



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Farmacia y Bioquímica

**ROL DE LA PROTEÍNA SPARC EN LA BIOLOGÍA ADENOVIRAL  
ORIENTADA AL USO TERAPÉUTICO**

Tesis presentada para optar al título de Magister en Biología Molecular Médica de la  
Universidad de Buenos Aires

Maestranda: Lic. Elvia Rivas

Director: Dr. Osvaldo Podhajcer

Director Adjunto: Dr. Edgardo Salvatierra

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

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2015

*A mi madre, mi apoyo invaluable*

## **AGRADECIMIENTOS**

Estas páginas representan el logro de una meta, meta que para ser alcanzada trajo consigo un cambio de vida.

### **En la vida académica:**

A la Universidad Central de Venezuela y al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, por formarme como la profesional que soy y sembrar en mí la curiosidad por la ciencia.

A la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, por permitirme dar un paso más en mi formación académica.

A Osvaldo Podhajcer, mi director, por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme desarrollar esta tesis.

A Edgardo Salvatierra, mi director adjunto, por enseñarme mucho más de esperado.

A los miembros y ex miembros del Laboratorio de Terapia Molecular y Celular: Agostina, Ana, Alejandro, Leandro, Leonardo, Verónica, Colo, Gabriela, Giselle, Santiago, Caffé, María Elena, Daniela, Juan Martín, Marcela, Andrea, Yanina, Cecilia, Mariela y Luciana. Gracias por el apoyo brindado en todo este tiempo, los consejos, la guía y los mates.

A la Fundación Instituto Leloir, por toda la ayuda brindada.

### **En la vida personal:**

A mi madre, por apoyarme desde el día uno de esta aventura, por no fallarme nunca. Otra meta lograda por y para ti.

A mi hogar, mi casa siempre, mi país Venezuela. No hay día que pase que no te extrañe.

A mi gente venezolana, de la que me separa la distancia, pero solo eso. Gracias por estar.

A Argentina, por sorprenderme y darme más de lo que alguna vez esperé.

A lo mejor que me dejó la cursada, Yani, Lucy y Jime. No sé qué hubiese sido de mí sin verlas cada noche de viernes y sábado en la mañana. Porque nunca se terminen los primeros viernes de cada mes.

A mi Aguito, chiquita de mi corazón, porque tú me entiendes y yo a ti, porque somos iguales, porque sufrimos el frío como ninguna otra.

A Caffè y Santi, siempre dispuestos a dar sabios consejos, por las charlas, los mates, las risas y las reuniones compartidas.

A Anita, la multitasking y a Anastasia, torbellino de energía.

A Celeste y Cori, capas del 106, almas maravillosas que se cruzaron en mi camino.

A las Diosas Leloireses, Marie, Gaby, Sole, Ivi, Jules, Kari, Sofi, Ine y Carol, por permitirme redescubrir mi amor por la danza, por las charlas de pasillo, las meriendas, los festejos, los consejos y la abrazos.

A el alma del Instituto Leloir, su gente. Porque más allá del lab 107 tuve la suerte de cruzarme con personas maravillosas, dispuestas a ayudar, charlar y brindar una hermosa sonrisa.

A todos los responsables de hacer que la nostalgia no pegue tanto en estas tierras del sur.

## RESUMEN

En la actualidad, grandes avances se han realizado en el campo de la terapia génica para el tratamiento del cáncer, y dentro de este campo, el uso de virus oncolíticos se presenta con adelantos prometedores, ya que no solo presentan un tropismo preferencial por células transformadas, sino que también median procesos citotóxicos en las células infectadas, sin dañar a las células normales. Dentro de los virus oncolíticos encontramos los adenovirus de replicación condicional basados en adenovirus que infectan a humanos (“CRAds” en sus siglas en inglés). En nuestro laboratorio se construyó un CRAd cuya replicación es dirigida por un promotor quimera con: un fragmento del promotor de SPARC, elementos respondedores a hipoxia y a inflamación; además posee una fibra quimera 5/3. Este virus se denominó Adenovirus 5/3 NHS. En la búsqueda de nuevas estrategias para el “delivery” de CRAds al tumor, se utilizaron células mesenquimales (“MSCs” en sus siglas en inglés) pre infectadas con el Ad 5/3 NHS como medio de transporte para el mismo. Se observó que al infectar estas células tanto en presencia de medio condicionado de células tumorales que expresan la proteína SPARC, como en presencia de la proteína purificada SPARC, la infección fue más eficiente, evidenciándose en un aumento en la lisis a menor multiplicidad de infección (“MOI” en sus siglas en inglés).

Partiendo de esta premisa, en este trabajo se planteó evaluar si el efecto observado en MSC se reproducía en células tumorales. Para ello se utilizaron 3 estrategias: infecciones en presencia de medio condicionado proveniente de células que secretan SPARC, infección en presencia de la proteína purificada SPARC e infecciones en células que expresan o no SPARC, empleando 3 virus: Ad5/3 Luciferasa como control no replicativo, Ad5/3 WT como control positivo y el Ad5/3 NHS generado en nuestro laboratorio. La estrategia en la que infectamos en presencia del medio condicionado no represento un ensayo eficiente para la evaluación del efecto de SPARC, ya que el mismo inhibió el crecimiento celular. La expresión de SPARC y el agregado exógeno de la proteína favorece la lisis mediada por los adenovirus utilizados. Sin embargo, estudios de expresión de los receptores adenovirales CAR, CD46 y Desmogleína-2, y de entrada de virus por cuantificación de copias del gen E4, nos sugieren que el mecanismo utilizado por SPARC no está relacionado con las etapas del ciclo adenoviral que abarcan la unión a receptores y la entrada del virus.

**Palabras claves:** CRAds, lisis, SPARC

## ABSTRACT

Today, great strides have been made in the field of gene therapy for cancer treatment, and in this field, the use of oncolytic viruses is presented with promising advances, since they not only have a preferential tropism for transformed cells but also they mediate cytotoxic processes in infected cells, without harming normal cells. Within oncolytic viruses are conditionally replicative adenovirus (CRAds) based in adenovirus that infect humans. In our laboratory was built a CRAd whose replication is driven by a chimeric promoter with a fragment of the SPARC promoter, hypoxia response elements and inflammation, besides having a chimera fiber 5/3. This virus was called adenovirus 5/3 NHS. In the search for new strategies for the delivery of CRAds to the tumor, mesenchymal cells were used (MSCs) pre-infected with Ad 5/3 NHS as a means of transport for the same. It was observed that by infecting these cells, both in the presence of conditioned medium of tumor cells that express the SPARC protein, as in the presence of purified protein SPARC, the infection turn out to be more efficient, demonstrating an increase in lysis at lower multiplicity of infection (MOI).

Starting from this premise, this work aimed to assess whether the effect observed in MCSs reproduced in tumor cells. This three strategies were used: Infections in the presence of conditioned medium from cells secreting SPARC, infection in the presence of the purified protein SPARC and infections in cells expressing or not SPARC using 3 viruses: Ad5/3 Luciferase as a non-replicative control, Ad5/3 WT as positive control and the Ad5/3 NHS generated in our laboratory. The strategy that involve an infection in the presence of conditioned media do not represent an efficient test for evaluating the effect of SPARC, since it inhibited cell growth. SPARC expression and exogenously added protein promotes adenovirus mediated lysis. However, studies of expression of CAR, CD46 and Desmoglein-2 adenoviral receptors and virus entry by quantification of copies of E4 gene and immunofluorescence, suggest that the mechanism used by SPARC is unrelated to adenoviral cycle stages related to receptor binding and virus entry.

**Keywords:** CRAds, lysis, SPARC

## **CARTA CULMINACIÓN DE TESIS DE MAESTRÍA**

Yo, Osvaldo Podhajcer, Investigador Superior del CONICET y Director del Laboratorio de Terapia Molecular y Celular de la Fundación Instituto Leloir hago constar en mi carácter de Director que: Elvia Carolina Rivas Baquero, estudiante de la Maestría de Biología Molecular Médica de la Universidad de Buenos Aires, ha culminado satisfactoriamente todas las actividades relacionadas con la Tesis: **“ROL DE LA PROTEÍNA SPARC EN LA BIOLOGÍA ADENOVIRAL ORIENTADA AL USO TERAPÉUTICO”**

Atentamente,

Dr. Osvaldo Podhajcer

Director

Laboratorio de Terapia Molecular y Celular

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Adenovirus .....	1
1.1.1 Estructura .....	2
1.1.2 Ciclo de Infección Adenoviral .....	3
1.2 Viroterapia.....	5
1.3 Matriz Extracelular.....	7
1.3.1 SPARC .....	7
1.4 SPARC y adenovirus.....	9
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
2.1 Objetivo General .....	12
2.2 Objetivos Específicos .....	12
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
3.1 Líneas Celulares .....	13
3.2 Metodología Básica de Cultivo Celular .....	13
3.2.1 Preparación de Medio de Cultivo Celular: .....	13
3.2.3 Cultivo y viabilidad celular: .....	13
3.3 Vectores Adenovirales .....	15
3.4 Producción de Stock virales: .....	16
3.5 Purificación de la proteína SPARC humana .....	16
3.6 Western Blot.....	17
3.7 Ensayos para evaluar actividad Oncolítica.....	18
3.7.1 MTS/MTT .....	18
3.8 Ensayos para evaluar unión y entrada viral.....	18
3.8.1 Cuantificación mediante qPCR de E4.....	18
3.8.2 Citometría de Flujo.....	19
4.1 Purificación de la Proteína SPARC.....	20
4.2 Producción de Stocks Virales.....	22
4.3 Western Blot anti-SPARC.....	23
4.4 Efecto de SPARC sobre la lisis celular mediada por adenovirus oncolíticos .....	23
4.4.1 Efecto del medio condicionado de células que expresan o no SPARC sobre la lisis celular mediada por Adenovirus oncolíticos .....	25
4.4.2 Efecto de SPARC endógeno sobre la lisis celular mediada por adenovirus oncolíticos ..	29



4.4.3 Efecto de SPARC exógeno sobre la lisis celular mediada por adenovirus oncolíticos ....	30
4.5 Efecto de SPARC endógeno en la entrada adenoviral a la célula tumoral.....	32
4.5.1 Expresión de Receptores .....	32
4.5.2 Cuantificación de E4.....	33
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>41</b>

## INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 20 años se han realizado grandes avances en el campo de la terapia génica para el tratamiento del cáncer. Dentro de este campo, la estrategia denominada viroterapia, presenta adelantos prometedores. La viroterapia o utilización de vectores virales como estrategia terapéutica para infectar y destruir células cancerígenas, fue una de las primeras estrategias utilizadas para combatir el cáncer. Las partículas virales están naturalmente diseñadas para infectar distintos tipos de células y en algunos casos destruirlas. Estas últimas se denominan vectores o virus oncolíticos<sup>1</sup>.

Uno de los primeros vectores utilizados en estudios de terapia génica fueron los Adenovirus, debido a su alta capacidad infectiva y a su eficacia como vehículo de genes de interés. Además presentan una gran capacidad de infectar tanto células quiescentes como en división y pueden replicarse *in vitro*, alcanzando títulos virales elevados. Esto posibilita la producción y purificación a gran escala para su aplicación en la clínica. Actualmente existen más de 150 ensayos clínicos que utilizan vectores adenovirales para el tratamiento contra el cáncer, neoplasias, enfermedades metabólicas, entre otras.<sup>2</sup>

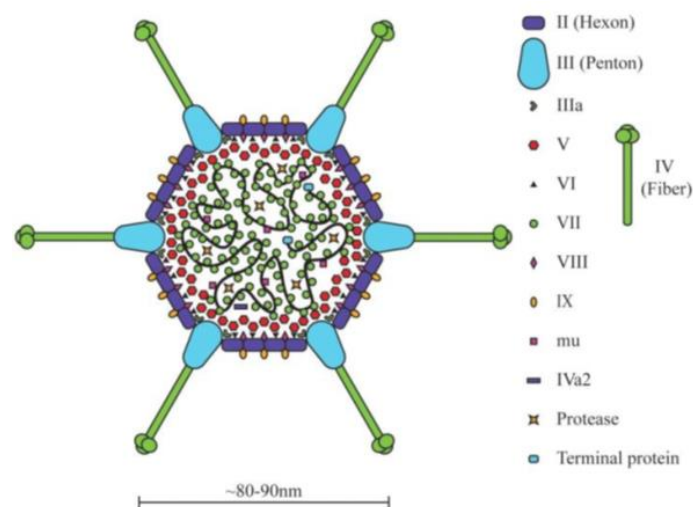
### 1.1 Adenovirus

Los adenovirus que infectan humanos están clasificados en más de 60 serotipos diferentes y están asociados a infecciones oculares, síndromes respiratorios y gastrointestinales agudos, así como también con infecciones fulminantes en niños y en pacientes inmunocomprometidos<sup>3</sup>.

Estos virus pertenecen a la familia *Adenoviridae*, la cual se divide en cuatro géneros: *Siadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus* y *Mastadenovirus*. Todos los adenovirus humanos pertenecen al género *Mastadenovirus*, de los cuales se conocen 51 serotipos, y pueden ser clasificados, mediante estudios de patrones de hemaglutinación y capacidad oncogénica en roedores, en seis subgrupos <sup>4</sup>.

### 1.1.1 Estructura

Los adenovirus son partículas virales de ADN doble cadena, sin envoltura y con un diámetro de 70-90 nm. Presenta un genoma de tamaño variable, entre 25 a 45 Kb, con repeticiones terminales invertidas (ITRs) en ambos extremos, en los cuales se encuentra la Proteína Terminal unida a los extremos 5'.<sup>5</sup>



**Figura 1. Representación gráfica de la estructura de un virión de Adenovirus 5<sup>6</sup>.** Se pueden observar las principales proteínas de la cápside compuesta por el Hexón, las Pentonas y la proteína IX. De esta cápside sobresalen las fibras que marcan la especificidad antigénica.

El ADN viral y las proteínas asociadas del "core" se encuentran contenidos en una cápside icosaédrica con 20 caras triangulares compuestas en su mayor parte por la proteína más grande de la cápside, denominada Hexón. De cada uno de los 12 vértices que forman las caras de la cápside se proyectan estructuras denominadas pentones,

constituidos por una estructura pentamérica, o Penton, a la cual se le une la Fibra viral, que contiene proteínas de adherencia vírica y con capacidad hemaglutinante. A su vez, en el extremo distal de la fibra viral, se encuentra un dominio globular denominado Knob.<sup>5</sup> (Figura 1)

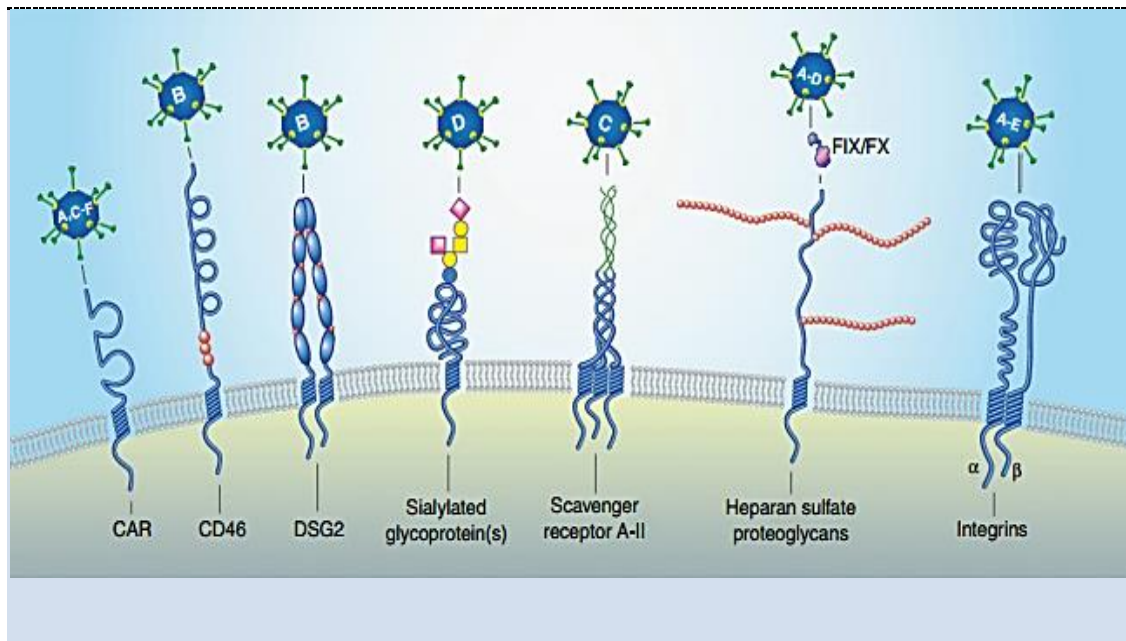
### 1.1.2 Ciclo de Infección Adenoviral

- Unión:

Las etapas tempranas de la infección adenoviral implican la unión inicial a la célula, por medio de la interacción de la Fibra, mediado por el dominio Knob, con el receptor primario de la superficie celular, y seguido por una interacción secundaria entre el Penton y una molécula de integrina, desencadenando así la endocitosis de la partícula viral, con el subsecuente escape endosomal y el tráfico celular al núcleo<sup>7</sup>.

Tanto la unión como el tropismo celular van a ser dependientes de la expresión del receptor primario. Las diferentes especies adenovirales presentan una mayor afinidad a determinados receptores celulares a los cuales se une la Fibra. Los más comunes y mayormente descritos son: CAR (“*Coxsackievirus-adenovirus receptor*” en inglés), CD46 y Desmogleína-2 (DSG2).<sup>8,9</sup> (Figura 2)

Especie	Serotipo/Tipo	Receptores
A	12, 18, 31	CAR
B1	3, 7, 16, 21, 50	CD46, DSG2, CD80, CD86
B2	11, 14, 34, 35	CD46, DSG2, CD80, CD86
C	1, 2, 5, 6	CAR, VCAM-1, HSPG, MHC1-a2, SR
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36,-39, 42-49, 51, 53, 54	SA, CD46, CAR
E	4	CAR
F	40, 41	CAR
G	52	ND



**Figura. 2 . Receptores celulares usados por los adenovirus.**<sup>9</sup>

- Entrada celular y tráfico intracelular:

El agrupamiento de partículas de adenovirus en la superficie celular luego de la unión a integrinas genera la formación e internalización del virus en vesículas cubiertas de Clatrina. Mientras el virus entra en la célula, empieza secuencialmente a perder sus proteínas de cápside, empezando por la fibra. El escape de la vesícula endosomal y la entrada en el citoplasma evita la degradación por lisosomas<sup>7</sup>.

Una vez en citoplasma, el adenovirus es capaz de secuestrar proteínas de Dineína para dirigirse al núcleo junto con los microtúbulos. Al llegar a los poros nucleares, el ADN genómico pasa a través de ellos hasta el núcleo para la expresión de genes virales<sup>7</sup>.

- Replicación de genes virales:

El genoma adenoviral está clasificado en genes tempranos o tardíos, dependiendo del momento en que son expresados, antes o después de la replicación viral<sup>7</sup>.

Cuatro unidades de transcripción codifican para proteínas que son requeridas para la transactivación de otras regiones virales, modificando el ambiente de la célula hospedadora y alterando la respuesta inmune: E1a, E1b, E3 and E4. E2 codifica para proteínas directamente relacionadas con la replicación viral. La mayor parte de las proteínas tardías estas organizadas en las unidades de transcripción L1 a L5 y generalmente codifican para proteínas estructurales del virión. Otros cuatro transcritos tardíos se producen, que van a codificar para las proteínas IX, IVa2 y los transcritos VA RNA I y II que contienen los orígenes de replicación. Adyacente a la izquierda del extremo ITR se encuentran las secuencias para empaquetamiento viral.<sup>6</sup> (Figura 3)



**Figura 3. Mapa simplificado del genoma de un Adenovirus 5.** Se muestran los genes de replicación temprana y tardía, así como también los extremos ITR, el elemento de empaquetamiento viral  $\psi$  y la posición del Promotor principal tardío (“MLP” en Inglés).<sup>6</sup>

## 1.2 Viroterapia

A diferencia de otros sistemas de vectores virales, los viriones de Adenovirus tienen alta capacidad de empaquetamiento y se replican fácilmente, obteniéndose títulos virales altos. Más allá de eso, los vectores adenovirales mantienen una alta estabilidad *in vivo* y presentan una capacidad infectiva tanto en células quiescentes como en división. A su vez, poseen versatilidad para ser inducidos como replicativos o no replicativos.

En relación a las características de su genoma, el tamaño del transgén puede ser de hasta 10 Kb. Persisten predominantemente como moléculas de ADN episomal con una baja frecuencia de integración al genoma, por lo cual, no ocurre mutagénesis por inserción. Estas propiedades hacen a los vectores adenovirales particularmente atractivos para aplicaciones en la terapia génica, donde el objetivo primordial es la expresión génica por encima de las modificaciones genéticas permanentes<sup>10</sup>.

Para alcanzar la transferencia génica en los tipos celulares deseados y asegurar la entrada del virus mediada por integrinas, son necesarias dosis altas del vector. Estas dosis altas aumentan los efectos secundarios en pacientes, como el secuestro viral en las células de Kupffer en el hígado<sup>10</sup>. Así, la mayoría de los esfuerzos se han concentrado hasta el momento en el desarrollo de adenovirus replicativos condicionales (“CRAbs” en sus siglas en inglés) diseñados para replicar exclusivamente en células tumorales.

Sin embargo, existen algunos problemas con la efectividad antitumoral. Uno de ellos, es la eficiencia infectiva mediada por la unión a receptores. La mayoría de los vectores adenovirales se construyen a partir del Adenovirus 5, el cual es el serotipo mayormente descrito. Este serotipo se une con preferencia al receptor CAR, el cual presenta alta expresión en cáncer de colón, y baja expresión en ciertos cánceres como el melanoma, cáncer de ovario, entre otros; limitando su capacidad infectiva en estas y otras malignidades. A partir de esta problemática se desarrollaron, entre otras estrategias, adenovirus con Fibras quiméricas en los cuales el dominio Knob es genéticamente reemplazado, en forma total o parcial (solo el Knob), con una contraparte estructural de otro serotipo humano que reconoce un receptor alternativo de la superficie celular, permitiendo la unión a otra variedad de receptores adenovirales.<sup>11</sup>

Otro aspecto a mejorar de los CRAbs es la difusión post-replicación y su diseminación intratumoral, particularmente por el efecto de la matriz extracelular en el tejido. En este sentido, por ejemplo, se está trabajando en vectores que expresan proteínas que modifican la matriz extracelular o la expresión de metaloproteasas para permitir una mejora en la distribución de las partículas virales<sup>12</sup>. Sin embargo, no existen muchos trabajos sobre el efecto de la matriz extracelular en el ciclo de vida adenoviral.

### **1.3 Matriz Extracelular**

La matriz extracelular (ECM en sus siglas en inglés) está compuesta por una gran variedad de componentes, que incluye proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos y polisacáridos con diferentes propiedades físicas y bioquímicas.<sup>13</sup>

En cáncer, la ECM es el mayor componente del nicho local y posee un papel esencial en varias etapas del proceso carcinogénico, debido a su diversidad funcional y dinámica en el comportamiento celular y procesos de desarrollo. Las propiedades bioquímicas de la ECM permiten su acción directa o indirecta sobre las células, lo que va a desencadenar la interacción de las mismas con su microambiente mediante diversas cascadas de transducción que van desde la superficie celular hasta el núcleo, resultando en cambios en la expresión de genes, entre otras cosas. Los principales contribuidores celulares que alteran las actividades de la ECM son las células del estroma, que incluyen a los fibroblastos asociados a cáncer y células inmunes, así como células epiteliales y células mesenquimales (“MSCs” en sus siglas en inglés).<sup>13</sup>

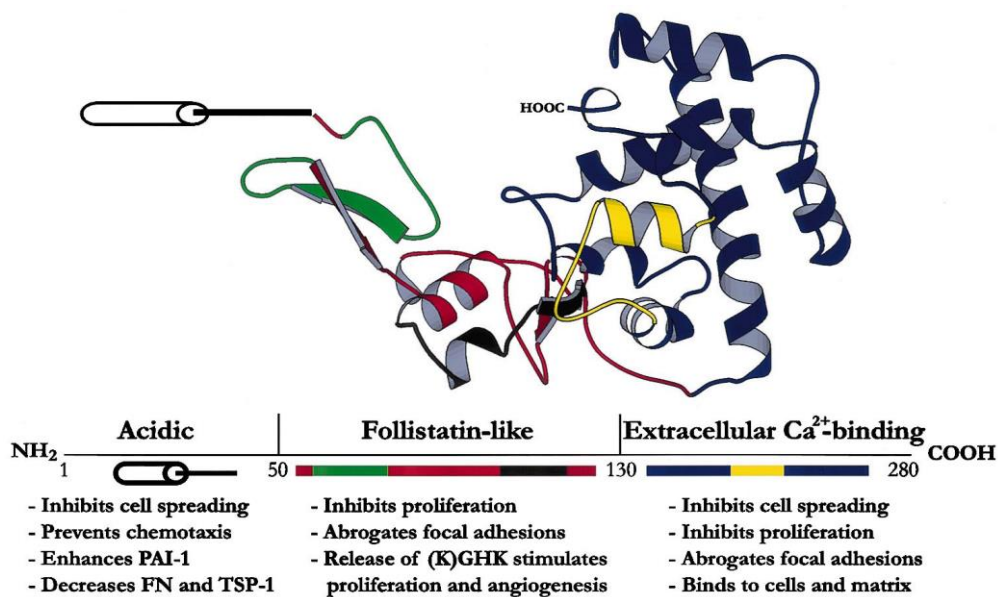
#### **1.3.1 SPARC**

SPARC o “*Secreted protein, acidic and rich in cysteine*” en inglés, también llamada *osteonectin* o BM-40, es una glicoproteína ácida de la ECM que está involucrada en



diversos procesos biológicos. Por cristalografía, se han identificado 3 módulos estructurales: un extremo N- terminal ácido, un folistatina “like” y un extremo C-terminal extracelular que une calcio 14 (Figura 4). Entre otras funciones, SPARC participa en el proceso de cicatrización de heridas como respuesta a una lesión y el remodelado de tejidos<sup>15</sup>.

SPARC presenta una función importante en procesos morfogénéticos, angiogénicos, de diferenciación celular, proliferación y migración. A nivel celular, actúa modificando la morfología celular, inhibiendo la proliferación, induciendo la de-adhesión *in vitro* así como la regulación de la deposición de la ECM. Su expresión es variable en diferentes tipos tumorales, sobre-expresándose en cáncer de mama, colon, esófago, próstata, melanoma y carcinoma hepatocelular.<sup>15</sup>



**Figura 4. Estructura de SPARC.** Diagrama de cintas derivado de datos de cristalografía. Representación de los tres dominios de SPARC con sus actividades. El dominio N terminal no se encuentra dentro de la estructura cristalográfica. En verde se encuentran los aas. 54-73, en negro los aas. 114-130, que contienen al péptido GHK, y en amarillo los aas. 254-273.<sup>14</sup>

Es interesante notar que, aunque no se conoce aún un receptor para SPARC, se ha propuesto que actúa haciendo “*shuttling*” entre la matriz y los endosomas promoviendo la remodelación de la matriz de colágeno, así como en la formación y liberación de vesículas pre-sinápticas en neuronas<sup>16</sup>. Por otro lado, también está asociada a la remodelación de la matriz y la interacción con integrinas<sup>17</sup>, eventos asociados con la unión, la internalización y lisis adenoviral<sup>18</sup>.

#### **1.4 SPARC y adenovirus**

Nuestro grupo de trabajo realizó la construcción y caracterización de un CRAd denominado Ad 5/3 NHS, el cual está regulado por un promotor específico de tumor el cual es una triple quimera que contiene un fragmento del promotor de SPARC, combinado con un motivo de respuesta a hipoxia (3XHRE) y otro de respuesta al factor de transcripción NF-kB (12XkB). Este CRAd contiene además una fibra quimera del tipo 5/3.<sup>19</sup>

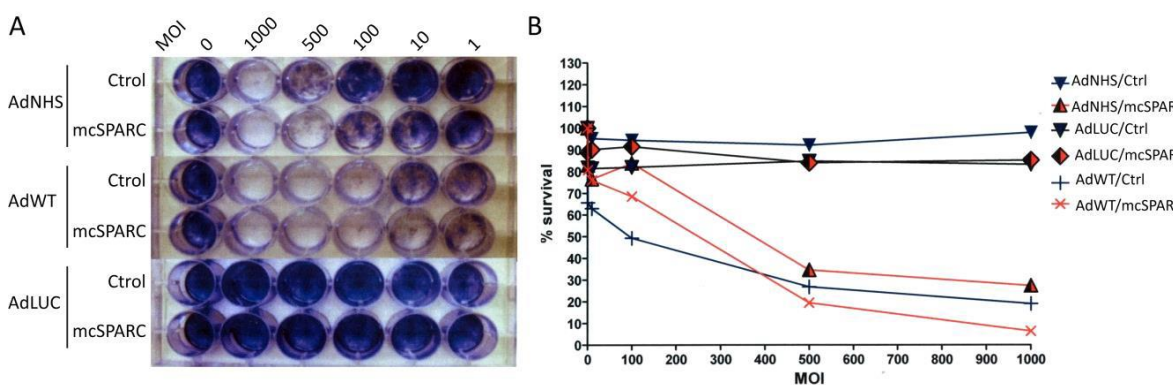
Los CRAds son capaces de eliminar células tumorales a una multiplicidad de infección inicial de entre 0,1 y 10. Así también, son capaces de eliminar a las MSCs pero a una multiplicidad de infección (“MOI” en sus siglas en inglés) mayor y más lentamente.

Estudios previos de nuestro grupo, tuvieron como objetivo utilizar MSCs como células transportadoras de CRAds, debido a sus propiedades de migrar e integrarse al tejido tumoral.<sup>20</sup> En ensayos *in vitro* se determinó una ventana temporal/MOI, de modo de dar tiempo a que las MSCs, que transportan a los CRAds a la zona del tumor, llegaran sin ser eliminadas en el trayecto por los mismos adenovirus que transportan. Durante estos estudios observamos que se necesitaba una elevada MOI del CRAds Ad 5/3 NHS para que este comenzara a eliminar a las MSCs *in vitro* (MOI mayor de 5000).

Llamativamente, Ad 5/3 NHS fue capaz de eliminar a las MSCs a partir de una MOI de 10 en presencia de medio condicionado de células de melanoma (MC-Mel) (Figura 5).

A su vez, dicho medio condicionado fue capaz de estimular la lisis de las MSCs por el adenovirus salvaje, utilizado como control positivo (Ad 5/3 WT).

Por otro lado, no se produjo lisis alguna al infectar con el Ad 5/3 Luc, un virus control negativo, en el cual el gen iniciador de la transcripción adenoviral E1 había sido reemplazado por el gen de la Luciferasa (Figura 5). Sin embargo, estos ensayos no nos permiten asociar el aumento de la capacidad lítica con ningún evento específico del ciclo de vida adenoviral. Ya que el aumento de la eficiencia podría estar asociado a un aumento en la adhesión/internalización viral, donde la presencia de SPARC podría aumentar la cantidad de viriones que infectan a cada una de las células, y el efecto generado puede producir un aumento en la actividad general de los promotores virales, estimulando la producción temprana de mayor cantidad de partículas y por lo tanto una lisis temprana o al aumento en la fragilidad de la membrana celular, que generaría una lisis prematura con menor cantidad de partículas virales.



**Figura 5. Actividad lítica.** A) Se sembraron 20.000 MSC (Naval10) por pocillo y se infectó con distintas MOI de AdNHS, AdWT o AdLUC. Luego se incubó por 72hs con medio condicionado de A375 (mcSPARC) o medio control (Ctrl) y se visualizaron las células remanentes mediante tinción con cristal violeta. B) Se relativizó al valor de MOI=0 como 100% de supervivencia. Se graficó la supervivencia remanente a las distintas MOIs.

Estos resultados sugieren por primera vez el efecto directo de una proteína de matriz extracelular sobre la biología adenoviral directamente. Sin embargo, queda por resolver

en cuales de los eventos que componen el ciclo de vida adenoviral estaría actuando SPARC y si este efecto observado sobre las células mesenquimales se reproduce sobre las células tumorales. Para ello nos propusimos definir el efecto de la expresión de SPARC sobre el efecto lítico adenoviral en distintas estirpes tumorales. El efecto del pretratamiento, la presencia durante o con posterioridad a la infección adenoviral de medios condicionados conteniendo o no SPARC sobre la actividad lítica. Se evaluará comparativamente contra el efecto de la proteína purificada en medio fresco y se determinarán los niveles de replicación adenoviral y de receptores específicos en las células tratadas con medios con distintas concentraciones de SPARC e infectadas con Adenovirus del tipo salvaje pero quimérico en la fibra del tipo 5 y 3 descrito anteriormente.

## **OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

Definir el efecto de la presencia de SPARC en la lisis celular por infección con CRAds y su comparación con el virus de tipo salvaje.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- A. Purificar la proteína SPARC humana.
- B. Definir el efecto de los medios condicionados de células malignas que expresan SPARC sobre la capacidad lítica de los CRAds.
- C. Definir el efecto de la expresión de SPARC por células malignas sobre la capacidad lítica de los CRAds.
- D. Definir el efecto de la proteína purificada SPARC sobre la actividad de los CRAds.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Líneas Celulares

- MiaPaca-2: Células de carcinoma pancreático humano.
- A375: Células de melanoma humano.
- HEK293A: Células embrionarias de riñón humano transformadas. Contiene una copia integrada estable del gen de E1 que codifica para las proteínas E1 (E1a y E1b), necesaria para generar adenovirus recombinantes.

### 3.2 Metodología Básica de Cultivo Celular

#### 3.2.1 Preparación de Medio de Cultivo Celular:

- Medio de Cultivo para células Eucariotas: DMEM alta glucosa estéril, enriquecido con 10% suero fetal bovino (SFB) y 1% L-Glutamina.
- Medio de congelamiento para células eucariotas: 10% DMSO, 10% SFB, 80 % DMEM alta glucosa.
- Buffer Fosfato Salino (PBS).
- Tripsina/EDTA en PBS 0.25%.

#### 3.2.3 Cultivo y viabilidad celular:

Todos los cultivos celulares se realizaron utilizando el medio de cultivo para células eucariotas antes definido, en placas de cultivo de 10 cm de diámetro (Cellstar® Bio-One). Se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

Todas las células utilizadas se encontraban preservadas en el tanque de nitrógeno líquido a -196°C, en viales estériles con medio de congelación para células eucariotas

(antes definido) y medio de cultivo. Se procedió a descongelar tales viales de la siguiente manera:

Los criotubos se sumergieron rápidamente en un recipiente con agua a 37°C. Una vez descongeladas las células, y dentro de una campana de flujo laminar, se procedió a rociar los viales con Etanol a 70% con el fin de evitar una posible contaminación. Se transfirió el contenido a una placa de cultivo celular con medio DMEM alta glucosa enriquecido con 10% SFB. Se procedió luego a incubar dicha placa a 37 °C en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar la confluencia deseada. Para realizar el conteo de células y/o evaluar las condiciones del cultivo celular, se determinó la viabilidad celular de los cultivos con una solución Azul de Tripán al 0.1%, el cual es un colorante vital, se lavaron las células con PBS (Buffer Fosfato Salino) y se realizó una dilución 1:2 de la solución de Azul de Tripán y las células del cultivo. Posteriormente se adicionaron 20 µl de dicha solución en una cámara de contaje Neubauer. Esta cámara posee 2 retículos con 9 cuadros cada uno. Para el contaje se utilizó un solo retículo contando solo las células que se distribuyan en los cuadros ubicados en las esquinas del mismo, contando solo 2 cuadros, estos están divididos a su vez en 16 cuadrantes. En estos cuadrantes se procedió al conteo de las células viables (translúcidas) y no viables (azules) utilizando un microscopio de contraste de fase. Se sumaron las células viables y las no viables, se dividieron entre 2 y se multiplicaron por el factor de dilución. El resultado se expresó en células/ml. A partir de este resultado se tomaron el número de células necesarias para sembrar en las placas correspondientes, de acuerdo a los requerimientos del diseño experimental.

### 3.3 Vectores Adenovirales

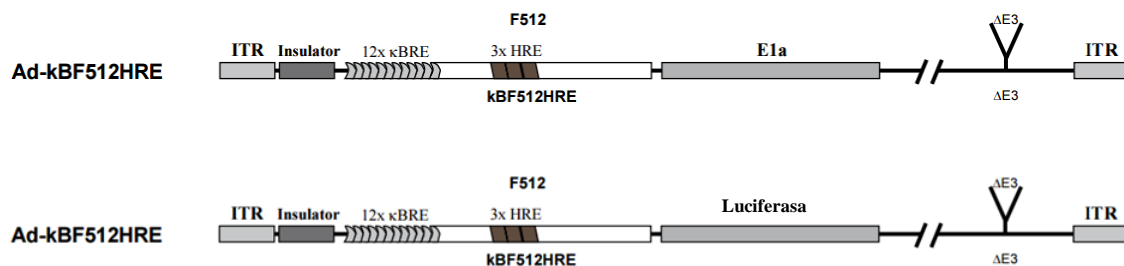
Se utilizaron 3 vectores adenovirales a lo largo de todo el trabajo con la base genética de Adenovirus 5, sobre la cual se realizaron las modificaciones a continuación descritas.

(Tabla 1 Virus y Modificaciones)

Virus	Modificación
Adenovirus 5/3 WT	Knob de la fibra de Ad 3
Adenovirus 5/3 kBF512HRE-Luciferasa	Knob de la fibra de Ad 3. Promotor quimera humano kBF512HRE.  Delección del gen E3. Sustitución del gen de E1a por el de Luciferasa
Adenovirus 5/3 kBF512HRE-E1	Knob de la fibra de Ad 3. Promotor quimera humano kBF512HRE  aguas arriba de E1a. Delección del gen E3.

**Tabla 1 Virus y Modificaciones**

El promotor quimera humano kBF512HRE posee un fragmento del promotor de SPARC, denominado F512, elementos respondedores a NF- $\kappa$ B y elementos respondedores a Hipoxia. Este promotor se abreviará a lo largo de este trabajo con las siglas NHS. . A continuación se grafican los vectores utilizados:





### **3.4 Producción de Stock virales:**

Se produjo a partir de la infección de 30 placas de cultivo de 15 cm de diámetro (Cellstar® Bio- One) de células HEK293A. Luego de 24-36 horas, cuando se observó un efecto citopático marcado en aproximadamente el 80% de las células, se recolectó el medio de cultivo junto con las células y se centrifugó a 1000 rpm por 10 min. El pellet se resuspendió en 24 ml de PBS y se sometió a tres ciclos de congelamiento y descongelamiento para liberar el virus de las células. Posteriormente, se centrifugó nuevamente y se recuperó el sobrenadante. A continuación se procedió a purificar el virus por gradiente con cloruro de cesio.

El sobrenadante obtenido se colocó sobre un tubo conteniendo dos fases de cloruro de cesio de diferentes densidades (1,6 y 1,3). Se ultra-centrifugó durante 2 horas y se aisló el virus mediante la extracción de la banda con jeringa de 3 ml y aguja (21G). Este virus se colocó en una nueva columna sobre cloruro de cesio de densidad 1,33 y se centrifugó durante una noche. Se extrajo el virus nuevamente mediante la utilización de jeringa. El extracto fue insertado en una columna Sephadex G-25 equilibrada con 30 ml de Tris-Cl (pH 7,2) y luego se fue agregando 500 µl de Tris-Cl para obtener el virus entre las alícuotas 4 y 7. Se evaluó la cantidad de partículas virales mediante densidad óptica en espectrofotómetro y se utilizaron las fases que obtuvieran más de  $1,1 \times 10^{11}$  p.v. ( $>0,01$  U.A.) para alicuotar en tubos de 0,5ml. El título obtenido mediante este método describe la cantidad de partículas virales por ml mediante densidad óptica (v.p./ml [DO]), no mediante actividad biológica.

### **3.5 Purificación de la proteína SPARC humana**

SPARC humana fue purificada a partir de medio condicionado libre de suero de células A375 obtenido después de 24 horas, centrifugado y suplementado con inhibidores de proteasa (PMSF 1mM, EDTA 1mM, Azida 0.01%). Se procedió a la ultrafiltración con

una membrana YM10, MW “cut off” 10.000 (Millipore Corp., Billerica, MA), y se dializó utilizando como Buffer Tris-HCl 20 mmol/L (pH 7.9). Posteriormente, la muestra se cargó en una columna HiTrap Q (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y se eluyó con un gradiente continuo de sal (Tris 20 mM pH7.8, 1M NaCl).

Las muestras seleccionadas se corrieron en un gel SDS-PAGE y aquellas que mostraron el tamaño compatible con SPARC y una pureza mayor al 90%, se mezclaron y se dializaron utilizando TBS 1X como Buffer, para posteriormente correrlas en una columna Superdex 200.

Las fracciones que contienen SPARC recolectadas se concentraron con una Centricon 10 (Millipore Corp., Billerica MA), mediante tres centrifugaciones cambiando con PBS de cultivo una vez. La proteína fue esterilizada mediante su paso por un filtro 0.22 nm y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.6 Western Blot**

La expresión de SPARC en los medios condicionados y extractos celulares de las líneas utilizadas se evaluó mediante Western Blots utilizando anticuerpos específicos anti SPARC.

Las muestras se sembraron en geles SDS-PAGE al 10% de poliacrilamida junto a marcadores de peso molecular (GE Healthcare) y se separaron electroforéticamente. Una vez culminada la corrida las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa aplicando un voltaje de 90 V durante una hora en una cuba de transferencia. Una vez finalizada la misma, la membrana fue bloqueada con leche descremada al 5% en PBS durante una hora, para luego incubarla durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  con el anticuerpo monoclonal anti-SPARC AON-1 1:250 (Developmental Studies Hybridoma Bank). Se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0,05% sobre la membrana,

de 5 minutos cada uno. Posteriormente, se agregó una solución 1:2500 de IgG de cabra con especificidad anti-IgG de ratón, conjugada a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson), y se incubó por 1 hora.

Se revelaron las membranas con “ECL Plus Pierce, Western Blotting Substrate” (Thermo Diagnostics) y se registraron usando el equipo LAS 4000 (GE).

### **3.7 Ensayos para evaluar actividad Oncolítica**

#### **3.7.1 MTS/MTT**

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células en placas de 24 pocillos. Al día siguiente fueron infectadas con dosis crecientes de los Adenovirus en 200ul de medio DMEM/F12 conteniendo 2% de SFB y luego de 4 horas de infección se realizó un lavado con PBS, para posteriormente agregar 1 ml del correspondiente medio conteniendo 10% de SFB. Las cantidad de virus utilizada varía desde 1 a 1000 MOI. Luego de 6 días se realizó el ensayo de MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium) o MTT (3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio bromuro)), que permiten determinar el índice metabólico mitocondrial, siendo reflejo indirecto del número del porcentaje de supervivencia celular y se utilizaron de manera indistinta de acuerdo a la disponibilidad del reactivo en el laboratorio.

### **3.8 Ensayos para evaluar unión y entrada viral**

#### **3.8.1 Cuantificación mediante qPCR de E4**

La replicación viral se evaluó realizando la amplificación y cuantificación, mediante ensayos de PCR en tiempo real, de la región E4 del genoma adenoviral.

Se realizó la purificación de ADN utilizando el Wizard GenomicDNA Purification Kit (Promega). La PCR en tiempo real se realizó utilizando el StepOne® Real Time PCR System.

Se utilizaron los cebadores: **E4F** ACAAGCTCCTCCCGCGTTAG **E4R** ACTACGTCCGGCGTTCCAT. Los controles negativos sin templado fueron realizados en cada serie de reacciones.

Para cuantificar el número de copias de genoma adenoviral se utilizó una curva de  $10^2$  a  $10^8$  copias de genoma adenoviral y se calculó el número de copias presentes en cada muestra a partir de la regresión lineal de los datos obtenidos en la curva. Los datos se expresaron como copias de genoma adenoviral/ng ADN de la muestra.

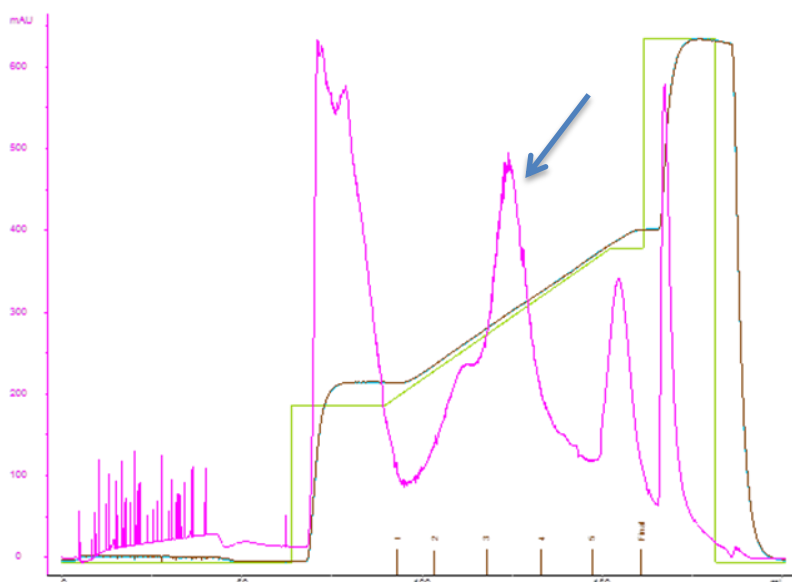
### **3.8.2 Citometría de Flujo**

A partir de  $5 \times 10^4$  células, se realizó citometría de flujo para los receptores de adenovirus CAR (Santa Cruz Biotech), CD46 (Santa Cruz Biotech) y Desmogleína-2 (abcam®). Los anticuerpos primarios fueron incubados con las células durante 1 hora en la oscuridad. Posterior a 3 lavados con PBS/BSA 3%, se agregó el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a Cy5, el cual se incubó durante 1 hora en la oscuridad. Se realizaron nuevamente 3 lavados, se resuspendieron las células marcadas en PBS/BSA 3% y se determinaron las células positivas para cada receptor en el citómetro (BD FACSCalibur). Los resultados obtenidos se analizaron con el programa “Cyflogic” y se representaron en histogramas.

## RESULTADOS

### 4.1 Purificación de la Proteína SPARC

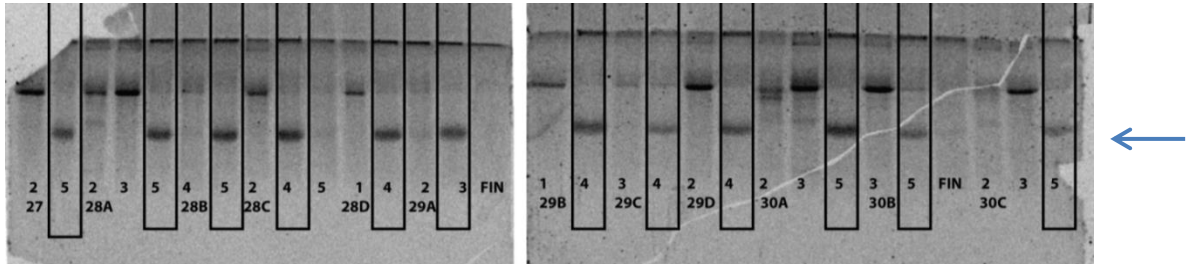
Se colectaron 4 litros de medio condicionado sin suero proveniente de las células A375. Se concentró 7 veces mediante ultrafiltración con umbral de corte de 10kDa y se dializó el concentrado en Tris-Cl 20mM pH 7,8. Se obtuvieron 600ml de Medio Condicionado Concentrado, los cuales fueron fraccionados utilizando una columna de intercambio iónico HiTrap Q y eluído en gradiente de NaCl. (Figura 6)



**Figura 6. Cromatograma.** Perfil de elusión del Medio Condicionado, obtenido de la cromatografía de intercambio iónico en columna Mono Q en gradiente lineal de 200-600uM NaCl. Al perfil de absorbancia a 280nm (---) se le superponen el gradiente de NaCl teórico (---) y real (---). La flecha indica la fracción enriquecida en SPARC.

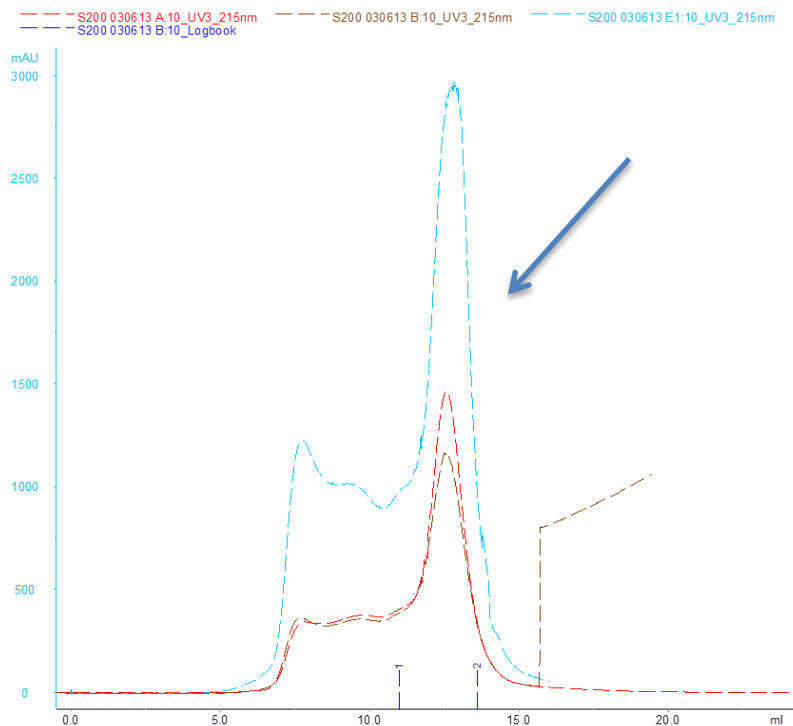
Se tomaron las fracciones eluídas contra 300 y 450mM de NaCl y se verificó la presencia de proteínas en SDS-PAGE 12% seguido de tinción con Sypro Ruby. Se colectaron y mezclaron las fracciones que contenían bandas correspondientes al tamaño

de SPARC (42kD) (Figura 7) y se concentraron nuevamente realizando un intercambio de búfer a PBS.



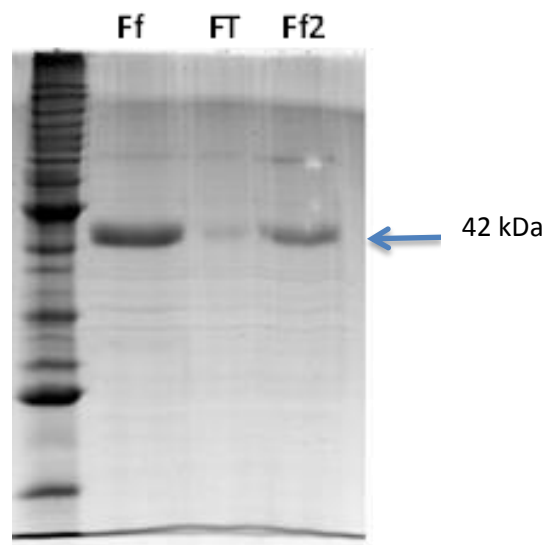
**Figura 7. Gel SDS-PAGE 12% Sypro Ruby.** Fracciones numeradas como en el gráfico del AKTA (el número indica cuando se empezó a coleccionar) se recuadra las fracciones mezcladas utilizadas para el tamiz molecular. La flecha indica 42kD.

El eluato concentrado fue corrido en una columna de tamizaje molecular Superdex 200 donde se coleccionaron las fracciones únicas con alta absorbancia a 280nM (Figura 8)



**Figura 8. Cromatograma Purificación de SPARC por tamiz molecular.** Se superponen los perfiles de tres inyecciones de 500ul de eluato concentrado. La flecha indica el pico esperado de SPARC. La flecha indica el pico correspondiente a SPARC

El volumen final obtenido al juntar las muestras pertenecientes a los picos esperados de SPARC positivo fue de 15 ml. Se concentró mediante sistemas Centricon con membranas de 10kD de exclusión llevándose a una concentración final 1 mg/ml, medida por absorbancia a 280nM. Se comprobó la identidad de la proteína con un Western Blot anti SPARC y se cuantificó la pureza de la fracción final mediante SDS-PAGE 12 con tinción de SyproRuby (Figura 9)



**Figura 9. Sypro Ruby SDS PAGE 12%.** Ff=fracción final; FT: fracción remanente; Ff2: fracción final 2.

#### 4.2 Producción de Stocks Virales

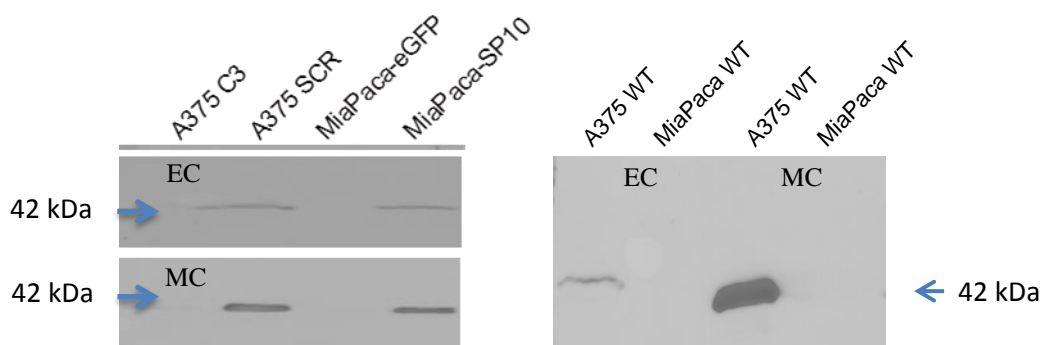
En la Tabla 2 se presentan los Stock virales realizados, mediante purificación por diferencia de gradientes con cloruro de cesio con sus respectivos títulos. Los adenovirus con Fibra quimera 5/3 únicamente se titularon en base a su DO, ya que el método de titulación para obtener su TCID<sub>50</sub> es variable y poco específico para estos adenovirus que poseen Fibra quimera.

Virus	vp/ml [OD]
Ad 5/3 NHS	1,25E+12
	2,53E+12
Ad 5/3 Luc	1,27E+12
Ad 5/3 WT	4.07E+12

**Tabla 2.** Stocks Virales realizados, con sus respectivos títulos

### 4.3 Western Blot anti-SPARC

Con el objetivo de analizar la expresión de la proteína SPARC, se realizaron Western Blots con los medios condicionados y los extractos celulares de las líneas utilizados en los distintos ensayos. Las bandas obtenidas coinciden con el tamaño esperado para SPARC de 43 Kb. (Figura 10)



**Figura 10. Western Blot anti-SPARC.** Medios condicionados (MC) y extractos celulares(EC) de A375 y MiaPaca. Banda de 42kDa compatible con el tamaño de SPARC.

### 4.4 Efecto de SPARC sobre la lisis celular mediada por adenovirus oncolíticos

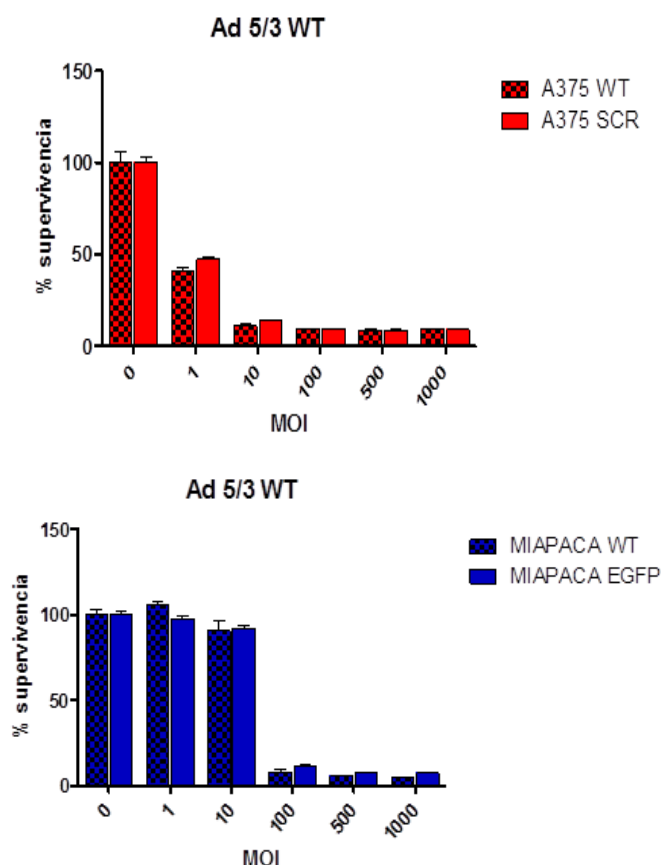
Para establecer el efecto de la presencia de SPARC en la lisis celular mediada por adenovirus oncolíticos. Se utilizaron dos líneas: una línea de melanoma humano maligno A375 que expresa SPARC y que fue transfectada en forma estable con un siRNA para SPARC (clon A375.-C3) y su control con un siRNA “scrambled” (A375.-SCR) y una línea de cáncer de páncreas MiaPaCa2 transfectada en forma estable con un



plásmido expresando el cDNA de SPARC (clon MiaPaca-Sp 10) o eGFP como control (MiaPaca-eGFP).

Las células fueron infectadas con diferentes MOI (de 1 a 1000) del Ad 5/3 NHS y Ad5/3 WT y al cabo de 6 días de incubación se evaluó la viabilidad por MTS o MTT.

Primeramente se analizó si las células modificadas artificialmente se comportaban de manera similar a las células parentales, de manera tal de evaluar si las modificaciones realizadas alteraban de alguna manera la capacidad infectiva de la célula. Para ello se realizaron infecciones en las diversas líneas con el Ad 5/3 WT a diferentes MOI y se observó que presentaban un patrón de lisis similar. (Figura 11)

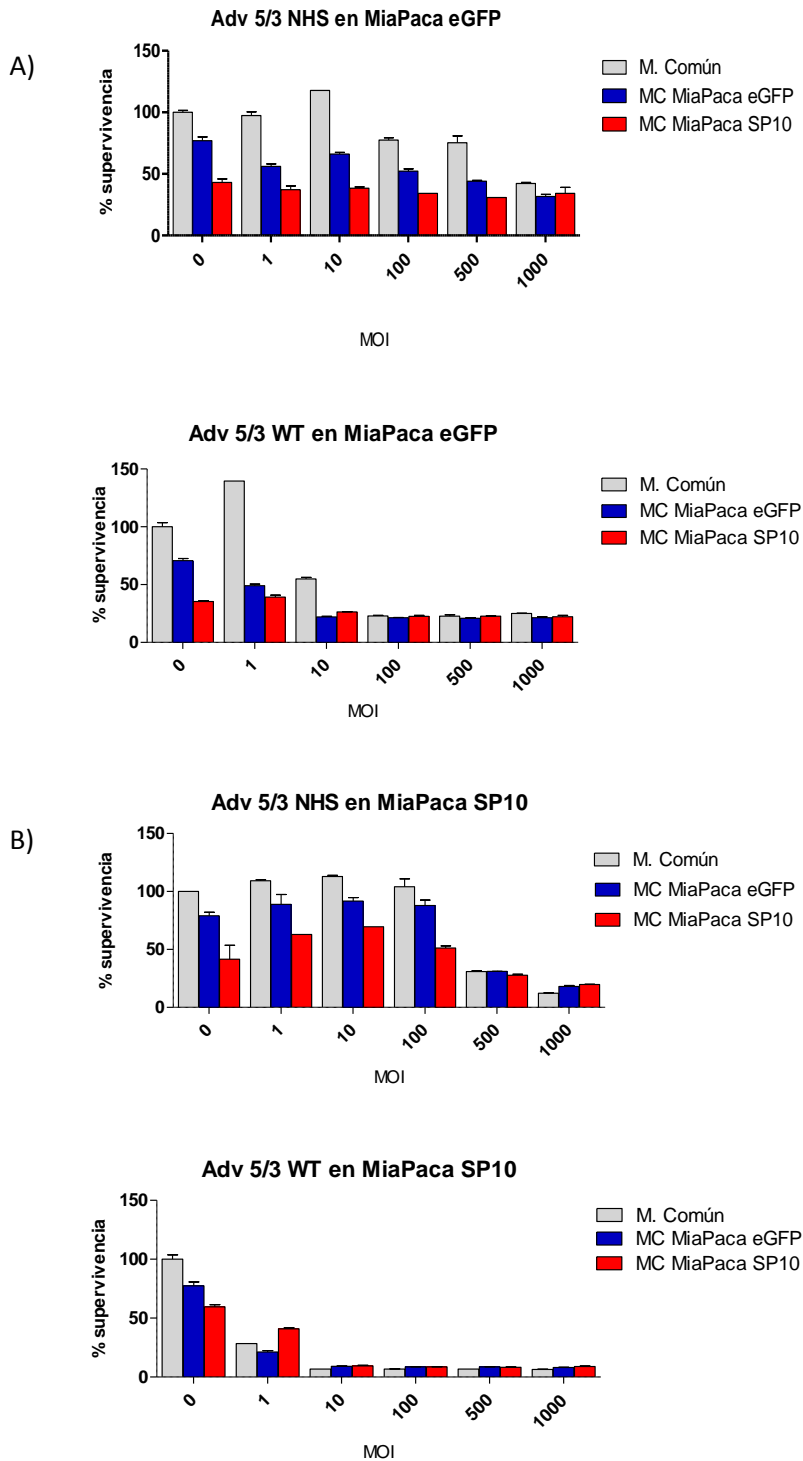


**Figura 11. Las células control para siRNA Scramble y lentivirus cDNA eGFP se lisan de forma similar a las células parentales (wt). MTS de la actividad lítica del Adenovirus 5/3 WT en A375 WT y SCR y MiaPaca WT y MiaPaca eGFP a diferentes MOI (0.1 a 1000)**

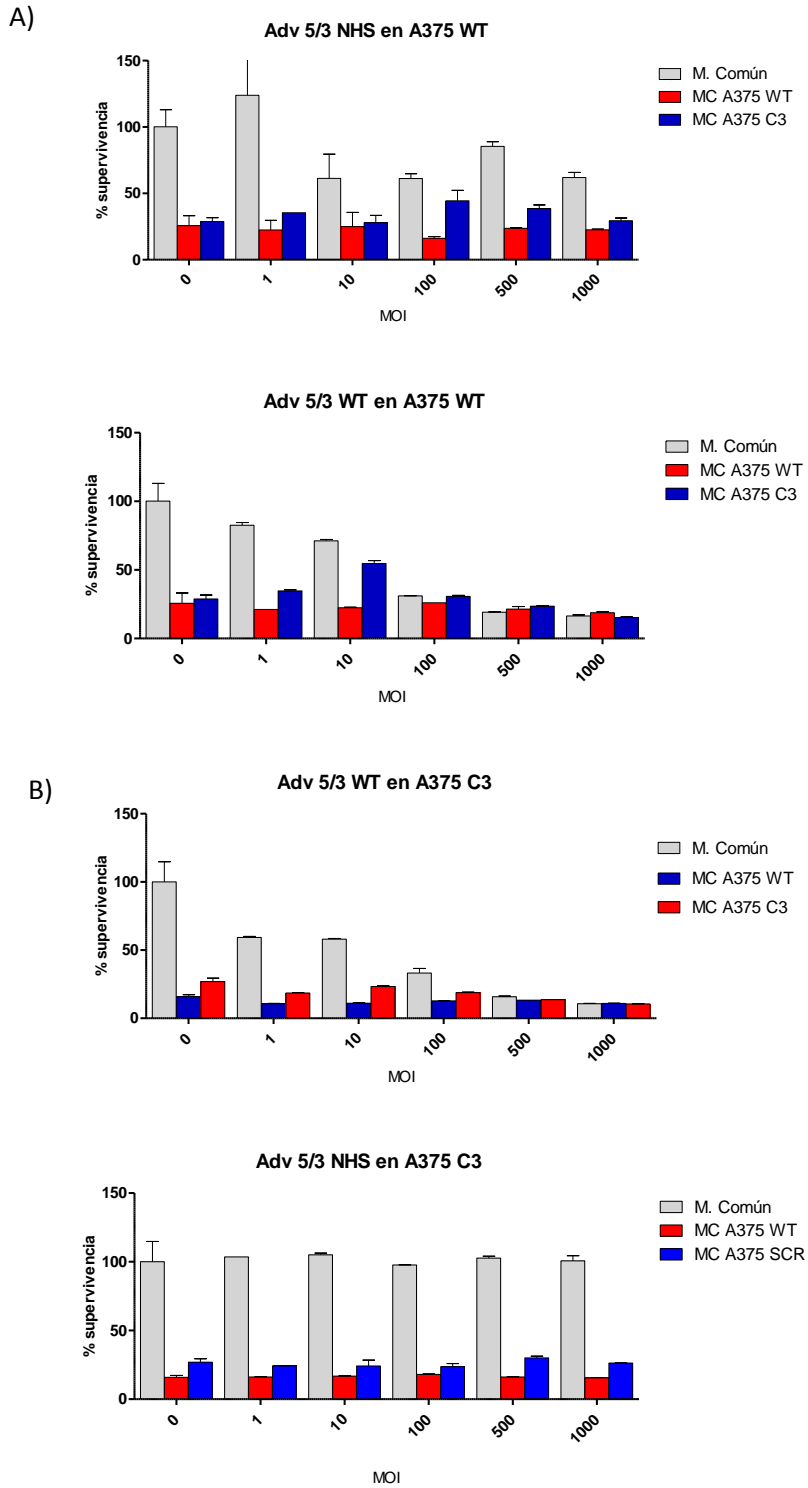
#### **4.4.1 Efecto del medio condicionado de células que expresan o no SPARC sobre la lisis celular mediada por Adenovirus oncolíticos**

En esta etapa, se buscó evaluar el efecto de medios condicionados provenientes de células que expresan o no SPARC en la lisis mediada por los adenovirus oncolíticos. Las células fueron infectadas con el virus correspondiente y 4 horas post infección se agregó el medio condicionado y se mantuvieron en presencia del mismo hasta el final del ensayo.

Tanto en las células MiaPaca2 (Figura 12) como en las A375 (Figura 13) la presencia del medio condicionado produjo una inhibición en el crecimiento celular, observándose una marcada diferencia entre el crecimiento de las células en medio común más 10% Suero Fetal Bovino y las que se cultivaron con medio condicionado, las cuales más que crecer o morir, se mantuvieron en un estado estacionario a lo largo del tiempo y de manera independiente a infección adenoviral.

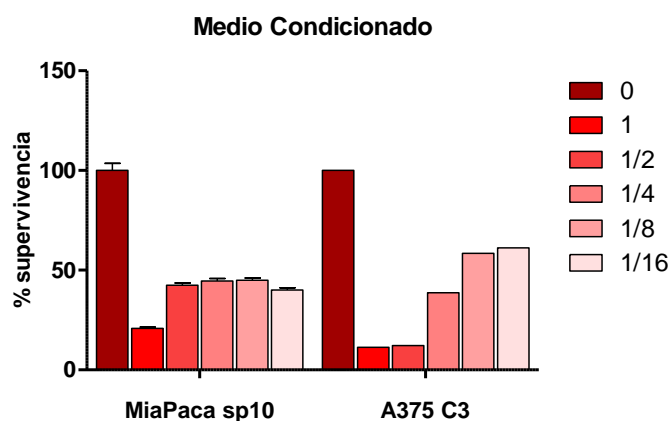


**Figura 12. Actividad lítica in vitro de Ad 5/3 WT y NHS en presencia de medio condicionado en células MiaPaca.** Curvas de supervivencia de A) MiaPaca eGFP y B) MiaPaca sp10 luego de ser infectadas con Ad 5/3 WT y NHS en presencia de medio común y medio condicionado (MC) de MiaPaca eGFP y MiaPaca SP10



**Figura 13. Actividad lítica in vitro de Ad 5/3 WT y NHS en presencia de Medio Condicionado en células A375.** Curvas de supervivencia de A) A375 SCR y B) A375 C3 luego de ser infectadas con Ad 5/3 WT y NHS en presencia de medio común y medio condicionado (MC) de A375 WT y A375 C3

Teniendo en cuenta que el crecimiento celular se observó afectado por la presencia del medio condicionado, se sembraron las células MiaPaca sp10 y A375 C3 con el objetivo de evaluar si al diluir el medio, se diluía el factor que podía estar ocasionando la inhibición del crecimiento celular. Se mantuvieron en cultivo durante 6 días en presencia del medio condicionado de las mismas a diferentes diluciones sin ser infectadas, (Figura 14)



**Figura 14. Porcentaje de Supervivencia de células A375 C3 y MiaPaca sp10 ante diluciones seriadas de Medio Condicionado.**

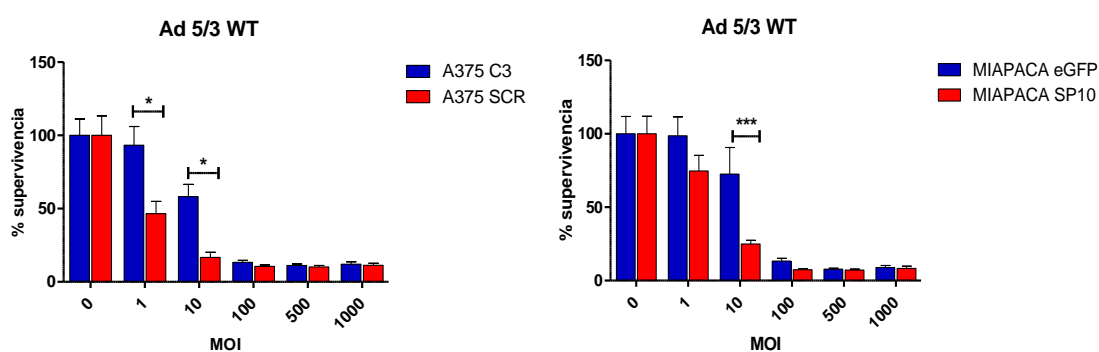
En las diluciones más altas utilizadas (1/8 y 1/16) solo se obtuvo un 50% de supervivencia celular en relación con el control sin medio condicionado. Esto indicaría que esta metodología no resultaría útil para evaluar el efecto de SPARC en medio condicionado en la oncólisis adenoviral, ya que al diluir el medio condicionado, estaríamos diluyendo a su vez la proteína contenida en el mismo.

#### 4.4.2 Efecto de SPARC endógeno sobre la lisis celular mediada por adenovirus oncolíticos

Se procedió entonces a evaluar si la expresión endógena de SPARC favorecía la oncolisis adenoviral. Para ello se infectaron con Ad 5/3 NHS y Ad 5/3WT, las células MiaPaca eGFP y SP10 y A375 SCR y C3.

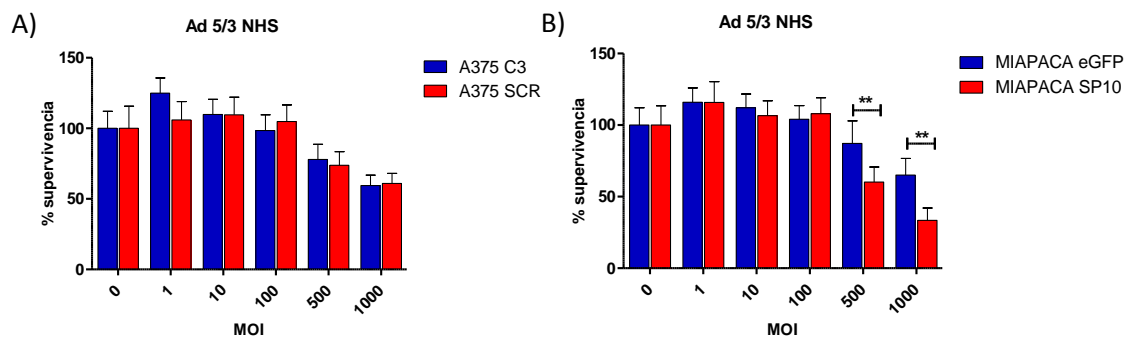
En el caso del Ad 5/3 WT notamos una diferencia significativa en MOI de 10 y 1 entre las A375 SCR (expresan SPARC) y las A375 C3 (no expresan SPARC). Las A375 SCR presentan una menor supervivencia ante la infección adenoviral que su contraparte A375 C3, indicando que la expresión endógena de SPARC estaría favoreciendo la lisis celular en esta línea. (Figura 15)

Este mismo efecto se puede apreciar entre las MiaPaca eGFP (no expresa SPARC) y MiaPaca SP10 (expresa SPARC), en donde esta última tiene un menor porcentaje de supervivencia en relación a MiaPaca eGFP a MOI de 10. (Figura 15)



**Figura 15. Efecto de la expresión endógena de SPARC sobre la Lisis adenoviral.** Curva de supervivencia de A) A735 C3 y A375 WT y B) MiaPaca eGFP y MiaPaca sp10 infectadas con Ad 5/3 WT (\*  $p < 0.05$  - \*\*\* $p < 0.001$ )

A continuación se realizaron infecciones con Ad 5/3 NHS, y notablemente se observó que en el caso de A375 no existía diferencia entre ambas líneas. Sin embargo, en MiaPaca2 a MOI de 500 y 1000 se observó una supervivencia menor en SP10 en relación a eGFP. (Figura 16)



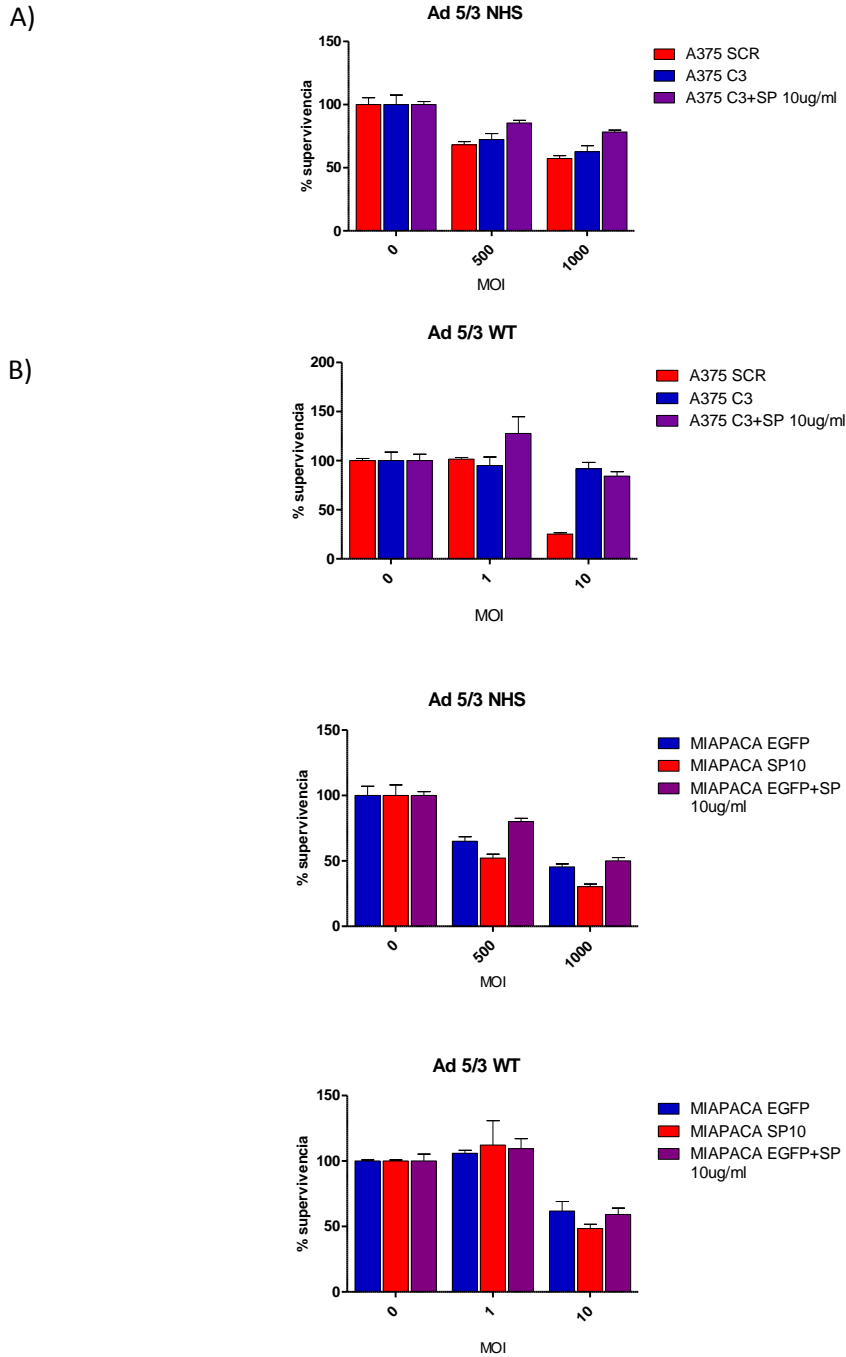
**Figura 16. Efecto de la expresión endógena de SPARC sobre la Lisis adenoviral.** Curva de supervivencia de A) A375 C3 y A375 WT y B) MiaPaca eGFP y MiaPaca sp10 infectadas con Ad 5/3 NHS ( $p < 0.01$  \*\*)

#### 4.4.3 Efecto de SPARC exógeno sobre la lisis celular mediada por adenovirus oncolíticos

Debido a que la expresión endógena de SPARC ejercía un efecto sobre la oncolisis adenoviral, se quiso establecer el efecto directo de la proteína SPARC nativa sobre la actividad lítica de los AOL. Para determinar el efecto “enhancer” de SPARC en la actividad lítica todos los tipos celulares fueron incubados a un único tiempo y a dos MOI viral a partir de lo obtenido en el punto anterior. Estas condiciones se obtuvieron a partir del tiempo mínimo que demora una MOI viral determinada para eliminar alrededor del 50% (o menos) de las células.

A esas MOI y tiempo enfrentamos a las células con diferentes concentraciones de la proteína SPARC (2 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) y evaluamos la actividad lítica, como se realizó anteriormente. La proteína se agregó a tiempo 0 y 4 horas posteriores a la Infección y se

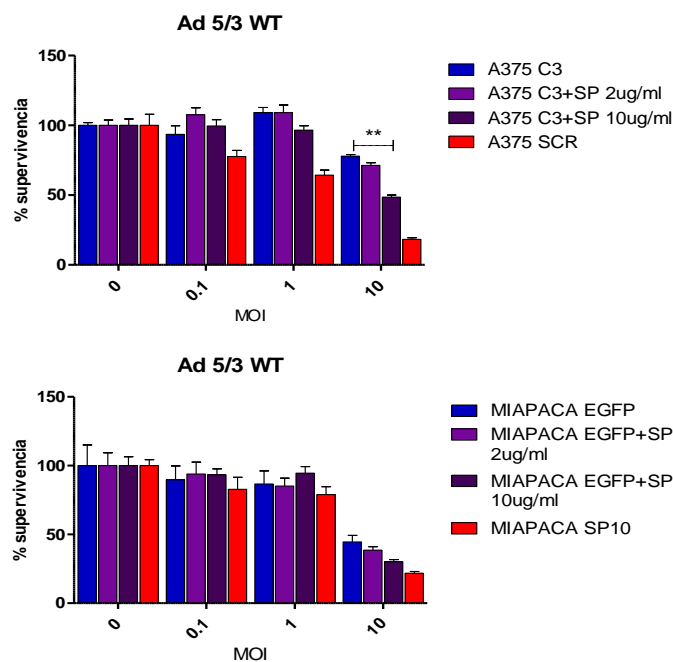
mantuvo su presencia a lo largo de la misma. Presentamos una figura representativa de las condiciones, ya todas presentaron la misma tendencia. ( Figura 17)



**Figura 17. Efecto del agregado exógeno de SPARC sobre la Lisis adenoviral.** A) A735 C3 y A375 WT y B) MiaPaca eGFP y MiaPaca sp10 infectadas con Ad 5/3 WT y Ad 5/3 NHS en presencia de 10 ug/ml de SPARC agregado a las 0 horas de la infección.



La presencia de SPARC agregada de manera exógena no logró revertir el fenotipo e igualar el efecto lítico del virus en las células que expresan SPARC en estas condiciones. Por ello se decidió realizar una incubación de las células con la proteína purificada, durante las 24 horas previas a la infección a concentraciones de 2 y 10ug/ml, en estas condiciones se observó una ligera reversión del fenotipo en las células que no expresan SPARC a 10ug/ml. (Figura 18)



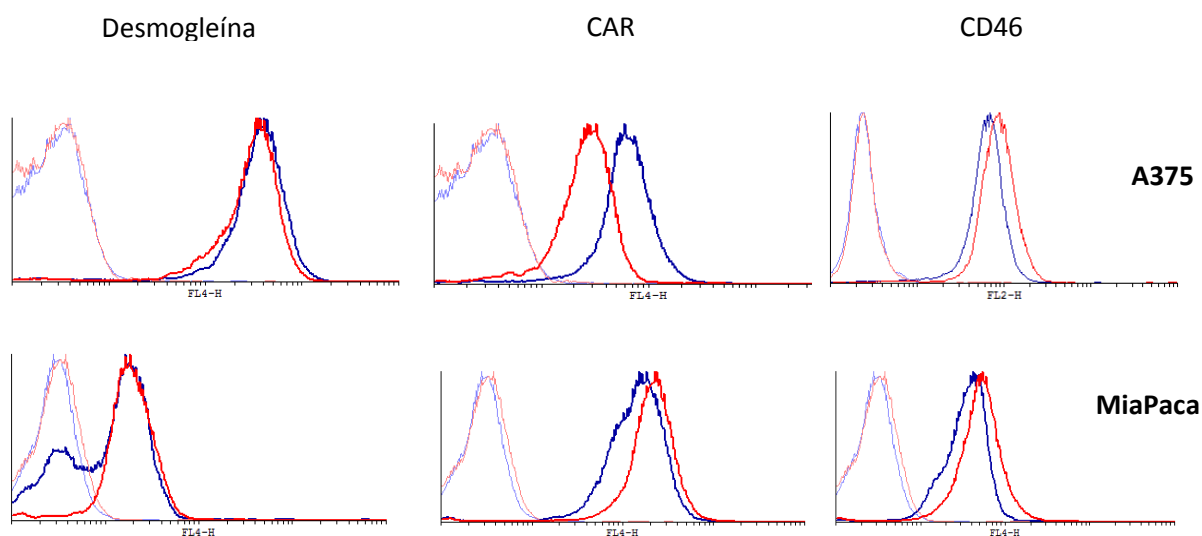
**Figura 18. Efecto del agregado exógeno de SPARC previo a la infección adenoviral.** Se agregó SPARC de manera exógena 24 horas previas a la infección con Ad 5/3 WT(\*\*p<0.01)

#### 4.5 Efecto de SPARC endógeno en la entrada adenoviral a la célula tumoral

##### 4.5.1 Expresión de Receptores

Se evaluó la expresión de receptores adenovirales CAR, CD46 y Desmogleína-2, teniendo en cuenta que la expresión diferencial de los mismos entre células que expresan o no SPARC, podría estar relacionado con una mayor entrada y posteriormente, una mayor lisis celular.

Sin embargo, no hubo diferencias significativas en los ensayos de citometría de flujo realizados en las células A375 C3 y SCR y en las células MiaPaca eGFP y sp10, lo que descartaría la hipótesis de que la expresión de SPARC podría estar aumentando la expresión de estos 3 receptores adenovirales. (Figura 19)

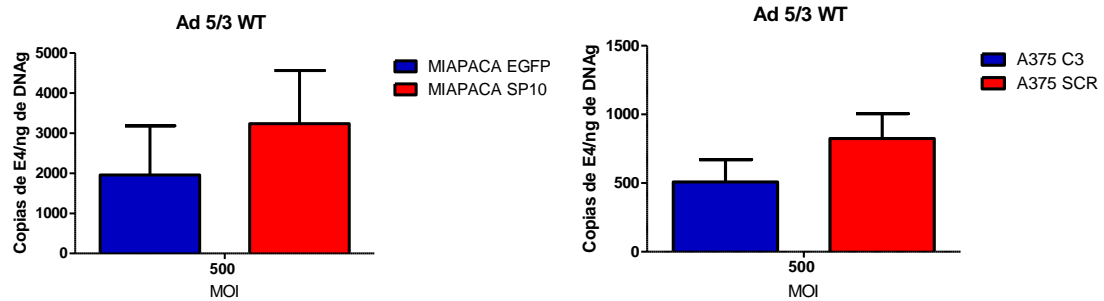


**Figura 19. Expresión de receptores adenovirales.** Histogramas de la citometría de flujo para evaluar expresión de los receptores adenovirales CAR, CD46 y Desmogleína-2 en A375 y MiaPaca. En rojo: células que expresan SPARC; en azul: células que no expresan SPARC.

#### 4.5.2 Cuantificación de E4

Para evaluar la eficiencia de infección de los adenovirus se determinó el número de copias del genoma adenoviral en células infectadas durante un periodo de tiempo determinado. Basados en este número de copias es posible estimar el número de viriones que infectaron a las células. Partiendo de este principio, se infectaron células A375 SCR y C3, así como MiaPaca eGFP y SP10 a MOI de 500, durante 4 horas, tiempo necesario para que los viriones se unan a sus receptores y sean internalizados. Una vez transcurrido el periodo de infección, se extrajo ADN genómico y se realizó

qPCR para E4 ya que el número de copias de este gen es proporcional al número de viriones internalizados. (Figura 20)



**Figura 20. Cuantificación de E4.** qPCR de E4 después de 4 horas de infección con Ad 5/3 WT

No se observaron diferencias significativas entre ambas condiciones de expresión de SPARC, sugiriendo que la entrada de viriones es similar e independiente de la expresión de la proteína.

## DISCUSIÓN

Los virus oncolíticos de replicación condicional son una relativamente nueva clase de agentes anticancerígenos con gran potencial terapéutico. No solo presentan un tropismo preferencial por células transformadas, sino que también median procesos citotóxicos en las células infectadas, sin dañar a las células normales.<sup>21,22</sup>

Los virus oncolíticos son estructural y biológicamente diversos, diseminándose en tumores y matando células tumorales mediante diversos mecanismos y con diferentes cinéticas<sup>22</sup>. A pesar de que hasta ahora, numerosos virus oncolíticos han sido identificados, los adenovirus de replicación condicional basados en adenovirus que infectan a humanos (CRAds) son los más comúnmente utilizados para el desarrollo de agentes para la terapia génica.

Teniendo en cuenta su potencial terapéutico, los CRAds han sido trasladados a ensayos clínicos en humanos con cáncer avanzado. A pesar de presentar evidencia sugestiva de actividad antitumoral, es discutida su efectividad clínica como único agente terapéutico.<sup>23,24</sup> Así, numerosas estrategias han sido utilizadas para mejorar la actividad antitumoral de los CRAds, tales como: modificaciones en la Fibra (para orientación), modificaciones en el Hexón (para evitar secuestro hepático), capas poliméricas (como protección del sistema inmune), delección de genes (para orientación fisiológica), inserciones transgénicas (para combatir la inmunidad innata mejorar la inmunidad adaptativa, la promoción de la difusión, aumentar la citotoxicidad o facilitar la monitorización no invasiva).<sup>22</sup>

Las más usadas de las modificaciones en CRAds son las generadas en la Fibra y en los promotores que dirigen la replicación del adenovirus. Viale *et al* demostraron que la

incorporación de una fracción del promotor de la proteína SPARC, de motivos respondedores a hipoxia e inflamación como promotor de un adenovirus replicativo aumenta considerablemente el efecto terapéutico del virus, llevando a la eliminación de melanomas establecidos en ratones “nude”. Así también, la modificación de la Fibra por una quimérica, formada por los serotipos 5/3, aumentó la potencia de este virus oncolítico en melanomas con baja expresión de CAR.<sup>19</sup> Este virus fue denominado Ad 5/3 NHS en este trabajo.

En ensayos en los cuales se infectaron células mesenquimales con el Ad 5/3 NHS a fin de usarlas como vehículos para el transporte de CRAds, las mismas se notaron refractarias a la infección, requiriéndose un número de partículas infectivas (MOI) notablemente alto para lograr un efecto lítico. El agregado de medio condicionado de células de melanoma A375, las cuales expresan altas concentraciones de SPARC, y el agregado de la proteína purificada, aumento la lisis mediada por el CRAds y disminuyó considerablemente la MOI necesaria para alcanzar la muerte celular, favoreciendo así la eficacia infectiva del virus *in vitro*.

Partiendo de esta premisa, en este trabajo se plateó evaluar si el efecto observado en células mesenquimales se reproducía en células tumorales. Para ello se utilizaron 3 estrategias: infecciones en presencia de medio condicionado proveniente de células que secretan SPARC, infección en presencia de la proteína purificada SPARC e infecciones en células que expresan o no SPARC, empleando 3 virus: Ad5/3 Luciferasa como control no replicativo, Ad5/3WT como control positivo y el Ad5/3NHS generado en nuestro laboratorio.

La estrategia en la cual se realizó la infección en presencia del medio condicionado resultó ser ineficiente para evaluar la actividad de SPARC sobre la oncólisis adenoviral,

ya que este medio inhibió el crecimiento celular. En ciertos sistemas se han observado resultados similares. Por ejemplo, el medio condicionado de células de neuroblastoma que sobre expresan SPARC, inhibe la proliferación celular y la formación endotelial de túbulos.<sup>25</sup>

Cuando evaluamos si la expresión de SPARC por parte de la célula tumoral afectaba la lisis mediada por el adenovirus, observamos que existía un aumento en las células que expresan la proteína *versus* las que no, indicando que la producción de la proteína, mediante algún mecanismo no determinado aún, está favoreciendo la lisis celular y la propagación del CRAd Ad 5/3 NHS, y de una manera más potente, la del Ad5/3WT.

Sin embargo, no resultaba claro si este resultado era por efectos intracelulares de la expresión de la proteína sobre la célula o un efecto sinérgico entre la proteína y el virus, que potenciaban su acción al momento de la infección. El agregado de SPARC de manera exógena, como proteína purificada, no modificó la lisis por el adenovirus cuando se agregaba al momento o posterior a la infección. Sin embargo, cuando SPARC se encontraba presente desde las 24h previas a la infección, se producía un aumento de la lisis. Esto sugeriría que la proteína genera en la célula condiciones propicias para hacerla más susceptible a la lisis por adenovirus y que no se trata de una sinergia adenovirus-proteína al momento en que se produce la infección por el virus.

Si bien observamos que SPARC favorecía la lisis adenoviral, era necesario determinar en cual etapa del ciclo infectivo actuaba esta proteína. Se decidió evaluar entonces las etapas de la unión y entrada del virión, ya que dan inicio al proceso infectivo, sugiriendo que una mayor expresión de receptores primarios generado por SPARC, implicaría una mayor unión de viriones y una subsecuente mayor entrada de los mismos a la célula, generando *a posteriori* una mayor lisis.

No se observaron diferencias significativas entre las células que expresaban SPARC y las que no, al evaluar la expresión de los receptores CAR, CD46 y Desmogleína-2 y la entrada de viriones por cuantificación de la secuencia del gen E4. Estos resultados indicarían que SPARC no interviene en ninguno de estos procesos, y que el efecto posiblemente, se produce en etapas posteriores del ciclo.

Si bien la internalización de las partículas de adenovirus es primordial para la infección, este es sólo el inicio del viaje hacia el complejo del poro nuclear. Una vez dentro de la célula, y mediante endocitosis, los viriones necesitan escapar del compartimiento vesicular para ser trasladados al núcleo por un mecanismo Dineína dependiente. Finalmente, la asociación del virión con proteínas nucleares facilita su “uncoating” permitiendo la entrada del genoma al núcleo a través de una red de microtúbulos, donde finalmente se dará inicio a la replicación y propagación del virus.<sup>26</sup>

De lo anterior expuesto podemos identificar 4 etapas del ciclo: endocitosis y escape del endosoma, traslocación al núcleo, replicación y lisis y propagación. Debido a las funciones descritas de SPARC, estas serían las siguientes a evaluar.

Por ejemplo, se conoce que SPARC puede llevar a rearrreglos en el citoesqueleto y a su vez alterar la forma de la célula por disolución de los complejos de adhesión focal y la reorganización de las fibras de estrés de actina, aspecto importante, dado que las mismas intervienen en el transporte de los viriones internalizados desde las vesículas hacia el núcleo celular.<sup>25</sup>

Así también, SPARC interviene en las vías de apoptosis. En células de meduloblastoma, por ejemplo, induce apoptosis mediada por autofagia, mientras que en células de cáncer colorectal SPARC inicia la activación de la vía extrínseca de apoptosis al unirse al extremo n-terminal de Caspasa 8, con la subsecuente contribución a la cascada

intrínseca, vía Bid, estimulando la apoptosis.<sup>25,27</sup> Por lo tanto SPARC podría favorecer la muerte celular por apoptosis o autofagia potenciando el efecto lítico del adenovirus.

Si bien son necesarios estudios adicionales que permitan identificar en cual etapa del ciclo adenoviral actúa SPARC, la misma se perfila como una proteína prometedora para ser usada como herramienta a la hora de desarrollar estrategias necesarias para mejorar la eficacia de los CRAds, al potenciar su efecto con menores concentraciones de virus.



## CONCLUSIONES

- La infección de células tumorales en presencia de medio condicionado, no representa un buen modelo experimental *in vitro* para evaluar el efecto de SPARC en la oncólisis adenoviral.
- El agregado de la proteína SPARC al momento o durante la infección con adenovirus no produce cambio alguno en la lisis mediada por el virus.
- El agregado de la proteína SPARC 24 horas previo a la infección con adenovirus, favorece la lisis mediada por el virus.
- La expresión de SPARC por parte de la célula tumoral favorece la lisis mediada por adenovirus.
- La expresión de SPARC por parte de células tumorales no modifica la expresión de los receptores adenovirales CAR, CD46 o Desmogleína, ni favorece la entrada del virión a la célula tumoral.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cross D, Burmester J. Review: Gene Therapy for Cancer Treatment: Past, Present and Future. *Clin Med Res.* 2006; 4(3):218-27.
2. <https://clinicaltrials.gov/>
3. Veeslera D, Cupellib K, Burgerc M, Gräberc P, Stehleb T, Johnsona J. Single-particle EM reveals plasticity of interactions between the adenovirus penton base and integrin  $\alpha V\beta 3$ . *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014; 111(24):8815-9.
4. Yun C, Kim E, Koo T, Kim H, Lee YS, Kim JH. Yun, C. ADP-overexpressing adenovirus elicits enhanced cytopathic effect by induction of apoptosis. *Cancer Gene Ther.* 2005;12(1):61-71.
5. Zhang Y, Bergelson J. Minireview: Adenovirus Receptors. *J Virol.* 2005;79(19):12125-31.
6. Giberson A, Davidson A, Parks R. Chromatin structure of adenovirus DNA throughout infection. *Nucleic Acids Res.* 2012 Mar;40(6):2369-76.
7. Medina-Kauwe LK. Development of adenovirus capsid proteins for targeted therapeutic delivery. *Ther Deliv.* 2013 Feb;4(2):267-77
8. Sharma A, Li X, Bangari DS, Mittal SK. Adenovirus receptors and their implications in gene delivery. *Virus research.* 2009;143(2):184-194.
9. Arnberg, Niklas. Adenovirus receptors: implications for targeting of viral vectors *Trends in Pharmacological Sciences.* 2012 ;33(8): 442 – 448

10. Reetz J, Herchenröder O, Pützer B. Peptide-Based Technologies to Alter Adenoviral Vector Tropism: Ways and Means for Systemic Treatment of Cancer. *Viruses*. 2014;6(4):1540-63.
11. Beatty, M. S., & Curiel, D. T. Adenovirus Strategies for Tissue-Specific Targeting. *Advances in Cancer Research*. 2012; 115, 39–67.
12. Lee W, Choi I, Lee J, Lee J, Kim Y, Rah D, Yun C. Relaxin-expressing adenovirus decreases collagen synthesis and up-regulates matrix metalloproteinase expression in keloid fibroblasts: in vitro experiments. *Plast Reconstr Surg*. 2012; 130(3):407-17.
13. Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *The Journal of Cell Biology*. 2012;196(4):395-406.
14. Brekken RA, Sage EH. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix. *Matrix Biol*. 2000;19(7):569-80.
15. Lopez C, Gottifredi V, Llera A, Salvatierra E, Prada F, Alonso L et al. SPARC modulates the proliferation of stromal but not melanoma cells unless endogenous SPARC expression is downregulated. *Int J Cancer*. 2008; 122(7):1465-75.
16. Albrecht D, López-Murcia F, Pérez-González A, Lichtner G, Solsona C, Llobet A. SPARC prevents maturation of cholinergic presynaptic terminals. *Mol Cell Neurosci*. 2012;49(3):364-74.
17. Shin M, Mizokami A, Kim J, Ofude M, Konaka H, Kadono Y et al. Exogenous SPARC suppresses proliferation and migration of prostate cancer by interacting with integrin  $\beta$ 1. *Prostate*. 2013; 73(11):1159-70.

18. Jiang H, White EJ, Ríos-Vicil CI, Xu J, Gomez-Manzano C, Fueyo J. Human Adenovirus Type 5 Induces Cell Lysis through Autophagy and Autophagy-Triggered Caspase Activity. *J Virol*. 2011;85(10):4720-9
19. Viale D, Cafferata E, Gould D, Rotondaro C, Chernajovsky Y, Curiel DT, Podhajcer OL, Lopez MV. Therapeutic improvement of a stroma-targeted CRAAd by incorporating motives responsive to the melanoma microenvironment. *J Invest Dermatol*. 2013; 133(11):2576-84.
20. Bolontrade MF, Sganga L, Piaggio E, et al. A Specific Subpopulation of Mesenchymal Stromal Cell Carriers Overrides Melanoma Resistance to an Oncolytic Adenovirus. *Stem Cells and Development*. 2012;21(14):2689-2702.
21. Pol, J., Bloy, N., Obrist, F., Eggermont, A., Galon, J., Cremer, I., Galluzzi, L. Trial Watch: Oncolytic viruses for cancer therapy. *Oncoimmunology*. (2014); 3.
22. Russell, S. J., Peng, K.-W., & Bell, J. C. Oncolytic Virotherapy. *Nature Biotechnology*. 2012; 30(7).
23. Wold, W. S. M., & Toth, K. Adenovirus Vectors for Gene Therapy, Vaccination and Cancer Gene Therapy. *Current Gene Therapy*. 2013 ;13(6), 421–433.
24. Yamamoto, M., & Curiel, D. T. (2010). Current Issues and Future Directions of Oncolytic Adenoviruses. *Molecular Therapy*. 2010; 18(2), 243–250.
25. Bhoopathi P, Gond CS, Gujrati M, Dinh DH, Lakka SS. SPARC Mediates Src-induced Disruption of Actin Cytoskeleton via Inactivation of Small GTPases Rho-Rac-Cdc42. *Cellular signalling*. 2011;23(12):1978-1987.

26. Kremer EJ, Nemerow GR. Adenovirus Tales: From the Cell Surface to the Nuclear Pore Complex. *PLoS Pathog.* 2015; 11(6)
27. Tang,M.J. Tai I. A novel interaction between procaspase 8 and SPARC enhances apoptosis and potentiates chemotherapy sensitivity in colorectal cancers. *J. Biol. Chem.*,2007. 282, 34457–34467.