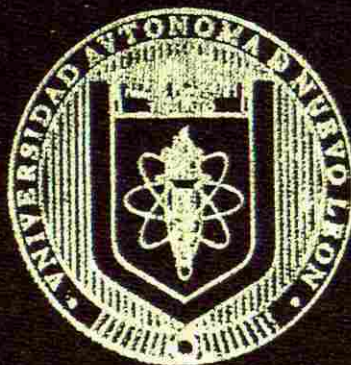


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



EVALUACIÓN IN VITRO DE VARS UPR16aa/delta 24
PARA TUMORES VPH POSITIVOS

FOR:

L.A.Q.B. DANIEL CERVANTES GARCÍA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR
E INGENIERÍA GENÉTICA

DICIEMBRE 2006

TM

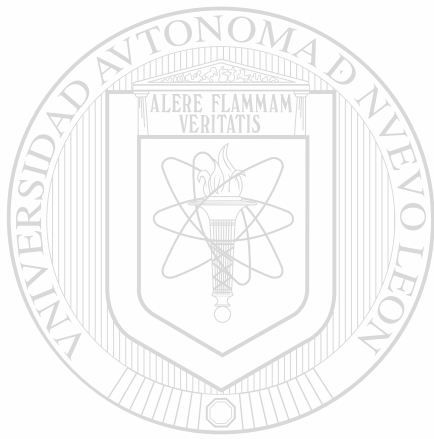
RC280

.US

C47

2006

c.1



UANL

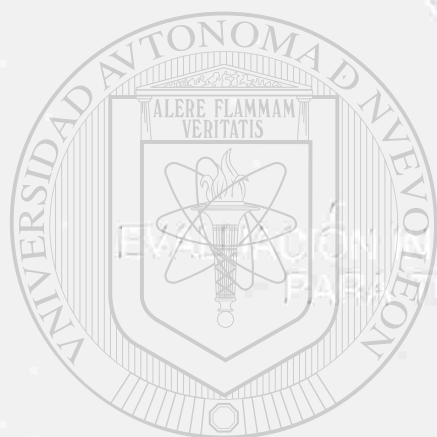
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



EVOLUCIÓN IN VITRO DE VARS UFR16aa / delta 24
PARA TUMORES VEH POSITIVOS

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

L.A.Q.B. DANIEL CERVANTES GARCÍA
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR
E INGENIERÍA GENÉTICA

DICIEMBRE 2006



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

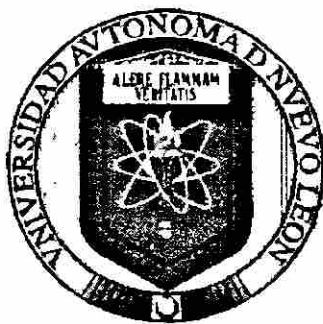


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN IN VITRO DE VARS URR16aa/ Δ 24
PARA TUMORES VPH POSITIVOS**

Por:
L.A.Q.B. DANIEL CERVANTES GARCÍA ®

**Como requisito parcial para obtener el Grado
de MAESTRÍA EN CIENCIAS con orientación en
Biología Molecular e Ingeniería Genética**

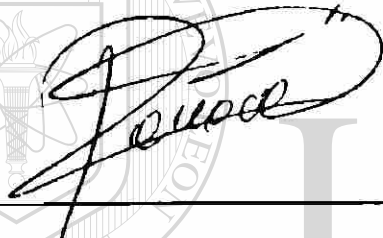
Diciembre, 2006

**EVALUACIÓN IN VITRO DE VARS URR16aa/ Δ 24
PARA TUMORES VPH POSITIVOS**

probación de tesis:



DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ
Director de Tesis



DRA. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ
Co-Director de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

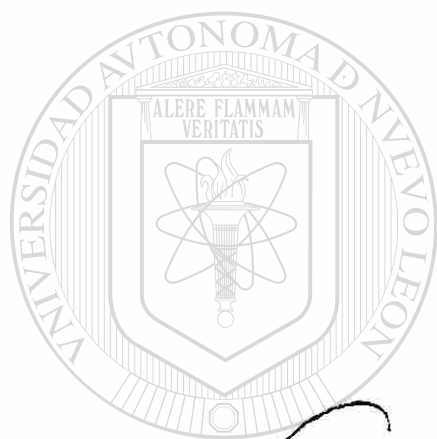


DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA
Co-Director de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Bajo la dirección del Dr. Augusto Rojas Martínez y la Co-Dirección de la Dra. Rocío Ortiz López y el Dr. Roberto Montes de Oca Luna.



Vo.Bo.

DR: AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ

Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Augusto,
Por darme la enorme oportunidad de iniciarme en el campo
de la Terapia Génica en su laboratorio.*

*A la Dra. Rocío y al Dr. Roberto,
Por su apoyo y consejos que me enseñaron a ser lo que quiero.*

*A lo miembros del laboratorio de Terapia Génica,
Christian, Víctor, Maggie e Iván por sus enseñanzas y
momentos divertidos que pasamos juntos.*

*A todos los miembros de la ULIEG,
Personal administrativo, Mike, Clarita y Katy
por todos los momentos que pasamos juntos.*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

*Al Dr. Urzúa,
Por el apoyo y cariño que siempre me ha brindado.*

*A mi Familia,
Al valor mas hermoso que tengo, mis padres Rosalba y
Alfredo, mis hermanos Tere, Lalo y Juan Pablo, y mis lindas
sobrinas Lupita y Citlali.*

*Y por supuesto . . .
a Dios por darme el camino hacia él.*

*“El hombre encuentra a Dios detrás de cada
puerta que la ciencia logra abrir.”*



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Albert Einstein (1879-1955)

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi

CAPÍTULO	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El VPH y el CaCU	2
1.1.1 El VPH y su clasificación	2
1.1.2 Organización genómica del VPH	3
1.1.3 Regulación de la expresión de VPH	4
1.1.4 Efecto transformante de oncogenes E6 y E7	5
1.1.5 Ciclo biológico del VPH	6
1.1.6 Epidemiología del CaCU	7
1.1.7 El oncogen E7 de VPH y su relación con el gen E1A adenoviral	8
1.1.8 Estrategias terapéuticas contra el CaCU	9
1.2 Una nueva estrategia de terapia génica contra el cáncer	11
1.2.1 Estructura genética del adenovirus	11
1.2.2 Viroterapia oncolítica	12
1.2.3 Estrategias moleculares de la viroterapia oncolítica	14
1.2.4 Atenuación de genes de replicación adenoviral	14
1.2.5 Promotores tejido específico empleados en VARS	16
1.3 Propuesta de una estrategia de viroterapia oncolítica contra el CaCU	17
1.4 Justificación	19
II. OBJETIVOS	20

2.1 Objetivo general	20
2.2 Objetivos específicos	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 Material biológico	21
3.1.1 Células competentes y líneas celulares	21
3.1.2 Vectores adenovirales de replicación selectiva	21
3.1.3 Plásmidos	22
3.2 Materiales y reactivos	23
3.3 Estrategia general	26
3.4 Construcción del plásmido pSK-pA-URR	27
3.5 Construcción de plásmido pSp-URR/E1Awt	28
3.6 Construcción del genoma adenoviral pAd-URR/E1Awt	29
3.7 Generación del VARS Ad URR/E1Awt	31
3.8 Purificación del VARS Ad URR/E1Awt	31
3.9 Titulación en placa con células HEK 293 (TCID ₅₀)	32
3.10 Determinación óptica de partículas virales	32
3.11 Estudio del poder replicativo de VARS	33
3.12 Estudio del efecto citotóxico de VARS	34
IV. RESULTADOS	35
V. DISCUSIÓN	48
VI. CONCLUSIONES	51
VII. BIBLIOGRAFÍA	52

RESUMEN
L.A.Q.B. Daniel Cervantes García

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina.

Fecha de Graduación: Diciembre de 2006.

Área de estudio: Terapia Génica.

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Número de Páginas: 60

Título del Estudio: “EVALUACIÓN IN VITRO DE VARS URR16AA/Δ24 PARA TUMORES VPH POSITIVOS”.

Antecedentes: El cáncer cérvicouterino sigue siendo un problema de salud mundial, presentándose la mayoría de los casos en países en desarrollo. Además del tratamiento con quimioterapia, radioterapia y cirugía, es necesaria la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que permitan mejorar la calidad de vida de los pacientes. Los vectores adenovirales de replicación selectiva (VARS) son una opción para la eliminación de células con transformación maligna. En este trabajo se presenta la evaluación de las características replicativa y citotóxica de las modificaciones genéticas individuales y combinadas a VARS dirigidos contra células transformadas por VPH.

Objetivo: El objetivo de este estudio fue determinar las contribuciones en especificidad y potencia de la inclusión del promotor URR dirigiendo la expresión de la modificación Δ24 en el gen E1A adenoviral.

Materiales y Métodos: Se generó un VARS Ad-URR/E1Awt que completaría la colección de los VARS Ad-URR/E1AΔ24, Ad-Δ24 y Ad-wt. Se evaluó la replicación y citotoxicidad de los VARS en líneas celulares VPH+ y VPH-.

Resultados: El VARS Ad-URR/E1AΔ24 no mostró una diferencia significativa en la citotoxicidad y selectividad de los VARS Ad-URR/E1Awt, Ad-Δ24 y Ad-wt, en líneas celulares VPH+. Sin embargo, se observó que este VARS muestra una atenuación superior a los VARS incluidos como controles y que dicha atenuación es sinérgica con respecto a la mostrada por los VARS con las modificaciones individuales (Ad-URR/E1Awt y Ad-Δ24).

Contribuciones y Conclusiones: Estos resultados soportan la bioseguridad mejorada del VARS Ad-URR/E1AΔ24 para su empleo en neoplasias relacionadas con VPH. El vector Ad-URR/E1AΔ24 no tiene una potencia oncolítica disminuida en líneas celulares VPH+ comparada con los vectores ya reportados Ad-Δ24 y Ad-wt. La inclusión del promotor URR dirigiendo la expresión del gen E1AΔ24 incrementa la atenuación del VARS Ad-URR/E1AΔ24 en líneas celulares VPH- con respecto a los VARS Ad-Δ24 y Ad-wt.

DIRECTOR DE TESIS


DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS


DRA. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS

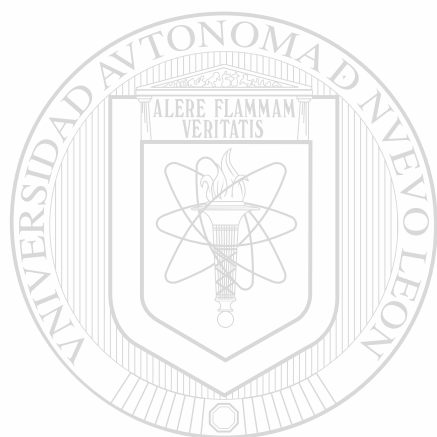

DR. ROBERTO MONTES DE OCA LUNA

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	PÁGINA
Figura 1. Organización del genoma de VPH.	4
Figura 2. Mapa del genoma adenoviral y unidades de transcripción.	12
Figura 3. Mecanismo de acción de VARS sobre células tumorales.	13
Figura 4. Construcciones adenovirales reportadas por Delgado-Enciso (2004).	18
Figura 5. Construcciones adenovirales incluidas en este trabajo.	19
Figura 6. Mapas de plásmidos pSK pA URR, pSp pA GH(2.4) E1wt y pBHG10, los cuales fueron empleados para la generación del VARS Ad URR/E1Awt.	22
Figura 7. Estrategia general para la elaboración del VARS Ad-URR/E1Awt y su evaluación <i>in vitro</i> .	26
Figura 8. Estrategia para la construcción pSK-pA-URR.	27
Figura 9. Estrategia para la construcción del vector acarreador pSp-URR/E1Awt.	28
Figura 10. Generación de un genoma adenoviral pAd URR/E1Awt.	30
Figura 11. Preparación de diluciones para realizar cuantificación de OD 260 nm.	33
Figura 12. Generación de un plásmido pSK-pATK-URR.	36
Figura 13. Generación de un plásmido acarreador pSp-pATK-URR/E1Awt.	37
Figura 14. Presencia de una inserción en el plásmido pSp-pATK-URR/E1Awt.	39
Figura 15. Esquema del vector acarreador pSp-pATK-URR/E1Awt con la localización de una inserción al final del gen E1B.	40
Figura 16. Determinación del poder replicativo de VARS en líneas celulares VPH + y VPH-.	43
Figura 17. Ensayos de citotoxicidad en líneas VPH+ y VPH-.	45
Figura 18. DL ₅₀ alcanzada por cada uno de los vectores en líneas celulares HepG2, SiHa y HeLa.	47

LISTA DE TABLAS

TABLAS	PÁGINA
Tabla 1. Clasificación de VPH s de acuerdo al riesgo de producir lesiones cancerosas.	3
Tabla 2. Ejemplos de promotores específicos de tejido empleados en VARS.	17
Tabla 3. Cuantificación óptica de VARS (OD_{260}).	41
Tabla 4. Valores de pfu/mL para cada VARS obtenido por TCID 50.	42



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE ABREVIATURAS

Ad	Adenovirus
CaCU	Cáncer cérvicouterino
CR1	Región conservada 1
CR2	Región conservada 2
CR3	Región conservada 3
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DL ₅₀	Dosis letal 50
Δ24	Delección 24 pares de bases
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
h	Horas
ITR	Repeticiones terminales invertidas (por sus siglas en inglés)
Kb	Kilobases
KDa	Kilodaltones
Log	Logaritmo base 10
mL	Mililitro
μg	Microgramo
μL	Microlitro
pA	Poliadenilación
p53	Proteína Celular p53
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pE6	Proteína E6
pE7	Proteína E7
pRb	Proteína de Retinoblastoma
URR	Región reguladora río arriba (por sus siglas en inglés)
VARS	Vectores adenovirales de replicación selectiva

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Cáncer es un término genérico para un grupo de más de 100 enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. También son empleados los términos neoplasias y tumores malignos. Una característica que define el cáncer es la rápida generación de células anormales que crecen más allá de sus límites normales y son capaces de invadir zonas adyacentes del organismo y diseminarse a otros órganos, un proceso llamado metástasis. El cáncer se está convirtiendo en un factor cada vez más importante en la carga de morbilidad mundial. Actualmente hay 24,6 millones de personas con cáncer, y se calcula que en 2020 habrá 30 millones. Para entonces, el cáncer podría matar a más de 10 millones de personas al año. Según las previsiones, el número estimado de casos nuevos de cáncer al año aumentará de 10,9 millones en 2002 a 16 millones en 2020 si se mantiene la tendencia. Alrededor del 60 % de esos casos se producirán en las zonas menos desarrolladas del mundo. Hoy en día mueren de cáncer casi 7 millones de personas al año (WHO, 2006).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En los países desarrollados, el cáncer es la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares. Los datos epidemiológicos indican que esta tendencia empieza a observarse también en el mundo menos desarrollado, particularmente en los países "de transición" o los países de medianos ingresos de Sudamérica y Asia. Más de la mitad de los casos de cáncer ya se producen en los países en desarrollo (WHO, 2006).

Se han vinculado varios factores causales a la aparición del cáncer: un estilo de vida poco saludable (consumo de tabaco y alcohol, alimentación incorrecta, inactividad física) y la exposición a carcinógenos ambientales y agentes infecciosos (por ejemplo, el virus de la hepatitis B o el papilomavirus humano). El consumo de tabaco provoca el 30 % de los tumores malignos en los países

desarrollados; la alimentación, el 30 % en esos países y el 20 % en los países en desarrollo. La exposición a carcinógenos en los países desarrollados es responsable del 4 % de los casos de cáncer; la exposición a los agentes infecciosos provoca el 18 % de los casos en el mundo, la mayoría en los países en desarrollo (WHO, 2006).

1.1 El VPH y el CaCU

1.1.1 El VPH y su clasificación

Los virus del papiloma humano (VPH) pertenece al genero A de la familia *Papillomaviridae*. Al menos 85 especies ya han sido bien caracterizadas. Todos son epiteliotrópicos e infectan tipos específicos de epitelio. Cada uno de los diferentes tipos se asocia con diferentes tipos de lesiones y con diferente potencial oncogénico (Wolf y Ramírez, 2001).

El VPH preferentemente infecta epitelio basal a través de la microabrasiones. Más de 100 diferentes tipos de VPH han sido identificados, de los cuales aproximadamente 40 infectan el epitelio genital y aproximadamente la mitad de estos se encuentran clasificados como tipos de VPH de "alto riesgo" debido a su asociación con el cáncer cervical (Tabla 1). Actualmente, los tipos de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 se clasifican como de alto riesgo (Muñoz, 2000). Los VPHs de bajo riesgo incluyen los tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81 (Muñoz, 2000; Sanclemente y Gill, 2002; de Villiers *et al.*, 2004; Bernard, 2005); estos virus se asocian comúnmente a displasias de bajo grado, células escamosas atípicas (ASCs), lesiones intraepiteliales escamosas (SILs), lesiones intraepiteliales de bajo grado (SIL) y verrugas genitales externas (Clifford *et al.*, 2005).

Tabla 1. Clasificación de VPH s de acuerdo al riesgo de producir lesiones cancerosas.

Grupo de VPH	Tipos de VPH
Alto riesgo	VPH -16, VPH -18, VPH -45, VPH -56, VPH -31, VPH -33, VPH -35, VPH -51, VPH -52, VPH -56 y VPH -58
Bajo riesgo	VPH -6, VPH -11, VPH -40, VPH -42, VPH -43, VPH -44, VPH -54, VPH -61, VPH -70, VPH -72 y VPH -81

Los VPHs se diseminan por medio del contacto sexual e infectan células basales del epitelio estratificado a través de pequeñas disrupciones en el tejido. Aunque la infección por VPH interfiere con la función normal de la célula, raramente se asocia con inflamación o respuesta inmune agresiva. En células de displasias de bajo grado, los genomas de VPH residen de manera circular, permanecen de manera episomal hasta que se integran en el DNA humano en algunas neoplasias de alto grado y en cánceres. Las células infectadas eventualmente liberarán viriones intactos (Wiley y Masongsong, 2006).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
1.1.2 Organización genómica del VPH
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los VPHs son una partícula eicosahédrica no envuelta con un diámetro aproximado de 55-60 nm. Esta compuesta de 72 capsómeros (60 hexaméricas y 12 pentaméricas). Su genoma comprende un DNA de doble cadena circular de 7900 pares de bases (pb), acomplejado con histonas, y se divide en tres regiones: región reguladora río arriba, región temprana y tardía. El genoma de VPH codifica sólo ocho proteínas (figura 1). Los genes tardíos L1 y L2 codifican para proteínas de la cápside viral, los genes tempranos son de E1 a E7, los cuales codifican proteínas necesarias para la replicación viral. E1 y E2 son responsables para la transcripción y replicación viral, y E4 permite la liberación del virus de las células infectadas. Los genes E6 y E7 contienen las propiedades

oncogénicas del VPH (Carr y Gyorfí, 2000; Jansen y Shaw, 2004; Ledwaba *et al.*, 2004; Simonson *et al.*, 2005).

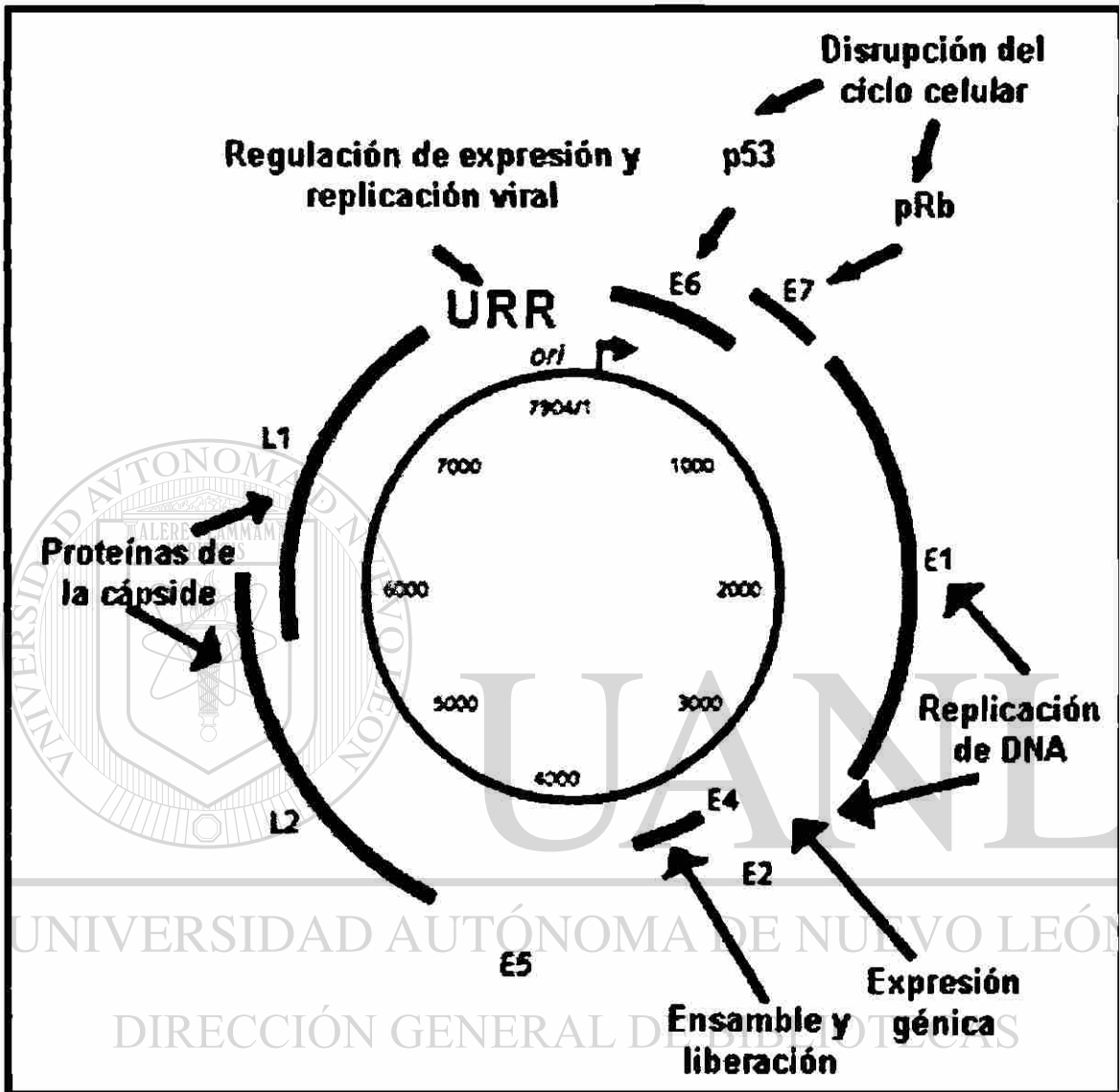


Figura 1. Organización del genoma de VPH.

1.1.3 Regulación de la expresión de VPH

La regulación genética de los VPHs reside en una porción no codificadora del genoma viral conocida como región larga de control o LCR. Ésta es un segmento cuyo tamaño varía entre los 800 y 1000 pb dependiendo del tipo de VPH. La LCR controla la transcripción de los genes tempranos del virus y

contiene sitios para diferentes factores transcripcionales que regulan la transcripción de los genes tempranos E6 y E7 en un mRNA policistrónico a partir del promotor P₉₇. Funcionalmente se encuentra dividida en dos dominios principales: el RE2, regulado por la presencia de la proteína viral E2 y donde se localizan tanto el origen de replicación del DNA viral, como el promotor temprano; y el dominio CE (celular enhancer), un fuerte potenciador de la transcripción cuya activación depende exclusivamente de factores transcripcionales celulares. Actualmente se sabe que factores como la proteína activadora 1 (AP1), el factor de transcripción específico de queratinocitos (KRF-1), los factores SP1, TEF-1, TEF-2, Gre y Ying-Yang 1 (YY1) y la proteína E2 (Wu *et al.*, 2006), entre otros, se unen a sitios consenso presentes en la LCR que son importante en la regulación tanto positiva como negativa de la misma. Algunas de las proteínas que se han podido relacionar con efectos importantes en la regulación tanto basal como tejido-específica de VPH son factores transcripcionales conocidos, tales como: SP1, OCT-1, NF1 y AP1, entre otros (Álvarez-Salas y López-Bayghen, 1995; Taniguchi *et al.*, 1993; Romanczuk *et al.*, 1991; Velazquez-Torres y Gariglio-Vidal, 2002; Kämmer *et al.*, 2000; Zhi-Ming y Baker, 2006; Hubert, 2005).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

1.1.4 Efecto transformante de oncogenes E6 y E7

El papel más importante para la transformación maligna puede ser asignado para los genes E6 y E7 y sus proteínas respectivas. Ambos son continuamente expresados en tejido maligno, e inhibiendo su expresión se bloquea el fenotipo maligno de células de cáncer cervical. Se han descrito muchas funciones para E6 y E7. Inicialmente se observó que E6 interacciona con p53, mientras que E7 interacciona con pRb, bloqueando así la actividad de estos supresores de tumor; en ambos casos se ha reportado la degradación de ambos supresores de tumor. Además, la interacción de la proteína E6 con p53 y la proteína pro-apoptótica BAK resulta en la resistencia a la apoptosis e incremento en la inestabilidad

cromosómica. Asimismo, la activación de la telomerasa y la posible inhibición de la degradación de cinasas de la familia SRC por la oncoproteína E6 parece cumplir con importantes funciones en la estimulación del crecimiento. Se ha especulado que la estabilización de las formas activadas de miembros específicos de cinasas de la familia SRC podrían contribuir al fenotipo transformado por VPH. El inhibidor de cinasas dependiente de ciclina INK4A (también conocido como p16) parece contrarrestar estas funciones. E7, por su parte, interacciona y degrada pRb, lo cual libera el factor de transcripción E2F inhibidor de pRb. El resultado de la alta actividad de E2F podría llevar a la apoptosis en células que expresan E7. Por otra parte, E7 estimula los genes de fase S ciclina A y ciclina E, y parece bloquear la función del inhibidor de cinasa dependiente de ciclina WAF1 (también conocido como CIP1 y p21) y KIP1 (también conocido como p27). Mediante inducción de la amplificación de centriolos, E7 también induce aneuploidía de las células que expresan E7, lo cual contribuye a la tumorigénesis (Münger *et al.*, 2004; Werness, 1990; zur Hausen, 2002; Burd, 2003; Scheffner *et al.*, 1990; Scheffner *et al.*, 1992).

1.1.5 Ciclo biológico del VPH

La infección inicial requiere al acceso de las partículas infecciosas a las células en la capa basal, lo cual para algunos VPH se requiere un rompimiento del epitelio estratificado. Existe controversia en cuanto a la existencia de un receptor celular que permita la unión inicial del virus a la superficie de la célula, aunque algunos estudios han sugerido la dependencia de heparina sulfato (Giroglou *et al.*, 2001). La internalización de la viriones es un proceso lento y ocurre a través de endocitosis por vesículas cubiertas de clatrina (Day *et al.*, 2003). El ambiente reductor de la célula permite romper las uniones intracapsoméricas permitiendo que el DNA se transporte al núcleo (Li *et al.*, 1998), ahí permanece episomal por acciones de las proteínas E1 y E2 (Wilson *et al.*, 2002). Las células basales salen del ciclo celular y migran a las capas celulares suprabasales donde

realizan un proceso de diferenciación terminal. Durante la infección por VPH, las proteínas E6 y E7 son expresadas en estas células, evitándose la restricción del ciclo celular (Fehrmann y Laimins, 2003, Caldeira *et al.*, 2003). La unión de E2 a la región reguladora río arriba (URR, por sus siglas en inglés) inicia la expresión de los oncogenes E6 y E7, permitiendo así el arresto del ciclo celular. Los VPHs codifican dos proteínas estructurales que se expresan en las capas superiores del tejido infectado una vez que el genoma viral se ha amplificado. La proteína mayor de la cápside (L1) se expresa después de L2 permitiendo el ensamblaje de partículas infecciosas en las capas superiores del epitelio. Los papilomavirus no son líticos y no se liberan hasta que las células alcanzan la superficie epitelial (Florin *et al.*, 2002).

1.1.6 Epidemiología del CaCU

El cáncer cervicouterino (CaCU) sigue afectando la salud de mujeres de todo el mundo, en especial en países en desarrollo. Los carcinomas de tracto genital, particularmente los de cérvix, corresponden casi al 12 % de todos los cánceres en la mujer, de tal manera que representan la segunda malignidad ginecológica más frecuentes en el mundo. Cada año se registran alrededor de 500,000 nuevos casos, de los cuales 80 % de ellos ocurren en vías de desarrollo. Alrededor de 250,000 de esos casos resultan en muerte (zur Hausen, 2002; Muñoz *et al.*, 2003; Valdespino-Gómez y Valdespino-Castillo, 2004). En México, el INEGI reportó la detección de 2,610,961 mujeres que padecen de CaCU en 2001. La tasa de defunción para ese mismo año a causa de CaCU fue de 16.74 defunciones de mujeres mayores de 25 años por cada 100,000 mujeres (INEGI, 2004).

El cáncer cervical es causado por infecciones con diferentes tipos de VPH. Los VPHs son una de las causas más común de enfermedad de transmisión sexual en hombres y mujeres y se cree que sea la enfermedad viral más comúnmente

transmitida vía sexual en los Estados Unidos. Se ha reportado que el DNA de VPH es detectable en más del 99.7 % de los casos de cáncer cervical invasivo. El VPH-16 es el más prevalente en cerca del 50 % de las infecciones (Burd, 2003; Yamada *et al.*, 1997; Lillo, 2005; Bosch y Muñoz, 2002; Walboomers *et al.*, 1999).

1.1.7 El oncogén E7 de VPH y su relación con el gen E1A adenoviral

La región temprana E1A del adenovirus humano tipo 5 codifica para dos proteínas principales 243 y 289 residuos de aminoácidos (proteínas 243R y 289R) que corresponden a los dos transcritos principales de RNA 12S y 13S. El iniciador exón tiene una longitud de 553 nucleótidos en el transcritos 13S y 415 nucleótidos en el 12S. El segundo exón es idéntico en las dos proteínas y codifica para 104 aminoácidos en común de ambas proteínas. Dos regiones altamente conservadas entre los diferentes serotipos adenovirales se encuentran en los primeros 139 aminoácidos, llamadas región conservada (CR1) (aa 41 – 72) y CR2 (aa 115 – 137) (Avvakumov *et al.*, 2004). Estas dos regiones conservadas son cruciales para la unión e inactivación de la proteína pRb.

La proteína E1A se une al dominio B (B-box) de pRb. Como ya se mencionó anteriormente, una característica de la proteína pRb es que se une a la secuencia LxCxE el cual se encuentra en la región CR2 (aa 122–126). El desplazamiento de proteínas celulares, entre las que se incluye E2F, que interactúan con el dominio conservado de pRb B-box por acción de un dominio LxCxE es un mecanismo importante por el cual E1A interfiere con pRb (Morris y Dyson, 2001; Felsani *et al.*, 2006).

La molécula E7 de VPH de cepas de alto riesgo contiene tres regiones funcionales: CR1 a CR2 en la mitad amino-terminal, y un dominio de dedos de zinc en la región carboxilo-terminal. Mientras que CR1 y CR2 muestran

homologías estructurales y funcionales con la proteína E1A y regiones del antígeno T de poliomavirus, el dominio de dedos de zinc aparece como único y no tiene homología con E1A ni el antígeno T. Como lo hacen E1A y el antígeno T, la proteína E7 de VPH 16 se une a miembros de la familia pRb y causa la liberación del factor de transcripción E2F y la consecuente transactivación de genes de respuesta a E2F necesarios para la progresión del ciclo celular (Muller y Helin, 2000).

Así pues, la oncoproteínas virales E1A y E7 tienen un diseño comparable con el fin de realizar tareas análogas relacionadas con la infección y transformación de la célula huésped, y entre estas tareas, la más importante, es la del deterioro de las funciones de pRb. Este punto en común de ambas infecciones ha permitido explorar nuevas vías en el tratamiento del CaCU.

1.1.8 Estrategias terapéuticas contra el CaCU

La mayoría de los pacientes pueden ser manejados con cirugía, radioterapia o combinación de ambas. La quimioterapia se ha empleado en pacientes con enfermedad avanzada, recurrente o con sensibilidad a la radiación. Los agentes activos incluyen cisplatino, 5-fluorouracilo (5-FU), hexametilmelamina y vincristina. Recientemente se ha tomado interés por el uso de la quimioterapia como agente radiosensibilizador. Los agentes activos incluyen la hidroxiurea, 5-FU y cisplatino (Fauci *et al.*, 1998). Además, es posible realizar modificaciones a dichos agentes quimioterapéuticos para que mejoren su eficacia contra el cáncer, como es el caso de una nueva droga polimérica para el tratamiento del CaCU que consiste en la incorporación al cisplatino de un poli(etilen-co-vinil acetato) (EVAc) de manera que se permite una liberación rápida y luego lenta de cisplatino (Keskar *et al.*, 2006). Varios agentes antivirales han sido indicados para el tratamiento de la infección por VPH, entre ellos se encuentran el imiquimod (Andel-Haq *et al.*, 2006).

Ya se han desarrollado estrategias preventivas para el desarrollo del CaCU explotando la inmunogenicidad generada por los productos de las regiones L1 y L2. Dos compañías farmacéuticas, Merck y Glaxo-Smith-Kline han desarrollado una vacuna activa contra tipos de VPH, la vacuna es llamada VLP L1. La vacuna de Merck, Gardasil®, es cuadrivalente y esta dirigida a VPH tipos 16/18/6/11. Fue aprobada el 8 de junio de este año para su uso en mujeres de 9 a 26 años de edad. La vacuna de GlaxoSmithKline, Cervarix®, es una vacuna bivalente para VPH tipos 16/18 y actualmente se encuentra en la fase III de ensayo clínico (Stanley, 2005; Harper *et al.*, 2006; Speck y Tyring, 2006).

Otra estrategia dirigida al tratamiento de CaCU incluye el uso de vectores adenovirales para fines de terapia génica. La terapia génica para CaCU se enfoca a diversas estrategias, entre las que se incluye: (1) Inactivación de la expresión de genes involucrados en el desarrollo del cáncer empleando ribozimas y oligonucleótidos que interfieran con la traducción del mRNA de E6 y E7 principalmente (Álvarez-Salas *et al.*, 2003; Hamada *et al.*, 2006). (2) Transducción de las células tumorales por un transgén que mejore la respuesta inmune (Ahn *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2005) o sensibilice a radio- o quimioterapia (Wybranietz *et al.*, 2001; Huh *et al.*, 2003). (3). Otra estrategia interesante ha sido la creación de adenovirus que replican preferentemente en células transformadas por VPH; esto puede ser posible si mutaciones en los genes tempranos

E, que afectan la replicación adenoviral, son complementadas por la presencia de oncogenes de VPH. Dicha estrategia es mejor conocida como viroterapia oncolítica (Shillitoe, 2006).

1.2 Una nueva estrategia de terapia génica contra el cáncer

1.2.1 Estructura genética del adenovirus

El adenovirus es un partícula icosaédrica no envuelta, con un tamaño de alrededor de 70-90 nm, una cubierta proteica externa y un nucleocápside interna. Las caras de la cápside están compuestas de trímeros de la proteína hexon, como también de algunos componentes menores (pIIIa, pVI, pVIII y pIX). Los vértices de la cápside contienen la base pentón responsable de la unión de los viriones a la superficie celular. La nucleocápside del adenovirus contiene el DNA viral como también pV, mu y la proteína tipo histona pVII. El genoma es un DNA de doble cadena lineal de aproximadamente 36 kb de largo. Cada extremo del genoma tiene una repetición terminal invertida (ITR) de 100-140 pb a la cual la proteína terminal se encuentra covalentemente unida. Los genes son codificados en ambas cadenas de DNA en una serie de unidades de transcripción sobrelapadas (figura 2). Los viriones también contienen aproximadamente 10 copias de la proteasa adenoviral, una cisterna endopeptidasa que rompe muchas de las preproteínas estructurales en su forma madura al final de la etapa de ensamblaje viral (McConnell e Imperiale, 2004).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

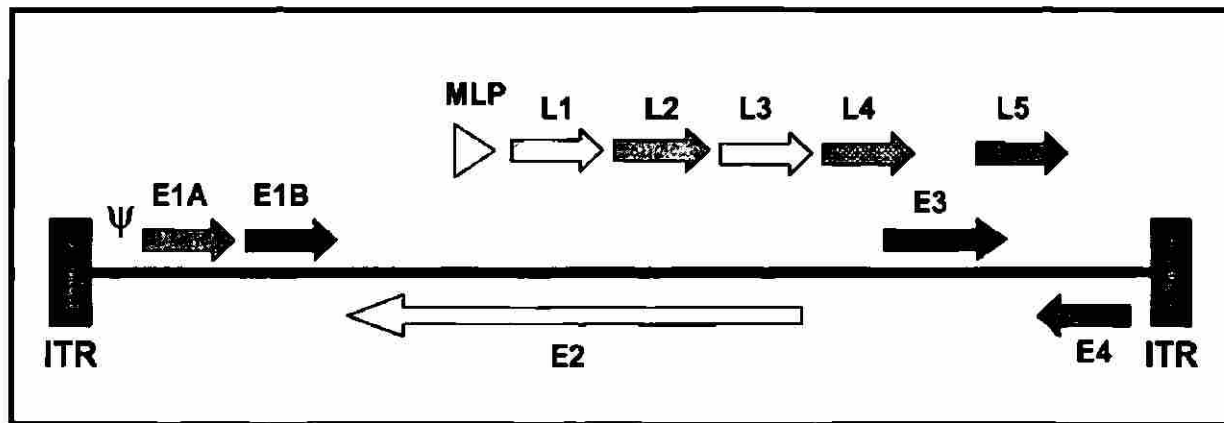


Figura 2. Mapa del genoma adenoviral y unidades de transcripción. A los extremos se encuentran las regiones ITR izquierda y derecha, (Ψ) señal de encapsidación, unidades de transcripción tempranas (E1A, E1B, E2, E3 y E4) y la unidad de transcripción tardía mayor (promotor tardío mayor [MLP], L1-L5).

1.2.2 Viroterapia oncolítica

La terapia génica busca tratar el cáncer mediante la introducción de genes que podrían matar células tumorales, mediante su sensibilización a otras terapias. Muchas de las estrategias de terapia génica emplean virus no replicativos para evitar el riesgo de diseminación viral descontrolada. Estos virus no replicativos[®] pueden ser capaces de transferir alguna característica a la célula tumoral, como la capacidad de restablecer los mecanismos de corrección de daño al DNA, responder a agentes citotóxicos administrados, inhibir la capacidad de desarrollar nuevos vasos sanguíneos o mejorar la respuesta inmune contra células tumorales (Wadhwa *et al.*, 2002). Si una de las metas es eliminar células neoplásicas, se puede aprovechar la citotoxicidad inherente a la replicación viral. Así pues, al infectar una célula y una vez que se ha completado el ciclo viral, se puede inducir la lisis de la célula huésped, permitiendo además la diseminación de nuevas partículas virales a otras células (figura 3) La idea de emplear virus de replicación selectiva en la batalla contra el cáncer se denomina viroterapia oncolítica. Una gran variedad de virus con potencial terapéutico están bajo

estudio, estos pueden dividirse en dos grupos: cepas de virus oncolíticos silvestres y virus con modificaciones genéticas para lograr selectividad tumoral (Everts y van der Poel, 2005).

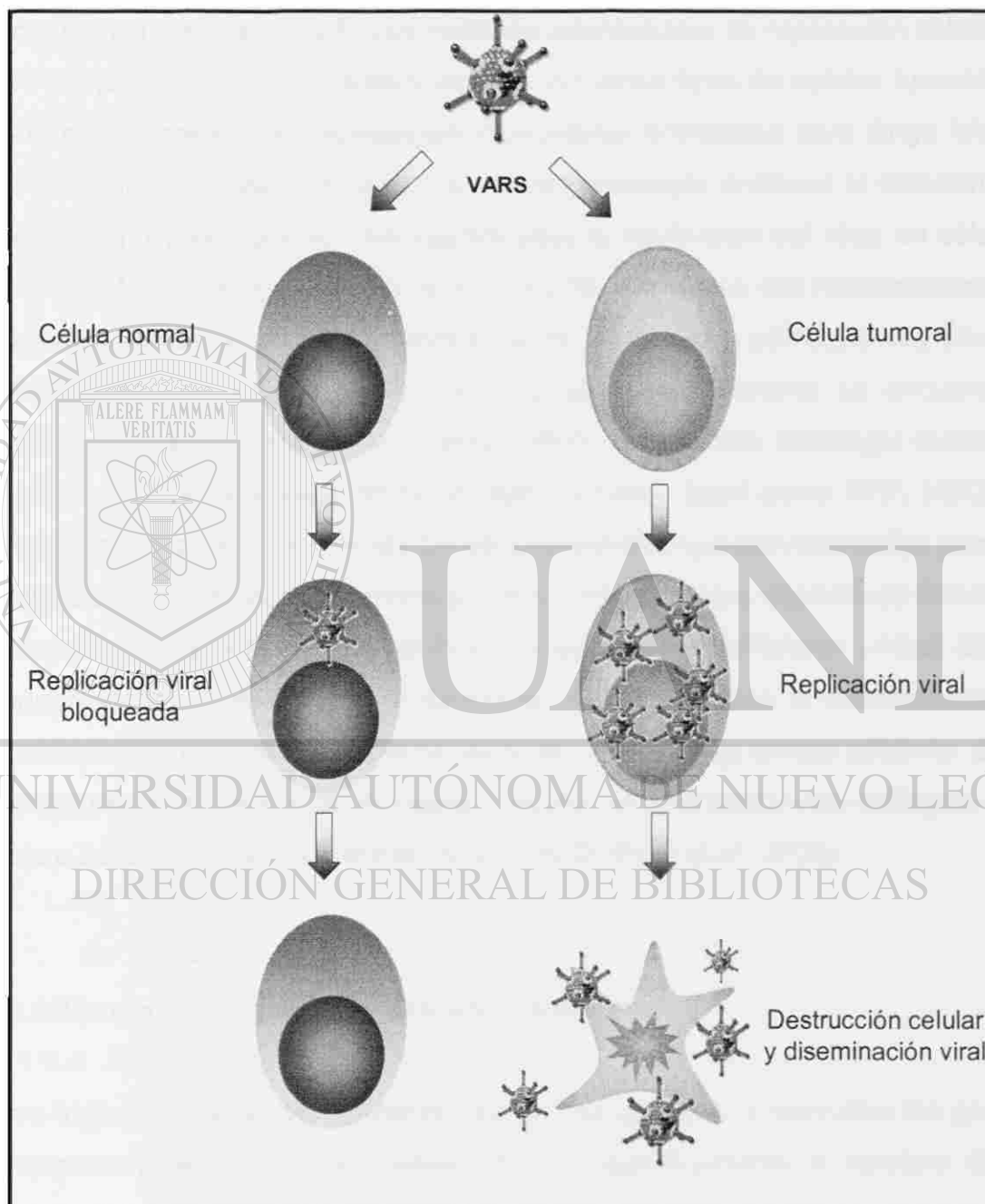


Figura 3. Mecanismo de acción de VARS sobre células tumorales.

1.2.3 Estrategias moleculares de la viroterapia oncolítica

Uno de los virus más ampliamente estudiados han sido los adenovirus, en particular los serotipos 2 y 5. Los vectores adenovirales de replicación selectiva (VARS), pueden replicarse selectivamente en varios tipos de células tumorales. Se han desarrollado dos estrategias moleculares principales para dirigir VARS directamente a células tumorales. La primera estrategia involucra la delección de genes adenovirales que son necesarios para la replicación del virus en células normales. Estos incluyen los genes *E1A* y *E1B*, los cuales son responsables de la inactivación de las proteínas supresoras de tumor pRb y p53 (Ludlow y Skuse, 1995; Green y Seymour, 2002), cuyos genes frecuentemente se encuentran mutados en células cancerosas (Jones, 1990). La segunda estrategia involucra el uso de promotores específicos de tejido o tumor, tales como AFP, MUC1 y PSA, para dirigir la expresión de genes adenovirales que son esenciales para la replicación. Este avance, sin embargo, está limitado a tipos específicos de tumor que expresan los antígenos específicos correspondientes (Robson y Hirst, 2003; Sadeghi y Hitt, 2005; Kanerva y Hemminki, 2005). Así pues, la combinación de atenuación, promotores específicos de tumor y la terapia génica estándar para entrega de genes terapéuticos, pueden resultar en una interacción sinérgica que mejore así el potencial terapéutico de los VARS (Post *et al.*, 2003).

1.2.4 Atenuación de genes de replicación adenoviral

Para lograr el arresto del ambiente celular, los adenovirus expresan los genes tempranos *E1A* y *E1B*. La proteína *E1A*, específicamente el dominio CR2, compite con E2F para su unión a pRb. E2F se encarga de la expresión de genes relacionados con ciclo celular (ciclina E) y su liberación permite la progresión de G1 a S (Dahiya *et al.*, 2000; Alevizopoulos *et al.*, 2000). Por otra parte, la proteína *E1B*-55 kb es capaz de unirse e inactivar a p53, por lo que hay arresto

en apoptosis y ciclo celular (Wienzek *et al.*, 2000; Zhao y Liao, 2003). Los genes *P53* y *RB1* frecuentemente se encuentran mutados durante la tumorigénesis, manteniendo la capacidad de respuesta de inhibición de ciclo celular o apoptosis al comprometerse el DNA celular (Hickman *et al.*, 2002). Así pues, los productos de los genes *E1A* y *E1B* pueden ser eliminados en células tumorales sin perder la capacidad de replicación del adenovirus. Por otra parte, las partículas adenovirales que carezcan de las funciones de *E1A* y *E1B*, serán incapaces de replicarse en un ambiente con las funciones p53 y pRb intactas, como ocurre en las células normales (Liu y Kim, 2005; Berk, 2005). Además de genes relacionados con la replicación adenoviral, es importante considerar aquellos que permiten una mejor diseminación lateral del VARS, como el gen *E1B-19k* (Subramanian *et al.*, 2006).

El primer VARS descrito, llamado *d/1520* o ONYX-015, fue publicado por Bischoff *et al.* (1996) Este presenta una delección en el gen *E1B* que impide la expresión de la proteína *E1B-55 kd*. La estrategia es que la inactivación de p53 en células cancerosas, pero no en células normales, compensará la ausencia de *E1B-55 kd*, permitiendo la replicación adenoviral, mientras que en células normales, la función de p53 reconocerá la presencia de un agente adenoviral y se provocará la detención de ciclo celular y la resolución de la infección. ONYX-015 ya ha sido probado en más de 250 pacientes en diferentes ensayos clínicos, mostrando buena tolerancia en dosis de más de 2×10^{12} partículas virales (Kim, 2001). En un ensayo clínico, se administró ONYX-015 intratumoralmente a pacientes con tumor hepatobiliar y se demostró que el vector es seguro y bien tolerado. Algunos pacientes tuvieron evidencia de efecto anticáncer (Makower *et al.*, 2003). En otro ensayo clínico, se determinó que la inyección intratumoral en pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello recurrente producía una modesta actividad antitumoral y que además tenía efectos tóxicos leves (Nemunaitis *et al.*, 2001). Estos resultados tan divergentes muestran que la eficacia antitumoral de ONYX-015 puede depender en gran parte de las características de la neoplasia, como del paciente.

Fueyo *et al.* (2000) describieron un nuevo VARS denominado Ad- Δ 24. Este VARS presenta una delección de 24 pb en la región CR2 del gen *E1A*. Esta región resulta importante por su interacción con pRb. La mutación de este gen provoca la liberación del factor E2F y la progresión del ciclo celular de G1 a S. La ausencia de la región CR2 permite a una célula normal mantener el arresto del ciclo celular cuando es infectada por el vector.

1.2.5 Promotores tejido específico empleados en VARS

Otra estrategia para lograr la selectividad tumoral en la replicación del adenovirus consiste en la regulación de la expresión de genes adenovirales involucrados con la replicación. Los niveles de expresión de *E1A* modifican el grado de replicación adenoviral (Zheng *et al.*, 2005). Dicha regulación puede ser lograda mediante el empleo de promotores tumor o tejido específico. Los principales promotores tejido específicos se enlistan en la tabla 2 (Harrington *et al.*, 2000; Robson y Hirst, 2003). Estos promotores se encuentran bajo evaluación preclínica y clínica para su empleo en VARS. En la siguiente tabla se enlistan algunos ejemplos de VARS reportados que emplean promotor tejido específico:

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 2. Ejemplos de promotores específicos de tejido empleados en VARS.

VARS	Promotor específico de tejido	Referencia
CN706	Antígeno prostático específico	Rodríguez <i>et al.</i> , 1997
AvE1a04i	Alfa-fetoproteína	Hallenbeck <i>et al.</i> , 1999
Adv-TERTp-E1A	Telomerasa	Huang <i>et al.</i> , 2003
OV798	Antígeno carcinoembrionario	Li <i>et al.</i> , 2003
CG7870	Probasina de rata (E1A) y antígeno prostático específico (E1B)	Dilley <i>et al.</i> , 2005

1.3 Propuesta de una estrategia de viroterapia oncolítica contra el CaCU

Delgado-Enciso (2004), en su tesis doctoral, construyó una serie de VARS que presentaban deleciones en las regiones CR1 y/o CR2 del gen E1A del adenovirus humano tipo 5 (figura 4). Los ensayos de replicación y citotoxicidad arrojaron como resultado que el vector Ad-URR/E1A Δ 24 es altamente selectivo y potente en comparación a los demás VARS construidos. Además ya se ha demostrado que el VARS Ad- Δ 24 tiene una potencia similar al Ad-wt en líneas celulares VPH+ (Balagué *et al.*, 2001); sin embargo también se ha demostrado que la inclusión de promotores tejido específicos disminuyen su potencia (Majem *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2006). Es por eso que en el presente trabajo se planteó la construcción de un VARS Ad-URR/E1Awt, completando así la colección de VARS en los que se incluye el promotor URR. Así pues, se evaluaron los VARS que presentan las modificaciones individuales (Ad-URR/E1Awt y Ad- Δ 24) y el VARS con la combinación de ambas modificaciones (Ad-URR/E1A Δ 24), con la finalidad de determinar la aportación en términos de potencia y selectividad de las modificaciones (figura 5). Es importante resaltar que estos resultados

proveen más datos en términos de bioseguridad para el empleo del VARS Ad-URR/E1A Δ 24 con miras a un futuro tratamiento de paciente con CaCU en estadios avanzados, ya que el VARS propuesto tiene la capacidad de atacar tumores primarios y también tiene la posibilidad de diseminarse y atacar metástasis sistémicas

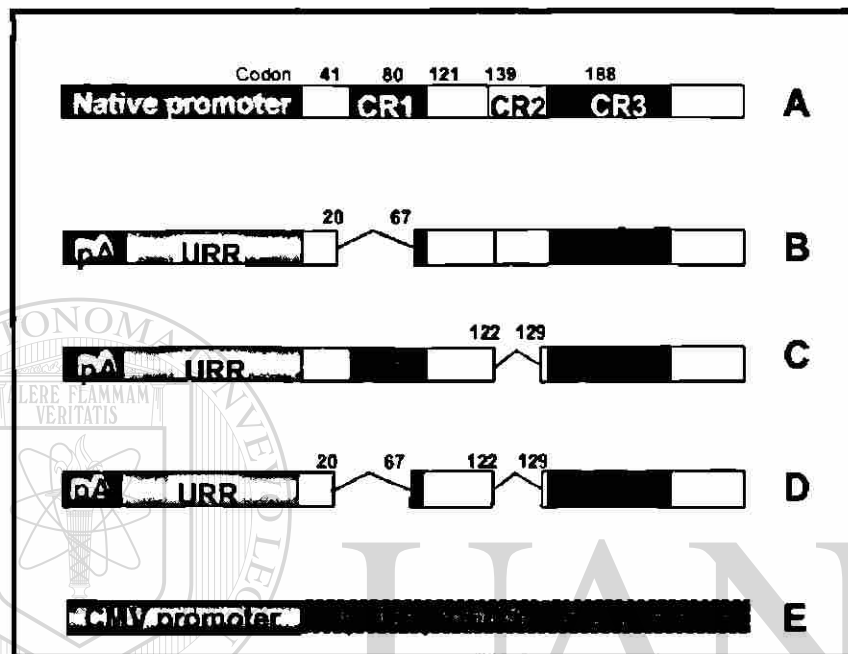


Figura 4. Construcciones adenovirales reportadas por Delgado-Enciso (2004). (A) Ad-wt. (B) Ad-URR/E1ACR1-. (C) Ad-URR/E1A Δ 24. (D) Ad-URR/E1ACR1- Δ 24. (E) Ad- β gal.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

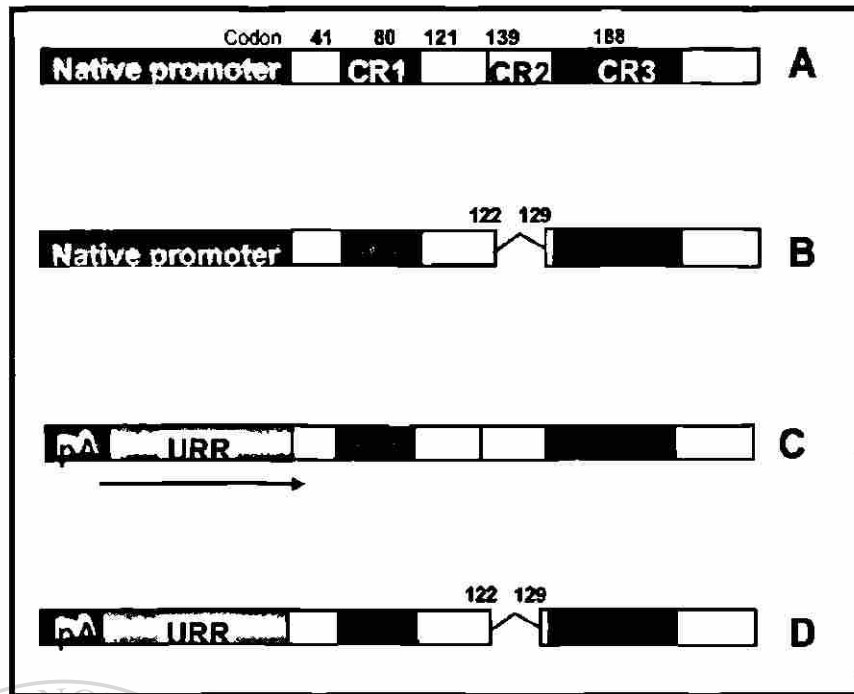


Figura 5. Construcciones adenovirales incluidas en este trabajo. (A) Ad-wt. (B) Ad- Δ 24. (C) Ad-URR/E1Awt. (D) Ad-URR/E1A Δ 24.

1.4 Justificación

El Laboratorio de Terapia Génica cuenta con una serie de VARS para el tratamiento de neoplasias VPH+. Estos VARS presentan como modificaciones el promotor URR y/o una deleción en el gen E1A (Δ 24). En este trabajo se desea estudiar si ambas modificaciones incrementan el poder oncolítico y la selectividad por mecanismos aditivos o sinérgicos. Los resultados de estos estudios nos permitirán tener más datos preclínicos de bioseguridad y eficacia terapéutica con miras a futuras aplicaciones clínicas.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar si la expresión del gen E1A Δ 24 bajo la regulación del promotor URR en un VARS incrementa la eficacia oncolítica y la especificidad replicativa de manera aditiva o sinérgica.

2.2 Objetivos específicos

1. Construir un vector adenoviral de replicación selectiva en el cual la expresión del gen E1A se encuentre regida por el promotor URR y preparar una colección de VARS que portan una sola de las modificaciones a estudiar (URR y Δ 24).
2. Determinar, mediante ensayos de replicación viral, la capacidad replicativa[®] de los VARS en líneas celulares VPH+ y VPH-.
3. Determinar la eficacia oncolítica, mediante ensayos de citotoxicidad, de cada VARS en líneas celulares VPH+ y VPH-.

CAPÍTULO III.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material biológico

3.1.1 Células competentes y líneas celulares

Se emplearon las células competentes XL1-Blue (Stratagene, La Jolla CA) y BJ5183 (Stratagene, La Jolla CA). Se emplearon líneas celulares VPH positivas: SiHa (ATCC HTB-35™, carcinoma de células escamosas de cérvix grado II), CaSki (ATCC CRL-1550™, carcinoma epidermoide de cérvix), HeLa (ATCC CCL-2™, adenocarcinoma epitelial de cérvix) y TC-1 (CRL-2785™, epitelio de pulmón de ratón inmortalizado). Además de las líneas celulares VPH negativas: Huh7 (carcinoma hepatocelular), HepG2 (carcinoma hepatocelular), JAR (ATCC HTB-144™, coriocarcinoma de placenta), HuTu 80 (ATCC HTB-40™, adenocarcinoma de duodeno), SK-N-SH (ATCC HTB-11™, neuroblastoma) y HEK-293 (ATCC CRL-1573™, riñón embrionario humano).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.1.2 Vectores adenovirales de replicación selectiva

En este estudio se incluyó el VARS que porta el promotor URR específico de tejido epitelial con la delección en CR2 en el gen E1A, Ad-URR/E1A Δ 24, ya descritos por Delgado-Enciso (Tesis doctoral, 2004). Además se agregaron los VARS controles: Ad- Δ 24, Ad-URR/E1Awt y Ad-wt.

3.1.3 Plásmidos

El laboratorio de Terapia génica cuenta con los plásmidos pSK pA URR GFP, pSp pA GH(2.4) E1wt y pBHG10 (Microbix Biosystems, Canadá), los cuales fueron propagados en células XL1-Blue. El DNA plasmídico fue extraído por los métodos de mini y midiprep descritos por Sambrook y Russell (2001). En la figura 6 se muestran los mapas de los plásmidos indicando los sitios de restricción que fueron empleados para la caracterización.

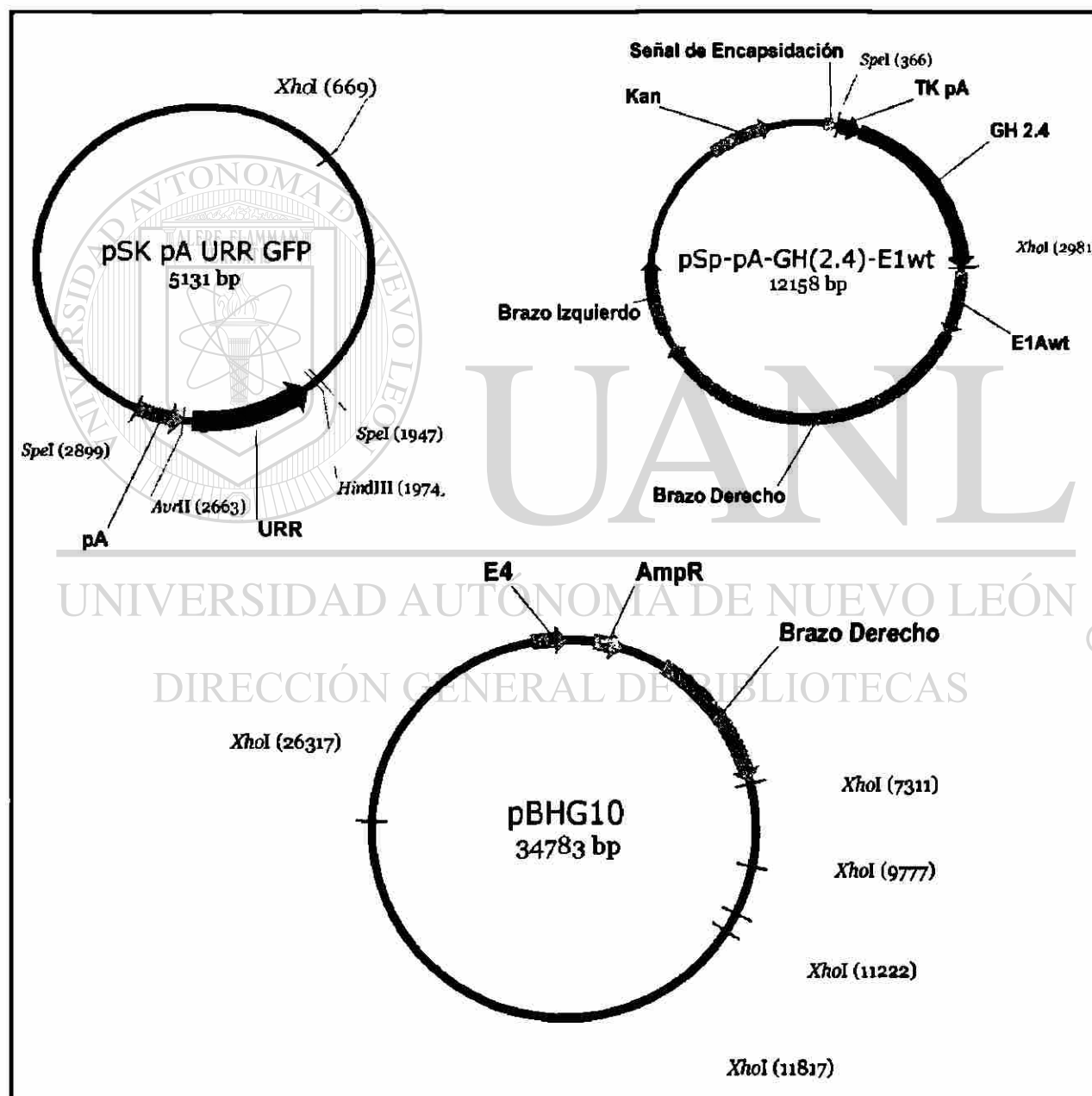


Figura 6. Mapas de plásmidos pSK pA URR, pSp pA GH(2.4) E1wt y pBHG10, los cuales fueron empleados para la generación del VARS Ad URR/E1Awt.

3.2 Materiales y reactivos

A continuación se mencionan enzimas, medios de cultivo celulares, estuches y material de plástico empleados durante el desarrollo del trabajo.

A. New England BioLabs® (Ipswich, RU)

*Hind*III

*Avr*II

*Xho*I

*Spe*I

B. EPICENTRE® Biotechnologies (Madison, WI)

MasterAmp™ Taq DNA Polimerasa

C. Promega (Madison, WI)

T4 DNA Ligasa Amortiguador Pack

D. QIAGEN (Hilden, Alemania)

Estuche QIAEX II Gel extraction

E. Invitrogen™ y Gibco® (Carlsbad, CA)

Lipofectamina™ 2000

Medio Advanced Dulbecco's Modified Eagle

Suero bovino fetal, certificado

Tripsina 0.25 %

F. Sigman-Aldrich (St. Louis, MO)

Acetato de potasio

Ácido bórico

Cloroformo

Cloruro de calcio

Dodecil sulfato de sodio

EDTA

Fenol

Fosfato dibásico de sodio

Fosfato monobásico de sodio

Glucosa

Hidróxido de sodio

G. Amresco® (Solon, OH)

Acido bórico

Agar bacteriológico

Agarosa

Cloruro de sodio

Extracto de levadura

Triptona de caseína

Tris

H. Merck (Whitehouse Station, NJ)

Alcohol etílico

Ácido acético glacial

I. Corning y Costar (Costar City, NY)

Tubos para microcentrifuga 1.5 mL

Tubos para microcentrifuga 2 mL

Puntas para pipeta 20 μ L

Puntas para pipeta 200 μ L

Puntas para pipeta 1000 μ L

Criotubos 2 mL

Botella para cultivo celular de 25 cm²

Botella para cultivo celular de 75 cm²

Botella para cultivo celular de 150 cm²

J. VWR™ (Edmonton, Canadá)

Cajas Petri 100 mm

Pipeta serológica 5 mL

Pipeta serológica 10 mL

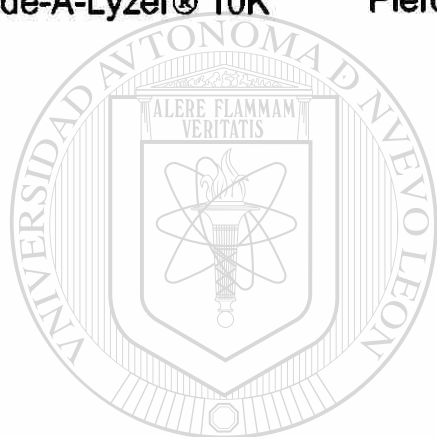
Pipeta serológica 25 mL

K. Otros

Bromuro de etidio Amersham Bioscience (Piscataway, NJ)

Azul Alamar Biosource International (Camarillo, CA)

Slide-A-Lyzer® 10K Pierce (Rockford, IL)



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.3 Estrategia general

En la figura 7 se muestra la estrategia general para la elaboración del VARS Ad URR/E1Awt así como la evaluación *in vitro*.



Figura 7. Estrategia general para la elaboración del VARS Ad-URR/E1Awt y su evaluación *in vitro*.

3.4 Construcción del plásmido pSK-pA-URR

Para la creación del plásmido pSK-pA-URR se realizó la reacción de digestión del plásmido pSK-pA en los sitios *Hind*III y *Avr*II, los cuales se encuentran en el extremo 3' de la señal de poliadenilación, ésta funciona como un aislante transcripcional al bloquear la actividad promotora de la región ITR del VARS. El fragmento correspondiente al URR se obtuvo por digestión en los sitios *Hind*III y *Avr*II del plásmido pSK-pA-URR-GFP, este fragmento tiene un tamaño molecular de 689 pb y se purificó con el estuche QIAEX II Gel extraction. El fragmento URR se ligó con el vector pSK-pA-URR y la reacción se utilizó para transformar células XL1-Blue. En la figura 8 se muestra la estrategia para la creación del plásmido pSK pA URR.

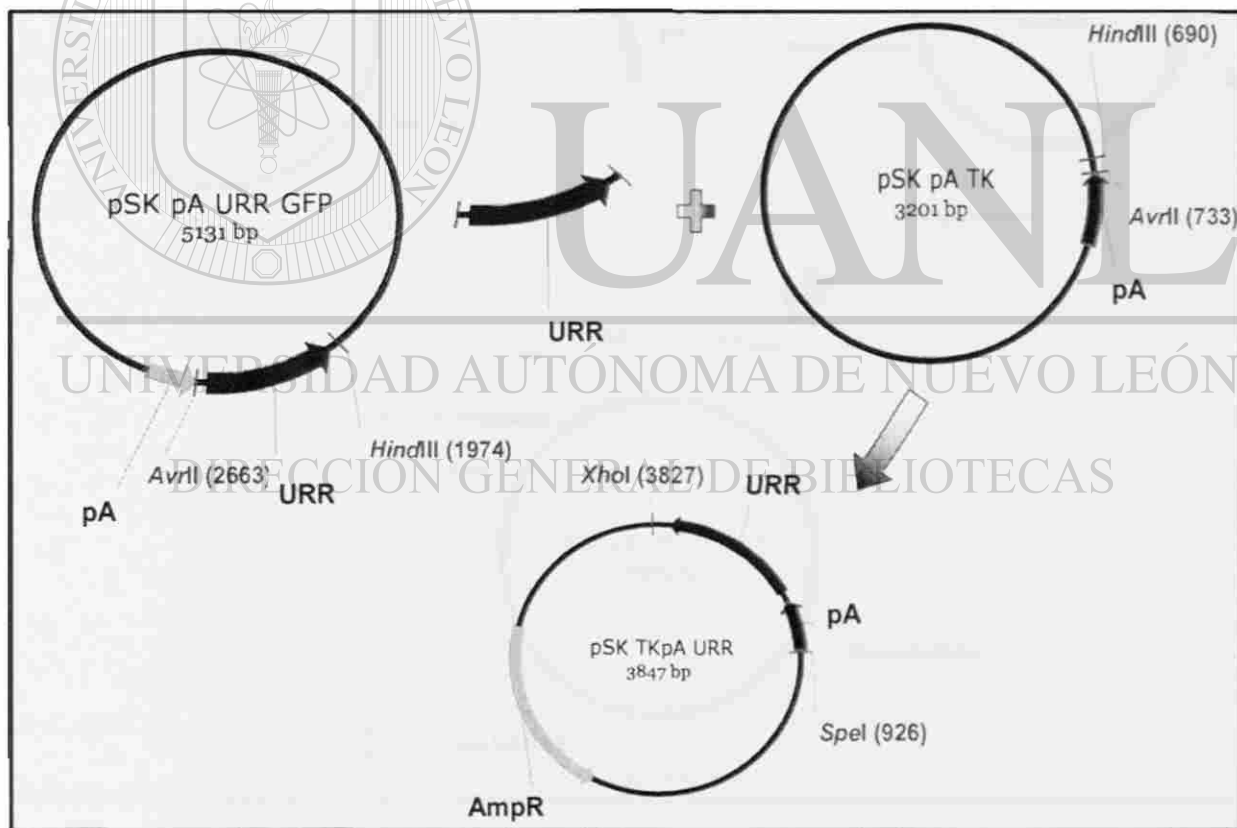


Figura 8. Estrategia para la construcción pSK-pA-URR. El fragmento URR (689 pb) fue ligado en el plásmido pSK-pA en los sitios *Hind*III y *Avr*II.

3.5 Construcción de plásmido pSp-URR/E1Awt

El vector acarreador pSp-URR/E1Awt se creó a partir del plásmido pSp-pA-GH(2.4)E1wt. El fragmento pA-URR (946 pb) se liberó mediante digestión del plásmido pSK-pA-URR en los sitios *Xho*I y *Spe*I, purificó y ligó en los sitios *Xho*I y *Spe*I del vector acarreador pSp-pA-GH(2.4)E1wt. La reacción se empleó para transformar células XL1-Blue. En la figura 9 se muestra la estrategia para la creación del vector acarreador pSp-URR/E1Awt.

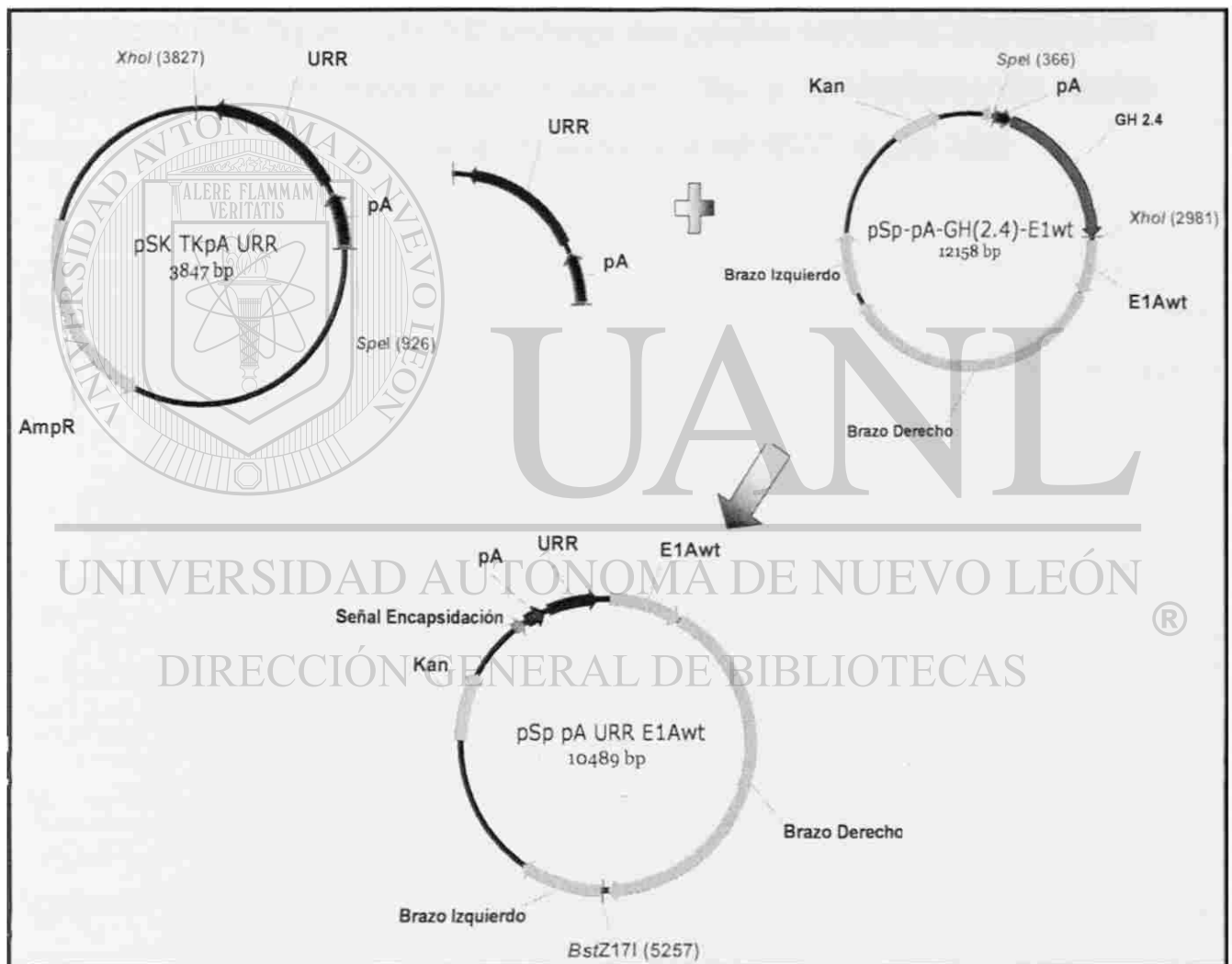
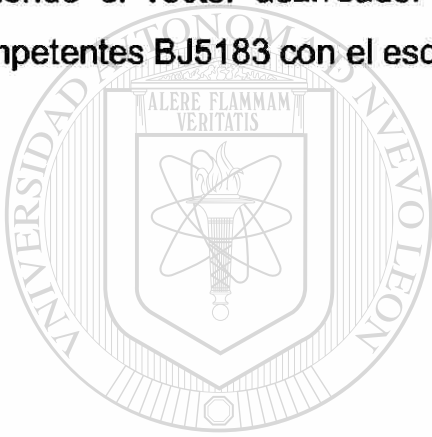


Figura 9. Estrategia para la construcción del vector acarreador pSp-URR/E1Awt. El fragmento pA-URR (946 pb) fue ligado en el plásmido pSp-pA-GH(2.4) E1wt en los sitios *Xho*I y *Spe*I.

3.6 Construcción del genoma adenoviral pAd URR/E1Awt

El vector acarreador fue abierto en el sitio único *Bst*Z17I, sin embargo se observó la liberación de un fragmento de aproximadamente 3200 pb, lo cual indicaría una mutación que generaría otro sitio *Bst*Z17I. Para verificar el lugar en el cual este sitio se encontraba se realizó un mapeo de restricción con las enzimas *Afl*III, *Bam*HI, *Stu*I, *Bgl*II y *Nae*I, llegando a la conclusión de que se trataba de una inserción de aproximadamente 1200 pb la cual se encontraba al final del gen *E1B* (figura 10A). Sin embargo fue posible realizar la recombinación abriendo el vector acarreador con la enzima *Stu*I y cotransformando células competentes BJ5183 con el esqueleto adenoviral pBHG10 (figura 10B).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

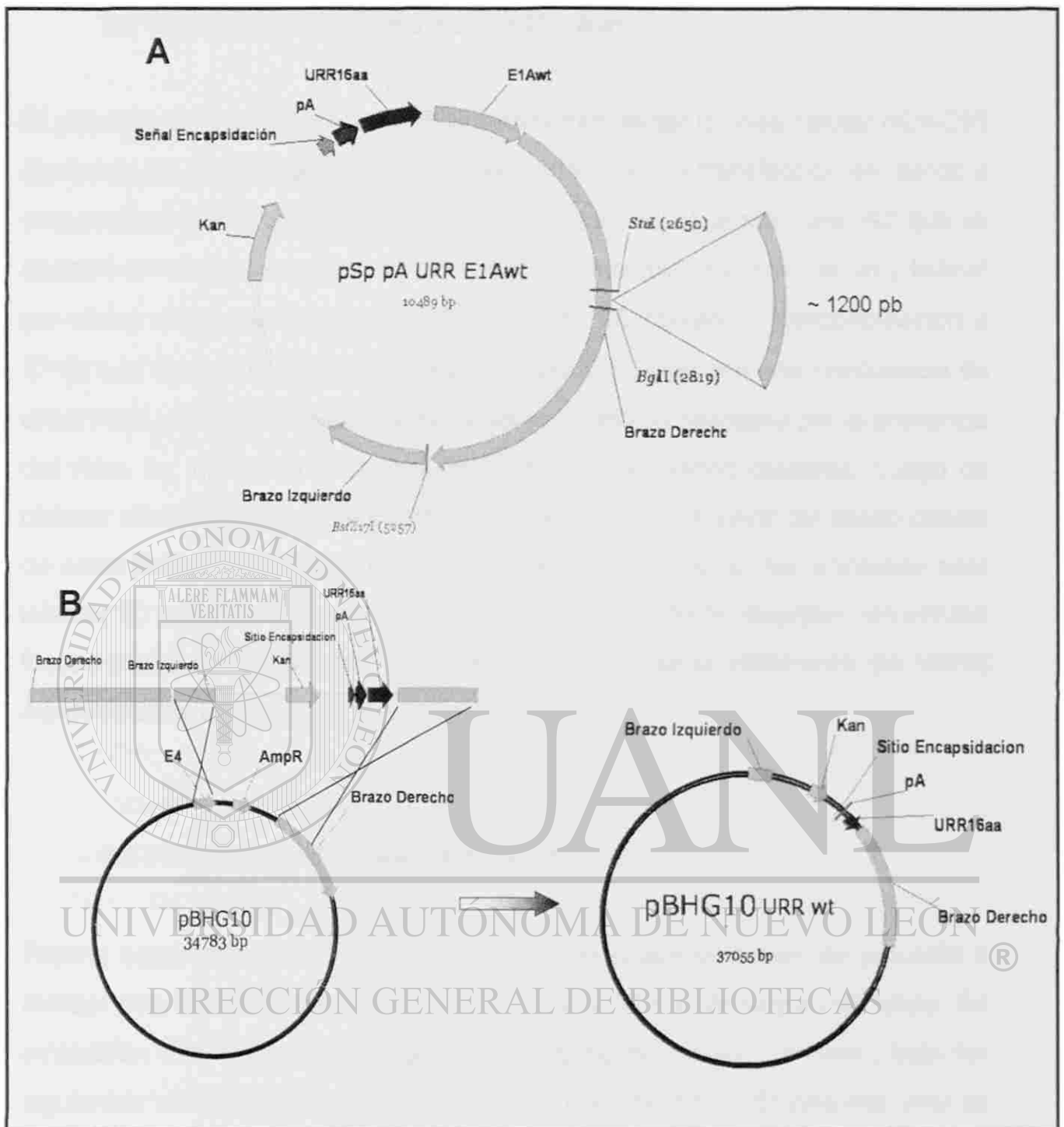


Figura 10. Generación de un genoma adenoviral pAd URR/E1Awt. Se identificó una mutación insercional de aproximadamente 1200 pb al final del gen *E1B* en el vector acarreador pSp URR/E1Awt (A). El vector acarreador pSp URR/E1Awt fue abierto en el sitio *StuI* y recombinado con el esqueleto adenoviral pBHG10 para generar el genoma adenoviral pAd URR/E1Awt (B).

3.7 Generación del VARS Ad URR/E1Awt

El plásmido pAd URR/E1Awt se utilizó para transfectar la línea celular HEK-293 siguiendo las especificaciones de la casa comercial. La transfección se realizó a una confluencia de entre 70 % y 80 % en placas de 24 pozos. Una vez que se observó un efecto de estrés por confluencia, las células se cosecharon y lisaron por ciclos de congelamiento a -70°C durante 15 minutos y descongelación a 37°C . Los lisados se emplearon para reinfectar células con una confluencia de entre 70 % y 80 %. Una vez que se observó un efecto citopático por la presencia del virus, se infectaron 3 frascos de T-25 con los lisados celulares. Luego de obtener efecto citopático, se infectaron 4 frascos T-75. A partir del lisado celular de estos frascos se infectaron 3 frascos de T-150. El lisado fue empleado para infectar 30 cajas de 150 mm. Una vez observado el efecto citopático, las células fueron cosechadas y lisadas, y se procedió a realizar la purificación del VARS Ad-URR/E1Awt.

3.8 Purificación del VARS Ad URR/E1Awt

Para la separación de las partículas virales de restos celulares, se procedió a realizar una centrifugación en un gradiente discontinuo de cloruro de cesio. Se emplearon densidades de 1.4 g/mL y 1.2 g/mL de cloruro de cesio, bajo las siguientes condiciones: $100,000 \times g$ a 4°C durante 1.5 h. El paquete viral se recuperó de la interfase y se centrifugó en un gradiente de 1.35 g/mL de cloruro de cesio. La banda correspondiente a las partículas virales completas se recuperó del resto de partículas incompletas. El volumen recuperado se dializó en un Slide-A-Lyzer® 10K (Pierce, Rockford Illinois USA) durante 1 hora a 4°C en amortiguador de diálisis (Tris 10 mM, MgCl_2 1 mM y NaCl 140 mM) realizando dos cambios de amortiguador. Una diálisis final contenía además 10 % de glicerol y se realizó la diálisis bajo las mismas condiciones. El volumen dializado se recuperó y alicuotó en crioviales a -70°C .

3.9 Titulación en placa con células HEK 293 (TCID₅₀)

En placas de 96 pozos se sembraron 2,000 células en un volumen de 100 μL. Luego de 24 h de incubación, 10 pozos se infectaron con cada una de las diferentes diluciones de la partícula viral (-6, -7, -8, -9, -10, -11, -12 y -13). Pasados 10 días de incubación se observó el efecto citopático para determinar la proporción de pozos positivos por dilución viral.

3.10 Determinación óptica de partículas virales

Se prepararon diluciones 1:2 y 1:5 (diluciones 1 y 2, respectivamente) del dializado con amortiguador de lisis viral (0.1 % SDS, 10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 1 mM EDTA). La dilución 1 se diluyó 1:5 para obtener una dilución 1:10 (dilución 3). La dilución 2 se diluyó 1:5 para obtener una dilución 1:25 (dilución 4). También se realizó una dilución 1:10 de la dilución 2 para obtener una dilución 1:50 (dilución 5) (figura 11). Además se incluyó como blanco al amortiguador de diálisis con glicerol (Tris 10 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 140 mM y glicerol 10 %) bajo las mismas diluciones de trabajo. Se determinó la densidad óptica (OD) de las siguientes diluciones: dilución 5 (dos determinaciones), dilución 4 y dilución 3. Se aplicó la siguiente fórmula para la determinación del número de partículas por OD:

$$(OD_{260}) \times (\text{Dilución viral}) \times (\text{Dilución de cubeta}) \times 1.1 \times 10^{12} = \underline{\hspace{2cm}}$$

OPU/mL

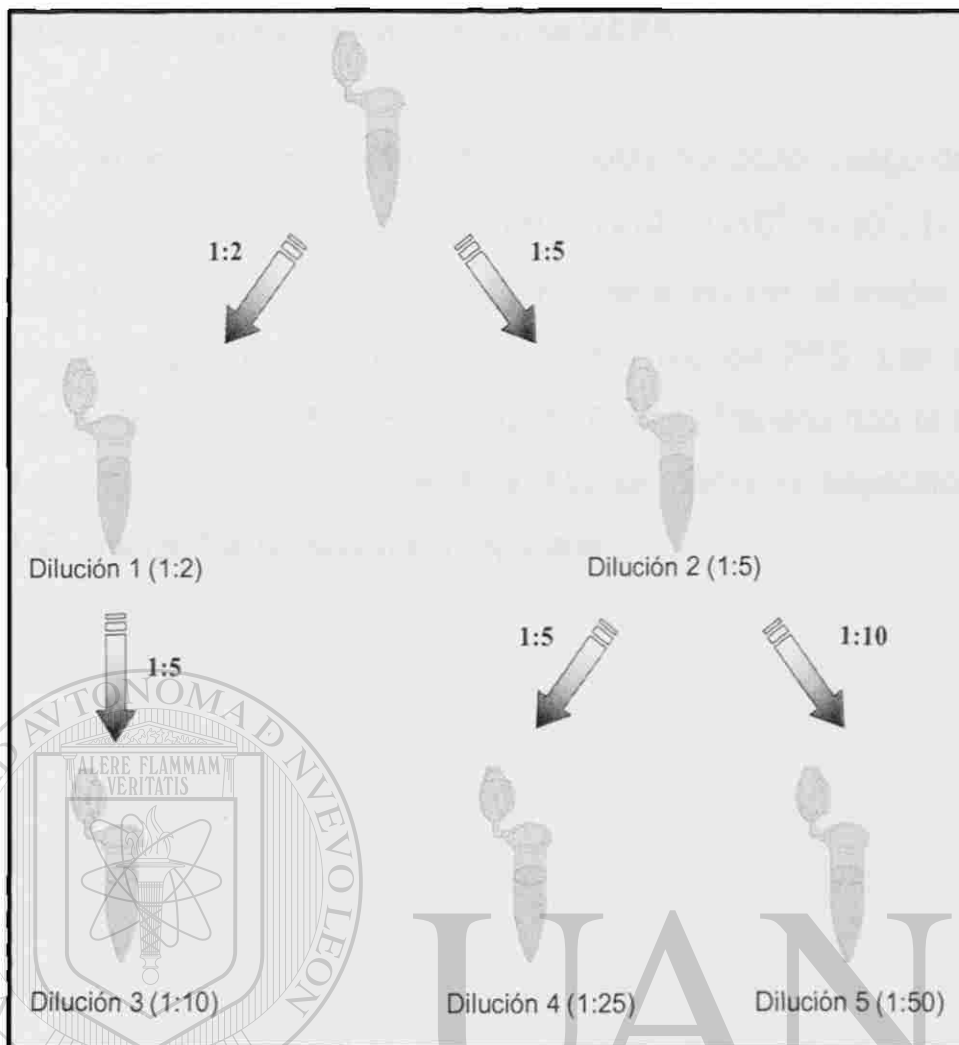


Figura 11. Preparación de diluciones para realizar cuantificación de OD 260 nm.

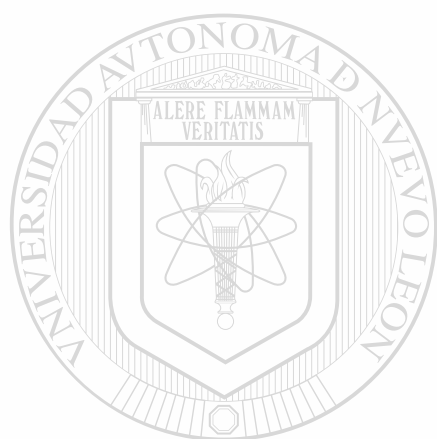
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.11 Estudio del poder replicativo de VARS

En placas de 24 pozos se sembraron 1×10^5 células por pozo. Luego de 24 h, las células se infectaron con 1×10^8 pv/mL durante 1 h. Pasada el tiempo de infección, el medio se retiró y las células se lavaron en dos ocasiones con 1 mL de PBS. Las células se incubaron con medio con 0.5 % SBF durante 48 h. Transcurrido el tiempo, las células se cosecharon y lisaron por ciclos de congelación a -70°C y descongelación a 37°C . Se determinó el título viral por ensayo en placa con células HEK 293 (TCID_{50}). El ensayo fue realizado por duplicado.

3.12 Estudio del efecto citotóxico de VARS

En placas de 96 pozos se sembraron 1×10^6 células por pozo. Luego de 24 h, las células se infectaron con 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 y 1×10^{10} pv/mL durante 1 h. Pasado el tiempo de infección, el medio se retiró y las células se lavaron en dos ocasiones con 1 mL de PBS. Las células se incubaron con medio con 0.5 % SBF durante 6 días. Transcurrido el tiempo, se realizó el ensayo de reducción de Azul Alamar como lo especifica la casa comercial. El ensayo fue realizado por triplicado.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

Los resultados que se muestran a continuación forman parte de los pasos para la generación de un vector adenoviral de replicación selectiva en líneas tumorales VPH+.

El promotor URR fue clonado en el plásmido pSK pATK, empleando los sitios *Hind* III y *Avr* II. Este plásmido contiene además del gen de resistencia a ampicilina, una señal de terminación de la transcripción que corresponde al gen de la timidita-cinasa del virus *herpes simplex*; dicha señal de terminación de la transcripción nos permite poder aislar la actividad transcripcional de un promotor heterólogo. Así pues, el promotor URR fue clonado en el extremo 3' de la señal de terminación, de manera que el promotor URR fuera asilado por su extremo 5', generando así el plásmido pSK-pATK-URR (figura 12). Las clonas fueron caracterizadas por PCR, empleando los siguientes iniciadores:

1. Forward P971 5'- TTTGCTACGTCGACTTTTTGTTTTAT-3' y
2. Reverse P972 5'- TCTTTTGGTGATCAAATGTCTGC-3'

Bajo las siguientes condiciones:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	5
2	94	1
3	52	1
4	72	1.5
5	Ir a paso 2, 30 veces	
6	72	5
7	Final	

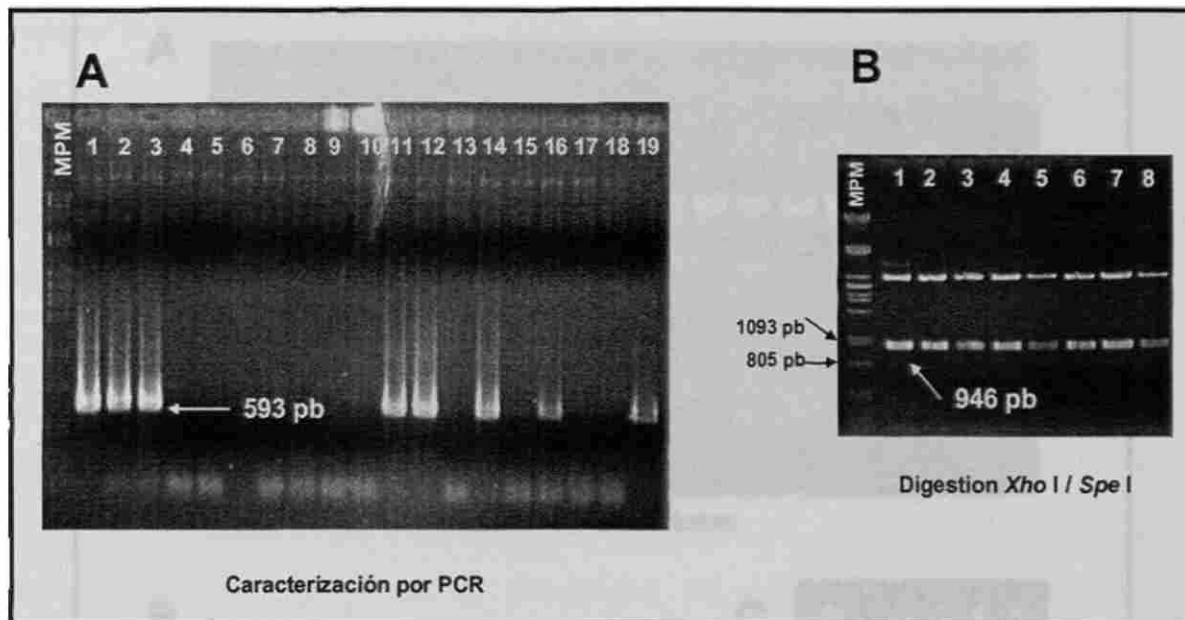


Figura 12. Generación de un plásmido pSK-pATK-URR (A) Las clonas fueron primero seleccionadas mediante PCR empleando iniciadores que amplifican la región URR de 593 pb (B) El plásmido generado fue caracterizado por restricción con las enzimas *Xho*I y *Spe*I para liberar el fragmento pA-URR.

Una vez clonado el promotor URR en el extremo 3' de la señal de poliadenilación, se procedió a la generación de un vector acarreador pSp-pATK-URR/E1Awt. Se intercambió la región promotora larga de la hormona de crecimiento humana por el fragmento pATK-URR. El fragmento pATK-GH(2.4) se liberó por corte en los sitios *Spe*I y *Xho*I y en su lugar se ligó el fragmento pATK-URR empleando los mismos sitios de restricción. De esta manera que se generó un vector acarreador pSp-pATK-URR/E1Awt, en el cuál, la actividad promotora de las regiones ITR 5' y URR se encuentran aisladas por una señal de terminación de la transcripción pA.

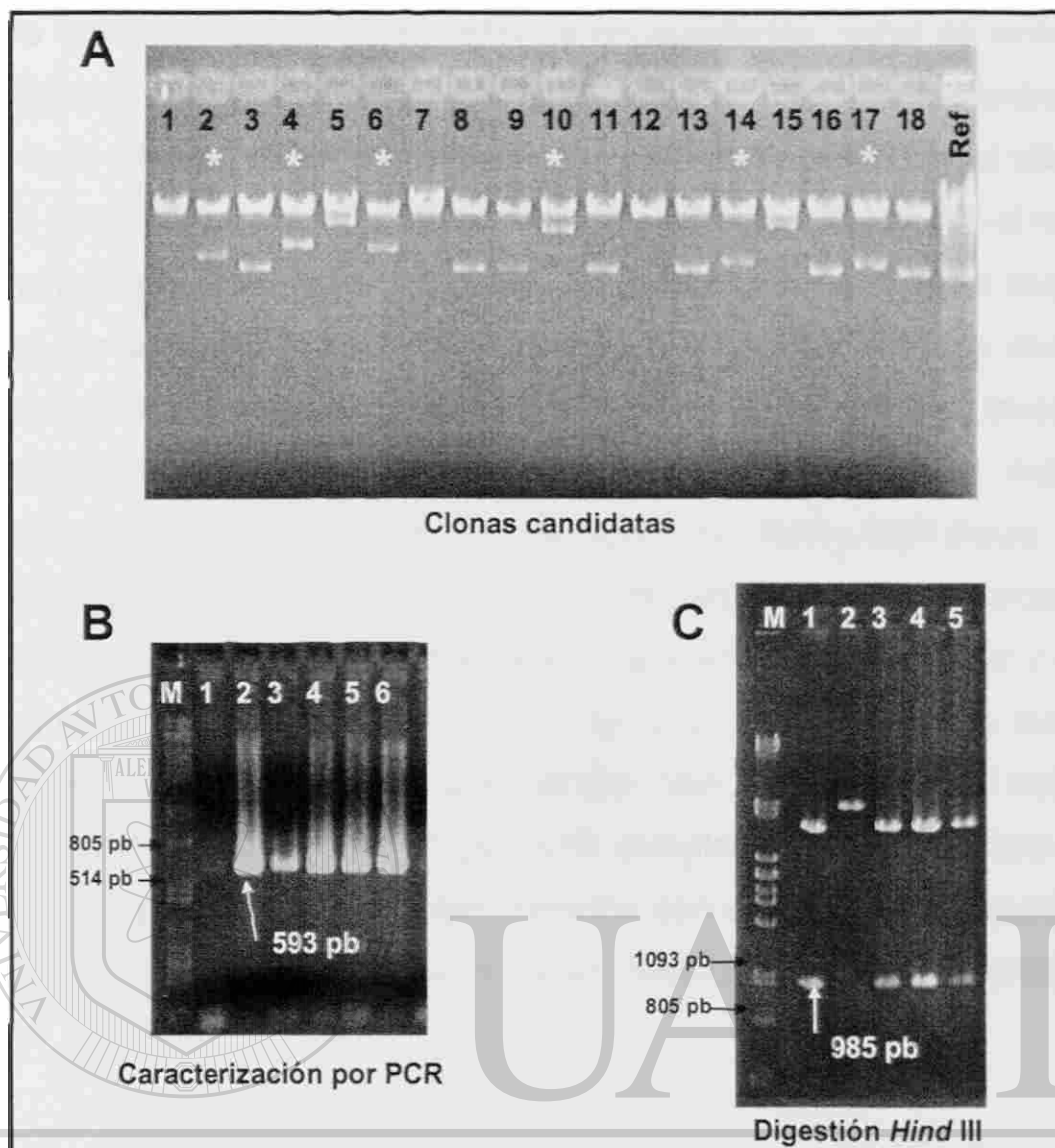
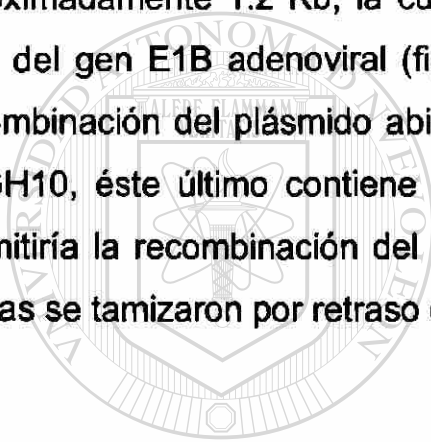


Figura 13. Generación de un plásmido acarreador pSp-pATK-URR/E1Awt (A) Las clonas se seleccionaron mediante retraso en electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. PCR. B) Se realizó PCR de las clonas retrasadas empleando primers que amplifican la región URR de 593 pb. (B) El plásmido generado se caracterizó por restricción con la enzima *Hind*III para liberar un fragmento de 985 pb.

Para generar el resto del genoma adenoviral con el promotor URR se procedió a buscar sitios únicos de restricción que permitieran abrir el plásmido pSp-pATK-URR/E1Awt separando así los dos brazos de recombinación. El brazo izquierdo incluye la región ITR 3' y el gen E4; mientras que el brazo de recombinación

derecho incluye la región ITR 5', señal de encapsidación, señal de terminación de la transcripción, promotor URR, E1Awt y parte del genoma adenoviral hasta el gen de la DNA polimerasa adenoviral. Así pues se encontró que el sitio único *BstZ171* permitiría la recombinación del vector acarreador abierto con el resto del genoma adenoviral. Sin embargo, luego de la restricción con dicha enzima se observó que se liberaba un fragmento de aproximadamente 3200 pb, por lo que claramente indicaba una mutación. Para determinar la naturaleza y localización aproximada de la mutación, se procedió a realizar un análisis de mapeo de restricción empleando las enzimas *Bam*HI, *Afl*III, *Stu*I, *Bgl*II y *Nae*I (figura 14). De esta manera se comprobó la presencia de una mutación insercional de aproximadamente 1.2 Kb, la cual se encontraba entre los sitios *Stu*I y *Bgl*II al final del gen E1B adenoviral (figura 15). Por esta razón se escogió realizar la recombinación del plásmido abierto en el sitio *Stu*I con el esqueleto adenoviral pBGH10, éste último contiene el gen E1B completo, por lo que dicha región permitiría la recombinación del brazo derecho con el plásmido acarreador. Las clonas se tamizaron por retraso de migración, restricción, PCR y secuenciación.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

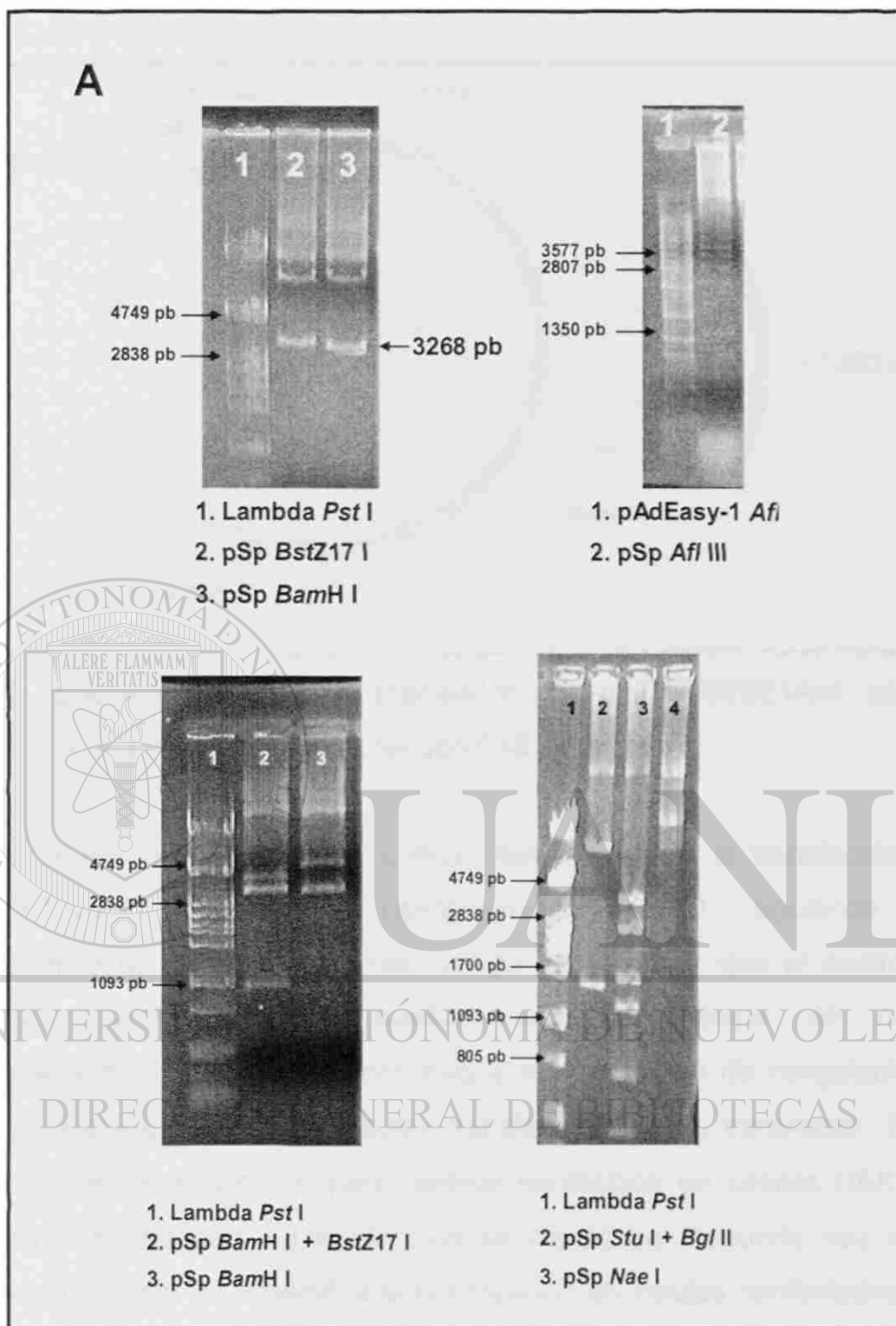


Figura 14. Presencia de una inserción en el plásmido pSp-pATK-URR/E1Awt (A) La digestión con la enzima *Bst*Z17I en un supuesto sitio único liberó un fragmento de 3200 pb aproximadamente, además se estimó el tamaño de la inserción en aproximadamente 1300 pb (B) Dicha inserción fue localizada al final del gen E1B del vector acarreador pSp-pATK-URR/E1Awt.

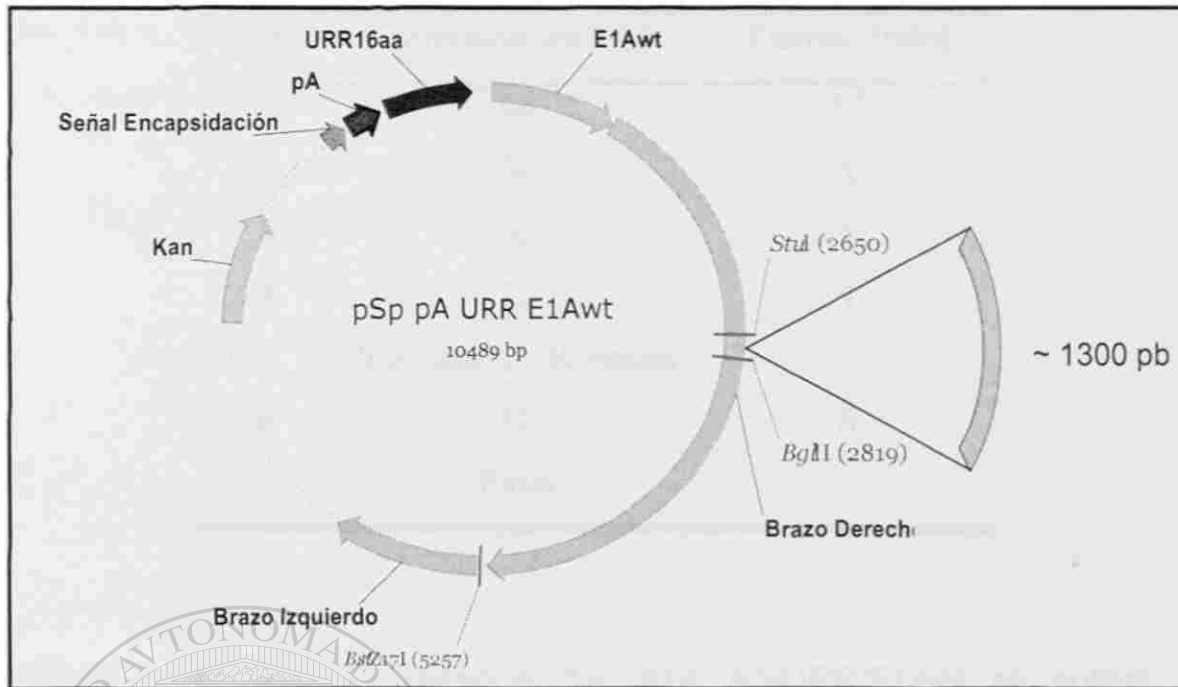


Figura 15. Esquema del vector acarreador pSp-pATK-URR/E1Awt con la localización de una inserción al final del gen E1B.

Una vez obtenido el plásmido pAd-URR/E1Awt, se realizó la transfección de células HEK-293 empleando Lipofectamina™ 2000 siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Luego de observar que el control de células sin transfectar ya mostraba daño por tiempo de cultivo (aproximadamente 1 semana), se procedió a realizar ciclos de congelación (-70°C)/descongelación (37°C) de células transfectadas y sin transfectar. Estos extractos crudos se emplearon para realizar reinfección en células HEK 293 recientemente sembradas. La reinfección se repitió por segunda vez en la misma línea celular y se observó efecto citopático en células reinfectadas con extracto transfectado y no así en células reinfectadas con extracto sin transfectar. Una vez comprobado el efecto citopático se realizó PCR para verificar la presencia del un genoma híbrido con los siguientes iniciadores:

3. Forward V1 VPH 5'-GCACTATGTGCAACTACTGAATCACTATGT-3' y
4. Reverse E1A4 5'-GTATCTCAGGAGGTGTGTTAGAAGG-3'

Bajo las siguientes condiciones:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	10
2	94	1
3	52	1
4	72	1
5	Ir a paso 2, 30 veces	
6	72	5
7	Final	

Teniendo confirmada la presencia del virus Ad-URR/E1Awt en cultivo, se realizaron escalamientos de infección hasta llegar a 30 cajas de 150 mm. De dichas cajas se realizaron ciclos de congelación (-70°C)/descongelación (37°C) para obtener un extracto crudo, del cual se realizó purificación de las partículas empleando centrifugación continua y discontinua en gradiente de cloruro de cesio y diálisis para eliminar el exceso de sales.

Una vez alicuotado el dializado adenoviral, se procedió a realizar la cuantificación óptica basada en la absorbancia del DNA. En la siguiente tabla se muestran los valores obtenidos para en vector Ad-URR/E1Awt

Tabla 3. Cuantificación óptica de VARS (OD₂₆₀).

VARS	pv/mL
Ad-URR/E1A Δ 24	2.5×10^{12}
Ad- Δ 24	5.3×10^{12}
Ad-URR/E1Awt	8.36×10^{11}
Ad-wt	5.12×10^{12}

Además de cuantificación por absorbancia se determinó el número de pfu/mL presente mediante el método de TCID₅₀ (Quantum Biotechnologies), obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 4. Valores de pfu/mL para cada VARS obtenido por TCID 50.

VARS	pfu/mL
Ad-URR/E1A Δ 24	2.5×10^{12}
Ad- Δ 24	5.3×10^{12}
Ad-URR/E1Awt	8.36×10^{11}
Ad-wt	5.12×10^{12}

Una vez conocido la cantidad de pv/mL se realizó la determinación del poder replicativo de los VARS Ad-URR/E1A Δ 24, Ad- Δ 24, Ad-URR/E1Awt y Ad-wt. El ensayo se realizó en líneas celulares VPH- (HepG2, Huh7 y HEK 293) y líneas celulares VPH+ (SiHa, CaSki y HeLa) por duplicado.

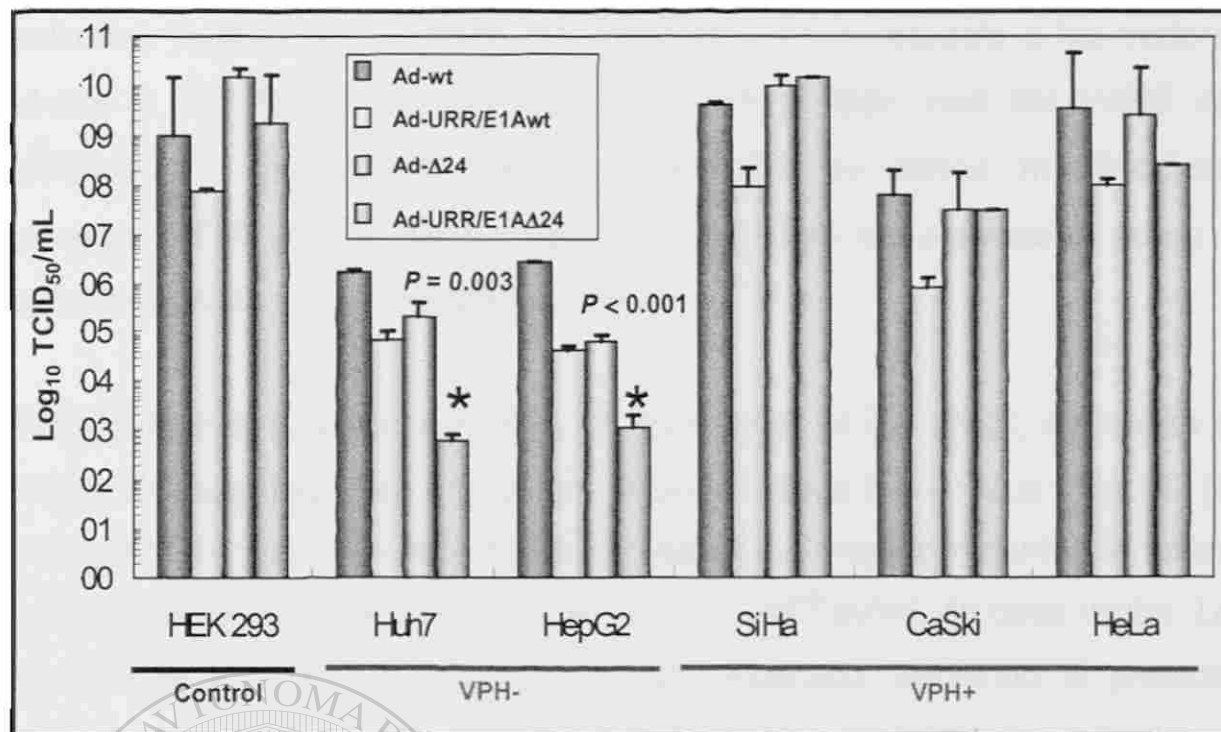


Figura 16. Determinación del poder replicativo de VARS en líneas celulares VPH + y VPH-. Se sembraron 1×10^5 células por pozo en placas de 24 pozos. Las células fueron infectadas durante 1 h y luego de 48 h se determinó la producción de partículas adenovirales por el método de TCID₅₀.

En la figura 16 se grafica las TCID₅₀ proporcionadas para cada vector en cada línea celular. Como se puede observar en las líneas VPH+, el vector Ad- Δ 24® tiene un comportamiento muy similar que el Ad-wt ($p = 0.206$), lo que corrobora con resultados previos presentados por otros autores (Balagué *et al.*, 2001). La actividad replicativa del VARS Ad-URR/E1A Δ 24 en líneas VPH+ muestra niveles replicativos similares a los vectores Ad-wt y Ad- Δ 24 ($p = 0.519$) en la línea celular SiHa. En la línea celular CaSki, tampoco se observa una modificación ni positiva ni negativa ($p = 0.165$) en la replicación por la inclusión del promotor URR. En la línea celular HeLa se muestra de nueva cuenta un alcance replicativo similar a los vectores Ad-wt y Ad- Δ 24 ($p = 0.109$).

En las líneas de origen de carcinoma hepatocelular es de resaltar que existe una diferencia significativa ($p = 0.003$ y < 0.001 , respectivamente) en el nivel

replicativo logrado por el vector Ad-URR/E1A Δ 24 con respecto a los vectores Ad- Δ 24 y Ad-URR/E1Awt. La disminución en el título viral del VARS Ad-URR/E1A Δ 24 nos indica que la combinación de ambas modificaciones (promotor URR y Δ 24) pueden permitir un efecto de atenuación sobre la replicación adenoviral en células hepáticas.

Para determinar el efecto citotóxico de cada uno de los VARS, se realizó un ensayo de citotoxicidad en el cual tres líneas celulares SiHa, HeLa y HepG2 (de origen VPH-16, VPH-18 y carcinoma hepatocelular, respectivamente) se retaron a diferentes concentraciones que iban de 10^2 a 10^{10} pv/mL de cada vector. Los ensayos de azul Alamar se realizaron por triplicado, siguiendo el protocolo señalado por la casa comercial. En la figura 17 se muestran las cinéticas de citotoxicidad obtenidas para cada vector y para cada línea celular. Como podemos observar, el comportamiento citotóxico de los VARS en líneas celulares SiHa y HeLa es muy similar, a excepción del VARS Ad-URR/E1A Δ 24 en la línea celular HeLa, en la cual se observa un drástico efecto citotóxico de dicho VARS.

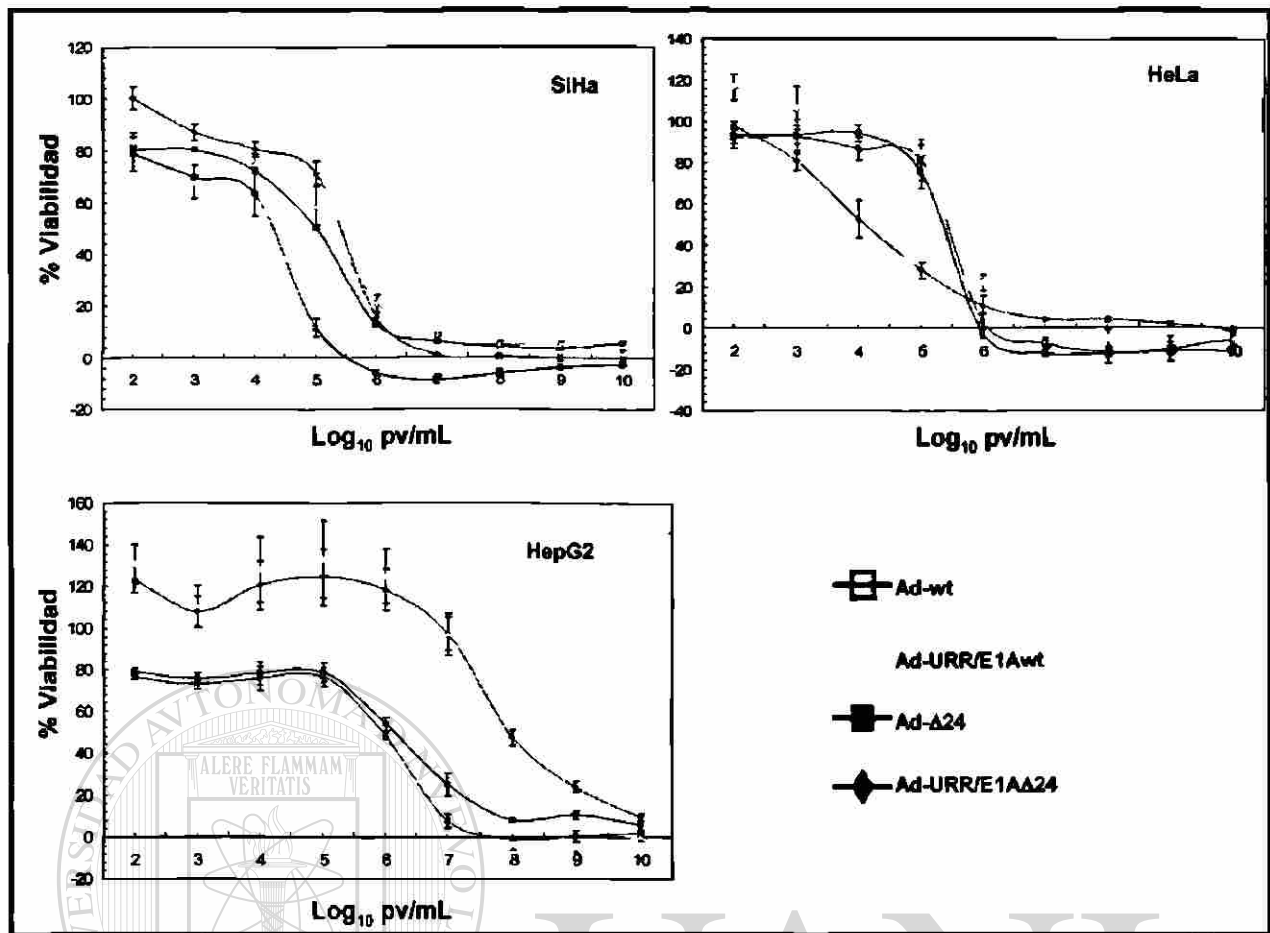


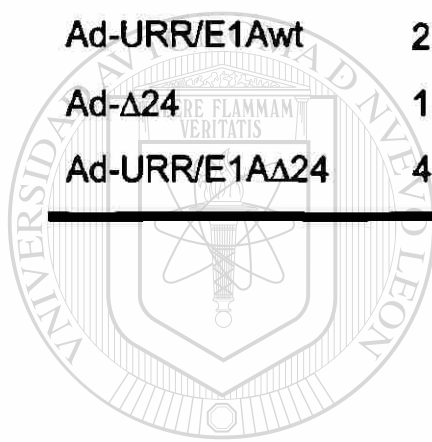
Figura 17. Ensayos de citotoxicidad en líneas VPH+ y VPH-. Se sembraron 1×10^6 células por pozo, luego de 24 h fueron infectadas con 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 y 1×10^{10} pv/mL durante 1 h. Seis días después se realizó el ensayo de reducción de azul alamar. El ensayo fue realizado por triplicado.

A partir de los resultados de citotoxicidad se determinaron las Dosis Letales 50 (DL₅₀) en cada ensayo (figura 18). Como se puede observar en la línea celular SiHa no existe una diferencia significativa ($p = 0.096$) en la letalidad de los VARS Ad-URR/E1A Δ 24 y Ad- Δ 24, lo que nos indica que la inclusión de un promotor URR no afecta su potencial citotóxico. En la línea celular HeLa, observamos un efecto citotóxico superior con el VARS Ad-URR/E1A Δ 24 que con el VARS Ad- Δ 24 ($p = 0.004$), lo que indica una capacidad citotóxica efectiva en una línea celular de origen VPH-18. En la línea celular HepG2 es evidente un claro incremento de la atenuación citotóxica en el VARS Ad-URR/E1A Δ 24 con

respecto al VARS Ad- Δ 24 ($p = 0.003$). Además es de notar que la DL_{50} para el VARS Ad-URR/E1A Δ 24 fue de 4.04×10^8 pv/mL, mientras que los valores de DL_{50} para los VARS Ad-URR/E1Awt y Ad- Δ 24 son de 2.41×10^7 y 1.02×10^6 pv/mL, respectivamente, esto indica que la DL_{50} del VARS Ad-URR/E1A Δ 24 es superior a la suma de la DL_{50} de los VARS Ad-URR/E1Awt y Ad- Δ 24, sugiriendo un efecto sinérgico de ambas modificaciones.

Tabla 5. DL_{50} de cada VARS para cada línea celular VPH- y VPH+.

	HepG2	SiHa	HeLa
Ad-wt	4.47×10^5	1.55×10^4	2.11×10^5
Ad-URR/E1Awt	2.41×10^7	1.58×10^5	2.99×10^5
Ad- Δ 24	1.02×10^6	3.22×10^4	9.49×10^4
Ad-URR/E1A Δ 24	4.04×10^8	2.11×10^5	1.73×10^4



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

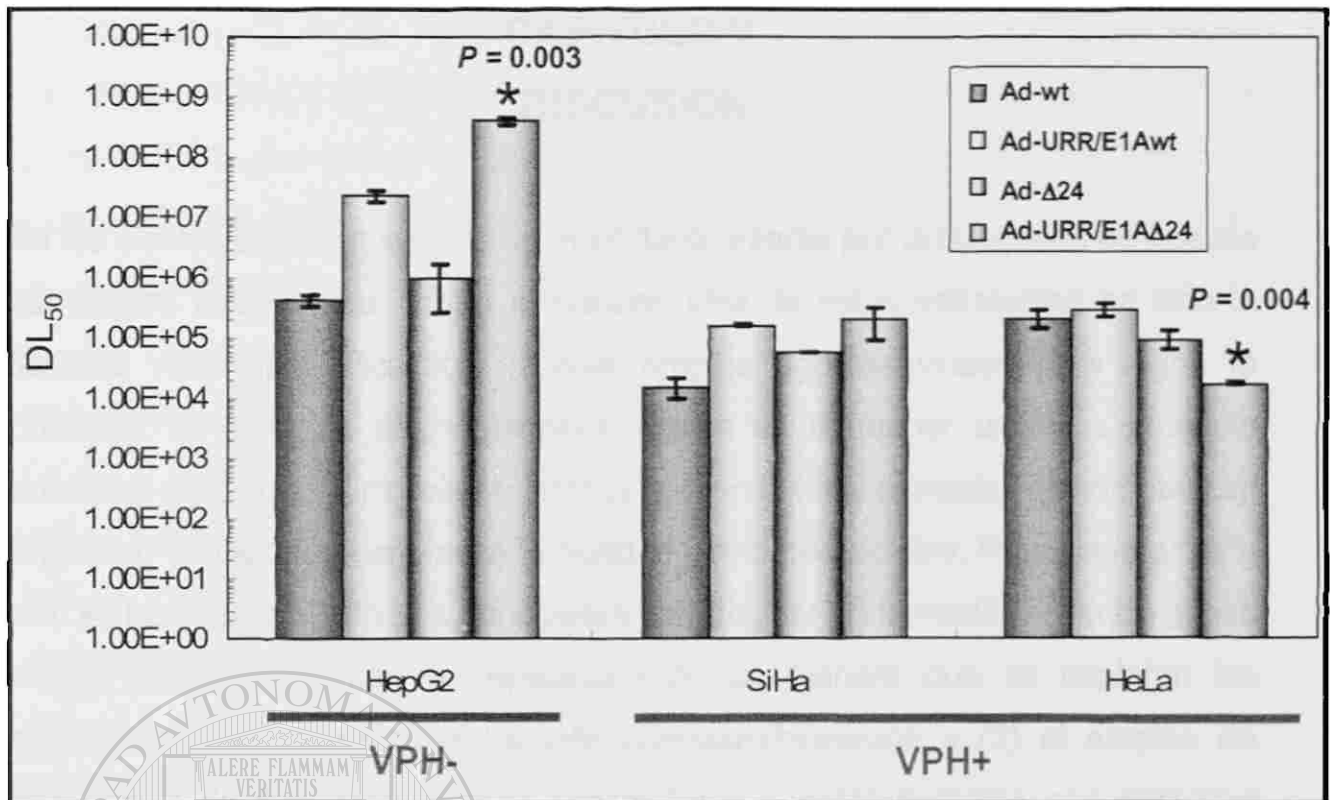


Figura 18. DL_{50} alcanzada por cada uno de los vectores en líneas celulares HepG2, SiHa y HeLa. Las DL_{50} fueron determinadas a partir de los datos de citotoxicidad relativa.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN

En los últimos años, ha surgido un importante interés por la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer. Una de estas estrategias ha sido la llamada viroterapia oncolítica, la cual emplea agentes virales para lograr la oncolisis. El ideal de estos vectores virales es mantener una alta potencia oncolítica en células tumorales mientras que en células normales dicho potencial oncolítico sea lo más cercano a la nulidad como sea posible. Para superar este reto se han desarrollado dos principales estrategias: (1) la modificación de genes virales relacionados con la replicación de tal manera que se exploten las coincidencias que existen entre infección-transformación y (2) el empleo de secuencias de DNA reguladoras (promotoras y potenciadoras) con actividad específica en células tumorales de manera que su actividad sea restringida únicamente a estas células.

En el presente trabajo se evaluaron dos modificaciones realizadas a un VARS en las que se incluye la delección del dominio CR2 en el gen E1A y la inclusión del promotor URR de VPH-16. En un trabajo previo, Delgado-Enciso (2004) construyó una serie de VARS en los cuales la expresión del gen E1A se encontraba dirigida por el promotor URR de VPH-16. Las construcciones adenovirales incluían una serie de delecciones en CR1, CR2 y CR1/CR2. La evaluación de dichas construcciones arrojó como un buen candidato para terapia del CaCU al VARS Ad-URR/E1A Δ 24, dada su potencia oncolítica en líneas celulares VPH+ y su atenuación VPH-. Sin embargo, era necesario determinar cuales eran las aportaciones individuales de cada modificación (URR y Δ 24) para de esta manera tener más datos que refuercen la bioseguridad del VARS Ad-URR/E1A Δ 24. Así pues, este trabajo se centró en la creación de un VARS Ad-URR/E1Awt en el cual la expresión del gen E1Awt se encuentra regida por el promotor URR.

La generación del VARS Ad-URR/E1Awt comenzó por la creación de un vector acarreador pSp-pAURR/E1Awt, en dicho vector se incluía la señal de poliadenilación para aislar el efecto transcripcional de la región ITR. Una vez construido este vector se procedió a realizar la recombinación con el esqueleto del genoma del adenovirus humano tipo 5 (pAdEasy-5). La digestión se realizó en el sitio único reportado *Bst*Z17I (5257 pb) para así lograr la separación de ambos brazos de recombinación. Sin embargo, se observó la presencia de una mutación que liberaba un fragmento de 3200 pb aproximadamente, lo cual no estaba reportado en la secuencia. Debido a que la mutación se encontraba al final del gen E1B adenoviral, se decidió realizar la recombinación del vector acarreador con el esqueleto adenoviral pBGH10 (Microbix Biosystems, Canadá). Una vez creado el genoma adenoviral pAd-URR/E1Awt, se procedió a la generación y purificación de las partículas virales en cultivo celular.

La evaluación de los VARS Ad-wt, Ad-URR/E1Awt, Ad- Δ 24 y Ad-URR/E1A Δ 24 se realizó determinando su potencial replicativo y citotóxico en líneas celulares HepG2 (carcinoma hepatocelular), Huh7 (carcinoma hepatocelular), HEK 293 (riñón embrionario humano), SiHa (carcinoma de células escamosas, VPH-16), CaSki (carcinoma epidermoide, VPH-16) y HeLa (carcinoma cervical, VPH-18).

Ya se ha reportado que la inclusión de promotores tejido específicos dirigiendo la expresión del gen E1A con la delección en CR2 disminuye la expresión del gen E1A (Majem *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2006), por lo que se disminuye su potencia oncolítica; sin embargo se logra la replicación limitada únicamente a aquellas células que poseen la actividad del promotor incluido en el VARS. Es por eso que los resultados en este trabajo resultan importantes en cuanto a la actividad replicativa del VARS Ad-URR/E1A Δ 24, pues la inclusión del promotor URR no cambia de manera significativa el poder replicativo del VARS Ad-URR/E1A Δ 24 con respecto a los VARS control altamente replicativos (Ad-wt y Ad- Δ 24) en líneas VPH(+). Lo que indica que el VARS Ad-URR/E1A Δ 24 mantiene la misma capacidad replicativa que aquellos VARS en los que la expresión del gen E1A se

encuentra regida por la región ITR (1 – 353 nt). Sin embargo en células VPH(-), la inclusión de ambas modificaciones atenúa sinérgicamente el poder replicativo del VARS Ad-URR/E1AΔ24 con respecto a los VARS altamente replicativos (Ad-wt y Ad-Δ24) en líneas VPH(-) de manera significativa ($p = 0.003$ y <0.001). Por lo anterior podemos argumentar que la escasa actividad del promotor URR en líneas hepáticas, le permite al VARS Ad-URR/E1AΔ24 limitar su carácter replicativo a células de carcinoma cervicouterino VPH(+).

Otro aspecto importante evaluado en este trabajo fue la citotoxicidad relativa de los VARS mencionados. Así pues se observó que la inclusión del promotor URR en el VARS Ad-URR/E1AΔ24 no afecta significativamente su capacidad oncolítica en comparación con lo mostrado por los vectores Ad-Δ24 y Ad-wt en línea celular SiHa ($p = 0.096$). Notoriamente, se observa un incremento significativo en la citotoxicidad de este VARS en células HeLa ($p = 0.004$), a pesar de que esta línea es VPH-18. Dichas modificaciones en el VARS Ad-URR/E1AΔ24 incrementan significativamente su atenuación en líneas VPH(-) ($p = 0.003$). Este efecto se debe a la sinergia de las dos modificaciones, e indica una mejoría del efecto protector de este vector por la inclusión del promotor URR.

CAPITULO VI. CONCLUSIONES

La inclusión del promotor URR dirigiendo la expresión de un gen E1A con la región CR2 deletada en el VARS Ad-URR/E1A Δ 24 no modificó de manera significativa su capacidad replicativa y citotóxica sobre líneas celulares VPH(+), manteniéndose similares a las de los vectores altamente replicativos Ad- Δ 24 y Ad-wt.

La inclusión del promotor URR en el VARS Ad-URR/E1A Δ 24 le confiere una evidente atenuación en líneas de origen hepático que no provienen de la transformación por VPH.

Gracias al amplio margen de la DL₅₀ en células VPH(+) y VPH(-) en ensayos *in vitro*, se propone al VARS Ad-URR/E1A Δ 24 como un agente terapéutico seguro para el tratamiento del CaCU.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdel-Haq, N., Chearskul, P., Al-Tatari, H., Asmar, B. 2006. New antiviral agents. *Indian J Pediatr.* 73: 313-321.
2. Ahn, W.S., Bae, S.M., Kim, T.G., Lee, J.M., Namkoong, S.E., Kim, C.K. and Sin, J.I. 2003. A therapy modality using recombinant IL-12adenovirus plus E7 protein in a human papillomavirus 16 E6/E7-associated cervical cancer animal model. *Hum Gene Ther.* 14: 1389-1399.
3. Alevizopoulos, K., Sanchez, B. and Amati, B. 2000. Conserved region 2 of adenovirus E1A has function distinct from pRb binding required to prevent cell cycle arrest by p16INK4 or p27Kip1. *Oncogene.* 19: 2067-2074.
4. Alvarez-Salas, L.M. y Lopez-Bayghen, E. 1995. Regulación genética de los papilomavirus humanos genitales. *Salud Publica Mex.* 37: 241-247.
5. Alvarez-Salas, L.M., Benitez-Hess, M.L. and DiPaolo, J.A. 2003. Advances in the development of ribozymes and antisense oligodeoxynucleotides as antiviral agents for human papillomaviruses. *Antivir Ther.* 8: 265-278.
6. Avvakumov, N., Kajon, A.E., Hoeben, R.C. and Mymryk, J.S. 2004. Comprehensive sequence analysis of the E1A proteins of human and simian adenoviruses. *Virology.* 329: 477-492.
7. Balagué, C., Noya, F., Alemany, R., Chow, L.T. and Curiel, D.T. 2001. Human papillomavirus E6E7-mediated adenovirus cell killing: selectivity of mutant adenovirus replication in organotypic cultures of human keratinocytes. *J Virol.* 75: 7602-7611.
8. Berk, A.J. 2005. Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene.* 24: 7673-7685.
9. Bernard, H.U. 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 32S: S1-S6.
10. Bischoff, J.R., Kim, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A. McCormick, F. 1996. An

- adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*. 274: 373-376.
11. Bosch, F.X. and Munoz, N. 2002. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res*. 89: 183-190.
 12. Burd, E.M. 2003. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev*. 16: 1-17.
 13. Burd, E.M. 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*. 16: 1-17.
 14. Caldeira, S., Zehbe, I., Accardi, R., Malanchi, I., Dong, W., Giarre, M., de Villiers, E.M., Filotico, R., Boukamp, P. and Tommasimo, M. 2003. The E6 and E7 proteins of the cutaneous human papillomavirus type 38 display transforming properties. *J. Virol*. 77: 2195-2206.
 15. Carr, J. and Gyorfi, T. 2000. Human papillomavirus. *Epidemiology, transmission, and pathogenesis*. *Clin Lab Med*. 20: 235-255.
 16. Clifford, G.M., Rana, R.K., Franceschi, S., Smith, J.S., Gough, G. and Pimenta, J.M. 2005. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 14:1157-1164.
 17. Dahiya, A., Gavin, M.R., Luo, R.X. and Dean, D.C. 2000. Role of the LXCXE binding site in Rb function. *Mol Cell Biol*. 20: 6799-6805.
 18. Day, P.M., Lowry, D.R. and Schiller, J.T. 2003. Papillomavirus infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology*. 307: 1-11.
 19. de Villiers, E.M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U. and zur Hausen, H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 324: 17-27.
 20. Delgado-Enciso, I. 2004. Tesis Doctoral. Generación de un vector adenoviral de replicación selectiva para cáncer cérvico-uterino. ULIEG. Facultad de Medicina. UANL.
 21. Dilley, J., Reddy, S., Ko, D., Nguyen, N., Rojas, G., Working, P. and Yu, D.C. 2005. Oncolytic adenovirus CG7870 in combination with radiation demonstrates synergistic enhancements of antitumor efficacy without loss of specificity. *Cancer Gene Ther*. 12: 715-722.

22. Everts, B. and van der Poel, H.G. 2005. Replication-selective oncolytic viruses in the treatment of cancer. *Cancer Gene Ther.* 12: 141-161.
23. Fauci, A.S., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Wilson, J.D., Martin, J.B., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L. and Jameson, J.L. 1998. *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 14th edition. McGraw-Hill. USA. pp. 609-610.
24. Fehrmann, F. and Laimins, L.A. 2003. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene.* 22: 5201-5207.
25. Felsani, A.M., Mileo, A.M. and Paggi, M.G. 2006. Retinoblastoma family proteins as key targets of the small DNA virus oncoproteins. *Oncogene.* 25: 5277-5285.
26. Florin, L., Sapp, C., Streeck, R.E. and Sapp, M. 2002. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. *J Virol.* 76: 10009-10014.
27. Fueyo, J., Gomez-Manzano, C., Alemany, R., Lee, P.S., McDonnell, T.J., Mitlianga, P., Shi, Y.X., Levin, V.A., Yung, W.K.A. and Kyritsis, A.P. 2000. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect *in vivo*. *Oncogene.* 19: 2-12.
28. Giroglou, T., Florin, L., Schafer, F., Streeck, R.E. and Sapp, M. 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparin sulfate. *J Virol.* 75:1565-1570.
29. Green, N.K. and Seymour, L.W. 2002. Adenoviral vectors: Systemic delivery and tumor targeting. *Cancer Gene Ther.* 9: 1036-1042.
30. Hallenbeck, P.L., Chang, Y.N., Hay, C., Golightly, D., Stewart, D., Lin, J., Phipps, S. and Chiang, Y.L. 1999. A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Hum Gene Ther.* 10: 1721-1733.
31. Hamada, K., Shirakawa, T., Gotoh, A., Roth, J.A. and Follen, M. 2006. Adenovirus-mediated transfer of human papillomavirus 16 E6/E7 antisense RNA and induction of apoptosis in cervical cancer. *Gynecol Oncol.* Epub ahead of print.

32. Harper, D.M., Franco, E.L. and Wheeler, C.M. 2006. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomized control trial. *Lancet*. 367:1247-1255.
33. Harrington, K.J., Linardakis, E. and Vile, R.G. 2000. Transcriptional control: an essential component of cancer gene therapy strategies?. *Adv Drug Deliv Rev*. 44: 167-184.
34. Hickman, E.S., Moroni, M.C. and Helin, K. 2002. The role of p53 and pRb in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 12: 60-66.
35. <http://dgcnesyp.inegi.gob.mx/cgi-win/sisesim.exe/NIV1100>
36. Huang, T.G., Savontaus, M.J., Shinozaki, K., Sauter, B.V. and Woo, S.L.C. 2003. Telomerase-dependent oncolytic adenovirus for cancer treatment. *Gene Ther*. 10: 1241-1247.
37. Hubert, W.G. 2005. Variant upstream regulatory region sequences differentially regulate human papillomavirus type 16 DNA replication throughout the viral life cycle. *J Virol*. 79: 5914-5922.
38. Huh, J.J., Wolf, J.K., Fightmaster, D.L., Lotan, R. and Follen, M. 2003. Transduction of adenovirus-mediated wild-type p53 after radiotherapy in human cervical cancer cells. *Gynecol Oncol*. 89: 243-250.
39. Jansen, K.U. and Shaw, A.R. 2004. Human papillomavirus vaccines and prevention of cervical cancer. *Annu Rev Med*. 55: 319-331.
40. Jin, H.S., Park, E.K., Lee, J.M., NamKoong, S.E., Kim, D.G., Lee, Y.J., Jun, H.J., Han, B.D., Bae, S.M. and Ahn, W.S. 2005. Immunization with adenoviral vectors carrying recombinant IL-12 and E7 enhanced the antitumor immunity to human papillomavirus 16-associated tumor. *Gynecol Oncol*. 97: 559-567.
41. Jones, N.C. 1990. Transformation by the human adenoviruses. *Semin Cancer Biol*. 1: 425-435.
42. Kämmer, C., Warthorst, U., Torrez-Martinez, N., Wheeler, C.M. and Pfister, H. 2000. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol*. 81: 1975-1981.

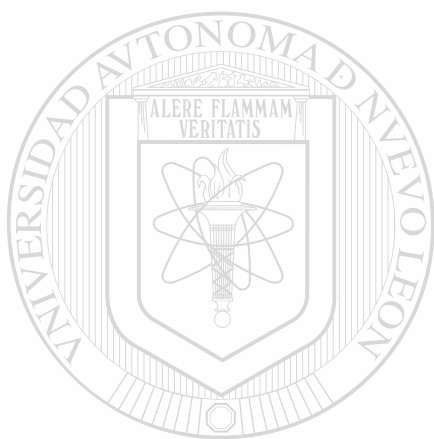
43. Kanerva, A. and Hemminki, A. 2005. Adenoviruses for treatment of cancer. *Ann Med.* 37: 33-43.
44. Keskar, V., Mohanty, P.S., Gemeinhart, E.J. and Gemeinhart, R.A. 2006. Cervical cancer treatment with a locally insertable controlled release delivery system. *J Control Release.* 115: 280-288.
45. Kim, D. 2001 Oncolytic virotherapy for cancer with the adenovirus dl1520 (Onyx-015): results of phase I and II trials. *Expert Opin Biol Ther.* 1:525-538.
46. Ledwaba, T., Dlamini, Z., Naicker, S. and Bhoola, K. 2004. Molecular genetics of human cervical cancer: role of papillomavirus and the apoptotic cascade. *Biol Chem.* 385: 671-682.
47. Li, M., Beard, P., Estes, P.A., Lyon, M.K. and Garcea, R.L. Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J Virol.* 72: 2160-2167.
48. Li, Y., Chen, Y., Dilley, J., Arroyo, T., Ko, D., Working, P. and Yu, D.C. 2003. Carcinoembryonic antigen-producing cell-specific oncolytic adenovirus, OV798, for colorectal cancer therapy. *Mol Cancer Ther.* 2: 1003-1009.
49. Lillo, F.B. 2005. Human papillomavirus infection and its role in the genesis of dysplastic and neoplastic lesions of the squamous epithelia. *New Microbiol.* 28: 111-118.
50. Liu, T.C. and Kim, D. 2005. Viruses with deletions in antiapoptotic genes as potential oncolytic agents. *Oncogene.* 24:6069-6079.
51. Ludlow, J.W. and Skuse, G.R. 1995. Viral oncoprotein binding to pRb, p107, p130, and p300. *Virus Res.* 35: 113-121.
52. Majem, M., Cascallo, M., Bayo-Puxan, N., Mesia, R., Germa, J.R. and Alemany, R. 2006. Control of E1A under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator reduces the toxicity of oncolytic adenovirus Ad-D24RGD. *Cancer Gene Ther.* 1-10.
53. Makower, D., Rozenblit, A., Kaufman, H., Edelman, M., Lane, M.E., Zwiebel, J., Haynes, H. and Wadler, S. 2003. Phase II clinical trial of intralesional administration of the oncolytic adenovirus ONYX-015 in patients with

- hepatobiliary tumors with correlative p53 studies. *Clin Cancer Res.* 9: 693-702.
54. McConnell, M.J. and Imperiale, M.J. 2004. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther.* 15: 1022-1033.
55. Morris, E.J. and Dyson, N.J. 2001. Retinoblastoma protein partners. *Adv Cancer Res.* 82: 1-54.
56. Muller, H. and Helin, K. 2000. The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta.* 1470: 1-12.
57. Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K.M., Hayakawa, H., Nguyen, C.L., Owens, M., Miranda, G. and Huh, K.W. 2004. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 78: 11451-11460.
58. Munoz, N. 2000. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol.* 19: 1-5.
59. Muñoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K.V., Snijders, P.J. Meijer, C.J., International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 348: 518-527.
60. Nemunaitis, J., Khuri, F., Ganly, I., Arseneau, J., Posner, M., Vokes, E., Kuhn, J., McCarty, T., Landers, S., Blackburn, A., Romel, L., Randlev, B., Kaye, S. and Kim D. 2001. Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 19:289-298.
61. Post, D.E., Khuri, F.R., Simons, J.W. and Van Meir, E.G. 2003. Replicative oncolytic adenoviruses in multimodal cancer regimens. *Hum Gene Ther.* 14:933-946.
62. Quantum Biotechnologies. AdEasy Vector System. Application Manual. Version 1.2. Montreal, Canada. pp. 1-53.
63. Ren, X.W., Liang, M., Meng, X., Ye, X., Ma, H., Zhao, Y., Guo, J., Cail, N., Chen, H.Z., Ye, S.L. and Hu, F. 2006. A tumor-specific conditionally

- replicative adenovirus vector expressing TRAIL for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 13: 159-168.
64. Robson, T. and Hirst, D.G. 2003. Transcriptional targeting in cancer gene therapy. *J Biomed Biotechnol.* 2003: 110-137.
65. Rodriguez, R., Schuur, E.R., Lim, H.Y., Henderson, G.A., Simons, J.W. and Henderson, D.R. 1997. Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res.* 57: 2559-2563.
66. Romanczuk, H., Villa, L.L., Schlegel, R. and Howley, P.M. 1991. The viral transcriptional regulatory region upstream of the E6 and E7 genes is a major determinant of the differential immortalization activities of human papillomavirus types 16 and 18. *J Virol.* 65: 2739-2744.
67. Sadeghi, H. and Hitt, M.M. 2005. Transcriptionally targeted adenovirus vectors. *Curr Gene Ther.* 5: 411-427.
68. Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual.* Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. p. 1.31-1.38.
69. Sanclemente, G. and Gill, D.K. 2002. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 16: 231-240.
70. Scheffner, M., Münger, K., Huibregtse, J.M. and Howley, P.M. 1992. Targeted degradation of the retinoblastoma protein by human papillomavirus E7-E6 fusion proteins. *EMBO J.* 11: 2425-2431.
71. Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. and Howley, P.M. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 63: 1129-1136.
72. Shillitoe, E.J. 2006. Papillomaviruses as targets for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 13: 445-450.
73. Simonson, S.J., Difilippantonio, M.J. and Lambert, P.F. 2005. Two distinct activities contribute to human papillomavirus 16 E6's oncogenic potential. *Cancer Res.* 65: 8266-8273.

74. Speck, L.M. and Tying, S.K. 2006. Vaccines for the prevention of human papillomavirus infections. 11: 1-3.
75. Stanley, M.A. 2005. The end for genital human papillomavirus infections? *Lancet Oncol* 6:256-257.
76. Subramanian, T., Vijayalingam, S. and Chinnadurai, G. 2006. Genetic identification of adenovirus type 5 genes that influence viral spread. *J Virol.* 80: 2000-2012.
77. Taniguchi, A., Kikuchi, K., Nagata, K. and Yasumoto, S. 1993. A cell-type-specific transcription enhancer of type 16 human papillomavirus (HPV 16)-P₉₇ promoter is defined with HPV-associated cellular events in human epithelial cells lines. *Virology.* 195: 500-510.
78. Valdespino-Gomez, V.M y Valdespino-Castillo, V.E. 2004. Perspectivas actuales en el estudio y en la atención de las pacientes con cáncer cervicouterino. *Ginecol Obstet Mex.* 72: 29-38.
79. Velazquez-Torres, A. y Gariglio-Vidal, P. 2002. Posible papel del factor de transcripción AP1 en la regulación tejido-específica del papilomavirus humano. *Rev Invest Clin.* 54: 231-242.
80. Wadhwa, P.D., Zielske, S.P., Roth, J.C., Ballas, C.B., Bowman, J.E. and Gerson, S.L. 2002. Cancer Gene Therapy: Scientific Basis. *Annu Rev Med.* 53:427-452.
81. Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J. and Munoz, N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 189: 12-19.
82. Werness, B.A., Levine, A.J. and Howley, P.M. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 248: 76-79.
83. Wienzek, S., Roth, J. and Dobbelstein, M. 2000. E1B 55-kilodaltons oncoproteins of adenovirus types 5 and 12 inactivate and relocalize p53, but not p51 or p73, and cooperate with E4orf6 proteins to destabilize p53. *J Virol.* 74: 193-202.

84. Wiley, D. and Masongsong, E. 2006. Human papillomavirus: the burden of infection. *Obstet Gynecol Surv.* 61(6 Suppl 1):S3-14.
85. Wilson, V.G., West, M., Woytek, K. and Rangasamy, D. 2002. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes.* 24: 275-290.
86. Wolf, J.K. and Ramirez, P.T. 2001. The molecular biology of cervical cancer. *Cancer Invest.* 19: 621-629.
87. Wu, M.H., Chan, J.Y., Liu, P.Y., Liu, S.T. and Huang, S.M. 2006. Human papillomavirus E2 protein associates with nuclear receptors to stimulate nuclear receptor- and E2-dependent transcriptional activations in human cervical carcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol.* Epub ahead of print.
88. Wybranietz, W.A., Gross, C.D., Phelan, A., O'Hare, P., Spiegel, M., Graepler, F., Bitzer, M., Stahler, P., Gregor, M. and Lauer, U.M. 2001. Enhanced suicide gene effect by adenoviral transduction of a VP22-cytosine deaminase (CD) fusion gene. *Gene Ther.* 8: 1654-1664.
89. Yamada, T., Manos, M.M., Peto, J., Creer, E.C., Muñoz, N., Bosch, X.F. and Wheeler, C.M. 1997. Human Papillomavirus Type 16 Sequence Variation in Cervical Cancers: a Worldwide Perspective. *J Virol.* 71: 2463-2472.
90. Zhao, L.Y. and Liao, D. 2003. Sequestration of p53 in the cytoplasm by adenovirus type 12 E1B 55-kilodalton oncoprotein is required for inhibition of p53-mediated apoptosis. *J Virol.* 77:13171-13181.
91. Zheng, X., Rao, X.M., Sodgrass, C., Wong, M., Dong, Y., McMasters, K.M. and Zhou, H.S. 2005. Adenoviral E1A expression levels affect virus-selective replication in human cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 4: 1255-1262.
92. Zhi-Ming, Z. and Baker, C.C. 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 11: 2286-2302.
93. zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2: 342-350.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



