

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'- TTTGCTACGTCGACTTTTGTTTAT-3' y
2. Reverse P972 5'- TCTTTGGTGATCAAAATGTCTGC-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	

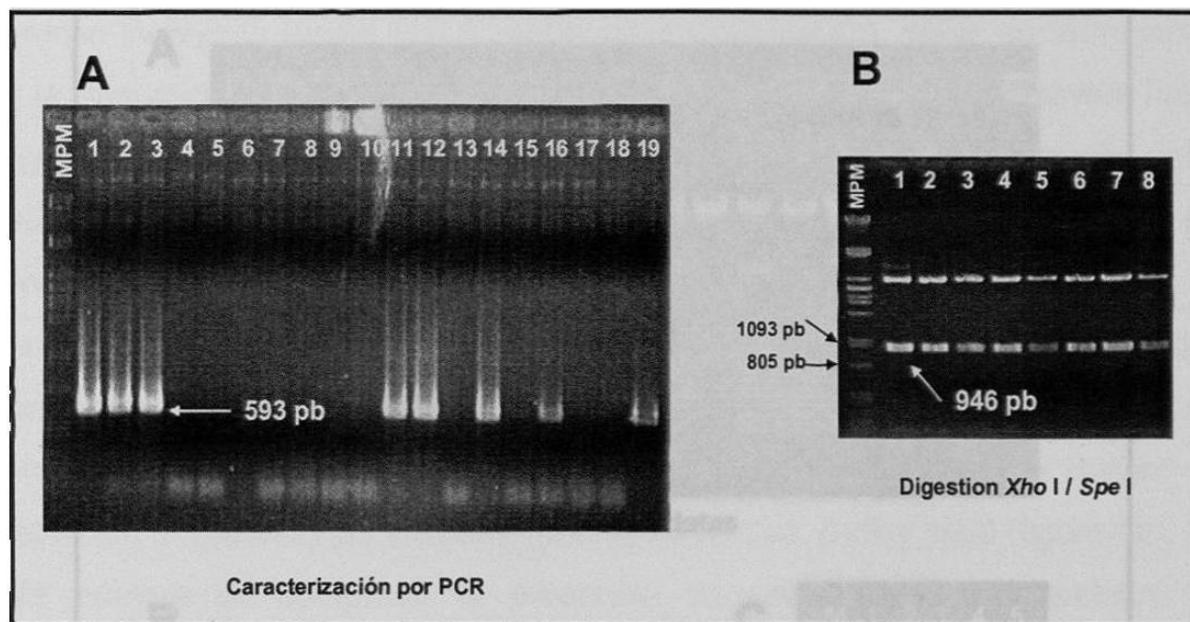


Figura 12. Generación de un plásmido pSK-pATK-URR (A) Las clonas fueron primero seleccionadas mediante PCR empleando iniciadores que amplifican la región URR de 593 pb (B) El plásmido generado fue caracterizado por restricción con las enzimas *Xhol* y *Spel* para liberar el fragmento pA-URR.

Una vez clonado el promotor URR en el extremo 3' de la señal de poliadadenilación, 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 *Spel* y *Xhol* 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.

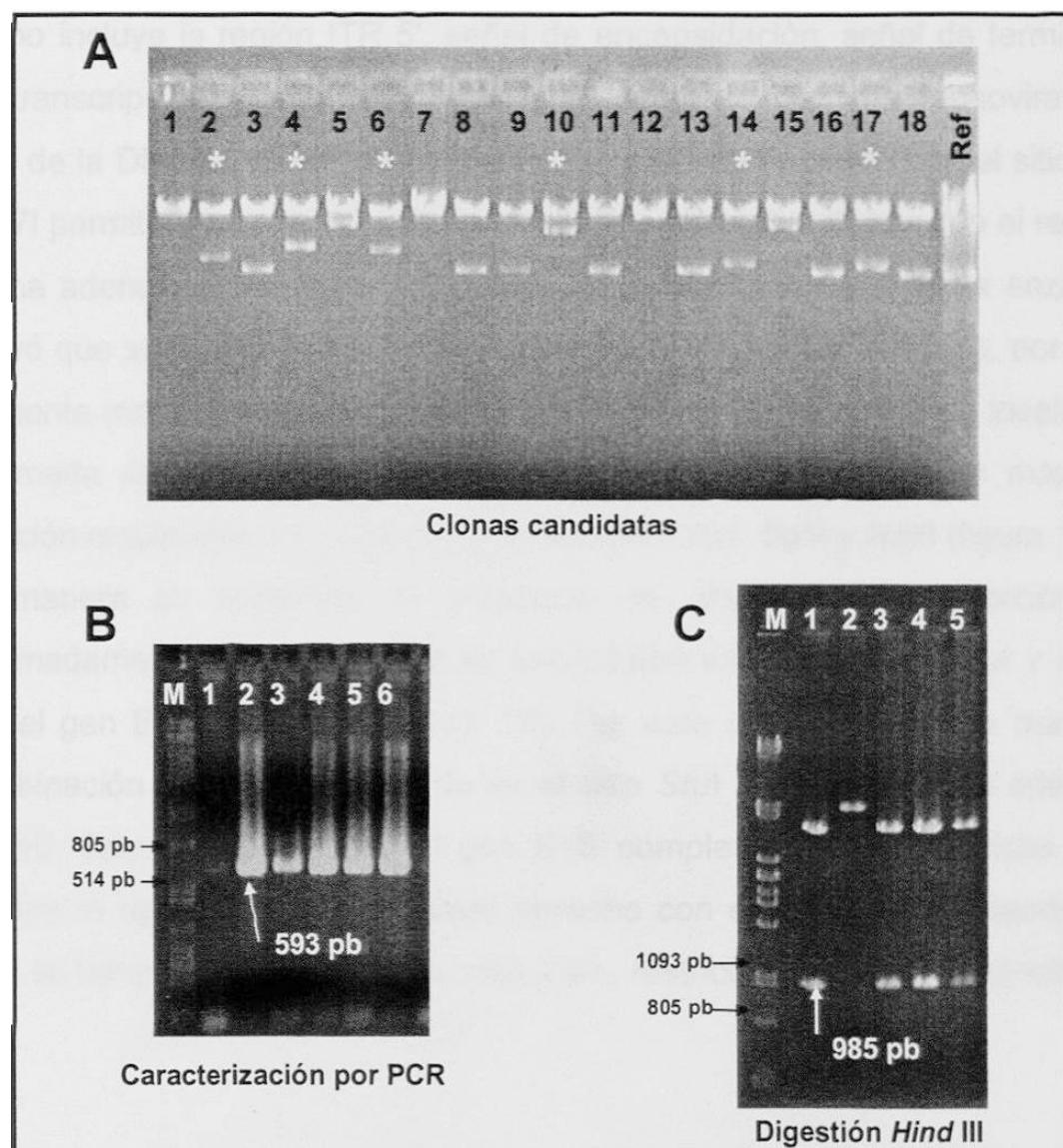


Figura 13. Generación de un plásmido acarreador pSp-pATK-URR/E1Awt (A) Las clonas se seleccionaron mediante retraso en electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %. PCR. B) Se realizó PCR de las clonas retrasadas empleando primers que amplifican la región URR de 593 pb. (B) El plásmido generado se caracterizó 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 *BstZ17I* 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 *BamHI*, *AfIII*, *StuI*, *BgII* y *Nael* (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 *StuI* y *BgII* al final del gen E1B adenoviral (figura 15). Por esta razón se escogió realizar la recombinación del plásmido abierto en el sitio *StuI* 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.

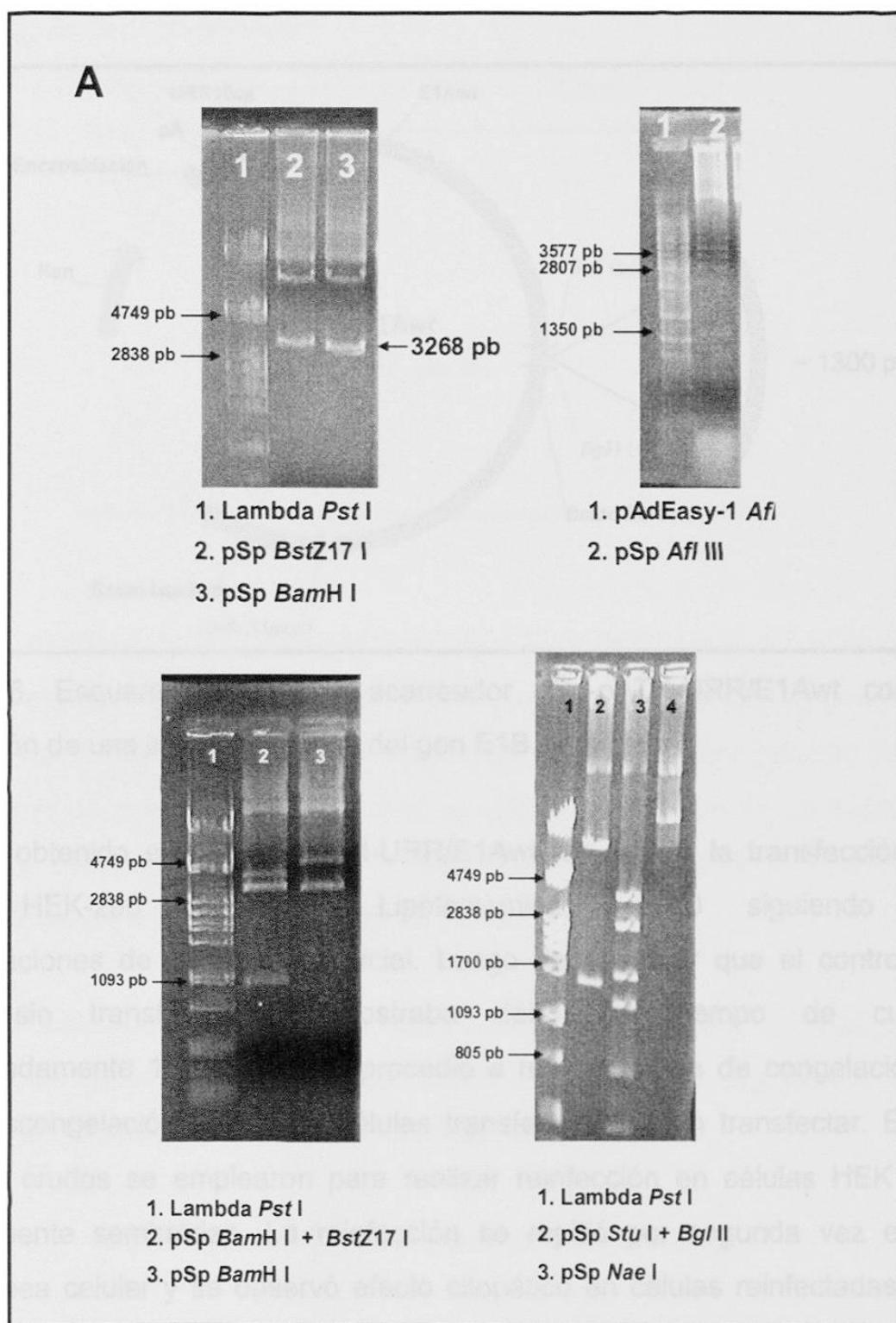


Figura 14. Presencia de una inserción en el plásmido pSp-pATK-URR/E1Awt (A). La digestión con la enzima *BstZ17I* en un supuesto sitio único liberó un fragmento de 3200 pb aproximadamente, además se estimó el tamaño de la inserción en aproximadamente 1300 pb (B). Dicha inserción fue localizada al final del gen E1B del vector acarreador pSp-pATK-URR/E1Awt.

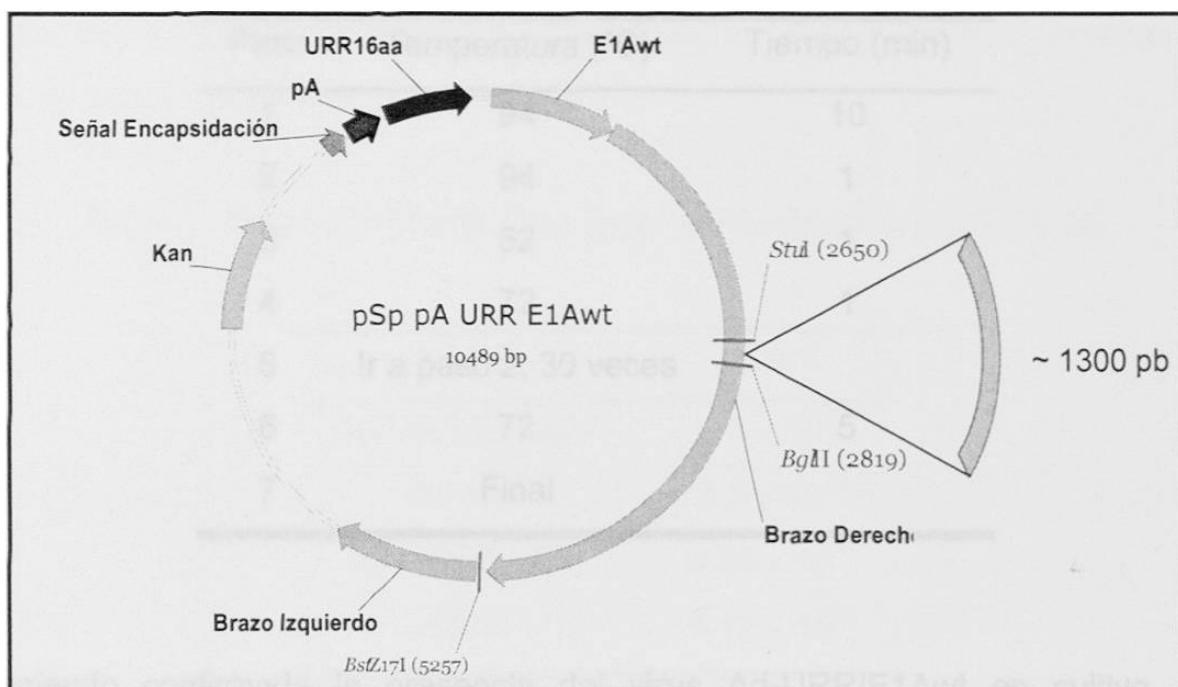


Figura 15. Esquema del vector acarreador pSp-pATK-URR/E1Awt con la localización de una inserción al final del gen E1B.

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'-GTATCTCAGGAGGTGTAGAAGG-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/E1AΔ24	2.5 × 10 ¹²
Ad-Δ24	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/E1AΔ24	2.5×10^{12}
Ad-Δ24	5.3×10^{12}
Ad-URR/E1AwT	8.36×10^{11}
Ad-wt	5.12×10^{12}

Una vez conocido la cantidad de pfu/mL se realizó la determinación del poder replicativo de los VARS Ad-URR/E1AΔ24, Ad-Δ24, 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.

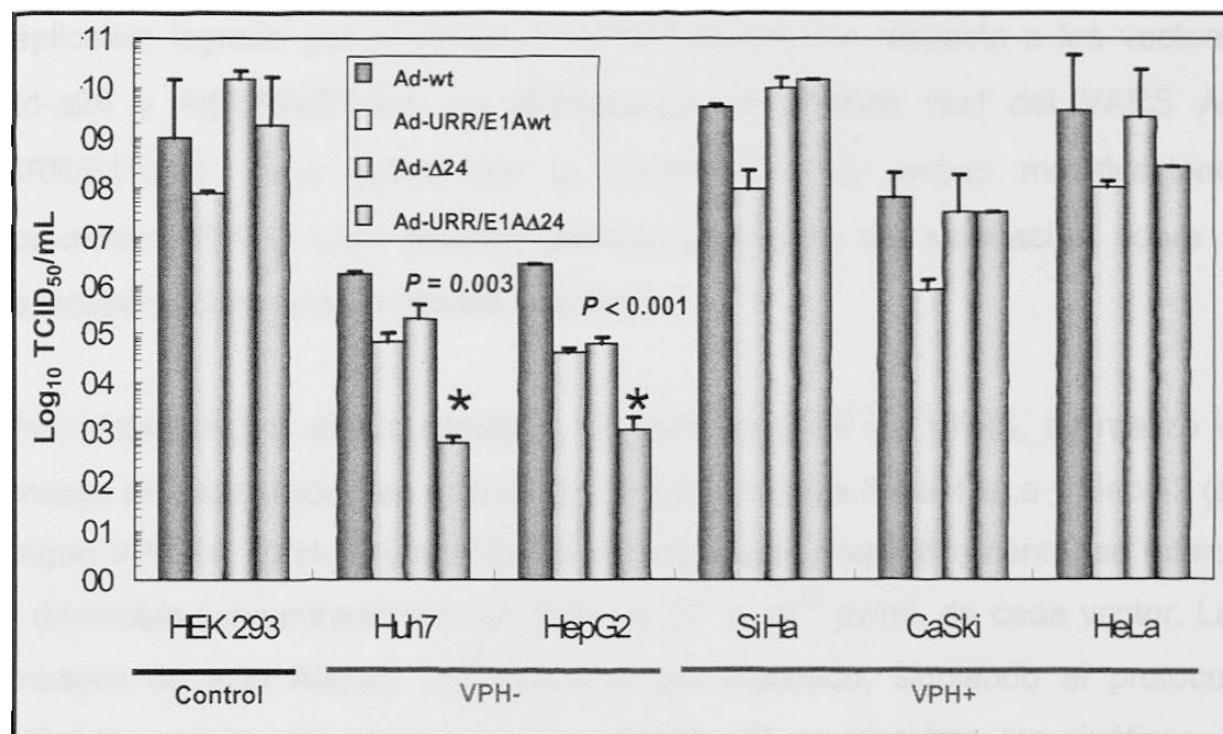


Figura 16. Determinación del poder replicativo de VARS en líneas celulares VPH + y VPH-. Se sembraron 1×10^5 células por pozo en placas de 24 pozos. Las células fueron infectadas durante 1 h y luego de 48 h se determinó la producción de partículas adenovirales por el método de TCID₅₀.

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-Δ24 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/E1AΔ24 en líneas VPH+ muestra niveles replicativos similares a los vectores Ad-wt y Ad-Δ24 ($p = 0.519$) 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-Δ24 ($p = 0.109$).

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/E1AΔ24 con respecto a los vectores Ad-Δ24 y Ad-URR/E1Awt. La disminución en el título viral del VARS Ad-URR/E1AΔ24 nos indica que la combinación de ambas modificaciones (promotor URR y Δ24) 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} pfu/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/E1AΔ24 en la línea celular HeLa, en la cual se observa un drástico efecto citotóxico de dicho VARS.

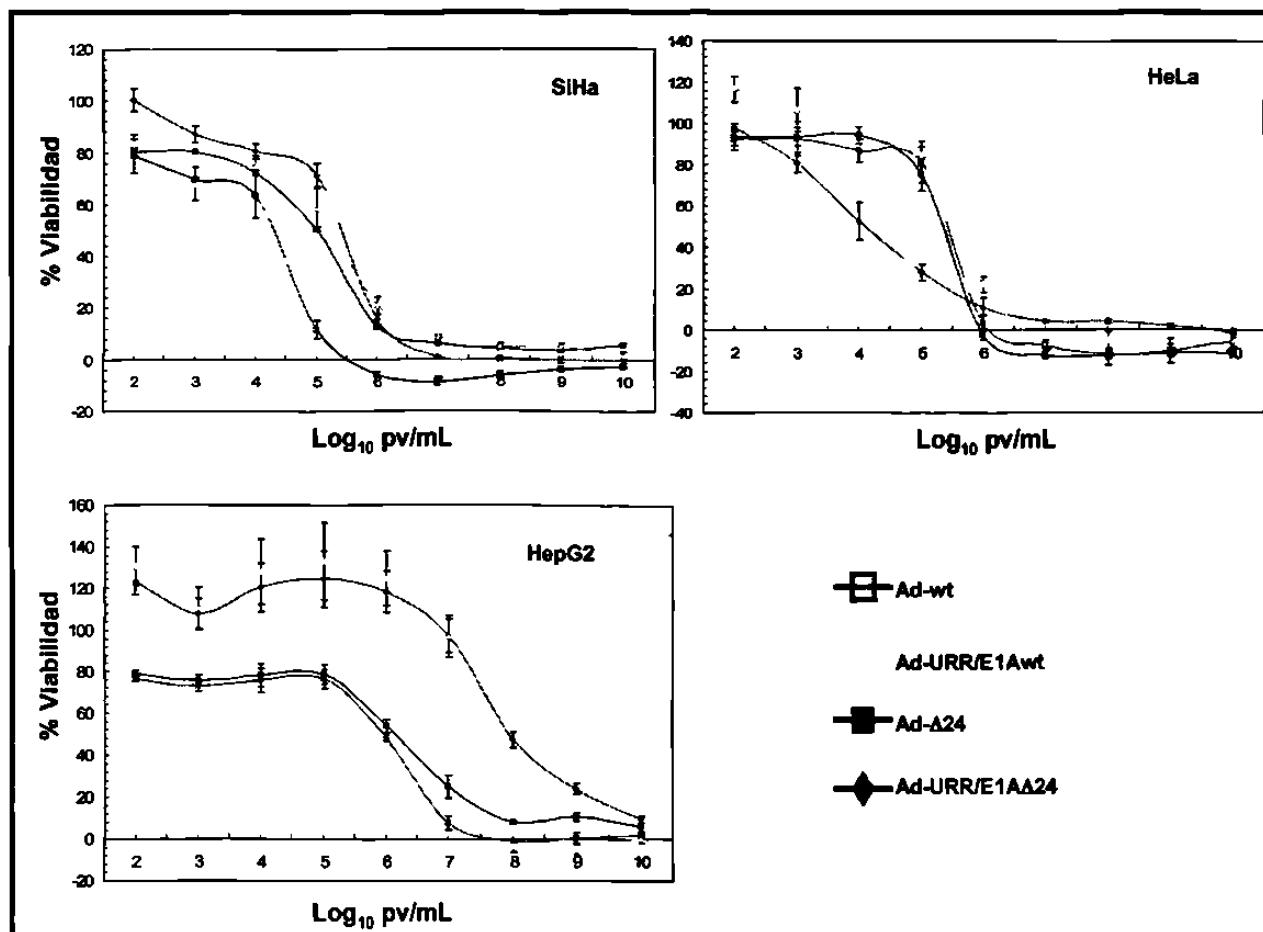


Figura 17. Ensayos de citotoxicidad en líneas VPH+ y VPH-. Se sembraron 1×10^6 células por pozo, luego de 24 h fueron infectadas con 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 y 1×10^{10} pv/mL durante 1 h. Seis días después se realizó el ensayo de reducción de azul alamar.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

A partir de los resultados de citotoxicidad se determinaron las Dosis Letales 50 (DL_{50}) 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 linea 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 linea 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-Δ24 ($p = 0.003$). Además es de notar que la DL₅₀ para el VARS Ad-URR/E1AΔ24 fue de 4.04×10^8 pfu/mL, mientras que los valores de DL₅₀ para los VARS Ad-URR/E1Awt y Ad-Δ24 son de 2.41×10^7 y 1.02×10^6 pfu/mL, respectivamente, esto indica que la DL₅₀ del VARS Ad-URR/E1AΔ24 es superior a la suma de la DL₅₀ de los VARS Ad-URR/E1Awt y Ad-Δ24, sugiriendo un efecto sinérgico de ambas modificaciones.

Tabla 5. DL₅₀ 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-Δ24	1.02×10^6	3.22×10^4	9.49×10^4
Ad-URR/E1AΔ24	4.04×10^8	2.11×10^5	1.73×10^4

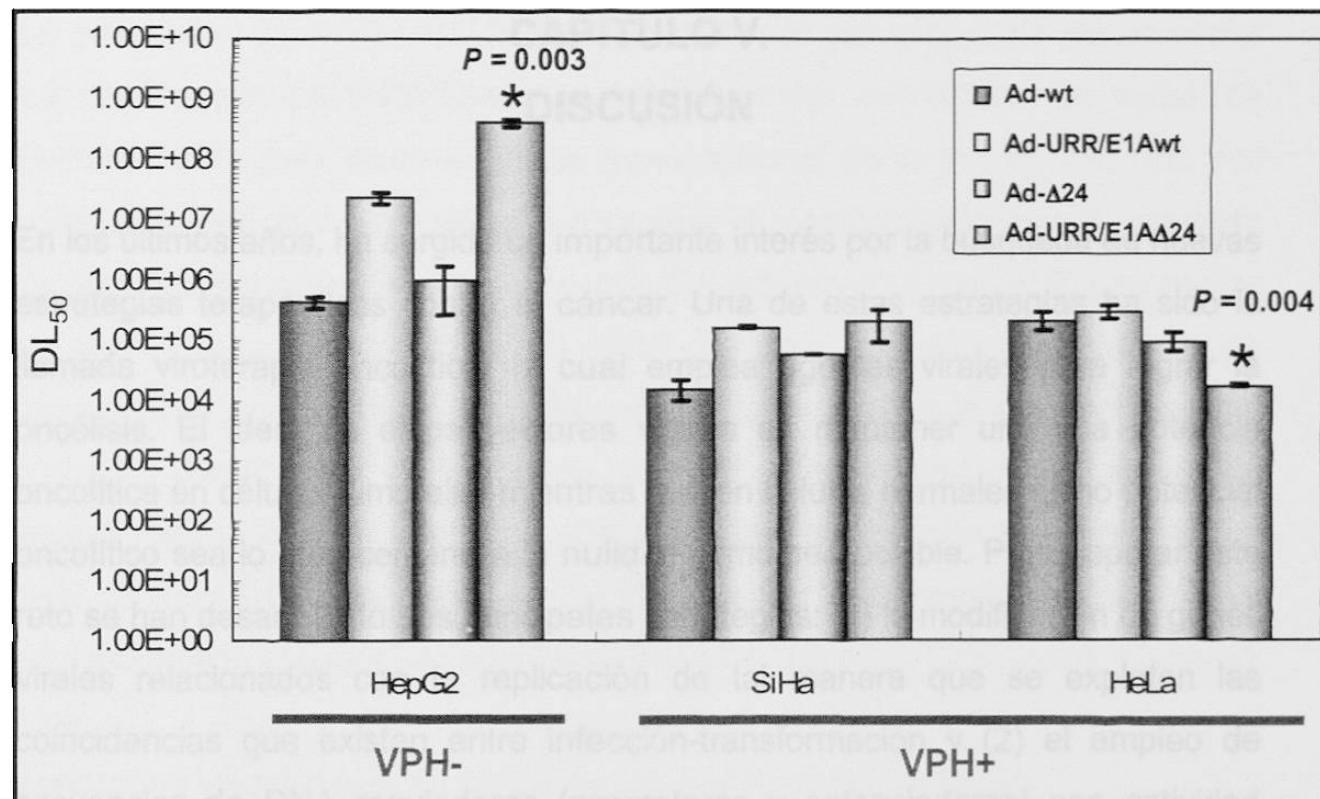


Figura 18. DL_{50} alcanzada por cada uno de los vectores en líneas celulares HepG2, SiHa y HeLa. Las DL_{50} fueron determinadas a partir de los datos de citotoxicidad relativa.

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/E1AΔ24, dada su potencia oncolítica en líneas celulares VPH+ y su atenuación VPH-. Sin embargo, era necesario determinar cuáles eran las aportaciones individuales de cada modificación (URR y Δ24) para de esta manera tener más datos que refuerzen la bioseguridad del VARS Ad-URR/E1AΔ24. 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-pAU_{RR}/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-Δ24 y Ad-URR/E1AΔ24 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/E1AΔ24, pues la inclusión del promotor URR no cambia de manera significativa el poder replicativo del VARS Ad-URR/E1AΔ24 con respecto a los VARS control altamente replicativos (Ad-wt y Ad-Δ24) en líneas VPH(+). Lo que indica que el VARS Ad-URR/E1AΔ24 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/E1A Δ 24 con respecto a los VARS altamente replicativos (Ad-wt y Ad- Δ 24) 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/E1A Δ 24 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/E1A Δ 24 no afecta significativamente su capacidad oncolítica en comparación con lo mostrado por los vectores Ad- Δ 24 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/E1A Δ 24 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.

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 Pública 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., Kirn, 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 cicle. *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., Cai, 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 Tyring, 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.



