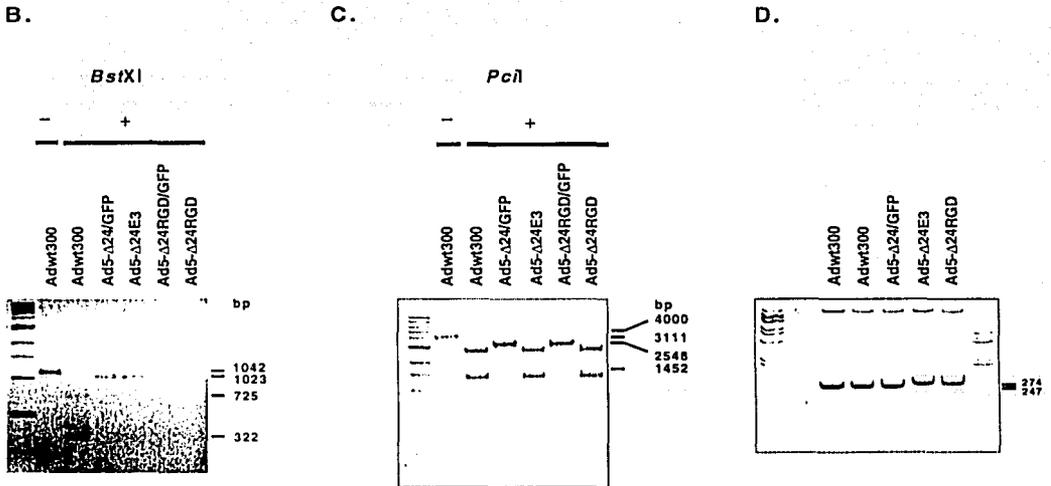


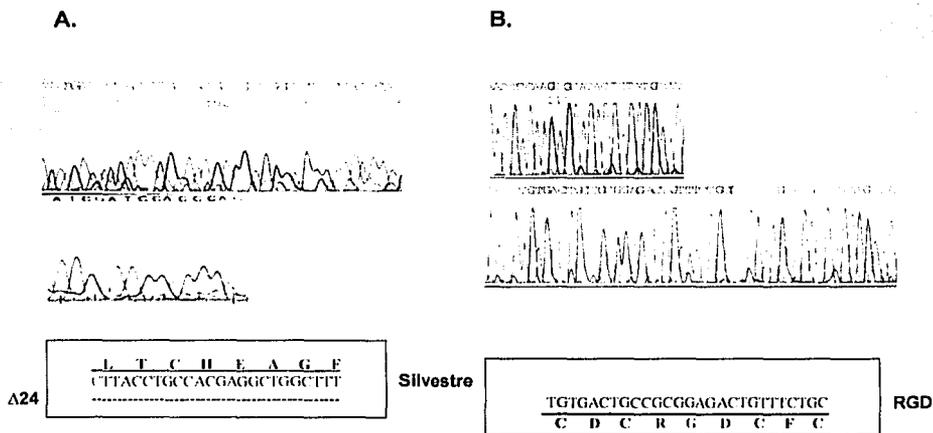
Fig. 14. Esquema representativo de los adenovirus Ad5-Δ24 y Ad5-Δ24RGD con y sin E3 y un control no replicativo (AdGFP). El negro indica deleción, el rayado horizontal, la presencia de RGD y en diagonal, de GFP (A). Fragmentos de DNA correspondientes a las PCR de la región E1A seguida de digestión enzimática comprobando que ningún producto de los virus Δ24 se corta debido a que la deleción retira el sitio de corte (B), del gen E3 donde sólo los que lo contienen se digieren con *PciI* (C) y los productos de la PCR de la fibra muestran que sólo los mutantes con RGD migran más lentamente por su mayor tamaño.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 1.4. La secuenciación corrobora la composición genética de los mutantes

Con el fin de reafirmar los resultados previos en cuanto a las modificaciones introducidas a los adenovirus, el DNA viral fue extraído a partir de células infectadas con: Ad5- $\Delta$ 24GFP, Ad5- $\Delta$ 24E3, Ad5- $\Delta$ 24RGD/GFP y Ad5- $\Delta$ 24RGD empleando la espermina para obtener únicamente el material genético encapsidado. Se verificó la presencia o ausencia de la delección de 24 bp en E1A, de E3 y de la secuencia RGD en la fibra en los virus correspondientes empleando los cebadores E1a-1, E3-adp y Fiber-up. Para esto se siguió el protocolo estipulado por el programa CEQ2000 (Beckman) (véase sección de "Materiales y Métodos") que consiste en una PCR inicial, seguida de precipitación del DNA, disolución en formamida y secuenciación. Los resultados concordaron con los obtenidos por PCR y digestión enzimática. En la Fig. 15 se muestran fragmentos representativos de las secuencias E1A silvestre en comparación con  $\Delta$ 24 (izquierda) y de la fibra silvestre con la que incluye el RGD. Se omitió la presentación de las secuencias de E3 por su tamaño (Fig. 15).

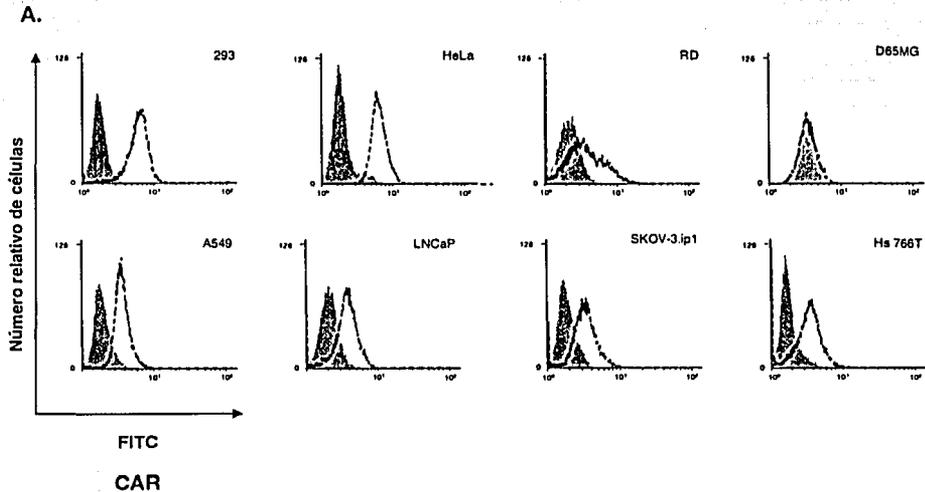


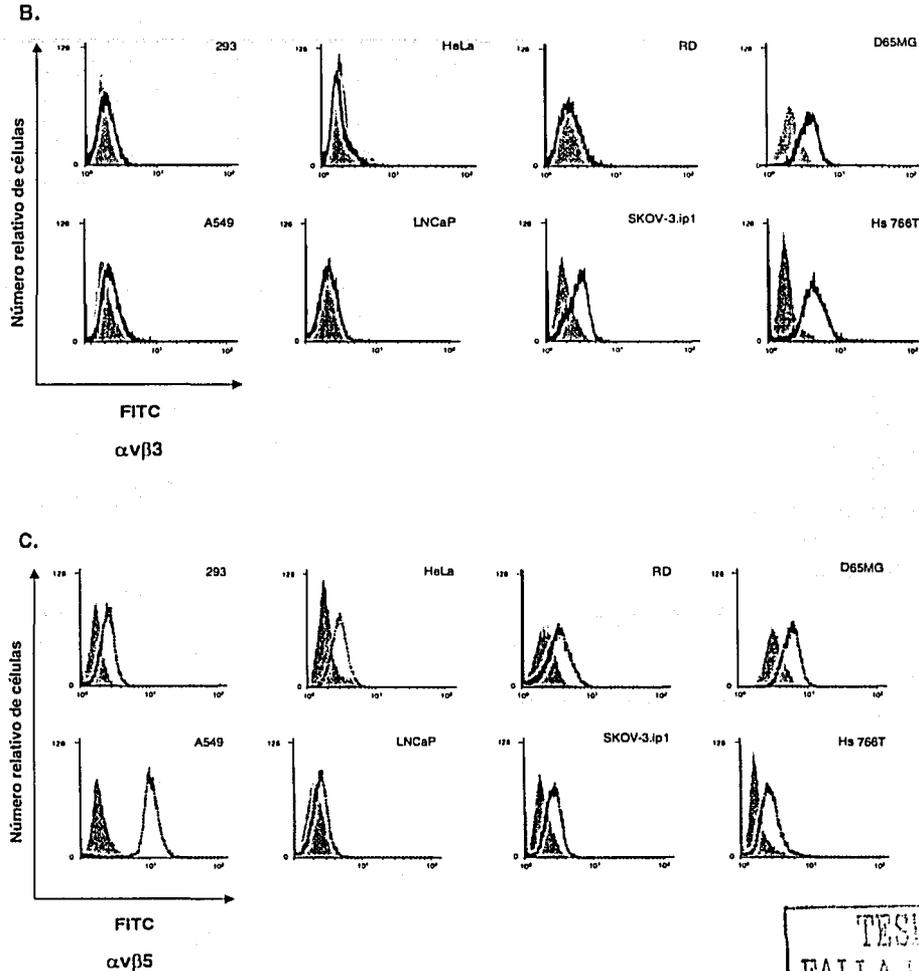
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 15. Secuenciación de la región E1A (A) y de la fibra (B) del DNA extraído a partir de los adenovirus mutantes. Se muestran las gráficas y secuencias representativas de las variedades con y sin  $\Delta$ 24 y/o RGD. El renglón superior corresponde a la secuencia silvestre y el inferior a la forma mutante tanto en la gráfica (arriba) como en la secuencia (abajo).

## 2. La cuantificación de CAR e integrinas $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ en diferentes líneas celulares por citometría de flujo demuestra una expresión variable

La adhesión y entrada natural del adenovirus, paso inicial de la infección, depende de la presencia de CAR y las integrinas  $\alpha V\beta 3$  y  $\alpha V\beta 5$ . Por otro lado, la introducción del motivo RGD a la fibra está diseñada en base a su afinidad alta por las integrinas  $\alpha v$ . Es por ello que se analizó la expresión de estas moléculas de superficie en varias líneas celulares por citometría de flujo. En la fig. 16 se presentan histogramas representativos en donde el eje de las abscisas representa la intensidad de la señal del fluorocromo FITC y en el de la ordenadas, el número de células (Fig. 16). Ya que la eficiencia de cada anticuerpo para detectar su molécula blanco varía, la comparación de los niveles de cada receptor/integrina entre las líneas celulares es más significativa que comparar los niveles de diferentes moléculas en la misma célula. En términos generales, la  $\alpha v\beta 3$  es baja en todas las células (Fig. 16 B), mientras que se observa una gran variabilidad de los niveles de CAR e integrina  $\alpha v\beta 5$  (Fig. 16 A y C y tabla 3). En base la expresión de éstas últimas, se eligieron A549, LNCaP, D65MG y RD para proseguir con los experimentos.





TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 16. Análisis de la expresión de las moléculas de superficie involucradas en la entrada y adhesión del adenovirus por citometría de flujo. Se emplearon como anticuerpos primarios: Rmcb para detectar CAR (A), LM609 para  $\alpha v \beta 3$  (B) y P1F6 para  $\alpha v \beta 5$  (C) en diferentes líneas celulares. En todos los casos se usó un anticuerpo secundario conjugado a FITC para la cuantificación. La curva sombreada en gris representa el control negativo y la línea punteada la expresión de cada molécula.

**Tabla No. 3 Niveles de CAR e Integrinas  $\alpha v$** 

Línea celular	CAR	$\alpha v\beta 3$	$\alpha v\beta 5$
293	+++	-	+
A549	++	+/-	++++
Capan-1	+/-	-	+/-
HeLa	+++	-	+
Hs 766T	+	++	++
LNCaP	++	-	+/-
D65MG	-	++	++
RD	+/-	-	+
SKOV-3	+	++	++
SKOV-3.ip1	+	+	+

TESIS CON  
FALLA DE CANCELACIÓN

### 3. La transducción y expresión de luciferasa se correlacionan con los niveles de CAR e integrinas de las células: incremento de la eficiencia del adenovirus que contiene la secuencia RGD

Antes de estudiar el aspecto oncolítico de un virus modificado con RGD, se estudió la relación entre los niveles de CAR e integrinas  $\alpha v$  en las células y la eficiencia de transducción del gen de luciferasa por vectores adenovirales no replicativos con y sin el tripéptido. Las cuatro líneas elegidas se transdujeron con dosis crecientes de AdCMVLuc o AdLucRGD. La transducción por el AdCMVLuc permite analizar la relación con el nivel de expresión del receptor primario. Las células con CAR alto, A549 y LNCaP mostraron niveles de luciferasa 10 a 100 veces mayores en comparación con D65MG o RD (Fig. 17) que tienen CAR bajo, concluyendo que la expresión de CAR está relacionada proporcionalmente con la eficiencia de transducción del virus con fibra silvestre. Por otro lado, la de AdLucRGD refleja el papel de las integrinas como una vía alterna de la adhesión viral. Cuando se compararon células con niveles similares de

CAR, LNCaP y A549, la expresión de luciferasa incrementó en presencia de valores altos de integrina  $\alpha\beta 5$ . Es decir, mientras que en las LNCaP (casi en ausencia de integrinas) dió una ventaja sobre el virus no modificado tan sólo de 10 veces a dosis bajas (6.25, 12.5 y 25 pv/célula) y ninguna a dosis altas (50 y 100 pv/célula) (Fig. 17B); en las A549 con  $\alpha\beta 5$  muy altas, el mutante con RGD mostró una transducción 100 veces mayor que el virus con la fibra silvestre a cualquier dosis (Fig. 17A). En el caso de las líneas con CAR muy bajo o casi nulo, RD y D65MG, se observaron resultados muy similares (Fig. 17 C y D). Es decir, las células RD, que tienen integrinas muy bajas, presentaron una curva parecida a la de las LNCaP (Fig. 17D). Comparativamente, en las D65MG la lectura incrementó 100 veces en la infección por AdLucRGD en relación con AdCMVLuc (Fig. 17C). Independientemente del nivel de CAR, la presencia de integrinas  $\alpha\beta$  permite un incremento de la transducción, de modo que las células que mostraron el incremento más alto de transducibilidad con el adenovirus RGD fueron A549 y D65MG. Los datos en conjunto indican que CAR es el receptor primario aunque no único y la adsorción del adenovirus a través de integrinas  $\alpha\beta$  constituye una vía de adhesión alterna y aditiva.

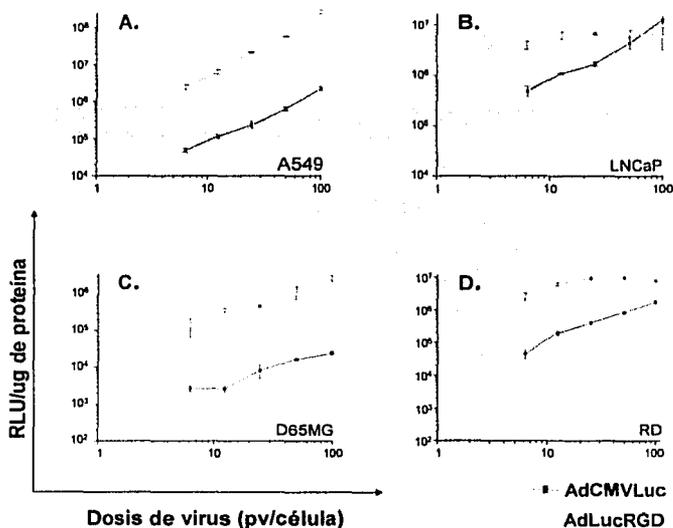


Fig. 17. Comparación de la expresión del gen de la luciferasa transducida por un adenovirus con fibra silvestre o por el mutante con RGD. Las 4 líneas celulares fueron elegidas de acuerdo a las diferentes combinaciones en los niveles de CAR e integrinas. Ante la presencia del receptor primario, la transducción por AdCMVLuc fue más alta en A549 (A) y LNCaP (B) que en D65MG (C) y RD (D). Por otro lado, ya que AdLucRGD tiene la capacidad de entrar por la vía adicional de las integrinas, la expresión de luciferasa incrementa 100 veces en A549 y D65MG.

#### 4. La delección $\Delta 24$ provoca la pérdida de la capacidad de la proteína viral E1A para unir pRB: inmunoprecipitación y detección por quimioluminiscencia

Con el fin de comprobar que la delección  $\Delta 24$  introducida en E1A de nuestro adenovirus replicativo elimina la unión a pRb se realizó un análisis por inmunoprecipitación y quimioluminiscencia. Para ello, se infectaron células con los diferentes mutantes, la proteína se precipitó con anticuerpo anti-E1A y se analizaron con anticuerpos anti-E1A y anti-pRb. Si el virus no contiene la delección, pRb co-precipita con la proteína viral. Primeramente se comprobó la presencia de E1A en todas las células infectadas. Cuando la membrana se expuso al anticuerpo anti-E1A, se observaron las bandas de diferente movilidad con un tamaño por debajo de 55 kD características de esta proteína en todas las muestras (Fig. 18A). A continuación se demostró que las formas mutantes  $\Delta 24$  no se unen a pRb (Fig. 18B, líneas 7 y 8), mientras que el E1A del Ad5-wt300 sí lo hace y fue detectado por el anticuerpo anti-pRb como una banda de 105-110 kb (Fig. 18B, línea 6). La banda de 55 kD corresponde al anticuerpo anti-E1A de la primera reacción para formar los precipitados. De esta manera se confirmó de manera funcional que la delección parcial en E1A de los virus Ad5- $\Delta 24$  y Ad5- $\Delta 24$ RGD impiden la interacción con pRb. Como se ha explicado en la introducción, esta falta de unión a pRb es la base de la replicación selectiva del virus Ad5- $\Delta 24$  y sus derivados generados en este estudio.

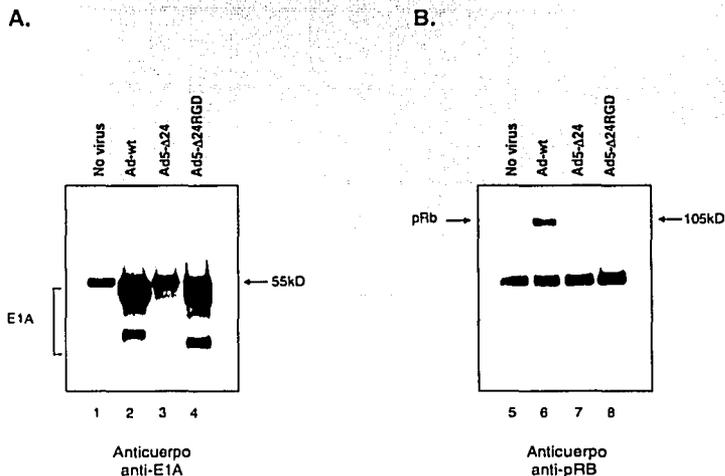


Fig. 18. Inmunoprecipitación del complejo E1A-pRB en células infectadas con adenovirus. La precipitación se realiza con anticuerpo anti-E1A y se analizan con el mismo anti-E1A (A) o con anti-pRB (B). La proteína viral se detectó en todas las muestras infectadas (líneas 2 a 4), pero la interacción pRB ocurrió solamente en las células expuestas al adenovirus silvestre (línea 6). En los mutantes  $\Delta 24$ , la delección impide dicha unión (líneas 7 y 8).

## 5. Estudios del efecto de la inserción genética del tripéptido RGD

### 5.1. La inserción de RGD incrementa la propagación de Ad5- $\Delta$ 24 *in vitro*

Una vez caracterizados nuestros virus y líneas celulares procedimos a evaluar si las modificaciones generadas conllevaban alguna ventaja terapéutica. Primero estudiamos la replicación viral *in vitro*. Cuando las células infectadas con dosis bajas de los adenovirus condicionalmente replicativos son incubadas en un medio con BrdU, cualquier DNA sintetizado (el de las células como el de la progenie viral) incorporará este nucleótido modificado. Sin embargo, es posible purificar el material genético encapsidado empleando espermina (ver "Purificación de DNA viral a partir de células infectadas" en "Material y Métodos") y comparar la capacidad de replicación del virus en base a la cantidad de BrdU captado. Partiendo del mismo número de pv/célula, Ad5- $\Delta$ 24RGD replicó más eficientemente temporal y cuantitativamente que Ad5- $\Delta$ 24 (Fig. 19). En la figura se observa que las bandas características del genoma viral digerido por *Hind*III fueron detectadas desde el día 6 en el mutante con RGD mientras que en el otro esto no se observó hasta el día 8, además de que la cantidad incorporada fue mayor en el Ad5- $\Delta$ 24RGD en cualquiera de los días. De esto se concluyó que la incorporación de RGD en la fibra provee ventaja a la propagación del adenovirus.

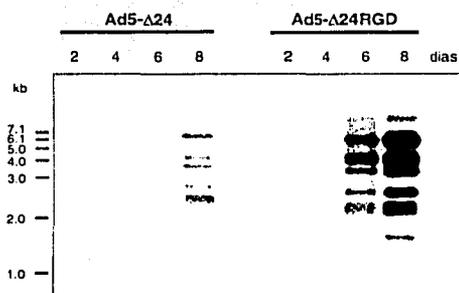


Fig. 19. Estudio *in vitro* de la replicación del DNA de los adenovirus mutantes. Las células infectadas se incubaron en medio con BrdU el cual se incorporó al DNA viral durante su replicación. El material genético encapsidado fue purificado, digerido con *Hind*III y analizado por South-western blot empleando un anticuerpo anti-BrdU. Se observó que ambos virus replican, pero que el mutante con RGD en la fibra muestra una clara ventaja replicativa de manera temporal y cuantitativa.

## 5.2. La presencia de RGD aumenta la cantidad de virus producida *in vitro*

Es sabido que en una preparación viral, no todas las partículas encapsidadas son infecciosas. De hecho, es común calcular la tasa "pv:unidad formadora de placas (pfu)" de cada lote y se considera aceptable si está dentro de un rango de 20-100 (Mittereder *et al.*, 1996). Dado que no es posible conocer la virulencia o capacidad de infección de la progenie con el experimento anterior, los mutantes  $\Delta 24$  se compararon en términos de su citopatogenicidad empleando el ensayo de placa. El lisado proveniente de las células infectadas con el agente no replicativo AdLucRGD no generó progenie infecciosa, mientras que ambos replicativos Ad5- $\Delta 24$  y Ad5- $\Delta 24$ RGD produjeron virus biológicamente activo y el título de la muestra proveniente del mutante RGD ( $3.75 \times 10^9$  pfu/mL) fue 43 veces más alto que del no modificado ( $8.75 \times 10^7$  pfu/mL). Lo anterior refuerza la noción de que la incorporación de la secuencia RGD incrementa la producción de partículas adenovirales infecciosas.

## 5.3. La inserción de RGD aumenta la oncolisis provocada por Ad5- $\Delta 24$ *in vitro*

Una vez demostrada la superioridad del mutante RGD en cuanto a la transducción y eficiencia de propagación, así como la capacidad de replicación de los virus  $\Delta 24$ , procedimos a estudiar la inducción de oncolisis. El mecanismo antitumoral de estos agentes es la ruptura de la célula huésped cuando prolifera y libera la progenie. Se ha mencionado y demostrado anteriormente que las neoplasias suelen presentar niveles muy variados de CAR. En el caso de células con niveles de CAR casi nulos como las RD (Tabla 3), los datos obtenidos por la transducción con el gen de la luciferasa indicaron que aún niveles bajos de integrinas pueden mejorar la infección por el adenovirus con la secuencia RGD en la fibra cuando se administra a dosis bajas (Fig. 17D) y la dosis mínima empleada en dicho experimento fue de 6.25 pv/célula. En el experimento de oncolisis se usaron dosis mucho menores (0.001 a 0.1 pv/célula) de modo que fuera posible observar el incremento provocado en la lisis celular por el virus con la fibra mutante. Se infectó la línea RD con Ad5-wt300 y Ad5-wtRGD y los resultados demostraron que el Ad-wtRGD tiene un efecto oncolítico 100 veces mayor que el Ad5-wt300 en el contexto de células con muy bajo CAR (Fig. 20). Este último, a pesar de ser el virus silvestre, al no encontrar su receptor en la superficie celular y

carecer del motivo RGD fue incapaz de infectar y destruir las células completamente aún a la dosis más alta de 0.1 pv/célula después de 10 días.

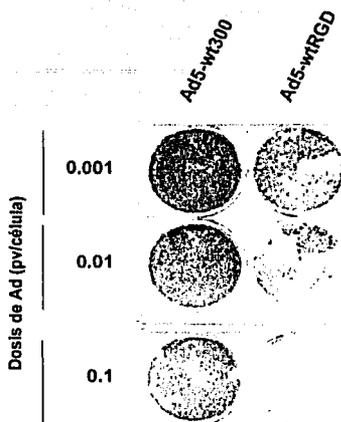
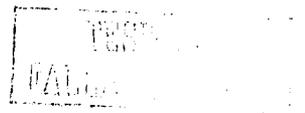


Fig. 20. Estudio de la capacidad oncolítica del adenovirus E1A silvestre con y sin RGD en la fibra. En este experimento se empleó una línea con CAR muy bajo (RD) para demostrar la superioridad del Ad5-wtRGD en comparación con el virus silvestre. El Ad-wt300 no fue capaz de lisar las células aún a la dosis más alta de 0.1 pv/célula debido a que carece de una vía eficiente de entrada a la célula, mientras que a pesar de la expresión baja de integrinas en la línea RD, fue suficiente para incrementar 100 veces el efecto lítico del virus con RGD.

A continuación se estudió el papel de RGD en la potencia oncolítica empleando las dos versiones del adenovirus  $\Delta 24$  en células con CAR moderado a alto y diferente nivel de integrinas (A549 vs LNCaP) (Tabla 3). Nuevamente se emplearon dosis bajas de 0.001 a 0.01 pv/célula y las células que permanecen adheridas al plato de cultivo se tiñeron con cristal violeta que es un método que muestra de forma visual la viabilidad remanente. Además, se aplicó un ensayo colorimétrico basado en la reducción de la sal sódica de XTT por las deshidrogenasas de las mitocondrias de células vivas para una valoración cuantitativa. Se comprobó que la capacidad oncolítica del Ad5- $\Delta 24$ RGD es 7 veces mayor que la del Ad5- $\Delta 24$  (después de 8 días de incubación) si las integrinas  $\alpha v$  están presentes en altas cantidades como ocurre con las A549. Gracias al uso de dosis bajas de virus, en la línea LNCaP el virus RGD logró una ventaja de 3.5 veces comparada con la de la fibra silvestre (10 días de incubación) a pesar de la baja expresión de integrinas (Fig. 21). En base a este experimento y el previo podemos decir que la incorporación de RGD en la fibra incrementa la eficiencia oncolítica como consecuencia de la mayor infectividad y reproducción del virus.





al receptor primario (Fig. 22, recuadros inferiores). De manera paralela, se intentó la inhibición de integrinas con péptidos sintéticos que contienen la secuencia RGD (GRGDSP vs GRGESP) y con anticuerpos anti-integrina para corroborar la participación de estas moléculas en el incremento de infectividad del virus RGD. En cada intento, las células perdieron su adhesión al plato de cultivo dificultando la valoración y sin obtenerse resultados interpretables. Por otro lado, tampoco se encontraron células sin integrinas ya que siempre presentan algún subtipo que se une a RGD.

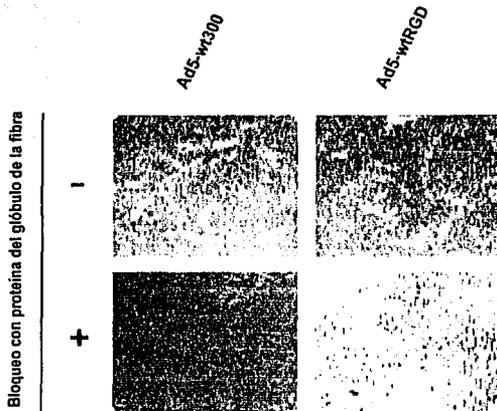


Fig. 22. Efecto del bloqueo de CAR en la capacidad oncolítica de adenovirus con y sin RGD. Se realizaron estudios de interferencia de la interacción del virus con el receptor primario en la línea A549. Cuando la unión de la fibra del virus por la vía natural fue posible, no hay ninguna diferencia en el efecto citolítico entre ambos. Sin embargo, cuando ésta se bloquea empleando fibra viral soluble, solamente el Ad-wtRGD fue capaz de infectar las células y replicar gracias a la presencia de la vía alterna de las integrinas.

## 6. Efecto de la presencia de la región E3 del adenovirus

### 6.1. E3 favorece la dispersión viral: comparación del tamaño de las placas producidas por adenovirus replicativos E3<sup>-</sup> contra E3<sup>+</sup>

La región E3 es eliminada frecuentemente de los vectores adenovirales con el fin de crear espacio para la introducción de genes, sin embargo está descrito que la ausencia de la ADP codificada en dicho gen genera placas citopáticas más pequeñas debido a su papel en la lisis celular durante la etapa tardía del ciclo vital es suprimida. En el caso de los virus replicativos antitumorales, la presencia de esta proteína es crucial pero hasta este punto no se había considerado en el contexto de los virus mutantes  $\Delta 24$ . Con la finalidad de estudiar las características de la citopatogenicidad en relación al gen E3, se eligieron los virus mutantes Ad5- $\Delta 24$ RGD (E3<sup>+</sup>) y Ad5-



$\Delta 24\text{RGD}/\text{GFP}$  ( $\text{E3}^-$ ) que excepto la presencia o ausencia del gen en cuestión tienen la misma configuración. Se infectaron células A549, se cubrieron con agarosa y se midió el tamaño de 25 placas citopáticas por grupo al cabo de 12 días de incubación. En la figura se muestran ejemplos de placas producidas por el virus  $\text{Ad5-}\Delta 24\text{RGD}$  y  $\text{Ad5-}\Delta 24\text{RGD}/\text{GFP}$  (Fig. 23A). Aunque hay cierta variabilidad, el cálculo del área de efecto citopático promedio indicó que el virus  $\text{E3}^+$  genera calvas 3 veces más grandes ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 23B).

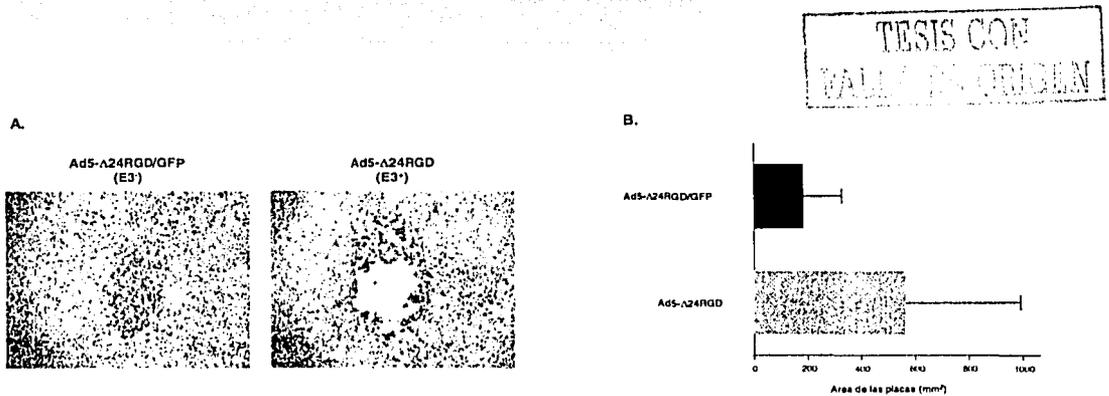


Fig. 23. Placas citopáticas generadas por variantes de  $\text{Ad5-}\Delta 24\text{RGD}$  con y sin el gen E3. Fotografías representativas del área afectada por cada adenovirus a 12 días de la infección (100x) muestran claramente la potencia citolítica del mutante  $\text{E3}^+$  (A). Así mismo el promedio  $\pm$  desviación estándar calculado a partir del área de 25 placas por grupo indicó que éste es 3 veces mayor en dicho virus ( $p < 0.0001$ ) (B).

## 6.2. La eficiencia de propagación del adenovirus replicativo incrementa por la presencia de E3: estudio de la dinámica de producción y liberación de progenie

Dado que la fuerza citopática es mayor en los mutantes con E3, se espera que la cantidad de virus liberada al medio también lo sea. Estos, a su vez, infectarán y lisarán otras células amplificando el efecto antitumoral. Con el fin de estudiar la liberación de la progenie, se compararon los títulos virales de  $\text{Ad5-}\Delta 24$  ( $\text{E3}^-$ ) o  $\text{Ad5-}\Delta 24\text{E3}$  ( $\text{E3}^+$ ) correspondientes a los dos compartimientos, células y sobrenadante, en una curva temporal. En el caso del virus  $\text{E3}^-$ , la cantidad de virus en la fracción celular incrementó 5 veces del día 3 al 6; sin embargo, no escaparon al medio hasta el día 9. En este caso, la tasa entre los títulos de medio:células fue de 4.9:1 (Fig. 24A). En

contraste, en el grupo tratado con el E3<sup>+</sup> la liberación de progenie se observó desde el día 3 ( $2 \times 10^6$  unidades de CPE total), mostrando una curva ascendente hasta que alcanzó  $1 \times 10^9$  unidades de CPE al día 9. El título en las células no aumenta porque los virus producidos escapan rápidamente al medio y la tasa entre los títulos medio:célula del último día es de 37.7:1 (Fig. 24B). Estas cifras indican que el virus Ad5- $\Delta$ 24E3 libera la progenie con una eficiencia 7.7 veces más alta que el virus sin E3.

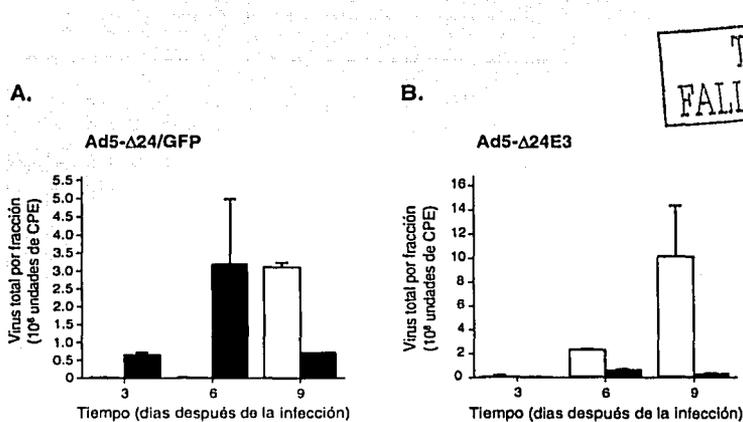


Fig. 24. Estudio dinámico de la producción y liberación de progenie adenoviral en relación con la presencia o ausencia de E3 en las mutantes  $\Delta$ 24. La cantidad de virus contenida en la fracción celular se comparó con la del medio en un curso temporal. El virus E3<sup>+</sup> mostró liberación temprana (día 3) y una tasa célula:medio de 37.7:1 al final del experimento (B); mientras que el E3<sup>-</sup> fue detectado de manera tardía (día 9) con una tasa de 4.9:1. Es decir que la eficiencia de liberación de E3<sup>+</sup> fue 7.7 veces mayor y ya que la progenie liberada puede infectar a su vez el resto de las células, su propagación también fue más eficiente.

## 7. La combinación de los efectos de RGD y E3 en el aumento de la oncolisis *in vitro*

El resultado previo nos condujo a la evaluación de los virus  $\Delta$ 24 con y sin RGD, E3<sup>+</sup> y E3<sup>-</sup>. Al inicio de la sección de "Resultados" se presentó la validación de las 4 formas mutantes (Fig. 14A y B). La capacidad oncolítica se analizó esta vez en A549, Hs 766T y SKOV-3 todas con alteración del eje pRB/p16. La cuantificación de la viabilidad por XTT y la tinción con cristal violeta se realizaron a 9, 10 y 17 días después de la infección correspondientemente de acuerdo a las características de cada línea. La

gráfica se expresa como el porcentaje de células destruidas por pocillo, considerando como 100% al número de células presentes en grupos no expuestos a los virus. Los mutantes E3<sup>+</sup> fueron más potentes en las tres líneas pero con una variabilidad en la ventaja oncolítica de 1.6 veces entre Ad5- $\Delta$ 24/GFP y Ad5- $\Delta$ 24E3 en Hs 766T, hasta de 20 veces entre Ad5- $\Delta$ 24RGD/GFP y Ad5- $\Delta$ 24RGD (Fig. 25). Las diferencias fueron mayores en células A549 y SKOV-3 que demostraron ser más resistentes a los virus E3<sup>-</sup>. Además del papel importante de la región E3 en la destrucción celular, se advirtió que dentro de los virus E3<sup>+</sup> el poseedor de RGD en la fibra es siempre más lítico (A549 p<0.01; Hs 766T p<0.02; SKOV-3 p<0.02) (Fig. 25). Es decir, la combinación de ambos elementos es necesaria para obtener un virus con la máxima potencia antitumoral.

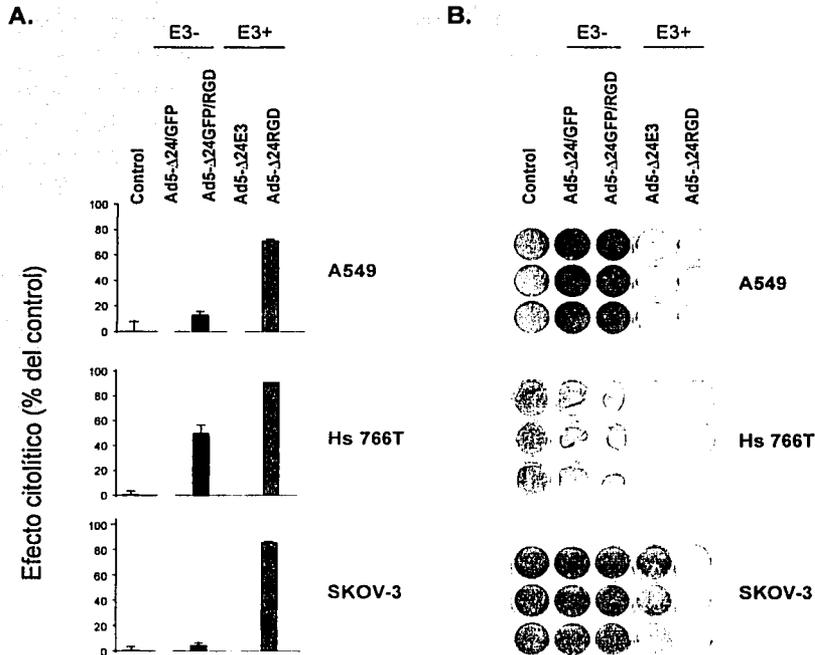


Fig. 25. Estudio comparativo de la capacidad oncolítica de los adenovirus  $\Delta$ 24 con y sin RGD, E3<sup>+</sup> y E3<sup>-</sup>. La gráfica (A) se elaboró en base al ensayo de XTT tomando como 100% viables a las células del grupo control (no infectadas) y se expresa el inverso de las cifras obtenidas. Las mismas se tiñeron posteriormente con cristal violeta (B). Los virus E3<sup>+</sup> fueron más potentes que sus contrapartes y dentro de ellos el mutante RGD demostró la máxima eficiencia oncolítica en todas las líneas celulares.

## 8. Propagación del adenovirus de replicación condicionada en un modelo tridimensional *in vitro*: esferoides

Los esferoides son agregados multicelulares que representan de manera más fehaciente la distribución heterogénea de nutrientes y oxígeno en los tumores reales así como su complejidad estructural en comparación con los cultivos en monocapa. Estudios de transducción en este modelo son muy útiles en el campo de la terapia génica del cáncer puesto que la mayor limitación observada es la transducción más allá de la capa celular directamente expuesta al vector inoculado. Su superficie es lisa, siendo difícil la distinción de células individuales y puede estar cubierta por una red filamentosa de proteínas dependiendo de la línea celular. En el centro, de acuerdo a la duración de cultivo, puede presentar áreas de necrosis. Este modelo se ha empleado para el estudio de diferentes terapias antitumorales (Santini y Rainaldi, 1999). Con el mismo fin, se elaboraron esferoides de la línea A549 y se infectaron con los mutantes  $\Delta 24$ . Veintitres días después de la siembra de células estuvieron listos, primero para el análisis de la viabilidad del esferoide, empleando un par de reactivos fluorescentes de los que el verde (calceína) indica células vivas y el rojo (etidio) proviene de las muertas. Se observó que todas las células son viables en los pequeños, mientras que los de mayor tamaño tienen una zona central de células no viables (Fig. 26).

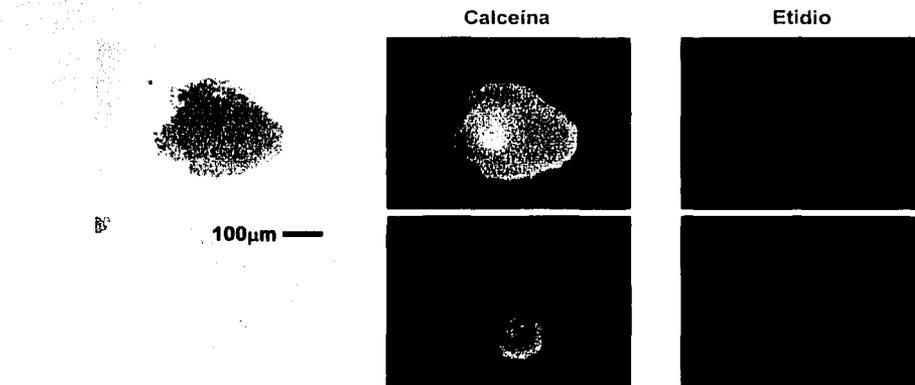


Fig. 26. Viabilidad de esferoides elaborados a partir de la línea A549. Las estructuras tridimensionales se formaron después de 20 días de incubación desde de la siembra de células sobre agarosa. Al día 23, se aplicó un par de reactivos fluorescentes que indican las viabilidad celular de manera simultánea: en verde (calceína) las vivas y en rojo (etidio) las muertas. Se observa que hay un grupo de células dañadas al centro del esferoide de mayor tamaño. Magnificación = 50x.

Para proseguir con el experimento, se eligieron esferoides de tamaño mediano y similar entre los grupos de tratamiento (AdGFP, Ad5- $\Delta$ 24/GFP y Ad5- $\Delta$ 24RGD/GFP). Once días después de la exposición a los virus se observó que, mientras que el AdGFP (no replicativo) transduce únicamente la capa externa del corpúsculo, ambos replicativos infectan capas más internas (Fig. 27) lo que comprobó que la replicación confiere una capacidad de penetración en una estructura tridimensional a estos adenovirus.

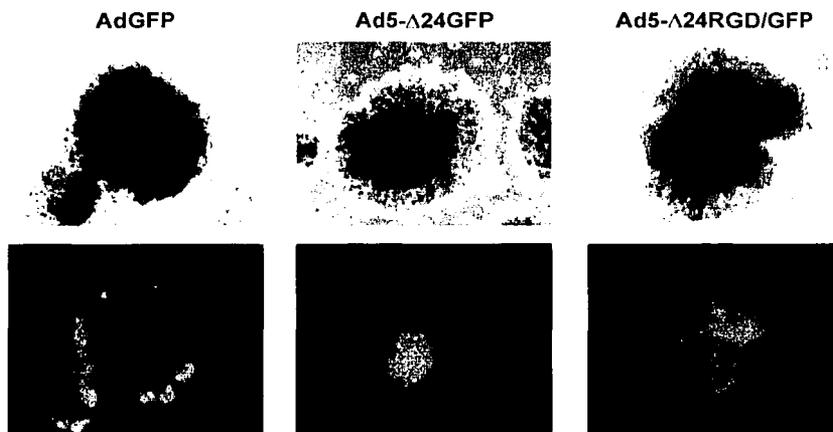


Fig. 27. Transducción de esferoides con adenovirus replicativos. Esferoides de A549 fueron tratados con virus que expresan GFP. Once días después se observó que en el caso del no replicativo AdGFP, solamente se transduce la capa externa mientras que en ambos replicativos  $\Delta$ 24 el efecto se expande hacia el interior de la estructura tridimensional. Magnificación = 100x.

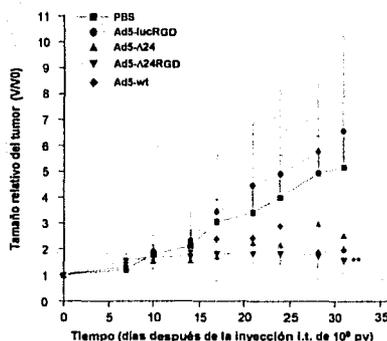
## 9. Análisis del efecto de los adenovirus condicionalmente replicativos *in vivo*

### 9.1. La inserción de RGD aumenta la capacidad oncolítica del adenovirus administrado localmente

Una vez demostrado el efecto de RGD y E3 en la oncolisis *in vitro* pasamos a evaluar su capacidad de potenciar la lisis tumoral *in vivo*. El xenotrasplante subcutáneo de líneas celulares tumorales humanas en ratones atímicos es un modelo ampliamente caracterizado para el estudio de tratamientos anti-neoplásicos. Se eligieron las células A549 para demostrar la hipótesis central del trabajo ya que se sabe que tienen un 90-93% de éxito cuando son xenotransplantadas a ratones atímicos (Topley *et al.*, 1993) y es una de las líneas en donde se ha estudiado la capacidad oncolítica de los diferentes

virus mutantes *in vitro*. Dado que el concepto del virus replicativo como terapia se basa precisamente en la capacidad de llevar a cabo varios ciclos de reproducción que conducen a la extensión a todo el tumor, las dosis elegidas para el tratamiento fueron bajas y la administración única. El resultado del tratamiento intratumoral con  $10^9$  pv mostró un efecto oncolítico similar entre los virus Ad5- $\Delta$ 24 y el Ad5- $\Delta$ 24RGD. Ambos detuvieron el crecimiento tumoral a lo largo de 32 días de modo similar a Ad5-wt300 y en claro contraste con los grupos tratados con PBS o el virus no replicativo (Ad5- $\Delta$ 24,  $p < 0.05$ ; Ad5- $\Delta$ 24RGD,  $p < 0.01$  comparado con el grupo tratado con PBS) (Fig. 28A). Incluso en algunos casos destruyeron los nódulos por completo como se presenta en la figura 28B. La masa tratada con Ad5- $\Delta$ 24RGD casi ha desaparecido dejando una costra (Fig. 28B.c), en comparación, otro inyectado con PBS continuó creciendo (Fig. 28B.b.).

A.



B.

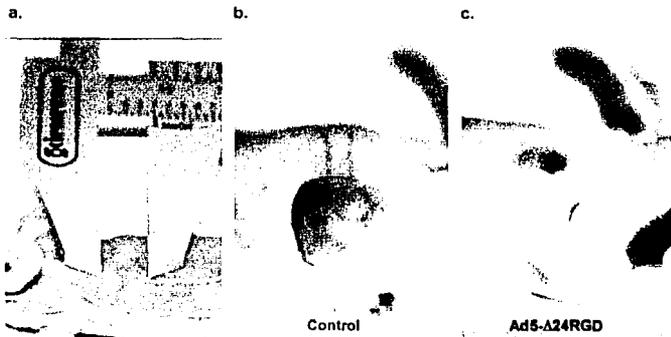


Fig. 28. Efecto oncolítico de los adenovirus  $\Delta 24$  administrados por vía intratumoral a dosis alta ( $10^9$  pv) en un modelo de xenotrasplante subcutáneo de células tumorales en ratones atímicos. Los nódulos fueron medidos 2 veces por semana ( $n = 5$ ) (B.a.) y el tamaño se expresa como volumen relativo ( $V/V_0$ , siendo V el volumen medido en cada punto y  $V_0$  el inicial). Se observa que tanto Ad5- $\Delta 24$  como la versión RGD tienen un efecto similar (Ad5- $\Delta 24$   $p < 0.05$  y Ad5- $\Delta 24$ RGD  $p < 0.01$  en relación al grupo tratado con PBS) (A). Fotografías de ratones atímicos con nódulos tratados con PBS (B.b.) o Ad5- $\Delta 24$ RGD (B.c) muestran el efecto del virus replicativo. Este presentó un claro efecto antitumoral, dejando una costra que desapareció al final del experimento.

Cuando la dosis se disminuyó a  $10^7$  pv, la diferencia entre los virus con y sin RGD se hizo notar. La eficiencia oncolítica de Ad5- $\Delta 24$ RGD fue mayor que el Ad5- $\Delta 24$  ( $p < 0.05$ ), éste último no fue suficiente para ejercer un efecto antitumoral y la curva de crecimiento del tumor tuvo el mismo patrón que la del tratamiento con el virus no replicativo (Fig. 29A). Con el fin de confirmar la presencia de los virus en el tejido tumoral, se realizó un ensayo de inmunodetección empleando un anticuerpo primario anti-hexón y uno secundario conjugado a un fluorocromo verde. La presencia de virus se detectó en los tumores tratados con las formas replicativas, siendo la cantidad del virus RGD mayor que la del que carece de RGD (Fig. 29B.b. y c.). No se observó ninguna fluorescencia en los tratados con AdLucRGD (Fig. 29B.a.), lo que indica que el virus detectado equivale a la progenie generada a partir del inoculo inicial. Lo anterior nos permite concluir que: (1) la replicación de los virus provoca la desintegración del tumor, ya que el tamaño varía de manera inversa al incremento en la cantidad de virus detectada y (2) la modificación de la fibra con la secuencia RGD confiere mayor infectividad, producción y oncolisis al adenovirus empleado *in vivo*.

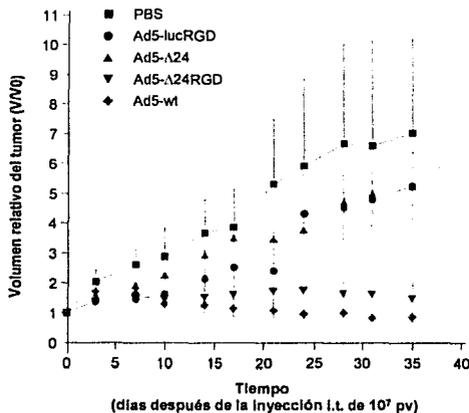


Fig. 29A. Efecto oncolítico de los adenovirus  $\Delta 24$  administrados por vía intratumoral a dosis baja ( $10^7$  pv) en el modelo tumoral en ratones atímicos. Cada línea representa el promedio de 4 tumores  $\pm$  desviación estándar y se presenta como el volumen relativo al inicial. Se observa que a esta dosis solamente el Ad5- $\Delta 24$ RGD muestra eficiencia oncolítica.

## B.

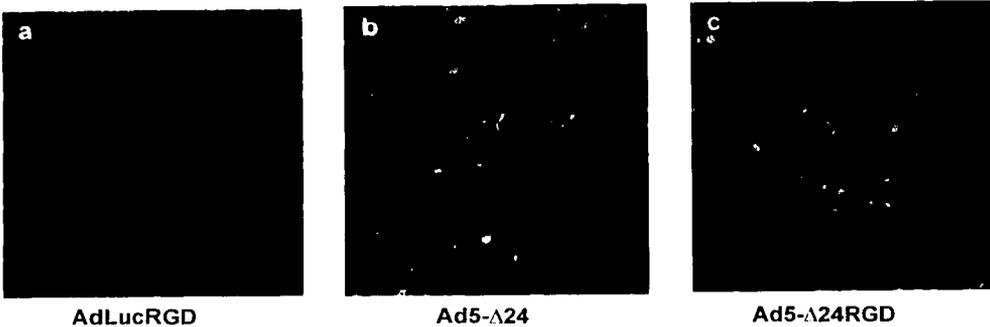
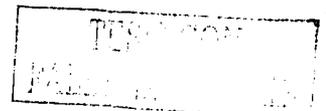


Fig. 29B. Cuando se analizaron los tumores empleando un anticuerpo caprino anti-hexón como primario y un secundario (burro) anti-cabra conjugado a un fluorocromo verde (Alexa 488) se detectó progenie viral de ambos virus  $\Delta 24$  en el tejido neoplásico (B.b y c). Los núcleos de las células se observan en azul (Hoechst 33342). La señal fue más intensa en las muestras provenientes del tratamiento con Ad5- $\Delta 24$ RGD (c), mientras que las inyectadas con PBS o AdLucRGD no presentaron fluorescencia indicativa de virus (a).

## 9.2. Efecto del gen E3 en la oncolisis *in vivo*

Al igual que en los experimentos *in vitro*, se analizó el efecto de la presencia o ausencia de E3 en la capacidad oncolítica de los virus  $\Delta 24$  en el mismo modelo de xenotrasplante en ratones atímicos. Los nódulos se inyectaron por vía intratumoral con  $10^7$  pv de los 4 virus  $\Delta 24$  (con y sin RGD y E3<sup>+/+</sup>) así como uno incapaz de replicación y el vehículo. Como se observa en la figura 30, el crecimiento del tumor fue inhibido de manera parcial por Ad5- $\Delta 24$ E3 (volumen relativo del tumor =  $3.22 \pm 0.77$ ) o total por Ad5- $\Delta 24$ RGD ( $1.87 \pm 0.53$ ) 35 días después de la administración de los virus E3<sup>+</sup>, mientras que los tratados con los E3<sup>-</sup>, no replicativo o PBS siguieron incrementado de tamaño. Las diferencias fueron estadísticamente significativas si se comparan los tratamientos efectivos con el grupo control (Ad5- $\Delta 24$ E3  $p < 0.05$ ; Ad5- $\Delta 24$ RGD  $p < 0.01$ ) (Fig. 30A). El análisis de los nódulos al final del experimento mostró que 40% de los nódulos remanentes en los grupos tratados por los virus E3<sup>+</sup> estaban compuestos de tejido necrótico. El estudio de los tejidos por inmunofluorescencia no encontró virus en el grupo control (Fig. 30B), mientras que en los tratados por los E3<sup>+</sup> se detectó



claramente su presencia formando focos muy localizados (Fig. 30C), por otro lado 30% de los E3<sup>-</sup> también mostraron virus pero el patrón fue más difuso (Fig. 30D). En conclusión, el efecto oncolítico del virus que posee ambos elementos, E3 y RGD, es superior al de los virus sin E3 o sin RGD.

A.

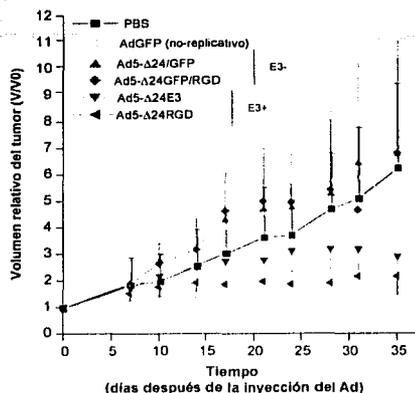


Fig. 30. Comparación del efecto oncolítico de los adenovirus  $\Delta 24$  con y sin RGD y E3<sup>+</sup> o E3<sup>-</sup> administrados por vía intratumoral a dosis baja ( $10^7$  pv) en el modelo de xenotrasplante subcutáneo en ratones atímicos. La potencia antitumoral de los virus que contienen E3 es superior a la de los que lo carecen, pero no hay diferencia estadística entre los dos virus E3<sup>+</sup> ( $n = 5$ ) (A). El análisis de inmunofluorescencia detectó progenie en los inyectados con Ad5- $\Delta 24$ E3 y Ad5- $\Delta 24$ RGD (C) con un patrón muy delimitado, mientras que algunos E3<sup>-</sup> también mostraron virus pero en forma difusa (D). El grupo control no mostró ninguna señal (B). Los núcleos se observan en azul (Hoechst 33342) y los adenovirus en verde (Alexa 488).

B.



Control

C.



E3<sup>+</sup>

D.



E3<sup>-</sup>

### 9.3. Cuantificación del adenovirus en el tejido tumoral

Con los objetivos de comprobar que existe una reproducción del adenovirus dentro del tejido tumoral y de correlacionarla con el efecto oncolítico, se realizó la cuantificación en un curso temporal en el modelo de xenotrasplante en ratón. Los lisados tumorales se elaboraron por digestión enzimática de los nódulos inyectados con los diferentes mutantes. Previamente se analizó el efecto de la proteinasa en la integridad funcional del adenovirus empleando el AdGFP no replicativo que se expuso

a la enzima a la concentración y durante el tiempo utilizados para el experimento de titulación o a medio de cultivo simple. Posteriormente, se transdujeron células A549 con ambas preparaciones y la expresión de la GFP no presentó diferencias. Así mismo, se estudió el efecto de la filtración de los virus a través de membranas de 0.2  $\mu\text{m}$  y no se observó ninguna diferencia (Fig. 31).

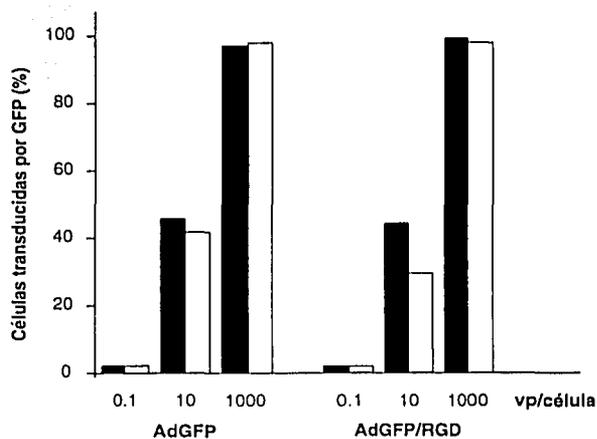


Fig. 31. Efecto de la filtración en la actividad biológica del adenovirus. Se elaboraron suspensiones de AdGFP/RGD en 3 concentraciones: baja (0.1 pv célula), media (10 pv/célula) y alta (1000 pv/célula); se dividieron en 2 porciones y una se filtró a través de una membrana de unión de proteínas baja con poros de 0.2  $\mu\text{m}$ . Se transdujeron células A549 con estos preparados se analizaron por citometría de flujo. En la gráfica se muestra el porcentaje de células positivas (GFP) de una cuenta total de 10,000 eventos. Se observa que la filtración (barras blancas) no afecta al virus ya que presenta niveles de transducción similares al no filtrado (barras negras).

La titulación de los extractos tumorales resultó en la ausencia de progenie adenoviral en los provenientes de los grupos inyectados con PBS o con AdGFP. Todos los nódulos tratados con virus replicativo mostraron títulos que varían de  $3 \times 10^8$  unidades de CPE/g de tejido (Ad5- $\Delta$ 24GFP) a  $2 \times 10^{11}$  CPE/g de tejido (Ad5- $\Delta$ 24/RGD) (Fig. 32A). En la totalidad de los casos, los E3<sup>+</sup> tuvieron títulos más altos que los que carecen de dicho gen. El cálculo del significado estadístico (*t* de Student) al día 9 después de la inyección indica que entre Ad5- $\Delta$ 24GFP y Ad5- $\Delta$ 24E3 el valor de  $p=0.05$  y entre Ad5- $\Delta$ 24GFP/RGD y Ad5- $\Delta$ 24RGD de  $p<0.04$ . El adenovirus con E3 y RGD obtuvo las cifras más altas en todos los puntos aunque si comparamos los títulos en los días 3, 6 y 9 la tendencia es a disminuir, lo que podría ser causado por la falta de células viables como se describe más adelante. Si se observa la gráfica del promedio del tamaño de los tumores en el momento de la disección (Fig. 32B) se nota que hay

una relación inversa con el título de la progenie viral, es decir, los tumores con títulos altos tienen menor tamaño y viceversa.

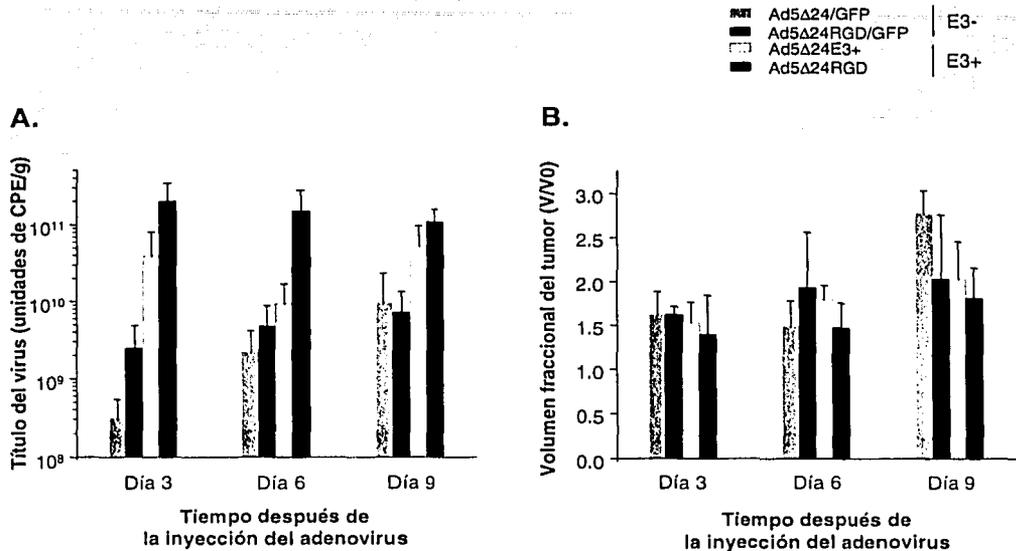
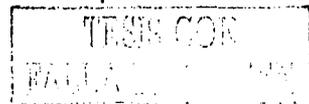


Fig. 32. Estudio temporal de la propagación del adenovirus en los tumores inyectados localmente. Se tituló la cantidad de virus presente en los tumores a 3, 6 y 9 días después de la inyección. Para ello se preparó un extracto tisular por digestión enzimática, se filtró y cuantificó empleando el método espectrofotométrico. Las unidades empleadas son CPE por gramo de tejido y cada columna representa el promedio de 3 tumores  $\pm$  desviación estándar (A). El tamaño correspondiente a los nódulos fue medido en el momento de la disección y se expresa como volumen relativo al inicial (B). Existe una relación inversa entre la cantidad de virus presente y el tamaño del tumor.

#### 9.4. El tratamiento sistémico no muestra eficiencia oncolítica

Debido a que en la mayoría de los tumores no hay un acceso directo, al igual que en las metástasis, la vía de administración del tratamiento viral ideal es la intravenosa. Una vez verificada la eficacia del adenovirus modificado con la secuencia RGD *in vivo* por administración intratumoral, estudiamos la eficacia de los virus inyectados por vía sanguínea. Para ello, se emplea el mismo modelo de xenotrasplante y se inyectan  $10^9$  pv divididas en dos dosis en días consecutivos por una de las venas



laterales de la cola. Este tratamiento no mostró efectividad oncolítica ni se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Ad5- $\Delta$ 24 y Ad5- $\Delta$ 24RGD después de 28 días, momento en el que se practicó la eutanasia de los animales debido al tamaño de los tumores en el grupo control (Fig. 33). Evidentemente, los adenovirus no eran capaces de alcanzar el tumor por esta vía, lo que condujo al estudio de la dinámica de estos agentes administrados en la vía sistémica.

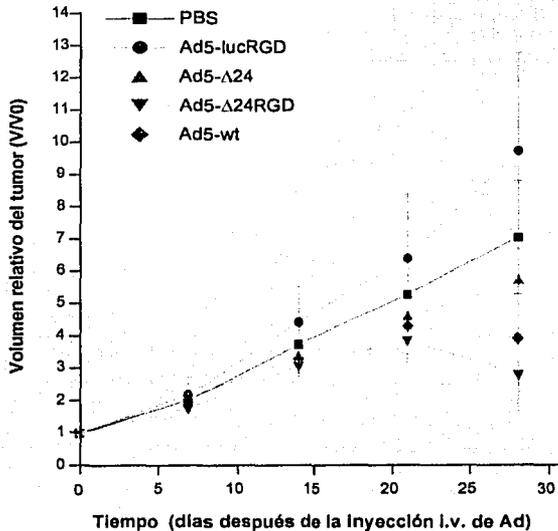


Fig. 33. Efecto oncolítico de los adenovirus  $\Delta$ 24 administrados por vía sistémica en un modelo de xenotrasplante tumoral subcutáneo en ratones atímicos. La dosis empleada fue de  $5 \times 10^8$  pv dividida en dos días consecutivos ( $10^9$  pv en total) e inyectada en la vena dorsal de la cola. El tamaño se midió de manera semanal y se expresa en la gráfica como volumen relativo ( $n = 5$ ). El efecto es similar entre Ad5- $\Delta$ 24RGD y el silvestre, ninguno fue capaz de detener el crecimiento de los tumores.

### 9.5. El adenovirus se co-localiza con las células de Kupffer en el hígado

La persistencia del adenovirus en el torrente sanguíneo tiene implicaciones en su uso como agente oncolítico, de manera que cualquier intervención que disminuya su eliminación podría favorecer su dirección hacia los tumores cuando es administrado de manera sistémica. Está descrito previamente que 90% del genoma del adenovirus se localiza en el hígado a las 24 horas de su administración sistémica y que, de los componentes de este órgano, las KC son las encargadas de depurar diferentes macromoléculas incluyendo virus (Kirn *et al.*, 1982; Lieber *et al.*, 1997; Wolff *et al.*, 1997; Worgall *et al.*, 1997). Con el fin de demostrar que el adenovirus administrado por

vía intravenosa es interceptado por las KC, se realizaron estudios de co-localización en ratones. Se sabe que las partículas de látex son fagocitadas por las KC y en este experimento se observan en color verde (Fig. 34A), mientras que el virus se conjugó con un fluoróforo rojo (Fig 34B) y los núcleos celulares se tiñen de azul. En la figura se muestra la localización de las partículas virales que coincide con las de látex, dando una fluorescencia amarilla con un patrón irregular (Fig. 34C). Esto indica que gran parte de los adenovirus está confinado en las KC dentro del hígado. En apoyo a este resultado, en el siguiente experimento se administró el adenovirus previo bloqueo de las KC con cloruro de gadolinio y se observó que el fluoróforo rojo se distribuye de manera homogénea en todo el tejido hepático lo que demostró que es posible alterar la distribución del virus interfiriendo con la acción de las KC (Fig. 34D).

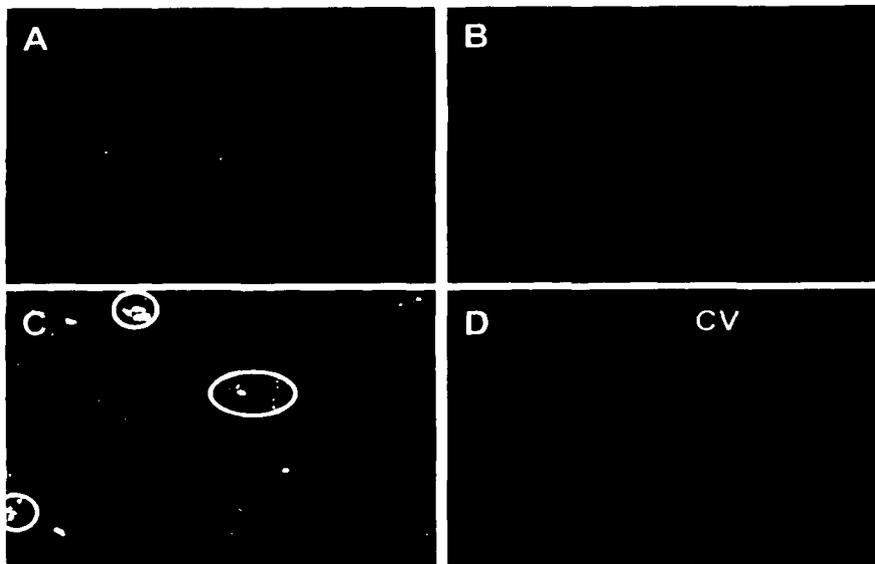


Fig. 34. Estudio de la distribución intrahepática del adenovirus administrado por vía intravenosa. El virus fue conjugado con Cy3 (fluorocromo rojo) y las partículas de látex con fluoresceína (verde) y se inyectaron por la vena dorsal de la cola: (A) látex, (B) virus y (C) ambos, en donde se indica su co-localización dentro de los círculos blancos. Cuando se bloqueó el efecto de las KC con  $GdCl_3$ , el virus se mostró una distribución más uniforme. CV = vena centrolobulillar. Magnificación = 100x.

## 9.6. El adenovirus es eliminado rápidamente del torrente sanguíneo en ratones

Demostrada la interacción de los adenovirus con las KC y que su bloqueo puede cambiar la distribución intrahepática, se procedió a medir la eliminación del virus a partir del torrente sanguíneo bajo la premisa de que el bloqueo de las KC también puede modificar la farmacocinética viral. Ya que se emplea un ensayo de transducción de células 293 para cuantificar la cantidad de adenovirus en sangre a diferentes tiempos, se comenzó por el análisis del efecto de la sangre en dicho proceso empleando AdGFP y se demostró que no existe ningún tipo de interferencia (Tabla 4).

Tabla No. 4

Efecto de la sangre en la capacidad de transducción

	RLU/25,000 células
PBS	40,516 ± 10,725
Sangre heparinizada	67,452 ± 18,101

Comprobado esto, se midió la eliminación del adenovirus del torrente circulatorio en ratones Balb/c. El virus se inyectó por la vena cava inferior, se suturó la pared abdominal y se obtuvieron las muestras de sangre a partir de los vasos de la cola. Considerando un volumen total de sangre de 2 mL en el ratón, la concentración calculada de virus fue de  $5 \times 10^5$  unidades de transducción/ $\mu$ L. De acuerdo a la cuantificación, esto significa que a 1-min de la inyección, solamente 10% de la dosis administrada estaba circulando. Desde el minuto 1 al 5, el título baja 7 veces (de  $6.5 \times 10^5$  unidades de transducción/ $\mu$ L a  $10^5$  unidades de transducción/ $\mu$ L), indicando que la permanencia media del virus en la circulación es menor de 2 min. A los 60 min sólo se detectó 0.01% del título al primer minuto (Fig. 35).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

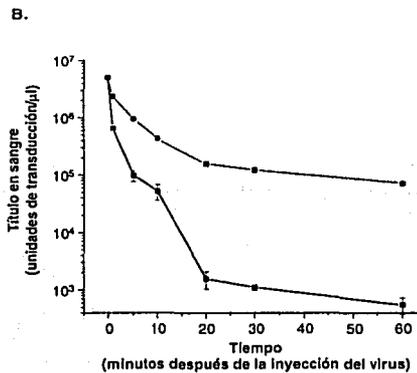
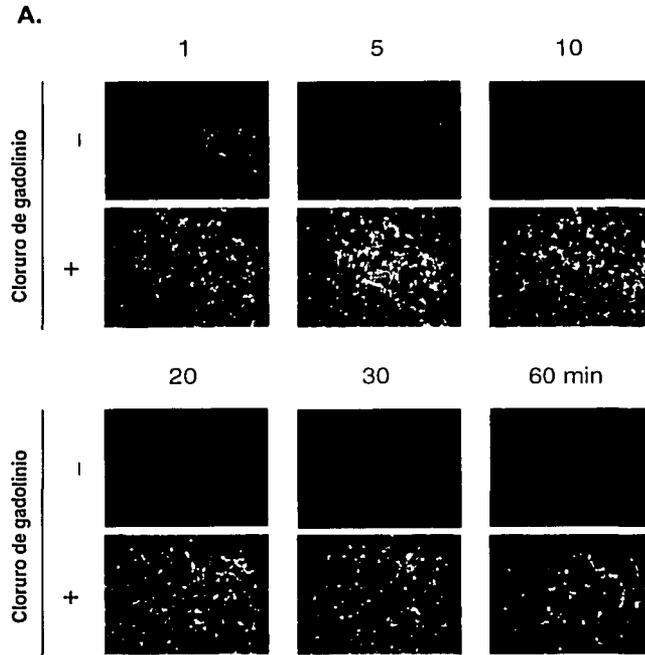


Fig. 35. Depuración del adenovirus inyectado por vía sistémica y efecto del bloqueo de KC. Se inyectó AdGFP por la vena cava inferior en presencia o ausencia de  $GdCl_3$  y se tomaron muestras de sangre a intervalos de 10 min a partir de los vasos de la cola. Se tituló el virus presente en el plasma transduciendo células A549 con diluciones seriadas. Fotografías bajo microscopía fluorescente de la dilución 1:1000 de los sueros provenientes de cada intervalo (A). Gráfica del título de los virus (unidades de transducción/ $\mu$ L sangre) sin (-■-) o con bloqueo de KC (-●-) (B).

### 9.7. Efecto del cloruro de gadolinio en la eliminación del adenovirus

Con el objetivo de investigar si la persistencia del adenovirus en la sangre se prolonga al bloquear las KC, se realizó el experimento descrito pero con previa administración de  $GdCl_3$ , inhibidor inespecífico de canales iónicos mecanosensitivos de los macrófagos. La disminución en la cantidad de virus circulante fue solamente de 2.5 veces del minuto 1 al 5; de 2 veces entre 5 y 10 min; 2.8 veces entre 10 y 20 min; y casi 2 veces entre 20 y 60 min (Fig. 35). Así, el título calculado para los 60 min es del 10% del título del primer minuto, pero si se compara con el experimento en ratones con KC funcionales, el adenovirus remanente en el torrente sanguíneo es 100 veces más alto. Esto demostró que es posible incrementar la persistencia del virus circulante, por lo que se procedió a repetir el experimento de oncolisis empleando estas condiciones.

### 9.8. El tratamiento con cloruro de gadolinio no incrementa la carga adenoviral que llega al tumor cuando es administrado por vía sistémica

En base a los estudios anteriores, se establece la hipótesis de que la persistencia prolongada del adenovirus en la sangre lograda mediante el bloqueo de las KC por el  $GdCl_3$  puede incrementar la cantidad del agente oncolítico que llega al tumor. Se empleó el mismo modelo de xenotrasplante subcutáneo de células A549 en ratones atímicos, salvo que esta vez se administró  $GdCl_3$  antes del tratamiento intravenoso con los adenovirus. Inesperadamente, el crecimiento de los tumores en los ratones inyectados con  $GdCl_3$  fué mucho mayor (Fig. 36) (volumen relativo del grupo control =  $7.05 \pm 1.2$ ;  $GdCl_3$  =  $9.25 \pm 2.57$ ) y las posibles causas de este fenómeno se discuten más adelante. Por otro lado, como se observó en el estudio del tratamiento sistémico realizado previamente, el Ad5- $\Delta 24$ RGD administrado por vía sistémica no fue efectivo para detener el crecimiento neoplásico ( $4.8 \pm 1.68$ ) y la combinación con el  $GdCl_3$  el efecto fue deletéreo ( $6.86 \pm 2.76$ ).

TESIS CON  
FALLA EN CRISTAL

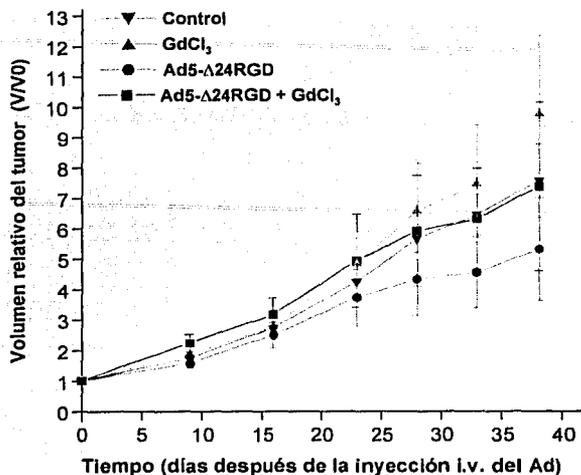


Fig. 36. Efecto del cloruro de gadolinio en la carga adenoviral que llega al tumor en un modelo de xenotransplante subcutáneo en ratones atímicos. El bloqueo de las KC se realizó con 3 inyecciones de GdCl<sub>3</sub> a 54, 30 y 6 h previas a la administración de Ad5-Δ24RGD cuya dosis fue de  $5 \times 10^8$  pv en dos días consecutivos ( $10^9$  pv en total) e inyectada en la vena dorsal de la cola. El tamaño se midió de manera semanal durante un mes y cada 5 días posteriormente. En la gráfica se expresa como volumen relativo al inicial ( $n = 5$ ). El tratamiento con GdCl<sub>3</sub> tuvo un efecto contraproducente.

## DISCUSION

---

Siendo el cáncer una enfermedad mortal en la cual los tratamientos convencionales han sido incapaces de producir un impacto significativo en la supervivencia global, la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas es un área experimental muy activa. El conocimiento de las diferencias genéticas y moleculares entre las células normales y las neoplásicas ha abierto la puerta a estrategias más selectivas como la terapia génica. De los protocolos aprobados en los Estados Unidos y Europa en este campo, más del 70% se aplican a problemas oncológicos. Sin embargo, los resultados de estos estudios indican que la administración de los vectores convencionales de la terapia génica, ya sea de manera intratumoral o sistémica, no son suficientes para eliminar los tumores. Es por eso que se ha considerado el empleo de virus con capacidad de replicación, que permitirían la amplificación del efecto citopático para compensar la transducción/infección subóptima. Tres aspectos cruciales en la viroterapia son la especificidad de la replicación viral, la capacidad de infección de la célula huésped y la potencia oncolítica.

### 1. La selectividad del virus de replicación condicionada

Existen dos estrategias para obtener la especificidad replicativa. El control de genes virales con promotores activos en tumores y la delección de proteínas que tienen funciones indispensables para su replicación en células normales pero no necesarias en las tumorales (Curiel, 2000; Alemany, 2001). El virus Ad5- $\Delta$ 24 fue elaborado por el Dr. Juan Fueyo y cols. en base al segundo concepto. Como se ha explicado en la "Introducción", la delección de 24 bp en la región constante 2 del gen E1A es crucial para la unión de la pRB. Ellos demostraron que este virus es incapaz de replicarse en las células normales, en este caso fibroblastos, y una línea de osteosarcoma (pRB<sup>-/-</sup>) en la que pRB fue restaurada por transfección con otro adenovirus que lleva el gen *RB*; mientras que el ciclo vital del virus y la citólisis ocurrieron en las células de glioma con alteraciones de la vía pRB/p16 (Fueyo *et al.*, 2000). La selectividad del adenovirus Ad5- $\Delta$ 24 estaba demostrada, sin embargo la baja capacidad de infección de las células tumorales seguía siendo una de las limitantes en el uso del virus con fines terapéuticos.

El bajo nivel del receptor primario CAR en la célula diana es claramente un problema central en la infectividad del adenovirus (Huang *et al.*, 1995; Zabner *et al.*, 1997; Hemmi *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1998; Kaner *et al.*, 1999; Kasono *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Nalbantoglu *et al.*, 1999). Se trate de células neoplásicas o no, una infección ineficiente refleja un bajo nivel de expresión del receptor primario en las células (Zabner *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 1998; Pickles *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1999). En este trabajo estudiamos los niveles de CAR de diferentes líneas celulares tumorales provenientes de diferentes órganos y como se observa en la tabla 3, corroboramos la existencia de esta variabilidad.

## 2. Cómo incrementar la infectividad

Ante este hecho, se han ideado diversas estrategias para alterar el tropismo del adenovirus e incrementar la eficiencia de infección de las células neoplásicas. Estos incluyen el intercambio de la totalidad o la porción globular de la fibra por la de otros serotipos que se unen a receptores diferentes a CAR (Krasnykh *et al.*, 1996) y la modificación genética de algún elemento involucrado en el mecanismo de entrada para introducir motivos de ligandos específicos de ciertos receptores que se encuentran en las células blanco. Algunos investigadores han alterado genéticamente el extremo carboxilo terminal de la fibra con éxito (Wickham *et al.*, 1997), pero en este trabajo se eligió el glóbulo (knob) de la fibra, responsable de la adhesión inicial. En dicha estructura, los componentes implicados en la interacción con CAR son el asa AB, la lámina- $\beta$  B y el asa DE; mientras que otras asas, DE distal, FG distal y HI presentan gran variabilidad entre los diferentes serotipos (Roelvink *et al.*, 1999). De ellas, se escogió el asa HI en base a la localización exterior; la flexibilidad; la ausencia de interacción con otras estructuras intramoleculares de modo que la inserción de secuencias adicionales no afectaría la trimerización de la fibra y en el hecho de que la longitud de este asa es diferente entre los serotipos indicando la existencia de cierta tolerancia a la variación (Krasnykh *et al.*, 1998).

La siguiente cuestión fue la elección de la secuencia. Las características que se buscaron fueron que no causara alteraciones estructurales, no requiriera de procesamiento postraduccional y que pudiera adquirir la configuración correcta en el contexto de la fibra para interactuar con el receptor (Krasnykh *et al.*, 1998). Polipéptidos cargados positivamente como polilisina o poliarginina se han empleado con este fin (Fromm *et al.*, 1995; Wickham *et al.*, 1997). Sin embargo, nosotros elegimos el tripéptido Arg-Gly-Asp (RGD) porque cumple con las tres características, interacciona con la inmensa mayoría de las integrinas presentes en cualquier tipo celular y se sabe que hay una expresión exagerada de las de tipo  $\alpha_v$  en algunos tumores o en los vasos sanguíneos que los nutren (Albelda *et al.*, 1990; Gladson y Cheresch, 1991; Koivunen *et al.*, 1995; Gladson, 1996), lo que favorece el uso de este tipo de adenovirus modificado con RGD en el tratamiento del cáncer. La secuencia se introdujo como un nonapéptido con 4 cisteínas que forman puentes disulfuro intramoleculares (CDCRGDCF) lo que le da estabilidad y la formación de un asa que expone al máximo la secuencia RGD para la interacción con las integrinas (Koivunen *et al.*, 1995). El incremento de la transducción por un adenovirus no replicativo con la incorporación genética de RGD fue demostrada por Dmitriev y cols. (Dmitriev *et al.*, 1998).

En la tabla 3 se muestra la expresión de las integrinas  $\alpha\beta_3$  y  $\beta_5$  en las mismas células en las que se estudió la presencia de CAR. Todas las células presentan, una y/u otra en diferente proporción. En teoría, éstas permitirían la unión y entrada del adenovirus de manera independiente y aditiva a la vía primaria.

Con el fin de demostrar que la presencia de RGD permitiría la entrada del virus por una vía alterna a la primaria, se comparó el efecto causado por el mismo número de pv de Ad5-wt y el correspondiente mutante Ad5-wtRGD en dos modelos: (a) células A549 con CAR bloqueado por una forma soluble de la fibra adenoviral y (b) células RD con niveles casi nulos del receptor primario. Se observó que cuando el receptor primario es bloqueado, solamente la forma con RGD es capaz de infectar y mostrar un efecto citopático (Fig. 23). Asimismo, en las RD se requiere una dosis 100 veces mayor del virus silvestre para obtener el mismo efecto que el Ad5-wtRGD (Fig. 21). Estos datos indican que existe una vía alterna de entrada, mas no demuestran qué tipo de

moléculas que podrían estar participando, por lo que se intentó demostrar de forma directa el papel de las integrinas mediante su inhibición por anticuerpos o péptidos solubles artificiales, pero ambos tratamientos provocaron el despegamiento y muerte de las células y no pudo ser comprobado. Sin embargo, está establecido que RGD es una secuencia consenso que se une a una gran variedad de integrinas ( $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 8\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ ,  $\alpha v\beta 6$ ,  $\alpha v\beta 8$ ,  $\alpha IIb\beta 3$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 7\beta 1$ ) (Ruoslahti, 1996) y asumimos que éstas son las involucradas en el proceso (Nemerow y Stewart, 1999).

### 3. La combinación de las dos estrategias

Con estos antecedentes, decidimos combinar las dos características: selectividad ( $\Delta 24$ ) e infectividad aumentada (RGD) en un solo virus y estudiar su capacidad citolítica. El DNA de los virus obtenidos fué analizado por PCR seguida de digestión enzimática y por secuenciación (Fig. 14 a 16). Estos fueron amplificados en células A549 o Saos-2, que carecen de material genético transcomplementario a la deleción  $\Delta 24$ . Es importante subrayar que no aparecieron adenovirus contaminantes con el gen E1 o fibra silvestres a lo largo de la propagación de Ad5- $\Delta 24$ RGD. Además de la corroboración estructural, se realizó un estudio funcional en relación a la capacidad de los virus de unirse a pRB. Los resultados de la inmunoprecipitación indican que la ausencia de la deleción  $\Delta 24$  inhibe esta interacción, mientras que el virus silvestre muestra claramente la presencia del complejo E1A-pRB (Fig. 19). Cabe mencionar que las formas de E1A con variación de la movilidad en el gel se ha observado previamente (Egan *et al.*, 1988; Barbeau *et al.*, 1992).

Primeramente se realizó el análisis temporal de la capacidad de replicación de los virus  $\Delta 24$ . Para ello se incubaron las células infectadas con dosis bajas de cada virus (0.01 pv/célula) en medio con BrdU. Este es un método de medición indirecta de la propagación a través de la incorporación del nucleótido durante la síntesis de DNA viral. A los días 2, 4, 6 y 8 después de la infección se recolectó solamente el material genético encapsidado (incorporado en la progenie viral) y las muestras fueron analizadas por la técnica de Southwestern-blot empleando un anticuerpo anti-BrdU. La propagación del Ad5- $\Delta 24$ RGD fué más eficiente que la del Ad5- $\Delta 24$  (Fig. 21).

En base al experimento previo, decidimos titular la cantidad de progenie viral de ambos virus *in vitro*. Para ello se infectaron células A549 con un virus no replicativo (AdLucRGD), Ad5- $\Delta$ 24 ó Ad5- $\Delta$ 24RGD y se midió la cantidad de virus generado a los 8 días después de la infección. No se obtuvo progenie viral a partir de las células infectadas por el vector control, mientras que Ad5- $\Delta$ 24RGD tuvo un rendimiento de 43 veces el del virus Ad5- $\Delta$ 24. Todos estos resultados conducen a la conclusión de que la modificación genética de la fibra con el motivo RGD incrementa la infección y la reproducción del adenovirus.

Posteriormente, fue estudiada la traducción de este fenómeno a la destrucción de células tumorales. Las monocapas celulares fueron infectadas con los diferentes virus mutantes y la capacidad lítica se midió empleando una técnica colorimétrica basada en la bioreducción del reactivo XTT por las deshidrogenasas presentes en las células vivas. La conclusión obtenida a partir de los resultados fue que la incorporación de RGD en la fibra incrementa la capacidad lítica del adenovirus. El efecto varía en cada célula dependiendo de la combinación de integrinas y CAR expresadas. En las LNCaP, que tienen bajos niveles de  $\alpha\beta$ 3 (Zheng *et al.*, 1999) (tabla 3) la ventaja oncolítica no es tan grande. Sin embargo, como se observa en la Fig. 18 del experimento de transducción con AdLucRGD, las  $\alpha\beta$ 5 integrinas y probablemente otras integrinas expresadas por estas células como  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 y  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 (Rokhlin y Cohen, 1995) ayudan la entrada del Ad5- $\Delta$ 24RGD cuando se administra a dosis baja pero estos receptores se saturan rápidamente y no hay diferencias a dosis altas. En el caso de A549, que expresa CAR, la presencia de  $\alpha\beta$ 5 en un nivel extremadamente alto contribuye al incremento del efecto.

Un aspecto de interés es que la densidad de las células en el cultivo parece estar relacionado con la unión del adenovirus a algunas moléculas de superficie como los glucosaminoglucanos derivados del heparán sulfato en donde a menor confluencia, la interacción virus-célula aumenta (Dechecchi *et al.*, 2001). Además está descrito que la expresión de CAR varía según la densidad del cultivo (Carson *et al.*, 1999) y observaciones realizadas en nuestro laboratorio indican que podría existir tal efecto (Dr.

Toshiro Seki, comunicación personal). De modo que es un factor que se debe considerar durante los experimentos. En el presente trabajo las infecciones se realizaron a una confluencia común de 85-90% de las diferentes células y se considera que no han afectado los resultados.

#### 4. Cómo incrementar la potencia limitada

En la terapia génica convencional, en donde el objetivo es transducir células con genes heterólogos, los sitios elegidos más frecuentemente para la inserción de transgenes son E1 y E3 (Grunhaus y Horwitz, 1992). Hace algunos años se describió que una proteína codificada en el gen E3, posteriormente bautizada como proteína adenoviral mortal (ADP), que está involucrada en la lisis de la célula huésped y el escape de la progenie (Tollefson *et al.*, 1996a). Era evidente que ésta influiría de manera directa a la potencia oncolítica de los agentes empleados en la viroterapia. Este aspecto es de suma importancia en cuanto a que algunas estrategias actuales de terapia viral introducen genes "suicidas" (Freytag *et al.*, 1998; Wildner *et al.*, 1999) sustituyendo a E3 para incrementar la capacidad lítica de los adenovirus. Al inicio del presente proyecto, este elemento no había sido tomado en cuenta y con el fin de analizar el papel que desempeña este gen en nuestros virus, se elaboraron mutantes de Ad5- $\Delta$ 24 y Ad5- $\Delta$ 24RGD con y sin E3. Como representantes de los virus E3<sup>-</sup> se utilizaron virus con el gen de GFP introducido en el sitio E3, previa demostración de que la presencia del transgén no afecta la biología de los virus E3<sup>-</sup>.

Ya que la cuantificación de la carga viral que se libera al sobrenadante se ha considerado, recientemente, como una forma más fiel para valorar la potencia oncolítica de un adenovirus (Alemany *et al.*, 2000), se comparó a carga generada por Ad5- $\Delta$ 24/GFP con la producida por Ad5- $\Delta$ 24E3 y resultó que la presencia de E3 conduce al escape temprano (día 3 después de la infección) de la progenie y al incremento exponencial de virus en el medio (Fig. 26). Está demostrado que los adenovirus mutantes que carecen de ADP generan el mismo número de placas pero que el tamaño es más pequeño debido a la incapacidad de ruptura celular (Tollefson *et al.*, 1996), es decir, el efecto de E3 recae estrictamente sobre el proceso de

ruptura/salida de la progenie y no en la replicación por sí misma y el incremento de virus E3<sup>+</sup> se debe a que se liberan antes, infectan a su vez a células circundantes y continúan con ciclos líticos subsecuentes. Se realizaron los estudios *in vitro* en diferentes líneas celulares y se demostró la superioridad de los adenovirus que contienen E3 (Fig. 25). Y, a pesar de que la presencia de este gen tiene un peso predominante en la potencia oncolítica, el virus E3<sup>+</sup>/RGD<sup>+</sup> mostró una ligera ventaja sobre el E3<sup>+</sup>/RGD<sup>-</sup> ( $p < 0.01$  en A549,  $p < 0.02$  en Hs 766T y SKOV-3) (Fig. 25).

## 5. Los esferoides

En busca de un modelo *in vitro* que representase el crecimiento tridimensional y la organización de un tumor sólido de forma realista, se elaboraron esferoides multicelulares con la línea tumoral A549. Estas estructuras se pueden crear a partir de otras líneas celulares o de material primario y han sido empleadas en estudios de la biología de los tumores (Sutherland, 1988; Santini y Rainaldi, 1999), así como de diferentes terapias antineoplásicas (Fujiwara *et al.*, 1993; Kaaijk *et al.*, 1996; Kaaijk *et al.*, 1997). Está descrito que la expresión de integrinas disminuye en las células que conforman esferoides si se compara con las mismas en cultivo en monocapa, característica que se acerca más a la situación de tumores xenotrasplantados *in vivo* (Waleh *et al.*, 1994; Hauptmann *et al.*, 1995). Otros aspectos como la heterogeneidad de las células que los componen, del su estado de oxigenación, del pH, de la difusión de nutrientes, entre otros, hace de los esferoides un buen modelo para el estudio de la expansión de los virus replicativos Ad5-Δ24/GFP y Ad5-Δ24GFP/RGD en comparación con el AdGFP (no replicativo) de manera dinámica. Esto fue posible gracias a la fluorescencia que permite seguir el avance de la infección/transducción dentro de esferoides particulares sin la necesidad de procedimientos histopatológicos de fijación y tinción. Como se observa en la figura 28, 11 días después de la infección, AdGFP sólo transduce la capa más externa mientras que los virus Δ24 se expanden hacia el interior y la periferia se vuelve más difusa debido a la destrucción de las células que la componen (aunque ésta no es muy marcada debido a que estos virus carecen de E3 y fueron elegidos únicamente para la visualización del fenómeno *in situ*), pero los

agentes empleados en la clínica deberán ser E3<sup>+</sup> para asegurar la máxima eficacia de penetración y oncolisis.

Este modelo sigue siendo deficiente en cuanto a que el tamaño de los esferoides es de 250  $\mu\text{m}$  de diámetro en promedio. Los nódulos xenotransplantados en ratones alcanzan más de 1-cm y en los pacientes la masa es mucho mayor. El microambiente del tumor y las células que lo conforman son altamente heterogéneos. Una gran diferencia es la presencia de vasos sanguíneos. La infección de los esferoides ocurre de fuera hacia dentro, mientras que en la clínica, los virus son administrados por inyección directa al centro o en varios puntos estratégicos localizados en el interior del tumor, si es que el tumor es accesible (Simons y Henderson, 1998; Ganly *et al.*, 2000) y de no serlo, la vía es sistémica (Nemunaitis *et al.*, 2001). De modo que para estudiar los virus en relación a estos aspectos es necesario el modelo animal. Sin embargo, los datos obtenidos a partir de la infección de esferoides son valiosos ya que permitieron demostrar la penetración del virus replicativo en una estructura sólida tridimensional.

Otro modelo *in vitro* que ha sido empleado con éxito es el cultivo organotípico. Este se origina de especímenes tumorales o no tumorales que se cultivan sobre estructuras de soporte cubiertas o impregnadas con proteínas de la ECM y que mantienen el crecimiento, diferenciación y arquitectura de los tejidos originales. La elección del modelo tridimensional dependerá del tipo histopatológico del tumor en estudio. El cultivo organotípico es ideal para el estudio de tumores epiteliales (Balague *et al.*, 2001; Boxman *et al.*, 2001; Hansson *et al.*, 2001).

## 6. El modelo animal

Dentro de la oncología, los modelos murinos se emplean para estudiar los mecanismos y características del desarrollo tumoral, la metástasis, la inmunobiología del cáncer, entre otros aspectos. Sin embargo, uno de los objetivos más importantes es la predicción de la respuesta terapéutica en los pacientes. El xenotrasplante de líneas tumorales humanas a ratones inmunodeprimidos se ha empleado con este objetivo desde hace más de 30 años (Rygaard y Povlsen, 1969).

En el presente trabajo se eligieron ratones Ncr-nu/nu que tienen una displasia tímica y por consiguiente una carencia congénita de linfocitos T competentes (Pantelouris, 1968). Las funciones afectadas incluyen la relacionada con los TL CD4+, como la síntesis de anticuerpos y la hipersensibilidad retardada; las dependientes de CD8+, como la eliminación de células infectadas por virus o las malignas; o de ambos, como el rechazo de injertos; pero no son totalmente inmunodeficientes ya que tienen linfocitos B, además de células NK y macrófagos abundantes con reactividad elevada.

Ya que las células trasplantadas a ratones atímicos mantienen sus características genotípicas y fenotípicas, se considera uno de los modelos más cercanos a la situación real (Fidler, 1986). Sin embargo, no todas las células tumorales son capaces de generar nódulos en este animal (Sharkey y Fogh, 1984). De las líneas celulares que permitieron demostrar la superioridad oncolítica del Ad5- $\Delta$ 24RGD *in vitro*, se eligió la línea tumoral A549 por su alta capacidad de implantación subcutánea (90-93%) (Topley *et al.*, 1993).

Con el fin de demostrar *in vivo* la superioridad oncolítica de los adenovirus condicionalmente replicativos con infectividad aumentada, se elaboraron los nódulos cancerosos como se describe en la sección de "Material y Métodos" y se trataron con la inyección intratumoral de  $10^9$  pv en una sola aplicación. La gráfica de crecimiento tumoral indica que, a esta dosis, los virus replicativos son igualmente efectivos en detener la proliferación tumoral después de 32 días de la inyección, e incluso en algunos casos, destruirla por completo (Ad5- $\Delta$ 24,  $p < 0.05$ ; Ad5- $\Delta$ 24RGD,  $p < 0.01$  comparado con el grupo tratado con PBS) (Fig. A). Cuando se bajó la dosis a  $10^7$  pv, se evidenció la superioridad del Ad5- $\Delta$ 24RGD (Ad5- $\Delta$ 24RGD vs PBS,  $p < 0.01$ ; Ad5- $\Delta$ 24RGD vs Ad5- $\Delta$ 24,  $p < 0.05$ ) (Fig. 29B). Es decir que, incluso un virus menos potente (Ad5- $\Delta$ 24) es capaz de ejercer un efecto antineoplásico al ser administrado en cantidades altas. Otros investigadores emplean esquemas de administración múltiple (Shinoura *et al.*, 1999; Heise *et al.*, 2000; Rogulski *et al.*, 2000). Sin embargo, el adenovirus administrado en cantidades altas es hepatotóxico, por lo que se busca emplear las cantidades más bajas posibles sin perder la eficacia. Los resultados

señalan que esto es posible con el virus RGD ya que el inóculo inicial, aunque pequeño, produciría de manera local un incremento exponencial de la progenie y de células tumorales muertas que puede incluso extenderse al tumor completo. Además, la comparación del efecto oncolítico en relación con el gen E3 mostró que los mutantes que lo poseen son más efectivos que los que lo carecen (Fig. 30). Para demostrar la presencia de progenie en el tejido tumoral, muestras histológicas tomadas al final de los experimentos se analizaron con un anticuerpo específico contra el hexón como primario y otro secundario conjugado con un fluorocromo verde. Las muestras pertenecientes a los grupos tratados con los adenovirus condicionalmente replicativos fueron positivos a la detección inmunológica. La intensidad de la señal fué variable, en general mayor para los virus E3<sup>+</sup>. La ausencia de virus en los tumores tratados con el Ad5lucRGD (no replicativo) junto con el tiempo transcurrido desde la inyección nos llevó a la conclusión de que la señal pertenece a la progenie del virus inoculado (Fig. 29C) y a la hipótesis de que la reducción de la masa tumoral se debía a la presencia de adenovirus en propagación activa.

Para corroborar este último punto, se repitió el experimento de inyección intratumoral con  $10^7$  pv y los nódulos ( $n = 3$ ) se recolectaron a intervalos de 3 días durante 9 días para analizar la cantidad total de virus presente (Fig. 31). El título mostró una tendencia ascendente en los adenovirus E3<sup>-</sup>; pero estática o incluso ligeramente descendente en los E3<sup>+</sup>. No hay diferencias estadísticamente significativas en cuanto al tamaño, ya que en este experimento se eligieron específicamente puntos en la fase temprana de la curva de crecimiento de los tumores (Fig. 31B) para evitar nódulos con material necrótico en donde el virus no replica. El tamaño presentó una relación inversa con el título; es decir, a menor título mayor masa y viceversa. Se piensa que, el hecho de que la cantidad de virus no incrementó en los tumores tratados con los virus E3<sup>+</sup> puede deberse a que las células van muriendo sucesivamente, se pierde el sustrato en donde replicar y se llega a un estado de "equilibrio dinámico" entre las proliferación del virus y de la viabilidad de las células cancerosas. Mientras que en las E3<sup>-</sup>, la velocidad de reproducción celular es mayor que la del virus y hay un acceso continuo al huésped. Este fenómeno se ha observado también *in vitro* por otros investigadores (Dr. Nettelbeck, comunicación personal).

## 7. Tratamiento sistémico

La vía de administración de los adenovirus replicativos se escoge dependiendo de la localización de la neoplasia. La administración intratumoral es posible en casos como el cáncer de próstata (DeWeese *et al.*, 2001), de cabeza y cuello (Nemunaitis *et al.*, 2001) o en glioblastoma (Trask *et al.*, 2000) o intraperitoneal como en el de ovario (Vasey *et al.*, 2002); sin embargo, muchos tipos tumorales son inaccesibles al igual que las metástasis en cuyo caso la vía sistémica se convierte en la única ruta con posibilidades de alcanzar los tumores (Reid, 2001). Es por ello que se estudió la efectividad oncolítica de los virus  $\Delta 24$  ( $5 \times 10^8$  pv) inyectados al torrente sanguíneo en dos días consecutivos (Fig. 32). Desafortunadamente, el tratamiento sistémico mostró baja eficacia, lo que concuerda con los resultados de algunos investigadores (Heise *et al.*, 1997), pero otros han demostrado la remisión de tumores empleando el modelo de xenotrasplante subcutáneo (Yu *et al.*, 1999). En nuestro caso, la curva de crecimiento de los tumores es ascendente en todos los grupos y, aunque la pendiente es menor en el tratado con Ad5- $\Delta 24$ RGD, no se observó eficacia oncolítica. Esto ha llevado a otros investigadores a combinar la viroterapia con otros tratamientos convencionales (Freytag *et al.*, 1998; Heise *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2001). Las razones de la ineficiencia del adenovirus administrado por vía sistémica son varias: la diferencia de expresión del receptor CAR entre los órganos, las barreras físicas y la inmunología. Cuando se inyecta un adenovirus por la vena dorsal de la cola es secuestrado de las células diana (tumorales) bajas en CAR por otros tejidos "no-diana" con alto CAR como el hígado (Kass-Eisler *et al.*, 1994; Fehner *et al.*, 1999). La modificación de la fibra con el motivo RGD provoca una redistribución hacia el bazo, pulmón y riñón (Reynolds *et al.*, 1999) pero no se ha observado la dirección hacia los tumores. Recientemente se ha demostrado que para reducir el hepatotropismo natural del adenovirus es necesario abolir la unión a CAR y a las integrinas  $\alpha v$  (Einfeld *et al.*, 2001) y en combinación con la modificación de la fibra con ligandos específicos, la infección se podría ver completamente redirigida. Se han diseñado diferentes estrategias para modificar el tropismo como la conjugación de moléculas proteicas a la fibra como el folato o el factor de crecimiento de fibroblastos (Douglas *et al.*, 1996; Goldman *et al.*, 1997) o no proteicas como polilisina (Wickham *et al.*, 1996) y la unión de anticuerpos biespecíficos

(dímero de anticuerpos formado por uno que se una a la fibra y otro al receptor) (Wickham *et al.*, 1996). Sin embargo, las interacciones entre la fibra y los ligandos no son covalentes en estas técnicas, lo que hace que el complejo sea inestable y menos aplicable desde el punto de vista clínico.

En cuanto a las barreras físicas, desde la anatomía irregular de los vasos que irrigan a los tumores, hasta la composición y organización de la matriz extracelular, actúan en contra del transporte intersticial de macromoléculas incluyendo al adenovirus (Fechner *et al.*, 1999; Netti *et al.*, 2000). Se han inyectado proteinasas como la colagenasa o la trispina antes del tratamiento viral con el fin de incrementar la difusión intratumoral (Kuriyama *et al.*, 2000). Otros métodos como la administración del factor de crecimiento del endotelio vascular (Monsky *et al.*, 1999), sustancias vasoactivas, citoquinas, radiación o calor también podrían ser empleadas con este fin (Alemany *et al.*, 2000).

## **8. Cómo incrementar la carga viral al tumor: relación con la respuesta inmune inespecífica**

Sin duda, la respuesta inmune del huésped es el mayor obstáculo a superar en la viroterapia del cáncer. Como ya se ha mencionado, más del 90% del adenovirus es capturado por el hígado en su primer paso cuando es administrado por vía sistémica y una vez dentro de este órgano, se dirige a diferentes células como las hepáticas, estelares, endoteliales y KC (Davern *et al.*, 1999). El potencial fagocítico de las KC es muy alto y han sido responsabilizadas de la degradación del DNA viral que ocurre localmente en las primeras 24 horas después de la inyección en la vena (Steffan, 1997; Worgall *et al.*, 1997). Además se ha visto que el índice de fagocitosis de carbón coloidal por este tipo celular se reduce al 50% después de la administración intravenosa de virus (Gut J.P., datos no publicados mencionado en Kirn *et al.*, 1982).

En este trabajo, adenovirus y partículas de látex se conjugaron con fluorocromos diferentes, se inyectaron por la vena dorsal de la cola y se demostró su co-localización en las KC dando una apariencia irregular dentro del hígado (Fig. 33). Aunque están

más concentradas en el área periportal, estas células se distribuyen en todo el parénquima y las imágenes obtenidas concuerdan con esta descripción histológica (Gumucio *et al.*, 1994). Por otro lado, hay estudios que demuestran que la depleción de los macrófagos en el tejido blanco incrementa la transducción mediada por adenovirus (Wolff *et al.*, 1997). Algunas de las sustancias empleadas para depletar macrófagos son el dióxido de torio (Brunner *et al.*, 1960), el silicio (Zisman *et al.*, 1971), el cloruro de gadolinio ( $GdCl_3$ ) (Lieber *et al.*, 1997) y los liposomas que contienen bifosfonato de diclorometileno (Van Rooijen *et al.*, 1990; Wolff *et al.*, 1997), propamidina, EDTA (Van Rooijen y Sanders, 1996) o doxorubicina (Tao *et al.*, 2001). En este proyecto se eligió el  $GdCl_3$  por su estabilidad y porque es una sal que sólo requiere de disolución para ser usado directamente. Al bloquear las KC, la localización del adenovirus fue más regular, mostrando un gradiente hacia las células que rodean la vena centrolobulillar (Fig. 33D). Se sabe que el lobulillo hepático se divide en zonas con diferencias en la composición celular, función y de expresión genética (Gumucio *et al.*, 1994), lo cual podría explicar este patrón si se asume que células con niveles más altos de CAR se distribuyen en la misma zona, pero esto no ha sido estudiado.

Una vez demostrado que son atrapados por las KC, la siguiente pregunta fue si el bloqueo de éstas tendría un efecto en la permanencia del adenovirus en la circulación. Para responderla, se inyectaron  $10^{10}$  unidades de transducción de AdGFP en la vena cava inferior y se colectó sangre a partir de la cola a diferentes intervalos en el transcurso una hora. La depuración del virus en el ratón normal es sumamente rápida y solamente el 10% de la dosis administrada está presente en el primer minuto. El descenso sigue hasta que a los 30 minutos el virus desaparece por completo (Fig. 34). El tratamiento con  $GdCl_3$  incrementó el tiempo de circulación y tomó 10 minutos para que disminuyera a 10% y aún después de una hora fue posible detectar virus en el torrente sanguíneo. Dado que el adenovirus circula por más tiempo, el  $GdCl_3$  podría incrementar la carga viral que llega el tumor. Se administraron los virus replicativos en el modelo de xenotrasplante subcutáneo en ratones con y sin bloqueo de las KC. Desgraciadamente, se observó un crecimiento en todos los nódulos. El grupo tratado con el Ad5- $\Delta$ 24RGD fue el que mostró crecimiento más lento y la combinación con  $GdCl_3$ , a diferencia de lo esperado, actuó en contra del efecto oncolítico del virus

provocando un crecimiento similar al del grupo control. Una posible explicación es que el  $GdCl_3$  además de ser empleado como bloqueador de KC, se aplica para la disminuir el rechazo del tejido xenogénico y prolongar su permanencia en modelos murinos (Lazar *et al.*, 1997). Pudiera ser que el efecto "protector" del  $GdCl_3$  en este experimento inclinase la balanza hacia el desarrollo del tumor y la dosis de adenovirus administrada no fue suficiente para contrarrestarlo (Fig. 36). Otra alternativa es que los macrófagos secreten sustancias inmunomoduladoras (supresivas en este caso, como prostaglandina o interferón) y ante la ausencia de éstas, la respuesta inmune aumenta de modo que la cantidad de virus administrada puede ser anulada. Los modelos animales empleados hasta ahora utilizan roedores inmunodeficientes que toleran tanto el xenotrasplante de células tumorales humanas como la presencia del virus, lo que dificulta la evaluación de la interacción del sistema inmune, el tumor y el adenovirus replicativo.

En resumen, se ha conseguido mejorar un adenovirus de replicación selectiva (Ad5- $\Delta$ 24) aumentando su capacidad oncolítica y demostrando la funcionalidad de sus componentes. A raíz de este trabajo se han iniciado nuevos estudios de eficacia y combinaciones terapéuticas que han sido fruto de diversas publicaciones y trabajos postdoctorales (Cripe *et al.*, 2001; Bauerschmitz *et al.*, 2002). Es de destacar que el virus oncolítico aquí generado está en vías de aprobación por la Administración de Alimentos y Fármacos (Food and Drug Administration, FDA) de los Estados Unidos para su aplicación al tratamiento experimental de glioblastomas (Juan Fueyo, M.D. Anderson Cancer Center; Jacques Grill, Universidad Libre de Amsterdam) y carcinomas de ovario (David T. Curiel, Universidad de Alabama en Birmingham).

## CONCLUSIONES

---

1. El adenovirus con capacidad de replicación condicionada Ad5- $\Delta$ 24 muestra eficiencia antitumoral *in vitro* e *in vivo* basada en el ciclo vital lítico del organismo.
2. La adición del tripéptido RGD en la fibra de este adenovirus incrementa la capacidad de infección y en consecuencia, la potencia oncolítica *in vitro* e *in vivo*.
3. La presencia/conservación del gen E3 proporciona mayor eficiencia a la oncolisis *in vitro* e *in vivo*.
4. La vía de administración intratumoral muestra eficacia oncolítica, mas no la inyección sistémica.
5. Es posible alterar la farmacocinética del adenovirus inyectado por vía sistémica a través de la manipulación de la respuesta inmune inespecífica inicial pero no incrementa la carga terapéutica al tumor.

## **BIBLIOGRAFIA**

---

- Akama, Y., W. Yasui, et al. (1995). Frequent amplification of the cyclin E gene in human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 86(7): 617-21.
- Albelda, S. M., S. A. Mette, et al. (1990). Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res* 50(20): 6757-64.
- Alemaný, R. (2001). Terapia génica del cáncer: nuevos abordajes en terapia génica adenoviral. *Oncología* 24(6): 324-335.
- Alemaný, R., C. Balague, et al. (2000). Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol* 18(7): 723-7.
- Allan, K., R. C. Jordan, et al. (2000). Overexpression of cyclin A and cyclin B1 proteins in astrocytomas. *Arch Pathol Lab Med* 124(2): 216-20.
- An, H.-X., M. W. Beckmann, et al. (1999). Gene Amplification and Overexpression of CDK4 in Sporadic Breast Carcinomas Is Associated with High Tumor Cell Proliferation. *Am J Pathol* 154(1): 113-118.
- Andrade, F., H. G. Bull, et al. (2001). Adenovirus L4-100K Assembly Protein Is a Granzyme B Substrate that Potently Inhibits Granzyme B-Mediated Cell Death. *Immunity* 14(6): 751-61.
- Andreansky, S., B. He, et al. (1998). Treatment of intracranial gliomas in immunocompetent mice using herpes simplex viruses that express murine interleukins. *Gene Ther* 5(1): 121-30.
- Arnberg, N., A. H. Kidd, et al. (2000). Initial interactions of subgenus D adenoviruses with A549 cellular receptors: sialic acid versus alpha(v) integrins. *J Virol* 74(16): 7691-3.
- Arnold, A., T. Motokura, et al. (1992). PRAD1 (cyclin D1): a parathyroid neoplasia gene on 11q13. *Henry Ford Hosp Med J* 40(3-4): 177-80.
- Asaoka, K., M. Tada, et al. (2000). Dependence of efficient adenoviral gene delivery in malignant glioma cells on the expression levels of the Coxsackievirus and adenovirus receptor. *J Neurosurg* 92(6): 1002-8.
- Babiss, L. E., H. S. Ginsberg, et al. (1985). Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol Cell Biol* 5(10): 2552-8.
- Bachenheimer, S. y J. E. Darnell (1975). Adenovirus-2 mRNA is transcribed as part of a high-molecular-weight precursor RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(11): 4445-9.
- Bagchi, S., P. Raychaudhuri, et al. (1990). Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell* 62(4): 659-69.
- Balague, C., F. Noya, et al. (2001). Human papillomavirus E6E7-mediated adenovirus cell killing: selectivity of mutant adenovirus replication in organotypic cultures of human keratinocytes. *J Virol* 75(16): 7602-11.
- Balmain, A. (2001). Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nature Rev Cancer* 1(1): 77-82.
- Bandara, L. R. y N. B. La Thangue (1991). Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature* 351(6326): 494-7.
- Barbeau, D., R. C. Marcellus, et al. (1992). Quantitative analysis of regions of adenovirus E1A products involved in interactions with cellular proteins. *Biochem Cell Biol* 70(10-11): 1123-34.
- Bartkova, J., M. Thullberg, et al. (2000). Cell cycle regulators in testicular cancer: loss of p18INK4C marks progression from carcinoma in situ to invasive germ cell tumours. *Int J Cancer* 85(3): 370-5.
- Bates, S., L. Bonetta, et al. (1994). CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1. *Oncogene* 9(1): 71-9.

- Bauerschmitz, G. J., J. T. Lam, et al. (2002). Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus. *Cancer Res* 62(5): 1266-70.
- Bergelson, J. M., J. A. Cunningham, et al. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275(5304): 1320-3.
- Bischoff, J. R., D. H. Kirn, et al. (1996). An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 274(5286): 373-6.
- Blake, M. C. y J. C. Azizkhan (1989). Transcription factor E2F is required for efficient expression of the hamster dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 9(11): 4994-5002.
- Bodmer, S., D. Huber, et al. (1991). Human glioblastoma cell derived transforming growth factor-beta 2: evidence for secretion of both high and low molecular weight biologically active forms. *J Neuroimmunol* 34(1): 33-42.
- Bookstein, R., J. Y. Shew, et al. (1990). Suppression of tumorigenicity of human prostate carcinoma cells by replacing a mutated RB gene. *Science* 247(4943): 712-5.
- Boulanger, P. A. y G. E. Blair (1991). Expression and interactions of human adenovirus oncoproteins. *Biochem J* 275(Pt 2): 281-99.
- Boxman, I. L., L. H. Mulder, et al. (2001). Transduction of the E6 and E7 genes of epidermodysplasia- verruciformis-associated human papillomaviruses alters human keratinocyte growth and differentiation in organotypic cultures. *J Invest Dermatol* 117(6): 1397-404.
- Bridge, E., S. Medghalchi, et al. (1993). Adenovirus early region 4 and viral DNA synthesis. *Virology* 193(2): 794-801.
- Brunner, K. T., D. Hurez, et al. (1960). Blood clearance of p32-labeled vesicular stomatitis and Newcastle disease viruses by the reticuloendothelial system in mice. *Journal of Immunology* 85: 99-104.
- Buchkovich, K., L. A. Duffy, et al. (1989). The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 58(6): 1097-105.
- Buckley, M. F., K. J. Sweeney, et al. (1993). Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene* 8(8): 2127-33.
- Buschges, R., R. G. Weber, et al. (1999). Amplification and expression of cyclin D genes (CCND1, CCND2 and CCND3) in human malignant gliomas. *Brain Pathol* 9(3): 435-42; discussion 432-3.
- Cairns, P., T. J. Polascik, et al. (1995). Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nat Genet* 11(2): 210-2.
- Calabretta, B., R. B. Sims, et al. (1991). Normal and leukemic hematopoietic cells manifest differential sensitivity to inhibitory effects of c-myc antisense oligodeoxynucleotides: an in vitro study relevant to bone marrow purging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(6): 2351-5.
- Caldas, C., S. A. Hahn, et al. (1994). Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 8(1): 27-32.
- Carson, S. D., J. T. Hobbs, et al. (1999). Expression of the coxsackievirus and adenovirus receptor in cultured human umbilical vein endothelial cells: regulation in response to cell density. *J Virol* 73(8): 7077-9.
- Cassel, W. A. y R. E. Garrett (1967). Relationship between viral neurotropism and oncolysis. I. Study of vaccinia virus. *Cancer* 20(3): 433-9.
- Chardonnet, Y. y S. Dales (1970). Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. I. Penetration of type 5 and intracellular release of the DNA genome. *Virology* 40: 478-485.
- Chartier, C., E. Degryse, et al. (1996). Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in Escherichia coli. *J Virol* 70(7): 4805-10.

- Chaubert, P., L. Guillou, et al. (1997). Frequent p16INK4 (MTS1) gene inactivation in testicular germ cell tumors. *Am J Pathol* 151(3): 859-65.
- Chaum, E., R. M. Ellsworth, et al. (1984). Cytogenetic analysis of retinoblastoma: evidence for multifocal origin and in vivo gene amplification. *Cytogenet Cell Genet* 38(2): 82-91.
- Chellappan, S., V. B. Kraus, et al. (1992). Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10): 4549-53.
- Chellappan, S. P., S. Hiebert, et al. (1991). The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65(6): 1053-61.
- Chen, C. y H. Okayama (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7(8): 2745-52.
- Chen, C. A. y H. Okayama (1988). Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6(7): 632-8.
- Chen, S. H., H. D. Shine, et al. (1994). Gene therapy for brain tumors: regression of experimental gliomas by adenovirus-mediated gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8): 3054-7.
- Cheng, J. Q., S. C. Jhanwar, et al. (1994). p16 alterations and deletion mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma. *Cancer Res* 54(21): 5547-51.
- Chittenden, T., D. M. Livingston, et al. (1991). The T/E1A-binding domain of the retinoblastoma product can interact selectively with a sequence-specific DNA-binding protein. *Cell* 65(6): 1073-82.
- Chiu, C. Y., P. Mathias, et al. (1999). Structure of adenovirus complexed with its internalization receptor, alphavbeta5 integrin. *J Virol* 73(8): 6759-68.
- Chung, I., P. E. Schwartz, et al. (1999). Use of L-plastin promoter to develop an adenoviral system that confers transgene expression in ovarian cancer cells but not in normal mesothelial cells. *Cancer Gene Ther* 6(2): 99-106.
- Cipriano, S. C., L. Chen, et al. (2001). Inhibin and p27 interact to regulate gonadal tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 15(6): 985-96.
- Clark, P. R., A. T. Stopeck, et al. (1999). Polycations and cationic lipids enhance adenovirus transduction and transgene expression in tumor cells. *Cancer Gene Ther* 6(5): 437-46.
- Cobrinik, D., P. Whyte, et al. (1993). Cell cycle-specific association of E2F with the p130 E1A-binding protein. *Genes Dev* 7(12A): 2392-404.
- Coffey, M. C., J. E. Strong, et al. (1998). Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway [see comments]. *Science* 282(5392): 1332-4.
- Cohen, C. J., J. T. Shieh, et al. (2001). The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26): 15191-6.
- Cornelis, J. J., P. Becquart, et al. (1988). Transformation of human fibroblasts by ionizing radiation, a chemical carcinogen, or simian virus 40 correlates with an increase in susceptibility to the autonomous parvoviruses H-1 virus and minute virus of mice. *J Virol* 62(5): 1679-86.
- Cornelis, J. J., Y. Q. Chen, et al. (1990). Susceptibility of human cells to killing by the parvoviruses H-1 and minute virus of mice correlates with viral transcription. *J Virol* 64(6): 2537-44.
- Coukos, G., A. Makrigiannakis, et al. (2000). Multi-attenuated herpes simplex virus-1 mutant G207 exerts cytotoxicity against epithelial ovarian cancer but not normal mesothelium and is suitable for intraperitoneal oncolytic therapy. *Cancer Gene Ther* 7(2): 275-83.
- Cripe, T. P., E. J. Dunphy, et al. (2001). Fiber knob modifications overcome low, heterogeneous expression of the coxsackievirus-adenovirus receptor that limits adenovirus gene transfer and oncolysis for human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res* 61(7): 2953-60.

- Curiel, D. T. (2000). The development of conditionally replicative adenoviruses for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 6(9): 3395-9.
- Dales, S. y Y. Chardonnet (1973). Early events in the interaction of adenovirus with HeLa cells. IV. Association with microtubules and the nuclear pore complex during vectorial movement in the inoculum. *Virology* 56: 465-483.
- Datta, M. W., A. A. Renshaw, et al. (2000). Evaluation of cyclin expression in testicular germ cell tumors: cyclin E correlates with tumor type, advanced clinical stage, and pulmonary metastasis. *Mod Pathol* 13(6): 667-72.
- Davern, T. J., A. M. Sevcik, et al. (1999). In vivo adenoviral vector-mediated gene delivery to non-parenchymal cells of the liver. *Hepatology* 30(4 Pt. 2): 490A.
- Davison, E., R. M. Diaz, et al. (1997). Integrin alpha5beta1-mediated adenovirus infection is enhanced by the integrin-activating antibody TS2/16. *J Virol* 71(8): 6204-7.
- Dechecchi, M. C., P. Melotti, et al. (2001). Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 and 5. *J Virol* 75(18): 8772-80.
- Dechecchi, M. C., A. Tamanini, et al. (2000). Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 and 2-host cell interactions. *Virology* 268(2): 382-90.
- Del Pizzo, J. J., A. Borkowski, et al. (1999). Loss of cell cycle regulators p27(Kip1) and cyclin E in transitional cell carcinoma of the bladder correlates with tumor grade and patient survival. *Am J Pathol* 155(4): 1129-36.
- Delmer, A., R. Tang, et al. (1995). Alterations of cyclin-dependent kinase 4 inhibitor (p16INK4A/MTS1) gene structure and expression in acute lymphoblastic leukemias. *Leukemia* 9(7): 1240-5.
- DePace, N. (1912). Sulla scomparsa di un enorme cancro vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica. *Ginecologia* 9: 82-89.
- Deshane, J., F. Loechel, et al. (1994). Intracellular single-chain antibody directed against erbB2 down-regulates cell surface erbB2 and exhibits a selective anti-proliferative effect in erbB2 overexpressing cancer cell lines. *Gene Ther* 1(5): 332-7.
- DeWeese, T. L., H. van der Poel, et al. (2001). A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy. *Cancer Res* 61(20): 7464-72.
- Dmitriev, I., V. Krasnykh, et al. (1998). An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism. *J Virol* 72(12): 9706-13.
- Dock, G. (1904). Influence of complicating diseases upon leukaemia. *Am J Med Sci* 127: 563-592.
- Doronin, K., K. Toth, et al. (2000). Tumor-specific, replication-competent adenovirus vectors overexpressing the adenovirus death protein. *J Virol* 74(13): 6147-55.
- Douglas, J. T., B. E. Rogers, et al. (1996). Targeted gene delivery by tropism-modified adenoviral vectors. *Nat Biotechnol* 14(11): 1574-8.
- Dupressoir, T., J. M. Vanacker, et al. (1989). Inhibition by parvovirus H-1 of the formation of tumors in nude mice and colonies in vitro by transformed human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 49(12): 3203-8.
- Eaton, M. D., J. D. Levinthal, et al. (1967). Contribution of antiviral immunity to oncolysis by Newcastle disease virus in a murine lymphoma. *J Natl Cancer Inst* 39(6): 1089-97.
- Egan, C., T. N. Jelsma, et al. (1988). Mapping of cellular protein-binding sites on the products of early-region 1A of human adenovirus type 5. *Mol Cell Biol* 8(9): 3955-9.
- Einfeld, D. A., R. Schroeder, et al. (2001). Reducing the native tropism of adenovirus vectors requires removal of both CAR and integrin interactions. *J Virol* 75(23): 11284-91.

- Elledge, S. J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274(5293): 1664-72.
- Erlanson, M., C. Portin, et al. (1998). Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas-prognostic implications. *Blood* 92(3): 770-7.
- Faisst, S., D. Guittard, et al. (1998). Dose-dependent regression of HeLa cell-derived tumours in SCID mice after parvovirus H-1 infection. *Int J Cancer* 75(4): 584-9.
- Fearon, E. R., T. Itaya, et al. (1988). Induction in a murine tumor of immunogenic tumor variants by transfection with a foreign gene. *Cancer Res* 48(11): 2975-80.
- Fechner, H., A. Haack, et al. (1999). Expression of Coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther* 6(9): 1520-1535.
- Fidler, I. J. (1986). Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 5(1): 29-49.
- Foster, J. R. (2000). Cell death and cell proliferation in the control of normal and neoplastic tissue growth. *Toxicol Pathol* 28(3): 441-6.
- Freytag, S. O., K. R. Rogulski, et al. (1998). A novel three-pronged approach to kill cancer cells selectively: concomitant viral, double suicide gene, and radiotherapy [see comments]. *Hum Gene Ther* 9(9): 1323-33.
- Fromm, J. R., R. E. Hileman, et al. (1995). Differences in the interaction of heparin with arginine and lysine and the importance of these basic amino acids in the binding of heparin to acidic fibroblast growth factor. *Arch Biochem Biophys* 323(2): 279-87.
- Fueyo, J., C. Gomez-Manzano, et al. (2000). A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene* 19(1): 2-12.
- Fujiwara, T., E. A. Grimm, et al. (1993). A retroviral wild-type p53 expression vector penetrates human lung cancer spheroids and inhibits growth by inducing apoptosis. *Cancer Res* 53(18): 4129-33.
- Fujiwara, T., E. A. Grimm, et al. (1994). Induction of chemosensitivity in human lung cancer cells in vivo by adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene. *Cancer Res* 54(9): 2287-91.
- Furihata, M., Y. Ohtsuki, et al. (1997). Cyclin A overexpression in carcinoma of the renal pelvis and ureter including dysplasia: immunohistochemical findings in relation to prognosis. *Clin Cancer Res* 3(8): 1399-404.
- Furukawa, Y., J. A. DeCaprio, et al. (1991). Heterogeneous expression of the product of the retinoblastoma susceptibility gene in primary human leukemia cells. *Oncogene* 6(8): 1343-6.
- Ganly, I., S. G. Eckhardt, et al. (2000). A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer [published erratum appears in Clin Cancer Res 2000 May;6(5):2120]. *Clin Cancer Res* 6(3): 798-806.
- Ganly, I., Y. T. Kim, et al. (2001). Replication and cytolysis of an E1B-attenuated adenovirus in drug-resistant ovarian tumour cells is associated with reduced apoptosis. *Gene Therapy* 8: 369-375.
- Garrido, F., F. Ruiz-Cabello, et al. (1997). Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 18(2): 89-95.
- Geradts, J. y P. A. Wilson (1996). High frequency of aberrant p16(INK4A) expression in human breast cancer. *Am J Pathol* 149(1): 15-20.
- Ginsberg, H. S., L. L. Moldawer, et al. (1991). A mouse model for investigating the molecular pathogenesis of adenovirus pneumonia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(5): 1651-5.
- Gladson, C. L. (1996). Expression of integrin alpha v beta 3 in small blood vessels of glioblastoma tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 55(11): 1143-9.

- Gladson, C. L. y D. A. Cheresh (1991). Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J Clin Invest* 88(6): 1924-32.
- Goldman, C. K., B. E. Rogers, et al. (1997). Targeted gene delivery to Kaposi's sarcoma cells via the fibroblast growth factor receptor. *Cancer Res* 57(8): 1447-51.
- Gombart, A. F., R. Morosetti, et al. (1995). Deletions of the cyclin-dependent kinase inhibitor genes p16INK4A and p15INK4B in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 86(4): 1534-9.
- Gooding, L. R. (1994). Regulation of TNF-mediated cell death and inflammation by human adenoviruses. *Infect Agents Dis* 3(2-3): 106-15.
- Gooding, L. R., L. W. Elmore, et al. (1988). A 14,700 MW protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytolysis by tumor necrosis factor. *Cell* 53(3): 341-6.
- Gooding, L. R., T. S. Ranheim, et al. (1991). The 10,400- and 14,500-dalton proteins encoded by region E3 of adenovirus function together to protect many but not all mouse cell lines against lysis by tumor necrosis factor. *J Virol* 65(8): 4114-23.
- Goodrich, D. W., N. P. Wang, et al. (1991). The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 67: 293-302.
- Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology* 36: 59-72.
- Grill, J., V. W. Van Beusechem, et al. (2001). Combined targeting of adenoviruses to Integrins and epidermal growth factor receptors increases gene transfer into primary glioma cells and spheroids. *Clin Cancer Res* 7(3): 641-50.
- Grunhaus, A. y M. S. Horwitz (1992). Adenoviruses as cloning vectors. *Seminars in Virology* 3: 237-252.
- Guetta, E., D. Ron, et al. (1986). Development-dependent replication of minute virus of mice in differentiated mouse testicular cell lines. *J Gen Virol* 67(Pt 11): 2549-54.
- Gumucio, J. J., M. B. Bahri, et al. (1994). The biology of the liver cell plate. The Liver. Biology and Pathobiology. I. M. Arias. New York, Raven Press: 1143-1163.
- Halbert, D. N., J. R. Cutt, et al. (1985). Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA replication, late gene expression, and host cell shutoff. *J Virol* 56(1): 250-7.
- Hall, M. y G. Peters (1996). Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 68: 67-108.
- Hallenbeck, P. L., Y. N. Chang, et al. (1999). A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther* 10(10): 1721-33.
- Hangaishi, A., S. Ogawa, et al. (1996). Inactivation of multiple tumor-suppressor genes involved in negative regulation of the cell cycle, MTS1/p16INK4A/CDKN2, MTS2/p15INK4B, p53, and Rb genes in primary lymphoid malignancies. *Blood* 87(12): 4949-58.
- Hansson, A., B. K. Bloor, et al. (2001). Expression of keratins in normal, immortalized and malignant oral epithelia in organotypic culture. *Oral Oncol* 37(5): 419-30.
- Harlow, E., P. Whyte, et al. (1986). Association of adenovirus early-region 1A proteins with cellular polypeptides. *Mol Cell Biol* 6(5): 1579-89.
- Hasson, T. B., P. D. Soloway, et al. (1989). Adenovirus L1 52- and 55-kilodalton proteins are required for assembly of virions. *J Virol* 63(9): 3612-21.
- Hatta, Y., T. Hirama, et al. (1995). Homozygous deletions of the p15 (MTS2) and p16 (CDKN2/MTS1) genes in adult T-cell leukemia. *Blood* 85(10): 2699-704.
- Hauptmann, S., C. Denkert, et al. (1995). Integrin expression on colorectal tumor cells growing as monolayers, as multicellular tumor spheroids, or in nude mice. *Int J Cancer* 61(6): 819-25.

- Hay, R. T., A. Freeman, et al. (1995). Molecular interactions during adenovirus DNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol* 199(Pt 2): 31-48.
- Hayashi, H., T. Ito, et al. (2000). Reduced expression of p27/Kip1 is associated with the development of pulmonary adenocarcinoma. *J Pathol* 192(1): 26-31.
- He, J., J. R. Allen, et al. (1994). CDK4 amplification is an alternative mechanism to p16 gene homozygous deletion in glioma cell lines. *Cancer Res* 54(22): 5804-7.
- Hearing, P., R. J. Samulski, et al. (1987). Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *J Virol* 61(8): 2555-8.
- Hebert, J., J. M. Cayuela, et al. (1994). Candidate tumor-suppressor genes MTS1 (p16INK4A) and MTS2 (p15INK4B) display frequent homozygous deletions in primary cells from T- but not from B-cell lineage acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 84(12): 4038-44.
- Heise, C., T. Hermiston, et al. (2000). An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med* 6(10): 1134-1139.
- Heise, C. y D. H. Kirn (2000). Replication-selective adenoviruses as oncolytic agents. *J Clin Invest* 105(7): 847-51.
- Heise, C., M. Lemmon, et al. (2000). Efficacy with a replication-selective adenovirus plus cisplatin-based chemotherapy: dependence on sequencing but not p53 functional status or route of administration. *Clin Cancer Res* 6(12): 4908-14.
- Heise, C., A. Sampson-Johannes, et al. (1997). ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents [see comments]. *Nat Med* 3(6): 639-45.
- Helin, K., K. Holm, et al. (1997). Loss of the retinoblastoma protein-related p130 protein in small cell lung carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(13): 6933-8.
- Hemmi, S., R. Geertsens, et al. (1998). The presence of human coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures. *Hum Gene Ther* 9(16): 2363-73.
- Hensel, C. H., C. L. Hsieh, et al. (1990). Altered structure and expression of the human retinoblastoma susceptibility gene in small cell lung cancer. *Cancer Res* 50(10): 3067-72.
- Hiebert, S. W., M. Lipp, et al. (1989). E1A-dependent trans-activation of the human MYC promoter is mediated by the E2F factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(10): 3594-8.
- Hierholzer, J. C. (1973). Further subgrouping of the human adenoviruses by differential hemagglutination. *J Infect Dis* 128(4): 541-50 the above report in.
- Hijmans, E. M., P. M. Voorhoeve, et al. (1995). E2F-5, a new E2F family member that interacts with p130 in vivo. *Mol Cell Biol* 15(6): 3082-9.
- Hinds, P. W., S. Mittnacht, et al. (1992). Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* 70(6): 993-1006.
- Hirschowitz, E. A., A. Ohwada, et al. (1995). In vivo adenovirus-mediated gene transfer of the Escherichia coli cytosine deaminase gene to human colon carcinoma-derived tumors induces chemosensitivity to 5-fluorocytosine. *Hum Gene Ther* 6(8): 1055-63.
- Hodes, M. E., S. Morgan, et al. (1973). Tissue culture and animal studies with an oncolytic bovine enterovirus (bovine enterovirus 1). *Cancer Res* 33(10): 2408-14.
- Hong, S. S., L. Karayan, et al. (1997). Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *Embo J* 16(9): 2294-306.
- Horowitz, J. M., D. W. Yandell, et al. (1989). Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science* 243(4893): 937-40.

- Horwitz, M. S. (1996). Adenoviruses. *Fields Virology*. B. N. Fields, D. N. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, Lippincott-Raven: 2149-2171.
- Houldsworth, J., V. Reuter, et al. (1997). Aberrant expression of cyclin D2 is an early event in human male germ cell tumorigenesis. *Cell Growth Differ* 8(3): 293-9.
- Howe, J. A., G. W. Demers, et al. (2000). Evaluation of E1-mutant adenoviruses as conditionally replicating agents for cancer therapy. *Mol Ther* 2(5): 485-95.
- Huang, H. J., J. K. Yee, et al. (1988). Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science* 242(4885): 1563-6.
- Huang, M. M. y P. Hearing (1989). Adenovirus early region 4 encodes two gene products with redundant effects in lytic infection. *J Virol* 63(6): 2605-15.
- Huang, S., R. I. Endo, et al. (1995). Upregulation of integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 on human monocytes and T lymphocytes facilitates adenovirus-mediated gene delivery. *J Virol* 69(4): 2257-63.
- Huang, S., T. Kamata, et al. (1996). Adenovirus interaction with distinct integrins mediates separate events in cell entry and gene delivery to hematopoietic cells. *J Virol* 70(7): 4502-8 the above report in.
- Hunter, T. y J. Pines (1994). Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79(4): 573-82.
- Hussussian, C. J., J. P. Struewing, et al. (1994). Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 8(1): 15-21.
- Ikeda, K., T. Monden, et al. (1996). [Cyclin D, CDK4 and p16 expression in colorectal cancer]. *Nippon Rinsho* 54(4): 1054-9.
- Issing, W. J., T. P. Wustrow, et al. (1993). An association of the RB gene with osteosarcoma: molecular genetic evaluation of a case of hereditary retinoblastoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 250(5): 277-80.
- Ito, K., H. Sasano, et al. (1998). Immunohistochemical study of cyclins D and E and cyclin dependent kinase (cdk) 2 and 4 in human endometrial carcinoma. *Anticancer Res* 18(3A): 1661-4.
- Jen, J., J. W. Harper, et al. (1994). Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res* 54(24): 6353-8.
- Jiang, W., S. M. Kahn, et al. (1992). Amplification and expression of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer Res* 52(10): 2980-3.
- Kaaijk, P., D. Troost, et al. (1996). Daunorubicin and doxorubicin but not BCNU have deleterious effects on organotypic multicellular spheroids of gliomas. *Br J Cancer* 74(2): 187-93.
- Kaaijk, P., D. Troost, et al. (1997). Hypofractionated radiation induces a decrease in cell proliferation but no histological damage to organotypic multicellular spheroids of human glioblastomas. *Eur J Cancer* 33(4): 645-51.
- Kaner, R. J., S. Worgall, et al. (1999). Modification of the genetic program of human alveolar macrophages by adenovirus vectors in vitro is feasible but inefficient, limited in part by the low level of expression of the coxsackie/adenovirus receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20(3): 361-70.
- Kaplan, J. M., D. Armentano, et al. (1999). Novel role for E4 region genes in protection of adenovirus vectors from lysis by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 73(5): 4489-92.
- Kasono, K., J. L. Blackwell, et al. (1999). Selective gene delivery to head and neck cancer cells via an integrin targeted adenoviral vector. *Clin Cancer Res* 5(9): 2571-9.
- Kass-Eisler, A., E. Falck-Pedersen, et al. (1994). The impact of developmental stage, route of administration and the immune system on adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther* 1(6): 395-402.
- Kato, J., H. Matsushime, et al. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev* 7(3): 331-42.

- Kawamata, N., C. W. Miller, et al. (1995). Molecular analysis of a family of cyclin-dependent kinase inhibitor genes (p15/MTS2/INK4b and p18/INK4c) in non-small cell lung cancers. *Mol Carcinog* 14(4): 263-8.
- Kawauchi, S., Y. Goto, et al. (2001). Low expression of p27(Kip1), a cyclin-dependent kinase inhibitor, is a marker of poor prognosis in synovial sarcoma. *Cancer* 91(5): 1005-12.
- Kay, M. A., D. Liu, et al. (1997). Gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24): 12744-6.
- Keyomarsi, K., N. O'Leary, et al. (1994). Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res* 54(2): 380-5.
- Khuri, F. R., J. Nemunaitis, et al. (2000). A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer [see comments]. *Nat Med* 6(8): 879-85.
- King, R. W., P. K. Jackson, et al. (1994). Mitosis in transition. *Cell* 79(4): 563-71.
- Kirn, A., J. P. Gut, et al. (1982). Interaction of viruses with sinusoidal cells. *Prog Liver Dis* 7: 377-92.
- Kirn, D. H. y F. McCormick (1996). Replicating viruses as selective cancer therapeutics. *Mol Med Today* 2(12): 519-27.
- Kitahara, K., W. Yasui, et al. (1995). Concurrent amplification of cyclin E and CDK2 genes in colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 62(1): 25-8.
- Knudsen, E. S. y J. Y. Wang (1997). Dual mechanisms for the inhibition of E2F binding to RB by cyclin-dependent kinase-mediated RB phosphorylation. *Mol Cell Biol* 17(10): 5771-83.
- Koff, A., A. Giordano, et al. (1992). Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* 257(5077): 1689-94.
- Kohzato, N., Y. Dong, et al. (2001). Overexpression of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 is correlated with development of hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res* 21(1): 27-39.
- Koivunen, E., B. Wang, et al. (1995). Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins. *Biotechnology (N Y)* 13(3): 265-70.
- Korshunov, A. y A. Golanov (2002). Immunohistochemical analysis of p18INK4C and p14ARF protein expression in 117 oligodendrogliomas: correlation with tumor grade and clinical outcome. *Arch Pathol Lab Med* 126(1): 42-8.
- Kovesdi, I., R. Reichel, et al. (1986). Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell* 45(2): 219-28.
- Krasnykh, V., I. Dmitriev, et al. (1998). Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob. *J Virol* 72(3): 1844-52.
- Krasnykh, V. N., G. V. Mikheeva, et al. (1996). Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J Virol* 70(10): 6839-46.
- Kuriyama, N., H. Kuriyama, et al. (2000). Pretreatment with protease is a useful experimental strategy for enhancing adenovirus-mediated cancer gene therapy. *Hum Gene Ther* 11(16): 2219-30.
- Kushner, J., G. Bradley, et al. (1999). Aberrant expression of cyclin A and cyclin B1 proteins in oral carcinoma. *J Oral Pathol Med* 28(2): 77-81.
- La Thangue, N. B. (1994). DP and E2F proteins: components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* 6(3): 443-50.
- Lam, P. Y., E. Di Tomaso, et al. (2000). Expression of p19INK4d, CDK4, CDK6 in glioblastoma multiforme. *Br J Neurosurg* 14(1): 28-32.
- Larsson, S., C. Svensson, et al. (1992). Control of adenovirus major late gene expression at multiple levels. *J Mol Biol* 225(2): 287-98.

- Lazar, G., Jr., G. Farkas, et al. (1997). Gadolinium chloride-induced macrophage blockade prevents rejection of human insulinoma cell xenograft in rats. *Transplantation* 63(5): 729-32.
- Leach, F. S., S. J. Elledge, et al. (1993). Amplification of cyclin genes in colorectal carcinomas. *Cancer Res* 53(9): 1986-9.
- Lee, E. Y., H. To, et al. (1988). Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science* 241(4862): 218-21.
- Leopold, P. L., G. Kreitzer, et al. (2000). Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Hum Gene Ther* 11(1): 151-65.
- Levaditi, C. y S. Nicolau (1923). Vaccine et Neoplasmes. *Annales de L'Institut Pasteur* 5: 443-477.
- Li, D., L. Duan, et al. (1999). Variability of adenovirus receptor density influences gene transfer efficiency and therapeutic response in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 5(12): 4175-81.
- Li, Y., J. Kang, et al. (1997b). Interaction of an adenovirus 14.7-kilodalton protein inhibitor of tumor necrosis factor alpha cytolysis with a new member of the GTPase superfamily of signal transducers. *J Virol* 71(2): 1576-82.
- Li, Y., R. C. Pong, et al. (1999). Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy. *Cancer Res* 59(2): 325-30.
- Lieber, A., C. Y. He, et al. (1997). The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors. *J Virol* 71(11): 8798-807.
- Lillie, J. W., M. Green, et al. (1986). An adenovirus E1a protein region required for transformation and transcriptional repression. *Cell* 46(7): 1043-51.
- Lin, Y. W., C. H. Chen, et al. (1998). Infrequent mutations and no methylation of CDKN2A (P16/MTS1) and CDKN2B (p15/MTS2) in hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Eur J Cancer* 34(11): 1789-95.
- Lingfei, K., Y. Pingzhang, et al. (1998). A study on p16, pRb, cdk4 and cyclinD1 expression in non-small cell lung cancers. *Cancer Lett* 130(1-2): 93-101.
- Liu, T. J., W. W. Zhang, et al. (1994). Growth suppression of human head and neck cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene via a recombinant adenovirus. *Cancer Res* 54(14): 3662-7.
- Ludlow, J. W., C. L. Glendening, et al. (1993). Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 13(1): 367-72.
- Maizel, J. V., Jr., D. O. White, et al. (1968). The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7A, and 12. *Virology* 36(1): 115-25.
- Malumbres, M. y M. Barbacid (2001). To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Rev Cancer* 1(3): 222-31.
- Marcellus, R. C., J. G. Teodoro, et al. (1996). Adenovirus type 5 early region 4 is responsible for E1A-induced p53-independent apoptosis. *J Virol* 70(9): 6207-15.
- Marchini, S., A. M. Codegani, et al. (1997). Absence of deletions but frequent loss of expression of p16INK4 in human ovarian tumours. *Br J Cancer* 76(2): 146-9.
- Markert, J. M., M. D. Medlock, et al. (2000). Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial [see comments]. *Gene Ther* 7(10): 867-74.
- Marone, M., G. Scambia, et al. (1998). Analysis of cyclin E and CDK2 in ovarian cancer: gene amplification and RNA overexpression. *Int J Cancer* 75(1): 34-9.
- Martuza, R. L., A. Malick, et al. (1991). Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* 252(5007): 854-6.
- Masciullo, V., G. Scambia, et al. (1997). Altered expression of cyclin D1 and CDK4 genes in ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 74(4): 390-5.

- Mathias, P., T. Wickham, et al. (1994). Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J Virol* 68(10): 6811-4.
- Merrouche, Y., S. Negrier, et al. (1995). Clinical application of retroviral gene transfer in oncology: results of a French study with tumor-infiltrating lymphocytes transduced with the gene of resistance to neomycin. *J Clin Oncol* 13(2): 410-8.
- Mettler, N. E., D. H. Clarke, et al. (1982). Virus inoculation in mice bearing Ehrlich ascitic tumors: antigen production and tumor regression. *Infect Immun* 37(1): 23-7.
- Milde-Langosch, K., C. Goemann, et al. (2001). Expression of Rb2/p130 in breast and endometrial cancer: correlations with hormone receptor status. *Br J Cancer* 85(4): 546-51.
- Miller, C. R., D. J. Buchsbaum, et al. (1998). Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer. *Cancer Res* 58(24): 5738-48.
- Miller, C. W., A. Aslo, et al. (1996). Alterations of the p15, p16, and p18 genes in osteosarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 86(2): 136-42.
- Mineta, T., S. D. Rabkin, et al. (1995). Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat Med* 1(9): 938-43.
- Mishina, T., H. Dosaka-Akita, et al. (2000). Cyclin E expression, a potential prognostic marker for non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 6(1): 11-6.
- Mittereder, N., K. L. March, et al. (1996). Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol* 70(11): 7498-509.
- Monsky, W. L., D. Fukumura, et al. (1999). Augmentation of Transvascular Transport of Macromolecules and Nanoparticles in Tumors Using Vascular Endothelial Growth Factor. *Cancer Res* 59(16): 4129-4135.
- Moore, A. (1949). The destructive effect of the virus of Russian Far East encephalitis on the transplantable mouse sarcoma 180. *Cancer* 2: 525-534.
- Moran, E., T. Grodzicker, et al. (1986). Lytic and transforming functions of individual products of the adenovirus E1A gene. *J Virol* 57(3): 765-75.
- Mori, K., R. Juttermann, et al. (1996). Anti-interferon activity of adenovirus-2-encoded VAI and VAII RNAs in translation in cultured human cells. *Virus Res* 42(1-2): 53-63.
- Morris, C. A., T. H. Flewett, et al. (1975). Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. *Lancet* 1(7897): 4-5.
- Motokura, T. y A. Arnold (1993). Cyclin D and oncogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 3(1): 5-10.
- Mudryj, M., S. W. Hiebert, et al. (1990). A role for the adenovirus inducible E2F transcription factor in a proliferation dependent signal transduction pathway. *Embo J* 9(7): 2179-84.
- Mukhopadhyay, T., M. Tainsky, et al. (1991). Specific inhibition of K-ras expression and tumorigenicity of lung cancer cells by antisense RNA. *Cancer Res* 51(6): 1744-8.
- Murakami, H., M. Furihata, et al. (1999). Determination of the prognostic significance of cyclin B1 overexpression in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 434(2): 153-8.
- Nakagawa, H., L. Zukerberg, et al. (1995). Human cyclin D1 oncogene and esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 76(4): 541-9.
- Nakayama, K., N. Ishida, et al. (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85(5): 707-20.
- Nalbantoglu, J., G. Pari, et al. (1999). Expression of the primary coxsackie and adenovirus receptor is downregulated during skeletal muscle maturation and limits the efficacy of adenovirus-mediated gene delivery to muscle cells. *Hum Gene Ther* 10(6): 1009-19.

- Nemerow, G. R. y P. L. Stewart (1999). Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiol Mol Biol Rev* 63(3): 725-734.
- Nemunaitis, J., C. Cunningham, et al. (2001b). Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients: safety, feasibility and biological activity. *Gene Ther* 8(10): 746-59.
- Nemunaitis, J., F. Khuri, et al. (2001). Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *J Clin Oncol* 19(2): 289-98.
- Nermut, M. V. (1975). Fine structure of adenovirus type 5. I. Virus capsid. *Virology* 65(2): 480-95.
- Netti, P. A., D. A. Berk, et al. (2000). Role of Extracellular Matrix Assembly in Interstitial Transport in Solid Tumors. *Cancer Res* 60(9): 2497-2503.
- Nevins, J. R. (1992). E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258(5081): 424-9.
- O'Carroll, S. J., A. R. Hall, et al. (2000). Quantifying adenoviral titers by spectrophotometry. *Biotechniques* 28(3): 408-10, 412.
- Ogris, E., H. Rotheneder, et al. (1993). A binding site for transcription factor E2F is a target for trans activation of murine thymidine kinase by polyomavirus large T antigen and plays an important role in growth regulation of the gene. *J Virol* 67(4): 1765-71.
- Ohashi, Y., H. Sasano, et al. (1999). Cell cycle inhibitory protein p27 in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 19(3A): 1843-8.
- Ohno, A. (1996). [p16/CDKN2/MTS1 gene abnormality in lung cancer]. *Nippon Rinsho* 54(2): 503-6.
- Orlow, I., L. Lacombe, et al. (1995). Deletion of the p16 and p15 genes in human bladder tumors. *J Natl Cancer Inst* 87(20): 1524-9.
- Pack, G. t. (1950). Note on the experimental use of rabies vaccine for melanomatosis. *AMA Arch Dermatol* 62(694-695).
- Pantelouris, E. M. (1968). Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 217(126): 370-1.
- Patel, V., J. Jakus, et al. (1997). Altered expression and activity of G1/S cyclins and cyclin-dependent kinases characterize squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 73(4): 551-5.
- Paterlini, P., A. M. Suberville, et al. (1993). Cyclin A expression in human hematological malignancies: a new marker of cell proliferation. *Cancer Res* 53(2): 235-8.
- Patterson, S. y W. C. Russell (1983). Ultrastructural and immunofluorescence studies of early events in adenovirus-HeLa cell interactions. *J Gen Virol* 64(Pt 5): 1091-9.
- Pawlik, T. M., H. Nakamura, et al. (2000). Oncolysis of diffuse hepatocellular carcinoma by intravascular administration of a replication-competent, genetically engineered herpesvirus. *Cancer Res* 60(11): 2790-5.
- Pearson, B. E., H. P. Nasheuer, et al. (1991). Human DNA polymerase alpha gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells. *Mol Cell Biol* 11(4): 2081-95.
- Pecora, A. L., N. Rizvi, et al. (2002). Phase I Trial of Intravenous Administration of PV701, an Oncolytic Virus, in Patients With Advanced Solid Cancers. *J Clin Oncol* 20(9): 2251-66.
- Pennisi, E. (1996). Will a twist of viral fate lead to a new cancer treatment? [news; comment]. *Science* 274(5286): 342-3.
- Pickles, R. J., D. McCarty, et al. (1998). Limited entry of adenovirus vectors into well-differentiated airway epithelium is responsible for inefficient gene transfer. *J Virol* 72(7): 6014-23.
- Piva, R., P. Cavalla, et al. (1997). p27/kip1 expression in human astrocytic gliomas. *Neurosci Lett* 234(2-3): 127-30.

- Rao, L., D. Perez, et al. (1996). Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135(6 Pt 1): 1441-55.
- Reichard, K. W., R. M. Lorence, et al. (1992). Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells. *J Surg Res* 52(5): 448-53.
- Reid, T., E. Galanis, et al. (2001). Intra-arterial administration of a replication-selective adenovirus (dl1520) in patients with colorectal carcinoma metastatic to the liver: a phase I trial. *Gene Ther* 8(21):1618-26.
- Reynolds, P., I. Dmitriev, et al. (1999). Insertion of an RGD motif into the HI loop of adenovirus fiber protein alters the distribution of transgene expression of the systemically administered vector. *Gene Ther* 6(7): 1336-9.
- Robbins, P. D. y S. C. Ghivizzani (1998). Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther* 80(1): 35-47.
- Rodriguez, R., E. R. Schuur, et al. (1997). Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res* 57(13): 2559-63.
- Roelvink, P. W., A. Lizonova, et al. (1998). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol* 72(10): 7909-15.
- Roelvink, P. W., G. Mi Lee, et al. (1999). Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae. *Science* 286(5444): 1568-71.
- Rogulski, K. R., M. S. Wing, et al. (2000). Double suicide gene therapy augments the antitumor activity of a replication-competent lytic adenovirus through enhanced cytotoxicity and radiosensitization. *Hum Gene Ther* 11(1): 67-76.
- Rokhlin, O. W. y M. B. Cohen (1995). Expression of cellular adhesion molecules on human prostate tumor cell lines. *Prostate* 26(4): 205-12.
- Rommelaere, J. y J. J. Cornelis (1991). Antineoplastic activity of parvoviruses. *J Virol Methods* 33(3): 233-51.
- Rosen, I. (1960). A hemagglutination-inhibition technique for typing adenoviruses. *American Journal of Hygiene* 71: 120-128.
- Rosenberg, C. L., E. Wong, et al. (1991). PRAD1, a candidate BCL1 oncogene: mapping and expression in centrocytic lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(21): 9638-42.
- Roth, J. A. y R. J. Cristiano (1997). Gene therapy for cancer: what have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst* 89(1): 21-39.
- Rowe, W. P., R. J. Huebner, et al. (1953). Isolation of a cytopathic agent from human adenoids undergoing spontaneous degradation in tissue culture. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 84: 570-573.
- Ruas, M. y G. Peters (1998). The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1378(2): F115-77.
- Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 697-715.
- Ruoslahti, E. y M. D. Pierschbacher (1987). New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238(4826): 491-7.
- Russell, S. J. (1994). Replicating vectors for cancer therapy: a question of strategy. *Semin Cancer Biol* 5(6): 437-43.
- Russell, W. C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 81(Pt 11): 2573-604.

- Rustgi, A. K., N. Dyson, et al. (1991). The c-myc oncoprotein forms a specific complex with the product of the retinoblastoma gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 56: 163-7.
- Rygaard, J. y C. O. Povlsen (1969). Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. *Acta Pathol Microbiol Scand* 77(4): 758-60.
- Sanchez, I. y B. D. Dynlacht (1996). Transcriptional control of the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 8(3): 318-24.
- Sanda, M. G., N. P. Restifo, et al. (1995). Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 87(4): 280-5.
- Santini, M. T. y G. Rainaldi (1999). Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology* 67(3): 148-57.
- Scanlon, K., L. Jiao, et al. (1991). Ribozyme-Mediated Cleavage of c-fos mRNA Reduces Gene Expression of DNA Synthesis Enzymes and Metallothionein. *PNAS* 88(23): 10591-10595.
- Schaack, J., W. Y. Ho, et al. (1990). Adenovirus terminal protein mediates both nuclear matrix association and efficient transcription of adenovirus DNA. *Genes Dev* 4(7): 1197-208.
- Schmidt, E. E., K. Ichimura, et al. (1994). CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 54(24): 6321-4.
- Schwartz, M. A., D. A. Scheinberg, et al. (1992). Monoclonal antibody therapy. *Cancer Chemother Biol Response Modif* 13: 156-74.
- Scuderi, R., K. A. Palucka, et al. (1996). Cyclin E overexpression in relapsed adult acute lymphoblastic leukemias of B-cell lineage. *Blood* 87(8): 3360-7.
- Shan, B., C. Y. Chang, et al. (1994). The transcription factor E2F-1 mediates the autoregulation of RB gene expression. *Mol Cell Biol* 14(1): 299-309.
- Shapiro, G. I., C. D. Edwards, et al. (1995). Reciprocal Rb inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res* 55(3): 505-9.
- Sharkey, F. E. y J. Fogh (1984). Considerations in the use of nude mice for cancer research. *Cancer Metastasis Rev* 3(4): 341-60.
- Shenk, T. (1996). "Adenoviridae: The viruses and their replication" in *Fields Virology*: 2111-2148.
- Sherr, C. J. (1996). Cancer cell cycles. *Science* 274(5293): 1672-7.
- Shinoura, N., Y. Yoshida, et al. (1999). Highly augmented cytopathic effect of a fiber-mutant E1B-defective adenovirus for gene therapy of gliomas. *Cancer Res* 59(14): 3411-6.
- Shiozawa, T., T. Nikaido, et al. (1997). Immunohistochemical analysis of the expression of cdk4 and p16INK4 in human endometrioid-type endometrial carcinoma. *Cancer* 80(12): 2250-6.
- Simons, J. y D. Henderson (1998). A phase I study of the intraprostatic injections of CN706, a prostate-specific antigen gene-regulated cytolytic adenovirus in patients with locally recurrent cancer following definitive radiotherapy. *Human Gene Therapy Protocol 99802-236. National Institutes of Health. Recombinant DNA Advisory Committee.*
- Sinkovics, J. y H. J (1993). New developments in the virus therapy of cancer: a historical review. *Intervirology* 36: 193-214.
- Slansky, J. E. y P. J. Farnham (1996). Introduction to the E2F family: protein structure and gene regulation. *Curr Top Microbiol Immunol* 208: 1-30.
- Smith, D. R., S. L. Kunkel, et al. (1994). Production of interleukin-10 by human bronchogenic carcinoma. *Am J Pathol* 145(1): 18-25.
- Smith, R. R., R. J. Huebner, et al. (1956). Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer* 9(6): 1211-1218.

- Soria, J. C., S. J. Jang, et al. (2000). Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication. *Cancer Res* 60(15): 4000-4.
- Southam, C., B. Bronstein, et al. (1951). Effect of West Nile and liheus viruses on mouse leukemias. *Cancer Research* 11(669-675).
- Southam, C. M. y A. E. Moore (1952). Clinical studies of viruses as antineoplastic agents, with particular reference to Egypt 101 virus. *Cancer* 5(5): 1025-1034.
- Steffan, A. M. (1997). Hepatic macrophages and virus. *Pathol Biol (Paris)* 45(2): 169-83.
- Stojdl, D. F., B. Lichty, et al. (2000). Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med* 6(7): 821-5.
- Strohmeier, T., P. Reissmann, et al. (1991). Correlation between retinoblastoma gene expression and differentiation in human testicular tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(15): 6662-6.
- Su, Z. Z., Z. Y. Luo, et al. (1988). Inhibitory effect of parvovirus H-1 on cultured human tumour cells or transformed cells. *Sci Sin [B]* 31(1): 69-80.
- Sutherland, R. M. (1988). Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240(4849): 177-84.
- Suzuki, H., X. Zhou, et al. (1995). Intragenic mutations of CDKN2B and CDKN2A in primary human esophageal cancers. *Hum Mol Genet* 4(10): 1883-7.
- Suzuki, K., J. Fueyo, et al. (2001). A conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency. *Clin Cancer Res* 7(1): 120-6.
- Svensson, C., M. Bondesson, et al. (1991). Independent transformation activity by adenovirus-5 E1A-conserved regions 1 or 2 mutants. *Virology* 182(2): 553-61.
- Takata, T., Y. Kudo, et al. (1999). Reduced expression of p27(Kip1) protein in relation to salivary adenoid cystic carcinoma metastasis. *Cancer* 86(6): 928-35.
- Tam, S. W., J. W. Shay, et al. (1994). Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16Ink4. *Cancer Res* 54(22): 5816-20.
- Tanaka, N., T. Odajima, et al. (2001). Expression of Rb, pRb2/p130, p53, and p16 proteins in malignant melanoma of oral mucosa. *Oral Oncol* 37(3): 308-14.
- Tannapfel, A., D. Grund, et al. (2000). Decreased expression of p27 protein is associated with advanced tumor stage in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 89(4): 350-5.
- Tao, N., G. P. Gao, et al. (2001). Sequestration of adenoviral vector by Kupffer cells leads to a nonlinear dose response of transduction in liver. *Mol Ther* 3(1): 28-35.
- Taylor, M. W., R. Su, et al. (1974). Bovine enterovirus-1: characterization, replication and cytopathogenic effects. *J Gen Virol* 23(2): 173-8.
- Telerman, A., M. Tuynder, et al. (1993). A model for tumor suppression using H-1 parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(18): 8702-6.
- Thimmappaya, B., C. Weinberger, et al. (1982). Adenovirus VAI RNA is required for efficient translation of viral mRNAs at late times after infection. *Cell* 31(3 Pt 2): 543-51.
- Todyrk, S., C. McLean, et al. (1999). Disabled infectious single-cycle herpes simplex virus as an oncolytic vector for immunotherapy of colorectal cancer. *Hum Gene Ther* 10(17): 2757-68.
- Tollefson, A. E., A. Scaria, et al. (1996a). The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J Virol* 70(4): 2296-306.
- Tollefson, A. E., A. Scaria, et al. (1992). The 11,600-MW protein encoded by region E3 of adenovirus is expressed early but is greatly amplified at late stages of infection. *J Virol* 66(6): 3633-42.

- Toolan, H. W. y N. Ledinko (1968). Inhibition by H-1 virus of the incidence of tumors produced by adenovirus 12 in hamsters. *Virology* 35(3): 475-8.
- Toolan, H. W. y A. E. Moore (1951). Oncolytic effect of Egypt virus on a human epidermoid carcinoma grown in x-irradiated rats. *Proc Soc Exper Biol & Med* 79: 697-702.
- Topley, P., D. C. Jenkins, et al. (1993). Effect of reconstituted basement membrane components on the growth of a panel of human tumour cell lines in nude mice. *Br J Cancer* 67(5): 953-8.
- Toyoizumi, T., K. Tsukuda, et al. (2000). CEA-regulated replication-selective adenovirus for treatment of CEA-positive tumors. *Mol Ther* 1: S159.
- Trask, T. W., R. P. Trask, et al. (2000). Phase I study of adenoviral delivery of the HSV-tk gene and ganciclovir administration in patients with current malignant brain tumors. *Mol Ther* 1(2): 195-203.
- Trentin, J. J., Y. Yabe, et al. (1962). The quest for human cancer viruses. *Science* 137: 835-849.
- Tsai, S. C., B. Gansbacher, et al. (1993). Induction of antitumor immunity by interleukin-2 gene-transduced mouse mammary tumor cells versus transduced mammary stromal fibroblasts. *J Natl Cancer Inst* 85(7): 546-53.
- Tsihlias, J., L. Kapusta, et al. (1999). The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med* 50: 401-23.
- Ueki, K., Y. Ono, et al. (1996). CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* 56(1): 150-3.
- Van Rooijen, N., N. Kors, et al. (1990). Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Cell Tissue Res* 260(2): 215-22.
- Van Rooijen, N. y A. Sanders (1996). Kupffer cell depletion by liposome-delivered drugs: comparative activity of intracellular clodronate, propamidine, and ethylenediaminetetraacetic acid. *Hepatology* 23(5): 1239-43.
- Vasey, P. A., L. N. Shulman, et al. (2002). Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol* 20(6): 1562-9.
- Vile, R. y S. J. Russell (1994). Gene transfer technologies for the gene therapy of cancer. *Gene Ther* 1(2): 88-98.
- Wadayama, B., J. Toguchida, et al. (1994). Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas. *Cancer Res* 54(11): 3042-8.
- Wadell, G. (1969). Hemagglutination with adenovirus serotypes belonging to Rosen's subgroups II and 3. *Proc Soc Exp Biol Med* 132(2): 413-21.
- Wadell, G., M. L. Hammar skjold, et al. (1980). Genetic variability of adenoviruses. *Ann N Y Acad Sci* 354: 16-42.
- Wakasugi, E., T. Kobayashi, et al. (1997). p21(Waf1/Cip1) and p53 protein expression in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 107(6): 684-91.
- Waleh, N. S., J. Gallo, et al. (1994). Selective down-regulation of integrin receptors in spheroids of squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 54(3): 838-43.
- Wang, C. Y., B. Petryniak, et al. (1993). Regulation of the Ets-related transcription factor Elf-1 by binding to the retinoblastoma protein. *Science* 260(5112): 1330-5.
- Wang, J., X. Chenivesse, et al. (1990). Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma. *Nature* 343(6258): 555-7.
- Wang, K., T. Guan, et al. (2000). Regulation of adenovirus membrane penetration by the cytoplasmic tail of integrin beta5. *J Virol* 74(6): 2731-9.

- Wang, K., S. Huang, et al. (1998). Adenovirus internalization and infection require dynamin. *J Virol* 72(4): 3455-8.
- Wang, X. y J. M. Bergelson (1999). Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection. *J Virol* 73(3): 2559-62.
- Webb, H. E., G. Wetherley-Mein, et al. (1966). Leukaemia and neoplastic processes treated with Langat and Kyasanur Forest disease viruses: a clinical and laboratory study of 28 patients. *Br Med J* 5482: 258-66.
- Welch, P. J. y J. Y. Wang (1995). Abrogation of retinoblastoma protein function by c-Abl through tyrosine kinase-dependent and -independent mechanisms. *Mol Cell Biol* 15(10): 5542-51.
- Wheelock, E. F. (1967). Inhibitory effects of Sendai virus on Friend virus leukemia in mice. *J Natl Cancer Inst* 38(5): 771-8.
- Whyte, P., K. J. Buchkovich, et al. (1988). Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 334(6178): 124-9.
- Wickham, T. J., P. Mathias, et al. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73(2): 309-19.
- Wickham, T. J., P. W. Roelvink, et al. (1996). Adenovirus targeted to heparan-containing receptors increases its gene delivery efficiency to multiple cell types. *Nat Biotechnol* 14(11): 1570-3.
- Wickham, T. J., D. M. Segal, et al. (1996). Targeted adenovirus gene transfer to endothelial and smooth muscle cells by using bispecific antibodies. *J Virol* 70(10): 6831-8.
- Wickham, T. J., E. Tzeng, et al. (1997). Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins. *J Virol* 71(11): 8221-9.
- Wildner, O., R. M. Blaese, et al. (1999b). Therapy of colon cancer with oncolytic adenovirus is enhanced by the addition of herpes simplex virus-thymidine kinase. *Cancer Res* 59(2): 410-3.
- Wildner, O., J. C. Morris, et al. (1999). Adenoviral vectors capable of replication improve the efficacy of HSVtk/GCV suicide gene therapy of cancer. *Gene Ther* 6(1): 57-62.
- Wold, W. S. y L. R. Gooding (1989). Adenovirus region E3 proteins that prevent cytolysis by cytotoxic T cells and tumor necrosis factor. *Mol Biol Med* 6(5): 433-52.
- Wold, W. S. y L. R. Gooding (1991). Region E3 of adenovirus: a cassette of genes involved in host immunosurveillance and virus-cell interactions. *Virology* 184(1): 1-8.
- Wolff, G., S. Worgall, et al. (1997). Enhancement of in vivo adenovirus-mediated gene transfer and expression by prior depletion of tissue macrophages in the target organ. *J Virol* 71(1): 624-9.
- Worgall, S., P. L. Leopold, et al. (1997). Role of alveolar macrophages in rapid elimination of adenovirus vectors administered to the epithelial surface of the respiratory tract. *Hum Gene Ther* 8(14): 1675-84.
- Xia, D., L. Henry, et al. (1995). Structure of the receptor binding domain of adenovirus type 5 fiber protein. *Curr Top Microbiol Immunol* 199 ( Pt 1): 39-46.
- Yazaki, T., H. J. Manz, et al. (1995). Treatment of human malignant meningiomas by G207, a replication-competent multimutated herpes simplex virus 1. *Cancer Res* 55(21): 4752-6.
- Yee, S. P. y P. E. Branton (1985). Detection of cellular proteins associated with human adenovirus type 5 early region 1A polypeptides. *Virology* 147(1): 142-53.
- Yoshida, S., T. Todoroki, et al. (1995). Mutations of p16Ink4/CDKN2 and p15Ink4B/MTS2 genes in biliary tract cancers. *Cancer Res* 55(13): 2756-60.
- You, Z., D. C. Fischer, et al. (2001). Coxsackievirus-adenovirus receptor expression in ovarian cancer cell lines is associated with increased adenovirus transduction efficiency and transgene expression. *Cancer Gene Ther* 8(3): 168-75.

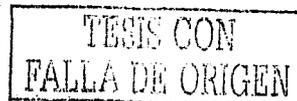
- Yu, D. C., Y. Chen, et al. (2001). Antitumor synergy of CV787, a prostate cancer-specific adenovirus, and paclitaxel and docetaxel. *Cancer Res* 61(2): 517-25.
- Yu, D. C., Y. Chen, et al. (1999b). The addition of adenovirus type 5 region E3 enables calydon virus 787 to eliminate distant prostate tumor xenografts [published erratum appears in *Cancer Res* 2000 Feb 15;60(4):1150]. *Cancer Res* 59(17): 4200-3.
- Zabner, J., P. Freimuth, et al. (1997). Lack of high affinity fiber receptor activity explains the resistance of ciliated airway epithelia to adenovirus infection. *J Clin Invest* 100(5): 1144-9.
- Zacksenhaus, E., R. Bremner, et al. (1993). Unraveling the function of the retinoblastoma gene. *Adv Cancer Res* 61: 115-41.
- Zamanian, M. y N. B. La Thangue (1993). Transcriptional repression by the Rb-related protein p107. *Mol Biol Cell* 4(4): 389-96.
- Zhang, H., G. J. Hannon, et al. (1994). p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* 8(15): 1750-8.
- Zheng, D. Q., A. S. Woodard, et al. (1999). Prostatic carcinoma cell migration via alpha(v)beta3 integrin is modulated by a focal adhesion kinase pathway. *Cancer Res* 59(7): 1655-64.
- Zisman, B., E. F. Wheelock, et al. (1971). Role of macrophages and antibody in resistance of mice against yellow fever virus. *J Immunol* 107(1): 236-43.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **AGRADECIMIENTOS**

---

- Dr. David T. Curiel
- Ramón Alemany y Cristina Balagué
- Masato Yamamoto y Dirk Nettelbeck
- Drs. Kershenobich y Llorente
- Comité de Evaluación: Dra. Sandra Gómez, Dra. Annie Pardo, Dra. Vilma Maldonado, Dr. García-Carrancá
- A mis ratones atómicos



**De UAB:** Dra. Judy Thomas, Gustavo, Coral y Andrea, Jesús y Lupita Salazar, Victor K., Joanne D., Igor D, Elena K., Paul R.. A todos los japoneses del laboratorio, en especial a Toshi S., Claudine R., Jialing X., Lucretia S., Traci H., Marianne R., Michael B., Angel R., Julia D., Natalya B., Long L., Peter N., Alexander L. (Sasha), David D., Vivian, Juanita, Connie, Paty; Tina Rogers, Ines, Tracy y Marion (UAB FACS core facility) y al Dr. Tousson (UAB Imaging core facility).

**De M. D. Anderson Cancer Center:** Dr. Juan Fueyo.

**Del INCMNSZ:** Pili Milke, Lety y Gaby G., Tino y Carmen (Nefrología) -gracias por el agua desionizada y el azul de Coomasie que nunca devolví-. Araceli -microscopio de contraste de fases- y Javier -congelador de nitrógeno líquido- (Inmunología). Octavio Villanueva y Sr. Fidel (Bioterio). Dr. Jorge Luis Poo y Dra. Lourdes Rodriguez, fueron los primeros en introducirme al mundo del laboratorio en biomedicina.

**De la UNAM:** Rafa Serrano, Sra. Marina, Sr. Toño, Claudia, Georgina y chicos de la biblioteca del Instituto de Fisiología Celular.

**Del CINVESTAV:** agradecimiento especial al Dr. Tomás Mendoza, Tere y Manuel.

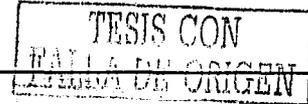
**De la Universidad La Salle:** Nick, del laboratorio; Dr. Romero Cabello, por su introducción al mundo de los microorganismos y Dr. Arechavala al de la oncología.

**Del pasado:** mis maestra(o)s de biología y química de secundaria y preparatoria quienes alentaron mi interés por las ciencias naturales: Alma, Araceli Pinilla, Aurea, Dulce, madre Delia, Kazu Saito, Lourdes Ramos, "la pasita" , Maru y Pedro Argüelles.

**Todos mis amigos:** Toño (Osito), Alio, Paloma, Charly, Norell, Daniel, Mark, Martín, Javi G. (Madrid), a todos los amigos (muchos) que afortunadamente tengo.

**Mi familia de Birmingham:** Francisco (Maligno), Neli, Alejandro, Montserrat, José Pablo y Zimmer

**Mi familia de México:** mamá, papá, Hiromi, Kimie, Ataru y Taco Uil, mi familia de Holanda.

**ANEXOS****Publicaciones**

Alemany R, Suzuki K, Curiel DT. Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice. *J Gen Virol* 2000;81:2605-2609.

Suzuki K, Fueyo J, Krasnykh V, Reynolds NP, Curiel DT. A conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency. *Clin Can Res* 2001;7:120-126.

Suzuki K, Curiel DT. La terapia viral del cáncer. *Rev Invest Clin* 2001 Jul-Aug;53:346-356. Revisión en español.

Seki T, Dmitriev I, Kashentseva E, Takayama K, Rots M, Suzuki K, Curiel DT. Artificial extension of the adenovirus fiber shaft inhibits infectivity in coxsackievirus and adenovirus receptor-positive cell lines. *J Virol* 2002;76:1100-1108.

Bauerschmitz GJ, Lam J, Kanerva A, Suzuki K, Nettelbeck DM, Dmitriev I, Krasnykh V, Mikheeva GV, Barnes MN, Alvarez RD, Dall P, Alemany R, Curiel DT, Hemminki A. Treatment of ovarian cancer with a tropism modified oncolytic adenovirus. *Cancer Res* 2002;62(5):1266-1270.

Seki T, Dmitriev I, Suzuki K, Kashentseva E, Takayama K, Rots M, Uil T, Wu H, Wang M, Curiel DT. Fiber shaft extension in combination with HI loop ligands augments infectivity for CAR-negative tumor targets but does not enhance hepatotropism *in vivo*. *Gene Therapy* 2002;9(16):1101-1108.

Suzuki K, Alemany R, Yamamoto M, Curiel DT. The presence of the adenovirus E3 region improves the oncolytic potency of conditionally replicative adenoviruses. Aceptado para publicación en *Clinical Cancer Research* ejemplar de noviembre 2002.