UNIVERSIDAD AUTONÓMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

EVALUACIÓN IN VITRO DE VARS URR16aa/delta 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

TM
RC280
.U8
C47
2006
c.1

1080156863

UNIVERSIDAD AUTONÓMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

EVALUACIÓN IN VITRO DE VARS URR16aa/delta 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

B U Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS MAESTRIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

EVALUACIÓN IN VITRO DE VARS URR16aa/Δ24 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/Δ24 PARA TUMORES VPH POSITIVOS

probación de tesis:

DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ
Director de Tesis

DRA. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ
Co-Director de Tesis

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 MARTÏNEZ

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 lo momentos que pasamos juntos.

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."

Albert Einstein (1879-1955)

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 plámido pSp-URR/E1Awt 28
3.6 Construcción del genoma adenovirual 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 específicidad 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 diminuida 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 *in vitro.*	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

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	Deleción 24 pares de bases
E. coli	*Escherichia coli*
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).

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).

1.1.2 Organización genómica del VPH

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 Gyorfi, 2000; Jansen y Shaw, 2004; Ledwaba *et al.*, 2004; Simonson *et al.*, 2005).

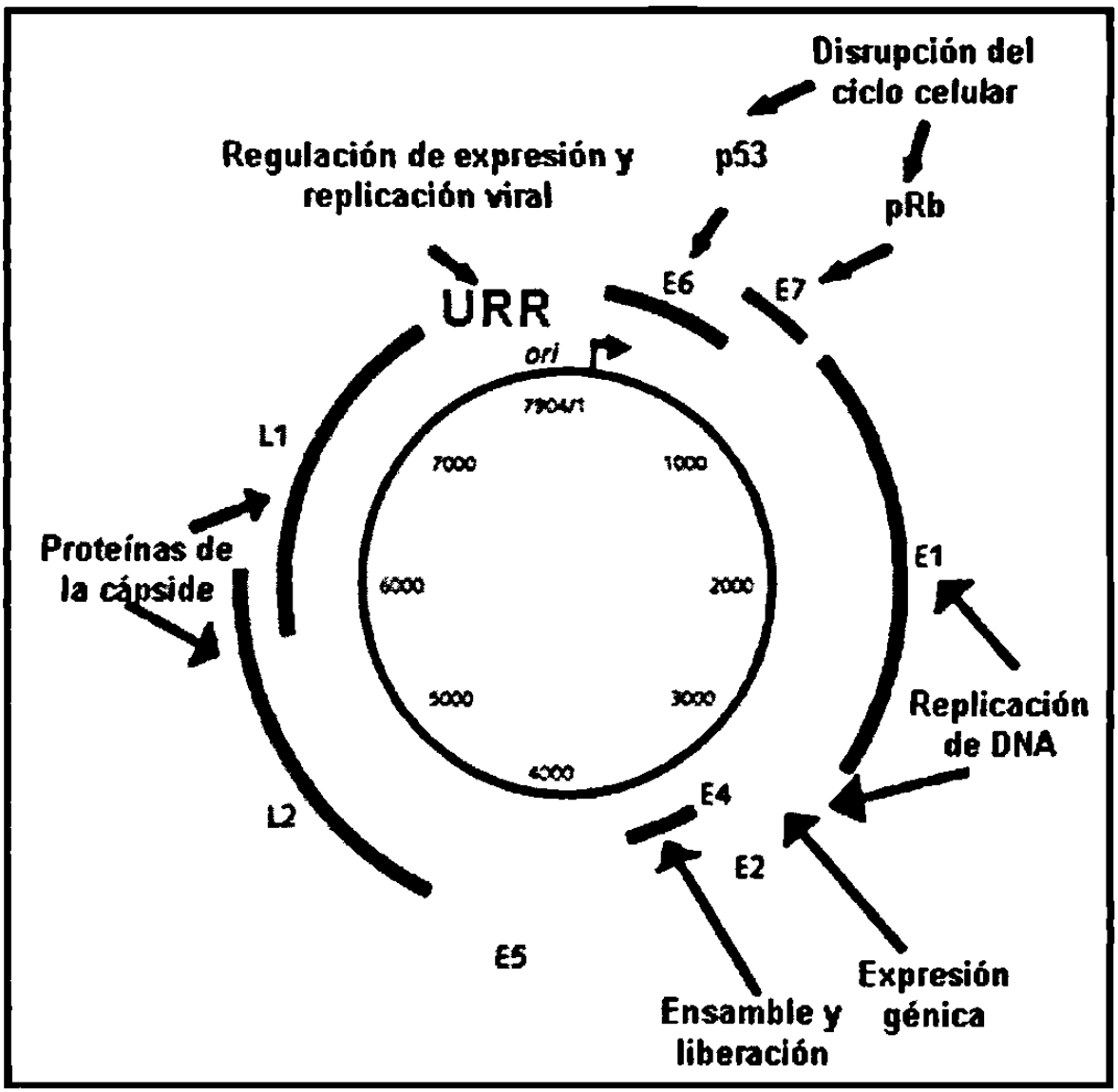

Figura 1. Organización del genoma de VPH.

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 varia 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 P_{97}. 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).

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 centríolos, 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 canceres 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 países 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 prevalerte 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 trascritos 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 L×C×E 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 L×C×E 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 quimoterapéuticos 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 icosahédrica 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).

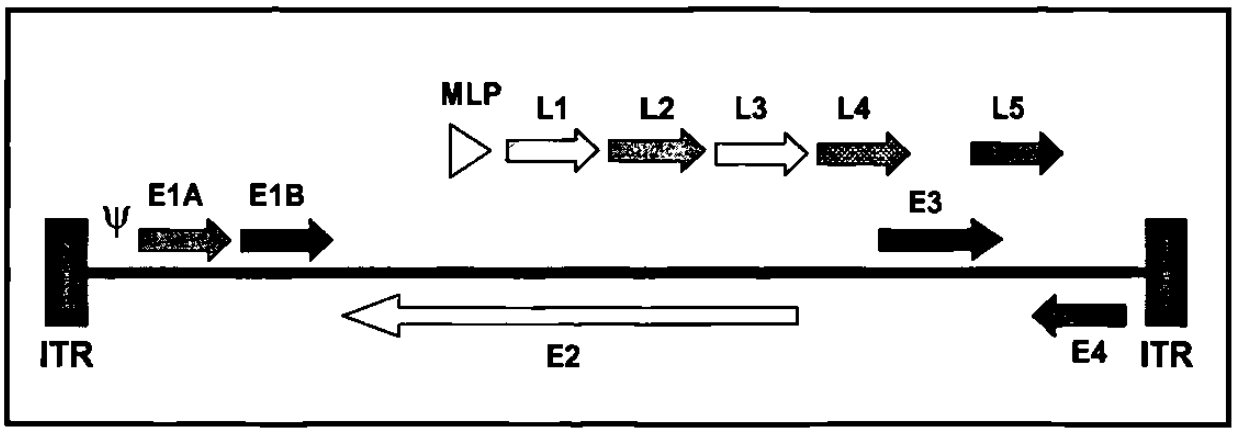

Figura 2. Mapa del genoma adenoviral y unidades de transcripción. A los extremos se encuentran las regiones ITR izquierda y derecha, (Ψ) señal de encapsidación, unidades de transcripción tempranas (E1A, E1B, E2, E3 y E4) y la unidad de transcripción tardía mayor (promotor tardío mayor [MLP], L1-L5).

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).

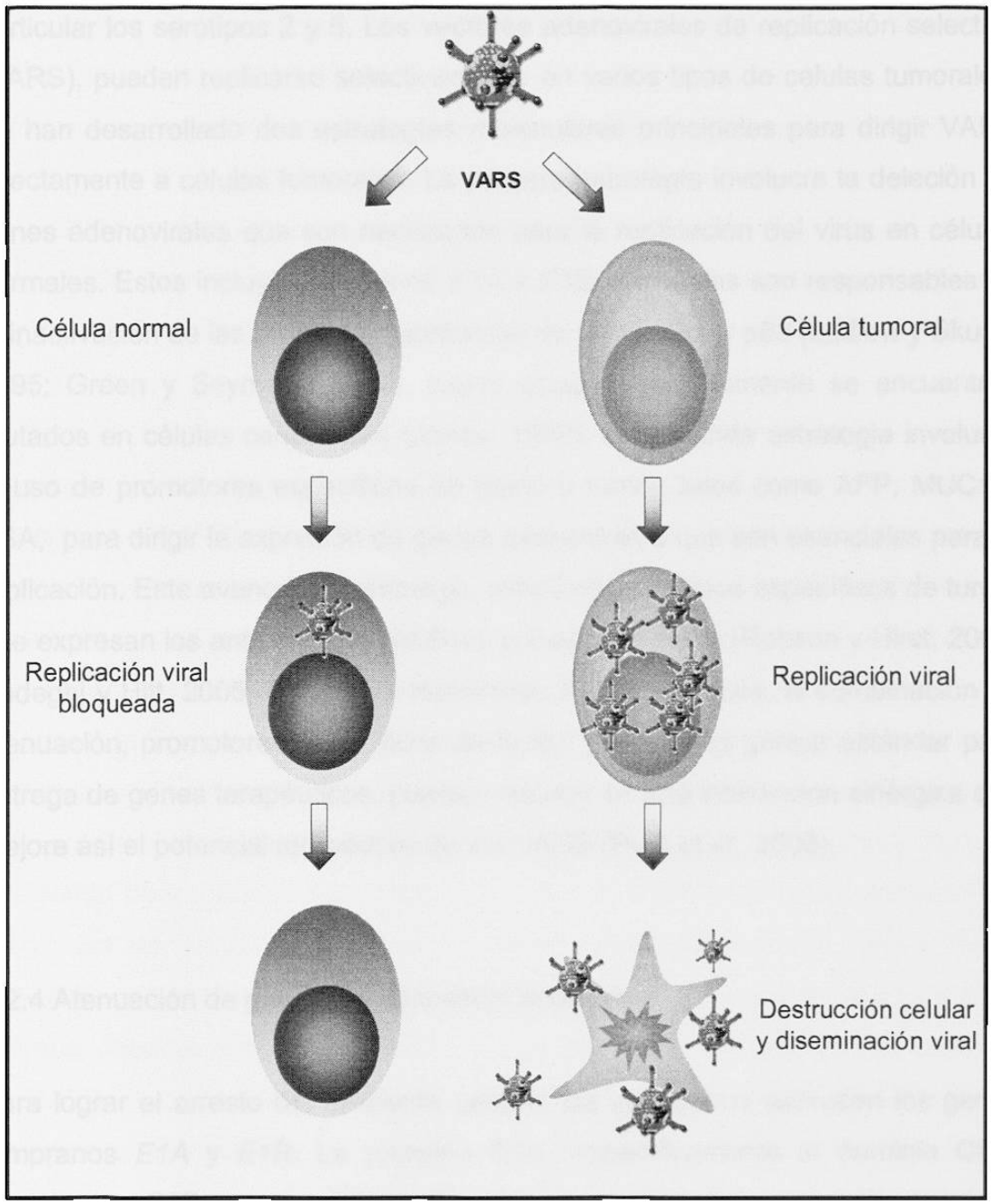

Figura 3. Mecanismo de acción de VARS sobre células tumorales.

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 deleción 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, esta 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 Kirn, 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-19*k* (Subramanian *et al.*, 2006).

El primer VARS descrito, llamado *dl*1520 o ONYX-015, fue publicado por Bischoff *et al.* (1996) Este presenta una deleción 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 (Kirn, 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-Δ24. Este VARS presenta una deleción 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:

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

VARS	Promotor específico de tejido	Referencia
CN706	Antígeno prostático específico	Rodriguez *et al.*, 1997
AvE1a04i	Alfa-fetoproteína	Hallenbeck *et al.*, 1999
Adv-TERTp-E1A	Telomerasa	Huang *et al.*, 2003
OV798	Antígeno carcinoembrionario	Li *et al.*, 2003
CG7870	Probasina de rata (E1A) y antígeno prostático específico (E1B)	Dilley *et al.*, 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/E1AΔ24 es altamente selectivo y potente en comparación a los demás VARS construidos. Además ya se ha demostrado que el VARS Ad-Δ24 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-Δ24) y el VARS con la combinación de ambas modificaciones (Ad-URR/E1AΔ24), 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/E1AΔ24 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

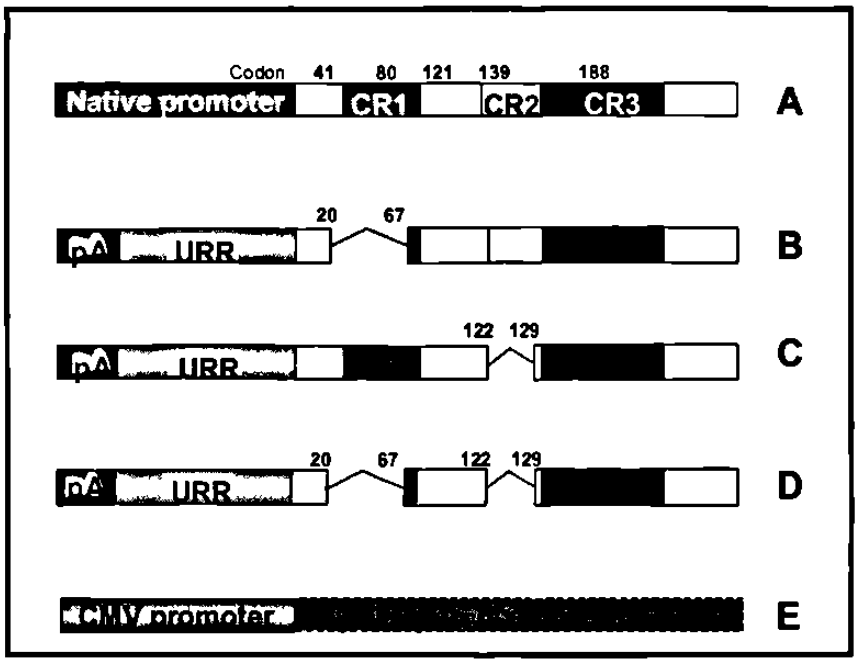

Figura 4. Construcciones adenovirales reportadas por Delgado-Enciso (2004). (A) Ad-wt. (B) Ad-URR/E1ACR1-. (C) Ad-URR/E1AΔ24. (D) Ad-URR/E1ACR1-Δ24. (E)Ad-βgal.

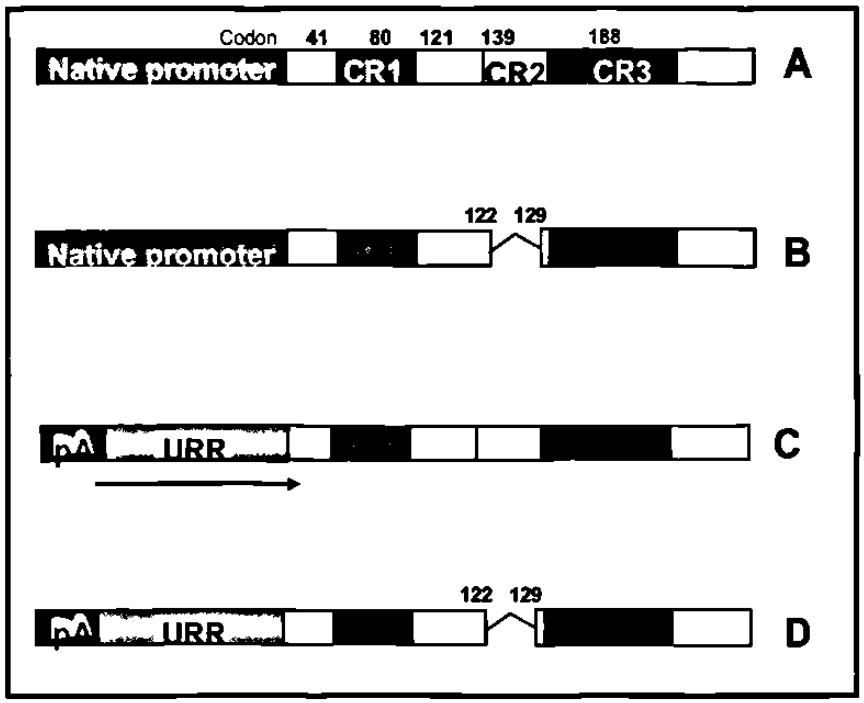

Figura 5. Construcciones adenovirales incluidas en este trabajo. (A) Ad-wt. (B) Ad-Δ24. (C) Ad-URR/E1Awt. (D) Ad-URR/E1AΔ24.

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 (Δ24). 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 E1AΔ24 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 Δ24).
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).

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 deleción en CR2 en el gen E1A, Ad-URR/E1AΔ24, ya descritos por Delgado-Enciso (Tesis doctoral, 2004). Además se agregaron los VARS controles: Ad-Δ24, 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.

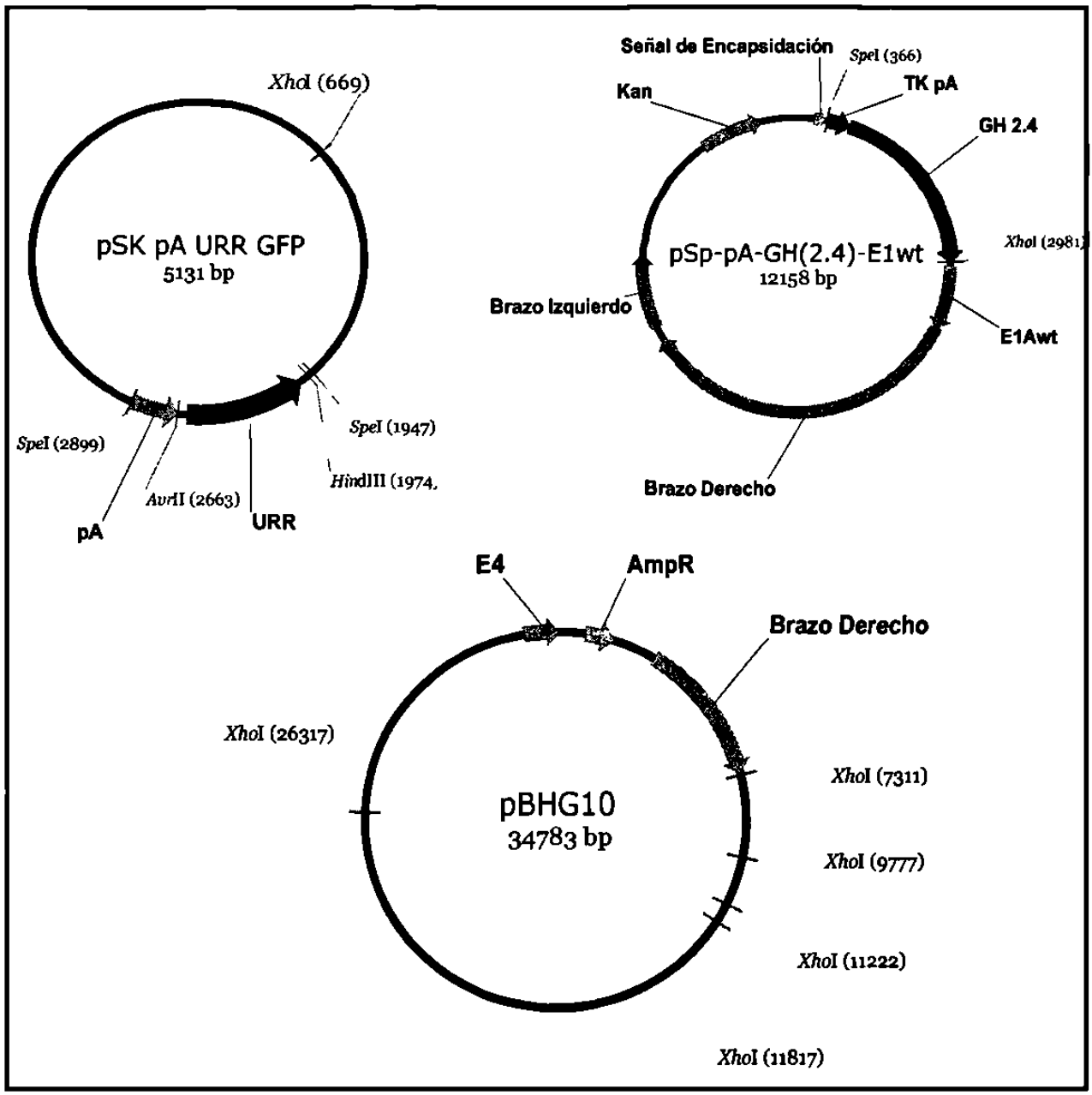

Figura 6. Mapas de plásmidos pSK pA URR, pSp pA GH(2.4) E1wt y pBHG10, los cuales fueron empleados para la generación del VARS Ad URR/E1Awt.

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 microcentrífuga 1.5 mL

Tubos para microcentrífuga 2 mL

Puntas para pipeta 20 μL

Puntas para pipeta 200 μL

Puntas para pipeta 1000 μL

Criotubos 2 mL

Botella para cultivo celular de 25 cm^2

Botella para cultivo celular de 75 cm^2

Botella para cultivo celular de 150 cm^2

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)

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*.

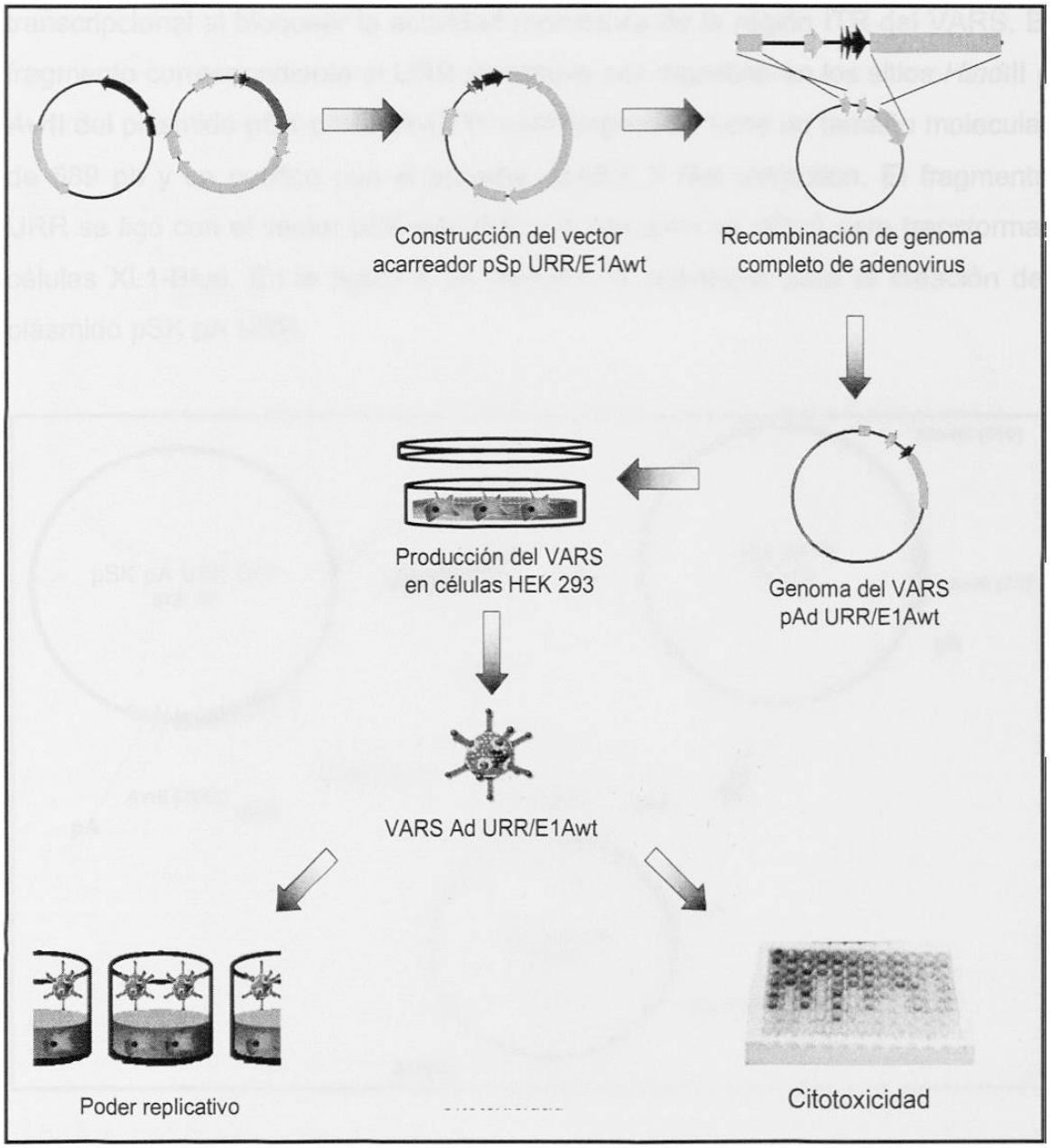

Figura 7. Estrategia general para la elaboración del VARS Ad-URR/E1Awt y su evaluación *in vitro*.

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.

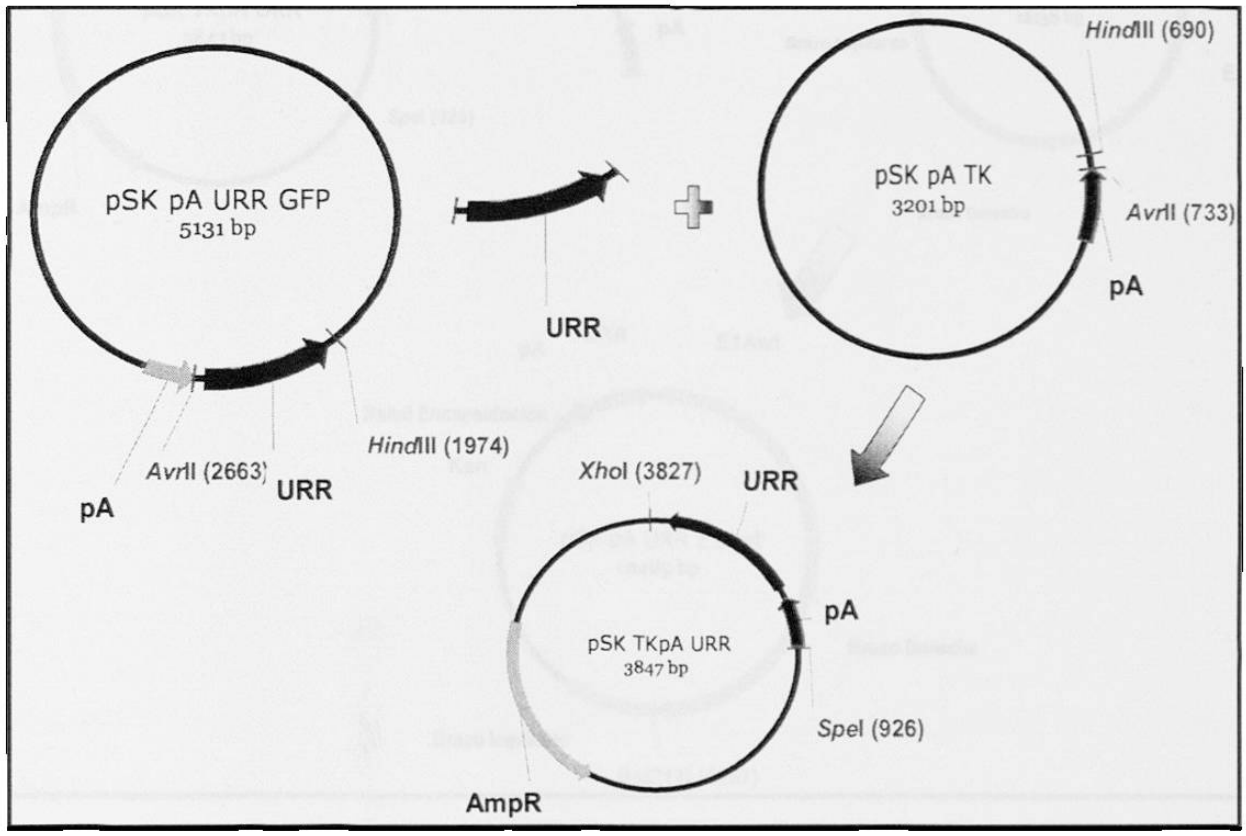

Figura 8. Estrategia para la construcción pSK-pA-URR. El fragmento URR (689 pb) fue ligado en el plásmido pSK-pA en los sitios *Hind*III y *Avr*II.

3.5 Construcción de plámido 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.

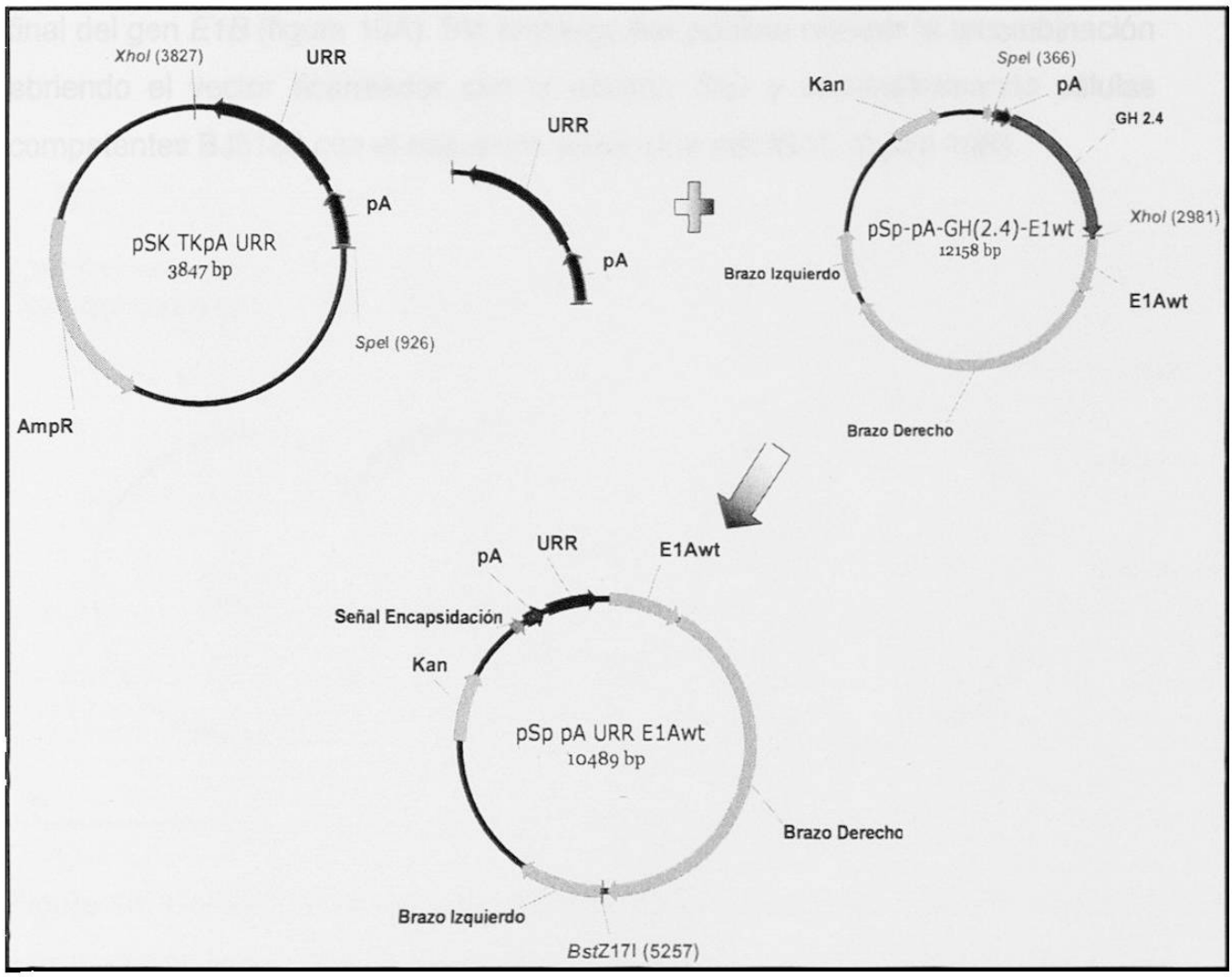

Figura 9. Estrategia para la construcción del vector acarreador pSp-URR/E1Awt. El fragmento pA-URR (946 pb) fue ligado en el plásmido pSp-pA-GH(2.4) E1wt en los sitios *Xho*I y *Spe*I.

3.6 Construcción del genoma adenovirual 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).

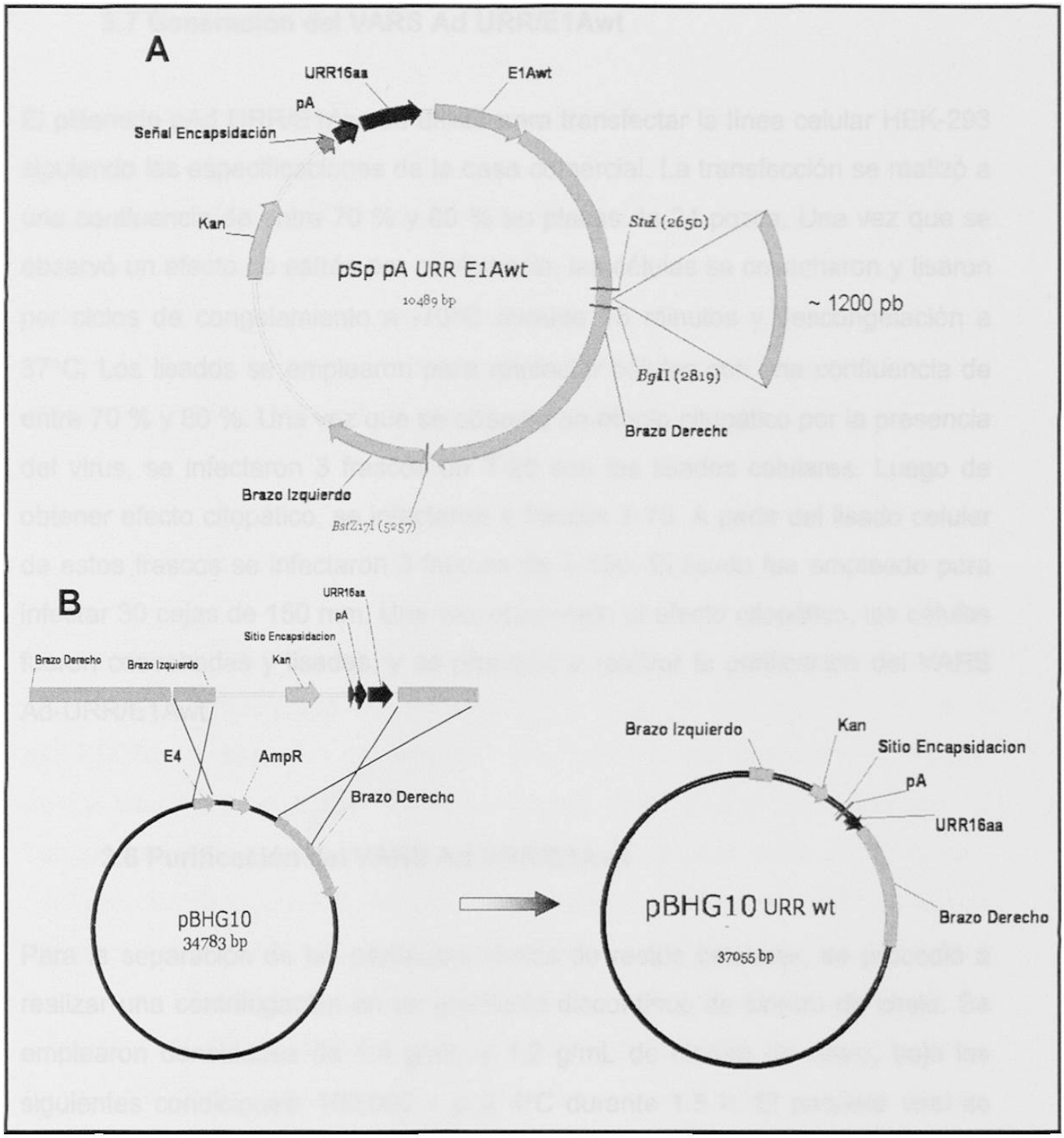

Figura 10. Generación de un genoma adenoviral pAd URR/E1Awt. Se identificó una mutación insercional de aproximadamente 1200 pb al final del gen *E1B* en el vector acarreador pSp URR/E1Awt (A). El vector acarreador pSp URR/E1Awt fue abierto en el sitio *Stu*I y recombinado con el esqueleto adenoviral 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 × 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 ($TCID_{50}$)

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, $MgCl_2$ 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:

$(OD_{260}) \times$ (Dilución viral) $\times$ (Dilución de cubeta) $\times$ 1.1×10^{12} = _____ OPU/mL

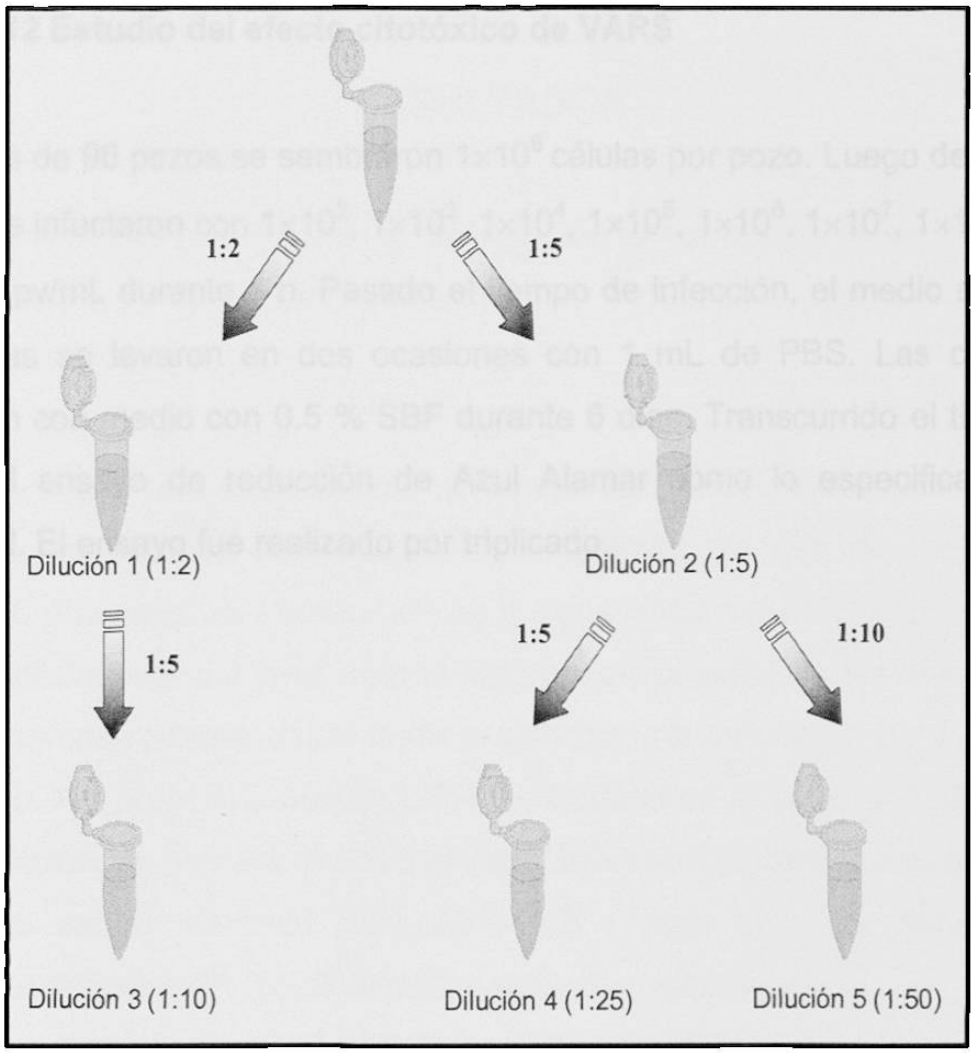

Figura 11. Preparación de diluciones para realizar cuantificación de OD 260 nm.

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 titulo 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.