



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Adaptación del uso de codones de transgenes terapéuticos, un nuevo concepto en el diseño de adenovirus oncolíticos armados

Estela Núñez Manchón



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA

**ADAPTACIÓN DEL USO DE CODONES DE
TRANSGENES TERAPÉUTICOS, UN NUEVO
CONCEPTO EN EL DISEÑO DE ADENOVIRUS
ONCOLÍTICOS ARMADOS**

Memoria presentada por Estela Núñez Manchón para optar al título de
Doctor/a por la Universidad de Barcelona

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra Cristina Fillat Fonts en el grupo de Terapia Génica y
Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS), y bajo la tutela
de la Dra Neus Carbó Carbó, del departamento de Bioquímica y Biomedicina Molecular de la
Universidad de Barcelona (UB)

Cristina Fillat Fonts

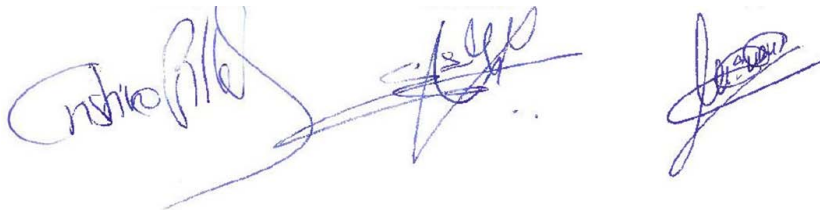
Estela Núñez Manchón

Neus Carbó Carbó

Directora

Doctoranda

Tutora



ESTELA NÚÑEZ MANCHÓN

2020

Agradecimientos

Gràcies, en primer lloc Cristina, per donar-me l'oportunitat de formar part d'aquest grup, gràcies per confiar en mi i permetre'm desenvolupar la tesi amb llibertat per proposar i fer, però tenint sempre la tranquil·litat de tenir la porta del teu despatx oberta quan ho he necessitat.

Gràcies a tots els Fillats amb qui he coincidit aquests anys, a la generació que vaig trobar en arribar, i que tant em va ensenyar, i a la que ara es queda, prenent en relleu. Als "Antics" qué puc dir-vos... Maria, Jero, Pau...gràcies per fer-me aprendre; i gràcies també a vosaltres Cristina i Miguel que, aunque vuestro paso fue breve, sin duda dejasteis huella! En definitiva, gràcies a tots pels moments que hem compartit al lab i sobretot pels moments que continuem compartint a fora.

Sabri y Marc, podemos decir que vosotros habéis estado prácticamente presentes durante toda la tesis, gracias por todos estos meses, ahora sí que sí os quedáis como los veteranos de los Fillat!

Anna y Silvia, hoy lo pienso y hace tan solo cerca de un año que llegasteis al lab, pero parece que hayáis estado siempre! No tengo más que gracias para vosotras, por aguantar tanto y quejaros tan poco, por vuestra ayuda con todo, por estar siempre ahí en esta última recta final.

No puedo escribir los agradecimientos sin hacer una mención especial a vosotros, Agos y Aleix, mis chicos PDT ;-)) este apartado de la tesis os lo dedico sin duda a vosotros, porque sin vuestro trabajo y esfuerzo no habría sido posible. Agos, fue genial compartir esos meses contigo, y que nos contagiaras tu motivación y tu ilusión. Aleix, gràcies de veritat per fer-ho tot tan fàcil, per la teva actitud i pel teu caràcter, ets un crack!!

Y aquí entre medio de los “Nuevos” y los “Antiguos” estáis vosotros, los que habéis estado de principio a fin, Giulia y Eneko.

Giulia....quién nos lo iba a decir cuando coincidimos en una clase de Máster en 2013...que acabaríamos así! Es imposible plasmar en unas líneas lo que han sido todos estos años, hemos reído, hemos llorado, hemos discutido y tantas otras cosas, pero sobretodo nos hemos hecho amigas. Has sido un apoyo incondicional, y sin ti esta aventura no habría sido posible.

Eneko, creo que en esto ninguno de los dos somos de muchas palabras, así que seré breve ;-). Simplemente gracias, gracias por transmitirme el entusiasmo por la ciencia, por guiarme, aconsejarme y tener siempre esa crítica constructiva.

Més enllà dels Fillat, m'agradaria donar les gràcies a totes aquelles persones de la planta amb qui he compartit moments i converses, i en especial a l'Hugo i la Irene, per estar sempre disposats a escoltar i a donar un cop de mà, en la ciència i més enllà d'aquesta.

Fuera del lab, no puedo olvidarme de vosotros Eva, Mireya, Dani por ser ese pilar que me ha ayudado a desconectar, a ver las cosas importantes de verdad, más allá de la ciencia y el trabajo. Gracias por esos momentos compartidos en nuestro piso de Mallorca, cuyas fotos (hechas con ese amor y cariño que solo los primos Lourido saben...) guardarán para la posteridad. Chicas, qué deciros que no sepáis, habéis sido mi apoyo, mi válvula de escape en esta tesis y en todo lo demás, gracias por nuestras cenas, nuestros desayunos y por todo, en definitiva gracias por estar y por seguir ahí. Agnès, no me n'ovlido de tú, gràcies a tu també per preguntar sempre i per preocupe- te de ser-hi.

Y llego ahora a las personas a las que sin dudas más gracias tengo que dar por poder estar hoy aquí. Gracias a mis padres, a la Judit y al Raúl. A mis padres por estar siempre ahí, por darme la oportunidad de estudiar una carrera y un máster imprescindibles para poder hoy escribir estas palabras. Gracias por apoyarme,

aunque sea difícil, porque como dices tu Mama “*cuesta mucho entender esto que hago con cosas tan pequeñas que no se ven*”. A ti Judit gracias, porque tu más que nadie eres capaz de entender nuestras conversaciones sobre este mundo de ciencia, sobre el doctorado y sobre qué es trabajar en un lab. Y a ti Raulillo – aunque sé que esto me va a costar más de una broma- gracias por ser el número uno en hacerme desesperar y reír a partes iguales. Sin duda, nuestros momentos todos juntos esos sábados y domingos durante estos años de tesis han sido un bálsamo para desconectar y de recuperar fuerzas. Y este camino habría sido mucho más difícil sin nuestros fines de semana todos juntos en el terreno, compartiendo comidas a las cuatro de la tarde y sobremesas eternas con vosotros tiet, tieta e Irene.

Finalment arribo a tu, Rubén, amb un gràcies enorme, gràcies per tot, per cuidar-me, preocupar-te, animar-me, aconsellar-me i deixar-me formar part de la teva família (Conchi, Oli, Maria, Concha, Fernando y Luisa gracias también a vosotros por apoyarme y animarme). Et vull donar les gràcies especialment per aquests últims mesos de recta final que han estat “durillos”, però en els que tu hi has estat per a tot, des de cuinar-me para que no muriera de inanición fins a compartir correccions de tesi un diumenge a horas intempestivas. Sens dubte, aquesta tesi té també molt de tu ;-).

-Gracias a todos por formar parte de este proyecto-

Índice

Abreviaciones.....	1
Presentación	5
1. Introducción.....	7
1.1. Cáncer	7
1.1.1. Historia y cifras actuales	7
1.1.2. Cáncer de páncreas.....	8
1.2. Viroterapia oncolítica	14
1.3. Adenovirus	18
1.3.1. Taxonomía.....	19
1.3.2. Estructura de la cápside adenoviral	19
1.3.3. Organización del genoma adenoviral	21
1.3.4. Fases de la infección adenoviral.....	24
1.3.5. Expresión de transgenes terapéuticos en adenovirus oncolíticos ...	29
1.4. Uso de codones y regulación de la expresión génica.....	33
1.4.1. El código genético.....	33
1.4.2. ARNt	36
1.4.5. Uso de codones y ARNts como mecanismo de regulación génica	37
2. Objetivos.....	41
3. Materiales y Métodos	43
3.1. Cultivo y manipulación bacteriana	43

3.1.1.	Cepas bacterianas utilizadas	43
3.1.2.	Técnicas de manipulación bacteriana	45
3.2.	Manipulación de ADN.....	51
3.2.1.	Aislamiento y cuantificación de ADN	51
3.2.2.	Cuantificación de ADN.....	53
3.2.3.	Digestión enzimática.....	53
3.2.4.	Ligación.....	54
3.2.5.	Técnicas de amplificación del ADN.....	55
3.2.7.	Generación de plásmidos de expresión GFP.....	57
3.2.8.	Generación de plásmidos de expresión PDT	59
3.2.9.	Secuenciación de ADN	60
3.3.	Manipulación de ARN.....	61
3.3.1.	Aislamiento de ARN.....	61
3.3.2.	Cuantificación de ARN	61
3.3.3.	Análisis de expresión de ARN mensajero	62
3.4.	Manipulación de proteínas.....	63
3.4.1.	Aislamiento de proteínas	63
3.4.2.	Cuantificación de proteínas	64
3.4.3.	Western Blot.....	64
3.4.4.	Ensayo enzimático de actividad hialuronidasa.....	67
3.5.	Cultivo celular eucariota.....	68
3.5.1.	Líneas celulares utilizadas.....	68
3.5.2.	Transfecciones transitorias.....	70
3.5.3.	Ensayo de viabilidad celular.....	71

3.5.4.	Análisis de cultivos celulares mediante el sistema de análisis de células vivas Incucyte®	72
3.5.5.	Análisis de fluorescencia por citometría de flujo.....	72
3.6.	Manipulación de adenovirus.....	73
3.6.1.	Generación de genomas adenovirales	73
3.6.2.	Producción de adenovirus replicativos modificados genéticamente.	77
3.6.3.	Titulación de adenovirus	79
3.6.4.	Estudios de producción viral.....	81
3.7.	Manipulación animal.....	81
3.7.1.	Generación y seguimiento de tumores subcutáneos.....	82
3.7.2.	Administración sistémica de virus	83
3.8.	Técnicas histológicas	83
3.8.1.	Extracción y preparación de las muestras	83
3.8.2.	Tinciones histológicas.....	84
3.8.3.	Análisis y cuantificación de histologías	89
3.9.	Análisis bioinformático	90
3.9.1.	Caracterización bioinformática de genes virales y transgenes	90
3.9.2.	Representación gráfica y análisis estadístico de los datos experimentales	92
4.	Resultados.....	95
4.1.	Evaluación de la repercusión del uso de codones de transgenes armados en adenovirus oncolíticos.....	95
4.1.1.	Los niveles máximos de expresión de un transgén se obtienen optimizando su uso de codones y expresándolo bajo el control del MLP ..	96

4.1.2.	La incorporación de un transgén altamente optimizado bajo el control del MLP interfiere con la expresión de proteínas estructurales y la capacidad replicativa del adenovirus	105
4.1.3.	Un uso de codones adaptado al virus permite un compromiso entre la expresión de GFP en <i>late</i> y la producción de partículas virales. ...	110
4.2.	Aplicación de la estrategia de adaptación de codones a transgenes terapéuticos armados en adenovirus oncolíticos	116
4.2.1.	Evaluación del impacto del uso de codones en el virus ICO15K armado con transgenes hialuronidasa	116
4.2.2.	Evaluación del impacto del uso de codones en el virus AdNuPARmE1A armado con transgenes codificantes para la <i>LmPDT</i> ..	140
5.	Discusión	157
5.1.	El uso de codones de los transgenes repercute de manera distinta en función de si estos se expresan en la fase <i>early</i> o <i>late</i> del ciclo de replicación adenoviral.....	159
5.2.	Adaptar el grado de optimización de los transgenes en adenovirus armados en <i>late</i> se traduce en una mejor respuesta terapéutica: <i>el ejemplo de la hialuronidasa</i>	165
5.3.	La relación entre el uso de codones de transgenes expresados en <i>late</i> y el <i>fitness</i> adenoviral se postula como un concepto universal	167
6.	Conclusiones	175
7.	Bibliografía	177
8.	Anexo.....	207
8.1.	Tablas	209
8.2.	Alineamientos de secuencias.....	219
8.2.1.	Alineamiento nucleotídico de los genes <i>GFP_{opt}</i> y <i>GFP_{DEopt}</i>	219

8.2.2. Alineamiento aminoacídico de los genes <i>GFP_opt</i> y <i>GFP_DEopt</i> ...	220
8.2.3. Alineamiento aminoacídico de los genes <i>PH20</i> y <i>hum_BH</i>	220
8.2.4. Alineamiento nucleotídico de los genes <i>hum_BH</i> y <i>apis_BH</i>	221
8.2.5. Alineamiento nucleotídico de los genes <i>apis_BH</i> y <i>adapt_BH</i>	222
8.2.6. Alineamiento aminoacídico de los genes codificantes para la hialuronidasa de abeja.....	224
8.2.7. Alineamiento nucleotídico de los genes <i>PDT</i> y <i>PDT_Adapt</i>	224
8.2.8. Alineamiento aminoacídico de los genes <i>PDT</i> y <i>PDT_Adapt</i>	225

Abreviaciones

μ	Micro
A	Adenina
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADP	Adenocarcinoma ductal de páncreas
ADP	Proteína mortal del adenovirus
AdZ	Adenovirus with zero cloning steps
ARN	Ácido ribonucleico
ARN_m	Ácido ribonucleico mensajero
ARN_t	Ácido ribonucleico de transferencia
AT3	Codones terminados en A o T
AT3%	Porcentaje de codones terminados en A o T
BAC	Cromosoma Bacteriano Artificial
BiTE	<i>Bi-specific T cell engager</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Citosina
CAFs	Fibroblastos asociados a tumor
CAI	<i>Codon Adaptation Index</i>
CAR	<i>Coxsackie and Adenovirus Receptor</i>
Ccmv	Citomegalovirus
cm	Centímetros
csp	Cantidad Suficiente Para
DBP	Proteína de unión a ADN

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DO	Densidad Óptica
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
F-Ade	2-fluoroadenina
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
F-dAdo	2-fluoro-2'desoxiadenosina
g	Acceleración de la gravedad
G	Guanina
GC3	Codones terminados en G o C
GC3%	Porcentaje de codones terminados en G o C
GFP	Proteína Verde Fluorescente
h	horas
HABP	Proteína de unión a ácido hialurónico
HAdV-5	Adenovirus humano C serotipo 5
hpi	Horas pos-infección
IC50	Concentración inhibitoria del 50%
IRES	<i>Internal Ribosome Entry</i>
ITR	Repeticiones Terminales Invertidas
L	Litro
LB	Luria Broth
LmPDT	<i>Leishmania mexicana</i> 2'desoxirribosilnucleósido transferasa
M	Molar
ml	Mililitros
MLP	<i>Major Late Promoter</i>
MTT	bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
n	Nano
° C	Grados centígrados
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDT	2'desoxirribosilnucleósido transferasa
PFA	Paraformaldehido
PI	Pos-infección

qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RGD	Arginina-Glicina-Aspártico
RGDK	Arginina-Glicina-Aspártico-Lisina
rpm	Revoluciones por minuto
SA	<i>Splicing acceptor</i>
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
SEM	Error Estándar Medio
T	Timidina
TA	Temperatura ambiente
tAI	<i>tRNA Adaptation Index</i>
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TP	Proteína Terminal
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
UCA	Uso de Codones Absoluto
uPAR	<i>Urokinase Plasminogen Activator Receptor</i>
vp	Partículas virales
WB	<i>Western Blot</i>
WT	<i>Wild Type</i>

Presentación

La viroterapia oncolítica es un tratamiento emergente basado en el uso de virus replicativos que de manera selectiva infectan células tumorales y provocan su muerte. Hasta la fecha, se han producido grandes avances en dotar a los virus de selectividad tumoral. Sin embargo, el principal desafío actual es potenciar la eficacia de este abordaje a fin de poder implementarlo en la práctica clínica habitual.

Una de las estrategias más prometedoras para dotar de mayor potencia antitumoral a los virus oncolíticos, pasa por incorporar genes terapéuticos en el genoma viral, a fin de que se expresen en el microambiente tumoral y aporten beneficios adicionales a la oncolisis. No obstante, se ha observado que, en ocasiones, la expresión de una proteína terapéutica puede afectar negativamente al *fitness* viral, haciendo que la capacidad replicativa del virus disminuya de manera considerable.

Estudios previos indican que el adenovirus utiliza la desviación en su uso de codones como mecanismo para optimizar el reparto de los recursos traducionales de la célula. En base a este hecho, hemos hipotetizado que la expresión de transgenes terapéuticos podría afectar al equilibrio en el

uso de codones del genoma adenoviral, y conducir a un fenómeno de competición intergénica por dichos recursos.

A fin de determinar el impacto del uso de codones de los transgenes armados en el genoma adenoviral, hemos estudiado cómo un mismo transgén con distintos patrones de uso de codones afecta a la expresión de las proteínas virales y a la producción de nuevos viriones. Nuestros datos sugieren que los transgenes, cuando se expresan en la fase tardía post-infección, compiten con los genes virales por los recursos traducionales, afectando el *fitness* viral de manera dependiente al uso de codones.

Transgenes altamente optimizados, secuestrarían los recursos traducionales de la célula en detrimento de los genes virales, conduciendo así a una replicación viral deficiente. No obstante, hemos demostrado que es posible rescatar la actividad viral mediante la modulación del grado de optimización de los transgenes.

Estos resultados se han evidenciado en adenovirus armados con genes codificantes para la proteína reportera verde fluorescente o GFP, así como con dos transgenes terapéuticos, la enzima hialuronidasa (que degrada la matriz celular y reduce la desmoplasia tumoral) y la enzima *LmPDT* (que cataliza la conversión de prodrogas en bases púricas citotóxicas).

En conjunto, concluimos que adaptar el uso de codones de los transgenes armados en el genoma adenoviral es un parámetro crítico que debería considerarse en el diseño de adenovirus oncolíticos armados a fin maximizar el beneficio terapéutico de los mismos.

1. Introducción

1.1. Cáncer

El término cáncer engloba un conjunto amplio de enfermedades (más de 200) con un denominador común: células anómalas con procesos de división, crecimiento y diseminación incontrolados [1].

1.1.1. Historia y cifras actuales

Actualmente, el cáncer constituye una de las principales causas de morbi-mortalidad [2]. Sin embargo, el cáncer no es una enfermedad de aparición moderna, de hecho el primer caso documentado corresponde a una mujer afectada por leucemia que vivió hace cerca de 7000 años [3]. Asimismo, la presencia de tumores en esqueletos momificados o documentos como el papiro de Edwin (1600 a.C), con referencias a lesiones de tipo neoplásico, sitúan la enfermedad en la época de la civilización egipcia. No obstante, cabe decir que no fue hasta mucho después cuando Hipócrates (460 a.C – 370 a.C) empleó por primera vez en término “*karkinos*” para referirse a la enfermedad [4].

En la actualidad, el cáncer es un problema de salud a nivel mundial. El pasado año 2018 se diagnosticaron más de 18 millones de nuevos casos y se produjeron más de 9 millones y medio de muertes por cáncer. Además, se pronostica que el diagnóstico de nuevos casos seguirá en aumento, estimándose una incidencia de cerca de 30 millones para el año 2040 [5]. A nivel español, en el año 2018 se diagnosticaron más de 270.000 nuevos casos y se registraron más de 113.000 muertes relacionadas, siendo así el cáncer la segunda causa de muerte en España, por detrás de las enfermedades cardiovasculares[5], [6], [7].

Pese a las alarmantes cifras registradas, cabe mencionar que, de forma general, la mortalidad asociada al cáncer ha experimentado un fuerte descenso en las últimas décadas. Esta tendencia refleja el efecto positivo de las campañas de prevención, de los procedimientos de diagnóstico precoz así como de los importantes avances terapéuticos [6].

1.1.2. Cáncer de páncreas

Entre los datos epidemiológicos para los distintos tipos de cáncer destaca el caso del cáncer de páncreas, en tanto que sus cifras de incidencia y mortalidad son prácticamente idénticas [5], [8]. Esto supone que pese a ocupar el duodécimo puesto en incidencia a nivel mundial, sube hasta la séptima posición cuando hablamos de mortalidad (Fig. 1.1). A nivel de los países occidentales, esta cifra destaca aún más si cabe, pues en Europa y en América del Norte los tumores de páncreas suponen la cuarta y la tercera causa de muerte por cáncer, respectivamente [5]. Además, se pronostica que en el 2030 los tumores de páncreas serán la segunda causa de muerte por cáncer en Estados Unidos [9].

A nivel del Estado español, los tumores de páncreas ocupan la tercera posición en mortalidad, por detrás del cáncer de pulmón y los tumores colorectales [5] (Fig. 1.1).

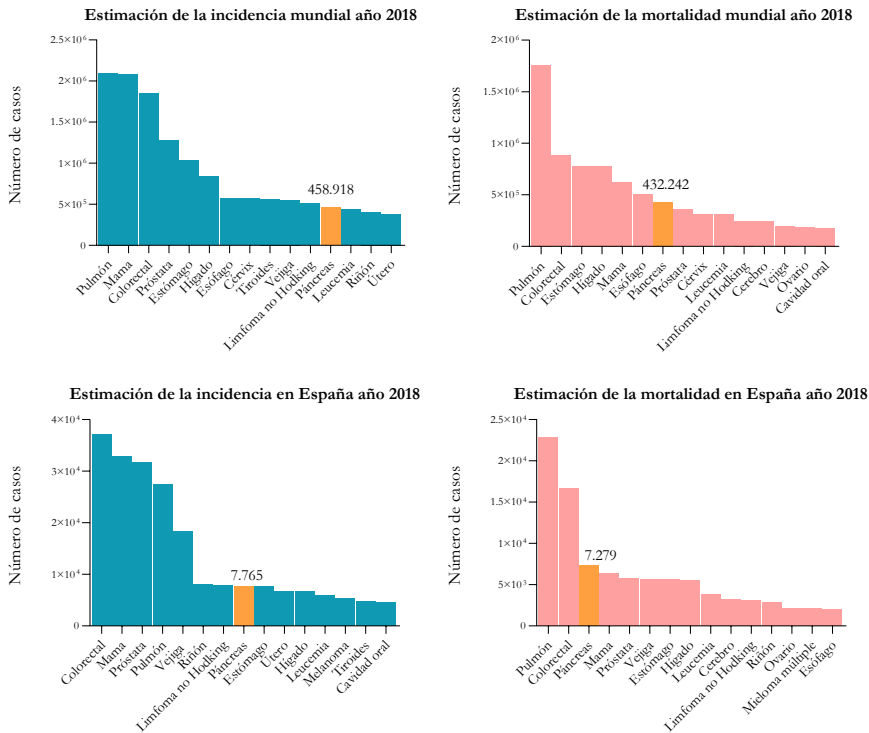


Figura 1.1 | Datos epidemiológicos del cáncer a nivel mundial y a nivel español para el año 2018. Los paneles de la izquierda muestran datos de incidencia; los de la derecha muestran datos de mortalidad. Las barras naranjas se corresponden en todos los casos con las cifras estimadas para el cáncer de páncreas[5]

Cabe destacar también que la mortalidad asociada a los tumores de páncreas ha ido en aumento durante las últimas décadas, siguiendo así una tendencia inversa a la del cáncer en general [5] (Fig. 1.2.).

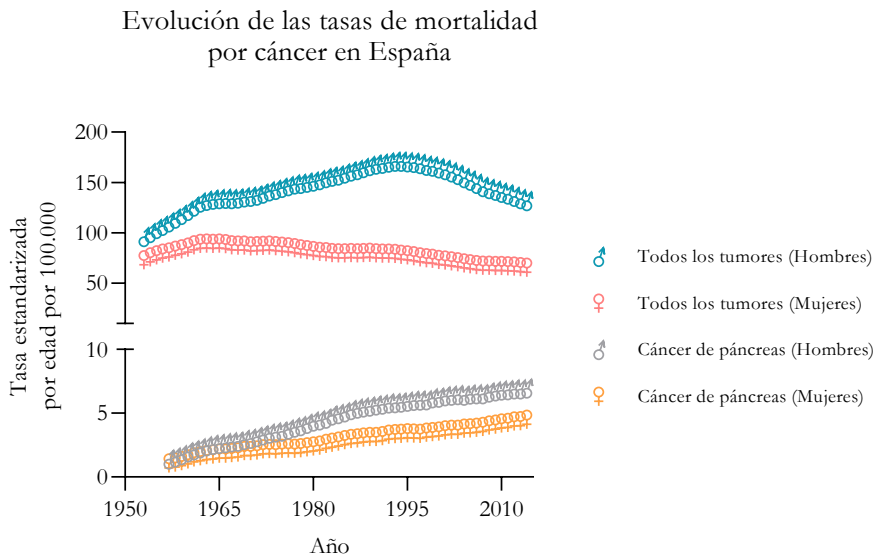


Figura 1.2 | Evolución de las tasas de mortalidad por cáncer en España. Los datos mostrados corresponden a los años comprendido entre 1953 y 2014 [5].

1.1.2.1. Etiología y caracterización del adenocarcinoma ductal de páncreas

Cuando hablamos de cáncer de páncreas, en realidad no estamos refiriéndonos a un único tipo de tumor, sino a todos aquellos procesos tumorales provocados por un crecimiento anómalo y descontrolado de las células de dicho órgano. Así, pueden distinguirse tumores de páncreas endocrinos y exocrinos en función del tipo celular implicado [10], [11]. Más del 90% de los tumores pancreáticos son tumores exocrinos de tipo adenocarcinoma ductal de páncreas (ADP). El resto de neoplasias pancreáticas corresponden mayoritariamente al adenocarcinoma acinar,

tumores neuroendocrinos, tumores quísticos, carcinoma pseudopapilar y pancreatoblastoma [11].

La etiología del ADP es multifactorial y solo un porcentaje relativamente bajo, que oscila en torno al 10%, corresponde a casos familiares hereditarios. Entre los factores de riesgo más importantes se encuentra el tabaquismo, la obesidad, la diabetes y la pancreatitis crónica [12]. El cáncer de páncreas es el resultado de la evolución de lesiones pre-neoplásicas junto con el acúmulo de mutaciones genéticas. Las lesiones precursoras incluyen neoplasias intraepiteliales pancreáticas (PanIN), neoplasias mucino-papilares intraductales (IPMN), neoplasias tubulopapilares intraductales (ITPN) y neoplasias mucinosas quísticas (MCN)[11] . Por otro lado, los primeros estudios de secuenciación del cáncer de páncreas revelaron mutaciones en 4 genes clave, *KRAS*, *TP53*, *SMAD4* y *CKN2A* [13]. Sin embargo, los recientes avances en estudios genómicos a gran escala, además de validar los hallazgos previos, han puesto en relieve un elevado número de alteraciones genéticas asociadas al ADP [14]–[16]. En 2016, un estudio genómico integrado dio lugar a la clasificación molecular del ADP en cuatro subtipos: escamoso, progenitor pancreático, inmunogénico y aberrantemente diferenciado endocrino-exocrino [17], [18].

1.1.2.2. Pronóstico y tratamiento del adenocarcinoma ductal de páncreas

La mala prognosis de ADP, con una tasa de supervivencia de un 3-9% [7], [8], [19], [20] a los cinco años, está relacionada con distintos factores. Por un lado, destaca la dificultad diagnóstica asociada a la localización anatómica profunda del páncreas, a la sintomatología inespecífica de la

enfermedad y a la falta de buenos marcadores diagnósticos. Por otro lado, el ADP presenta una elevada capacidad metastásica, que se relaciona con la aparición temprana de metástasis hepáticas y pulmonares. Finalmente, la escasa eficacia terapéutica de los tratamientos actuales contribuye enormemente a la mala prognosis del ADP[11], [12].

A día de hoy, el único tratamiento disponible considerado efectivo es la resección quirúrgica junto con quimioterapia adyuvante (gemcitabina/capecitabina). Sin embargo, sólo alrededor de un 20% del total de los tumores son resecables. Por otro lado, las líneas de tratamiento quimioterapéutico de los tumores no resecables y/o metastásicos se basan en el uso de gemcitabina/nAb-paclitaxel y en el régimen de quimioterapia combinada FOLFIRINOX (5-FU, L-leucovorina, irinotecán, oxiplatino). Estos tratamientos han sido asociados a modestas mejoras de la patología y a importantes efectos adversos[21]–[23].

La resistencia quimioterapéutica de este tipo de tumores está, en gran medida, asociada a la presencia de células madre tumorales y al importante contenido estromal, que dificulta la llegada de los agentes terapéuticos a las células tumorales. Se calcula que el estroma supone cerca del 80% del volumen tumoral total [24], [25]. Éste contiene una amplia variedad celular que incluye fibroblastos asociados a tumor (CAFs), células inflamatorias, vasos sanguíneos y células nerviosas. Por otro lado, comprende un elevado número de componentes fibróticos como el ácido hialurónico, el colágeno, la laminina, y la fibronectina [25], [26]. Así, el ADP se caracteriza por su elevado grado de desmoplasia, proceso por el cual el tejido fibroso se infiltra y envuelve el tumor [22], [27] (Fig.1.3.).

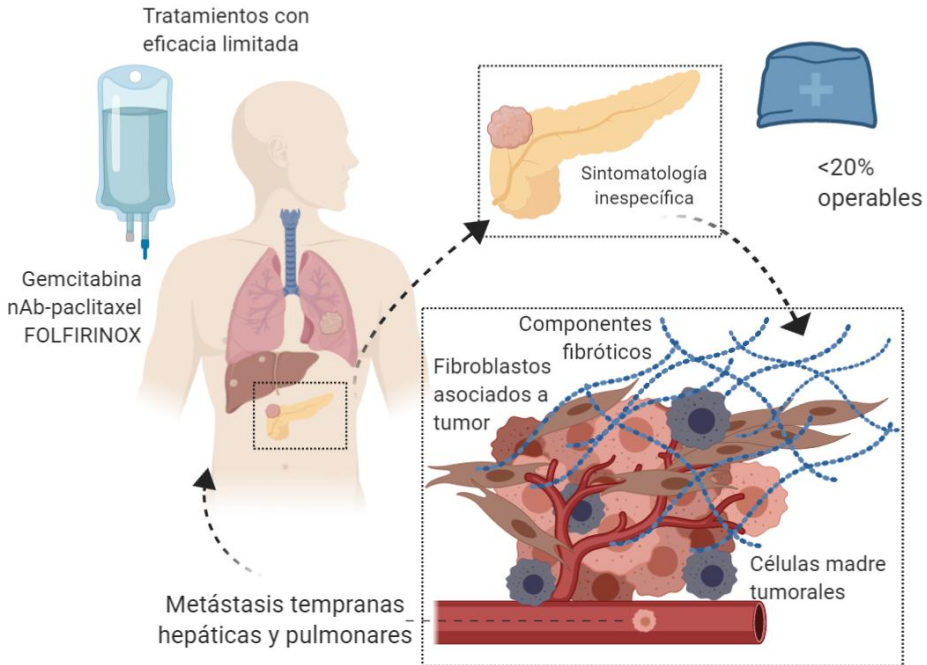


Figura 1.3 | Resumen gráfico del ADP.

Diversos estudios apuntan a que el estroma actúa también como una barrera contra la infiltración de linfocitos efectores [28]–[30]. Además, el ADP se caracteriza por presentar una alta densidad de células inmunosupresoras, como las células T reguladoras y las células mieloides (células dendríticas, macrófagos M2 y células mieloides supresoras, entre otras), consideradas un factor pronóstico negativo [31], [32]. Los CAFs activados secretan citoquinas inmunosupresoras como la CXCL12 o la IL6, que promueven el reclutamiento de células mieloides supresoras mientras que inhiben el reclutamiento de células T efectoras [33]–[35]. Las células mieloides, mediante factores como el $TGF\beta$ [36] y la activación de vías del metabolismo de la arginina, previenen la infiltración linfocitaria [37], [38]. En conjunto, estas características hacen que el ADP presente

una gran resistencia a la inmunoterapia como monoterapia [34], [39]–[42]

La mala prognosis del ADP junto con el escenario terapéutico actual conllevan la ineludible necesidad de seguir estudiando aproximaciones terapéuticas que logren modificar el curso natural de la enfermedad. En este marco, en el desarrollo de la presente tesis hemos considerado la aplicación de la viroterapia oncolítica como potencial opción terapéutica para el tratamiento del ADP.

1.2. Viroterapia oncolítica

La viroterapia oncolítica se define como una estrategia terapéutica basada en el uso de virus replicativos capaces de infectar células tumorales, replicar en ellas y provocar su muerte de manera selectiva [43] (Fig. 1.4).

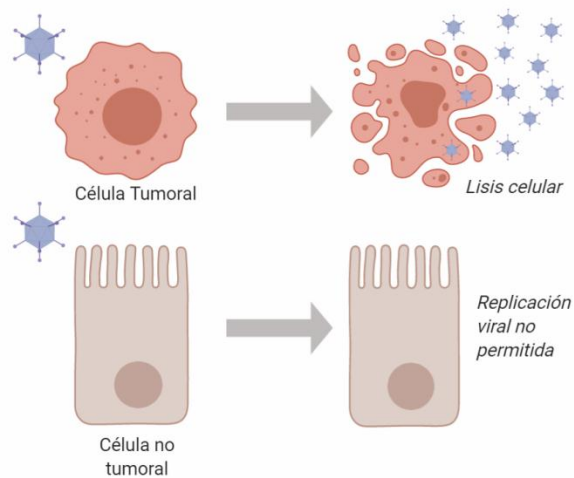


Figura 1.4 | Esquema sintético del concepto de viroterapia oncolítica.

Esta estrategia terapéutica presenta mecanismos de acción únicos en comparación con los tratamientos actuales. Los virus ofrecen la atractiva combinación de constituir un tratamiento auto-amplificable, dirigido específicamente hacia las células tumorales y con capacidad de estimular la respuesta inmunitaria antitumoral, gracias a la liberación de neo-antígenos subsecuentemente a la lisis de la célula tumoral [44]–[49].

Los distintos ensayos clínicos conducidos hasta el momento han mostrado resultados altamente alentadores en términos de seguridad [50]. Distintos tipos de virus, dosis y vías de administración han presentado buenos perfiles de seguridad, demostrándose que la administración intravenosa de virus oncolíticos conlleva, en general, sintomatología gripal y aumento de los niveles de citoquinas de fácil manejo [51]–[53].

En términos de eficacia sin embargo, los primeros estudios clínicos no han resultado suficientemente satisfactorios en muchos casos. Se requieren, por ende, mejoras en la actividad antitumoral de este abordaje, a fin de que pueda ser una realidad en la práctica clínica habitual. Si bien, parece existir un consenso amplio acerca de que una de las estrategias más prometedoras para dotar de mayor eficacia al tratamiento pasa por utilizar los virus oncolíticos como vehículos para expresar moléculas de distinta naturaleza en el sí del tumor. Dicho de otra forma, armar los virus oncolíticos con transgenes terapéuticos se presenta como una opción prometedora para incrementar la eficacia antitumoral, abordando la acción terapéutica desde dos frentes: mediante la actividad oncolítica propia del virus, y mediante la acción terapéutica de los transgenes [54]. La expresión de transgenes terapéuticos mediante virus oncolíticos facilita que la expresión de éstos sea tumor-específica, maximizando así la actividad en

el microambiente tumoral a la vez que se minimizan los efectos adversos (Fig. 1.5.).

Las citoquinas son uno de los genes terapéuticos más frecuentemente utilizados para armar virus oncolíticos, dada su capacidad de activar la respuesta inmunitaria antitumoral promoviendo la migración y la proliferación de linfocitos T en el microambiente tumoral [55], [56]. Asimismo, diversos estudios apuntan al potencial sinérgico de la utilización de virus oncolíticos armados con citoquinas y/o antígenos específicos, en combinación con células con CAR-T (*chimeric antigen receptor-T cells*) que reconozcan dichos antígenos [57]–[59]. En la misma línea, inmunomoduladora, se han propuesto virus oncolíticos armados con BiTEs (*Bi-specific T-cell engager*) en combinación o no con células CAR-T para el tratamiento de tumores sólidos [60]–[64]. Por otro lado, distintos estudios han puesto en relieve el potencial terapéutico de armar virus oncolíticos con IBCs (*immune checkpoint blockades*) dirigidos contra moléculas como PD-L1 o CTLA-4, a menudo sobre-expresadas en las células tumorales para escapar del sistema inmunitario [65], [66]. Como se ha comentado en apartados anteriores, la matriz extracelular supone un elemento muy importante en algunos tipos de tumores como el ADP. Dicha matriz supone una barrera para los agentes terapéuticos y promueve la exclusión de células T y la falta de respuesta sistema inmunitaria contra el tumor [67], [68]. Así, otra de las estrategias que reviste interés consiste en armar virus oncolíticos con transgenes como la hialuronidasa, la decorina o la relaxina capaces de degradar la matriz extracelular [69]–[75]. Finalmente, cabe destacar que los sistemas suicidas también pueden ser implementados en la viroterapia oncolítica mediante la expresión de transgenes que codifiquen enzimas convertidoras de prodroga. Así, es posible administrar profármacos que sean metabolizados

y convertidos en metabolitos tóxicos únicamente en aquellas células dónde el virus sea capaz de replicar [76]–[78] (Fig 1.5).

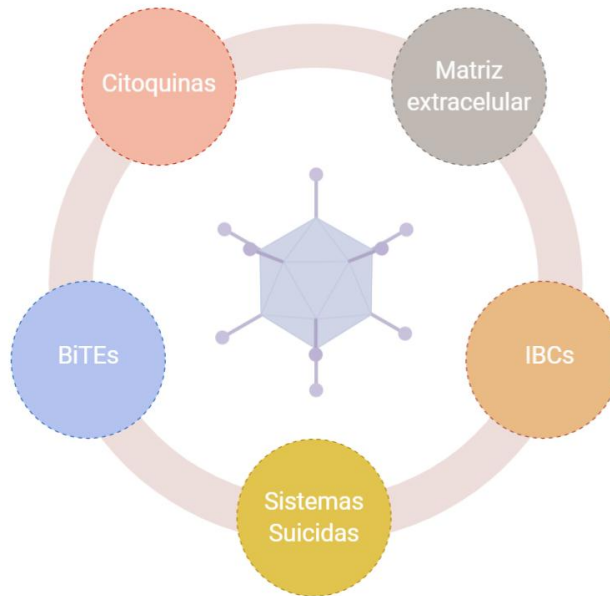


Figura 1.5 | Principales funciones adicionales que pueden aportarse al entorno tumoral mediante el uso de virus oncolíticos armados.

Actualmente, tan solo existen dos virus oncolíticos en el mercado, el adenovirus H101 registrado como Oncorine®, y el herpes-virus talimogene laherparepvec o T-VEC registrado bajo el nombre comercial Imlygic®. El primero fue aprobado por la CDA (*Chinese Drug Administration*) en el año 2005 para el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello [79]. Más recientemente, en 2015, la US FDA (*US Food and Drug Administration*) aprobó el T-VEC para el tratamiento del melanoma avanzado. Poco después, el T-VEC fue aprobado también por la EMA (*European Medicines Agency*) [80]. Además, actualmente hay registrados cerca

de un centenar de ensayos clínicos con otros virus oncolíticos en distintas fases de estudio [81].

Entre los distintos tipos de virus utilizados en viroterapia oncolítica, los adenovirus se encuentran entre los más frecuentes [50]. Su elevado perfil de seguridad, el amplio conocimiento que se tiene sobre ellos y la capacidad de poder editarlos genéticamente con facilidad, los constituyen como excelentes candidatos para su aplicación en clínica [82],[83].

1.3. Adenovirus

Los adenovirus son virus de ADN de doble cadena, sin envuelta y con cápside icosaédrica. Se trata de virus que frecuentemente se encuentran en el ambiente, pero cuya infección resulta asintomática en la mayoría de adultos inmunocompetentes. En niños, sin embargo, las infecciones sintomáticas pueden darse de forma relativamente frecuente. La sintomatología, que suele ser leve y auto-limitada, afecta normalmente las vías respiratorias superiores y puede causar lo que se conoce como resfriado común. Asimismo, las infecciones por adenovirus pueden provocar otros síntomas de naturaleza diversa como gastrointestinales, oculares o, menos frecuentemente, neurológicos. Así, se considera que los adenovirus presentan un nivel de seguridad elevado que permite su traslación al uso terapéutico [82].

1.3.1. Taxonomía

Los adenovirus fueron descritos por primera vez en 1953 por Rowe *et al.* en cultivos de tejido adenoideo, de ahí su nombre [84]. Actualmente, la familia *Adenoviridae* se encuentra dividida en cinco géneros: *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus* y *Ichtadenovirus* que son patógenos de mamíferos, aves y peces respectivamente; y *Matadenovirus* y *Siadenovirus* que son patógenos de un amplio rango de especies. Recientemente, se ha propuesto un sexto género, *Testadenovirus*, que incluiría los adenovirus capaces de infectar tortugas [85], [86]. Dentro del género *Mastadenovirus* se encuentran los adenovirus humanos (HAdV), que están a su vez clasificados en 7 especies distintas denominadas con una letra de la A a la G. Dentro de cada especie, encontramos distintos serotipos basados en características de hemaglutinación y neutralización de las principales proteínas de la cápside adenoviral. No obstante, esta tendencia de clasificación serológica está cambiando, y actualmente se han descrito nuevos tipos de virus de acuerdo con las características derivadas de la secuenciación genómica [87], [88].

El adenovirus empleado en el desarrollo del presente trabajo ha sido el adenovirus humano C serotipo 5 (HAdV-5); en este serotipo se centran los apartados descritos a continuación.

1.3.2. Estructura de la cápside adenoviral

La cápside del HAdV-5 tiene un diámetro de ~90 nm y está compuesta mayoritariamente por tres proteínas principales: hexón, pentón y fibra. El hexón es la proteína estructural más abundante, un total de 240 trímeros

de hexón constituyen la cápside adenoviral. En cada uno de los 12 vértices de la cápside se encuentran trímeros de pentón, de los cuales protruyen trímeros de fibra. Además de estas proteínas, en la cápside encontramos las proteínas IIIa, VI, VIII y IX que fortalecen las interacciones hexón-hexón y hexón-pentón. Por otro lado, en el núcleo viral se encuentran las proteínas asociadas con la doble cadena de ADN (V, VII, Mu y TP) y la proteasa 23K [89] (Fig. 1.6.).

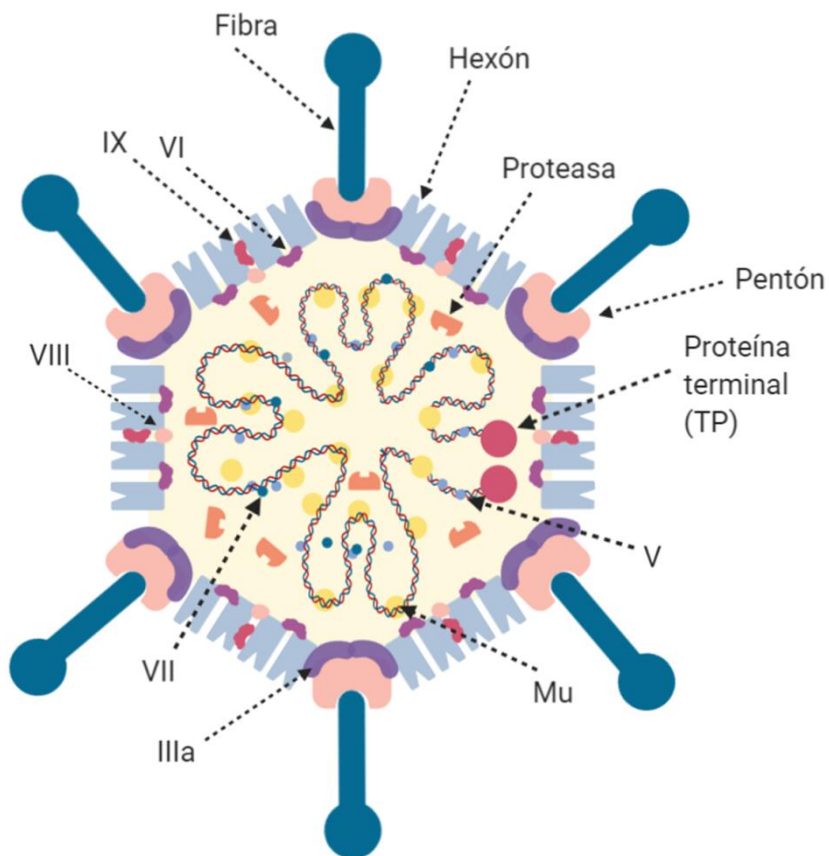


Figura 1.6 | Representación esquemática de la estructura del virión adenoviral.

1.3.3. Organización del genoma adenoviral

El genoma del HAdV-5 tiene un tamaño de 36 Kb y presenta en ambos extremos repeticiones terminales invertidas o ITRs. Junto a la ITR izquierda se encuentra la señal empaquetadora que permite, como su nombre indica, el correcto empaquetamiento del genoma viral en la cápside. Por otra parte, a ambos extremos 5' del genoma se encuentra unida de forma covalente la proteína terminal o TP [88], [90].

El genoma adenoviral se caracteriza por una elevada densidad de secuencias codificantes. Los genes se encuentran codificados en ambas hebras de la doble cadena de ADN y presentan regiones codificantes solapadas. La expresión de un elevado número de proteínas virales a partir de un genoma relativamente pequeño se hace posible mediante el uso intensivo de mecanismos de *splicing* [88], [90].

La correcta replicación viral requiere que la expresión de los distintos genes se suceda de manera finamente regulada a nivel temporal. De esa forma, se permite la reprogramación de la célula infectada para llevar a cabo la replicación viral evitando la respuesta del sistema inmune y la apoptosis celular. Así, el genoma adenoviral consta de seis unidades transcripcionales tempranas o *early* (E1A, E1B, E2A, E2B, E3 y E4), 2 unidades transcripcionales intermedias (IX y IVa) y una gran unidad transcripcional tardía o *late* controlada por el MLP (*Major Late Promoter*) que da lugar a 5 subunidades transcripcionales. Estas cinco subunidades transcripcionales se conocen como L1, L2, L3, L4 y L5, y codifican, principalmente, para las proteínas estructurales del virus. A esta gran unidad tardía hay que añadir otra mucho más pequeña y descubierta posteriormente que codifica para la proteína U exon [91], [92]. Cada una

de las unidades transcripcionales mencionadas contiene su propio promotor y la mayoría de ellas codifican para distintos ARNm (ácido ribonucleico mensajero) generados por mecanismos de *splicing* alternativos. La transcripción de todas las unidades es llevada a cabo por la ARN polimerasa II de la célula.

Por otro lado, cabe mencionar que el genoma adenoviral contiene dos ARN no codificantes (VA1 y VA2) que son transcritos por la ARN polimerasa celular III (Fig. 1.7.) [87].

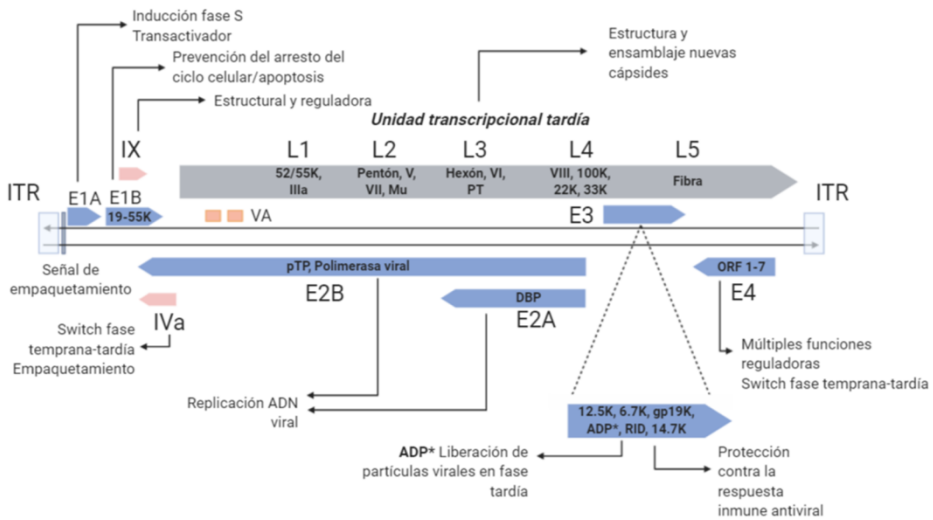


Figura 1.7 | Representación esquemática del genoma adenoviral y las principales funciones de cada unidad transricional.

En el transcurso de la infección adenoviral, el primer gen en expresarse es el gen *E1A*, que actúa como trans-activador del resto de unidades transcripcionales tempranas (*E1B*, *E2A*, *E2B*, *E3*, *E4*). Tras la expresión de dichas unidades tempranas, se expresan las unidades transcripcionales intermedias, que juegan un papel importante en el *switch* de fase temprana

a fase tardía [93], [94]. Por su parte, a tiempos tempranos pos-infección, el MLP se encuentra mayoritariamente inactivo y expresa únicamente un reducido número de moléculas de ARNm [95]. En consecuencia, la expresión de proteínas tardías es fútil durante esta fase. Sin embargo, el MLP se torna activo con el inicio de la replicación de genoma adenoviral [96], [97]. Esto conlleva una elevada expresión de moléculas de ARNm derivadas de L1, L2, L3, L4, L5, y por tanto, de proteínas estructurales.

Mediante el desarrollo de este programa transcripcional altamente orquestado, el virus pone a su disposición toda la maquinaria transcripcional y traduccional de la célula. Así, lleva a cabo su replicación de manera eficiente en cuestión de unas pocas horas, tardando alrededor de 36 h en completar todo el ciclo [98] (Fig. 1.8).

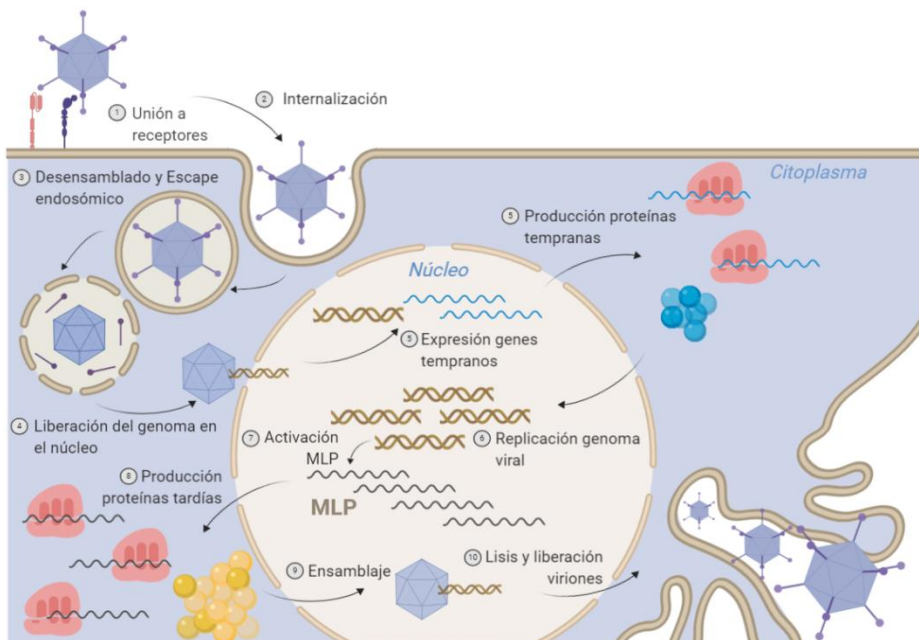


Figura 1.8 | Resumen gráfico del ciclo de replicación adenoviral.

1.3.4. Fases de la infección adenoviral

1.3.4.1. Entrada del virus en la célula

La entrada de los adenovirus en la célula sigue un proceso secuencial de unión, señalización, endocitosis, escape endosómico, transporte citoplasmático, disrupción de la cápside e importación del ADN viral dentro del núcleo [83].

La unión se da gracias a que las partículas virales reconocen, a través del dominio apical de la fibra, el receptor CAR (*Coxsackie and Adenovirus Receptor*) [99], [100]. Esta unión activa un segundo reconocimiento, mediado por la región RGD del pentón y las integrinas de la superficie celular [101], [102], que acaba desencadenando la endocitosis del virus mediada por clatrina [103].

Tras el reconocimiento del virus, se desarrolla un proceso de desensamblado progresivo de la cápside viral, que empieza con el desprendimiento de la fibra [104]. Este desensamblado progresivo lleva a la exposición de la proteína VI, encargada de propiciar la lisis del endosoma y provocar así la liberación de los restos de virión al citoplasma. El virión parcialmente desensamblado es entonces transportado al núcleo a través de los microtúbulos. El transporte se produce gracias al reconocimiento del hexón por las dineínas celulares [105]. Una vez allí, el ADN viral es importado al núcleo a través de los poros nucleares [83], [106].

1.3.4.2. Expresión de proteínas tempranas

Las proteínas tempranas son expresadas tras la entrada del ADN viral al núcleo y sus funciones son principalmente tres: inducir la entrada de la célula en fase S, facilitar la replicación de ADN viral y suprimir la respuesta inmunitaria antiviral.

Una vez internalizado el genoma adenoviral en el núcleo, el gen *E1A* es el primero en expresarse. La proteína E1A fuerza la célula a entrar en fase S para permitir así que el virus pueda explotar la maquinaria de replicación celular para replicar su genoma. Por otro lado, la proteína E1A induce la liberación del factor de transcripción E2F de su represor RB. Así, el E2F libre puede activar la transcripción de otros genes tempranos que presentan cajas de respuesta a E2F en sus promotores. De esta manera, E1A actúa como trans-activador de otros genes adenovirales tempranos [107].

La entrada en fase S, así como la propia presencia del virus, propicia la activación de diversas vías que tienen por objetivo de activar la respuesta inmunitaria y forzar la entrada en apoptosis de la célula. Sin embargo, esta cascada de respuestas es bloqueada por el virus. La supresión de la respuesta inmunitaria antiviral está mediada por las proteínas de la región transcripcional E3. Esta región codifica 7 proteínas: E3-12.5K, E3-6.7K, E3-gp19K, proteína mortal del adenovirus o ADP, RID α , RID β , y E3-14.7K. A excepción de la proteína E3-12.5K, cuya función es aún desconocida, y de la ADP, que se requiere en la fase tardía para la liberación eficiente de viriones [108], todas las demás influyen en la respuesta inmune innata y adquirida antiviral [109]. La proteína viral E3gp 19K impide el transporte a la membrana del complejo mayor de

histocompatibilidad de clase I, bloqueando así la presentación de antígenos y la subsecuente activación linfocitaria [110], [111]. El complejo RID (*Receptor Internalization and Degradation*), formado por RID α y RID β , promueve la internalización y la degradación de receptores proapoptóticos como Fas y TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) [112]. E3-6.7K funciona, junto con el complejo RID, disminuyendo el receptor TRAIL de la superficie celular; asimismo diversos estudios apuntan a la existencia de mecanismos anti-apoptóticos adicionales mediados por esta proteína [109], [113]. Finalmente E3-14.7 inhibe también la apoptosis mediada por TNF (*Tumor Necrosis Factor*) y TRAIL.

Además de las proteínas de E3, distintos genes de las unidades transcripcionales E4 y E1B presentan también funciones anti-apoptóticas [114]–[116].

1.3.4.3. Replicación del genoma adenoviral

Las proteínas implicadas en la replicación del genoma adenoviral se encuentran codificadas en la unidad transcripcional E2. Se trata de la polimerasa de ADN, la proteína preterminal o pTP y la proteína de unión a ADN (DBP) [117].

La replicación se inicia en los orígenes de replicación, localizados en las ITR de sendos extremos. En dichos orígenes de replicación, la polimerasa utiliza la pTP como cebador y los factores celulares NFI y Oct-1 favorecen el inicio de la replicación. Tras el inicio de la replicación, la polimerasa avanza replicando el ADN y deja la pTP anclada en el extremo 5'. En la fase final de la replicación la pTP es procesada por la proteasa

viral dando lugar a la TP. La elongación se lleva a cabo gracias a la acción combinada de la polimerasa y la DBP junto con la topoisomerasa I celular. Esta elongación puede desarrollarse de dos maneras. Por un lado puede iniciarse de forma paralela en ambos extremos del genoma adenoviral (haciendo uso de ambos orígenes de replicación). Por otro lado puede iniciarse una vez completada la primera copia. En este último caso el DNA monocatenario es capaz de formar un bucle sobre sí mismo gracias a la complementariedad de bases de ambas ITRs de forma que se permite el inicio de la replicación de la otra hebra del genoma [117].

1.3.4.4. Expresión de proteínas tardías

La mayor activación del MLP tiene lugar tras el inicio de la replicación del ADN viral. Así se genera un ARNm primario susceptible de poliadenilarse en cinco sitios distintos dando lugar a cinco tipos de pre-ARNm (L1, L2, L3, L4 y L5). En total estos pre-ARNm acaban derivando en más de 20 moléculas distintas de ARNm, la mayoría de las cuales comparten una secuencia líder común en su extremo 5'. Esta secuencia juega un papel importante en la exportación nuclear, la traducción y la estabilidad de las moléculas de ARNm [118], [119]. Asimismo, la secuencia líder permite la transcripción de forma independiente al complejo de iniciación eIF4f. En la fase tardía pos-infección el virus bloquea la expresión de los ARNm celulares gracias a la proteína L4-100K que impide la activación del complejo eIF4f. Así, todos los recursos traducionales son utilizados en favor de la síntesis de proteínas virales y se evitan respuestas antivirales por parte de la célula [118], [120], [121].

Tras la activación completa del MLP se produce una elevada expresión de todos los ARNm derivados de las subunidades transcripcionales tardías

que da lugar a una producción masiva de proteínas estructurales que se utilizarán para conformar los nuevos viriones [122], [123].

1.3.4.5. Formación y liberación de nuevos viriones

La formación de los nuevos viriones sucede en el núcleo y sigue un proceso secuencial en el que primero se ensambla la cápside y luego se empaqueta el ADN viral. Las cápsides se ensamblan primero a partir de los principales componentes de las mismas, hexones y pentones; y después se incorporan los componentes minoritarios. En este primer paso, del que aún no se conocen todos los detalles, estarían implicadas las proteínas L4-100K, L4-pVIII y L2-pVIII. A continuación, el genoma adenoviral es reconocido gracias a la secuencia empaquetadora por las proteínas empaquetadoras IVa2, L4-33K, L4-22K, L1-52/55K, y posiblemente la proteína DBP. Gracias a estas proteínas empaquetadoras, el ADN es introducido en las cápsides vacías a través de una estructura denominada portal, que se localiza en uno de los vértices de la cápside. Finalmente, algunas de las proteínas que han participado en el ensamblaje son eliminadas y la proteasa viral escinde las proteínas precursoras para dar lugar a los viriones maduros [124]–[127] .

A medida que la nueva progenie viral se forma, se exagera el efecto citopático de las células. El efecto citopático se caracteriza por la morfología redondeada que adquieren las células a causa de remodelaciones en su citoesqueleto. Pese a que las partículas virales pueden ser liberadas paulatinamente tras empezar a formarse, la liberación alcanza su punto máximo con la lisis celular. La proteína ADP es una glicoproteína de membrana que pese estar codificada en la región E3, se expresa mínimamente a partir del promotor de dicha región y por el

contrario se sintetiza abundantemente a partir del MLP en la fase tardía pos-infección. La ADP juega un papel fundamental promoviendo la muerte de la célula y la salida efectiva de los nuevos viriones [108].

1.3.5. Expresión de transgenes terapéuticos en adenovirus oncolíticos

Tal y como se ha comentado anteriormente, unos de los mayores atractivos de la viroterapia oncolítica es la posibilidad de poder editar genéticamente los virus para que expresen genes terapéuticos que aporten beneficios adicionales en el nicho tumoral. La incorporación de transgenes terapéuticos en el genoma del adenovirus lleva implícita dos cuestiones técnicas: el tamaño del fragmento a incorporar y el lugar del genoma dónde incorporarlo. En relación al primer aspecto, las limitaciones del empaquetamiento del adenovirus deben ser consideradas. El HAdV-5, con un genoma de 36 Kb, puede empaquetar de forma correcta genomas de hasta 38 Kb, es decir, un 105% de su tamaño original [128]. Teniendo en cuenta esta limitación, el espacio del genoma debe ser utilizado de forma eficiente. La reducción de la utilización de espacio por parte de los transgenes puede lograrse de distintas formas.

Frecuentemente, se ha utilizado la región E3 del genoma viral, con genes dispensables para la replicación, para introducir transgenes y expresar estos en la fase temprana o *early* del ciclo de replicación viral. En algunos casos, se ha delecionado total o parcialmente la unidad E3 para dar cabida a transgenes controlados por promotores exógenos, como el frecuentemente utilizado CMV. Sin embargo, la expresión de transgenes bajo promotores de este tipo implica una expresión constitutiva, luego

reduce la selectividad de la expresión del transgén. Ante este inconveniente, en otros casos la estrategia seguida ha consistido en incorporar el transgén en sustitución de un gen de E3, de manera que se utilizan los elementos transcripcionales del gen endógeno. En esta estrategia los transgenes siguen la pauta de expresión del gen sustituido.

Pese a que las delecciones en la región E3 son una estrategia relativamente habitual, algunos estudios apuntan a que ello se relaciona con una pérdida de la capacidad oncolítica del virus [129]–[132]; probablemente debida a que las proteínas de E3, aun no ser necesarias para la replicación, tienen un importante papel en la evasión del sistema inmunitario [109]–[114].

Otra opción para incorporar transgenes explotando promotores endógenos, y sin eliminar regiones del genoma adenoviral, pasa por incorporar el transgén tras un gen viral haciendo uso de IRES (*Internal Ribosome Entry Signal*), SA (*Splicing Acceptor*) o secuencias T2A. En este abordaje es frecuente la incorporación de los transgenes después del gen de la *fibra* y bajo el control del MLP. De esta forma, los transgenes son expresados como un gen tardío o *late* más, lo cual, en contraposición a la expresión en fases tempranas, reviste diversas ventajas. Por un lado, la expresión de los transgenes posteriormente a la replicación del ADN viral, evita complicaciones derivadas del uso de transgenes citotóxicos que puedan interferir con el proceso de replicación. Por otra parte, que la replicación viral preceda a la expresión del transgén, amplía el número de copias génicas y, por lo tanto, conduce a una mayor expresión. Finalmente, el control temporal de la expresión del transgén es mucho más estricto y oncosselectivo, puesto que la expresión tan solo tendrá lugar en aquellas células permisivas a la replicación viral [133].

A pesar del consenso existente acerca de las ventajas de expresar transgenes en *late*, lo cierto es que actualmente abundan mayoritariamente las construcciones *early*, tal y como se refleja en los últimos estudios publicados [134]–[140]. Asimismo, en el ámbito de los ensayos clínicos, 11 de los 17 estudios en curso utilizan adenovirus armados en *early* (Tabla 1.1.).

Probablemente, esta realidad sea, en parte, debida a que la expresión en *late* conlleva, en ocasiones, la entrada en conflicto con la correcta expresión de los genes virales tardíos. Así, diversos investigadores han dirigido sus estudios hacia entender mejor las repercusiones de armar transgenes en *late*. Se ha estudiado qué regiones del genoma son más viables para con el virus a la hora incorporar los transgenes bajo el control del MLP. Asimismo, otros trabajos se han focalizado en estudiar la repercusión que tienen distintos IRES, SA y secuencias T2A para la expresión de los transgenes [54], [141]–[146].

En este mismo sentido de entender mejor la repercusión que tiene sobre el virus armar transgenes, y de contribuir así a optimizar el rendimiento terapéutico de la viroterapia oncolítica, en esta tesis hemos estudiado el impacto del uso de codones de los transgenes terapéuticos sobre el virus.

Los adenovirus, de igual manera que muchos otros virus, presentan un patrón de uso de codones particular. Así, mientras los genes reguladores tempranos tienen un perfil menos optimizado sesgado hacia codones terminados en A o T (AT3), los genes tardíos estructurales y los genes implicados en la replicación tienen, en general, un patrón más optimizado sesgado hacia codones terminados en G o C (GC3). Se ha demostrado que el adenovirus utiliza la desviación en el uso de codones como

Adenovirus Oncolítico	Transgén (promotor)	Fase Ensayo Clínico	Target	Referencia
LOAd703 [214]	4-1BBL; TMZ-CD40L (CMV)	I/IIa	Cáncer de páncreas	NCT02705196
		I/II	Cáncer de páncreas, ovario, colorectal y biliar	NCT03225989
		I/II	Melanoma	NCT04123470
Ad5-yCD/mutTKSR3 _{SR39} 9rep-hIL12 [78][215]	yCD/mutTK _{SR39} ; IL-12 (CMV)	I	Cáncer de próstata	NCT02555397
		I	Cáncer de páncreas	NCT03281382
ONCOS-102 [216]–[218]	GM-CSF (E3)	I	Tumores sólidos avanzados	NCT01598129
		II	Mesotelioma pleural	NCT02879669
		I	Melanoma	NCT03003676
		I/II	Cáncer de próstata	NCT03514836
		I/II	Tumores peritoneales avanzados	NCT02963831
CG0070 [219]–[221]	GM-CSF (E3)	II	Cáncer de vejiga	NCT02365818
VCN-01 [69], [71], [72]	PH20 (MLP)	I	Tumores sólidos avanzados	NCT02045602
		I	Cáncer de páncreas	NCT02045589
		I	Retinoblastoma	NCT03284268
		I	Cáncer de cabeza y cuello	NCT03799744
NG-350A [146]	Anti-CD40 (MLP)	I	Tumores epiteliales	NCT03852511
NG-641 [146]	Anticuerpo FAP-TAc; CXCL9/CXCL10/IFN α (MLP)	I	Tumores epiteliales	NCT04053283

Tabla 1.1 | Ensayos clínicos en curso con adenovirus oncolíticos armados

mecanismo para optimizar el reparto de los recursos traduccionales de la célula, y que la modificación de este patrón puede afectar negativamente a la capacidad replicativa del virus o *fitness* viral [147]. Tomando como referencia este escenario, resulta plausible pensar que armar los adenovirus con transgenes puede modificar el equilibrio de uso de codones del genoma viral e impactar negativamente sobre el virus.

1.4. Uso de codones y regulación de la expresión génica

1.4.1. El código genético

En 1958 Crick postuló el dogma central de la biología, las secuencias aminoacídicas de las proteínas están determinadas por las secuencias nucleotídicas del ADN; no obstante, por aquel entonces aún no se sabía cómo dicha información estaba codificada [148]. Tres años más tarde, Crick junto con Branett, Branner y Whatts-Tobin dieron respuesta a la pregunta en su publicación *General Nature of the genetic code for proteins* en la revista *Nature* [149]. En dicho artículo postularon que el código genético está organizado en codones (tripletes formados a partir de los nucleótidos A, C, G y T), que es redundante (existen más codones que aminoácidos, de manera que un mismo aminoácido puede ser codificado por varios codones), que la secuencia nucleotídica es leída desde un punto fijo y de manera continua, que el código genético no es solapado (un nucleótido pertenece sólo a un triplete) y que dicho código es universal.

A día de hoy, estos postulados han sido extensamente corroborados y sabemos que las secuencias de ADN están formadas por 64 codones (61 son específicos de aminoácidos, y los tres restantes se utilizan como señales de parada). La secuencia codificante de ADN es transcrita a ARNm y, tras experimentar las correspondientes modificaciones post-transcripcionales, este ARNm es leído de acuerdo al código genético en un proceso denominado traducción [150]. Los responsables de llevar a cabo el proceso de traducción son los ribosomas. Éstos, gracias a las moléculas de ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) aminoacetiladas, van incorporando aminoácidos a la cadena peptídica hasta completar la síntesis proteica [150], [151] (Fig 1.8).

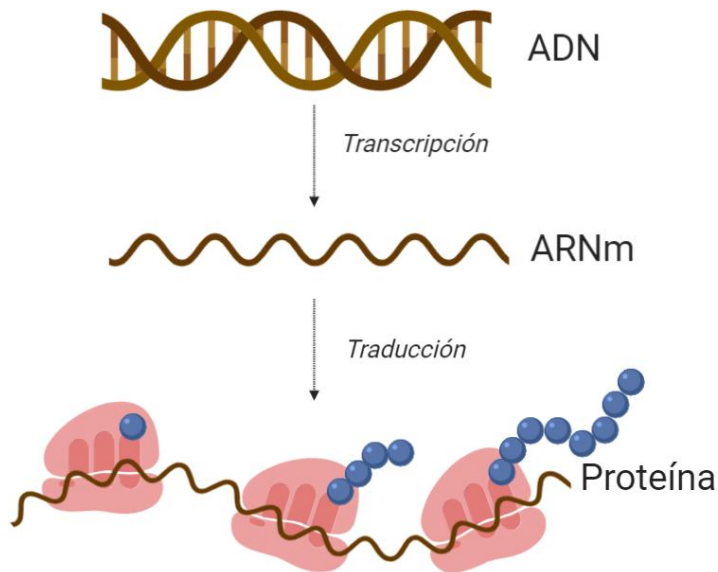


Figura 1.8 | Representación simplificada del proceso de expresión génica.

Hasta la fecha hay descritos 22 aminoácidos; 20 estándares o clásicos (Fig. 1.9) y dos descubiertos más recientemente que presentan alguna

1.4.2. ARNt

Los ARNt presentan un papel fundamental en el proceso de traducción. Los ARNt se acomplejan con los ribosomas y funcionan como adaptadores para convertir la información contenida en los codones del ARNm en aminoácidos. Así, en el ribosoma un determinado codón del ARNm es leído por el correspondiente ARNt a través de su *loop* anticodón, que contiene un triplete de bases (anticodón) complementario al codón (Fig. 1.9.). Cada ARNt está cargado en su extremo 3' con un aminoácido particular, que es incorporado a la cadena proteica cuando se da el reconocimiento codón-anticodón.

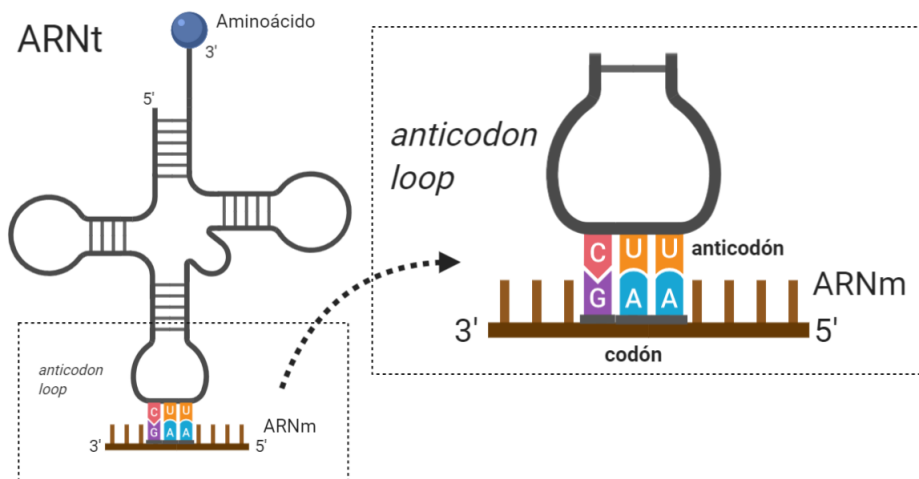


Figura 1.9 | Esquema de la estructura del ARNt.

Cabe mencionar que, pese a haber 61 codones, el número ARNt oscila entre 23 y 45 (Fig. 1.10). Así, la posibilidad de decodificar los 61 codones se basa en la flexibilidad de reconocimiento entre la base 3' del codón y la base 5' del anticodón (*wobble base pair*). En otras palabras, el

reconocimiento codón-anticodón no siempre sigue las reglas de Watson y Crick [156], permitiendo así que un único ARNt pueda leer distintos codones [157].

Los ARNt se caracterizan por ser las moléculas de ARN más ricas en modificaciones pos-transcripcionales [158]. Estas modificaciones pos-transcripcionales juegan un papel clave modulando la capacidad de los ARNt para formar interacciones de tipo *wobble* [157], [159].

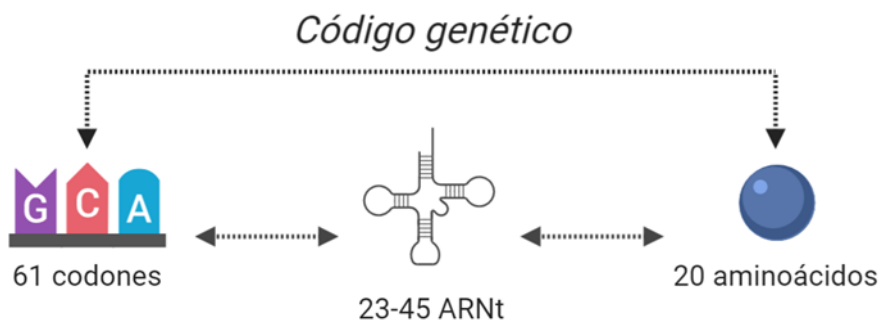


Figura 1.10 | Resumen gráfico del concepto código genético.

1.4.5. Uso de codones y ARNts como mecanismo de regulación génica

Dentro del conjunto de codones que codifican para un aminoácido, no todos son utilizados con la misma frecuencia. Esta propensión de algunos codones a estar desproporcionalmente representados en el transcriptoma recibe el nombre de desviación en el uso de codones [160].

Basándose en este hecho, *Sharp* y *Li* propusieron, en 1987, la utilización del parámetro CAI (*Codon Adaptation Index*) como medida de predicción de la expresión de un gen. Los autores describen que este índice toma como referencia el uso de codones de un conjunto de genes altamente expresados para determinar en qué medida cada codón favorece la expresión génica. A partir de estos datos, el valor de CAI para un gen de interés es calculado en función de su composición de codones. Así, un valor elevado de CAI significa similitud entre el gen de interés y el conjunto de genes de referencia, luego predice una elevada capacidad de expresión. Los autores postularon además la utilidad de este parámetro para predecir la expresión heteróloga de genes [161].

Los codones se clasifican en óptimos y no óptimos en función de cuán eficientemente se decodifican y se traducen al correspondiente aminoácido [162]. Tras el descubrimiento de la desviación del uso de codones, se observó una correlación positiva entre la frecuencia de los codones y la abundancia de los ARNt, especialmente en procariotas [163], [164] Dado que la unión entre ARNts y ribosomas es estocástica, los ARNts más abundantes tienen más probabilidades de unirse a los ribosomas. Teniendo esto en cuenta, y en base a la correlación entre la frecuencia de los codones y la abundancia de los ARNts, se ha descrito que los codones más óptimos coincidirían con los codones más representados en el transcriptoma [163], [165]–[168].

Sin embargo, este concepto no es una máxima, y no en todos los casos y todas las especies los codones más y menos frecuentes se corresponden con los codones más óptimos y menos óptimos, respectivamente [169]. De hecho, recientemente, un nuevo estudio realizado con ARNm humanos ha puesto en relieve que, para nuestra especie, los codones GC3

y los codones AT3 pueden considerarse óptimos y no óptimos, respectivamente. Este hecho sería así en tanto que se ha observado que moléculas ricas en codones GC3 presentan mayor estabilidad y más velocidad de traducción [169].

En general está aceptado que la abundancia de ARNts correlaciona con el número de copias de los genes que codifican dichos ARNts, de modo que los ARNts con más copias génicas serían los más abundantes en la célula. Así, en 2004 *dos Reis et al.* definieron el tAI (*tRNA Adaptation Index*) como medida de adaptación de un gen al *pool* de ARNt usando el número de copias de los genes ARNt como indicador de su abundancia [167]. Sin embargo, esta estimación, aunque ampliamente utilizada, es solo aproximada, en tanto que cada vez más diversos estudios constatan que el *pool* de ARNts presenta un gran dinamismo. Se han observado cambios en el *pool* de ARNts durante el ciclo celular [170], en respuesta a situaciones de estrés [171] o en células tumorales respecto a células sanas [172], [173]. Además, también se han descrito diferencias en el *pool* de ARNt tejido-específicas dentro de un mismo organismo [174].

En cualquier caso, e independientemente de la abundancia de cada ARNt en el *pool*, lo que resulta cada vez más evidente es la importancia del equilibrio codón-anticodón a fin de garantizar una síntesis proteica eficiente y asegurar la homeostasis celular [162], [175], [176]. Distintos estudios apuntan a que en un sistema con recursos traduccionales finitos como es la célula, un desbalance en el equilibrio codón-anticodón puede impactar de manera negativa no solo en los genes que promueven el desequilibrio, sino en todo el proteoma celular [177], [178].

De acuerdo a estos estudios, hemos hipotetizado que un escenario de desbalance en el equilibrio codón-anticodón podría darse cuando modificamos el genoma adenoviral para armarlo con un transgén terapéutico. Dicho de otra forma, la incorporación de un transgén terapéutico podría alterar el balance entre oferta de recursos traduccionales de la célula y la demanda de ellos que ejerce el virus. Este desbalance podría impactar no únicamente sobre el transgén sino sobre todo el proteoma viral y, por ende, en la capacidad de producción de nuevos viriones.

2. Objetivos

El objetivo general de esta tesis ha sido estudiar el papel del uso de codones de transgenes terapéuticos armados en adenovirus sobre la potencia oncolítica, y diseñar un modelo de uso de codones para los transgenes que permita una expresión óptima de los mismos y compatible con el *fitness* viral.

De manera más específica, los objetivos han sido:

1. Evaluar la influencia de la incorporación de un transgén en el genoma del HAdV-5 sobre la replicación viral en función de su uso de codones y de su momento de expresión en el ciclo replicativo.
2. Recodificar los genes terapéuticos de la hialuronidasa de abeja y la 2'desoxirribosilnucleósido transferasa de *Leishmania mexicana* (*LmPDT*) para conseguir un equilibrio entre la replicación viral y la expresión de los transgenes que permita incrementar la eficacia del tratamiento oncolítico.

3. Evaluar *in vitro* e *in vivo* la eficacia antitumoral de adenovirus oncolíticos armados con las proteínas terapéuticas recodificadas.

3. Materiales y Métodos

3.1. Cultivo y manipulación bacteriana

3.1.1. Cepas bacterianas utilizadas

Para el desarrollo del presente trabajo se han utilizado las cepas bacterianas DH5-alfa y SW102.

3.1.1.1. DH5-alfa

Células termo-competentes utilizadas para la amplificación de plásmidos. Se trata de bacterias recombinasa y endonucleasa negativas (recA1MUT; endAMUT) cuya membrana se torna inestable a 42°C. Las células DH5-alfa competentes fueron adquiridas a través de *Thermo Fisher Scientific*.

Condiciones de cultivo y almacenamiento de DH5-alfa

Las bacterias DH5-alfa fueron cultivadas a 37°C en medio *Luria Broth* (LB) suplementado con los antibióticos correspondientes en cada caso.

Los stocks bacterianos se almacenaron a -80°C en forma de glicerinado (80% cultivo bacteriano saturado + 20% glicerol).

3.1.1.2. SW102

Células electro-competentes utilizadas para la modificación del genoma adenoviral mediante el sistema AdZ.

Esta cepa se caracteriza por contener el genoma adenoviral flanqueado por dianas *SceI* dentro de un cromosoma bacteriano artificial (BAC). Estas dianas permiten la linealización del genoma adenoviral gracias a la expresión, en la célula eucariota, de la endonucleasa *SceI*, contenida también en el BAC. Asimismo, esta cepa presenta un sistema de recombinasas inducible térmicamente a 42°C que permite la recombinación entre fragmentos con 40 pares de bases de homología.

La cepa presenta un gen de resistencia a cloranfenicol, así como una mutación en la subunidad 30S ribosomal que la hace también resistente a estreptomicina.

Condiciones de cultivo y almacenamiento de SW102

Las bacterias SW102 fueron cultivadas a 32°C (para prevenir la expresión de las recombinasas) en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes en cada caso.

Los stocks bacterianos se almacenaron a -80°C en forma de glicerinado (80% cultivo bacteriano saturado + 20% glicerol).

3.1.2. Técnicas de manipulación bacteriana

3.1.2.1. Transformación de células DH5-alfa

El ADN plasmídico incorporado en las células bacterianas se duplica al tiempo que lo hace el ADN bacteriano, de forma que la cantidad de ADN plasmídico se incrementa a medida que las células se dividen. Según este principio, y con el objetivo de obtener cantidades suficientes de los plásmidos de interés, se transformaron células DH5-alfa.

El proceso de transformación se realizó incubando las bacterias en hielo junto con el ADN plasmídico durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, las bacterias se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 20 segundos, seguido de una incubación de 2 minutos en hielo. A continuación, se recuperó el cultivo incubándolo en agitación durante 1 hora. Tras la recuperación del cultivo, éste se sembró en placas de LB-agar con el antibiótico correspondiente a fin de seleccionar las bacterias transformadas (Fig. 3.1.).

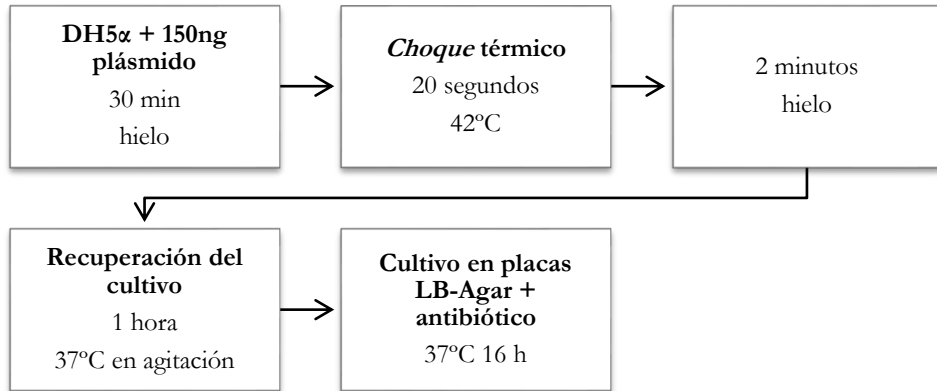


Figura 3.1 | Resumen esquemático del protocolo de transformación de células DH5-alfa.

3.1.2.2. Sistema AdZ

El sistema AdZ (*adenovirus with zero cloning steps*) fue originariamente desarrollado por el Dr. Richard Stanton [179], y posteriormente modificado por la Dra. Puig-Saus [180]. Este sistema permite introducir de forma rápida y eficiente modificaciones de distinta naturaleza en múltiples regiones del genoma adenoviral. La selección de los clones positivamente recombinados se realiza mediante un sistema de doble selección antibiótica gracias al casete antibiótico *rpsL-neo*. Este casete incorpora un gen de resistencia a kanamicina y una copia salvaje de la subunidad 30S ribosomal que sensibiliza a estreptomomicina. De esta forma, la introducción o sustitución de dicho casete en el BAC modifica la sensibilidad antibiótica de la cepa.

Detalle del sistema de doble selección antibiótica

	Estrategia	Antibióticos
<i>Introducción del casete rpsL-neo</i>	Selección positiva	Cloranfenicol + Kanamicina
	Selección negativa	Cloranfenicol + Estreptomicina
<i>Sustitución del casete rpsL-neo</i>	Selección positiva	Cloranfenicol + Estreptomicina
	Selección negativa	Cloranfenicol + Kanamicina

Concentraciones antibióticas de trabajo

Antibiótico	Concentración
Cloranfenicol	12.5 µg/ml
Kanamicina	15 µg/ml
Estreptomicina	5 mg/ml

Para llevar a cabo las modificaciones se realizaron los pasos del protocolo que se detalla a continuación (Fig. 3.2).

Primeramente las bacterias se cultivan durante toda la noche en 3 ml de LB-Cloranfenicol más estreptomicina o kanamicina, en función de si se desea introducir o substituir el casete *rpsL-neo*, respectivamente.

El día siguiente, se incorpora un inóculo de 1-2 ml del cultivo crecido en 15 ml de LB-antibióticos. Este crecimiento se efectúa hasta que el cultivo llega a una fase exponencial que se corresponde con una densidad óptica de 0.5-0.6 a 600 nm.

A continuación, se prosigue con la inducción del sistema de recombinasas mediante un choque térmico de 15 minutos en un baño agitado a 42°C, seguido de 15 minutos en hielo. A partir de este punto, las bacterias deben mantenerse siempre próximas a los cero grados, a fin que permanezcan electro-competentes hasta el momento de la electroporación.

A continuación, se centrifugan las bacterias a 0°C y 4200 rpm durante 5 minutos, y se resuspende el precipitado bacteriano en 10 ml de agua fría. Este proceso se repite 3 veces. Después de centrifugar la última vez, el precipitado se resuspende en un volumen aproximado de 400 µl de agua fría estéril. A 50 µl de dicha suspensión bacteriana se incorporan 150 ng del fragmento que se desea introducir flanqueado por colas homólogas a la región que se quiera modificar, y se realiza la electroporación en las siguientes condiciones:

Condiciones de electroporación

Parámetro	Valor
Cubeta	0.1 cm
Voltaje	1800 V
Capacitancia	25µF
Resistencia	200 Ω

Después de la electroporación, se recupera el cultivo bacteriano en 1 ml de LB sin antibióticos durante 70-90 minutos. Transcurrido ese tiempo, se siembra una dilución 1/10 en placas de LB con el antibiótico de selección positiva y se incuba a 32°C durante un período de 30h aproximadamente.

Cuando las colonias son suficientemente visibles se aíslan en una placa con la combinación antibiótica de selección negativa y a su vez se hace

crecer dichas colonias en medio líquido con la combinación antibiótica de selección positiva.

Tras 16-20h de incubación, se seleccionan aquellas colonias que han pasado el control de doble selección antibiótica y se realizan MiniPreps de las mismas (véase apartado 3.2.1.1. *Aislamiento de ADN plasmídico de células procariotas*). Las MiniPreps se utilizan para testar si las colonias seleccionadas son correctas. La comprobación se realiza a tres niveles:

1. Mediante amplificación por PCR de la región recombinada
2. Mediante restricción para comprobar la integridad del BAC
3. Mediante secuenciación de la región modificada

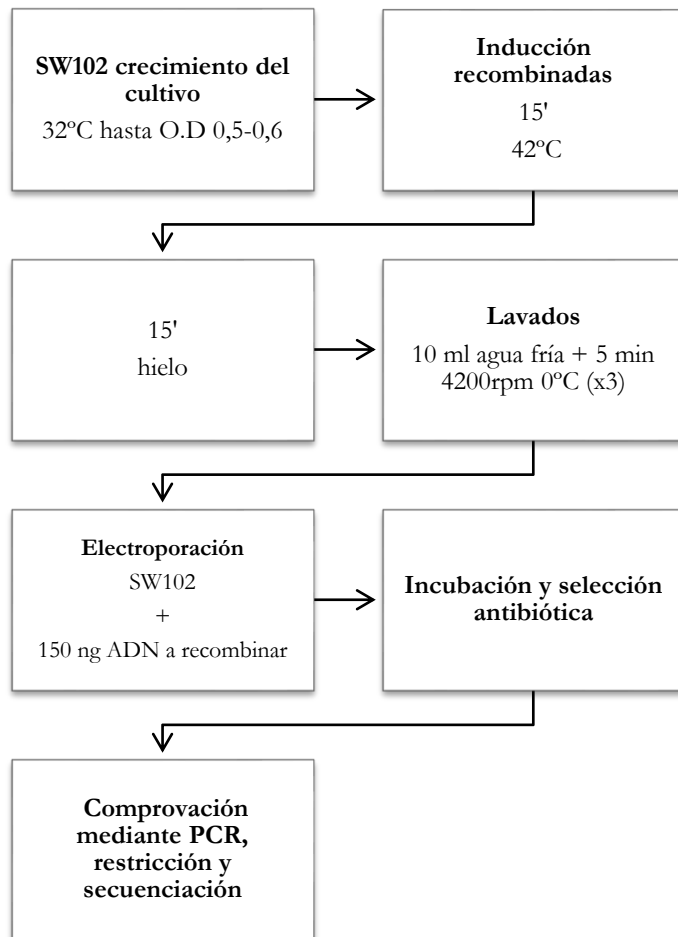


Figura 3.2| Resumen esquemático del protocolo de modificación del genoma adenoviral mediante el sistema AdZ.

3.2. Manipulación de ADN

3.2.1. Aislamiento y cuantificación de ADN

3.2.1.1. Aislamiento de ADN plasmídico de células procariotas

El ADN plasmídico de células procariotas se obtuvo a partir de cultivos bacterianos mediante el método de lisis alcalina y precipitación en presencia de sales y alcohol. Los cultivos bacterianos se obtuvieron creciendo la cepa de interés en medio LB con los antibióticos correspondientes hasta saturación (aproximadamente 16-20h).

Aislamiento de ADN a pequeña escala, MiniPreps

El aislamiento de ADN a pequeña escala se empleó para obtener cantidades de ADN en torno a 50 µg. Para ello, se creció la cepa de interés en 3 ml de medio de cultivo, y tras llegar éste a saturación, las células fueron precipitadas por centrifugación a 6000 g durante 5 minutos. A continuación, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado celular en la solución isotónica P1. Después, el cultivo homogenizado se sometió a un proceso de lisis alcalina mediante la solución P2. Transcurridos 5 minutos, la reacción de lisis se neutralizó incubando con la solución P3 durante 20 minutos en hielo.

A continuación, se centrifugó la muestra para eliminar los restos celulares. El ADN plasmídico contenido en la fase acuosa se precipitó mediante la agregación de isopropanol y posteriormente se lavó con etanol al 70%. El

precipitado de ADN se dejó secar hasta eliminar, por completo, la presencia de alcohol. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 30 μ l agua y se conservó a -20°C .

Detalle de las soluciones

	Componentes	Concentración
<i>Solución P1</i>	Tris	50 mM
	EDTA	10 mM
<i>Solución P2</i>	NaOH	0.1 M
	SDS	1%
<i>Solución P3</i>	Acetato potásico	1.5 mM
	Ácido acético	hasta pH 5.5

Aislamiento de ADN a gran escala, MaxiPreps

El aislamiento de ADN a gran escala se empleó para obtener cantidades de ADN en torno a los 500 μ g y de pureza elevada. Este procedimiento se realizó de manera estandarizada siguiendo el protocolo correspondiente al kit comercial *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen - ref. 12163). Dicho protocolo sigue los mismos principios descritos en el apartado anterior.

3.2.1.2. Aislamiento de ADN de células eucariotas

La obtención de ADN de células eucariotas se realizó de manera estandarizada mediante el kit comercial *Norgen's Blood DNA Isolation Mini Kit* (NORGEN BIOTEK CORP. - ref. 46380). Con dicho kit la purificación se lleva a cabo mediante un proceso de cromatografía en columna. El ADN se une a la columna en presencia de sales y se libera en condiciones de baja salinidad y pH ligeramente alcalino.

3.2.1.3. Aislamiento de ADN adenoviral procedente de células infectadas y/o de su sobrenadante

La obtención de ADN viral procedente de células infectadas se realizó mediante el kit comercial *Norgen's Blood DNA Isolation Mini Kit* (NORGEN BIOTEK CORP. - ref. 46380). Este método de purificación no es capaz de diferenciar entre ADN viral y ADN celular, de forma que mediante el mismo procedimiento fue posible recuperar ambos.

3.2.2. Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN obtenido con las técnicas anteriormente descritas se realizó a través de la medida de absorbancia a 260nm y posterior aplicación de la Ley de Lambert-Beer $C = A / \alpha l$. Siendo **A** la absorbancia, α el coeficiente de extinción a 260 nm ($0.020 (\mu\text{g/ml})^{-1} \text{cm}^{-1}$) y **l** la distancia de la trayectoria óptica (cm). La relación de absorbancia 260/280 fue tomada en cuenta para evaluar el nivel de pureza de la muestra. Una relación de 1.8 se considera óptima, mientras que valores inferiores a 1.7 denotan contaminación por proteínas o solventes. Las cuantificaciones de absorbancia se realizaron con el espectrofotómetro *NanoDrop*TM (Thermo Scientific).

3.2.3. Digestión enzimática

El ADN es susceptible de ser cortado mediante enzimas de restricción, endonucleasas bacterianas capaces de reconocer secuencias específicas de ADN y romper en ese punto los enlaces fosfodiéster de la doble hebra, dejando extremos romos o cohesivos.

Las digestiones se realizaron incubando el ADN a 37°C durante 1-16h con la correspondiente enzima de restricción, y el tampón enzimático indicado por la casa comercial en cada caso.

Reacción de digestión enzimática

Componente	Cantidad
ADN	1 μ L (0.5-1 μ g/ μ L)
10x Tampón	2 μ L
Agua libre de nucleasas	16 μ L
Enzima	1 μ L (10U)

El resultado de las restricciones se determinó a través del análisis del patrón de bandas resultante en geles de agarosa. En los casos convenidos, los fragmentos de ADN fueron recuperados mediante el kit comercial de extracción de ADN en agarosa *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen - ref. 28704).

3.2.4. Ligación

La ligación es el proceso por el cual dos fragmentos de ADN bicatenario, con extremos romos o cohesivos complementarios, se unen entre sí. Esta reacción es llevada a cabo por una enzima denominada ligasa que, mediante el uso de ATP como fuente de energía, cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre el grupo 5' fosfato de una cadena y el grupo 3' hidroxilo de otra cadena.

Las ligaciones se realizaron con la enzima *T4 DNA ligase* (Roche – ref. 10481220001) a 4°C durante 16 h, siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.2.5. Técnicas de amplificación del ADN

3.2.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación *in vitro* de fragmentos específicos de ADN. Esta reacción se basa en la actividad enzimática de la polimerasa, que copia hebras de ADN mediante la incorporación de desoxiribonucleótidos (dNTPs). La especificidad de la reacción viene dada por el uso de cebadores que reconocen la hebra molde de ADN y a su vez sirven de punto de partida a la polimerasa. Los cebadores son cadenas de 20-25 nucleótidos complementarias a los extremos 3' de la región a amplificar.

La reacción se realiza en presencia de un tampón enzimático suplementado con magnesio y sigue tres fases (desnaturalización, hibridación y elongación) que se repiten cíclicamente y de forma automatizada entre 25 y 40 veces a fin de amplificar exponencialmente el ADN de interés.

Todos los procesos de PCR del presente trabajo se llevaron a cabo usando la polimerasa *DreamTaq* (Thermo Fisher Scientific – ref. EP0703), o la polimerasa *Expand™ High Fidelity* (Roche – ref. 11732641001) en aquellos casos en los que el fragmento se utilizó para técnicas de clonaje.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador *ABI 2720* (Applied Biosystems).

Condiciones del programa de PCR

Desnaturalización inicial	94°C-5'
25-40 ciclos	
<i>Desnaturalización</i>	94°C-30''
<i>Hibridación</i>	<i>T^a cebador específica-30''</i>
<i>Elongación</i>	72°C-1'/1 kb
Elongación final	72°C-7'

La técnica de PCR se utilizó principalmente para la generación de construcciones mediante sistema AdZ, y para la generación de plásmidos de expresión. Véase en el anexo la *Tabla 2. Cebadores para la modificación de los plásmidos miRVec y pcDNA 3.1+/N-HA* y la *Tabla 3. Cebadores para la modificación de plásmidos según el sistema pAdZ*.

3.2.6. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) se basa en el mismo principio que la PCR pero permite determinar la cantidad de un fragmento específico de ADN gracias a un fluoróforo. Dicho fluoróforo se intercala entre las hebras de ADN que conforman una doble hélice, y emite entonces fluorescencia. A medida que avanza la reacción, los niveles de fluorescencia aumentan subsecuentemente a la amplificación de moléculas de ADN donde el fluoróforo puede intercalarse. La cuantificación se basa en la determinación del ciclo de PCR en el que el

nivel de fluorescencia supera un umbral determinado. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo con el reactivo comercial *LightCycler® 480 SYBR Green I Master* (Roche - ref. 04707516001) y el termociclador *ViiA 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems); véase en el anexo la *Tabla 1. Cebadores usados en qPCR*.

Reacción de qPCR

Componente	Cantidad
ADN	1 μ L
SYBR Green 2x	5 μ L
Cebador <i>forward</i> 10 μ M	0.3 μ L
Cebador <i>reverse</i> 10 μ M	0.3 μ L
Agua libre de nucleasas	3.4 μ L

3.2.7. Generación de plásmidos de expresión GFP

En este trabajo se generaron cinco plásmidos de expresión GFP: miRVec_GFP_opt, miRVec_GFP_DEopt, miRVec_GFP_Adapt1, miRVec_GFP_Adapt2 y miRVec_GFP_Adapt3.

Los genes *GFP_opt* y *GFP_DEopt* fueron amplificados a partir de plásmidos de expresión comerciales mediante cebadores con colas con dianas de restricción BamHI (cebador *forward*) y EcoRI (cebador *reverse*); véase en el anexo las parejas de cebadores 1 y 2 de la *Tabla 2. Cebadores para la modificación de los plásmidos miRVec y pcDNA 3.1+/N-HA*. Los fragmentos amplificados fueron purificados, digeridos con las enzimas BamHI y EcoRI y nuevamente purificados. A continuación, los

fragmentos se insertaron mediante ligación en el vector miRVec previamente digerido y purificado con las mismas enzimas de restricción.

Los genes *Adapt1*, *Adapt2*, y *Adapt3* fueron adquiridos a través de IDT en formato de gBlock[®], con la secuencia codificante flanqueada por dianas de restricción BamHI (extremo 5') y EcoRI (extremo 3'); véase en el anexo la *Tabla 4. gBlocks[®] Gene Fragments*. Para generar los plásmidos de expresión con los gBlocks[®], se procedió de igual manera como se ha detallado anteriormente para los fragmentos de PCR amplificados y purificados de *GFP_opt* y *GFP_DEopt*

Las construcciones se usaron para transformar células DH5-alpha y las secuencias fueron comprobadas mediante secuenciación (Fig. 3.3).

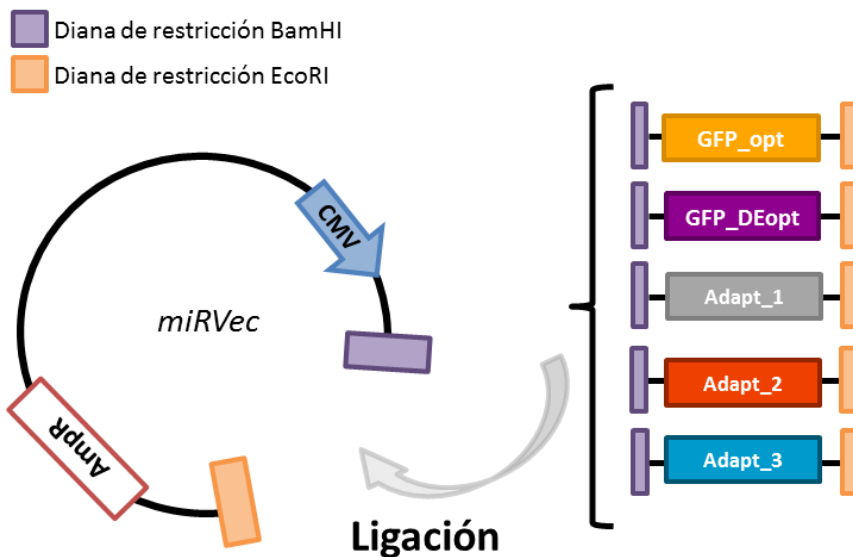


Figura 3.3 | Esquema representativo del proceso de construcción de los plásmidos de expresión GFP.

3.2.8. Generación de plásmidos de expresión PDT

En la presente tesis se ha trabajado con dos plásmidos de expresión PDT: pcDNA 3.1⁺/N-HA-PDT y pcDNA 3.1⁺/N-HA-PDT_Adapt.

El plásmido pcDNA 3.1⁺/N-HA-PDT fue amablemente cedido por el Dr. Jesús Fernández (Universidad Europea), y el plásmido pcDNA 3.1⁺/N-HA-PDT_Adapt fue generado a partir del plásmido pcDNA 3.1⁺/N-HA-PDT. Para ello la secuencia *PDT_Adapt* fue adquirida a través de IDT en formato de gBlock[®]. La secuencia fue amplificada con cebadores con colas con dianas de restricción EcoRI y BamHI; véase en el anexo la pareja de cebadores 3 de la *Tabla 2. Cebadores para la modificación de los plásmidos miRVec y pcDNA 3.1+/N-HA*. El fragmento amplificado y purificado, así como el plásmido pcDNA 3.1⁺/N-HA-PDT fueron digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. El producto de la restricción del plásmido pcDNA 3.1⁺/N-HA-PDT se reveló en un gel de agarosa a fin de seleccionar el fragmento correspondiente al vector pcDNA 3.1⁺/N-HA y descartar el fragmento correspondiente al gen PDT. A continuación, la inserción del gen PDT_Adapt en el vector pcDNA 3.1⁺/N-HA se llevó a cabo mediante ligación (Fig. 3.4). La construcción se usó para transformar células DH5-alpha la fidelidad de la secuencia fue comprobadas mediante secuenciación Sanger.

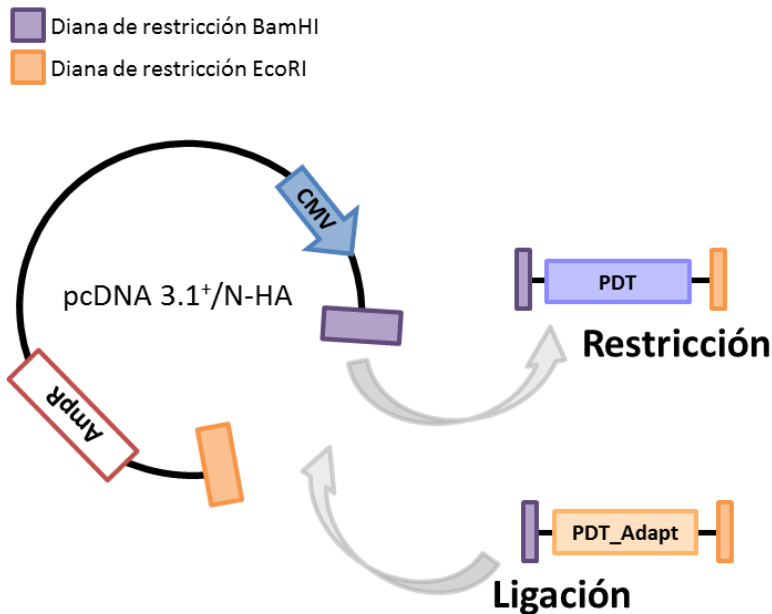


Figura 3.4 | Esquema representativo del proceso de construcción de los plásmidos de expresión PDT.

3.2.9. Secuenciación de ADN

La secuenciación de fragmentos de ADN se realizó mediante el método de Sanger. Este método se basa en una reacción de PCR en la que se incorporan aleatoriamente dideoxinucleótidos carentes del grupo hidroxilo en el carbono 3' y marcados con fluoróforos específicos para cada base. La incorporación de uno de estos dideoxinucleótidos resulta en el bloqueo de la polimerización. Esto conduce a la generación de un patrón de bandas mediante la detección de fluorescencia del cual, da lugar a la secuencia nucleotídica del fragmento de ADN molde.

Las secuenciaciones del presente estudio se llevaron a cabo por el servicio de secuenciación de *Beckman Coulter Genomics*.

3.3. Manipulación de ARN

3.3.1. Aislamiento de ARN

El ARN celular así como el ARN viral se aisló de manera estandarizada con el kit comercial *RNeasy mini kit* (Qiagen – ref. 74104).

Mediante dicho kit la purificación se realiza en primer lugar lisando las células con una solución a base de guanidina-tiocianato (*Qiazol Lysis Reagent*). A continuación, se añade etanol a la muestra para favorecer la unión del ARN a la membrana de sílica de las columnas de purificación incluidas en el kit. Tras la realización de diversos lavados, se consigue la elución del ARN con agua. Las muestras de ARN purificado se almacenaron a -80°C.

3.3.2. Cuantificación de ARN

La cuantificación del ARN obtenido con el proceso anteriormente descrito, se realizó mediante la medida de absorbancia a 260nm y posterior aplicación de la Ley de Lambert-Beer $C = A / \alpha l$. Siendo **A** la absorbancia, α el coeficiente de extinción a 260 nm (0.025 (µg/ml)-1 cm-1) y **l** la distancia de la trayectoria óptica (cm). La relación de absorbancia 260/280 fue tomada en cuenta para evaluar el nivel de pureza de la muestra. Una relación de 2 se considera óptima, mientras que valores inferiores denotan contaminación por ADN, proteínas o solventes. Las

cuantificaciones de absorbancia se realizaron con el espectrofotómetro *NanoDrop*TM (Thermo Scientific).

3.3.3. Análisis de expresión de ARN mensajero

El análisis de ARN mensajero (ARNm) celular y viral se realizó mediante RT-qPCR. Puesto que la polimerasa empleada en la qPCR no es capaz de reconocer las moléculas de ARN como molde, es necesario que éstas sean retrotranscritas a ADN. La reacción de retrotranscripción genera fragmentos de ADN bicatenario complementarios (ADNc) a los ARNm presentes en la muestra.

Para llevar a cabo las reacciones de retrotranscripción, se empleó el kit comercial *PrimeScript RT-PCR Kit* (Takara – ref. RR014B). El kit emplea la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney (MMLV-RT) juntamente con cebadores de 6 pares de bases aleatorias (*Random 6 mers*) y/o cebadores *OligodT* complementarios a la cola polyA para llevar a cabo la reacción de retrotranscripción.

Reacción de Retrotranscripción

Componente	Cantidad
ARN	500 ng
Tampón PrimeScript 5x	2 µL
Random 6 mers	0.5 µL
OligodT	0.5 µL
PrimeScript RT mix	0.5 µL
Agua libre de nucleasas	csp 10 µL

Condiciones del programa de retrotranscripción

Reacción de retrotranscripción	37°C-15'
Inactivación MMLV-RT	85°C-5''

Una vez retrotranscrito, el ADNc se utilizó como molde para su cuantificación por qPCR (véase el apartado 3.2.5.2. *Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa*).

3.4. Manipulación de proteínas

3.4.1. Aislamiento de proteínas

La extracción de proteínas celulares y virales se realizó mediante un tampón de lisis rico en SDS. Una vez homogeneizadas las muestras con el tampón de lisis, éstas se incubaron durante 10 minutos a 98°C. A continuación, los restos celulares fueron eliminados por centrifugación (5 minutos a 16.000 g) y las muestras se conservaron a -20°C.

Tampón de lisis

Componente	Cantidad
Tris HCl pH 6.8	50 mM
SDS	2%
Glicerol	10%
<i>Complete Mini Protease Inhibitor</i> 10x (Roche)	1%

3.4.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante un ensayo colorimétrico basado en la reducción mediada por proteínas de Cu^{2+} a Cu^{1+} en medio alcalino, y la posterior detección colorimétrica del catión Cu^{1+} por el ácido bicinconínico. La cuantificación se llevó a cabo con el kit *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific – ref. 23225) y la lectura de la absorbancia de las muestras se realizó a 562nm en el espectrofómeto *Synergy HT* (BioTek).

3.4.3. Western Blot

La técnica de Western Blot permite la identificación de proteínas concretas de una muestra mediante su separación electroforética por tamaños y su posterior detección con anticuerpos; véase en el anexo 8.1 la *Tabla 5. Anticuerpos utilizados en la técnica Western Blot*. Esta técnica comprende 3 fases principales: electroforesis en condiciones desnaturizantes, transferencia a membrana e inmunodetección.

3.4.3.1. Electroforesis en condiciones desnaturizantes

La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poli(acrilamida) en presencia de agentes desnaturizantes como el SDS y el DTT. El SDS es un detergente capaz de desnaturizar proteínas rompiendo enlaces no covalentes. Por otro lado, el SDS proporciona una carga negativa uniforme a las proteínas, de forma que éstas acaban separándose únicamente en función de su tamaño. El DTT, por su parte, es un agente reductor capaz de romper los puentes disulfuro. Finalmente, los geles de

poliacrilamida actúan a modo de tamiz molecular ralentizando el movimiento de moléculas grandes y favoreciendo la migración de moléculas pequeñas. De esta forma se logra la separación de las proteínas de acuerdo a su tamaño cuando éstas son sometidas a un campo eléctrico. En este trabajo se cargaron entre 15 μg y 80 μg de proteína.

Tampón de carga 6x

Componente	Cantidad
Tris base	300 mM
SDS	12%
DTT	600 mM
Azul de bromofenol	0.6%
Glicerol	60%

Tampón electroforesis

Componente	Cantidad
Tris base	3 g
SDS	1 g
Glicina	14.4 g
Agua	1L

3.4.3.2. Transferencia a membrana

Una vez realizada la electroforesis se transfirieron las proteínas a una membrana, a fin de poder realizar la inmunodetección. Para ello se colocó una membrada de nitrocelulosa (*AmershamTM Protran[®] 0.45 NC nitrocellulose Western blotting membranes*; GE Healthcare - ref. 10600051) entre

el gel y el polo positivo, de manera que las proteínas migraron del gel a la membrana al someterse a un campo eléctrico (400 mA - 1h).

Tampón transferencia

Componente	Cantidad
Tris base	3 g
Metanol	200 mL
Glicina	14.4 g
Agua	800 mL

3.4.3.3. Inmunodetección

La detección de proteínas específicas se realizó mediante el reconocimiento de epítomos concretos con anticuerpos. A fin de evitar uniones inespecíficas, se incubaron las membranas con las proteínas transferidas en una solución de bloqueo (10% de leche desnatada en polvo en TBST) durante 1h a temperatura ambiente (TA). A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos de interés 1h a TA o bien toda la noche (ON) a 4°C. Tras eliminar el exceso de anticuerpo mediante lavados con TBST, las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios (anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano) 1 h a TA.

TBST

Componente	Cantidad
Tris HCl	10 mM
NaCl	100 mM
Tween®20	0.1%

Finalmente, el revelado de la reacción de inmunodetección se realizó mediante el kit *Amersham™ ECL Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare – ref. RPN2209). En la reacción de revelado, la peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario promueve la oxidación del luminol al degradar peróxido de oxígeno, y esto produce una reacción de quimioluminiscencia. La quimioluminiscencia se detectó con el lector *LAS-4000* (Fujifilm).

La intensidad de las bandas detectadas por inmunodetección se cuantificó por densitometría con el programa ImageJ. En todos los casos el valor de intensidad de la banda de interés se relativizó al valor de intensidad de la banda de GAPDH de la correspondiente muestra.

3.4.4. Ensayo enzimático de actividad hialuronidasa

Los ensayos enzimáticos de actividad hialuronidasa llevados a cabo en este trabajo se hicieron por medición turbidimétrica de acuerdo con el protocolo elaborado por VCN Biosciences. La turbidimetría es una técnica analítica basada en la medición de la transmitancia lumínica, que varía en función de la turbidez de la muestra. La transmitancia (T) se relaciona con la absorbancia (A) mediante la siguiente fórmula:

$$A = -\log_{10}T$$

El ácido hialurónico proporciona turbidez a la muestra, y esta turbidez disminuye a medida que el ácido hialurónico es degradado por la actividad hialuronidasa. La actividad enzimática puede, por tanto, relacionarse con el aumento de la transmitancia y la disminución de la absorbancia de la muestra.

Para llevar a cabo el ensayo, se recogieron los sobrenadantes de células infectadas con adenovirus armados con genes hialuronidasa y se centrifugaron (5 minutos a 1200 rpm) para eliminar los restos celulares. Tras la centrifugación, las muestras se diluyeron en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) o se concentraron mediante concentradores *Amicon Ultra-15 10k centrifugal filters* (Merck Millipore - ref. UFC901024), en función de los requerimientos del experimento realizado en cada momento. A continuación, las muestras se incubaron con 0.3 mg/ml de ácido hialurónico en tampón fosfato. Esta incubación se realizó también de manera paralela con estándares de concentración conocida de hialuronidasa. La incubación se realizó a 37°C durante 14h. Transcurrido ese tiempo, la reacción se paró mediante una solución de albúmina ácida a pH 3,75, y se determinó la absorbancia a 600nm de las muestras y los estándares. Los estándares fueron utilizados para generar una recta patrón con la que se extrapolaron los valores de absorbancia obtenidos para las muestras. En todos los casos se utilizó como control negativo una muestra de células infectadas con el HAd-5 salvaje sin armar. Solo se consideraron positivas para actividad hialuronidasa aquellas muestras con un %T superior aL 130% respecto al control.

3.5. Cultivo celular eucariota

3.5.1. Líneas celulares utilizadas

A549. Línea tumoral derivada de un carcinoma de pulmón.
Adquirida a través de la ATCC.

PANC-1. Línea tumoral derivada de un carcinoma ductal de páncreas. *Adquirida a través de la ATCC.*

MIAPaCa-2. Línea tumoral derivada de un carcinoma de páncreas. *Adquirida a través de la ATCC.*

CP15-Luc. Línea tumoral con expresión de luciferasa generada en el laboratorio a partir de la línea parenteral CP15 (derivada de un fragmento de adenocarcinoma ductal de páncreas perpetuado en ratón [181]).

NP18. Línea tumoral derivada de una metástasis hepática de un adenocarcinoma ductal de páncreas. *Cedidas amablemente por el Dr. Gabriel Capellà (ICO-IDIBELL, l'Hospitalet de Llobregat).*

HEK293. Línea celular derivada de tejido epitelial de riñón embrionario. Se caracteriza por contener un fragmento correspondiente al extremo 5' del genoma del adenovirus 5. *Cedidas amablemente por el Dr. Ramon Alemany (ICO-IDIBELL, l'Hospitalet de Llobregat).*

HEK293T. Línea idéntica a la anterior excepto que contiene también el antígeno T del virus simio 40. *Adquirida a través de la ATCC.*

Todas las líneas utilizadas en el presente trabajo son de origen humano y fueron cultivadas en cultivos adherentes a 37°C y 5% de CO₂. Las células se cultivaron en DMEM (*Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Thermo Fisher Scientific - ref. 41966052) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (*Gibco™ Fetal Bovine Serum*; Thermo Fisher Scientific – ref. 10270106), 2mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina.

3.5.2. Transfecciones transitorias

La introducción de ADN exógeno para su expresión transitoria en células se llevó a cabo a través dos procedimientos distintos: transfección mediante fosfato cálcico y transfección mediante dendrímeros activados.

3.5.2.1. Transfección mediante fosfato cálcico

Esta técnica se fundamenta en la generación de precipitados de fosfato cálcico-ADN a partir de la incubación del ADN con una solución de cloruro de calcio en un tampón de sales. Dichos precipitados se añaden al cultivo y son interiorizados por las células mediante endocitosis.

Las transfecciones mediante fosfato cálcico se realizaron siguiendo el protocolo asociado al kit *CalPhos™ Mammalian Transfection Kit* (Clontech® Laboratories - ref. 631312).

3.5.2.2. Transfección mediante dendrímeros activados

El reactivo comercial *SuperFect®* es un dendrímero activado con una arquitectura esférica y con ramificaciones que nacen de un núcleo central y que terminan con grupos amino cargados positivamente. Este agente es capaz de unirse al ADN generando estructuras compactas con una carga neta positiva que permite la unión a receptores de la superficie celular cargados negativamente. Esto conduce a la internalización de los complejos por endocitosis no específica.

La transfecciones mediante dendrímero activados se realizaron siguiendo el protocolo asociado al producto comercial *SuperFect[®] Transfection Reagent* (Qiagen - ref. 301305).

3.5.3. Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular *in vitro* de este trabajo se determinó mediante el ensayo de reducción de MTT. Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica en la cadena respiratoria mitocondrial del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Esta reacción da lugar a la formación de cristales insolubles de formazán en cantidades proporcionales a la actividad metabólica y al número de células vivas del cultivo.

Este ensayo fue utilizado para determinar la citotoxicidad *in vitro* de los distintos adenovirus empleados en este trabajo y para evaluar el sistema suicida LmPDT/F-dAdo

.De forma general las células objeto de estudio se incubaron con la solución de MTT (0.7 mg/mL) durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, se aspiró la solución de incubación y se añadió el dimetilsulfóxido (DMSO) a fin de disolver los cristales de formazán. La lectura de la absorbancia se realizó a 550 nm mediante el espectrofómeto *Synergy HT* (BioTek).

Los valores de viabilidad se representaron relativizados al valor de las células control (100% de viabilidad). En los casos correspondientes, se determinó la dosis de virus necesaria para eliminar el 50% de las células (IC50) por regresión no lineal a partir de las curvas de viabilidad.

3.5.4. Análisis de cultivos celulares mediante el sistema de análisis de células vivas Incucyte®

El sistema Incucyte® (Essen Bioscience) es un sistema de imagen y análisis que permite la cuantificación de forma automatizada del comportamiento celular mediante la adquisición y el análisis de imágenes. Se permite así, conseguir información de procesos biológicos activos a tiempo real.

Este sistema fue empleado para evaluar la proliferación celular en estudios de citotoxicidad mediada por adenovirus armados con transgenes GFP. Asimismo, el sistema se utilizó para analizar la evolución de la expresión de los transgenes GFP durante diversos ciclos de replicación viral. La monitorización de los cultivos se efectuó tomando imágenes cada 4h durante un periodo de 100h tras la infección.

3.5.5. Análisis de fluorescencia por citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite el estudio de poblaciones celulares a partir del estudio individualizado de un gran número de células representativo del total de la población. Las células, que deben estar disgregadas y en suspensión, van pasando una a una y en un flujo constante a través de un pequeño orificio. Sobre este flujo celular constante se pueden hacer incidir distintos láseres, cuya dispersión y reflexión serán reflejo de las características de las células sobre las que incidan.

En este trabajo la citometría de flujo fue empleada para la evaluación de los niveles de fluorescencia emitida por la proteína verde fluorescente (GFP) en células transfectadas con plásmidos GFP o infectadas con adenovirus armados con genes GFP. Para ello, las células fueron tripsinizadas, resuspendidas en medio de cultivo y fijadas con solución de PFA al 4% hasta el momento de su análisis citométrico. Los datos crudos obtenidos fueron guardados y procesados mediante el programa FlowJo, y posteriormente analizados estadísticamente mediante modelos de regresión mixtos resistentes a valores extremos con el programa R.

Los análisis citométricos del presente trabajo se realizaron con el citómetro *Attune™ Acoustic Focusing Cytometer* (Applied Biosystems).

3.6. Manipulación de adenovirus

3.6.1. Generación de genomas adenovirales

Todos los genomas adenovirales del presente trabajo se generaron mediante el sistema AdZ (véase el apartado 3.1.2.2. *Sistema AdZ*). Las construcciones *early* y *late* fueron testadas mediante los conjuntos de cebadores *Step 3/4 Fw/Step 3/4 Rv* y *RpsLN 3' Fibra testar Fw/RpsLN 3' Fibra testar Rv*, respectivamente (véase en el anexo la *Tabla 3. Cebadores para la modificación de plásmidos según el sistema pAdZ*).

A continuación, se detallan las particularidades de la generación de cada constructo. El resumen de todas las construcciones puede verse en la *Tabla 6. Resumen de las construcciones AdZ* del anexo.

AdZ_Adwt_E4_GFP_opt_ITR

Para la construcción de este genoma se amplificó y purificó el fragmento correspondiente al promotor CMV y al gen *GFP_opt* del plásmido miRVec_GFP_opt con los cebadores *E4 miARN cua Fw/ E4 miARN cua Rv* (véase en el anexo la *Tabla 3. Cebadores para la modificación de plásmidos según el sistema pAdZ*). Estos cebadores contienen colas homólogas a la región del genoma adenoviral comprendida entre la unidad transcripcional E4 y la ITR derecha. El fragmento amplificado se recombinó en el BAC AdZ_E4_rpsL-neo-ITR (previamente generado en el laboratorio por la Dra. Maria Rovira) para generar el BAC AdZ_Adwt_E4_GFP_opt_ITR. Este constructo se utilizó para la producción del virus Adwt_GFP_opt_early.

AdZ_Adwt_E4_GFP_DEopt_ITR

Este genoma se generó de la misma forma que el anteriormente descrito AdZ_Adwt_E4_GFP_opt_ITR, con la diferencia que se utilizó el plásmido miRVec_GFP_DEopt para amplificar el fragmento de interés. Este constructo se utilizó para la producción del virus Adwt_GFP_DEopt_early

AdZ_Adwt_F_GFP_DEopt_E4

Para la construcción de este genoma, se amplificó y purificó el fragmento correspondiente al gen *GFP_DEopt* del plásmido miRVec_GFP_DEopt con los cebadores *Fw_Ad_late_pMONO-neo-GFP/ Rv_Ad_late_pMONO-neo-GFP* (véase en el anexo la *Tabla 3. Cebadores para la modificación de plásmidos según el sistema pAdZ*). Estos cebadores contienen colas homólogas a la región del genoma adenoviral comprendida entre las unidades transcripcionales L5 y E4. El fragmento amplificado se

recombinó en el BAC AdZ_Adwt_F_rpsL-neo_E4 (previamente generado en el laboratorio por la Dra. Maria Rovira) para generar el BAC AdZ_Adwt_F_GFP_DEopt_E4. Este constructo se utilizó para la producción del virus Adwt_GFP_DEopt_late

AdZ Adwt F GFP Adapt E4

Para la construcción de este genoma se amplificó y se purificó el fragmento correspondiente al gen *GFP_Adapt1* del plásmido miRVec_GFP_Adapt1 con los cebadores *Fiber-GFP Fw/Rv_Ad_late_pMONO-neo-GFP* (véase en el anexo la *Tabla 3. Cebadores para la modificación de plásmidos según el sistema pAdZ*). Estos cebadores contienen colas homólogas a la región del genoma adenoviral comprendida entre las unidades transcripcionales L5 y E4. El fragmento amplificado se recombinó en el BAC AdZ_F_rpsL-neo-E4 (previamente generado en el laboratorio por la Dra. Maria Rovira) para generar el BAC AdZ_Adwt_F_GFP_Adapt_E4. Este constructo se utilizó para la producción del virus Adwt_GFP_Adapt_late.

AdZ ICO15K F APIS BH E4

Para la construcción de este genoma se recombinó el gBlock[®] *Apis mellifera* (contiene el gen *apis_BH* flanqueado por secuencias homólogas a la región del genoma adenoviral comprendida entre las unidades transcripcionales L5 y E4) en el BAC AdZ_ICO15K_F_rpsL-neo-E4 (cedido amablemente por el Dr. Ramon Alemany) para generar el BAC AdZ_ICO15K_F_APIS_BH_E4. Este constructo se utilizó para la producción del virus APIS-BH. Véase en el anexo la *Tabla 4. gBlocks[®] Gene Fragments*.

AdZ_ICO15K_F_ADAPT_BH_E4

Para la construcción de este genoma se procedió igual que en el caso del BAC AdZ_ICO15K_F_APIIS_BH_E4, con la diferencia que se utilizó el gBlock® *Apis_melliferae_adapt*. Este constructo se utilizó para la generación del virus ADAPT-BH.

AdZ_AdNuPARmE1A_F_PDT_E4

Para la construcción de este genoma se amplificó y se purificó el fragmento correspondiente al gen *PDT* del plásmido pcDNA 3.1⁺/N-HA-PDT con los cebadores *PDT_Cola_Late Fw/ PDT_Cola_Late Rv* (véase en el anexo la *Tabla 3. Cebadores para la modificación de plásmidos según el sistema pAdZ*). Estos cebadores contienen colas homólogas a la región del genoma adenoviral comprendida entre las unidades transcripcionales L5 y E4. El fragmento amplificado se recombinó en el BAC AdZ_AdNuPARmE1A_F_rpsL-neo-E4 (previamente generado en el laboratorio por Agostina Bianchi) para generar el BAC AdZ_AdNuPARmE1A_F_PDT_E4. Este constructo se utilizó para la producción del virus PDT.

AdZ_AdNuPARmE1A_F_PDT_Adapt_E4

Para la construcción de este genoma se recombinó el gBlock® *PDT_Adapt* (contiene el gen *PDT_ADAPT* flanqueado por secuencias homólogas a la región del genoma adenoviral comprendida entre las unidades transcripcionales L5 y E4) en el BAC AdZ_AdNuPARmE1A_F_rpsL-neo-E4 (previamente generado en el laboratorio por Agostina Bianchi) para generar el BAC AdZ_AdNuPARmE1A_F_PDT_Adapt_E4. Este constructo se utilizó para la producción del virus PDT-ADAPT; véase en el anexo la *Tabla 4. gBlocks® Gene Fragments*.

3.6.2. Producción de adenovirus replicativos modificados genéticamente.

La producción de los adenovirus utilizados en este trabajo se llevó a cabo en tres fases:

1. Transfección de células HEK293 con el genoma adenoviral contenido en el BAC de la cepa SW102 de interés
2. Amplificación de las partículas virales en células A549
3. Purificación de las partículas virales

3.6.2.1. Transfección de células HEK293 con el genoma adenoviral contenido en el BAC de la cepa SW102 de interés

El genoma adenoviral contenido en el BAC de la cepa bacteriana SW102 se modificó en cada caso mediante el sistema AdZ (véase el apartado *3.1.2.2. Sistema AdZ*). Una vez modificado el BAC se amplificó a gran escala (véase el apartado *3.2.1.1. Aislamiento de ADN plasmídico de células procariotas*) y se transfectó en células HEK293 mediante Superfect[®] (véase el apartado *3.5.2.2. Transfección mediante dendrímeros activados*) Tanto las células como el medio de cultivo (conjunto denominado homogenado) fueron recogidos cuando se observó efecto citopático completo (entre 5 y 15 días pos-transfección).

El homogenado recogido se sometió a 3 ciclos de congelación (a -80°C) y descongelación (a 37°C) a fin de lisar todas las células, y liberar las partículas virales contenidas. Después de los ciclos de congelación y descongelación, el homogenado se centrifugó (10 minutos a 600 g) para

eliminar los restos celulares y obtener así el denominado sobrenadante del homogenado P1.

3.6.2.2. Amplificación de las partículas virales en células A549

La amplificación de las partículas virales generadas en el paso anterior se realizó infectando con la mitad del volumen del sobrenadante (entre 1 y 2 mL) células A549 sembradas en una placa p100. Una vez observado efecto citopático completo (entre 36h y 96h pos-infección) se procedió igual que en el caso anterior para obtener el sobrenadante del homogenado P2. A continuación, se infectaron 2 placas p150 de A549 con 300-1000 μL /placa de sobrenadante del homogenado P2 y, mediante el mismo procedimiento, se generó el sobrenadante del homogenado P3. Este sobrenadante del homogenado P3 se utilizó para infectar con 25-750 μL /placa la producción final (entre 13 y 20 placas p150 de A549). Tras la observación de efecto citopático se recogió el homogenado, se centrifugó (10 minutos a 600g) y se aspiró el sobrenadante. El precipitado celular se sometió a tres ciclos de congelación y descongelación, se resuspendió en 5 ml de PBS++ y se centrifugó para eliminar los restos celulares. Así se consiguió un número elevado de partículas virales en un volumen suficientemente pequeño para poder ser purificado.

PBS++

Componente	Cantidad
PBS 10x	25 ml
MgCl ₂	2.5 ml
CaCl ₂	2.5 ml
Agua	csp 250 ml

3.6.2.3. Purificación de las partículas virales

La suspensión de partículas virales obtenidas en el paso anterior se sometió a una doble ultracentrifugación a fin de descartar los restos celulares remanentes y las cápsides inmaduras. La primera ultracentrifugación se realizó con un gradiente de cloruro de cesio (1.5, 1.35, 1.25 mg/ml) durante 2h horas y la segunda con un gradiente continuo de 1.25 mg/ml durante 24h. Ambas ultracentrifugaciones se realizaron a 15°C y 35.000 rpm. A continuación, la suspensión viral fue desalada mediante las columnas de exclusión molecular *PD-10 Desalting columns* (GE Healthcare – ref. 17085101). La fracciones virales eluidas se mezclaron con un 10% de glicerol para su conservación y se almacenaron a -80°C.

3.6.3. Titulación de adenovirus

La titulación de los adenovirus producidos y purificados se determinó por cuantificación de partículas físicas y cuantificación de partículas infectivas.

3.6.3.1. Titulación de adenovirus por partículas físicas

La titulación de adenovirus por partículas físicas se llevó a cabo por espectrofotometría. Para ello, se preparó para cada virus una batería de diluciones del *stock* viral en tampón de lisis. A continuación, las muestras se incubaron durante 10 minutos a 56°C, para después y leer su densidad óptica (DO) a 260 nm en el espectrofotómetro *NanoDrop*TM (Thermo Scientific). El título viral se calculó después de la siguiente manera:

$$\text{partículas virales (vp)} / \text{ml} = DO_{260} \cdot \text{Factor de dilución} \cdot 1.1 \cdot 10^{12}$$

Tampón de lisis

Componente	Cantidad
Tris HCl pH 4.8	10 mM
EDTA	1 mM
SDS	0.1%

3.6.3.2. Titulación de adenovirus por partículas infectivas (PI/mL)

Con el objetivo de determinar la fracción infectiva del total de partículas físicas, se analizaron los genomas virales intracelulares 4 horas post-infección (hpi). De forma más concreta se sembraron 50.000 células A549 por pocillo en placas de 24 pocillos. Transcurridas 18h, se infectaron las células con una dilución conocida de los *stocks* virales a titular. Tras 4h, las células se lavaron 3 veces con PBS para eliminar las partículas virales no internalizadas y se aisló el ADN intracelular (véase el apartado 3.2.1.3. *Aislamiento de ADN adenoviral procedente de células infectadas y/o de su sobrenadante*). Los genomas celulares y virales por qPCR con los cebadores *S-albumin-qPCR/aS-albumin-qPCR* y *AdHEXO1/AdHEXO2*, respectivamente (véase el apartado 3.2.5.2. *Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa* y la *Tabla 1. Cebadores usados en qPCR del anexo*). Mediante curvas patrón se extrapoló el número de partículas virales/célula. Corrigiendo el valor de partículas virales/célula por el número de células contadas a las 4hpi, y el factor de dilución correspondiente, se obtuvieron

los títulos en partículas infectivas (PI)/ml. Los experimentos de titulación se repitieron de forma independiente un mínimo de 5 veces.

3.6.4. Estudios de producción viral

Para realizar los estudios de producción viral se prepararon las soluciones virales a la concentración deseada según las titulaciones por partículas infectivas. A continuación, se infectaron las células añadiendo la solución viral sobre las mismas. A las 4 hpi, las células se lavaron 3 veces con PBS para eliminar las partículas virales no internalizadas. Transcurrido el tiempo oportuno en cada caso, se aisló en ADN viral del sobrenadante (véase el apartado 3.2.1.3. *Aislamiento de ADN adenoviral procedente de células infectadas y/o de su sobrenadante*) y se analizó por qPCR con los cebadores *AdHEXO1/AdHEXO2* (véase el apartado 3.2.5.2. *Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa* y la *Tabla 1. Cebadores usados en qPCR* del anexo). Mediante curvas patrón se extrapolo la cantidad de partículas virales producidas.

3.7. Manipulación animal

Todos los protocolos y procedimientos de manipulación animal se desarrollaron siguiendo las directrices de la Unión Europea para el correcto cuidado y manipulación de animales de laboratorio 86/609/ECC. Asimismo, todos ellos fueron aprobados, previamente a su implementación, por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universitat de Barcelona y el *Departament de Territori i Sostenibilitat* de la Generalitat de Catalunya.

Los animales utilizados en el presente trabajo fueron ratones inmunodeprimidos de la cepa *Athymic Nude Foxn1^{nu/nu}* de 6 semanas adquiridos a través de Envigo y estabulados en condiciones SPF (*Specific Pathogen Free*) en el estabulario de la Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona. Esta cepa se caracteriza por la falta de respuesta inmunitaria adquirida, lo cual permite la inoculación de células de otras especies ya que no generan rechazo.

3.7.1. Generación y seguimiento de tumores subcutáneos

3.7.1.1. Generación de tumores subcutáneos a partir de células tumorales

La generación de tumores subcutáneos a partir de líneas celulares tumorales se realizó mediante inyección subcutánea en sendos cuartos traseros de 2 millones de células homogeneizadas en DMEM sin suplementar y en una dilución 1:1 con *Matrigel® Basement Membrane Matrix* (Corning® - ref. 354234). La inyección se realizó con agujas de 29G con el animal anestesiado.

3.7.1.2. Seguimiento de la progresión tumoral

El crecimiento tumoral se monitorizó tomando medidas de forma directa mediante un pie de rey y calculando el volumen tumoral con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen tumoral} = (D \times d \times \pi) / 6$$

Los animales fueron sacrificados al final del experimento o bien cuando los criterios éticos de bienestar animal así lo requirieron.

3.7.2. Administración sistémica de virus

La administración sistémica de los virus se realizó por vía endovenosa mediante inyección en una de las venas laterales de la cola con agujas de 29G. La administración se llevó a cabo inmovilizando el animal y vasodilatando la vena mediante la aplicación de calor.

La dosis de virus administrada fue de 4×10^{10} vp/animal en solución salina en un volumen total de 100 μ l/animal.

3.8. Técnicas histológicas

3.8.1. Extracción y preparación de las muestras

Los tumores subcutáneos fueron obtenidos por resección quirúrgica tras sacrificar el animal por dislocación cervical. Inmediatamente después de la extracción, los tumores fueron fijados en una solución de paraformaldehído al 4% a TA durante 24 h, y posteriormente conservados en tampón fosfato salino a 4°C hasta su inclusión en parafina. A partir de los bloques de parafina se realizaron cortes de secciones de 5 μ m de grosor que fueron colocadas en porta-objetos para su posterior tinción.

3.8.2. Tinciones histológicas

3.8.2.1. Tinciones generales

Las tinciones generales se basan en la utilización de colorantes para teñir las distintas estructuras tisulares. A nivel molecular, los colorantes presentan un componente responsable de la aportación de color (cromógeno), y otro que permite la unión a las diferentes estructuras tisulares en función de su naturaleza química (auxocromo).

a) Hematoxilina - Eosina

Esta tinción se basa en el uso de un colorante básico (hematoxilina) y un colorante ácido (eosina). La hematoxilina tiene afinidad por las estructuras ácidas celulares, de forma que se une fuertemente a las moléculas de ADN haciendo así que los núcleos celulares se tiñan de color morado. Por su parte, la eosina tiene afinidad por estructuras básicas como el citoplasma celular, que adquiere un color rosado cuando se realiza esta tinción.

Todas las tinciones de hematoxilina-eosina de este trabajo fueron llevadas a cabo por el Servicio del Biobanco del Hospital Clínic de Barcelona – IDIBAPS.

a) Tinción tricrómica de Masson

La tinción tricrómica de Masson se emplea para la detección de tejido conectivo, especialmente fibras de colágeno. Esta tinción se caracteriza por emplear tres colorantes que generalmente son la hematoxilina, la Ponceau-fucsina y el verde luz. De esta forma se logra teñir los núcleos de color morado-negro, el citoplasma, el músculo y los glóbulos rojos de color rosa-rojo, y el colágeno de una tonalidad verde-azul.

Todas las tinciones tricrómicas de Masson de este trabajo fueron llevadas a cabo por el Servicio del Biobanco del Hospital Clínic de Barcelona – IDIBAPS.

3.8.2.2. Tinciones específicas

Las tinciones específicas permiten la detección de componentes concretos de la sección histológica mediante el uso de anticuerpos o proteínas de unión específicas.

a) Tinción de ácido hialurónico

La detección de ácido hialurónico en las muestras de tejido tumoral se realizó siguiendo un procedimiento basado en el protocolo estándar de histoquímica.

Desparafinado e hidratación

Las secciones se desparafinaron e hidrataron por inmersión durante 10' en la siguiente batería de soluciones:

- Xilol I
- Xilol II
- Xilol III
- Etanol 100° I
- Etanol 100° II
- Etanol 96°
- Etanol 70°
- Etanol 50°
- Agua

Bloqueo

A fin de evitar el marcaje inespecífico y obtener una tinción más limpia, las secciones se incubaron con una solución de bloqueo rica en albúmina que permite saturar los posibles sitios de unión inespecífica.

Solución de bloqueo

Componente	Cantidad
Tritón	0.3%
BSA	1%
FBS	10%
PBS	csp 100 µl/sección

Marcaje

El marcaje de ácido hialurónico se realizó mediante una proteína de unión a ácido hialurónico (HABP; Merck-Millipore – ref. 385911). Se trata de una proteína biotinilada capaz de reconocer con alta afinidad y especificidad las moléculas de ácido hialurónico. La detección se llevó a cabo incubando las secciones con la HABP a una concentración de 5 ug/ml en una solución de PBS – 01% BSA durante toda la noche a 4°C.

Bloqueo de las peroxidasas endógenas y revelado

Previamente al revelado de la reacción, se bloquearon las peroxidasas endógenas de la muestra para evitar el marcaje inespecífico. El bloqueo se realizó incubando las secciones durante 10' con un reactivo de bloqueo comercial (*Dual Endogenous Enzyme-Blocking Reagent*, Agilent – ref. S200380). A continuación, se reveló de la reacción mediante los kits *Vectastain® ABC kit* (Vector Laboratories - ref. PK-4000) y *Vector® DAB Substrate kit* (Vector Laboratories - ref. SK-4100) siguiendo las

indicaciones del fabricante. Tras el revelado, las muestras se contrañeron con hematoxilina.

Deshidratación y montaje

El deshidratado de las secciones se realizó por inmersión durante 5' en la siguiente batería de soluciones:

- Etanol 100° I
- Etanol 100° II
- Etanol 100° III
- Xilol I
- Xilol II
- Xilol III

Finalmente se realizó el montaje de las muestras con *DPX mounting medium* (Fluka – ref. 44581).

b) Inmunodetección de citoqueratina 19

Las citoqueratinas son proteínas fibrosas que componen los filamentos intermedios del citoesqueleto. La citoqueratina 19 (CK19) se expresa en un gran número de epitelios y es utilizada como biomarcador tumoral en distintos tipos de cáncer.

La inmunodetección de este marcador en las muestras de tejido tumoral se realizó siguiendo un procedimiento basado en el protocolo estándar de histoquímica.

Desparafinado e hidratación

Véase apartado 3.8.2.2. a) *Tinción de ácido hialurónico*.

Recuperación antigénica

La fijación del tejido con paraformaldehído así como su inclusión en parafina puede alterar la estructura proteica y conllevar que determinados antígenos pierdan su reactividad inmunológica. A fin de restaurar la conformación de los epítomos se realizó un proceso de recuperación antigénica. Para ello se hirvieron las secciones histológicas en una olla a presión con solución tampón citrato durante 5'. Transcurrido ese tiempo las muestras se dejaron atemperar.

Tampón citrato

Componente	Cantidad
<i>Citrate buffer pH 6, 10x antigen retrieval (Sigma)</i>	200 ml
Agua destilada	1800 mL

Bloqueo

Véase apartado 3.8.2.2. a) *Tinción de ácido hialurónico*.

Marcaje

El marcaje de CK19 se realizó mediante el anticuerpo *Recombinant Anti-Cytokeratin 19 antibody [EP1580Y] - Cytoskeleton Marker* (Abcam). La inmunodetección se llevó a cabo incubando las secciones con una dilución 1:500 del anticuerpo en una solución de PBS – 0.1% BSA durante toda la noche a 4°C.

Bloqueo de las peroxidasas endógenas y revelado

El bloqueo de las peroxidasas endógenas se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.8.2.2. a) *Tinción de ácido hialurónico*. A continuación, el revelado se llevó a cabo con el kit *Dako EnVision® +*

Dual Link System-HRP (DAB+) (Dako) siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras el revelado las muestras se contra-tiñeron con hematoxilina.

Deshidratación y montaje

Véase apartado 3.8.2.2. a) *Tinción de ácido hialurónico*.

3.8.3. Análisis y cuantificación de histologías

El análisis de los cortes histológicos teñidos se realizó por microscopía con el microscopio Nikon e600. Para la cuantificación de los marcajes, se obtuvieron imágenes de cinco campos por muestra en un mínimo de tres muestras por condición. Para cada marcaje todas las imágenes fueron adquiridas en las mismas condiciones. La cuantificación de las imágenes se realizó mediante el programa ImageJ.

3.9. Análisis bioinformático

3.9.1. Caracterización bioinformática de genes virales y transgenes

3.9.1.1. Análisis del uso de codones mediante Análisis de Componentes Principales

El Análisis de Componentes Principales (PCA) es un método que permite el análisis exploratorio de datos y facilita la visualización de la variación presente en el conjunto de una forma simplificada pero que a su vez conserva toda la información. El empleo de este método es especialmente útil para el análisis de conjuntos de datos con un elevado número de variables.

En el presente trabajo se empleó el PCA para el estudio del uso de codones de distintos conjuntos de genes. Para ello se utilizaron los valores de frecuencia relativa por aminoácido de cada codón para cada gen como variables. El análisis y su representación se llevaron a cabo utilizando el paquete “*pcaMethods*” del programa R v3.2.3 mediante *scripts* modificados a partir de los originalmente generados por el Dr. Eneko Villanueva.

3.9.1.2. Análisis del índice de adaptación del uso de codones

El índice de adaptación del uso de codones (CAI) es una medida ampliamente utilizada para determinar la desviación de un gen en su uso de codones respecto a un conjunto de genes de referencia. Su valor oscila

entre 0 y 1, entendiéndose que cuánto más próximo es el valor de CAI a 1 para una secuencia dada, más semejante es ésta al conjunto de genes de referencia.

En el presente trabajo se ha utilizado el valor de CAI, como parámetro complementario al contenido en GC3, para determinar el grado de optimización de los genes estudiados. El análisis de CAI se realizó a través de la plataforma web <http://genomes.urv.es/CAIcal> [182]. Como referencia se utilizó el conjunto de genes representativo de la especie humana de la base de datos *Codon Usage Database*. [183] La representación gráfica se realizó con el programa R v3.2.3 mediante *scripts* modificados a partir de los originalmente generados por el Dr. Eneko Villanueva.

3.9.1.3. Análisis del índice de adaptación del uso de ARNt

El índice de adaptación de ARNt (tAI) es un parámetro que describe la eficiencia traduccional de un gen dado teniendo en cuenta el grado de adaptación de sus codones al *pool* de ARNts de la célula. En este trabajo el tAI se analizó en base al estudio publicado por Dos Rei *et al.* en el que se otorga a cada codón un valor de tAI [167]. La representación gráfica se realizó con el programa R v3.2.3 mediante el paquete “*plotrix*”.

3.9.1.4. Análisis de la distribución de codones a lo largo de la secuencia

El análisis de la distribución de los codones para alanina y prolina de los genes hialuronidasa se llevó a cabo utilizando los paquetes “*seqinr*”, “*stringr*” y “*Biostrings*” del programa R v3.2.3.

3.9.2. Representación gráfica y análisis estadístico de los datos experimentales

3.9.2.1. Representación gráfica y análisis de comparación de medias

Los datos experimentales del presente trabajo se muestran en su mayoría como diagramas de dispersión o diagramas de barras que representan la media \pm su error estándar medio (SEM). En lo que al estudio de la significancia estadística se refiere, debido al relativo bajo número de réplicas experimentales, no puede asumirse distribución normal de la muestra. En consecuencia se han aplicado tests estadísticos no paramétricos: test de Mann-Whitney, test de Wilcoxon y test de Tukey Kramer. Tanto para la representación como para el análisis estadístico se ha utilizado el programa GraphPad Prism.

En el presente trabajo se han considerado diferencias estadísticamente significativas aquellas con un p valor inferior a 0.05.

3.9.2.2. Análisis de los datos derivados de estudios por citometría de flujo

Los datos obtenidos mediante citometría de flujo se analizaron siguiendo un modelo lineal mixto. El estudio de significancia estadística de las diferencias entre las medias se realizó mediante el test Tukey-kramer. Todo el análisis se llevó a cabo utilizando los paquetes “nlme” y “multcomp” del programa R v3.2.3 mediante *scripts* modificados a partir de los originalmente generados por el Dr. Eneko Villanueva.

3.9.2.3. Análisis de la progresión tumoral

Los datos de progresión tumoral obtenidos se analizaron siguiendo un modelo lineal mixto que permite el estudio de la progresión del crecimiento tumoral, al tiempo que se corrige respecto a la correlación debida a las medidas repetidas de cada tumor durante el periodo experimental. El estudio de significancia estadística de las diferencias entre los distintos tratamientos se realizó mediante el test Tukey-kramer. Todo el análisis se llevó a cabo utilizando los paquetes “*arm*” y “*multicomp*” del programa R v3.2.3 mediante *scripts* modificados a partir de los originalmente generados por el Dr. Eneko Villanueva.

4. Resultados

4.1. Evaluación de la repercusión del uso de codones de transgenes armados en adenovirus oncolíticos

La viroterapia oncolítica, como cualquier aproximación terapéutica, se basa en dos pilares fundamentales: la seguridad y la eficacia. Si bien para esta estrategia han sido numerosos los avances durante las últimas décadas en términos de seguridad, la eficacia parece seguir siendo su talón de Aquiles.

En este sentido, armar el genoma adenoviral con transgenes terapéuticos que ofrezcan una función adicional en el nicho tumoral constituye una de las estrategias más atractivas y prometedoras. Sin embargo, este abordaje, aunque aparentemente sencillo en concepto, puede resultar un reto a la hora de ponerlo en práctica. Entre las limitaciones más estudiadas se encuentra la capacidad de encapsidación del adenovirus, que no permite un aumento del genoma viral de más del 105% [128]. Por otro lado, recientemente se ha demostrado que el adenovirus utiliza la desviación en

el uso de codones como mecanismo para optimizar el reparto de los recursos traducionales de la célula [147]. En este contexto, se ha postulado que la incorporación de transgenes terapéuticos podría influir en el equilibrio de la oferta y la demanda de dichos recursos. Así, en el presente trabajo nos hemos planteado dar respuesta a esta hipótesis a fin de contribuir a desvelar los aspectos que resultan críticos en el diseño de adenovirus oncolíticos armados.

4.1.1. Los niveles máximos de expresión de un transgén se obtienen optimizando su uso de codones y expresándolo bajo el control del MLP

Con el fin de estudiar el impacto del uso de codones de un transgén armado en el genoma del HAdV-5, seleccionamos dos genes GFP con distinto uso de codones pero codificantes para la misma proteína verde fluorescente (GFP) (Fig. 4.1 A, Anexos 8.2.1 y 8.2.2.). Así, seleccionamos un gen GFP con un uso de codones optimizado –rico en codones GC3- y equivalente al comúnmente utilizado gen *EGFP*; a este gen lo denominamos *GFP_opt*. Por otro lado, seleccionamos un gen más desoptimizado –pobre en codones GC3- al que denominamos *GFP_DEopt*. Además de con el contenido en GC3, el distinto grado de optimización de ambos genes se evidenció a través del análisis CAI a lo largo de la secuencia. Este análisis mostró valores de CAI inferiores a lo largo de toda la secuencia para el gen *GFP_DEopt* respecto al gen *GFP_opt* (Fig. 4.1 B).

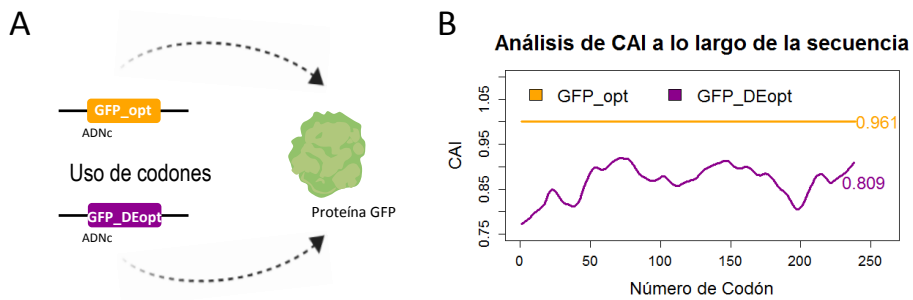


Figura 4.1 | Los genes *GFP_opt* y *GFP_DEopt* codifican la misma proteína pero presentan distinto grado de optimización. **A)** Esquema representativo del diseño experimental. **B)** Comparación de CAI a lo largo de la secuencia de los genes *GFP_opt* y *GFP_DEopt*. Los valores de CAI de cada codón se muestran suavizados para facilitar su interpretación. Los valores numéricos corresponden al valor global de CAI para cada uno de los genes.

A continuación, analizamos las características de los genes *GFP_DEopt* y *GFP_opt* en relación a los genes adenovirales. En primer lugar, analizamos el CAI global de ambos genes en relación al CAI de los genes del HAdV-5. Este estudio mostró un valor de CAI para el gen *GFP_DEopt* similar al de aquellos genes adenovirales con valores más altos de CAI. El gen *GFP_opt*, por su parte, mostró un valor de CAI muy superior al de los genes adenovirales y acorde a su elevado contenido en GC3 (Fig. 4.2 A).

Tras el análisis de CAI, estudiamos el uso de codones y el grado de optimización mediante PCA. Para ello, primero determinamos la frecuencia relativa por aminoácido de cada codón para cada uno de los genes. A continuación, los datos de frecuencia los utilizamos como descriptores de los genes en el PCA. El análisis puso de manifiesto un uso de codones para el gen *GFP_DEopt* similar al del conjunto de genes tempranos reguladores del HAdV-5, con un uso preferente de codones

AT3. Por otra parte, el análisis reveló un uso de codones para el gen *GFP_opt* similar al de los genes estructurales del adenovirus, pero con un uso aún más acusado de codones GC3 (Fig. 4.2 B).

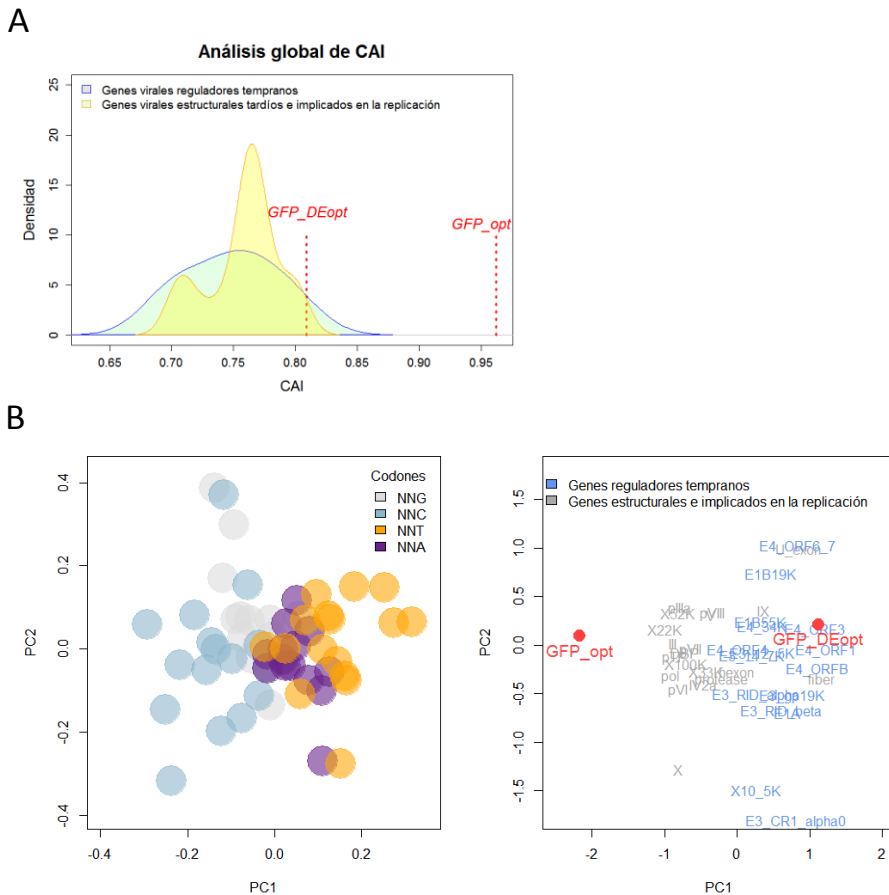


Figura 4.2 | Los genes *GFP_opt* y *GFP_DEopt* presentan patrones de uso de codones similares a los genes tardíos y tempranos adenovirales, respectivamente.

A) Estudio global del CAI de los genes *GFP_opt* y *GFP_DEopt* en relación a los genes adenovirales. **B)** Estudio del uso de codones mediante PCA de los genes *GFP_OPT* y *GFP_Deopt* en relación a los genes adenovirales. En el panel de la izquierda se muestran los codones, cuyas frecuencias relativas por aminoácido se han utilizado como descriptores. En el panel de la derecha se muestran los genes analizados. El PC1 separa los genes en función del uso de codones GC3 y AT3.

Tras la caracterización bioinformática inicial de ambos genes, estudiamos el impacto del uso de codones sobre la expresión de GFP en un contexto no viral. Para ello, generamos dos plásmidos de expresión con sendas secuencias génicas controladas bajo el promotor constitutivo CMV (citomegalovirus) (Fig. 4.3 A). Transfectamos ambos plásmidos de expresión en la línea celular HEK293T y 48h pos-transfección evaluamos los niveles de fluorescencia por citometría de flujo. Los niveles de expresión de GFP resultaron superiores en las células transfectadas con el gen *GFP_opt* (Fig. 4.3 B), de acuerdo a su elevado grado de optimización.

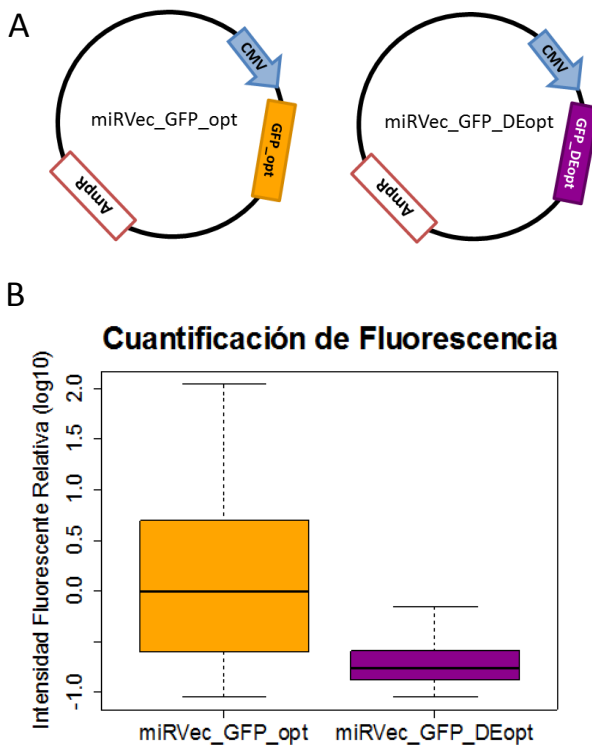


Figura 4.3 | El gen *GFP_opt* presenta mayor capacidad de expresión respecto al gen *GFP_DEopt* en un contexto no viral. **A)** Representación esquemática de los plásmidos de expresión miRVec_GFP_opt y miRVec_GFP_DEopt. **B)** Niveles de GFP

48h pos-transfección analizados por citometría de flujo en células 293T transfectadas con los plásmidos de expresión miRVec_GFP_opt y miRVec_GFP_DEopt.

Los datos corresponden a los valores individuales por célula de 4 experimentos independientes.

A continuación, evaluamos el impacto del distinto uso de codones en un contexto viral. En consonancia al distinto uso de codones de los genes tempranos y tardíos del adenovirus [147], estudiamos si el uso de codones del transgén tenía un impacto distinto en función del momento de expresión de éste. Para ello, generamos con cada uno de los transgenes, *GFP_opt* y *GFP_DEopt*, un virus que expresara el transgén en la fase tardía o *late* (con el transgén bajo el control del MLP) y un virus que expresara el transgén en la fase temprana o *early* (con el transgén bajo el control del promotor constitutivo CMV) (Fig. 4.4). En todos los casos se utilizó el virus HAdV-5 (denominado Adwt en los resultados que constan a continuación) para generar los virus armados.

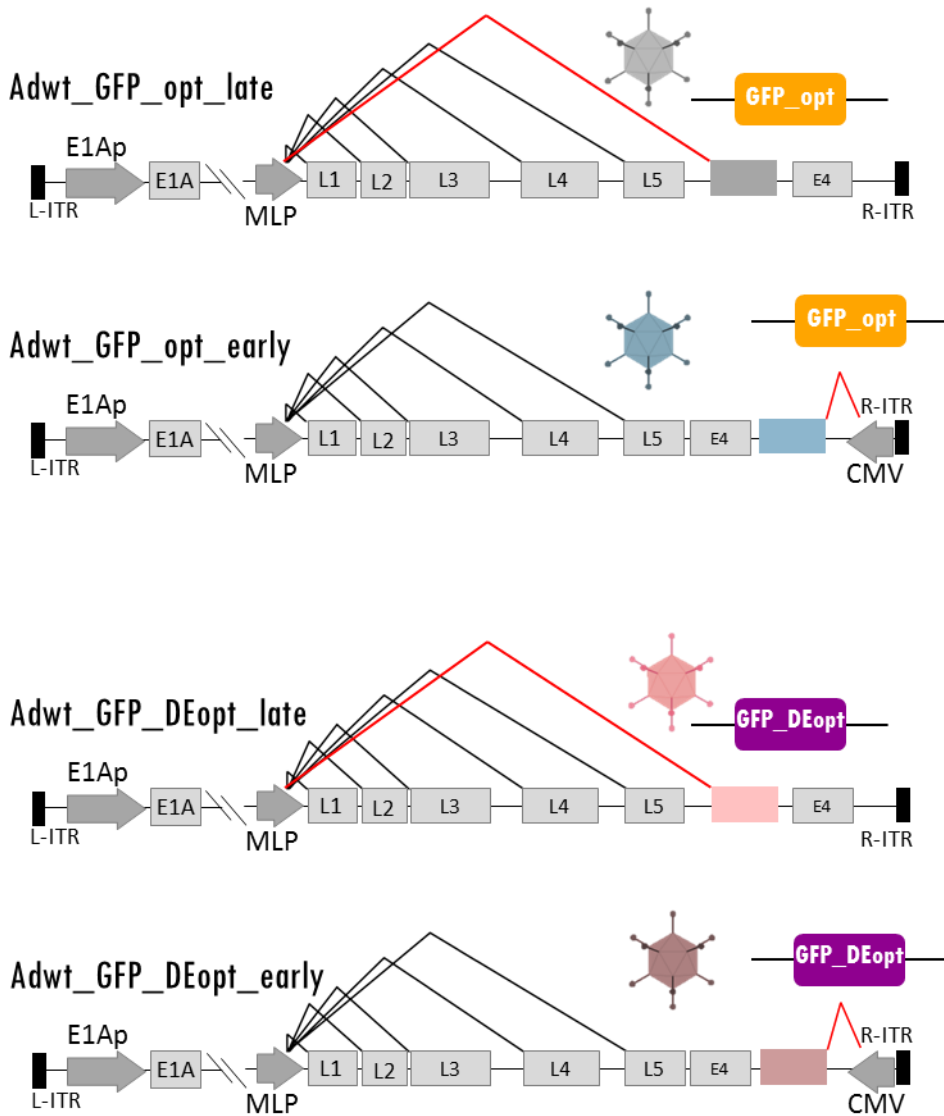


Figura 4.4 | Representación esquemática de los virus armados con transgenes GFP. Los esquemas muestran el lugar de incorporación de los transgenes GFP en cada una de las construcciones virales. Las construcciones *early* presentan el transgén controlado bajo el promotor CMV mientras que las construcciones *late* incorporan el transgén como una forma más de *splicing* bajo el control del MLP.

En primer lugar, utilizamos la pareja de virus *Adwt_GFP_opt_early* y *Adwt_GFP_opt_late* para infectar células A549 con 10 PI/célula. A continuación, comparamos por citometría de flujo la expresión de GFP (Fig. 4.5 A). En términos cinéticos, la fluorescencia se detectó antes (a las 8 hpi) en las células infectadas con el virus *Adwt_GFP_opt_early*, de acuerdo con la naturaleza constitutiva del promotor CMV. Sin embargo, a tiempos tardíos, 24 hpi y 36 hpi, los niveles de expresión fueron significativamente superiores en las células infectadas con el virus *Adwt_GFP_opt_late*. (Fig. 4.5 A). Resultados similares se obtuvieron con la pareja de virus *Adwt_GFP_DEopt_early* y *Adwt_GFP_DEopt_late*, pese a que las diferencias a tiempos tardíos no fueron significativas (Fig. 4.5 B). La evolución de los niveles fluorescencia concordó con los niveles de ARNm en los distintos puntos del ciclo de replicación, tanto para el transgén *GFP_opt* (Fig. 4.5 C) como para el transgén *GFP_DEopt* (Fig. 4.5 D).

Tras comparar individualmente cada transgén, realizamos un análisis de la expresión de GFP a tiempo real con los 4 virus en paralelo. Para ello infectamos células A549 con 5 PI/célula y monitorizamos la evolución de la expresión de GFP tomando imágenes cada 4h por un periodo total de 100h con el sistema Incucyte™. Este estudio mostró que, tras repetidos ciclos de replicación viral, los niveles de expresión del transgén son superiores cuando éste se expresa en *late*. Asimismo, el estudio puso de manifiesto que en un contexto viral las diferencias de expresión asociadas al uso de codones se acentúan, obteniendo niveles de fluorescencia hasta 2 órdenes de magnitud superiores con los virus *GFP_opt* en relación a los virus *GFP_DEopt* (Fig 4.6).

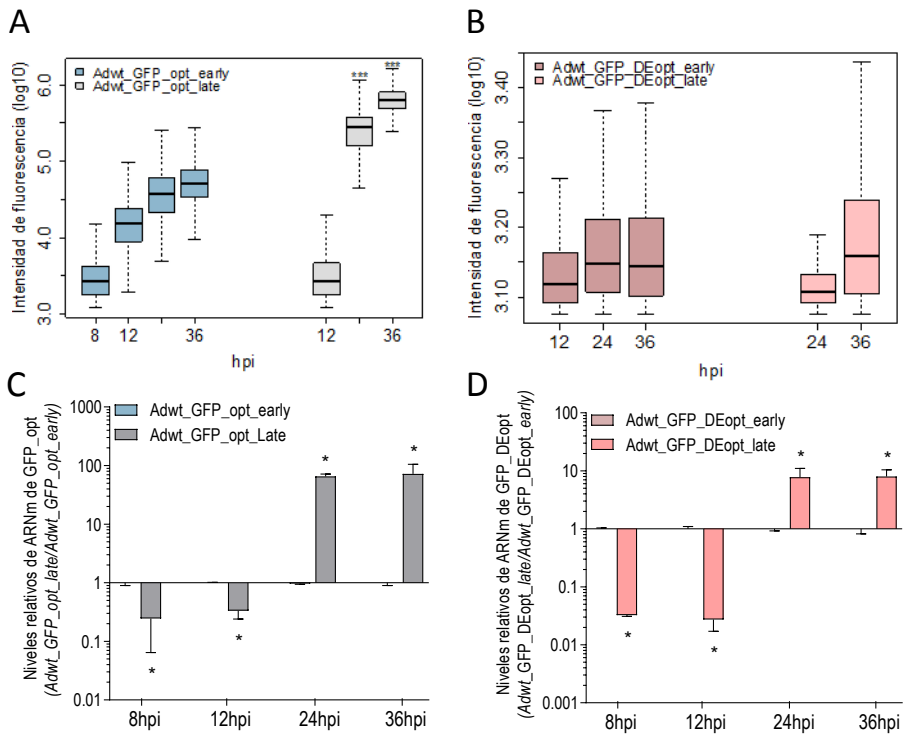


Figura 4.5 | Los niveles de expresión de GFP son superiores con el transgén controlado bajo el MLP en comparación a cuando se controla bajo el promotor CMV. A-B) Comparación de los niveles de GFP por citometría de flujo a diferentes puntos del ciclo de replicación adenoviral en células A549 infectadas con los virus Adwt_GFP_opt_early y Adwt_GFP_opt_late **(A)** y con los virus Adwt_GFP_DEopt_early **(B)**. **C-D)** Comparación de los niveles de ARNm qPCR a diferentes puntos del ciclo de replicación adenoviral en células A549 infectadas con los virus Adwt_GFP_opt_early y Adwt_GFP_opt_late **(C)** y con los virus Adwt_GFP_DEopt_early y Adwt_GFP_DEopt_late **(D)**.

Las células se infectaron a una dosis de 10 PI/célula.

Los datos se muestran como la media \pm SEM de 4 experimentos independientes.

** $P < 0.05$; *** $P < 0.001$*

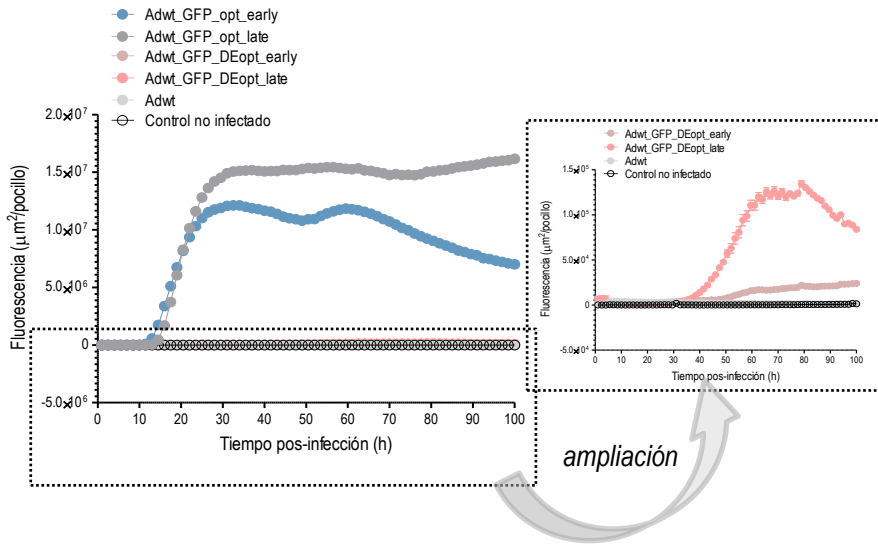


Figura 4.6 | Los niveles de expresión alcanzados por el transgén GFP_opt son superiores a los alcanzados por el transgén GFP_DEopt, independientemente de su lugar de inserción en el genoma adenoviral. Análisis de los niveles de GFP a tiempo real mediante el sistema Incucyte™ en células A549 infectadas con 5 PI/célula de Adwt_GFP_opt_early, Adwt_GFP_opt_late, Adwt_GFP_DEopt_early, Adwt_GFP_DEopt_late y Adwt.

Los datos se muestran como la media ±SEM de cuatro experimentos independientes.

En conjunto, estos resultados corroboraron que en un sistema viral la optimización de codones de los transgenes se correlaciona con su capacidad de expresión. Por otro lado, mostraron el gran potencial de expresión que supone expresar transgenes bajo el control del MLP.

4.1.2. La incorporación de un transgén altamente optimizado bajo el control del MLP interfiere con la expresión de proteínas estructurales y la capacidad replicativa del adenovirus

A continuación, evaluamos los efectos del uso de codones y del momento de expresión de los transgenes sobre la biología del virus.

Primeramente, estudiamos si la inclusión de los transgenes bajo el promotor CMV o bajo el MLP tenía implicaciones en la replicación del genoma adenoviral. Para ello, infectamos células A549 con 10 PI/célula con los virus Adwt_GFP_opt_early y Adwt_GFP_opt_late, y determinamos mediante qPCR el contenido de ADN viral intracelular a distintos puntos del ciclo de replicación. No se observaron diferencias en el proceso de replicación del genoma adenoviral entre ambos virus (Fig. 4.7 A). El mismo experimento se realizó con la pareja de virus Adwt_GFP_DEopt_early y Adwt_GFP_DEopt_late sin encontrarse tampoco diferencias (Fig. 4.7 B). De este modo, los resultados sugirieron que ni el uso de codones ni la fase de expresión del transgén condicionan la replicación del ADN viral.

A continuación, evaluamos el número de genomas adenovirales liberados al medio extracelular 36 hpi. Este estudio reveló una caída de cerca de 10 veces en la capacidad de producir nuevas partículas virales en el virus Adwt_GFP_opt_late respecto al virus Adwt_GFP_opt_early (Fig 4.7 C). Sin embargo, cuando evaluamos esta capacidad en los virus Adwt_GFP_DEopt_early y Adwt_GFP_DEopt_late no se encontraron diferencias significativas entre ambos (Fig 4.7 D).

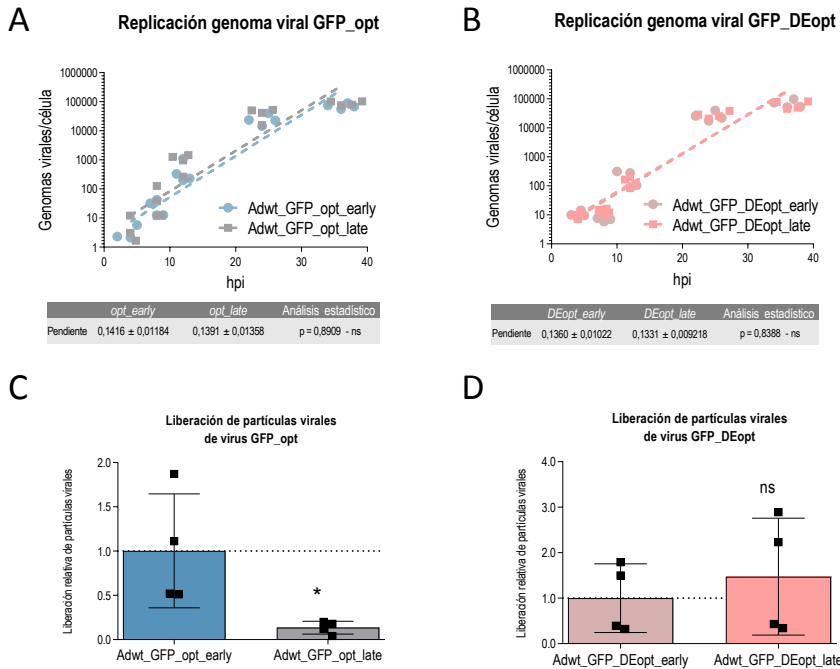


Figura 4.7 | El transgén GFP_opt en late provoca una reducción de la capacidad replicativa del virus. A-B) Comparación de los genomas adenovirales intracelulares por qPCR a distintos puntos del ciclo de replicación en células infectadas con Adwt_GFP_opt_early y Adwt_GFP_opt_late **(A)** y con Adwt_GFP_DEopt_early y Adwt_GFP_DEopt_late **(B)**. **C-D)** Comparación por qPCR de los genomas adenovirales extracelulares 36hpi en los sobrenadantes de células infectadas con Adwt_GFP_opt_early y Adwt_GFP_opt_late **(C)** y con Adwt_GFP_DEopt_early y Adwt_GFP_DEopt_late **(D)**.

En todos los casos se infectaron células A549 con 10 PI/célula.

Los datos se muestran como la media ±SEM de 4 experimentos independientes.

**p<0.05*

Dado que como habíamos demostrado anteriormente las diferencias de producción de nuevas partículas virales entre los virus Adwt_GFP_opt_late y Adwt_GFP_opt_early no podían venir dadas por diferencias en la replicación del genoma, evaluamos si podían estar

relacionadas con diferencias en la producción del ARNm y/o de las proteínas virales.

Para ello, analizamos, en primer lugar, el contenido de ARNm de dos de las principales proteínas de la cápside viral, el hexón y la fibra, 36 hpi. El análisis puso en relieve una disminución de un 50% en los niveles de ARNm del hexón en el virus Adwt_GFP_opt_late respecto a su homólogo *early*. Por su parte el contenido de ARNm del gen de la fibra no mostró diferencias significativas (Fig. 4.8 A). En cuanto a los virus GFP_DEopt, no se observaron diferencias en los niveles de ARNm ni para el hexón ni para la fibra, acorde con la ausencia de diferencias en su capacidad de producción de nuevas partículas virales (Fig. 4.8 B).

Tras esta observación, analizamos los niveles de proteína de los principales componentes de la cápside por Western Blot. En la comparación de los virus GFP_opt las diferencias en los niveles de ARNm del hexón no se tradujeron en diferencias a nivel proteico, tal vez porque de forma natural el virus produce más moléculas de ARNm de las que son necesarias para saturar la maquinaria de traducción y/o por una cuestión de sensibilidad de la técnica. Sin embargo, si se observaron caídas en el caso de proteínas con un uso de codones más sesgado hacia codones GC3 como es el caso del pentón y las proteínas pIIIa y V. Para la fibra, pobre en codones GC3, no se encontraron diferencias (Fig. 4.8 C). En cuanto a los virus GFP_DEopt, de acuerdo a los resultados anteriores, no se encontraron diferencias en ninguna de las proteínas analizadas (Fig. 4.8 D).

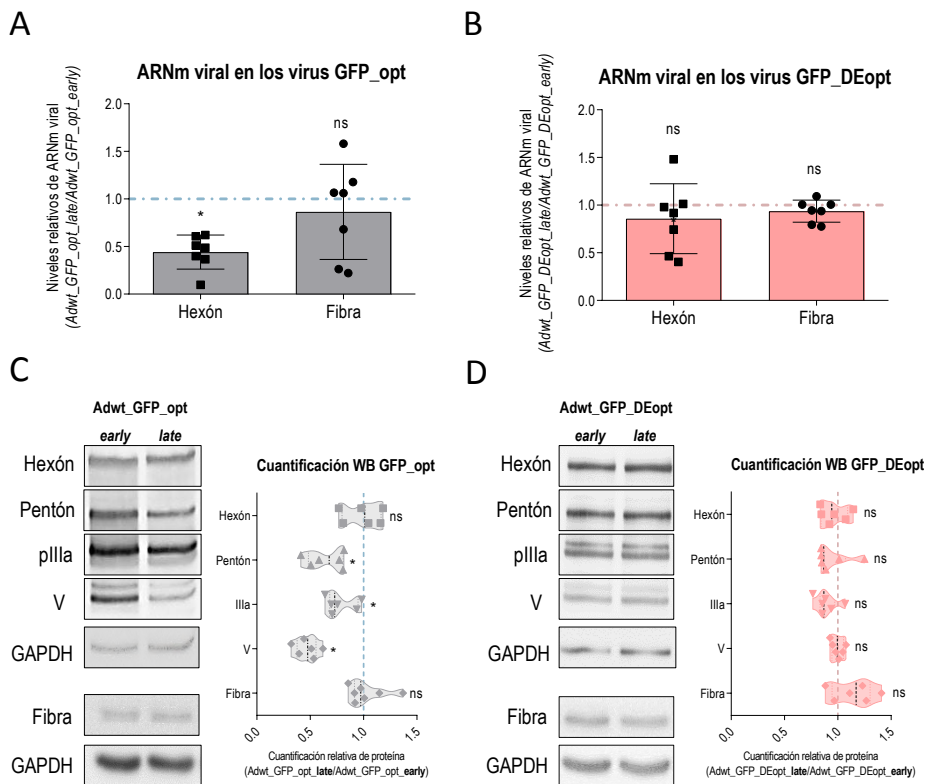


Figura 4.8 | La reducción de la capacidad replicativa del virus Adwt_GFPopt deriva de una menor producción de proteínas virales. A-B) Análisis mediante RT-qPCR de los niveles de ARNm de hexón y fibra de células infectadas con Adwt_GFP_opt_early y Adwt_GFP_opt_late **(A)** y con Adwt_GFP_DEopt_early y Adwt_GFP_DEopt_late **(B)**. **C-D)** Análisis mediante WB de las principales proteínas de la cápside adenoviral en células infectadas con con Adwt_GFP_opt_early y Adwt_GFP_opt_late **(C)** y con Adwt_GFP_DEopt_early y Adwt_GFP_DEopt_late **(D)**.

En todos los casos se infectaron células A549 con 10 PI/célula.

Los datos se muestran como la media ±SEM de un mínimo de 6 experimentos independientes.

**P<0.05*

A continuación, nos propusimos estudiar el efecto de los 4 virus sobre la evolución de la confluencia celular en un ensayo de monitorización a

tiempo real con el sistema Incucyte™. Para ello, se infectaron células A549 con 5 PI/célula de los distintos virus GFP. El seguimiento se realizó tomando imágenes cada 4h durante un periodo total de 100 h. El estudio demostró una incapacidad evidente del virus Adwt_GFP_opt_late para controlar la proliferación de las células tumorales. Contrariamente, los virus Adwt_GFP_opt_early, Adwt_GFP_DEopt_early y Adwt_GFP_DEopt_late mostraron una capacidad lítica equivalente a la del virus no armado (Adwt), sugiriendo una ausencia de efecto por parte del transgén sobre la capacidad replicativa del virus (Fig. 4.9).

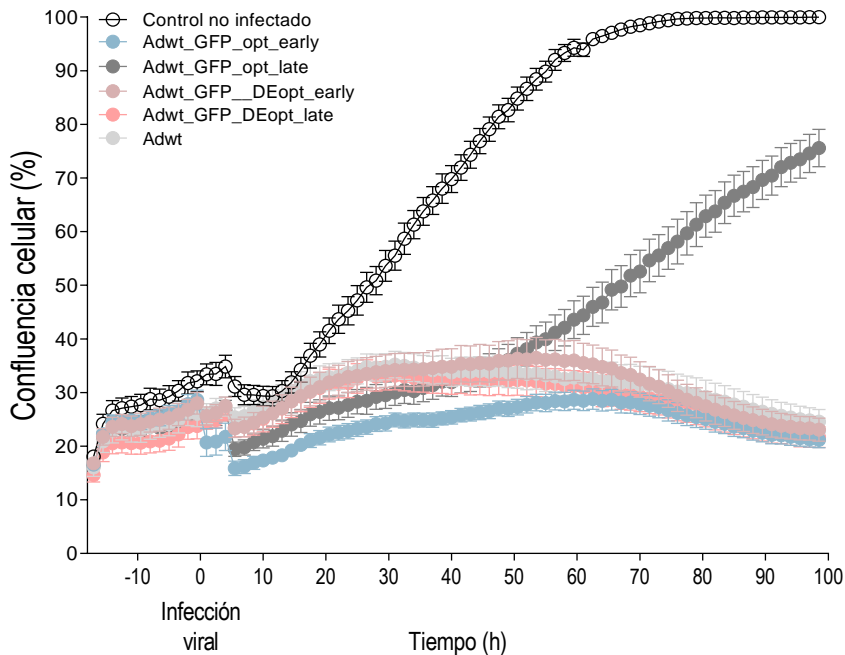


Figura 4.9| El virus armado en *late* con el transgén GFP optimizado (Adwt_GFP_opt_late) no es capaz de controlar la proliferación de las células tumorales. Análisis de los niveles de confluencia celular a tiempo real mediante el sistema Incucyte™ en células A549 infectadas con 5 PI/célula de Adwt_GFP_opt_early, Adwt_GFP_opt_late, Adwt_GFP_DEopt_early, Adwt_GFP_DEopt_late y Adwt.

Los datos se muestran como la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes.

Estos resultados sugirieron así que el uso de codones de los transgenes expresados en *late* puede resultar crítico para el *fitness* viral mientras que carecería de efecto cuando el transgén se expresa en *early*.

4.1.3. Un uso de codones adaptado al virus permite un compromiso entre la expresión de GFP en *late* y la producción de partículas virales.

Los resultados obtenidos hasta el momento mostraban que el uso de codones de transgenes armados bajo MLP estaría influenciando la capacidad de producción de nuevas partículas virales del adenovirus. Considerando este escenario, nos propusimos estudiar si era posible llegar a un compromiso para expresar eficientemente un transgén en *late* sin perjudicar el *fitness* viral.

Para ello diseñamos 3 nuevos genes GFP a partir de los genes *GFP_opt* y *GFP_DEopt*. Los nuevos genes se diseñaron sustituyendo un tercio de la secuencia *GFP_DEopt* por la equivalente del gen *GFP_opt*. Así, diseñamos un gen con el primer tercio de secuencia optimizado (*Adapt1*), otro con el tercio central optimizado (*Adapt2*) y otro con el último tercio optimizado (*Adapt3*) (Fig. 4.10 A-B). Los análisis de CAI evidenciaron la optimización de las nuevas secuencias respecto a *GFP_DEopt* (Fig. 4.10 C-D). El PCA visualizó también esa modificación del grado de optimización, mostrando un uso intermedio de codones GC3 para los nuevos genes en relación a los genes de origen (Fig. 4.10 E).

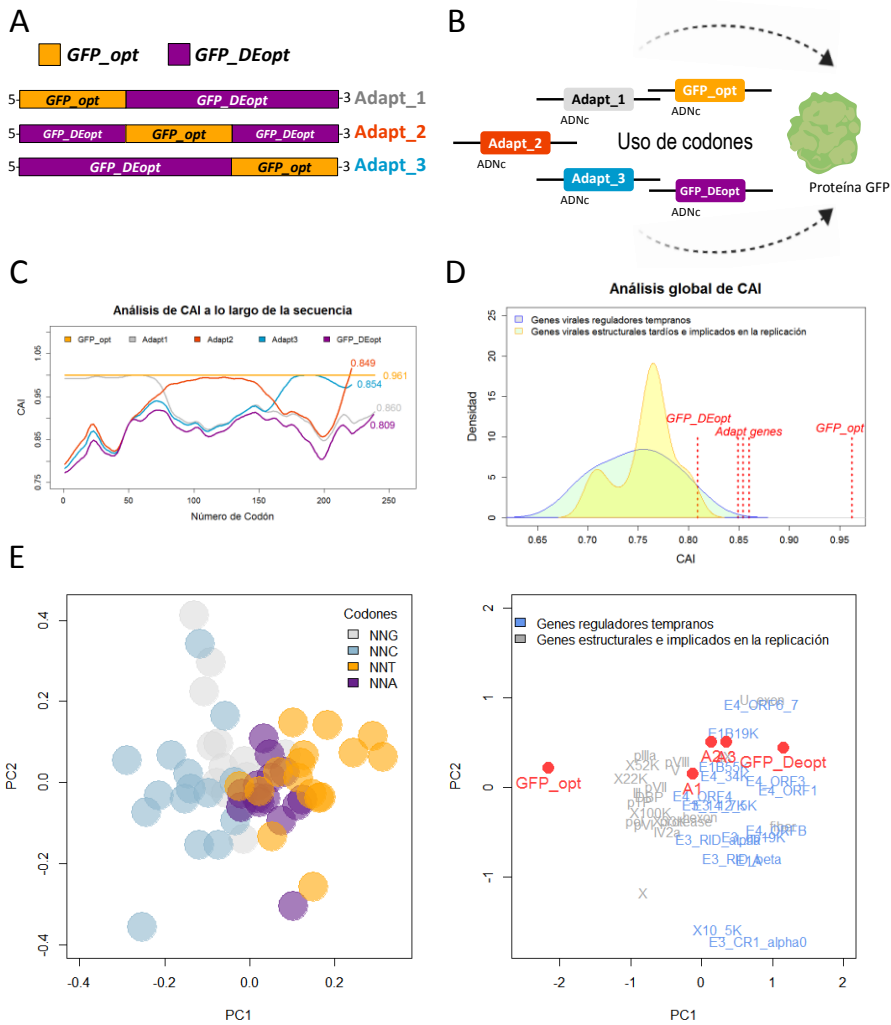


Figura 4.10 | Los genes *Adapt1*, *Adapt2* y *Adapt3* presentan un grado de optimización intermedio respecto a los genes *GFP_opt* y *GFP_DEopt*. **A)** Esquema representativo de las nuevas secuencias generadas a partir de los genes *GFP_opt* y *GFP_DEopt*. **B)** Esquema representativo del diseño experimental. **C)** Comparación de CAI a lo largo de la secuencia de los genes *GFP_opt*, *GFP_DEopt*, *Adapt1*, *Adapt2* y *Adapt3*. Los valores de CAI de cada codón se muestran suavizados para facilitar su interpretación. Los valores numéricos corresponden al valor global de CAI para cada uno de los genes. **D)** Estudio global del CAI de los genes GFP en relación a los genes adenovirales. **E)** Estudio del uso de codones mediante PCA de los distintos genes GFP

en relación a los genes adenovirales. Los genes *Adapt1*, *Adapt2* y *Adapt3* se representan como A1, A2 y A3, respectivamente.

Tras los análisis *in silico*, generamos tres nuevos plásmidos de expresión: *miRVec_GFP_Adapt1*, *miRVec_GFP_Adapt2* y *miRVec_GFP_Adapt3* (Fig. 4.11 A).

En primer lugar, evaluamos el potencial de expresión de cada gen GFP en un contexto no viral. Para ello, tal y como ya habíamos hecho anteriormente, transfectamos células HEK293T con los distintos plásmidos de expresión y analizamos los niveles de fluorescencia por citometría de flujo 48h pos-transfección. Este estudio mostró que los 3 nuevos genes diseñados presentaban un potencial de expresión intermedio entre los genes *GFP_opt* y *GFP_DEopt* (Fig. 4.11 B). Dados estos resultados y teniendo en cuenta la cercanía de los tres genes *Adapt* en el PCA, seleccionamos el gen con mejor capacidad de expresión (*Adapt1*) para armarlo en el genoma adenoviral bajo el control del MLP y generar el virus *Adwt_GFP_adapt_late*.

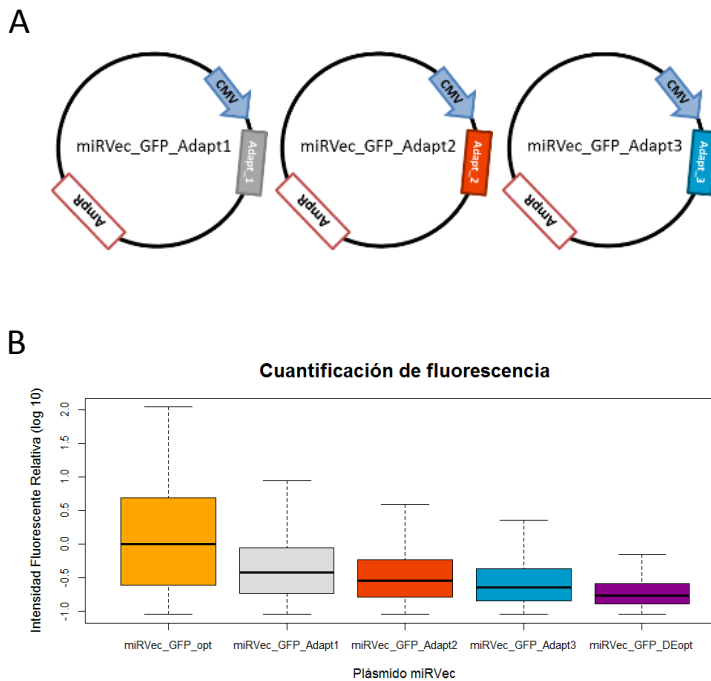


Figura 4.11 | Los genes *Adapt1*, *Adapt2* y *Adapt3* presentan unos niveles de expresión intermedios respecto a los genes *GFP_opt* y *GFP_DEopt* en un contexto no viral. **A)** Representación esquemática de los nuevos plásmidos de expresión generados: miRVec_GFP_Adap1, miRVec_GFP_Adapt2 y miRVec_GFP_Adap3. **B)** Niveles de GFP 48h pos-transfección analizados por citometría de flujo en células HEK293T transfectadas con los plásmidos de expresión miRVec_GFP_opt, miRVec_GFP_Adap1, miRVec_GFP_Adapt2, miRVec_GFP_Adap3, y miRVec_GFP_Deopt.

Los datos corresponden a los valores individuales por célula de 4 experimentos independientes.

Utilizamos el virus Adwt_GFP_adapt_late junto con los virus Adwt_GFP_opt_late y Adwt_GFP_DEopt_late para infectar células A549 con 0.5 PI/célula (Fig. 4.12).

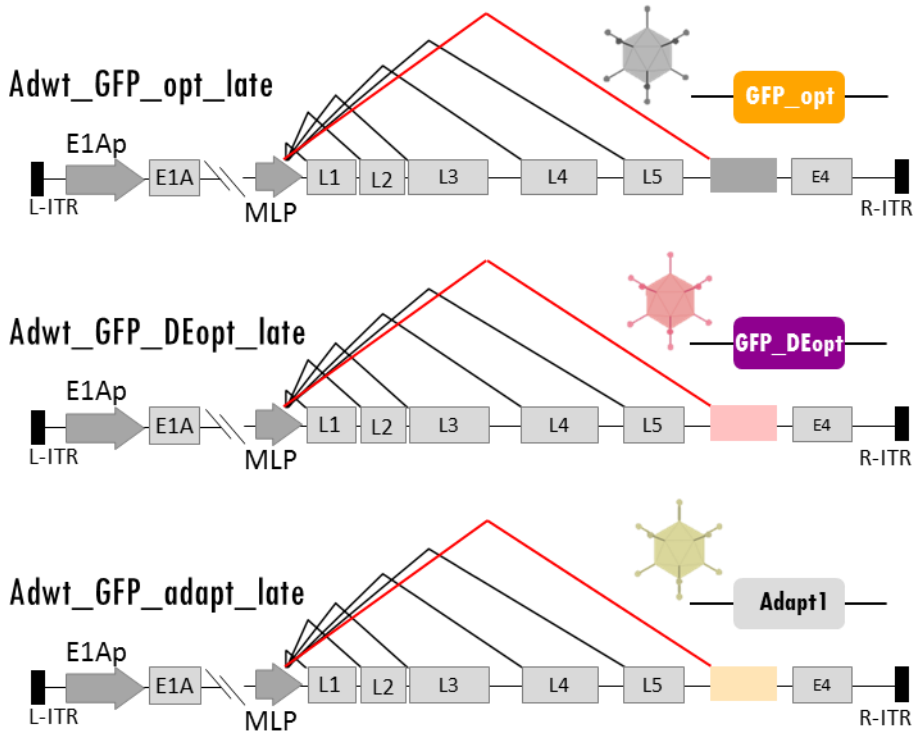


Figura 4.12 | Representación esquemática de los virus armados con transgenes GFP en late. Los esquemas muestran los distintos transgenes GFP incorporados bajo el control del MLP como una forma más de splicing después del gen de la fibra.

A las 48 hpi, analizamos la expresión de GFP por citometría de flujo y la liberación de partículas virales al medio extracelular por qPCR. La expresión de GFP en las células infectadas con el virus Adwt_GFP_adapt_late fue superior a la de las células infectadas con el virus Adwt_GFP_DEopt_late (Fig 4.13 A), de acuerdo a mayor grado de optimización del transgén *GFP_Adapt.1* Sin embargo, esta mejora en la expresión del transgén no impactó negativamente en la capacidad replicativa del virus, obteniendo un número de partículas similar con los virus Adwt_GFP_adapt_late y Adwt_GFP_DEopt_late (Fig 4.13 B).

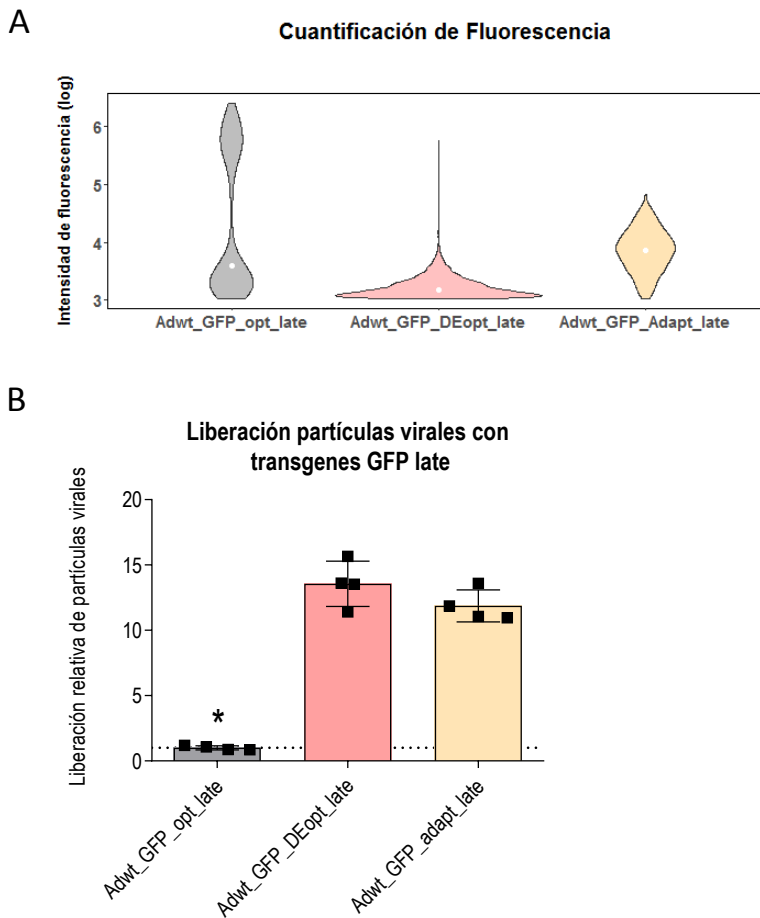


Figura 4.13 | El virus *Adwt_GFP_adapt_late* presenta mayor expresión de GFP que el virus *Adwt_GFP_DEopt* manteniendo el mismo *fitness* viral. **A)** Estudio de la expresión de GFP por citometría de flujo de células infectadas con los virus *Adwt_GFP_opt_late*, *Adwt_GFP_DEopt_late* y *Adwt_GFP_adapt_late*. **B)** Análisis por qPCR los genomas adenovirales presentes en el sobrenadante de las células infectadas. Los datos corresponden a 4 réplicas experimentales independientes de células *A549* 4 hpi con 0.5 PI/célula de *Adwt_GFP_opt_late*, *Adwt_GFP_DEopt_late* y *Adwt_GFP_Adapt_late*.

Estos resultados sugirieron la posibilidad de codificar los transgenes con un uso de codones capaz de permitir la expresión eficiente de genes virales así como del propio transgén.

4.2. Aplicación de la estrategia de adaptación de codones a transgenes terapéuticos armados en adenovirus oncolíticos

A fin de profundizar en el papel del uso de codones de los transgenes armados en *late* en adenovirus oncolíticos, se evaluó su impacto en el contexto de virus terapéutico. Así, se estudiaron dos adenovirus terapéuticos armados en *late*: el virus *ICO15K* armado con el gen de la enzima hialuronidasa y el virus *AdNuPARmE1A* armado con el gen de la enzima convertidora de prodroga 2'desoxirribosilnucleósido transferasa (*LmPDT*).

4.2.1. Evaluación del impacto del uso de codones en el virus *ICO15K* armado con transgenes hialuronidasa

El virus VCN-01, desarrollado por VCN Biosciences y actualmente en fase de ensayos clínicos, es un adenovirus oncolítico con replicación selectiva en células tumorales (virus *ICO15K*) armado con el gen humano *PH20* bajo el MLP [184]. La oncoselectividad del virus *ICO15K* viene dada por modificaciones en el promotor de E1A (modificado con 8 secuencias de respuesta al factor E2F y 1 secuencia de unión Sp-1), por

una delección de 24 pares de bases en el gen E1A y por la sustitución del dominio KKTK de la fibra por el dominio RGDK [185]. El gen *PH20*, también conocido como *SPAM1* (*sperm adhesión molecule 1*), codifica para una enzima hialuronidasa. A nivel fisiológico, esta hialuronidasa se expresa en el acrosoma del espermatozoide, y tiene como función hidrolizar el ácido hialurónico de la corona radiada que rodea el oocito para permitir así la fecundación [186], [187]. Dado que el ácido hialurónico es también un componente abundante en el estroma tumoral, esta enzima tiene interés a nivel terapéutico para degradar dicho estroma y, facilitar así, la biodistribución de los agentes terapéuticos [188], [189].

A la vista de los buenos resultados obtenidos para el virus VCN-01, des del grupo del Dr. Ramon Alemany (*ICO-IDIBELL, l'Hospitalet de Llobregat*) se interesaron en generar un virus armado con el gen de la hialuronidasa de abeja. Esta hialuronidasa, presente en el veneno de la abeja, manifiesta mayor actividad enzimática respecto a la hialuronidasa humana, sugiriendo esto un mayor potencial terapéutico (Anexo 8.2.3). Para asegurar la correcta expresión del gen de abeja en la célula humana, la secuencia de la hialuronidasa fue humanizada mediante la optimización de su uso de codones. A continuación, armaron la secuencia humanizada (*hum_BH*) en el genoma del virus ICO15K en sustitución del gen *PH20*, para generar así el virus HUM-BH. Este nuevo virus HUM-BH mostró una capacidad replicativa muy disminuida respecto al original VCN-01.

4.2.1.1. El estudio de uso de codones de los transgenes hialuronidasa mediante PCA permite predecir la compatibilidad entre la expresión de transgenes y el *fitness* viral

A fin de estudiar si las diferencias en la capacidad oncolítica entre los virus VCN-01 y HUM-BH podían explicarse por el uso de codones de sus correspondientes transgenes, realizamos estudios de CAI y un análisis de uso de codones mediante PCA. Los análisis mostraron un alto grado de optimización para el gen *hum_BH* a lo largo de toda la secuencia (Fig 4.14 A-B) y un importante sesgo hacia codones GC3, similar a lo observado previamente para el gen *GFP_opt* (Fig 4.14 C). Por su parte, el gen *PH20* presentó un uso de codones mucho menos optimizado (Fig 4.14 A-B), y sesgado hacia codones AT3, de forma similar al gen *GFP_DEopt* (Fig 4.14 C).

Los resultados del análisis bioinformático fueron coherentes con las observaciones realizadas *in vitro* por el grupo del Dr. Alemany así como con nuestras observaciones previas con los virus GFP, sugiriendo el potencial predictivo del PCA como herramienta de evaluación de la compatibilidad del transgén y el *fitness* viral.

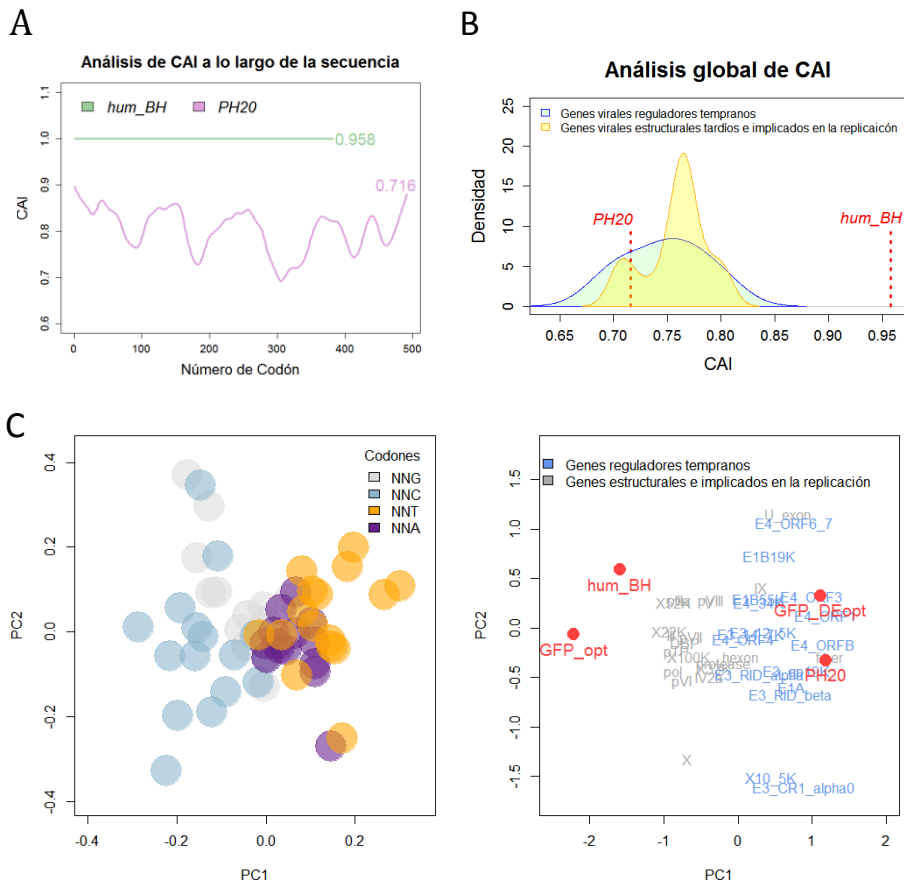


Figura 4.14 | El uso de codones de los transgenes *hum_BH* y *PH20* explica las diferencias en la capacidad replicativa de los vius armados con los mismos. **A)** Comparación de CAI a lo largo de la secuencia de los genes *hum_BH* y *PH20*. Los valores de CAI de cada codón se muestran suavizados para facilitar su interpretación. Los valores numéricos corresponden al valor global de CAI para cada uno de los genes. **B)** Estudio global del CAI de los genes *PH20* y *hum_BH* en relación a los genes adenovirales. **C)** Estudio del uso de codones de los transgenes *hum_BH* y *PH20* en relación a los genes adenovirales y a los transgenes *GFP_opt* y *GFP_DEopt*. Los transgenes *hum_BH* y *PH20* tienen un uso de codones similar al de los transgenes *GFP_opt* y *GFP_DEopt*, respectivamente. Esta semejanza se observa reflejada en su localización en el PC1.

4.2.1.2. La modulación del grado de optimización del transgén codificante para la hialuronidasa de abeja permite la recuperación del *fitness* viral

A fin de estudiar con mayor detalle la posible relación entre la replicación impedida del virus HUM-BH y su transgén, estudiamos el impacto de distintas modificaciones del uso de codones de este último.

El primer abordaje que realizamos fue analizar el CAI de la secuencia salvaje del gen de la hialuronidasa de abeja (*apis_BH*) (Anexos 8.2.4 y 8.2.6). Este análisis mostró un valor de CAI suficientemente elevado para sugerir una buena expresión del gen *apis_BH* en la célula humana (Fig 4.15 A-B). A continuación, para estudiar el uso de codones en relación a los genes virales, realizamos un estudio mediante PCA. Este estudio mostró un uso de codones para el gen *apis_BH* similar al de los genes *late* y al del gen *GFP_Adapt1* (Fig 4.15 C).

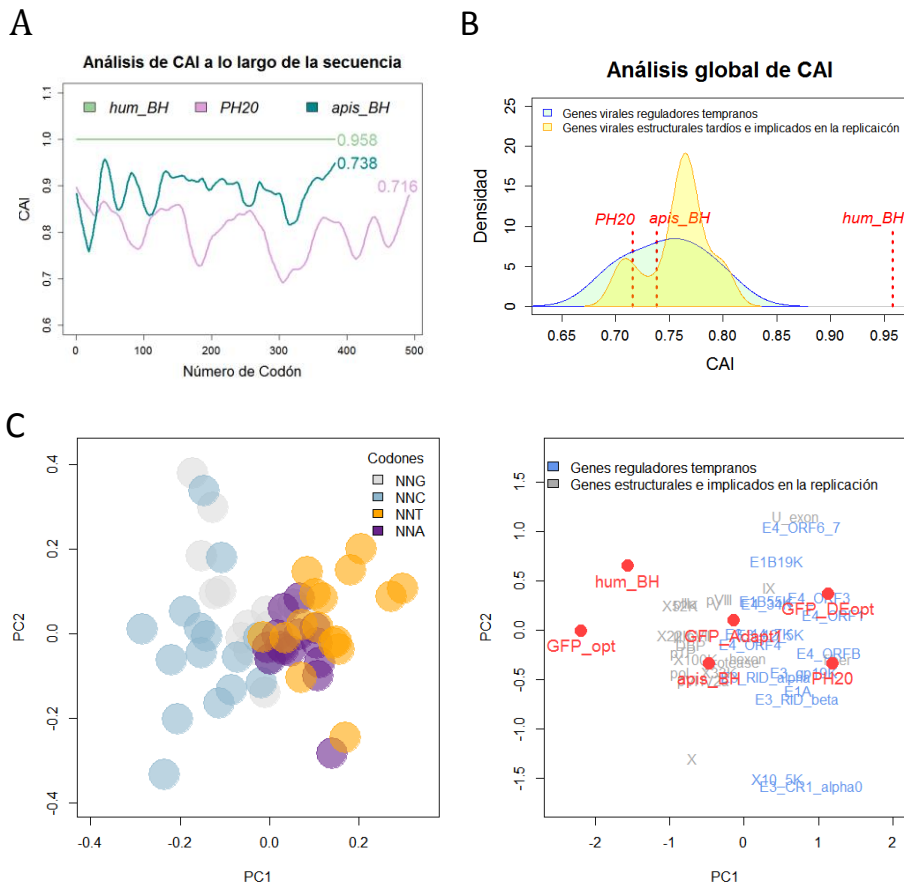


Figura 4.15 | El gen de la hialuronidasa de abeja salvaje, *apis_BH*, presenta un uso de codones moderadamente optimizado, compatible con el virus y con la expresión en células humanas. **A)** Comparación de CAI de la secuencia salvaje (*apis_BH*) de la hialuronidasa de abeja en relación a la secuencia humanizada (*hum_BH*) y al gen *PH20*. Los valores de CAI de cada codón se muestran suavizados para facilitar su interpretación. **B)** Estudio global del CAI del gen *apis_BH* en relación a los genes *hum_BH*, *PH20* y a los genes adenovirales. **C)** Estudio del uso de codones del gen *apis_BH* en relación a los genes adenovirales, y los transgenes *GFP_opt*, *GFP_DEopt*, *GFP_Adapt1*, *PH20* y *hum_BH*.

A continuación, a fin de profundizar en el uso de codones del gen *apis_BH* y corroborar su compatibilidad *in silico* con el virus, realizamos un

estudio del uso de codones en términos absolutos. El análisis por PCA nos permite estudiar el uso de codones relativo por aminoácido, pero no nos aporta información acerca del uso de codones absoluto (UCA) en una secuencia dada. A fin de estudiar el UCA, empleamos un modelo simplificado basado en el cálculo del número total de cada codón corregido por su valor de tAI; véase el apartado 3.9.1.3. *Análisis del índice de adaptación del uso de ARNt*. De esta manera, para un gen dado (i) y siendo NNN el codón de interés:

$$UCA_{NNN(i)} = \frac{N^{\circ} \text{ total } NNN(i)}{tAI \text{ } NNN}$$

Esta fórmula se empleó para calcular el UCA de cada codón en los genes adenovirales *late*, así como en el gen *apis_BH*. Este estudio reveló un uso abundante por parte del gen *apis_BH* de 3 codones (GCG_{-Ala}, CTA_{-Leu} y CCG_{-Pro}) ampliamente usados también por los genes *late* adenovirales (Fig 4.16 A). Ante la posibilidad de que un uso excesivo de estos codones por parte del transgén pudiera interferir con el virus, comparamos el UCA del gen *apis_BH* con el de los genes *PH20* y *GFP_Adapt1*. El análisis mostró un uso similar del codón CTA_{-Leu} para los genes *PH20* y *apis_BH* (Fig 4.16 B). En cambio, el gen *apis_BH* mostró un uso considerablemente mayor de los codones GCG_{-Ala} y CCG_{-Pro} respecto al de los genes *PH20* y *GFP_Adapt* (Fig 4.16 B).

Tras este análisis, y a fin de determinar la permisividad del virus con estos dos codones, diseñamos a partir del gen *apis-BH* una nueva secuencia con el uso de codones modificado para los aminoácidos alanina y prolina. La sustitución de codones se realizó emulando la distribución de codones para ambos aminoácidos de la secuencia *PH20* (Fig 4.17 A-B). La nueva secuencia fue denominada *adapt_BH* (Fig 4.18, Anexos 8.2.5 y 8.2.6).

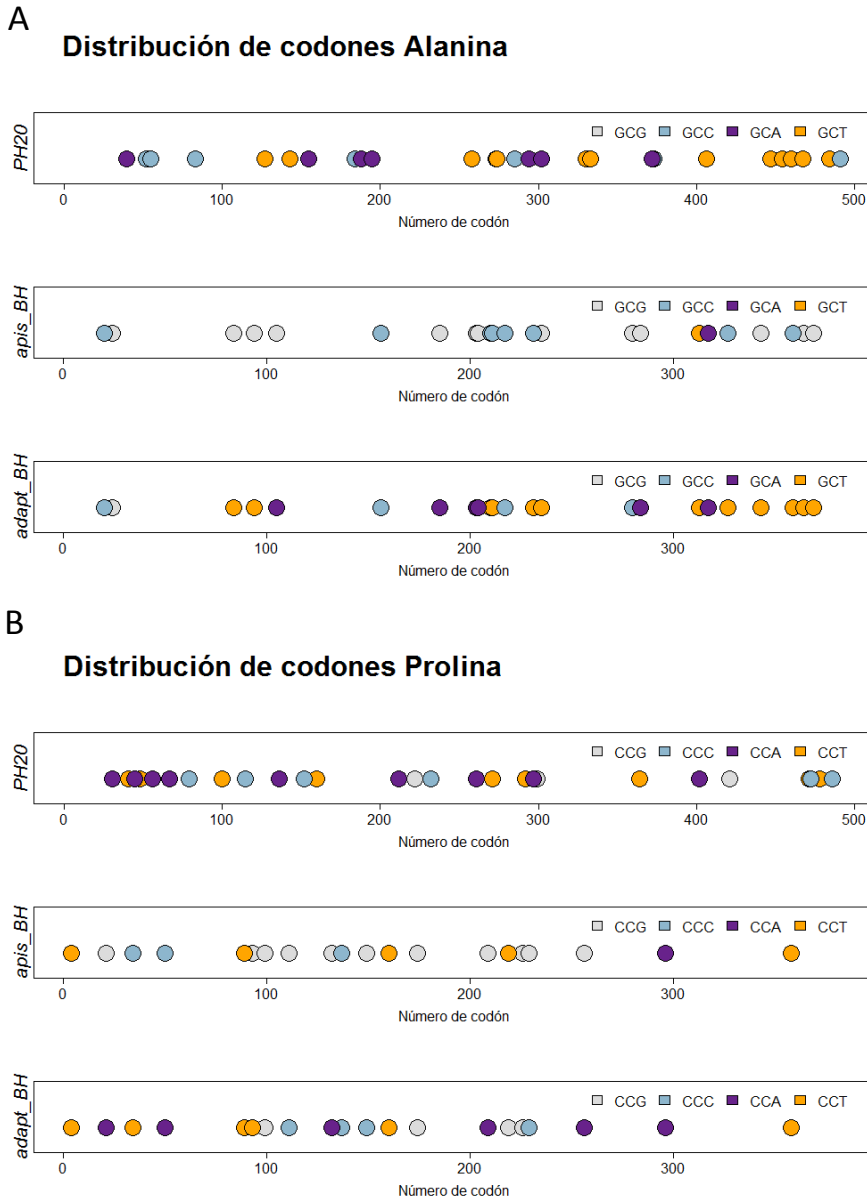


Figura 4.17 | Rediseño del uso de codones para los aminoácidos alanina y prolina del gen *apis_BH*. A) El panel superior muestra la distribución de codones a lo largo de la secuencia del gen *PH20* para el aminoácido alanina. El segundo panel muestra la distribución para el gen *apis_BH*. El tercer panel muestra la nueva distribución de codones para alanina del gen *apis_BH* mimetizando el gen *PH20*. **B)** El panel superior muestra la distribución de codones a lo largo de la secuencia del gen *PH20* para el

aminoácido prolina. El segundo panel muestra la distribución de codones prolina para el gen *apis_BH*. El tercer panel muestra la nueva distribución de codones prolina del gen *apis_BH* mimetizando el gen *PH20*.

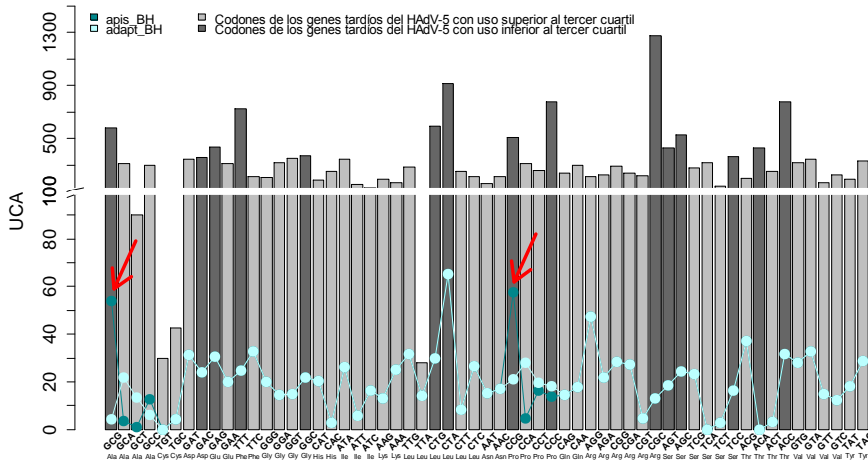


Figura 4.18 | El gen *adapt_BH* presenta un uso disminuido de los codones GCG y CCG respecto a la versión salvaje del gen. Análisis del UCA del gen *adapt_BH* en relación a los genes adenovirales tardíos y el gen *apis_BH*.

A continuación, se generaron 2 adenovirus oncolíticos armados bajo el control del MLP con los transgenes *apis_BH* (virus APIS-BH) y *adapt_BH* (virus ADAPT-BH) en el mismo vector viral ICO15K de los virus VCN-01 y HUM-BH (Fig. 4.19). Por su parte, los virus VCN-01 y HUM-BH fueron amplificados y purificados a partir de stocks cedidos por el Dr. Ramon Alemany.

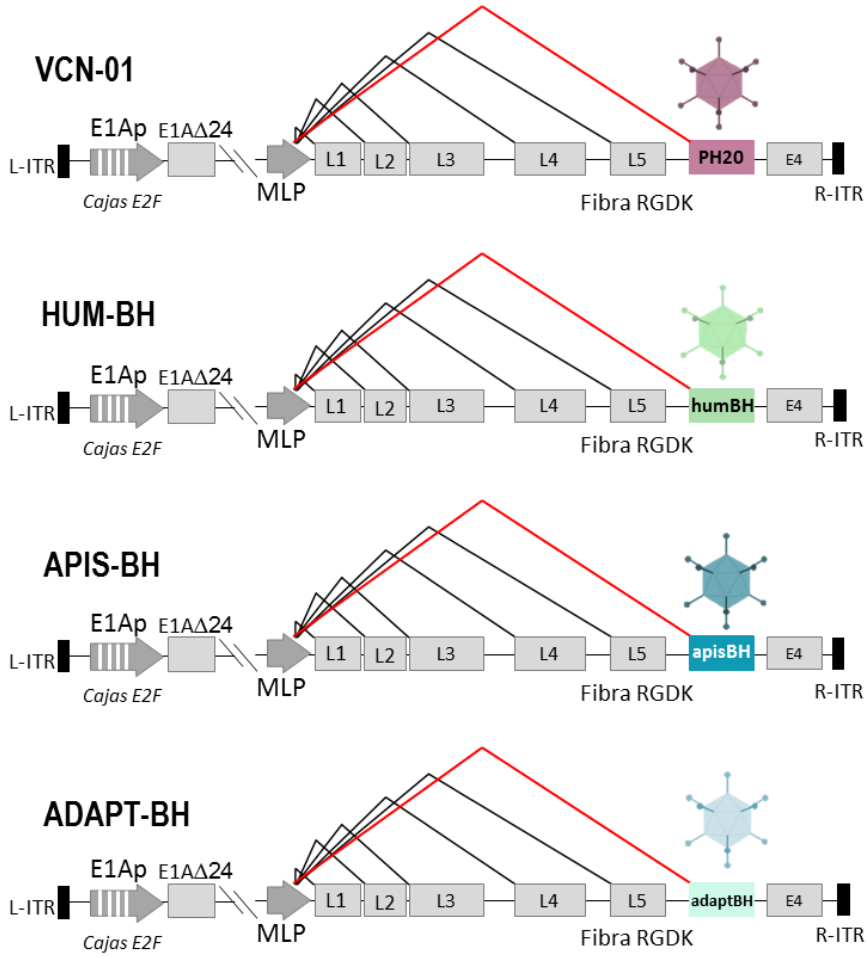


Figura 4.19 | Representación esquemática de los virus armados con transgenes hialuronidasa. Los transgenes están armados bajo el control del MLP en el esqueleto adenoviral ICO15K.

A fin de analizar el impacto de los distintos patrones de uso de codones, en primer lugar realizamos ensayos de citotoxicidad por MTT en las líneas A549, PANC-1, MIA PaCa-2 y NP18. En las líneas PANC-1, MIA PaCa-2 y NP18 se observó un incremento significativo de la toxicidad para los virus APIS-BH y ADAPT-BH, respecto al virus HUM-BH. Asimismo, en estas líneas ni APIS-BH ni ADAPT-BH mostraron diferencias significativas en el valor de IC50 respecto a VCN-01. En la línea A549, el virus ADAPT-BH, contrariamente al virus APIS-BH, presentó mayor citotoxicidad que el virus HUM-BH, demostrándose en este caso el beneficio reportado por las modificaciones en el uso de codones del transgén *adapt_BH* (Fig. 4.20 A-D).

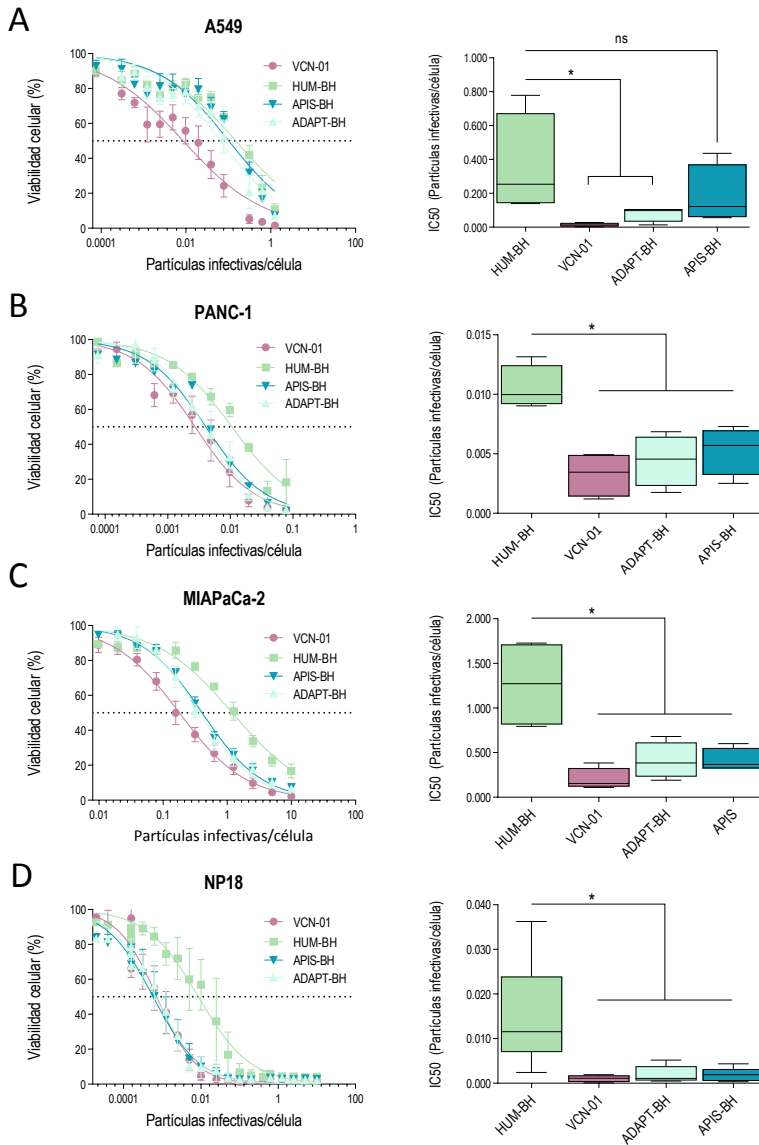


Figura 4.20 | Los virus APIS-BH y ADAPT-BH presentan una capacidad citotóxica incrementada respecto al virus HUM-BH y similar a VCN-01. A-D) Ensayo de citotoxicidad de los virus VCN-01, HUM-BH, APIS-BH y ADAPT-BH realizado en las líneas tumorales A549 (A), PANC-1 (B), MIA PaCa-2 (C) y NP18 (D). Los paneles de la izquierda muestran las curvas de viabilidad y los de la derecha la dosis IC50. En todos los casos el ensayo de citotoxicidad se realizó siete días pos-infección.

Los resultados se muestran un mínimo de 4 experimentos independientes. * $p < 0.05$

A continuación, realizamos estudios de producción viral en las líneas PANC-1 y MIA PaCa-2. Para ello, infectamos las células con 10 PI/célula y 3 días pos-infección analizamos los genomas virales del medio extracelular mediante qPCR. Los resultados mostraron para los virus APIS-BH y ADAPT-BH una mejor capacidad de producción de partículas virales en relación al virus HUM-BH. Asimismo, APIS-BH y ADAPT-BH no mostraron diferencias significativas respecto al virus VCN-01 (Fig 4.21 A-B).

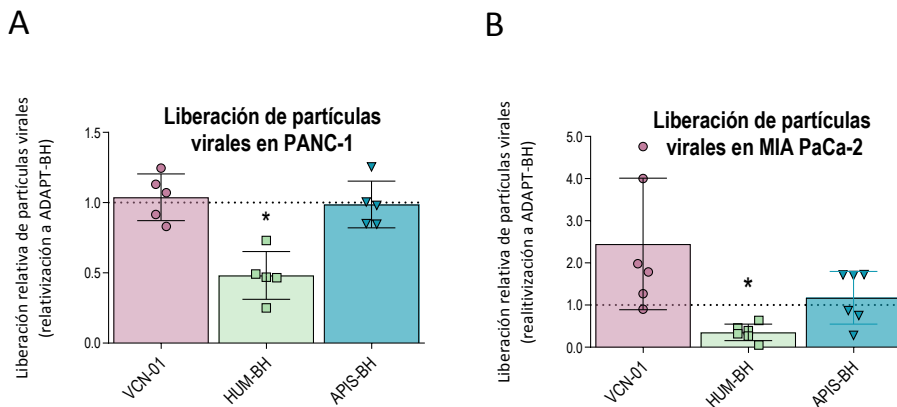


Figura 4.21 | Los virus APIS-BH y ADAPT-BH presentan una capacidad de producción de nuevas partículas virales incrementada respecto al virus HUM-BH y parecida a la de VCN-01. **A-B)** Análisis mediante qPCR de los genomas VCN-01, HUM-BH, APIS-BH y ADAPT-BH liberados al medio extracelular 72h pos-infección en células PANC-1 **(A)**, MIA PaCa-2 **(B)**.

En todos los casos las células se infectaron con 10 IP/célula.

Los datos se muestran relativizados a los valores de ADAPT-BH y representan un mínimo de 5 experimentos independientes

** $p < 0.05$*

Tras esta observación, y a fin de realizar un estudio a más largo plazo emulando de forma simplificada un escenario tumoral, diseñamos un experimento basado en la acumulación de pases de infección. Para ello, infectamos células PANC-1 con los distintos virus a una dosis de 0.5 PI/célula. Tras observar efecto citopático completo con al menos uno de los virus, utilizamos el 1% de los sobrenadantes para infectar nuevas células. Esta operación la realizamos un total de 5 veces (Fig 4.22 A). En este estudio las diferencias en la liberación de nuevas partículas se vieron fuertemente acentuadas. Tras 5 pases de infección, el virus HUM-BH mostró una caída de cinco órdenes de magnitud respecto al virus VCN-01 en la capacidad de producción de nuevas partículas virales. En cambio, las diferencias de los virus APIS-BH y ADAPT-BH respecto a VCN-01, fueron inferiores a un orden de magnitud (Fig 4.22 B). En cuanto a los virus ADAPT-BH y APIS-BH el estudio no mostró diferencias significativas entre ambos, sin embargo a punto final se observó un *fitness* ligeramente mejor para el virus ADAPT-BH (con una disminución en su capacidad de producción viral de 5 veces en relación al virus VCN-01) en comparación con el virus APIS-BH (con una disminución en su capacidad de producción viral de 9 veces en relación al virus VCN-01).

Estos resultados se vieron reflejados en el análisis de la principal proteína de la cápside (el hexón) mediante Western Blot (Fig 4.22.C). Así, no fue posible detectar el hexón en las muestras infectadas con el virus HUM-BH a p5. Por otro lado, la cantidad de proteína hexón de las muestras infectadas con los virus APIS-BH y ADAPT-BH a p5 cayó solamente en un 50% respecto al virus VCN-01.

A continuación, utilizamos este mismo modelo experimental para estudiar la actividad enzimática de los transgenes hialuronidasa. El ensayo mostró

en el pase p0 unos niveles de actividad hialuronidasa notablemente superiores en células infectadas con el virus HUM-BH. Sin embargo, a pase p5 la actividad hialuronidasa asociada al virus HUM-BH resultó indetectable como consecuencia de la extinción del virus a lo largo de los pases. Por su parte, la actividad hialuronidasa detectada en el sobrenadante de células infectadas con el virus ADAPT-BH fue, a pase p0, inferior a la de las células infectadas con el virus APIS-BH (Fig 4.22 D). No obstante, a pase p5 no se detectaron diferencias de actividad, en correlación probablemente con la ligera mejor capacidad de producción viral mostrada por el virus ADAPT-BH (Fig 4.22 B).

Las condiciones experimentales no permitieron la detección de actividad hialuronidasa en los sobrenadantes de células infectadas con el virus VCN-01. A fin de poder establecer las diferencias de actividad de la hialuronidasa PH20 y la de abeja en un sistema viral, se realizó un estudio comparativo de la actividad hialuronidasa a pase p0 entre células infectadas con el virus VCN-01 y células infectadas con el virus HUM-BH. Los sobrenadantes de VCN-01 fueron concentrados a fin de poder determinar la actividad hialuronidasa con la misma recta patrón utilizada para extrapolar la actividad hialuronidasa de los sobrenadantes de HUM-BH. Así, la actividad hialuronidasa del virus HUM-BH resultó ser 6000 veces superior a la del virus VCN-01 (Fig 4.22 E).

El conjunto de los resultados obtenidos demostraron una recuperación del *fitness* del virus HUM-BH derivada de la modulación del grado de optimización de su transgén (usando *apis_BH* y *adapt_BH*). La adaptación del uso de codones para prolina y alanina de *adapt-bb* mostró indicios de mejoría en la capacidad replicativa del virus ADAPT-BH respecto a APIS-

BH, pero en ningún caso significativos; siendo ambos virus buenos candidatos para su traslación pre-clínica.

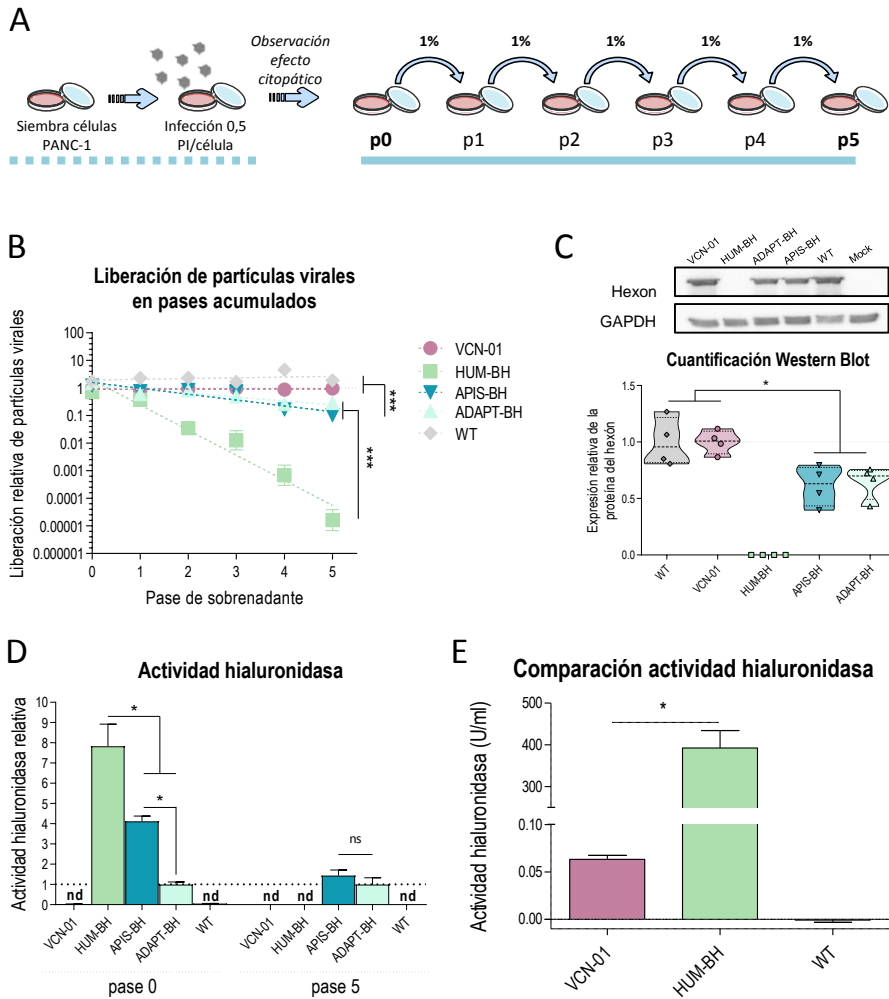


Figura 4.22 | La expresión de la hialuronidasa de abeja se pierde tras varios ciclos de replicación debido a la extinción del virus HUM-BH mientras se mantiene con los virus APIS-BH y ADAPTt-BH. A) Esquema representativo del diseño experimental. B) Cuantificación por qPCR de la producción de nuevas partículas virales en sobrenadantes acumulados. C) Western blot representativo de la expresión de la proteína del hexón en el paso 5 (p5). D) Cuantificación de la actividad hialuronidasa a

pase p0 y pase p5 mediante ensayo turbidimétrico. **E)** Comparación de la actividad hialuronidasa a pase p0 derivada de los virus VCN-01 y HUM-BH.

Los resultados de los paneles B- E se muestran como la media \pm SEM de 4 experimentos independientes.

**p<0.05*

4.2.1.3. La modulación del grado de optimización del transgén codificante para la hialuronidasa de abeja permite recuperar la actividad anti-tumoral *in vivo*

A fin de trasladar los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* a un escenario preclínico, evaluamos el potencial terapéutico antitumoral de los virus hialuronidasa en modelos subcutáneos de PANC-1 y MIA PaCa-2. Para ello se inyectaron 2 millones de células en cada uno de los cuartos traseros de animales inmunodeprimidos. Cuando el volumen tumoral alcanzó una media de 100 mm³ se administraron los virus VCN-01, HUM-BH, APIS-BH, ADAPT-BH o bien solución salina mediante administración intravenosa por la vena de la cola (Fig. 4.23 A; Fig. 4.24 A).

Se observó un control de la progresión tumoral por parte de todos los virus oncolíticos ensayados, si bien se detectaron diferencias significativas en el grado de efecto antitumoral ejercido por los distintos virus. En consonancia con los resultados obtenidos *in vitro*, los virus APIS-BH y ADAPT-BH dieron lugar a un control muy significativo de la progresión tumoral en comparación al virus HUM-BH, tanto en el modelo PANC-1 como MIA PaCa-2 (Fig. 4.23 B-C; Fig. 4.24 B-C). Además en el modelo PANC-1 los virus APIS-BH y ADAPT-BH mostraron mejor tendencia en

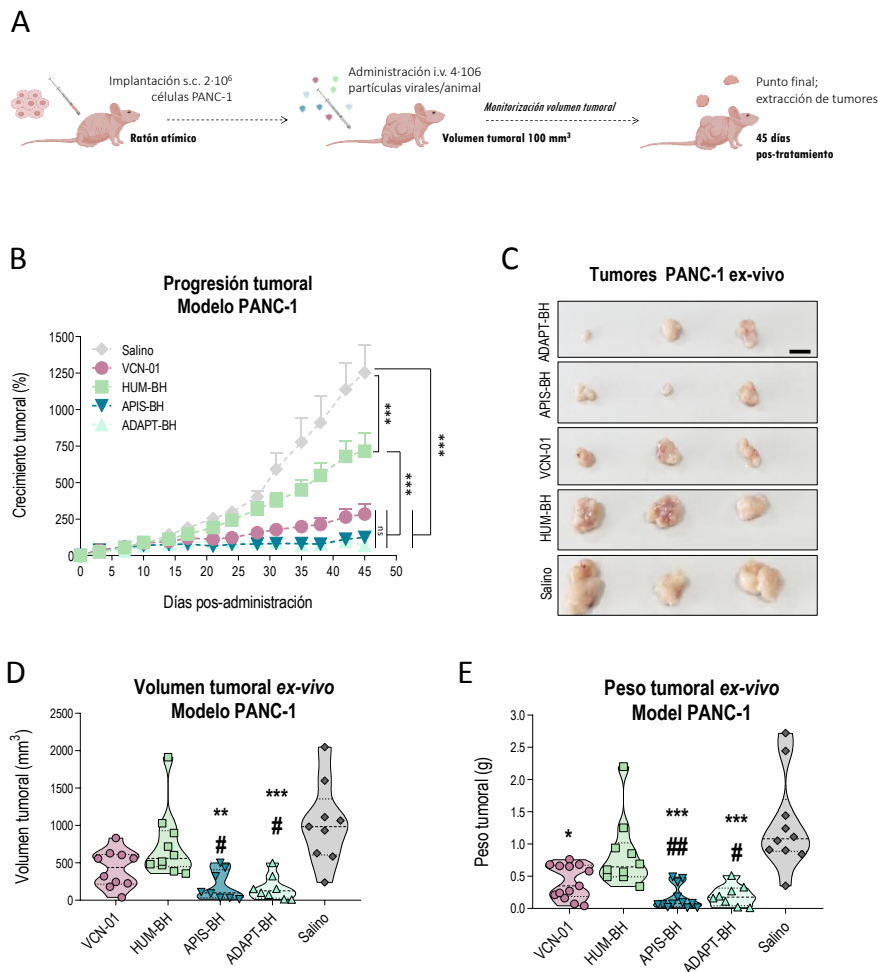


Figura 4.23 | Los virus APIS-BH y ADAPT-BH presentan una potente capacidad oncolítica vivo en el modelo tumora PANC-1. A) Esquema representativo del diseño experimental. **B)** Seguimiento de la progresión tumoral en tumores subcutáneos PANC-1. **C)** Imágenes representativas de los tumores ex-vivo 45 días pos-tratamiento. **D)** Cuantificación ex-vivo del volumen tumoral 45 días pos-tratamiento. **E)** Cuantificación ex-vivo del peso tumoral 45 días pos-tratamiento.

Scale bar 1 cm

En los paneles D y E los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo salino. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Las almoadillas representan diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo de tratamiento HUM-BH. # $p < 0,05$, ## $P < 0,01$.

el control de la progresión tumoral, así como en las dimensiones tumorales a punto final, respecto a VCN-01. En MIA PaCa-2, el estudio de los tumores a punto final no mostró diferencias entre los grupos de tratamiento VCN-01, APIS-BH y ADAPT-BH; únicamente el grupo ADAPT-BH mostró diferencias significativas respecto el grupo salino tanto en peso como en tamaño tumoral punto final (Fig. 4.23 B-E; Fig. 4.24 B-E).

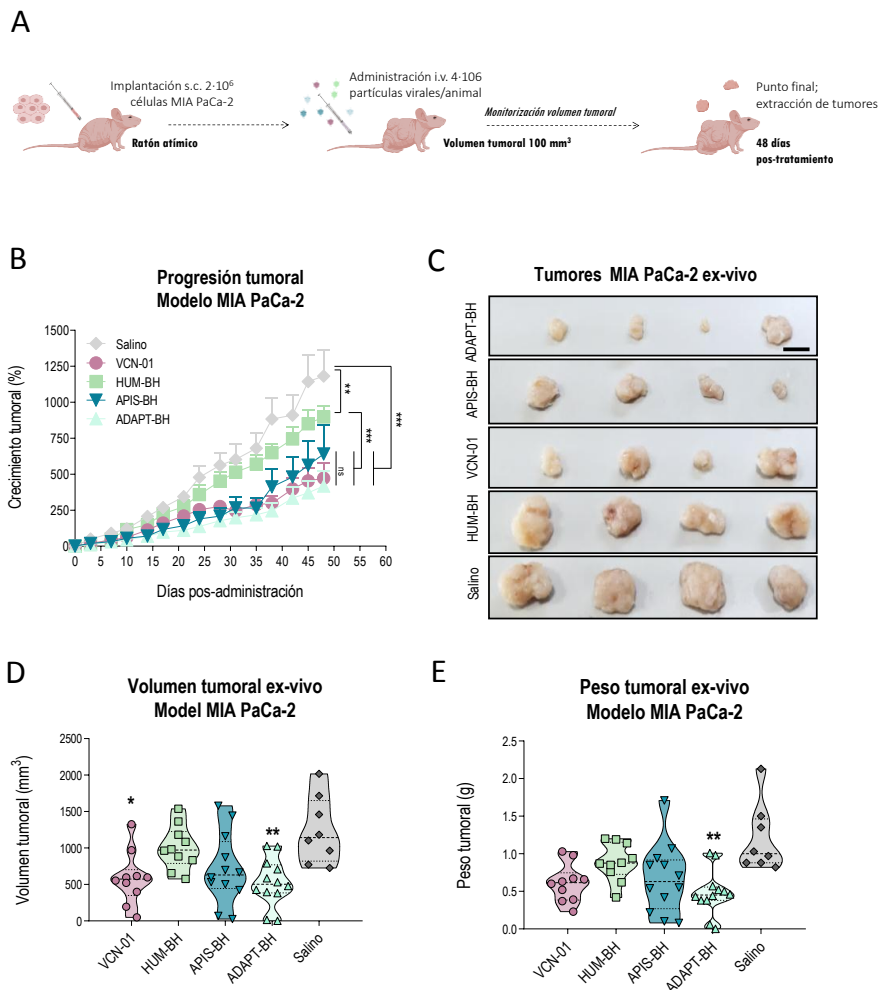


Figura 4.24 | Los virus APIS-BH y ADAPT-BH presentan una potente capacidad oncolítica vivo en el modelo tumora MIA PaCa-2. A) Esquema representativo del diseño experimental. **B)** Seguimiento de la progresión tumoral en tumores subcutáneos MIA PaCa-2. **C)** Imágenes representativas de los tumores ex-vivo 48 días post-tratamiento. **D)** Cuantificación ex-vivo del volumen tumoral 48 días post-tratamiento. **E)** Cuantificación ex-vivo del peso tumoral 45 días post-tratamiento.

Scale bar 1 cm

En los paneles D y E los asteriscos respresentan diferencias estadíticamente significativas respecto al grupo salino. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

A continuación, los tumores extraídos fueron analizados histológicamente. En primer lugar, se estudiaron diferencias en los distintos grupos de tratamiento en relación al contenido de ácido hialurónico. Tanto los tumores PANC-1 como los tumores MIA PaCa-2 tratados con virus armados con hialuronidasa de abeja (HUM-BH, APIS-BH y ADAPT-BH) mostraron un menor contenido de ácido hialurónico que aquellos tumores tratados con VCN-01, corroborando así el mayor potencial enzimático de la hialuronidasa de abeja frente a la humana (Fig. 4.25 A; Fig. 4.26 A),

Es interesante destacar el bajo nivel de ácido hialurónico detectado en tumores tratados con el virus HUM-BH. Teniendo en cuenta la escasa capacidad de control de la progresión tumoral mostrada por el virus HUM-BH, el bajo contenido de ácido hialurónico detectado en los tumores tratados con este virus sugiere una vida media de la enzima hialuronidasa prolongada.

Por otro lado, mediante la tinción de Masson se analizó el nivel de celularidad de los tumores. Los tumores PANC-1 tratados con APIS-BH y ADAPT-BH mostraron una enorme reestructuración de la masa tumoral, con un grado de celularidad mínimo y gran contenido en colágeno (Fig. 4.25 B), sugiriendo así una acción sinérgica entre el virus y el transgén. Los tumores MIA PaCa-2 no mostraron diferencias en el grado de celularidad entre los distintos grupos de tratamiento (Fig. 4.26 B).

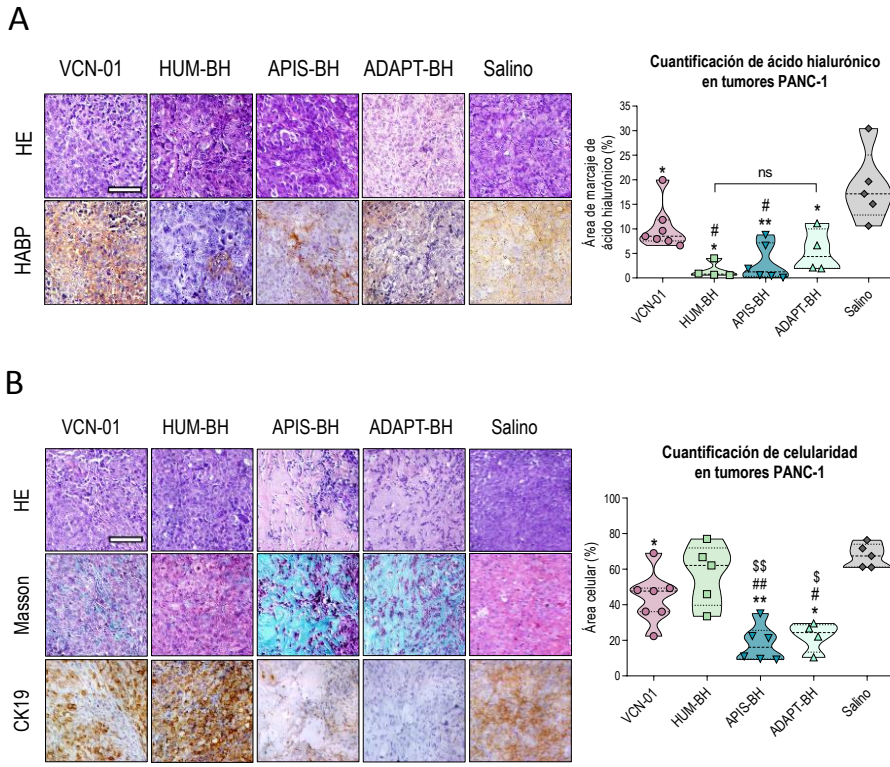


Figura 4.25 | Los tumores PANC-1 tratados con los virus APIS-BH y ADAPT-BH presentan muy bajos niveles de ácido hialurónico y de celularidad.

A) El panel de la izquierda muestra imágenes representativas del contenido de ácido hialurónico de tumores PANC-1 tras 45 días pos-tratamiento. El gráfico de la derecha muestra la cuantificación del área marcada con la proteína de unión a ácido hialurónico (HABP). **B)** El panel de la izquierda muestra imágenes representativas de la caracterización histológica de tumores PANC-1 tras 45 días de tratamiento. El gráfico de la derecha representa la cuantificación del grado de celularidad de los tumores en base a la tinción de Masson.

Scale bar 100µm

Los asterísticos respresentan diferencia estadísticamente significativas respecto al grupo salino. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Las almoadillas representan diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo de tratamiento VCN-01. # $p < 0,05$, ## $P < 0,01$.

El símbolo del dólar representa diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo de tratamiento HUM-BH. \$ $p < 0,05$, \$\$ $P < 0,01$.

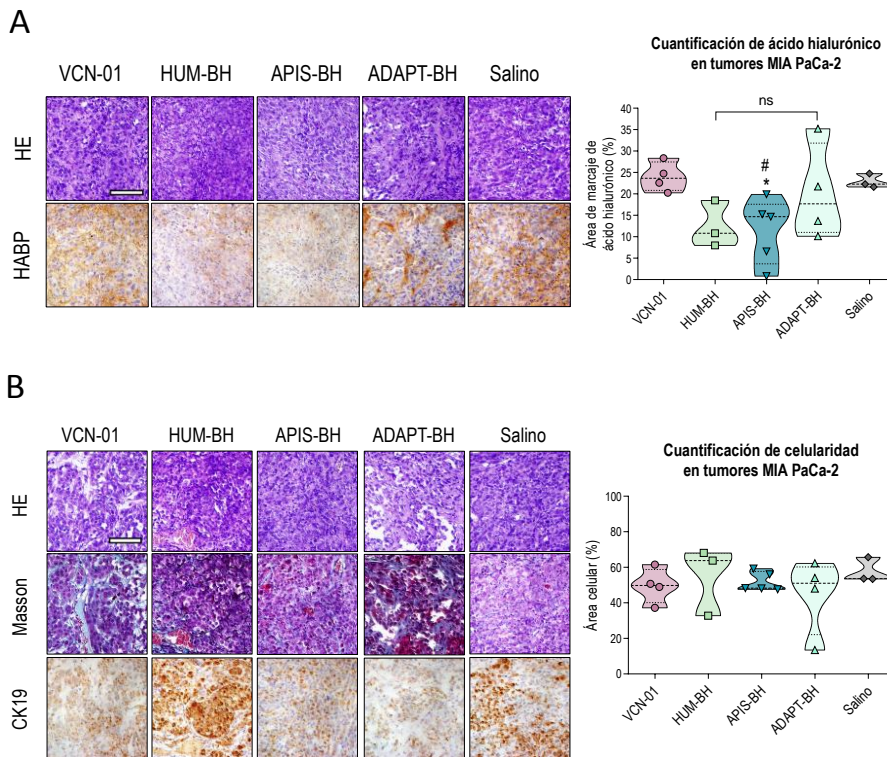


Figura 4.26 | Los tumores MIA PaCa-2 tratados con los virus APIS-BH y ADAPT-BH presentan niveles muy bajos de ácido hialurónico. A) El panel de la izquierda muestra imágenes representativas del contenido de ácido hialurónico de tumores MIA PaCa-2 tras 48 días pos-tratamiento. El gráfico de la derecha muestra la cuantificación del área marcada con la proteína de unión a ácido hialurónico (HABP). **B)** El panel de la izquierda muestra imágenes representativas de la caracterización histológica de tumores MIA PaCa-2 tras 48 días de tratamiento. El gráfico de la derecha representa la cuantificación del grado de celularidad de los tumores en base a la tinción de Masson.

Scale bar 100 μ m

Los asterísticos representan diferencia estadísticamente significativas respecto al grupo salino. * $p < 0,05$.

Las almohadillas representan diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo de tratamiento VCN-01. # $p < 0,05$.

Scale bar 100 μ m

Los asterísticos representan diferencia estadísticamente significativas respecto al grupo salino. * $p < 0,05$.

Las almohadillas representan diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo de tratamiento VCN-01. # $p < 0,05$.

En conjunto, los resultados muestran como la modulación de la optimización del uso de codones de los transgenes armados en *late* en

adenovirus oncolíticos puede favorecer una repartición equilibrada de los recursos traducionales entre virus y transgén. Y de esta forma, balanceando adecuadamente la capacidad replicativa viral y la expresión del transgén, es posible alcanzar un mayor beneficio terapéutico global.

4.2.2. Evaluación del impacto del uso de codones en el virus AdNuPARmE1A armado con transgenes codificantes para la *LmPDT*

Durante las últimas décadas se ha estudiado la aplicación de la terapia suicida basada en sistemas prodroga-enzima bioactivadora de prodroga como estrategia antitumoral [190]. Esta estrategia se basa en el uso de transgenes codificantes de enzimas capaces de convertir una prodroga en un metabolito citotóxico [191], [192]. El sistema contempla la expresión selectiva del transgén en las células tumorales, y por tanto la conversión controlada de la prodroga, así como la expansión del efecto citotóxico a las células vecinas (efecto *bystander*) (Fig. 4.27) [193], [194].

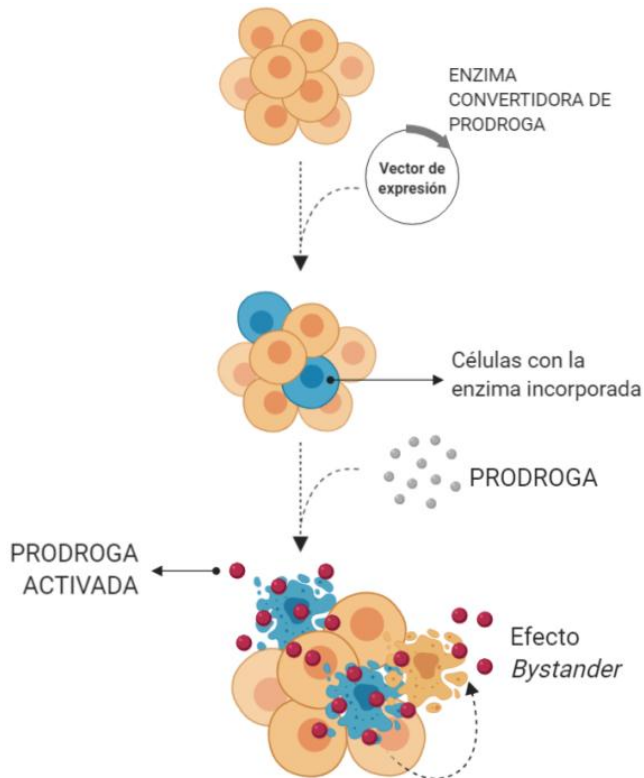


Figura 4.27 | Representación esquemática de la terapia suicida basada en sistemas prodroga-enzima.

En este marco, y en colaboración con el Dr. Jesús Fernández (*Universidad Europea, Madrid*), nos propusimos estudiar la recientemente descrita enzima *LmPDT* [195] para desarrollar un nuevo sistema suicida, similar al sistema PNP (*Purine Nucleoside Phosphorilase*), ya patentado [196]. La *LmPDT* es una 2'-desoxiribosiltransferasa que se expresa de manera natural en la *Leishmania mexicana* y que cataliza la transferencia de la fracción 2'-desoxiribosil de un 2'-desoxinucleósido de purina donador a una base púrica libre. De esta forma, la enzima es capaz de liberar análogos de base púrica que ejercen un efecto citotóxico sobre las células. En el presente estudio se ha utilizado el análogo de nucleósido 2-fluoro-

2'desoxiadenosina (F-dAdo), que tras ser metabolizado por la *LmPDT* da lugar a la 2-fluoroadenina (F-Ade). La F-Ade ejerce su actividad citotóxica bloqueando la síntesis de ADN y ARN/proteína (Fig. 4.28) [197]–[199].

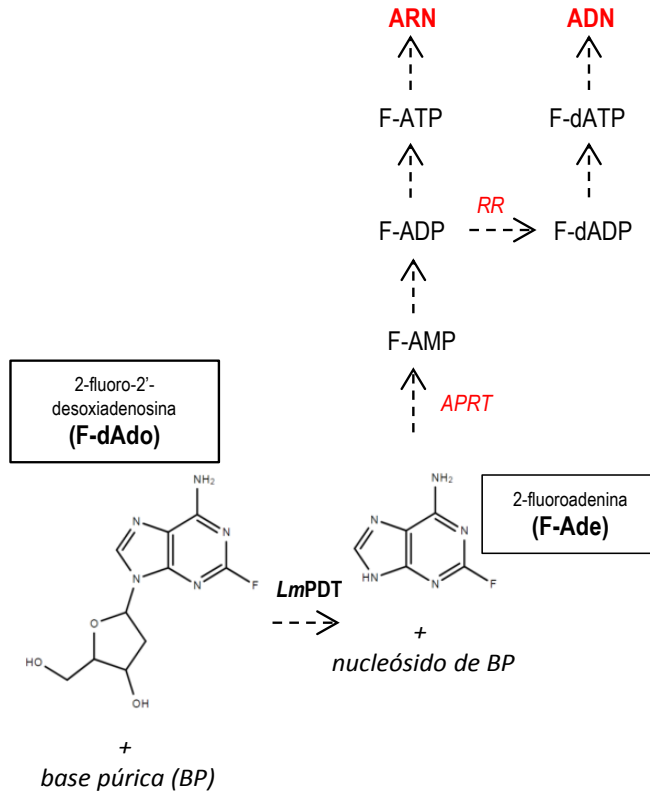


Figura 4.28 | Representación esquemática de la actividad citotóxica derivada del sistema suicida F-dAdo-LmPDT. RR: ribonucleotide reductase; APRT: adenine phosphoribosyltransferase.

La vehiculización selectiva de los sistemas suicida prodroga-enzima bioactivadora permite alcanzar altas concentraciones del principio activo en las células diana a la vez que se minimizan los efectos adversos del tratamiento. Cuando los vectores usados son adenovirus oncolíticos se da la posibilidad de que confluyan sinérgicamente la oncolisis adenoviral con

el efecto citotóxico del sistema suicida, amplificando así la potencia antitumoral del tratamiento[190], [200]. En base a esto, nos propusimos la generación y evaluación del virus AdNuPARmE1A armado con la enzima *LmPDT* bajo el control del MLP. El virus AdNuPARmE1A es un adenovirus oncolítico cuya oncoselectividad viene dada por el control de la expresión del gen *E1A* a través secuencias SPS (*sequence paired sites*) de respuesta a la vía de NOTCH y a través del promotor uPAR [201].

Considerando los resultados obtenidos hasta el momento en relación al impacto del uso de codones de los transgenes armados en *late*, evaluamos, en primer lugar, el uso de codones del gen *PDT* (codificante para la *LmPDT*) mediante un PCA (Fig. 4.29 A). Este análisis mostró para el gen *PDT* un uso de codones similar al de los genes tardíos del adenovirus, aunque con un sesgo ligeramente más pronunciado hacia codones GC3; situándose el gen *PDT* en una posición intermedia entre los genes *HUM_BH* y *APIS_BH* para el componente principal 1 (PC1). Este resultado sugirió así que el gen *LmPDT* podría tener un impacto negativo sobre la capacidad replicativa del virus.

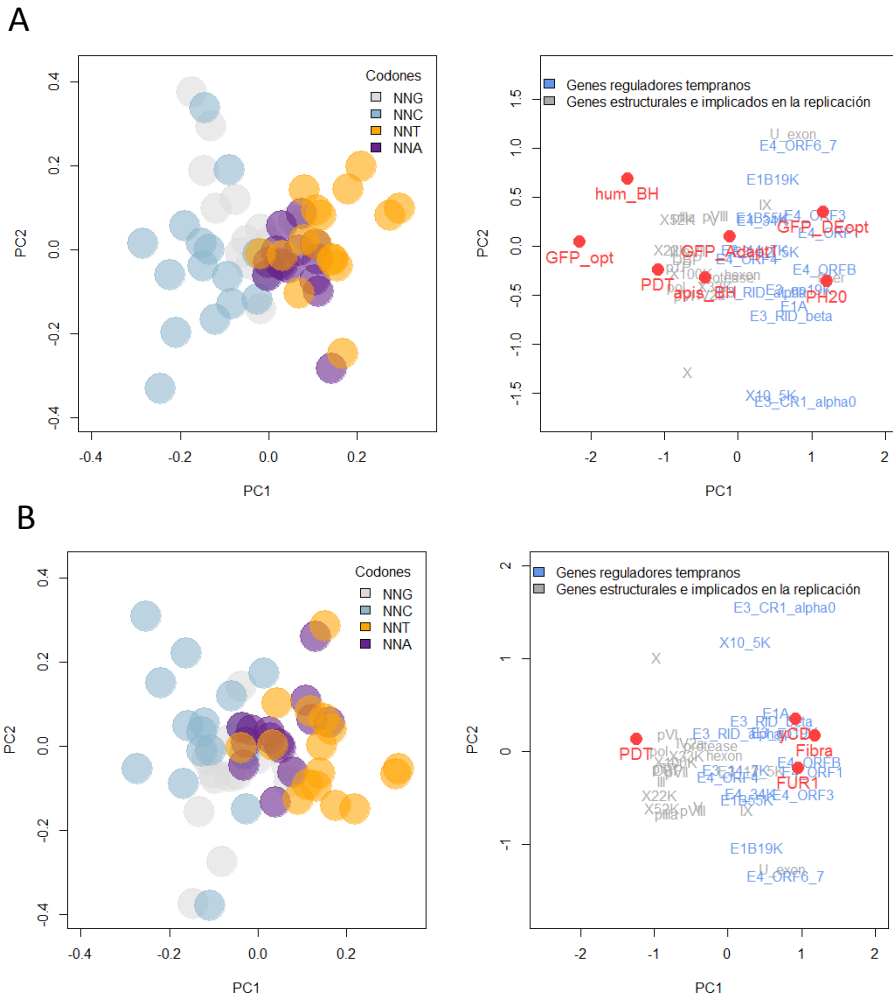


Figura 4.29 | Estudio del uso de codones mediante PCA del gen PDT. A) Análisis del uso de codones del gen PDT en relación a los genes adenovirales y a los transgenes previamente evaluados *GFP_opt*, *GFP_DEopt*, *GFP_Adapt1*, *hum_BH*, *apis_BH* y *PH20*. **B)** Análisis del uso de codones del gen PDT en relación a los genes adenovirales y a los genes *γCD* y *FUR1*.

Dado que según la bibliografía la *LmPDT* presenta una excelente actividad enzimática [195] y, basándonos en el uso de codones de los

transgenes con funciones similares yCD (*yeast cytosine deaminase*) y FUR1 (uracil phosphoribosyltransferase) [144], [202] utilizados en otros estudios bajo el control del MLP (Fig 4.29 B), optamos por recodificar el transgén mimetizando el uso de codones de la fibra, a fin de impactar en la menor medida posible sobre el *fitness* viral. La recodificación del gen *PDT* se realizó mediante la herramienta *online* COOL [203]. Para ello se introdujo la secuencia del gen de la fibra adenoviral como referencia y se estipularon los siguientes parámetros a mimetizar: GC3%, uso de codones individual y uso de codones contextualizado en la secuencia. La secuencia resultante fue denominada *PDT_Adapt* (Anexos 8.2.7 y 8.2.8). El análisis de CAI de la nueva secuencia generada indicó una reducción del grado de optimización respecto a la secuencia original (Fig. 4.30 A). Asimismo, el valor global de CAI del gen *PDT_Adapt* se situó por debajo de la media del conjunto de genes virales tardíos (Fig. 4.30 B). El nuevo análisis de PCA mostró la colocación de los genes de la *fibra* y de *PDT_Adapt*, de acuerdo al rediseño de uso de codones llevado a cabo (Fig. 4.30C). Finalmente, el análisis del UCA, en relación a los genes adenovirales tardíos y los transgenes *PH20* y *GFP_Adapt1* como referencia no mostró ningún codón particular susceptible de impactar en el *fitness* viral (Fig. 30D).

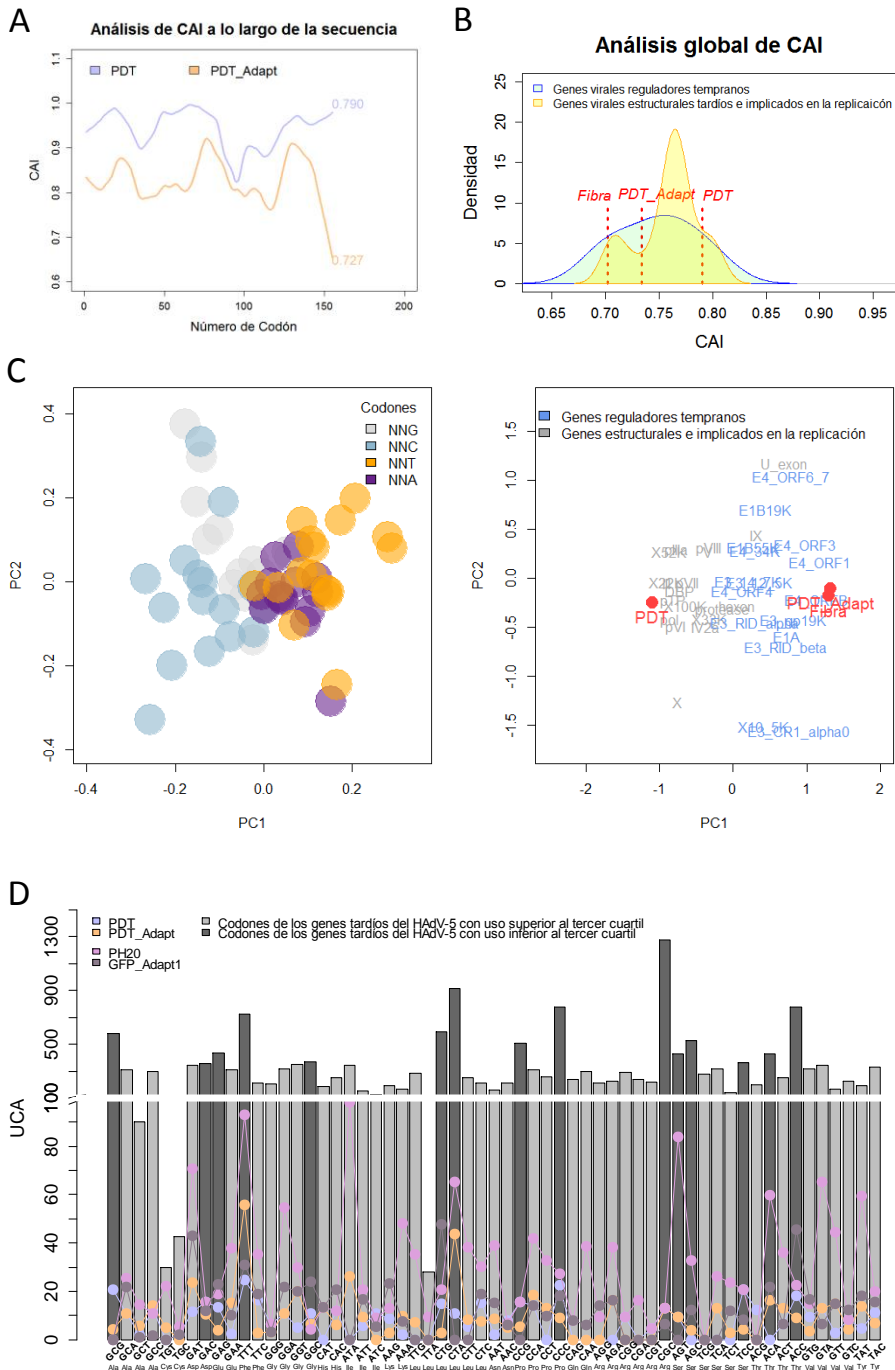


Figura 4.30 | El gen rediseñado *PDT_Adapt* presenta un grado de optimización más moderado respecto al gen *PDT*, con un valor inferior de CAI y un contenido

GC3 reducido. A) Comparación de CAI a lo largo de la secuencia de los genes *PDT*, *PDT_Adapt* y fibra adenoviral. Los valores de CAI de cada codón se muestran suavizados para facilitar su interpretación. Los valores numéricos corresponden al valor global de CAI para cada uno de los genes. **B)** Estudio global del CAI de los genes *PDT* y fibra en relación a los genes adenovirales. **C)** Estudio del uso de codones mediante PCA de los genes *PDT* y *PDT_ADAPT* en relación a los genes adenovirales y, particularmente en relación a la *fibra*. **D)** Análisis del UCA de los genes *PDT* y *PDT_Adapt* en relación a los genes tardíos adenovirales y a los transgenes *PH20* y *GFP_Adapt1*.

Tras la caracterización bioinformática del gen *PDT_Adapt*, generamos el plásmido de expresión pcDNA3.1+_PDT_Adapt (Fig. 4.31 A) a fin de comprobar que la recodificación no había afectado a la funcionalidad enzimática. A continuación, transfectamos el plásmido en la línea celular HEK293T, 12h pos-transfección añadimos la prodroga F-Ado, y 48h pos-transfección analizamos la viabilidad celular mediante un ensayo MTT. Como control utilizamos el mismo plásmido de expresión pero con la secuencia original del gen (pcDNA3.1+_PDT) (Fig. 4.31 A). Los resultados mostraron unos niveles de citotoxicidad dosis-dependientes similares para ambos plásmidos, con una ligera mayor citotoxicidad para el plásmido pcDNA3.1+_PDT, de acuerdo al mayor grado de optimización del gen *PDT* respecto al gen *PDT_Adapt* (Fig. 4.31 B).

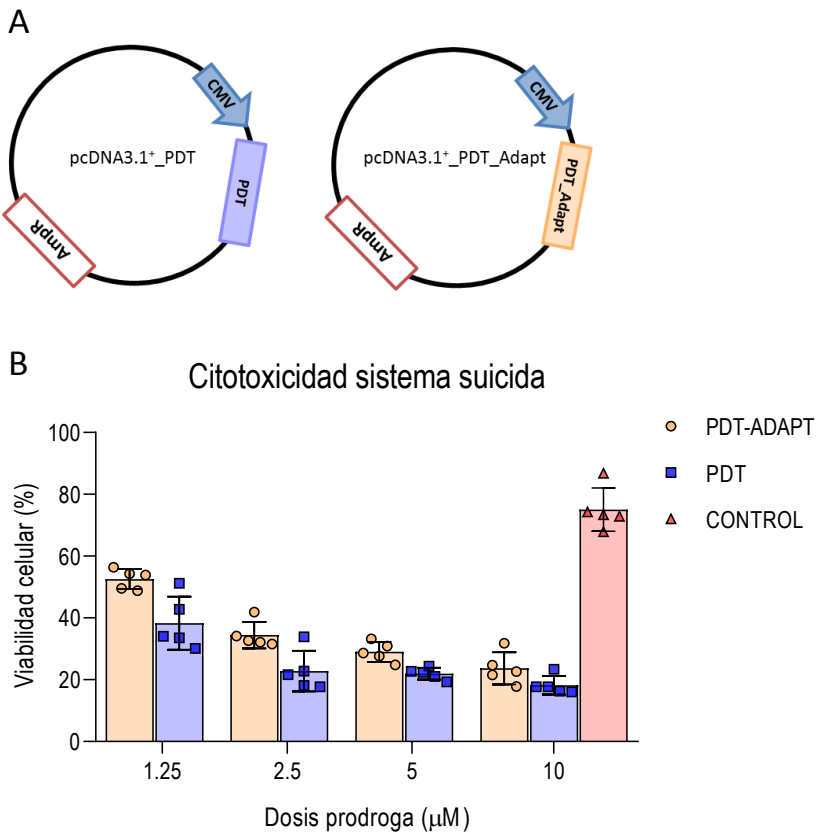


Figura 4.31| El gen recodificado *PDT_Adapt* mantiene la funcionalidad enzimática **A)** Representación esquemática de los plásmidos de expresión pcDNA3.1+_PDT y pcDNA3.1+_PDT_Adapt. **B)** Citotoxicidad derivada del sistema suicida con los genes *PDT* y *PDT_Adapt* analizados por ensayo MTT 36h post-tratamiento con F-dAdo (48h pos-transfección). El control se corresponde con células control no transfectadas y tratadas con F-dAdo a 10 μM .

Los datos muestran 5 experimentos independientes.

Tras comprobar que la recodificación no había afectado a la funcionalidad enzimática, armamos el virus AdNuPARmE1A con sendas secuencias para generar los virus PDT y PDT-ADAPT (Fig. 4.32).

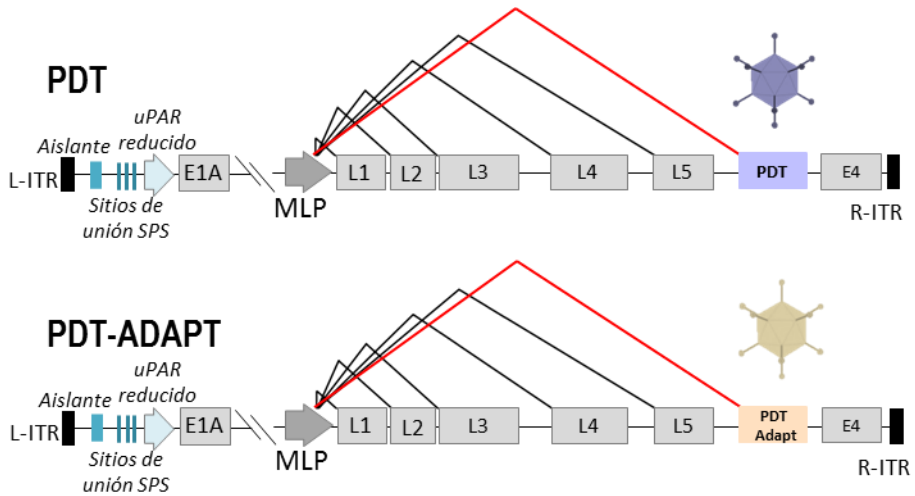


Figura 4.32| Representación esquemática de los virus armados con transgenes PDT. Los transgenes están armados bajo el control del MLP en el esqueleto adenoviral AdNuPARmE1A.

A continuación, a fin de analizar el impacto del uso de codones de los transgenes sobre el *fitness* viral, infectamos células A549, PANC-1 y MIA PaCa-2 con 10 PI/célula y, 72 hpi, determinamos las partículas virales liberadas. En las tres líneas celulares, el virus PDT-ADAPT mostró una significativa mayor capacidad replicativa, siendo este hecho de especial relevancia en la línea A549, con 50 veces más de partículas virales liberadas por el virus PDT-ADAPT respecto al virus PDT (Fig. 4.33).

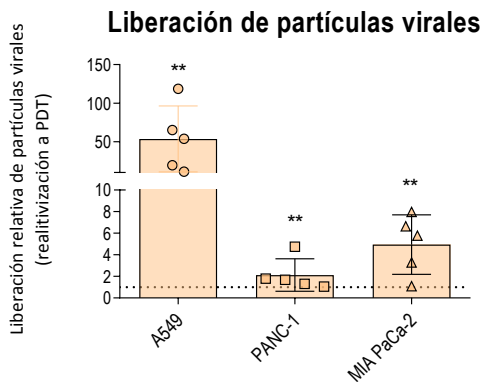


Figura 4.33 | El virus PDT_Adapt presenta mayor capacidad de producción de partículas virales respecto al virus PDT. Análisis mediante qPCR de los genomas virales liberados al medio extracelular 72h pos-infección en células A549, PANC-1, MIA PaCa-2.

En todos los casos las células se infectaron con 10 IP/célula.

*Los datos muestran 5 experimentos independientes relativizados a los valores de PDT. $**p < 0.01$*

Asimismo, observamos una mayor capacidad citotóxica para en virus PDT-ADAPT en las líneas A549 y MIA PaCa-2 (Fig. 4. 34 A,C). En células PANC-1 (Fig. 4.34 B) no se observaron diferencias de citotoxicidad entre los virus, probablemente porque estas células son muy permisivas a la oncolisis viral, con valores de IC50 en torno a 0.015 PI. Luego, probablemente sólo es posible detectar diferencias significativas en la citotoxicidad cuando la comparación se realiza con virus con un *fitness* altamente impedido como el anteriormente observado con el virus HUM-BH (Fig. 4.20 A).

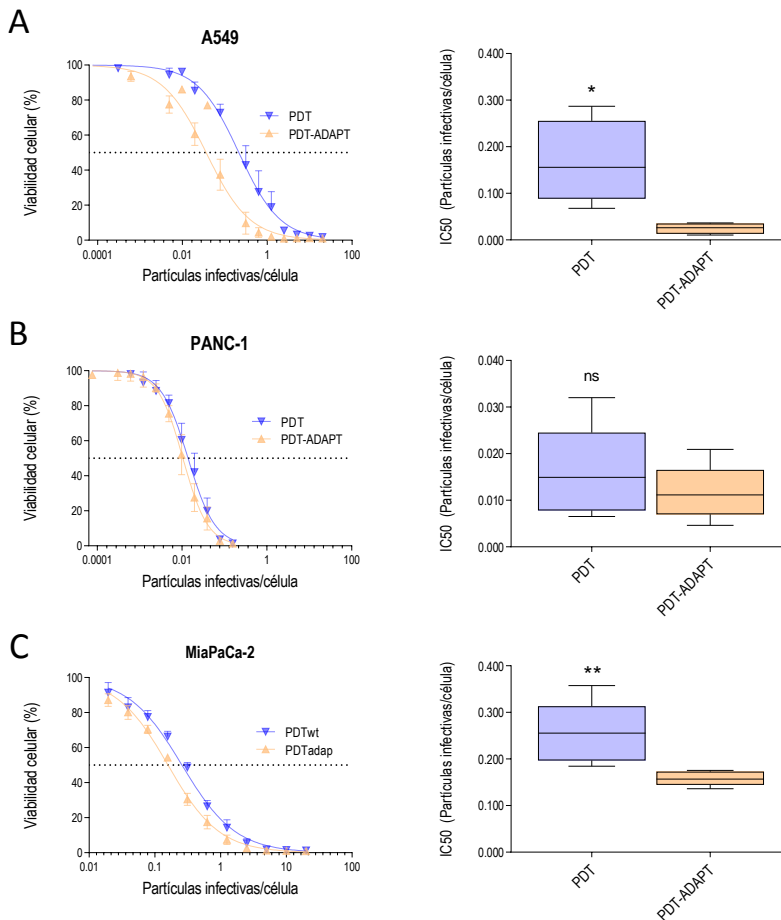


Figura 4.34 | El virus PDT_Adap presenta mayor capacidad citotóxica. Ensayo de citotoxicidad de los virus PDT y PDT-ADAPT realizado en las líneas tumorales A549 **(A)**, PANC-1 **(B)** y MIA PaCa-2 **(C)**. Los paneles de la izquierda muestran las curvas de viabilidad, y los de la derecha la dosis IC50. En todos los casos el ensayo de citotoxicidad se realizó siete días pos-infección.

Los resultados muestran la media de un mínimo de 4 experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

A continuación, nos centramos en estudiar el beneficio terapéutico de la combinación de la actividad oncolítica con el sistema suicida. Para ello, en primer término evaluamos la sensibilidad de la línea celular MIA PaCa-2 a

la prodroga F-dAdo y al metabolito citotóxico F-Ade creciendo las células en presencia de ambos compuestos a distintas concentraciones durante 48h. A continuación, la sensibilidad se determinó mediante un ensayo MTT. El análisis evidenció el perfil seguro la prodroga F-dAdo, con datos de viabilidad superiores al 80% a dosis de hasta 10 μM . Por su parte, el metabolito F-Ade mostró un gran efecto citotóxico, con datos de viabilidad inferiores al 20% a dosis superiores a 2.5 μM (Fig. 4.35). En base a estos resultados se seleccionaron las dosis de 2.5 μM y 5 μM para estudiar el sistema suicida en los virus PDT y PDT-ADAPT.

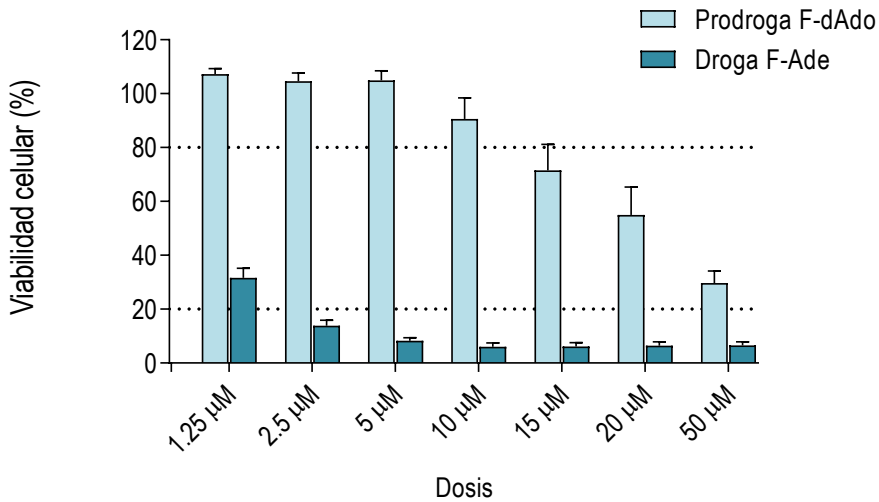


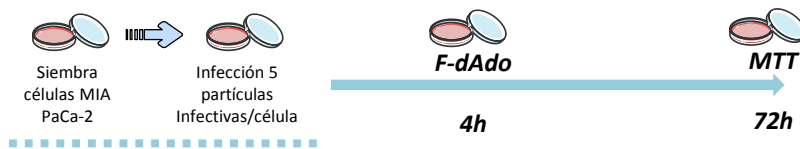
Figura 4.35 | Estudio de la sensibilidad de la línea celular MIA PaCa-2 a la prodroga F-dAdo y al citotóxico F-Ade. La viabilidad celular se determinó mediante ensayo MTT tras 48h de incubación con una batería de dosis de F-dAdo y F-Ade.

Los resultados se muestran como la media \pm SEM de 5 experimentos independientes.

Para evaluar el efecto combinado de la terapia suicida y la actividad oncolítica viral, diseñamos dos pautas de tratamiento. En la primera pauta,

infectamos células MIA PaCa-2 con 5 PI/célula. A las 4hpi realizamos un cambio de medio y añadimos F-dAdo a 2.5 μ M. Transcurridas 72 hpi, evaluamos la viabilidad celular mediante un ensayo MTT (Fig. 4.36 A). Con esta pauta de tratamiento y en ausencia de prodroga, el virus PDT_Adapt presentó mayor citotoxicidad respecto al virus PDT, de acuerdo a lo observado previamente. Sin embargo, en presencia de F-dAdo, el virus PDT presentó mayor toxicidad, evidenciando así un notable efecto citotóxico derivado del sistema suicida y sugiriendo un importante efecto *bystander*. Para el virus PDT_ADAPT, no se observaron diferencias en presencia o ausencia de prodroga, sugiriendo un posible enmascaramiento de la actividad del sistema suicida debido a la gran capacidad replicativa del virus PDT (Fig. 4.36 B).

A



B

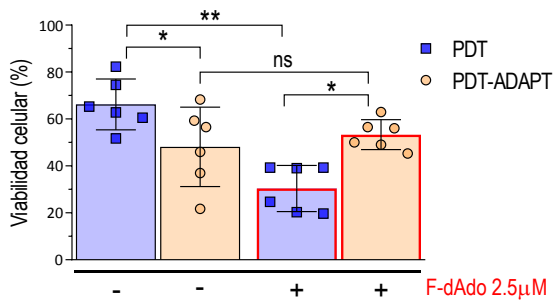


Figura 4.36 | Estudio de la citotoxicidad a corto plazo de los virus PDT y PDT-ADAPT en combinación con la prodroga F-dAdo. A) Esquema representativo del diseño experimental. **B)** Determinación de la viabilidad celular en células MIA PaCa-2

infectadas 5 PI/célula de los virus PDT y PDT-ADAPT en presencia y ausencia de F-dAdo.

*Los resultados muestran 6 experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$*

En la segunda pauta de tratamiento, infectamos células MIA PaCa-2 con 0.3 PI/célula. A continuación, dejamos transcurrir 6 días antes de añadir la prodroga a fin de amplificar ambos virus. Tras los 6 días pos-infección, se añadió la prodroga F-dAdo a dosis de 2.5 μM y 5 μM y se dejó incubar durante 72h. Transcurrido ese tiempo, la viabilidad celular se determinó mediante un ensayo MTT (Fig. 4.37 A).

Esta pauta exacerbó las diferencias de citotoxicidad de ambos virus en ausencia de prodroga subsecuente a la acumulación de ciclos de replicación viral. Así, el virus PDT mostró menor capacidad citotóxica respecto al virus PDT_ADAPT aún en presencia de F-dAdo.

Por otro lado, con esta pauta disminuyeron las diferencias para virus PDT en presencia y ausencia de F-dAdo. No obstante, la adición de la prodroga siguió mostrando un efecto dosis-dependiente de incremento de la citotoxicidad. Por su parte, pese a que el resultado no mostró significancia estadística, las células infectadas con el virus PDT-ADAPT y tratadas con 5 μM de prodroga, mostraron una ligera mayor citotoxicidad que en la condición sin prodroga (Fig. 4.37 B).

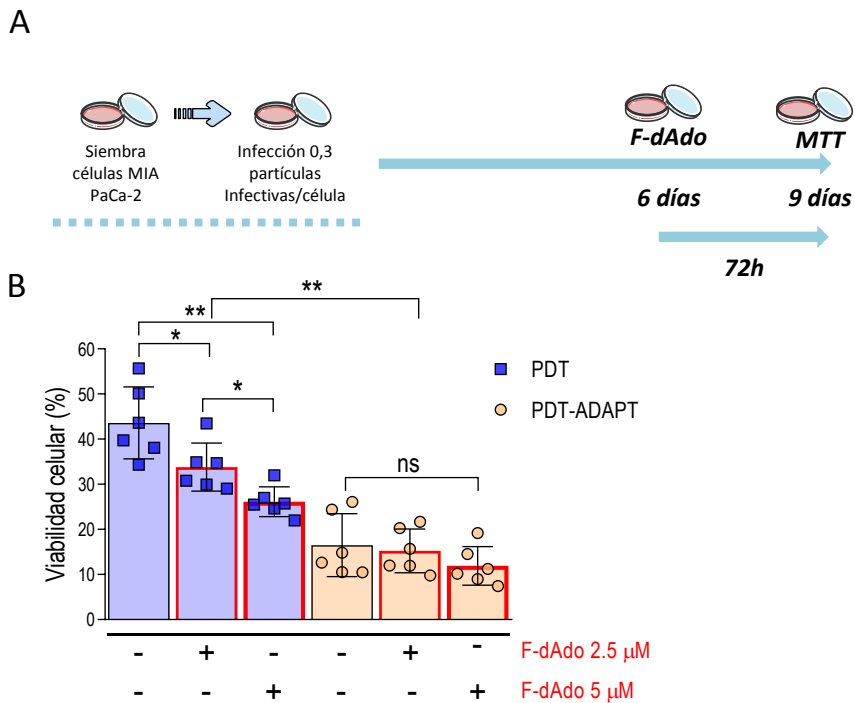


Figura 4.37 | Estudio de la citotoxicidad a largo plazo de los virus PDT y PDT-ADAPT en combinación con la prodroga F-dAdo. A) Esquema representativo del diseño experimental. **B)** Determinación de la viabilidad celular en células MIA PaCa-2 infectadas 0.3 PI/célula de los virus PDT y PDT-ADAPT en presencia y ausencia de F-dAdo.

Los resultados muestran 6 experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

En su conjunto, estos resultados evidencian la complejidad de los sistemas suicidas vectorizados por adenovirus oncolíticos. A nivel terapéutico, los resultados realizados hasta la fecha con los virus PDT y PDT-ADAPT no son concluyentes, y derivan en la necesidad de estudiar en mayor profundidad este sistema terapéutico, a fin de elucidar qué pauta de tratamiento constituye la opción más efectiva.

No obstante, se demuestra una vez más el efecto negativo sobre el virus que tiene armar transgenes en *late* con un uso de codones excesivamente optimizado. Asimismo, con este último ejemplo de virus armado, se sugiere que el efecto del uso de codones de transgenes controlados bajo el MLP es independientemente del esqueleto viral utilizado y de la naturaleza del transgén armado. Se evidencia así una vez más, la necesidad de modular el uso de codones de los trasgenes expresados en *late* a fin de conseguir el equilibrio más óptimo entre *fitness* viral y expresión de transgén.

5. Discusión

La creciente incidencia del cáncer, junto con la eficacia limitada de los abordajes antineoplásicos clásicos (quimioterapia, radioterapia y cirugía), han conducido a aunar esfuerzos para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que permitan mejorar el curso de la enfermedad. El desarrollo de nuevas estrategias resulta especialmente necesario en casos como el ADP, cuyas tasas de supervivencia son extremadamente bajas y han experimentado escasas mejoras en las últimas décadas [5]. Los fármacos aprobados para el tratamiento del ADP como la gemcitabina, el nab-paclitaxel o la terapia combinada FOLFIRINOX, se han asociado a modestas mejoras en la supervivencia y a importantes efectos adversos [21]–[23]. El microambiente tumoral del ADP, rico en factores inmunosupresores como los linfocitos T reguladores, los macrófagos M2 o el TGF β , junto con el denso contenido estromal fibrótico, limitan enormemente la eficacia terapéutica de los tratamientos de quimioterapia e inmunoterapia [31], [32], [36], [40], [41].

En este sentido, la viroterapia oncolítica ha despertado un interés creciente en los últimos años, en gran medida, gracias a los avances en el

entendimiento de la biología del cáncer y de los virus, y al desarrollo de las técnicas de edición genética, que han permitido la manipulación viral con fines terapéuticos. La propiedad de auto-amplificación de los virus oncolíticos junto con su capacidad de expresar moléculas terapéuticas y su potencial de estimulación de la respuesta inmune antitumoral componen los grandes atractivos de la viroterapia oncolítica [48], [49].

Los ensayos clínicos basados en el uso de virus oncolíticos han mostrado resultados muy positivos en términos de seguridad [50], [51]–[53]. Sin embargo, los resultados en términos de eficacia no han sido suficientemente satisfactorios. Se requieren, pues, mejoras en la potencia de los virus oncolíticos, a fin de que éstos puedan constituir una alternativa terapéutica en la práctica clínica habitual. Entre las distintas estrategias para dotar a los virus de mayor eficacia, una de las más alentadoras consiste en armar los genomas virales con transgenes terapéuticos que aporten beneficios adicionales en el microambiente tumoral. Armando los virus oncolíticos, es posible abordar la acción antitumoral del tratamiento desde dos frentes: mediante la actividad oncolítica propia del virus, y mediante la acción terapéutica de los transgenes [54]–[57], [60]–[63], [65], [66], [69], [74].

Sin embargo, armar el genoma viral con transgenes terapéuticos puede suponer diversos retos. En el caso de los adenovirus, ampliamente utilizados en viroterapia oncolítica [50],[82],[83], debe considerarse la capacidad limitada de empaquetamiento del genoma, lo cual obliga a minimizar el espacio utilizado por los transgenes. Por otro lado, se ha reportado que en ocasiones la incorporación de transgenes puede entrar en conflicto con la expresión de las proteínas virales y en consecuencia disminuir la capacidad oncolítica de los virus [54], [141]–[146].

A lo largo de esta tesis hemos querido contribuir a la optimización de la estrategia de armar los adenovirus oncolíticos. Para ello, hemos estudiado el impacto que tiene el uso de codones de los transgenes terapéuticos sobre el *fitness* del virus y hemos diseñado una estrategia que permite compatibilizar una buena actividad oncolítica con la expresión de los transgenes armados.

5.1. El uso de codones de los transgenes repercute de manera distinta en función de si estos se expresan en la fase *early* o *late* del ciclo de replicación adenoviral.

Los adenovirus presentan un patrón de uso de codones particular. Los genes reguladores tempranos (o *early*) tienen, en general, un perfil menos optimizado, sesgado hacia codones AT3. Por su parte, los genes tardíos (o *late*) tienen, mayoritariamente, un patrón más optimizado, sesgado hacia codones GC3. El virus estaría utilizando esta desviación en su uso de codones como mecanismo para optimizar el reparto de los recursos traducionales de la célula, y la modificación de este patrón sería susceptible de afectar negativamente al *fitness* viral [147].

Atendiendo a este hecho, y dada la dicotomía en el uso de codones de los genes tempranos y tardíos, en esta tesis hemos evaluado cómo impacta el uso de codones de los transgenes armados en el genoma adenoviral en

función de si éstos se expresan en la fase *early* o *late* del ciclo de replicación viral.

Así, armamos dos transgenes con distinto grado de optimización, *GFP_opt* (CAI 0.962; GC3% 96.7) y *GFP_DEopt* (CAI 0.809; GC3% 44.8) bajo el control del promotor constitutivo CMV, a fin de expresarlos en la fase temprana pos-infección o fase *early*. Por otro lado, armamos los mismos transgenes bajo el control del MLP, como una forma más de *splicing* después del gen de la fibra, a fin de expresarlos en la fase tardía pos-infección o fase *late*.

La incorporación de los transgenes en *early* no tuvo consecuencias sobre el ciclo replicativo viral, independientemente del uso de codones del transgén. Así, se observó que la replicación del genoma, la producción de proteínas virales y la liberación de nuevos viriones fue similar entre los virus *Adwt_GFP_opt_early* y *Adwt_GFP_DEopt_early*. Asimismo, el efecto citotóxico de ambos virus fue equivalente al del virus sin armar.

Estos resultados irían en consonancia con el hecho de que en la fase temprana del ciclo adenoviral se expresan fundamentalmente proteínas con una función reguladora, y lo hacen de forma moderada [204], compartiendo la maquinaria traduccional con los ARNm celulares endógenos. Este escenario dejaría margen a nivel de la economía celular (entendiéndose como la distribución de los recursos celulares -que son finitos- entre los distintos genes) para co-expresar simultáneamente y sin problemas un gen adicional que requiera de los mismos ARNts que los genes virales, como es el caso del gen *GFP_DEopt*. Por su parte, la expresión, aunque mucho más elevada, de genes como *GFP_opt* tampoco entraría en conflicto con la expresión de genes virales. Esto sería así ya

que, tal y como se muestra en el PCA, el uso de codones del gen *GFP_opt* se diferencia claramente del uso de codones de los genes adenovirales tempranos, luego se reduciría la posibilidad de competir por los mismos ARNts.

En conclusión, en este escenario de expresión temprana, dado que el grado de optimización de los transgenes se correlacionaría con su grado de expresión, y que el *fitness* viral no se vería afectado en ningún caso, la optimización de los transgenes se presenta como una buena opción a fin de obtener la máxima expresión de transgén, y, en definitiva, el máximo beneficio terapéutico.

Contrariamente al escenario *early*, la incorporación de transgenes en *late* supuso la afectación del *fitness* viral de forma dependiente al uso de codones. Así, el adenovirus armado en *late* con el transgén *GFP_DEopt* mostró un comportamiento equivalente al de los virus *early* y al del adenovirus sin armar; demostrándose que transgenes expresados en *late* con un uso de codones sesgado hacia AT3, no impactarían sobre la capacidad replicativa del virus. No obstante, igual que en el escenario *early*, la expresión del transgén desoptimizado resultó deficiente. Por su parte, el adenovirus armado en *late* con el transgén *GFP_opt*, mostró excelentes niveles de expresión de GFP pero una capacidad replicativa reducida derivada de una disminución en la producción de proteínas tardías.

A diferencia de lo que ocurre en la fase temprana pos-infección, en la fase tardía el virus tiene bajo su control a la célula, ha replicado el ADN y explota la maquinaria traduccional de forma exclusiva. Esto le permite producir a altos niveles las proteínas estructurales, necesarias para la formación de la nueva progenie viral [97], [117], [205]. La necesidad de

producir el mayor número de proteínas posible en esta fase está, probablemente, relacionada con el hecho que, en su mayoría, las proteínas tardías, a diferencia de las tempranas, presenten un uso de codones optimizado, sesgado hacia codones GC3. Luego, la incorporación de un transgén aún más optimizado (como *GFP_opt*), que haga un uso aún más intensivo de codones GC3, sería susceptible de desencadenar un fenómeno de competición integénica por los recursos traduccionales. El transgén altamente optimizado, con una alta capacidad de expresión, sería susceptible de “secuestrar” recursos traduccionales como los ARNts, de manera que privaría de su uso a aquellos genes virales que también los utilicen. Así, observamos que la expresión del gen *GFP_opt* en *late* afectó negativamente a la co-producción de proteínas virales ricas en GC3 como la *pIIIa*, la *V* o el *pentón*, pero no a la *fibra* (pobre en GC3).

El fenómeno de competición no se produciría en el caso de introducir un transgén sesgado hacia codones AT3 (como *GFP_DEopt*), debido que su uso de codones lo eximiría de entrar en conflicto competitivo con los de genes virales tardíos. Esto sería debido a que su expresión es menor, de acuerdo a su mayor desoptimización, y/o a que utilizaría un conjunto de ARNts distinto al de los genes virales expresados en esta fase.

No obstante, un escenario intermedio entre las dos situaciones *late* mencionadas sería posible, tal y como se demuestra con el virus Adwt_GFP_adapt_late. Este punto es importante en tanto que la expresión de transgenes bajo el control del MLP reviste importantes ventajas frente a la expresión en *early*. Entre las distintas ventajas destacan la minimización del uso de espacio en el genoma sin necesidad de reemplazar genes endógenos, la posibilidad de expresar agentes citotóxicos o una mayor oncoselectividad en la expresión del transgén [133].

Transgenes como *GFP_Adapt1*, con un uso de codones similar al de los genes adenovirales tardíos, no serían capaces de sesgar el uso de recursos a su favor – y en detrimento de los genes virales-, al tiempo que presentarían mejores niveles de expresión que aquellos transgenes más desoptimizados. Con otras palabras, un uso de codones similar entre el transgén y los genes adenovirales supondría la misma capacidad competitiva de todos los genes por los recursos traducionales, luego éstos serían distribuidos en proporciones similares entre todos los genes.

Así, el conjunto los resultados de los experimentos llevados a cabo con los virus GFP sugeriría tres escenarios para adenovirus armados en *late*:

- 1- Transgenes con uso muy optimizado de codones penalizarían enormemente la capacidad replicativa del virus, al tiempo que permitirían una excelente expresión del transgén.
- 2- Transgenes excesivamente desoptimizados no afectarían el *fitness* viral, pero su expresión podría resultar deficiente.
- 3- Transgenes con un uso de codones similar al de los genes tardíos adenovirales permitirían obtener buenos niveles de expresión, sin impactar excesivamente en el *fitness* viral.

Los escenarios observados con los virus GFP armados en *late* serían compatibles con diversos estudios que evidencian que es necesario un uso balanceado de codones para maximizar la eficiencia de producción proteica, y que el uso de codones de genes altamente expresados afecta la eficiencia traduccional de todo el proteoma [147], [178], [206]–[210]. El estudio llevado a cabo por I. Frumkin *et al.* [178] evidencia que el uso de codones de un gen no solo tiene efectos sobre el propio gen en cuestión,

sino que también actúa en *trans*, es decir, que el uso de codones de un gen afecta a la traducción de otros debido a la economía compartida. Los autores muestran cómo la variación en la frecuencia de un solo codón en un pequeño conjunto de genes altamente expresados, es capaz de influir en la síntesis de otras proteínas del sistema, especialmente de aquellas codificadas con codones similares. Así, el uso de codones no sólo modela la expresión a nivel individual de los genes, sino la eficiencia de traducción proteica global de la célula. Asimismo, otros estudios evidencian que, en tanto que los recursos disponibles son limitados, éstos tienen que redistribuirse cada vez que nuevos genes son introducidos en la célula. Dada la redistribución de los recursos comunes, la sobreexpresión de un gen puede disminuir la expresión de otros genes [207] y afectar la tasa de crecimiento celular [208]. En esta misma línea, la sobre-expresión de proteínas heterólogas puede conllevar el secuestro de factores de traducción como los ribosomas y los ARNt [209], [210],[178].

Dadas estas evidencias bibliográficas, es coherente pensar que la competición intergénica por los recursos traduccionales sea un fenómeno extrapolable a la fase tardía de una infección viral. Incluso, es razonable pensar que esta situación se dé de forma aún más exacerbada en el escenario viral, pues en la fase tardía pos-infección la producción proteica y la explotación de recursos traduccionales alcanzan niveles máximos, difícilmente reproducibles en ninguna otra situación biológica.

5.2. Adaptar el grado de optimización de los transgenes en adenovirus armados en *late* se traduce en una mejor respuesta terapéutica: *el ejemplo de la hialuronidasa*

La hialuronidasa es una enzima cuya función es hidrolizar las moléculas de ácido hialurónico. Dado el alto contenido de ácido hialurónico presente en el estroma tumoral, la hialuronidasa reviste interés terapéutico a fin de poder remodelar dicho estroma y hacer a las células tumorales más accesibles para los tratamientos [69], [189]. En este sentido, VCN Biosciences ha desarrollado el virus VCN-01, un adenovirus oncolítico que expresa bajo el control del MLP el transgén *PH20* (codificante para una hialuronidasa humana). Tomando este virus como referencia, y en colaboración con el Dr. Ramon Alemany, en esta tesis hemos estudiado el uso de codones del transgén codificante para la hialuronidasa de abeja (más potente que la hialuronidasa humana) a fin de obtener un nuevo virus terapéutico con eficacia antitumoral mejorada.

La interferencia de los transgenes altamente optimizados con el *fitness* viral, cuando estos se expresan en la fase tardía del ciclo de replicación del virus, se observó también con el transgen *hum_BH* (CAI 0.958; GC% 84.9). No obstante, fue posible rescatar al capacidad replicativa del virus recodificando el transgén *hum-BH* hacia secuencias menos optimizadas: *apis_bb* (CAI 0.732; GC%70.8) y *adapt_bb* (CAI 0.763; GC% 65).

En cuanto a la capacidad de expresión del transgén, observamos que, a tiempos cortos pos-infección, las células infectadas con los virus HUM-BH, APIS-BH y ADAPT-BH presentaron niveles de expresión de hialuronidasa correlativos al grado de optimización de los transgenes. Así, las células infectadas con el virus HUM-BH expresaron más hialuronidasa, seguidas de las células infectadas con el virus APIS-BH y luego de las células infectadas con el virus ADAPT-BH.

Sin embargo, tras varios ciclos de replicación, y debido a las diferencias en el *fitness* viral, la capacidad de expresión de hialuronidasa varió. Por una parte, observamos que la expresión del transgén *hum-bh* se perdía, de acuerdo con la capacidad replicativa deficiente del virus HUM-BH. Por otra parte, observamos que las diferencias de expresión de hialuronidasa mostradas a tiempos cortos entre los virus ADAPT-BH y APIS-BH se diluían tras varios ciclos de replicación, reflejo de que el virus ADAPT-BH mostró un ligero mejor *fitness* viral. Teniendo en cuenta que las secuencias *apis_BH* y *adapt_BH* solo difieren en un 2%, los resultados reflejarían la gran trascendencia del uso de codones de los transgenes sobre el *fitness* viral; sugiriendo que pequeños cambios en el uso de codones de los transgenes podrían suponer grandes repercusiones sobre el *fitness* viral.

La importancia de mantener a lo largo del tiempo un balance adecuado de producción viral y de transgén a fin de optimizar el resultado terapéutico se mostró en los estudios *in vivo*. Tanto el virus APIS-BH como el virus ADAPT-BH, mostraron, en contraposición al virus HUM-BH, un buen control de la progresión tumoral; demostrándose que el beneficio terapéutico no estaría supeditado a obtener la mayor expresión posible de transgén, sino a balancear ésta con una buena actividad oncolítica. Sólo

así, resultaría posible mantener los beneficios terapéuticos derivados tanto de la oncolisis del virus como de la actividad del transgén a lo largo de los ciclos de replicación viral, y maximizar el beneficio terapéutico.

La mayor disminución del contenido en ácido hialurónico tumoral mediada por los virus APIS-BH y ADAPT-BH, así como la disminución del grado de celularidad de los tumores, se presentan como dos ventajas terapéuticas de estos virus respecto al virus VCN-01. Dada la potente actividad hidrolítica observada para los virus APIS-BH y ADAPT-BH, es posible postular que podrían tener un mayor beneficio terapéutico respecto al virus VCN-01 en un tratamiento concomitante con quimioterapia, pues facilitarían en mayor medida el acceso del tratamiento a las células tumorales.

5.3. La relación entre el uso de codones de transgenes expresados en *late* y el *fitness* adenoviral se postula como un concepto universal

Los adenovirus oncolíticos ofrecen la posibilidad de expresar sistemas suicidas de manera oncoselectiva, minimizando la afectación de tejido sano. La combinación de oncolisis y citotoxicidad mediada por sistemas de prodroga-enzimas bioconvertidoras de prodroga suponen una atractiva estrategia para abordar el tratamiento de tumores resistentes a los tratamientos convencionales. En este sentido, y en colaboración con el Dr. Jesús Fernández, en esta tesis hemos estudiado el uso de codones del

transgén codificante para la 2'desoxirribosilnucleósido transferasa de *Leishmania mexicana* (*LmPDT*) a fin de desarrollar un nuevo virus terapéutico.

Los virus armados en *late* con los transgenes *PDT* y *PDT_Adapt* mostraron una relación inversa entre el grado de optimización del transgén y la capacidad replicativa del virus, de forma similar a lo que habíamos observado anteriormente con los transgenes para GFP y hialuronidasa. Así, el virus PDT, armado con el transgén *PDT* (CAI 0.790; GC3% 76.3) presentó menor capacidad replicativa que el virus PDT-ADAPT, armado con el transgén *PDT_Adapt* (CAI 0.727; GC3% 37.2).

Dada la complejidad del sistema terapéutico abordado y aun habiendo obtenido unos primeros resultados alentadores, no ha sido posible, establecer qué uso de codones del transgén reporta mayor beneficio terapéutico global. De hecho, a la luz de los resultados obtenidos, es probable que un uso de codones intermedio entre los dos patrones estudiados (*PDT* y *PDT_Adapt*) suponga la opción más plausible para desarrollar un virus con un balance adecuado entre *fitness* viral y expresión de transgén. Así, los resultados animan a profundizar en el estudio de este virus terapéutico empleando como estrategia la adaptación del uso de codones del transgén codificante para la *LmPDT*.

En cualquier caso el ejemplo de los virus PDT nos ilustró de nuevo, con un transgén y un esqueleto adenoviral completamente distintos, la relación existente entre el contenido GC3 del transgén y su impacto en el *fitness* viral. Todos los estudios en los que comparamos virus armados con el mismo transgén pero con distinto grado de optimización, mostraron que cuanto mayor es el contenido en GC3 del transgén, mayor es su capacidad

de expresión inicial y mayor es su impacto sobre el *fitness* viral. Cabe mencionar que la correlación inversa entre el CAI de los transgenes y el *fitness* viral se mostró menos robusta, sugiriendo que el mejor parámetro de medida de la optimización para estudiar la compatibilidad de los transgenes es su contenido en GC3 (Tabla 5.1).

El hecho que se observaran efectos similares con virus generados a partir de distinto esqueletos virales (Adwt, ICO15K y AdNuPARmE1A) y con transgenes con diferencias de tamaño y función (GFP, hialuronidasa, *LmPDT*) sugiere que el fenómeno de competición intergénica por los recursos traduccionales se daría de forma universal en todos los adenovirus armados en *late*.

Transgén	Tamaño (pares de bases)	CAI	GC3%
GFP_opt	720	0,962	96,7
GFP_DEopt	717	0,809	44,8
GFP_Adapt1	720	0,860	62,1
PH20	1476	0,716	35,8
hum_BH	1149	0,958	84,9
apis_BH	1149	0,732	70,8
adapt_BH	1149	0,763	65
PDT	468	0.790	76.3
PDT_Adapt	468	0,727	37,2

Tabla 5.1|Resumen del tamaño, el valor de CAI y el porcentaje GC3 de los transgenes utilizados.

La universalidad del concepto de la competición intergénica en los adenovirus armados en *late* la avalarían también los adenovirus armados en *late* que encontramos en la bibliografía; en tanto que el grado de optimización de los transgenes se correlaciona con los datos de *fitness* viral de la misma manera que muestran nuestros resultados. Así, transgenes como la *firefly luciferasa* [142], [143], la *yCD* [144], [145], la *FUR1* [145], la *NTR* [211] o *p14FAST* [212], cuyos virus no presentan diferencias en el *fitness* y/o la citotoxicidad respecto al virus parenteral, muestran en el PCA un uso de codones similar al de los genes adenovirales tempranos. Por otro lado, el PCA de transgenes como el *cBiTE* [64] o la *TAT8-TK* [77], que impactan moderadamente sobre el *fitness* viral cuando se expresan bajo el MLP, revela que estos transgenes presentan un uso de codones más optimizado que los anteriores y similar al de los genes adenovirales tardíos. Finalmente los transgenes armados en *late* en el adenovirus NG-641 en fase de ensayos clínico (INF, CXCL10, CXCL9) presentan un uso de codones que abarca todo el espectro de los genes adenovirales tempranos (Fig. 5.3).

La ausencia en la bibliografía de resultados con virus armados con transgenes altamente optimizados corroboraría también, de forma indirecta, nuestros resultados, dado que en muchos casos las publicaciones científicas presentan un sesgo que omite resultados negativos.

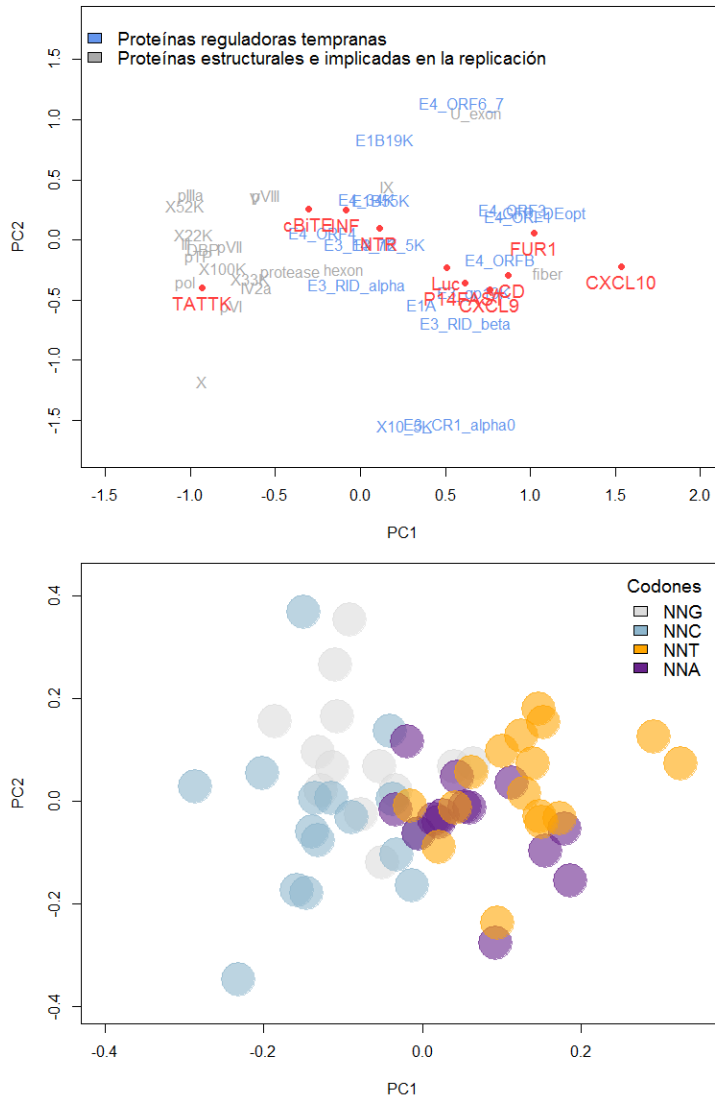


Figura 5.1| Análisis por PCA de los transgenes armados en *late* en el genoma del adenovirus reportados en la literatura.

En resumen, el conjunto de los resultados nos demuestra que existiría un margen de patrones de uso de codones más o menos amplio para el diseño de adenovirus oncolíticos armados en *late*. Este margen comprendería un uso de codones con GC3% igual o inferior al de la media de genes adenovirales tardíos, que excluiría patrones de uso de codones más optimizados que los genes adenovirales. Transgenes armados en el genoma adenoviral y expresados en fase *late*, con GC3% similares al de los genes virales tempranos no afectarían, o lo harían mínimamente, al *fitness* viral.

Por otro lado, los transgenes armados en el genoma adenoviral y expresados en fase *late* que presenten un uso de codones similar al de los genes adenovirales tardíos afectarían el *fitness* viral en una proporción inversa a su GC3%. No obstante, esta afectación podría ser compensada por el beneficio terapéutico que pueda reportar una mayor expresión del transgén asociada a su mayor optimización (Fig. 5.2).

Así dentro de este margen de contenido GC3, el grado de optimización en cada caso deberá ser matizado *ad-boc* en función de la naturaleza del transgén y de los intereses pro-virus o pro-transgén que prevalezcan para obtener el mayor beneficio terapéutico. De este modo, transgenes cuyo beneficio se obtuviera a dosis bajas, deberían diseñarse con un uso de codones sesgado hacia AT3 (similar al de los genes adenovirales tempranos) a fin de minimizar al máximo el impacto sobre el *fitness* viral. Por el contrario, transgenes cuyo aporte terapéutico dependiera de grandes niveles de expresión deberían diseñarse con un uso de codones similar al del conjunto de genes adenovirales tardíos.

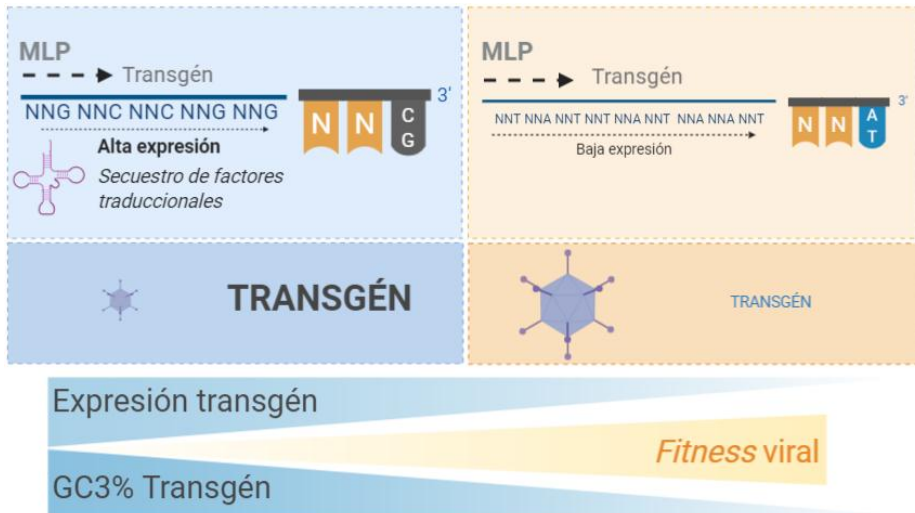


Figura 5.2 | Resumen gráfico del impacto del uso de codones de transgenes armados en el genoma adenoviral bajo el control del MLP.

Cabe considerar también que el aumento de la expresión de los transgenes mediado por mecanismos independientes al uso de codones podría tener también un impacto negativo sobre el *fitness* viral. Así, por ejemplo el uso de aceptores de *splicing* más potentes al utilizado en este trabajo, podrían suponer un efecto similar al de la optimización, pues un aumento de las moléculas de ARNm de transgén resultaría en un aumento de la presión competitiva del éste sobre los genes virales.

Por otro lado, es coherente pensar que transgenes con un uso de codones muy sesgado hacia codones particulares podrían inducir un efecto negativo sobre el virus (y sobre los propios transgenes) sin necesidad de que globalmente tuvieran un contenido muy elevado en GC3; pues, tal y como apuntan algunos estudios un solo codón excesivamente utilizado puede ser responsable del desequilibrio en el uso de los recursos

traduccionales [178]. Así, además de análisis del uso de codones relativo por aminoácido (como los PCA ilustrados) debería también contemplarse el UCA como parámetro en el diseño de adenovirus oncolíticos armados. En este sentido, estudios más profundos sobre el dinamismo del *pool* de ARNts en la condición de infección adenoviral podrían también ayudar a matizar el impacto real del uso de cada codón particular.

En su conjunto, este trabajo alude a la necesidad de profundizar en el estudio de modelos de expresión génica que contemplen la traducción simultánea de moléculas de ARNm, en lugar de focalizarse en la traducción de un solo transcrito aislado [209], [210], [213]–[215]. Los modelos de traducción simultáneos son especialmente necesarios en el caso de genes altamente expresados – como serían los genes virales-, en tanto que el consumo de recursos es mayor [216]. Comprender la expresión de los genes virales y los transgenes como un solo conjunto pueden aportarnos valiosa información que nos permita en un futuro maximizar la eficacia de la viroterapia oncolítica.

6. Conclusiones

1. El uso de codones de los transgenes armados en adenovirus tiene repercusiones distintas sobre el *fitness* viral en función de si éstos se expresan en la fase temprana o en la fase tardía pos-infección. Mientras que el uso de codones de los transgenes expresados en la fase temprana pos-infección no afecta al *fitness* viral, se observa una interferencia sobre la actividad del virus cuando éstos se expresan en la fase tardía.
2. El contenido GC3 de los transgenes expresados en la fase tardía pos-infección se correlaciona directamente con el impacto negativo que éstos refieren sobre el virus.
3. Transgenes controlados bajo el MLP con un contenido en GC3 superior al del conjunto de los genes tardíos adenovirales (como *GFP_opt*) impactan de manera negativa sobre la expresión de proteínas estructurales y sobre la capacidad replicativa del virus.

4. Transgenes altamente optimizados expresados en la fase tardía pos-infección (como *hum_BH*), no son compatibles con una buena tasa de oncolisis y una buena eficacia antitumoral.
5. La modulación del contenido de GC3 de transgenes *late* mimetizando a la media de genes adenovirales (como en el caso de *GFP_Adapt1* o *adapt_BH*), se postula como una buena estrategia para obtener un balance óptimo entre oncolisis y expresión de transgén; no obstante, cada caso deberá estudiarse de forma particular atendiendo a las características propias del transgén.
6. El conjunto de los resultados insta a incorporar el uso de codones de los transgenes terapéuticos (en términos de uso relativo y uso absoluto) como parámetro a considerar en el diseño de adenovirus oncolíticos armados.

7. Bibliografía

- [1] “Asociación Española Contra el Cáncer | AECC.” [Online]. Available: <https://www.aecc.es/es>. [Accessed: 09-Sep-2019].
- [2] “Cancer.” [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. [Accessed: 15-Dec-2019].
- [3] E. K. U. Scherf, H. (Paleanthropology, Senckenberg Center for Human Evolution and Paleoenvironment *et al.*, “Leukemia in the Neolithic—Evidence in cancellous bone of a 7,000 year old skeleton,” in *Abstracts for the “Evolutionary Medicine Conference: Interdisciplinary Perspectives on Human Health and Disease” at the University of Zurich, Switzerland (July 30–August 1, 2015)*, 2015.
- [4] “Early concepts of cancer,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 19, no. 3–4, pp. 205–207, 2000.
- [5] “Global Cancer Observatory.” [Online]. Available: <https://gco.iarc.fr/>. [Accessed: 29-Nov-2019].
- [6] “Las cifras del cáncer en España,” 2019.

- [7] “INEbase / Sociedad / Salud / Estadística de defunciones según la causa de muerte / Últimos datos.” [Online]. Available: https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736176780&menu=ultiDatos&idp=1254735573175. [Accessed: 29-Nov-2019].
- [8] “Neoplasia de páncreas - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019.” [Online]. Available: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/pancreas?start=1>. [Accessed: 15-Dec-2019].
- [9] L. Rahib, B. D. Smith, R. Aizenberg, A. B. Rosenzweig, J. M. Fleshman, and L. M. Matrisian, “Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states,” *Cancer Research*, vol. 74, no. 11. American Association for Cancer Research Inc., pp. 2913–2921, 01-Jun-2014.
- [10] “Cáncer de páncreas: Introducción | Cancer.Net.” [Online]. Available: <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cancer/cancer-de-pancreas/introduccion>. [Accessed: 16-Dec-2019].
- [11] E. C. Vaquero and A. Castells, “Tumores malignos del páncreas.”
- [12] P. Bretcha *et al.*, “SIGNOS Y SÍNTOMAS en el CÁNCER DE PÁNCREAS.”
- [13] S. Jones *et al.*, “Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses,” *Science (80-.)*, vol. 321, no. 5897, pp. 1801–1806, Sep. 2008.
- [14] T. Cancer Genome Atlas Research Network *et al.*, “Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma,” 2017.

- [15] A. K. Witkiewicz *et al.*, “Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets,” *Nat. Commun.*, vol. 6, Apr. 2015.
- [16] N. Waddell *et al.*, “Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer,” *Nature*, vol. 518, no. 7540, pp. 495–501, Feb. 2015.
- [17] P. Bailey *et al.*, “Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer,” *Nature*, vol. 531, no. 7592, pp. 47–52, Mar. 2016.
- [18] E. A. Collisson, P. Bailey, D. K. Chang, and A. V. Biankin, “Molecular subtypes of pancreatic cancer,” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, vol. 16, no. 4. Nature Publishing Group, pp. 207–220, 01-Apr-2019.
- [19] “Esperanza de vida del Cáncer de Páncreas | AECC.” [Online]. Available: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-pancreas/pronostico>. [Accessed: 29-Nov-2019].
- [20] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, “Cancer statistics, 2019,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 69, no. 1, pp. 7–34, Jan. 2019.
- [21] “Cancer of the Pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines | ESMO.” [Online]. Available: <https://www.esmo.org/Guidelines/Gastrointestinal-Cancers/Cancer-of-the-Pancreas>. [Accessed: 29-Nov-2019].
- [22] J. P. Neoptolemos, J. Kleeff, P. Michl, E. Costello, W. Greenhalf, and D. H. Palmer, “Therapeutic developments in pancreatic cancer: Current and future perspectives,” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, vol. 15, no. 6. Nature Publishing Group, pp. 333–348, 01-Jun-2018.
- [23] I. R. Eissa *et al.*, “The current status and future prospects of oncolytic

viruses in clinical trials against melanoma, glioma, pancreatic, and breast cancers,” *Cancers*, vol. 10, no. 10. MDPI AG, 01-Oct-2018.

- [24] M. Erkan *et al.*, “The role of stroma in pancreatic cancer: Diagnostic and therapeutic implications,” *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, vol. 9, no. 8. pp. 454–467, Aug-2012.
- [25] A. Neesse, H. Algül, D. A. Tuveson, and T. M. Gress, “Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: A changing paradigm,” *Gut*, vol. 64, no. 9, pp. 1476–1484, Sep. 2015.
- [26] J. Kleeff *et al.*, “Pancreatic cancer microenvironment,” *Int. J. Cancer*, vol. 121, no. 4, pp. 699–705, Aug. 2007.
- [27] M. G. Bachem *et al.*, “Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells,” *Gastroenterology*, vol. 128, no. 4, pp. 907–921, 2005.
- [28] J. Watt and H. M. Kocher, “The desmoplastic stroma of pancreatic cancer is a barrier to immune cell infiltration,” *Oncoimmunology*, vol. 2, no. 12, 2013.
- [29] J. L. Carstens *et al.*, “Spatial computation of intratumoral T cells correlates with survival of patients with pancreatic cancer,” *Nat. Commun.*, vol. 8, 2017.
- [30] S. J. Turley, V. Cremasco, and J. L. Astarita, “Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 15, no. 11. Nature Publishing Group, pp. 669–682, 01-Nov-2015.
- [31] T. Tsujikawa *et al.*, “Quantitative Multiplex Immunohistochemistry

- Reveals Myeloid-Inflamed Tumor-Immune Complexity Associated with Poor Prognosis,” *Cell Rep.*, vol. 19, no. 1, pp. 203–217, Apr. 2017.
- [32] M. Falasca, M. Kim, and I. Casari, “Pancreatic cancer: Current research and future directions,” *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, vol. 1865, no. 2. Elsevier, pp. 123–132, 01-Apr-2016.
- [33] S. Chouaib, M. Z. Noman, K. Kosmatopoulos, and M. A. Curran, “Hypoxic stress: Obstacles and opportunities for innovative immunotherapy of cancer,” *Oncogene*, vol. 36, no. 4, pp. 439–445, Jan. 2017.
- [34] S. Mariathasan *et al.*, “TGF β attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells,” *Nature*, vol. 554, no. 7693, pp. 544–548, Feb. 2018.
- [35] R. Kalluri, “The biology and function of fibroblasts in cancer,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 16, no. 9. Nature Publishing Group, pp. 582–598, 01-Sep-2016.
- [36] D. R. Principe *et al.*, “TGF β signaling in the pancreatic tumor microenvironment promotes fibrosis and immune evasion to facilitate tumorigenesis,” *Cancer Res.*, vol. 76, no. 9, pp. 2525–2539, May 2016.
- [37] V. Bronte, P. Serafini, A. Mazzoni, D. M. Segal, and P. Zanovello, “L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions.”
- [38] G. L. Beatty *et al.*, “Exclusion of T Cells From Pancreatic Carcinomas in Mice Is Regulated by Ly6Clow F4/80+ Extratumoral Macrophages,” *Gastroenterology*, vol. 149, no. 1, pp. 201–210, Jul. 2015.
- [39] E. Tan and B. El-Rayes, “Pancreatic Cancer and Immunotherapy:

- Resistance Mechanisms and Proposed Solutions,” *Journal of Gastrointestinal Cancer*, vol. 50, no. 1. Humana Press Inc., 15-Mar-2019.
- [40] G. L. Beatty, S. Eghbali, and R. Kim, “Deploying Immunotherapy in Pancreatic Cancer: Defining Mechanisms of Response and Resistance,” *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.*, no. 37, pp. 267–278, May 2017.
- [41] R. A. Skelton, A. Javed, L. Zheng, and J. He, “Overcoming the resistance of pancreatic cancer to immune checkpoint inhibitors,” *Journal of Surgical Oncology*, vol. 116, no. 1. John Wiley and Sons Inc., pp. 55–62, 01-Jul-2017.
- [42] D. T. Le *et al.*, “PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 372, no. 26, pp. 2509–2520, Jun. 2015.
- [43] S. J. Russell, K.-W. Peng, and J. C. Bell, “Oncolytic virotherapy,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 30, no. 7, pp. 658–70, Jul. 2012.
- [44] K. Harrington, D. J. Freeman, B. Kelly, J. Harper, and J. C. Soria, “Optimizing oncolytic virotherapy in cancer treatment,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 18, no. 9. Nature Publishing Group, pp. 689–706, 01-Sep-2019.
- [45] M. L. Hennessy, P. K. Bommareddy, G. Boland, and H. L. Kaufman, “Oncolytic Immunotherapy,” *Surgical Oncology Clinics of North America*, vol. 28, no. 3. W.B. Saunders, pp. 419–430, 01-Jul-2019.
- [46] A. Melcher, K. Parato, C. M. Rooney, and J. C. Bell, “Thunder and lightning: Immunotherapy and oncolytic viruses collide,” *Molecular Therapy*, vol. 19, no. 6. Nature Publishing Group, pp. 1008–1016, 2011.
- [47] P. K. Bommareddy, M. Shettigar, and H. L. Kaufman, “Integrating

- oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy,” *Nat. Rev. Immunol.*, pp. 1–16, May 2018.
- [48] S. E. Lawler, M. C. Speranza, C. F. Cho, and E. A. Chiocca, “Oncolytic viruses in cancer treatment a review,” *JAMA Oncology*, vol. 3, no. 6. American Medical Association, pp. 841–849, 01-Jun-2017.
- [49] J. Raja, J. M. Ludwig, S. N. Gettinger, K. A. Schalper, and H. S. Kim, “Oncolytic virus immunotherapy: Future prospects for oncology 11 Medical and Health Sciences 1107 Immunology 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis,” *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, vol. 6, no. 1. BioMed Central Ltd., 04-Dec-2018.
- [50] “Search of: oncolytic virus | cancer - List Results - ClinicalTrials.gov.” [Online]. Available: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=cancer&term=oncolytic+viru s&cntry=&state=&city=&dist=>. [Accessed: 03-Dec-2019].
- [51] G. Fulci and E. A. Chiocca, “Oncolytic viruses for the therapy of brain tumors and other solid malignancies: A review,” *Frontiers in Bioscience*, vol. 8. 2003.
- [52] N. Kemeny *et al.*, “Phase I, open-label, dose-escalating study of a genetically engineered herpes simplex virus, NV1020, in subjects with metastatic colorectal carcinoma to the liver,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 17, no. 12, pp. 1214–1224, Dec. 2006.
- [53] J. P. Machiels *et al.*, “A phase 1 dose escalation study of the oncolytic adenovirus enadenotucirev, administered intravenously to patients with epithelial solid tumors (EVOLVE),” *J. Immunother. Cancer*, vol. 7, no. 1, Jan. 2019.

- [54] J. J. Cody and J. T. Douglas, “Armed replicating adenoviruses for cancer virotherapy,” *Cancer Gene Ther.*, vol. 16, no. 6, pp. 473–488, Jun. 2009.
- [55] P. Bhattacharya *et al.*, “Dual Role of GM-CSF as a Pro-Inflammatory and a Regulatory Cytokine: Implications for Immune Therapy,” *Journal of Interferon and Cytokine Research*, vol. 35, no. 8. Mary Ann Liebert Inc., pp. 585–599, 01-Aug-2015.
- [56] J. Li, M. O’Malley, P. Sampath, P. Kalinski, D. L. Bartlett, and S. H. Thorne, “Expression of CCL19 from oncolytic vaccinia enhances immunotherapeutic potential while maintaining oncolytic activity,” *Neoplasia (United States)*, vol. 14, no. 12, pp. 1115–1121, 2012.
- [57] N. Nishio *et al.*, “Armed oncolytic virus enhances immune functions of chimeric antigen receptor-modified T cells in solid tumors,” *Cancer Res.*, vol. 74, no. 18, pp. 5195–5205, Jul. 2014.
- [58] A. Rosewell Shaw and M. Suzuki, “Recent advances in oncolytic adenovirus therapies for cancer,” *Curr. Opin. Virol.*, vol. 21, pp. 9–15, 2016.
- [59] A. Rosewell Shaw and M. Suzuki, “Oncolytic Viruses Partner With T-Cell Therapy for Solid Tumor Treatment,” *Frontiers in immunology*, vol. 9. NLM (Medline), p. 2103, 2018.
- [60] A. Wing *et al.*, “Improving CART-cell therapy of solid tumors with oncolytic virus-driven production of a bispecific T-cell engager,” *Cancer Immunol. Res.*, vol. 6, no. 5, pp. 605–616, May 2018.
- [61] T. Speck *et al.*, “Targeted bite expression by an oncolytic vector augments therapeutic efficacy against solid tumors,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 24, no. 9, pp. 2128–2137, May 2018.

- [62] J. de Sostoa, C. A. Fajardo, R. Moreno, M. D. Ramos, M. Farrera-Sal, and R. Alemany, "Targeting the tumor stroma with an oncolytic adenovirus secreting a fibroblast activation protein-targeted bispecific T-cell engager," *J. Immunother. Cancer*, vol. 7, no. 1, p. 19, Dec. 2019.
- [63] J. D. Freedman *et al.*, "Oncolytic adenovirus expressing bispecific antibody targets T- cell cytotoxicity in cancer biopsies," *EMBO Mol. Med.*, vol. 9, no. 8, pp. 1067–1087, Aug. 2017.
- [64] C. A. Fajardo *et al.*, "Oncolytic adenoviral delivery of an EGFR-targeting t-cell engager improves antitumor efficacy," *Cancer Res.*, vol. 77, no. 8, pp. 2052–2063, Apr. 2017.
- [65] C. E. Engeland *et al.*, "CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy," *Mol. Ther.*, vol. 22, no. 11, pp. 1949–1959, Aug. 2014.
- [66] C. Passaro *et al.*, "Arming an oncolytic herpes simplex virus type 1 with a single-chain fragment variable antibody against PD-1 for experimental glioblastoma therapy," *Clin. Cancer Res.*, vol. 25, no. 1, pp. 290–299, Jan. 2019.
- [67] A. Ene-Obong *et al.*, "Activated pancreatic stellate cells sequester CD8+ T cells to reduce their infiltration of the juxtatumoral compartment of pancreatic ductal adenocarcinoma," *Gastroenterology*, vol. 145, no. 5, pp. 1121–1132, 2013.
- [68] M. Loeffler, J. A. Krüger, A. G. Niethammer, and R. A. Reisfeld, "Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake," *J. Clin. Invest.*, vol. 116, no. 7, pp. 1955–1962, Jul. 2006.

- [69] A. Rodríguez-García *et al.*, “Safety and efficacy of VCN-01, an oncolytic adenovirus combining fiber HSG-binding domain replacement with RGD and hyaluronidase expression.,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 21, no. 6, pp. 1406–18, Mar. 2015.
- [70] B. Vera *et al.*, “Characterization of the Antiglioma Effect of the Oncolytic Adenovirus VCN-01,” *PLoS One*, vol. 11, no. 1, p. e0147211, 2016.
- [71] G. Pascual-Pasto *et al.*, “Therapeutic targeting of the RB1 pathway in retinoblastoma with the oncolytic adenovirus VCN-01.,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 11, no. 476, p. eaat9321, Jan. 2019.
- [72] M. Garcia-Moure *et al.*, “The oncolytic adenovirus VCN-01 promotes anti-tumor effect in primitive neuroectodermal tumor models,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019.
- [73] S. Y. Lee, H. R. Park, J. Rhee, Y. M. Park, and S. H. Kim, “Therapeutic effect of oncolytic adenovirus expressing relaxin in radioresistant oral squamous cell carcinoma,” *Oncol. Res.*, vol. 20, no. 9, pp. 419–425, 2013.
- [74] K. H. Jung *et al.*, “Oncolytic adenovirus expressing relaxin (YDC002) enhances therapeutic efficacy of gemcitabine against pancreatic cancer,” *Cancer Lett.*, vol. 396, pp. 155–166, Jun. 2017.
- [75] H. Zhao *et al.*, “Oncolytic Adenovirus rAd.DCN Inhibits Breast Tumor Growth and Lung Metastasis in an Immune-Competent Orthotopic Xenograft Model,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 30, no. 2, pp. 197–210, Feb. 2019.
- [76] J. D. Dias *et al.*, “Targeted chemotherapy for head and neck cancer with a chimeric oncolytic adenovirus coding for bifunctional suicide protein FCU1,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 16, no. 9, pp. 2540–2549, May 2010.

- [77] D. Abate-Daga *et al.*, “Oncolytic adenoviruses armed with thymidine kinase can be traced by PET imaging and show potent antitumoural effects by ganciclovir dosing,” *PLoS One*, vol. 6, no. 10, p. e26142, 2011.
- [78] S. O. Freytag, K. N. Barton, and Y. Zhang, “Efficacy of oncolytic adenovirus expressing suicide genes and interleukin-12 in preclinical model of prostate cancer,” *Gene Ther.*, vol. 20, no. 12, pp. 1131–9, Dec. 2013.
- [79] K. Garber, “China Approves World’s First Oncolytic Virus Therapy For Cancer Treatment,” *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 98, no. 5, pp. 298–300, Mar. 2006.
- [80] H. Rehman, A. W. Silk, M. P. Kane, and H. L. Kaufman, “Into the clinic: Talimogene laherparepvec (T-VEC), a first-in-class intratumoral oncolytic viral therapy,” *J. Immunother. Cancer*, vol. 4, no. 1, Sep. 2016.
- [81] “Search of: Oncolytic AND Adenovirus | cancer - List Results - ClinicalTrials.gov.” [Online]. Available: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=cancer&term=Oncolytic+AND+Adenovirus&cntry=&state=&city=&dist=>. [Accessed: 22-Jan-2018].
- [82] S. Khanal, P. Ghimire, and A. S. Dhamoon, “The repertoire of adenovirus in human disease: The innocuous to the deadly,” *Biomedicines*, vol. 6, no. 1. MDPI AG, 01-Mar-2018.
- [83] S. Luisoni and U. F. Greber, “Biology of Adenovirus Cell Entry: Receptors, Pathways, Mechanisms,” in *Adenoviral Vectors for Gene Therapy: Second Edition*, Elsevier Inc., 2016, pp. 27–58.
- [84] W. P. Rowe, R. J. Huebner, L. K. Gilmore, R. H. Parrott, and T. G.

- Ward, "Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture," *Exp. Biol. Med.*, vol. 84, no. 3, pp. 570–573, Dec. 1953.
- [85] *Fenner's Veterinary Virology*. Elsevier, 2017.
- [86] "Adenoviridae," in *Virus Taxonomy*, Elsevier, 2012, pp. 125–141.
- [87] "Fenner and White's Medical Virology | ScienceDirect." [Online]. Available:
<https://www.sciencedirect.com/book/9780123751560/fenner-and-whites-medical-virology>. [Accessed: 04-Dec-2019].
- [88] B. Harrach, "Adenoviruses: General Features ☆," in *Reference Module in Biomedical Sciences*, Elsevier, 2014.
- [89] W. C. Russell, "Adenoviruses: Update on structure and function," *Journal of General Virology*, vol. 90, no. 1, pp. 1–20, 2009.
- [90] A. J. Davison, M. Benko, and B. Harrach, "Genetic content and evolution of adenoviruses," *Journal of General Virology*, vol. 84, no. 11, pp. 2895–2908, Nov-2003.
- [91] A. E. Tollefson, B. Ying, K. Doronin, P. D. Sidor, and W. S. M. Wold, "Identification of a New Human Adenovirus Protein Encoded by a Novel Late 1-Strand Transcription Unit," *J. Virol.*, vol. 81, no. 23, pp. 12918–12926, Dec. 2007.
- [92] B. Ying, A. E. Tollefson, and W. S. M. Wold, "Identification of a Previously Unrecognized Promoter That Drives Expression of the UXP Transcription Unit in the Human Adenovirus Type 5 Genome," *J. Virol.*, vol. 84, no. 21, pp. 11470–11478, Nov. 2010.

- [93] P. Lutz and C. Keding, "Properties of the adenovirus IVa2 gene product, an effector of late-phase-dependent activation of the major late promoter," *J. Virol.*, vol. 70, no. 3, pp. 1396–405, Mar. 1996.
- [94] R. J. Parks, "Adenovirus protein IX: A new look at an old protein," *Molecular Therapy*, vol. 11, no. 1, pp. 19–25, Jan-2005.
- [95] G. Akusjarvi and H. Persson, "Controls of RNA splicing and termination in the major late adenovirus transcription unit," *Nature*, vol. 292, no. 5822, pp. 420–426, 1981.
- [96] S. Larsson, C. Svensson, and G. Akusjärvi, "Control of adenovirus major late gene expression at multiple levels," *J. Mol. Biol.*, vol. 225, no. 2, pp. 287–298, May 1992.
- [97] G. Paul Thomas and M. B. Mathews, "DNA replication and the early to late transition in adenovirus infection," *Cell*, vol. 22, no. 2, pp. 523–533, 1980.
- [98] M. Källsten *et al.*, "Temporal characterization of the non-structural Adenovirus type 2 proteome and phosphoproteome using high-resolving mass spectrometry ARTICLE IN F O," 2017.
- [99] J. M. Bergelson *et al.*, "Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5," *Science (80-.)*, vol. 275, no. 5304, pp. 1320–1323, Feb. 1997.
- [100] M. C. Bewley, K. Springer, Y. B. Zhang, P. Freimuth, and J. M. Flanagan, "Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR," *Science (80-.)*, vol. 286, no. 5444, pp. 1579–1583, Nov. 1999.

- [101] T. J. Wickham, P. Mathias, D. A. Cheresch, and G. R. Nemerow, "Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment.," *Cell*, vol. 73, no. 2, pp. 309–19, Apr. 1993.
- [102] S. C. Stevenson, M. Rollence, B. White, L. Weaver, and A. McClelland, "Human adenovirus serotypes 3 and 5 bind to two different cellular receptors via the fiber head domain.," *J. Virol.*, vol. 69, no. 5, pp. 2850–7, May 1995.
- [103] O. Meier and U. F. Greber, "Adenovirus endocytosis," *Journal of Gene Medicine*, vol. 6, no. SUPPL. 1. Feb-2004.
- [104] M. Y. Nakano, K. Boucke, M. Suomalainen, R. P. Stidwill, and U. F. Greber, "The First Step of Adenovirus Type 2 Disassembly Occurs at the Cell Surface, Independently of Endocytosis and Escape to the Cytosol," *J. Virol.*, vol. 74, no. 15, pp. 7085–7095, Aug. 2000.
- [105] K. H. Bremner, J. Scherer, J. Yi, M. Vershinin, S. P. Gross, and R. B. Vallee, "Adenovirus Transport via Direct Interaction of Cytoplasmic Dynein with the Viral Capsid Hexon Subunit," *Cell Host Microbe*, vol. 6, no. 6, pp. 523–535, Dec. 2009.
- [106] U. F. Greber, M. Suomalainen, R. P. Stidwill, K. Boucke, M. W. Ebersold, and A. Helenius, "The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry," *EMBO J.*, vol. 16, no. 19, pp. 5998–6007, 1997.
- [107] "Gene Therapy and Cancer Research Focus - Rebecca N. Campbell - Google Libres." [Online]. Available: https://books.google.es/books?id=S3MJ_EJ74I8C&pg=PA57&lpq=PA57&dq=adenovirus+e1a+forces+cell+entry+in+s+phase&source=bl&ots=fe_wd2fuaP&sig=ACfU3U0GqceFnM4mfiCHFB_F9IIjrO2dggw&chl

=ca&sa=X&ved=2ahUKEwi6pc3Z-
OLmAhVSUxoKHTwaCs4Q6AEwBXoECAoQAQ#v=onepage&q=ad
enovirus e1a forces cell entry in s phase&f=false. [Accessed: 01-Jan-
2020].

- [108] A. E. Tollefson, A. Scaria, T. W. Hermiston, J. S. Ryerse, L. J. Wold, and W. S. Wold, “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.*, vol. 70, no. 4, pp. 2296–306, Apr. 1996.
- [109] D. L. Lichtenstein, K. Toth, K. Doronin, A. E. Tollefson, and W. S. M. Wold, “Functions and mechanisms of action of the adenovirus E3 proteins,” *International Reviews of Immunology*, vol. 23, no. 1–2. Taylor and Francis Ltd., pp. 75–111, 2004.
- [110] H. G. Burgert, J. L. Maryanski, and S. Kvist, “E3/19K’ protein of adenovirus’ type 2 inhibits lysis of cytolytic T lymphocytes by blocking cell-surface expression of histocompatibility class I antigens,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 5, pp. 1356–1360, 1987.
- [111] M. Sester, Z. Ruzsics, E. Mackley, and H.-G. Burgert, “The transmembrane domain of the adenovirus E3/19K protein acts as an endoplasmic reticulum retention signal and contributes to intracellular sequestration of major histocompatibility complex class I molecules,” *J. Virol.*, vol. 87, no. 11, pp. 6104–17, Jun. 2013.
- [112] A. L. McNees, C. T. Garnett, and L. R. Gooding, “The Adenovirus E3 RID Complex Protects Some Cultured Human T and B Lymphocytes from Fas-Induced Apoptosis,” *J. Virol.*, vol. 76, no. 19, pp. 9716–9723, Oct. 2002.

- [113] D. L. Lichtenstein, K. Doronin, K. Toth, M. Kuppuswamy, W. S. M. Wold, and A. E. Tollefson, “Adenovirus E3-6.7K protein is required in conjunction with the E3-RID protein complex for the internalization and degradation of TRAIL receptor 2,,” *J. Virol.*, vol. 78, no. 22, pp. 12297–307, Nov. 2004.
- [114] G. Chinnadurai, “Control of apoptosis by human adenovirus genes,” *Semin. Virol.*, vol. 8, no. 5, pp. 399–408, 1998.
- [115] E. White, “Regulation of apoptosis by adenovirus E1A and E1B oncogenes,” *Semin. Virol.*, vol. 8, no. 6, pp. 505–513, 1998.
- [116] E. R. A. Oliveira and M. Bouvier, “Immune evasion by Adenoviruses: a window into host-virus adaptation,,” *FEBS Lett.*, Nov. 2019.
- [117] R. C. Hoeben and T. G. Uil, “Adenovirus DNA replication,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, no. 3, Mar. 2013.
- [118] J. Logan and T. Shenk, “Adenovirus tripartite leader sequence enhances translation of mRNAs late after infection,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 81, no. 12 I, pp. 3655–3659, 1984.
- [119] W. Huang and S. J. Flint, “The tripartite leader sequence of subgroup C adenovirus major late mRNAs can increase the efficiency of mRNA export,,” *J. Virol.*, vol. 72, no. 1, pp. 225–35, Jan. 1998.
- [120] Q. Xi, R. Cuesta, and R. J. Schneider, “Regulation of Translation by Ribosome Shunting through Phosphotyrosine-Dependent Coupling of Adenovirus Protein 100k to Viral mRNAs,” *J. Virol.*, vol. 79, no. 9, pp. 5676–5683, May 2005.
- [121] R. Cuesta, Q. Xi, and R. J. Schneider, “Structural basis for competitive

- inhibition of eIF4G-Mnk1 interaction by the adenovirus 100-kilodalton protein.," *J. Virol.*, vol. 78, no. 14, pp. 7707–16, Jul. 2004.
- [122] D. C. Farley, J. L. Brown, and K. N. Leppard, "Activation of the Early-Late Switch in Adenovirus Type 5 Major Late Transcription Unit Expression by L4 Gene Products," *J. Virol.*, vol. 78, no. 4, pp. 1782–1791, Feb. 2004.
- [123] H. Zhao, M. Chen, and U. Pettersson, "A new look at adenovirus splicing," *Virology*, vol. 456–457, no. 1, pp. 329–341, 2014.
- [124] P. Ostapchuk and P. Hearing, "Control of adenovirus packaging," *J. Cell. Biochem.*, vol. 96, no. 1, pp. 25–35, Sep. 2005.
- [125] Y. S. Ahi *et al.*, "Adenoviral E4 34K protein interacts with virus packaging components and may serve as the putative portal," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, Dec. 2017.
- [126] Y. S. Ahi and S. K. Mittal, "Components of adenovirus genome packaging," *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, no. SEP. Frontiers Research Foundation, 23-Sep-2016.
- [127] H. Wodrich, T. Guan, G. Cingolani, D. Von Seggern, G. Nemerow, and L. Gerace, "Switch from capsid protein import to adenovirus assembly by cleavage of nuclear transport signals," *EMBO J.*, vol. 22, no. 23, pp. 6245–6255, Dec. 2003.
- [128] A. J. Bett, L. Prevec, and F. L. Graham, "Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors.," *J. Virol.*, vol. 67, no. 10, pp. 5911–21, Oct. 1993.
- [129] A. Danielsson, H. Dzovic, B. Nilsson, and M. Essand, "Increased

- therapeutic efficacy of the prostate-specific oncolytic adenovirus Ad[I/PPT-E1A] by reduction of the insulator size and introduction of the full-length E3 region,” *Cancer Gene Ther.*, vol. 15, no. 4, pp. 203–213, Apr. 2008.
- [130] D. C. Yu, Y. Chen, M. Seng, J. Dilley, and D. R. Henderson, “The addition of adenovirus type 5 region E3 enables calydon virus 787 to eliminate distant prostate tumor xenografts,” *Cancer Res.*, vol. 59, no. 17, pp. 4200–3, Sep. 1999.
- [131] M. Zhu *et al.*, “Linked tumor-selective virus replication and transgene expression from E3-containing oncolytic adenoviruses,” *J. Virol.*, vol. 79, no. 9, pp. 5455–65, May 2005.
- [132] K. Suzuki, R. Alemany, M. Yamamoto, and D. T. Curiel, “The presence of the adenovirus E3 region improves the oncolytic potency of conditionally replicative adenoviruses,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 8, no. 11, pp. 3348–59, Nov. 2002.
- [133] M. Robinson *et al.*, “Comparison of the E3 and L3 regions for arming oncolytic adenoviruses to achieve a high level of tumor-specific transgene expression,” *Cancer Gene Ther.*, vol. 15, no. 1, pp. 9–17, Jan. 2008.
- [134] K. L. Zhang *et al.*, “Efficacy of a new oncolytic adenovirus armed with IL-13 against oral carcinoma models,” *Onco. Targets. Ther.*, vol. 12, pp. 6515–6523, 2019.
- [135] Y. Rivera-Molina *et al.*, “GITRL-armed Delta-24-RGD oncolytic adenovirus prolongs survival and induces anti-glioma immune memory,” *Neuro-Oncology Adv.*, vol. 1, no. 1, May 2019.
- [136] H. Gao, X. Zhang, Y. Ding, R. Qiu, Y. Hong, and W. Chen, “Synergistic

- Suppression Effect on Tumor Growth of Colorectal Cancer by Combining Radiotherapy With a TRAIL-Armed Oncolytic Adenovirus,” *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 18, Jan. 2019.
- [137] Q. Wang, M. Yang, Y. Zhang, L. Zhong, and X. Zheng, “Novel Combination Oncolytic Adenoviral Gene Therapy Armed with Dm-dNK and CD40L for Breast Cancer,” *Curr. Gene Ther.*, vol. 19, no. 1, pp. 54–65, May 2019.
- [138] R. Havunen *et al.*, “Abscopal Effect in Non-injected Tumors Achieved with Cytokine-Armed Oncolytic Adenovirus,” *Mol. Ther. - Oncolytics*, vol. 11, pp. 109–121, Dec. 2018.
- [139] W. Xie, J. Hao, K. Zhang, X. Fang, and X. Liu, “Adenovirus armed with VGLL4 selectively kills hepatocellular carcinoma with G2/M phase arrest and apoptosis promotion,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 503, no. 4, pp. 2758–2763, Sep. 2018.
- [140] V. Cervera-Carrascon *et al.*, “TNF α and IL-2 armed adenoviruses enable complete responses by anti-PD-1 checkpoint blockade,” *Oncoimmunology*, vol. 7, no. 5, p. e1412902, May 2018.
- [141] F. Jin, P. J. Kretschmer, and T. W. Hermiston, “Identification of novel insertion sites in the Ad5 genome That utilize the Ad splicing machinery for therapeutic gene expression,” *Mol. Ther.*, vol. 12, no. 6, pp. 1052–1063, Dec. 2005.
- [142] A. A. Rivera *et al.*, “Mode of transgene expression after fusion to early or late viral genes of a conditionally replicating adenovirus via an optimized internal ribosome entry site in vitro and in vivo,” *Virology*, vol. 320, no. 1, pp. 121–134, Mar. 2004.

- [143] J. E. Carette, H. C. A. Graat, F. H. E. Schagen, M. A. I. Abou El Hassan, W. R. Gerritsen, and V. W. van Beusechem, “Replication-dependent transgene expression from a conditionally replicating adenovirus via alternative splicing to a heterologous splice-acceptor site,” *J. Gene Med.*, vol. 7, no. 8, pp. 1053–1062, 2005.
- [144] C. Fuerer and R. Iggo, “5-Fluorocytosine increases the toxicity of Wnt-targeting replicating adenoviruses that express cytosine deaminase as a late gene,” *Gene Therapy*, vol. 11, no. 2, pp. 142–151, Jan-2004.
- [145] C. Quirin *et al.*, “Selectivity and Efficiency of Late Transgene Expression by Transcriptionally Targeted Oncolytic Adenoviruses Are Dependent on the Transgene Insertion Strategy,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 22, no. 4, pp. 389–404, Apr. 2011.
- [146] N. Marino *et al.*, “Development of a versatile oncolytic virus platform for local intra-tumoural expression of therapeutic transgenes,” *PLoS One*, vol. 12, no. 5, May 2017.
- [147] E. Villanueva *et al.*, “Codon optimization of the adenoviral fiber negatively impacts structural protein expression and viral fitness,” *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 27546, Jun. 2016.
- [148] F. H. CRICK, “On protein synthesis,” *Symp. Soc. Exp. Biol.*, vol. 12, pp. 138–163, 1958.
- [149] F. H. C. Crick, L. Barnett, S. Brenner, and R. J. Watts-Tobin, “General nature of the genetic code for proteins,” *Nature*, vol. 192, no. 4809, pp. 1227–1232, 1961.
- [150] “Translation: DNA to mRNA to Protein | Learn Science at Scitable.” [Online]. Available:

- <https://www.nature.com/scitable/topicpage/translation-dna-to-mrna-to-protein-393/>. [Accessed: 08-Jan-2020].
- [151] “ribosome” | Learn Science at Scitable.” [Online]. Available: <https://www.nature.com/scitable/definition/ribosome-194/>. [Accessed: 08-Jan-2020].
- [152] V. H. B. Serrão, I. R. Silva, M. T. A. da Silva, J. F. Scortecci, A. de Freitas Fernandes, and O. H. Thiemann, “The unique tRNA^{Sec} and its role in selenocysteine biosynthesis,” *Amino Acids*, vol. 50, no. 9. Springer-Verlag Wien, pp. 1145–1167, 01-Sep-2018.
- [153] G. Srinivasan, C. M. James, and J. A. Krzycki, “Pyrrolysine encoded by UAG in archaea: Charging of a UAG-decoding specialized tRNA,” *Science (80-.)*, vol. 296, no. 5572, pp. 1459–1462, May 2002.
- [154] O. Namy *et al.*, “Adding pyrrolysine to the *Escherichia coli* genetic code,” *FEBS Lett.*, vol. 581, no. 27, pp. 5282–5288, Nov. 2007.
- [155] “Ilustración de vector de código genético BW | Vectores de dominio público.” [Online]. Available: <https://publicdomainvectors.org/es/vectoriales-gratuitas/Ilustración-de-vector-de-código-genético-BW/30821.html>. [Accessed: 23-Jan-2020].
- [156] J. D. Watson and F. H. C. Crick, “Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid,” *Nature*, vol. 171, no. 4356, pp. 737–738, 1953.
- [157] P. F. Agris, F. A. P. Vendéix, and W. D. Graham, “tRNA’s Wobble Decoding of the Genome: 40 Years of Modification,” *Journal of Molecular Biology*, vol. 366, no. 1. pp. 1–13, 09-Feb-2007.

- [158] C. Chan, P. Pham, P. C. Dedon, and T. J. Begley, “Lifestyle modifications: coordinating the tRNA epitranscriptome with codon bias to adapt translation during stress responses,” *Genome Biol.*, vol. 19, no. 1, p. 228, Dec. 2018.
- [159] A. Weixlbaumer *et al.*, “Mechanism for expanding the decoding capacity of transfer RNAs by modification of uridines,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 14, no. 6, pp. 498–502, Jun. 2007.
- [160] R. Grantham, C. Gautier, M. Gouy, R. Mercier, and A. Pavé, “Codon catalog usage and the genome hypothesis,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 8, no. 1, p. 197, Jan. 1980.
- [161] P. M. Sharp and W. H. Li, “The codon adaptation index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 15, no. 3, pp. 1281–1295, Feb. 1987.
- [162] “Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay.” [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6594389/>. [Accessed: 13-Dec-2019].
- [163] T. Ikemura, “Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: A proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system,” *J. Mol. Biol.*, vol. 151, no. 3, pp. 389–409, Sep. 1981.
- [164] S. Kanaya, Y. Yamada, Y. Kudo, and T. Ikemura, “Studies of codon usage and tRNA genes of 18 unicellular organisms and quantification of *Bacillus subtilis* tRNAs: Gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis,” *Gene*, vol. 238,

- no. 1, pp. 143–155, Sep. 1999.
- [165] E. N. Moriyama and J. R. Powell, “Codon usage bias and tRNA abundance in *Drosophila*,” *J. Mol. Evol.*, vol. 45, no. 5, pp. 514–523, 1997.
- [166] L. Duret, “tRNA gene number and codon usage in the *C. elegans* genome are co-adapted for optimal translation of highly expressed genes,” *Trends Genet.*, vol. 16, no. 7, pp. 287–289, Jul. 2000.
- [167] M. Dos Reis, R. Savva, and L. Wernisch, “Solving the riddle of codon usage preferences: a test for translational selection.”
- [168] R. Sabi and T. Tuller, “Modelling the efficiency of codon-tRNA interactions based on codon usage bias,” *DNA Res.*, vol. 21, no. 5, pp. 511–26, Oct. 2014.
- [169] F. Hia *et al.*, “Codon bias confers stability to human mRNA s,” *EMBO Rep.*, Sep. 2019.
- [170] M. Frenkel-Morgenstern *et al.*, “Genes adopt non-optimal codon usage to generate cell cycle-dependent oscillations in protein levels,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 8, 2012.
- [171] M. Torrent, G. Chalancon, N. S. De Groot, A. Wuster, and M. Madan Babu, “Cells alter their tRNA abundance to selectively regulate protein synthesis during stress conditions,” *Sci. Signal.*, vol. 11, no. 546, Sep. 2018.
- [172] H. Gingold and Y. Pilpel, “Determinants of translation efficiency and accuracy,” 2011.
- [173] H. Goodarzi, H. C. B. Nguyen, S. Zhang, B. D. Dill, H. Molina, and S. F. Tavazoie, “Modulated expression of specific tRNAs drives gene

- expression and cancer progression,” *Cell*, vol. 165, no. 6, pp. 1416–1427, Jun. 2016.
- [174] K. A. Dittmar, J. M. Goodenbour, and T. Pan, “Tissue-specific differences in human transfer RNA expression.,” *PLoS Genet.*, vol. 2, no. 12, p. e221, Dec. 2006.
- [175] E. M. Novoa and L. Ribas de Pouplana, “Speeding with control: codon usage, tRNAs, and ribosomes.,” *Trends Genet.*, vol. 28, no. 11, pp. 574–81, Nov. 2012.
- [176] T. E. F. Quax, N. J. Claassens, D. Söll, and J. van der Oost, “Codon Bias as a Means to Fine-Tune Gene Expression,” *Molecular Cell*, vol. 59, no. 2. Cell Press, pp. 149–161, 16-Jul-2015.
- [177] W. Qian, J.-R. Yang, N. M. Pearson 1✉, C. Maclean, and J. Zhang, “Balanced Codon Usage Optimizes Eukaryotic Translational Efficiency,” *PLoS Genet.*, vol. 8, no. 3, 2012.
- [178] I. Frumkin, M. J. Lajoie, C. J. Gregg, G. Hornung, G. M. Church, and Y. Pilpel, “Codon usage of highly expressed genes affects proteome-wide translation efficiency,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 21, pp. E4940–E4949, May 2018.
- [179] R. J. Stanton, B. P. McSharry, M. Armstrong, P. Tomasec, and G. W. G. Wilkinson, “Re-engineering adenovirus vector systems to enable high-throughput analyses of gene function.,” *Biotechniques*, vol. 45, no. 6, pp. 659–62, 664–8, Dec. 2008.
- [180] C. Puig-Saus, A. Gros, R. Alemany, and M. Cascalló, “Adenovirus i-leader truncation bioselected against cancer-associated fibroblasts to overcome tumor stromal barriers,” *Mol. Ther.*, vol. 20, no. 1, pp. 54–62,

2012.

- [181] S. Pérez-Torras *et al.*, “Characterization of human pancreatic orthotopic tumor xenografts suitable for drug screening,” *Cell. Oncol. (Dordr.)*, vol. 34, no. 6, pp. 511–21, Dec. 2011.
- [182] P. Puigbò, I. G. Bravo, and S. Garcia-Vallve, “CAIcal: A combined set of tools to assess codon usage adaptation,” 2008.
- [183] “Codon usage table.” [Online]. Available: <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=9606>. [Accessed: 16-Jan-2020].
- [184] “Pipeline.” [Online]. Available: <http://www.vcnbiosciences.com/index.php/technologies/pipeline>. [Accessed: 23-Dec-2019].
- [185] J. J. Rojas, M. Gimenez-Alejandre, R. Gil-Hoyos, M. Cascallo, and R. Alemany, “Improved systemic antitumor therapy with oncolytic adenoviruses by replacing the fiber shaft HSG-binding domain with RGD,” *Gene Ther.*, vol. 19, no. 4, pp. 453–457, Apr. 2012.
- [186] M. Gmachl, S. Sagan, S. Ketter, and G. Kreil, “The human sperm protein PH-20 has hyaluronidase activity,” *FEBS Lett.*, vol. 336, no. 3, pp. 545–548, Dec. 1993.
- [187] Y. Lin, K. Mahan, W. F. Lathrop, D. G. Myles, and P. Primakoff, “A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg,” *J. Cell Biol.*, vol. 125, no. 5, pp. 1157–1163, Jun. 1994.
- [188] S. Guedan, J. J. Rojas, A. Gros, E. Mercade, M. Cascallo, and R.

- Alemany, “Hyaluronidase expression by an oncolytic adenovirus enhances its intratumoral spread and suppresses tumor growth,” *Mol. Ther.*, vol. 18, no. 7, pp. 1275–83, Jul. 2010.
- [189] K. M. Wong, K. J. Horton, A. L. Coveler, S. R. Hingorani, and W. P. Harris, “Targeting the Tumor Stroma: the Biology and Clinical Development of Pegylated Recombinant Human Hyaluronidase (PEGPH20),” *Current Oncology Reports*, vol. 19, no. 7. Current Medicine Group LLC 1, 01-Jul-2017.
- [190] Z. P, “Suicide Gene Therapy for Cancer; Old Dog New Tricks,” *J. Genet. Syndr. Gene Ther.*, vol. 4, no. 4, 2013.
- [191] Z. Karjoo, X. Chen, and A. Hatefi, “Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 99. Elsevier B.V., pp. 113–128, 01-Apr-2016.
- [192] J. Zhang, V. Kale, and M. Chen, “Gene-Directed Enzyme Prodrug Therapy,” *AAPS J.*, vol. 17, no. 1, pp. 102–110, Jan. 2015.
- [193] S. A. Navarro *et al.*, “Cancer suicide gene therapy: a patent review,” *Expert Opin. Ther. Pat.*, vol. 26, no. 9, pp. 1095–1104, Sep. 2016.
- [194] D. Portsmouth, J. Hlavaty, and M. Renner, “Suicide genes for cancer therapy,” *Mol. Aspects Med.*, vol. 28, pp. 4–41, 2007.
- [195] N. Crespo *et al.*, “2'-Deoxyribosyltransferase from *Leishmania mexicana*, an efficient biocatalyst for one-pot, one-step synthesis of nucleosides from poorly soluble purine bases,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 101, no. 19, pp. 7187–7200, Oct. 2017.
- [196] “Purine nucleoside phosphorylase as enzymatic activator of nucleoside

- prodrugs - Patent US8628767 - PubChem.” [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/patent/US8628767#section=Patent-Grant-Date>. [Accessed: 27-Dec-2019].
- [197] W. B. Parker, P. W. Allan, A. E. A. Hassan, J. A. Secrist, E. J. Sorscher, and W. R. Waud, “Antitumor activity of 2-fluoro-2'-deoxyadenosine against tumors that express Escherichia coli purine nucleoside phosphorylase,” *Cancer Gene Ther.*, vol. 10, no. 1, pp. 23–29, Jan. 2003.
- [198] W. B. Parker *et al.*, “Metabolism and metabolic actions of 6-methylpurine and 2-fluoroadenine in human cells.,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 55, no. 10, pp. 1673–81, May 1998.
- [199] T. E. Behbahani, E. L. Rosenthal, W. B. Parker, and E. J. Sorscher, “Intratumoral generation of 2-fluoroadenine to treat solid malignancies of the head and neck,” *Head and Neck*, vol. 41, no. 6. John Wiley and Sons Inc., pp. 1979–1983, 01-Jun-2019.
- [200] M. Malecki, “Frontiers in Suicide Gene Therapy of Cancer,” *J. Genet. Syndr. Gene Ther.*, vol. 3, no. 4, 2012.
- [201] A. Mato-Berciano, G. Raimondi, M. V. Maliandi, R. Alemany, L. Montoliu, and C. Fillat, “A NOTCH-sensitive uPAR-regulated oncolytic adenovirus effectively suppresses pancreatic tumor growth and triggers synergistic anticancer effects with gemcitabine and nab-paclitaxel,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 14, pp. 22700–22715, 2017.
- [202] C. Quirin *et al.*, “Selectivity and efficiency of late transgene expression by transcriptionally targeted oncolytic adenoviruses are dependent on the transgene insertion strategy.,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 22, no. 4, pp. 389–404, Apr. 2011.

- [203] J. X. Chin, B. K. S. Chung, and D. Y. Lee, “Codon Optimization OnLine (COOL): A web-based multi-objective optimization platform for synthetic gene design,” *Bioinformatics*, vol. 30, no. 15, pp. 2210–2212, Aug. 2014.
- [204] L. Crisostomo, A. M. Soriano, M. Mendez, D. Graves, and P. Pelka, “Temporal dynamics of adenovirus 5 gene expression in normal human cells,” *PLoS One*, vol. 14, no. 1, Jan. 2019.
- [205] R. Alemany, C. Balagué, and D. T. Curiel, “Replicative adenoviruses for cancer therapy,” *Nature Biotechnology*, vol. 18, no. 7, pp. 723–727, Jul-2000.
- [206] W. Qian, J. R. Yang, N. M. Pearson, C. Maclean, and J. Zhang, “Balanced codon usage optimizes eukaryotic translational efficiency,” *PLoS Genet.*, vol. 8, no. 3, Mar. 2012.
- [207] J. Vind, M. A. Sørensen, M. D. Rasmussen, and S. Pedersen, “Synthesis of proteins in *Escherichia coli* is limited by the concentration of free ribosomes: Expression from reporter genes does not always reflect functional mRNA levels,” *J. Mol. Biol.*, vol. 231, no. 3, pp. 678–688, Jun. 1993.
- [208] M. Scott, C. W. Gunderson, E. M. Mateescu, Z. Zhang, and T. Hwa, “Interdependence of cell growth and gene expression: Origins and consequences,” *Science (80-.)*, vol. 330, no. 6007, pp. 1099–1102, Nov. 2010.
- [209] W. H. Mather, J. Hasty, L. S. Tsimring, and R. J. Williams, “Translational Cross Talk in Gene Networks,” *Biophys. J.*, vol. 104, no. 11, pp. 2564–2572, Jun. 2013.
- [210] C. A. Brackley, M. C. Romano, and M. Thiel, “The dynamics of supply

- and demand in mRNA translation,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 7, no. 10, 2011.
- [211] A. N. Lukashev, C. Fuerer, M.-J. Chen, P. Searle, and R. Iggo, “Late Expression of Nitroreductase in an Oncolytic Adenovirus Sensitizes Colon Cancer Cells to the Prodrug CB1954,” *Hum. Gene Ther.*, vol. 16, no. 12, pp. 1473–1483, Dec. 2005.
- [212] J. Del Papa, J. Petryk, J. C. Bell, and R. J. Parks, “An Oncolytic Adenovirus Vector Expressing p14 FAST Protein Induces Widespread Syncytium Formation and Reduces Tumor Growth Rate In Vivo,” *Mol. Ther. - Oncolytics*, vol. 14, pp. 107–120, Sep. 2019.
- [213] A. Gyorgy and D. Del Vecchio, “Limitations and Trade-offs in Gene Expression due to Competition for Shared Cellular Resources.”
- [214] S. Varenne and C. Lazdunski, “Effect of distribution of unfavourable codons on the maximum rate of gene expression by an heterologous organism.,” *J. Theor. Biol.*, vol. 120, no. 1, pp. 99–110, May 1986.
- [215] A. Dana and T. Tuller, “Efficient manipulations of synonymous mutations for controlling translation rate: An analytical approach,” in *Journal of Computational Biology*, 2012, vol. 19, no. 2, pp. 200–231.
- [216] A. Raveh, M. Margaliot, E. D. Sontag, and T. Tuller, “A model for competition for ribosomes in the cell,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 13, no. 116, Mar. 2016.

8. Anexo

8.1. Tablas

Tabla 1. Cebadores usados en qPCR		
Set	Nombre del cebador	Secuencia (5' → 3')
1	CMV_seq_Fw	AGTACATCAATGGGCGTGGA
	CMV_seq_Rv	GCTTATATAGACCTCCCACC
2	Fw_qPCR_EGFP	AAGATCCGCCACAACATCGA
	Rv_qPCR_EGFP	AACTCCAGCAGGACCATGTG
4	Fw_qPCR_MONO	AGACACAACATTGAGGATGGAT
	Rv_qPCR_MONO	AACTCCAGGAGGACCATGTG
5	AdHEXO1	GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC
	AdHEXO2	CAGCACGCCGCGGATGTCAAAG
6	S-albumin-qPCR	GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT
	aS-albumin-qPCR	GGCTATCCAAACTCATGGGAG
7	qPCR-hexon-Fw	GTCTACTTCGTCTTCGTGTGTC
	qPCR-hexon-Rv	TGGCTTCCACGTACTTTG
8	qPCR-fiber-Fw	CTCCAACGTGTGCCTTTTC
	qPCR-fiber-Rv	GGCTCACAGTGGTTACATT

Tabla 2. Cebadores para la modificación del plásmidos miRVec y pcDNA 3.1+/N-HA		
Set	Nombre del cebador	Secuencia (5' → 3')
1	Fw_BamHI_EGFP	TATGCGGATCC ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
	Rv_EcoRI_EGFP	TATGCGAATTCT TACTTGTACAGCTCGTCCATGC
2	Fw_BamHI_pMONO-neo-GFP	TATGCGGATCC ATGAGCAAGGGAGAAGAACTC
	Rv_EcoRI_pMONO-neo-GFP	TATGCGAATTCT TACTTGTACAGCTCATCCATTCC
3	Fw_BamHI_PDTadapt	TATGCGGATCC ATGCCTGCTCCAAAACTATTTAC
	Fw_EcoRI_PDTadapt	TATGCGAATTCT TATGGAGTAAGATGATGTTCTAC

**En negrita se muestran las colas con dianas de restricción*

Tabla 3. Cebadores para la modificación de plásmidos según el sistema pAdZ		
Set	Nombre del cebador	Secuencia (5' → 3')
1	Fw_Ad_late_pMONO-neo-GFP	<i>CGTGTTTATTTTCAATTGGTACTAAGCGGTGATGTTTCTGATCAGCCACCATGAGCAAGG GAGAAGAAGCTC</i>
	Rv_Ad_late_pMONO-neo-GFP	<i>GAATGAAAAATGACTTGAAATTTTCTGCAATTGAAAAATAAAGTTTATTATTACTTGTAC AGCTCATCCATTCC</i>
2	Fiber-GFP Fw	<i>CAATTGGTACTAAGCGGTGATGTTTCTGATCAGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGG</i>
3	PDT_Cola_Late_Fw	<i>CGTGTTTATTTTCAATTGGTACTAAGCGGTGATGTTTCTGATCAGCCACCATGCCCGCTCC AAAGACC</i>
	PDT_Cola_Late_Rv	<i>GAATGAAAAATGACTTGAAATTTTCTGCAATTGAAAAATAAAGTTTATTATTACGGGGT AAGGTGGTGC</i>
4	E4 miARN cua Fw	<i>GAAAACTACAATTCCCAACACATACAAGTTACTCCGCCCTAACTTTTATTTTATCGAATCT GC</i>
	E4 miARN cua Rv	<i>CGTGGCGGGGGCGTGGGAACGGGGCGGGTGACGTAGGTTACATTGATTATTGACTAG</i>
5	RpsLN 3' Fibra testar Fw	<i>ACTGCCAAAAGTAACATTGTCAGTCAAG</i>
	RpsLN 3' Fibra testar Rv	<i>GATGAGCGTTTGGCTCGACAGG</i>
6	Step 3/4 Fw	<i>CCAGAAACGAAAAGCCAAAAA</i>
	Step 3/4 Rv	<i>TAATGAGGGGGTGGAGTTTG</i>

**En cursiva se muestran las regiones correspondientes a las colas de homología*

Tabla 4. gBlocks® Gene Fragments

Nombre del gBlock®	Secuencia (5' → 3')
GFP_Adapt1	<p>TATGCGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCG ACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTT CATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTC GCAGGTACCCTGACCACATGAAGCAGCATGACTTCTTTAAATCTGCAATGCCAGAAGGTTATGTTTCAGGAGAGGACA ATCTTCTTTAAGGATGATGGAAATTATAAGACAAGGGCAGAAGTGAAGTTTGAAGGTGATACACTGGTTAACAGAA TTGAGCTGAAAGGCATTGATTTTAAGGAAGATGGAAACATTCTGGGTCAAGCTGGAGTACAACATAATTCTCAC AATGTTTACATTATGGCAGATAAGCAGAAGAATGGAATTAAGGTTAATTTCAAGATTAGACACAACATTGAGGATGG ATCTGTCCAACCTGGCAGACCAATACCAGCAGAACACCCCTATTGGTGATGGCCAGTTCTCCTCCAGATAATCACTA TCTCCGCACTCAATCTGCTCTGTCCAAAGACCCTAATGAGAAAAGAGACCACATGGTCCTCCTGGAGTTTGTGACAGC AGCAGGAATTACTCTGGGAATGGATGAGCTGTACAAGTAAGAATTCGCATA</p>
GFP_Adapt2	<p>TATGCGGATCCATGAGCAAGGGAGAAGAACTCTTTACTGGTGTGTGCCAATTCTGGTTGAGCTGGATGGTGATGT GAATGGCCACAAATTCCTCTGTGTCTGGTGAAAGGTGAAGGAGATGCAACTTATGGAAAAGCTGACTCTGAAAGTTCATT GTACAACAGGAAAGCTGCCAGTGCCCTGGCCAACCTCTGGTGACCACCCTGACTTATGGTGTTC AATGTTTCAGCAGG TACCCTGACCACATGAAGCAGCATGACTTCTTTAAATCTGCAATGCCAGAAGGTTATGTTTCAGGAGAGGACAATCTTC TTTAAGGATGATGGAAATTATAAGACAAGGGCAGAAGTGAAGTTTGAAGGTGATACACTGGTTAACAGAAATTGAGC TGAAAGGCATTGATTTTAAGGAAGATGGAAACATTCTGGGTCAAGCTGGAGTACAACATAATTCTCACAAATGTT TACATTTATGGCAGATAAGCAGAAGAATGGAATTAAGGTTAATTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGT GCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGA</p>

GCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCC
GGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA**GAATTCGCATA**

GFP_Adapt3

TATGCGGATCCATGAGCAAGGGAGAAGAACTCTTTACTGGTGTGTGCCAAATTCTGGTTGAGCTGGATGGTGATGT
GAATGGCCACAAAATTCTCTGTGTCTGGTGAAGGTGAAGGAGATGCAACTTATGGAAAAGCTGACTCTGAAAGTTCATTT
GTACAACAGGAAAGCTGCCAGTGCCTTGGCCAACTCTGGTGACCACCCTGACTTATGGTGTTC AATGTTTCAGCAGG
TACCCTGACCACATGAAGCAGCATGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTC
TTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGC
TGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACA ACTACAACAGCCACAACGT
CTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAATGGAATTAAGGTAAATTTCAAGATTAGACACAACATTTGAGGATGGATCTG
TCCAACCTGGCAGACCATTACCAGCAGAAACACCCCTATTGGTGATGGCCAGTTCTCCTCCCAGATAATCACTATCTCC
GCACTCAATCTGCTCTGTCCAAGACCCTAATGAGAAAAGAGACCACATGGTCTCCTGGAGTTTGTGACAGCAGCA
GGAATTACTCTGGGAATGGATGAGCTGTACAAGTAA**GAATTCGCATA**

Apis_mellifera

*TTTCAATTGGTACTAAGCGGTGATGTTTCTGATCAGCCACCATGTCTCGGCCTCTCGTGATCACGGAAGGGATGATGA
TTGGAGTGTGCTAATGCTAGCCCCGATAAACGCGTTATTACTCGGCTTCGTACAGAGCACCCCCGACAACAACAAAA
CCGTACGGGAGTTCAACGTTTACTGGAACGTGCCACCTTTATGTGCCATAAAATACGGGCTACGGTTTCGAAGAAGTA
TCGGAGAAATATGGTATTCTACAGAACTGGATGGATAAGTTTCGGGGCGAGGAGATCGCGATCCTTTACGACCCTG
GAATGTTCCCGGCGTTGCTGAAAGACCCGAATGGGAACGTGGTGGCGAGGAACGGCGGTGTTCCCGCAACTGGGCA
ATCTCACCAAGCATCTGCAAGTATTTCCGGACCCTTGATCAATCAGATCCCAGACAAGTCGTTTCCCGGCGTGGGG
GTGATCGATTTCGAAAAGTTGGAGGCCGATATTACAGACAGAACTGGGCCTCCCTCCAGCCTTACAAGAACTGTCGT
AGAGGTGGTTCCCGGTGAGCATCCGTTCTGGGACGATCAGAGGGTGGAGCAGGAGGCGAAACGAAGGTTTCGAGA
AATACGGGCAGCTTTTCATGGAGGAGACGTTGAAAAGCGGCGAAACGGATGAGGCCGGCCGCAATTGGGGATACT
ACGCCTACCTTATTGCTACAATCTGACGCCGAATCAGCCGAGCGCCCAATGCGAAGCGACCACCATGCAGGAGAAC
GATAAAATGTCGTGGCTGTTTCGAGTCGGAAGACGTCTCCTTCCGTCCGTTTACTTGAGATGGAATCTGACGAGCGG*

CGAAAGAGTGGGCCTGGTCGGTGGCCGCGTGAAGGAGGCGTTGAGAATAGCGAGGCCAAATGACGACCAGCAGGA
AGAAGGTTCTACCATATTACTGGTACAAATATCAGGATCGAAGGGACACGGATTTGAGCAGGGCTGACCTCGAGGC
AACTTTACGAAAAATCACGGACCTCGGCGCCGACGGGTTTCATCATTTGGGGAAGTTCCGACGATATAAACACGAAGG
CGAAGTGCCTACAATTCAGGGAATACCTGAACAACGAGTTGGGCCCTGCCGTTAAACGAATCGCGTTGAACAACAAC
GCGAACGATCGACTGACGGTGGACGTGAGCGTGGACCAAGTGTGATAAATAAACTTTATTTTCAATTGCAGAAAAAT
TTCAAGTCATTT

Apis_mellifera_adapt

TTTCAATTGGTACTAAGCGGTGATGTTTCTGATCAGCCACCATGTCTCGGCCTCTCGTGATCACGGAAGGGATGATGA
TTGGAGTGTGCTAATGCTAGCCCAATAAACCGGTTATTACTCGGCCTTCGTACAGAGCACCCCTGACAACAACAAAA
CCGTACGGGAGTTCAACGTTTACTGGAACGTGCCAACCTTTATGTGCCATAAAATACGGGCTACGGTTTCGAAGAAGTA
TCGGAGAAATATGGTATTCTACAGAACTGGATGGATAAGTTTCGGGGCGAGGAGATCGCTATCCTTTACGACCCTG
GAATGTTCCCTGCTTTGCTGAAAAGACCCGAATGGGAACGTGGTGGCAAGGAACGGCGGTGTCCCCAACCTGGGCAA
TCTCACCAAGCATCTGCAAGTATTTCCGGGACCACTTGATCAATCAGATCCCAGACAAGTCGTTTCCCGCGTGGGGG
TGATCGATTTGAAAAGTTGGAGGCCCATATTCAGACAGAACTGGGCCTCCCTCCAGCCTTACAAGAAAAGTGTCCGTA
GAGGTGGTTCGCCGTGAGCATCCGTTCTGGGACGATCAGAGGGTGGAGCAGGAGGCAAAAACGAAGTTTCGAGAAA
TACGGGCAGCTTTTCATGGAGGAGACGTTGAAAAGCAGCAAAAACGGATGAGGCCAGCTGCTAATTGGGGATACTACG
CCTACCCGTATTGCTACAATCTGACGCCGAATCAGCCCAGCGCTCAATGCCAAGCTACCACCATGCAGGAGAACGAT
AAAAATGTCGTGGCTGTTCGAGTCGGAAGACGTCTCTCCATCCGTTTACTTGAGATGGAATCTGACGAGCGGGCA
AAGAGTGGGCCTGGTCGGTGGCCGCGTGAAGGAGGCCTTGAGAATAGCAAGGCAAAATGACGACCAGCAGGAAGA
AGGTTCTACCATATTACTGGTACAAATATCAGGATCGAAGGGACACGGATTTGAGCAGGGCTGACCTCGAGGCAAC
TTTACGAAAAATCACGGACCTCGGCGCTGACGGGTTTCATCATTTGGGGAAGTTCCGACGATATAAACACGAAGGCTA
AGTGCCTACAATTCAGGGAATACCTGAACAACGAGTTGGGCCCTGCTGTTAAACGAATCGCTTTGAACAACAACGCT
AACGATCGACTGACGGTGGACGTGAGCGTGGACCAAGTGTGATAAATAAACTTTATTTTCAATTGCAGAAAAATTC
AAGTCATTT

PDT_Adapt

*TTTCAATTGGTACTAAGCGGTGATGTTTCTGATCAGCCACCATGCCTGCTCCAAAACTATTTACATTGCCGGTCCAGC
TGTTTTTCACCCTGACAATGGAGAAAGCCTATTACAACAATGTACGCGCATTGATGAAGGGTAAAGATGTTGTGCCTC
TTATACCAACTGACAACATTGCCACAGGAGCTGTTAACATAAGAAAATAAAAAATATTGACATGATACGCGCATGTGAT
GCTATTATAGCCGACCTATCTCCTTTTAGATCCAAAAGAGCCCGATTGTGGCACCGCCTTTGAACCTCGGCTATGCTGCC
GCCCTGGGTAAAGTGCTACTAACTTTTTCAACAGACACAAGACCGATGGTCGAAAAGTACGGGAGTGAAATGGCGG
ATGGCCTCTCAGTTGAAAACTTTGGTTTTGCCCTTCAACCTAATGCTTCACGACGGAACCGATGTTTTTGATAGCTTTG
AGGCCGCATTTGCCATTTTTGTAGAACATCATCTTACTCCATAATAATAAACTTTATTTTTCAATTGCAGAAAATTTCA
AGTCATTTTTCAATCAGTAGTATAGCCCCACC*

**En cursiva se muestran las regiones correspondientes a las colas de homología*

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en la técnica Western Blot

Anticuerpos primarios				
Nombre del anticuerpo	Casa Comercial	Referencia	Dilución	Condiciones de hibridación
<i>Anti-Adenovirus type 5</i> (dirigido contra la cápside adenoviral)	Abcam	Ab6982	1/1.000	1h TA
<i>Anti-Adenovirus fiber trimer [2A6]</i> (dirigido contra la fibra adenovrial)	GeneTex	GTX23232	1/1.000	ON 4°C
<i>Anti-GAPDH</i>	Merck Millipore	ABS16	1/10.000	1h TA/ ON 4°C
Anticuerpos secundarios				
<i>Polyclonal rabbit anti-mouse Immunoglobulin HRP-conjugated</i>	DAKO	P0260	1/2000	1h TA
<i>Polyclonal goat anti-rabbit Immunoglobulin HRP-conjugated</i>	DAKO	P0448	1/2.000	1h TA

Tabla 6. Resumen de las construcciones AdZ

Origen del fragmento recombinante	BAC original	BAC resultante	Adenovirus generado
miRVec_GFP_opt	AdZ_Adwt_E4_rpsL-neo_ITR	AdZ_Adwt_E4_GFP_opt_ITR	Adwt_GFP_opt_early
miRVec_GFP_DEopt	AdZ_Adwt_E4_rpsL-neo_ITR	AdZ_Adwt_E4_GFP_DEopt_ITR	Adwt_GFP_DEopt_early
	AdZ_Adwt_F_rpsL-neo_E4	AdZ_Adwt_F_GFP_DEopt_E4	Adwt_GFP_DEopt_late
gBlock® GFP_Adapt1	AdZ_Adwt_F_rpsL-neo_E4	AdZ_Adwt_F_GFP_Adapt_E4	Adwt_GFP_Adapt_late
gBlock® <i>Apis mellifera</i>	AdZ_ICO15K_F_rpsL-neo_E4	AdZ_ICO15K_F_APIS_E4	APIS-BH
gBlock® <i>Apis mellifera adapt</i>	AdZ_ICO15K_F_rpsL-neo_E4	AdZ_ICO15K_F_APIS_ADAPT_E4	ADAPT-BH
pcDNA 3.1+/N-HA_PDT	AdZ_AdNuPARmE1A_F_rpsL-neo_E4	AdZ_AdNuPARmE1A_F_PDT_E4	PDT
gBlock® <i>PDT_Adapt</i>	AdZ_AdNuPARmE1A_F_rpsL-neo_E4	AdZ_AdNuPARmE1A_F_PDT_Adapt_E4	PDT-ADAPT

8.2.2. Alineamiento aminoacídico de los genes *GFP_{opt}* y *GFP_{DEopt}*

```

EGFP      MVSKEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGE GEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPT 60
GFP DEOPT -MSKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGE GEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPT 59
          :*****

EGFP      LVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTL 120
GFP DEOPT LVTTLT YGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTL 119
          *****

EGFP      VNRIELK GIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDG SVQLA 180
GFP DEOPT VNRIELK GIDFKEDGNILGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDG SVQLA 179
          *****

EGFP      DHYQQNTPIGDGFVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELYK* 239
GFP DEOPT DHYQQNTPIGDGFVLLPDNHYLRTQSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELYK* 238
          *****

```

8.2.3. Alineamiento aminoacídico de los genes *PH20* y *hum_{BH}*

```

PH20      MGVLKFKHIFFRSFKSSGVSQIVFTFLLI PCCLTLNFRAPPVIPNV PFLWAWNAPSEFC 60
hum BH    -----MSRPLVITEGMMIG--VLLMLAP-----INALLGFVQS 32
          * * * * *

PH20      LGKFDEPLDMSLFSFIGSPRINATGQGV TIFYVDRLGYYPYIDSITGVTVNGGIPQKISL 120
hum BH    TPDN-----NKTVREFNVYWNVPTFMCH KYGLRFEEVSEKYGILQNWMDKFRGEEIAILY 87
          * * * * *

PH20      QDHLDKAKKDITFYMPVDNLGMAVIDWE EWRPTWARNWPKDVKYKNRSIELVQQQNVQLS 180
hum BH    DPGMFPALLKDPNGNVVARNGGVPQLG---NLTKHLQVFRDH LI----- 128
          * * * * *

PH20      LTEATEKAKQEFKAGKDFLVETIKLGKLLRPNHLWGYYLFPDCYNH HYKPGYNGSCFN 240
hum BH    ---NQIPDKSFPVGVDFESWRPIFRQNWASLQPYK KLSVEVV-RREHPFWDQQRVEQ 183
          * * * * *

PH20      VEIKRNDL SWLWNESTALYPSIYLNTQQSPVAATLYVRNRVREAIRVSKIPDAKSP LPV 300
hum BH    EAKRFKQYGLFMEETLKA-----AKRMRPAANWGY YAYPYCYNLTPN---QPSAQC 233
          * * * * *

PH20      FAYTRIVFTDQVLKFLSQDELVYTFGETVALGASGIVIWG TLSIMRSMKSCLLLDNYMET 360
hum BH    EATRMQENDKMSWLFES-EDVLLPSVYLRWNLTSGE-RVGLV GGR---VKEALRIARQMT 288
          * * * * *

PH20      IILNPYIINVT LAAKMCSQVLCQEQGV CIRKNWNSSDYLHLNPDNF AIQLEKGGKFTVRGK 420
hum BH    -----TSRKKVLPYYWY-----KYQDRRD TDLSRADLEATLRKIIDLGA 327
          * * * * *

```



```

hum_BH   TGCTACAACCTGACTCCCAACCAGCCCAGCGCCAGTGCAGGCCACTACCATGCAGGAG 720
apis_BH  TGCTACAATCTGACGCCGAATCAGCCGAGCGCCCAATGCGAAGCGACCACCATGCAGGAG 720
*****  *****  *  *  *****  *****  *****  *  *  *****

hum_BH   AACGACAAGATGAGCTGGCTGTTTGGAGAGCGAGGACGTGCTGCTGCCAGCGTGTACCTG 780
apis_BH  AACGATAAAATGTCGTGGCTGTTTCGAGTCGGAAGACGTCTCCTCCGTCCGTTTACTTG 780
*****  *  *  *  *****  *  *  *  *****  *  *  *  *  *  *  *  *  *

hum_BH   CGCTGGAACCTGACCAGCGGCGAGCGCGTTGGACTGGTTGGAGGACGCGTGAAGGAGGCC 840
apis_BH  AGATGGAATCTGACGAGCGGCCAAAGAGTGGGCTGGTTCGGTGGCCCGCTGAAGGAGCG 840
*  *****  *****  *****  *  *  *  *****  *  *  *****

hum_BH   CTGAGAATTGCCAGACAGATGACCACTAGCCGCAAGAAGGTGCTGCCCTACTACTGGTAC 900
apis_BH  TTGAGAATAGCGAGGCAAATGACGACCAGCAGGAAGAAGTTTACCATATTACTGGTAC 900
*****  *  *  *  *  *  *****  *  *  *  *  *  *****  *  *  *  *****

hum_BH   AAGTACCAGGACAGACGCGACACCGACCTGAGCAGAGCCGACCTGGAAGCCACTCTGCGC 960
apis_BH  AAATATCAGGATCGAAGGGACACGGATTTGAGCAGGGCTGACCTCGAGGCAACTTTACGA 960
*  *  *****  *  *  *  *****  *  *  *****  *  *  *****  *  *  *  *  *

hum_BH   AAGATCACCGACCTGGGAGCTGACGGCTTCATCATCTGGGGCAGCAGCGACGACATCAAC 1020
apis_BH  AAAATCACGGACCTCGGCGCCGACGGTTTCATCATTTGGGGAAGTTCCGACGATATAAAC 1020
*  *  *****  *****  *  *  *****  *****  *****  *  *  *****  *  *  *

hum_BH   ACCAAGGCCAAGTGCCTGCAGTTTCGCGAGTACCTGAACAACGAGCTTGGACCTGCCGTG 1080
apis_BH  ACGAAGGCGAAGTGCCTACAATTCAGGGAATACCTGAACAACGAGTTGGCCCTGCCGTT 1080
*  *  *****  *****  *  *  *  *  *  *****  *  *  *****

hum_BH   AAGCGCATTGCCCTGAACAACAACGCCAACGACAGACTGACCGTGGACGTGAGCGTGGAC 1140
apis_BH  AAACGAATCGCGTTGAACAACAACGCGAACGATCGACTGACCGTGGACGTGAGCGTGGAC 1140
*  *  *  *  *  *****  *****  *****  *****  *****

hum_BH   CAGGTGTAA 1149
apis_BH  CAAGTGTGA 1149
*  *  *  *  *

```

8.2.5. Alineamiento nucleotídico de los genes *apis_BH* y *adapt_BH*

```

apis_BH   ATGTCTCGGCCTCTCGTGATCACGGAAGGGATGATGATTGGAGTGTGCTAATGCTAGCC 60
adapt_BH  ATGTCTCGGCCTCTCGTGATCACGGAAGGGATGATGATTGGAGTGTGCTAATGCTAGCC 60
*****

apis_BH   CCGATAAACGCGTTATTACTCGGCTTCGTACAGAGCACCCCGACAACAACAAAACCGTA 120
adapt_BH  CCAATAAACGCGTTATTACTCGGCTTCGTACAGAGCACCCCTGACAACAACAAAACCGTA 120
*  *****

apis_BH   CGGGAGTTCAACGTTTACTGGAACGTGCCACCTTTATGTGCCATAAAATACGGGTACGG 180
adapt_BH  CGGGAGTTCAACGTTTACTGGAACGTGCCACCTTTATGTGCCATAAAATACGGGTACGG 180
*****

```

```

apis_BH      TTCGAAGAAGTATCGGAGAAATATGGTATTCTACAGAACTGGATGGATAAGTTTCGGGGC 240
adapt_BH     TTCGAAGAAGTATCGGAGAAATATGGTATTCTACAGAACTGGATGGATAAGTTTCGGGGC 240
*****

apis_BH      GAGGAGATCGCGATCCCTTTACGACCCGGAATGTTCCCGCGCTTGCTGAAAGACCCGAAT 300
adapt_BH     GAGGAGATCGCTATCCCTTTACGACCCGGAATGTTCCCTGCTTTGCTGAAAGACCCGAAT 300
*****

apis_BH      GGGAACGTGGTGGCGAGGAACGGCGGTGTCCCGCAACTGGGCAATCTCACCAAGCATCTG 360
adapt_BH     GGGAACGTGGTGGCAAGGAACGGCGGTGTCCCCCAACTGGGCAATCTCACCAAGCATCTG 360
*****

apis_BH      CAAGTATTTCCGGGACCACTTGATCAATCAGATCCCAGACAAGTCGTTTCCCGGCGTGGGG 420
adapt_BH     CAAGTATTTCCGGGACCACTTGATCAATCAGATCCCAGACAAGTCGTTTCCCGGCGTGGGG 420
*****

apis_BH      GTGATCGATTTTCGAAAGTTGGAGGCCATATTCAGACAGAAGTGGGCTCCCTCCAGCCT 480
adapt_BH     GTGATCGATTTTCGAAAGTTGGAGGCCATATTCAGACAGAAGTGGGCTCCCTCCAGCCT 480
*****

apis_BH      TACAAGAACTGTCCGTAGAGGTGGTTCGCCGTGAGCATCCGTTCTGGGACGATCAGAGG 540
adapt_BH     TACAAGAACTGTCCGTAGAGGTGGTTCGCCGTGAGCATCCGTTCTGGGACGATCAGAGG 540
*****

apis_BH      GTGGAGCAGGAGGCGAAACGAAGGTTTCGAGAAATACGGGCAGCTTTTCATGGAGGAGACG 600
adapt_BH     GTGGAGCAGGAGGCGAAACGAAGGTTTCGAGAAATACGGGCAGCTTTTCATGGAGGAGACG 600
*****

apis_BH      TTGAAAGCGGCGAAACGGATGAGGCCGGCCCAATGGGGATACTACGCCTACCCCTTAT 660
adapt_BH     TTGAAAGCAGCAAAACGGATGAGGCCAGCTGCTAATGGGGATACTACGCCTACCCGTAT 660
*****

apis_BH      TGCTACAATCTGACGCCGAATCAGCCGAGCGCCAATGCGAAGCGACCACCATGCAGGAG 720
adapt_BH     TGCTACAATCTGACGCCGAATCAGCCGAGCGCTCAATGCGAAGCTACCACCATGCAGGAG 720
*****

apis_BH      AACGATAAAATGTCGTGGCTGTTTCGAGTCGGAAGACGTCCTCCTCCGTCGGTTTACTTTG 780
adapt_BH     AACGATAAAATGTCGTGGCTGTTTCGAGTCGGAAGACGTCCTCCTCCATCCGTTTACTTTG 780
*****

apis_BH      AGATGGAATCTGACGAGCGGCGAAAGAGTGGGCCTGGTCGGTGGCCCGCTGAAGGAGGCG 840
adapt_BH     AGATGGAATCTGACGAGCGGCGAAAGAGTGGGCCTGGTCGGTGGCCCGCTGAAGGAGGCG 840
*****

apis_BH      TTGAGAATAGCAGGGCAAATGACGACCAGCAGGAAGAAGGTTCTACCATATTA CTGGTAC 900
adapt_BH     TTGAGAATAGCAAGGCAAATGACGACCAGCAGGAAGAAGGTTCTACCATATTA CTGGTAC 900
*****

apis_BH      AAATATCAGGATCGAAGGGACACGGATTTGAGCAGGGCTGACCTCGAGGCAACTTTACGA 960
adapt_BH     AAATATCAGGATCGAAGGGACACGGATTTGAGCAGGGCTGACCTCGAGGCAACTTTACGA 960
*****

apis_BH      AAAATCACGGACCTCGGCGCCGACGGGTTTCATCATTTGGGGAAGTTCGACGATATAAAC 1020
adapt_BH     AAAATCACGGACCTCGGCGCTGACGGGTTTCATCATTTGGGGAAGTTCGACGATATAAAC 1020
*****

apis_BH      ACGAAGGCGAAGTGCCTACAATTCAGGAATACCTGAACAACGAGTTGGGCCCTGCCGTT 1080
adapt_BH     ACGAAGGCTAAGTGCCTACAATTCAGGAATACCTGAACAACGAGTTGGGCCCTGCCGTT 1080
*****

```

```

apis_BH AAACGAATCGCGTTGAACAACAACGCGAACGATCGACTGACGGTGGACGTGAGCGTGGAC 1140
adapt_BH AAACGAATCGCTTTGAACAACAACGCTAACGATCGACTGACGGTGGACGTGAGCGTGGAC 1140
*****

apis_BH CAAGTGTGA 1149
adapt_BH CAAGTGTGA 1149
*****

```

8.2.6. Alineamiento aminoacídico de los genes codificantes para la hialuronidasa de abeja

```

hum_BH MSRPLVITEGMMIGVLLMLAPINALLLGFVQSTPDNNKTVREFNVYWNVPTFMCHKYGLR 60
apis_BH MSRPLVITEGMMIGVLLMLAPINALLLGFVQSTPDNNKTVREFNVYWNVPTFMCHKYGLR 60
adapt_BH MSRPLVITEGMMIGVLLMLAPINALLLGFVQSTPDNNKTVREFNVYWNVPTFMCHKYGLR 60
*****

hum_BH FEEVSEKYGILQNWMDKFRGEEIAILYDPGMFPALLKDPNGNVVARNGGVPQLGNLTKHL 120
apis_BH FEEVSEKYGILQNWMDKFRGEEIAILYDPGMFPALLKDPNGNVVARNGGVPQLGNLTKHL 120
adapt_BH FEEVSEKYGILQNWMDKFRGEEIAILYDPGMFPALLKDPNGNVVARNGGVPQLGNLTKHL 120
*****

hum_BH QVFRDHLINQIPDKSFPGVGVIDFESWRPIFRQNWASLQPYKKLSVEVVRREHPFWDQQR 180
apis_BH QVFRDHLINQIPDKSFPGVGVIDFESWRPIFRQNWASLQPYKKLSVEVVRREHPFWDQQR 180
adapt_BH QVFRDHLINQIPDKSFPGVGVIDFESWRPIFRQNWASLQPYKKLSVEVVRREHPFWDQQR 180
*****

hum_BH VEQEAKRREFEKYGQLFMEETLKAAKRMRPAANWGYAYPYCYNLTPNQPSAQCEATMQE 240
apis_BH VEQEAKRREFEKYGQLFMEETLKAAKRMRPAANWGYAYPYCYNLTPNQPSAQCEATMQE 240
adapt_BH VEQEAKRREFEKYGQLFMEETLKAAKRMRPAANWGYAYPYCYNLTPNQPSAQCEATMQE 240
*****

hum_BH NDKMSWLFESDVLPSVYLRWNLTSGERVGLVGGRVKEALRIARQMTTSRKKVLPYYWY 300
apis_BH NDKMSWLFESDVLPSVYLRWNLTSGERVGLVGGRVKEALRIARQMTTSRKKVLPYYWY 300
adapt_BH NDKMSWLFESDVLPSVYLRWNLTSGERVGLVGGRVKEALRIARQMTTSRKKVLPYYWY 300
*****

```

8.2.7. Alineamiento nucleotídico de los genes *PDT* y *PDT_Adapt*

```

PDT ATGCCCGCTCCAAAGACCATCTACATTGCCGGCCCCGTGTGTTCCACCCCGACAACGGC 60
PDT_Adapt ATGCCTGCTCCAAAAACTATTACATTGCCGGTCCAGCTGTTTTCCACCCGACAATGGA 60
*****

```

```

PDT      GAGGCGTACTACAACAATGTACGTGCACTGATGAAGGGGAAGGATGTGGTACCACTCATT 120
PDT_Adapt  GAAGCCTATTACAACAATGTACGCGCATTGATGAAGGGTAAAGATGTTGTGCCTCTTATA 120
          ** * * * * **
          * * * * *

PDT      CCAACGGACAACATCGCCACCGGCGCAGTGAACATCCGCAACAAGAACATTGACATGATC 180
PDT_Adapt  CCAACTGACAACATTCGCACAGGAGCTGTTAACATAAGAAATAAAAAATATTGACATGATA 180
          *****
          * * * * *

PDT      CGGGCGTGCAGCCATCATCGCCGACCTCTCCCGTTCGGCTCCAAGGAGCCCGACTGC 240
PDT_Adapt  CGCGCATGTGATGCTATTATAGCCGACCTATCTCCTTTTAGATCCAAGAGCCCGATTGT 240
          ** * * * * **
          * * * * *

PDT      GGAACCGCCTTCGAGCTCGGCTACGCGCGCGCTCGGGAAGTCTGCTGACTTTTTTCC 300
PDT_Adapt  GGCACCGCCTTTGAACCTCGGCTATGCTGCCGCCCTGGGTAAAGTCTACTAACTTTTTCA 300
          ** * * * * *
          * * * * *

PDT      ACTGACACGCGGCCATGGTGGAAAAATACGGTAGTGAGATGGCAGATGGCCTTTCCGTC 360
PDT_Adapt  ACAGACACAAGACCGATGGTGCAGAAAGTACGGGAGTGAAATGGCGGATGGCCTCTCAGTT 360
          ** * * * * *
          * * * * *

PDT      GAGAACTTTGGACTGCCGTTCAACCTAATGCTGCACGACGGAACGGACGTGTTTCGATTCC 420
PDT_Adapt  GAAAACTTTGGTTGCCCTTCAACCTAATGCTTCACGACGGAACCGATGTTTTTGATAGC 420
          ** * * * * *
          * * * * *

PDT      TTTGAGGCCGCTTTGCCTATTTTCGTTGAGCACACCTTACCCCGTAA 468
PDT_Adapt  TTTGAGGCCGATTTGCCTATTTGTAGAACATCATCTACTCCATAA 468
          *****
          * * * * *

```

8.2.8. Alineamiento aminoacídico de los genes *PDT* y *PDT_Adapt*

```

PDT      MPAPKTIYIAGPAVFHPDNGEAYYNNVRLMKGKDVVPLIPTDNIATGAVNIRNKNIDMI 60
PDT_Adapt  MPAPKTIYIAGPAVFHPDNGEAYYNNVRLMKGKDVVPLIPTDNIATGAVNIRNKNIDMI 60
          *****

PDT      RACDAI IADLSPFRSKEPDCGTAFELGYAAALGKVLLTFSTDTRPMVEKYGSEMADGLSV 120
PDT_Adapt  RACDAI IADLSPFRSKEPDCGTAFELGYAAALGKVLLTFSTDTRPMVEKYGSEMADGLSV 120
          *****

PDT      ENFGLPFNLMLHDGTDVFDSFEAAFAYFVEHHLTP* 155
PDT_Adapt  ENFGLPFNLMLHDGTDVFDSFEAAFAYFVEHHLTP* 155
          *****

```