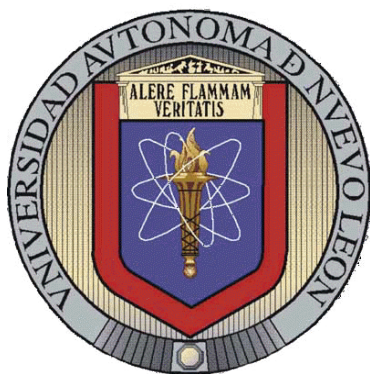


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



TÍTULO DE TESIS

GENERACION DEL VECTOR ADENOVIRAL ONCOLÍTICO Ad5/3-UV2- Δ 24 PARA
NEOPLASIAS ASOCIADAS A VPH.

POR

Q.B.C. GLORIA CAROLINA LÓPEZ ROMERO

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

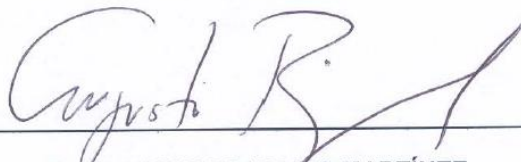
Con especialidad en

BIOLOGÍA MOLECULAR EN INGENIERÍA GENÉTICA.

SEPTIEMBRE, 2011

**GENERACIÓN DEL VECTOR ADENOVIRAL ONCOLÍTICO Ad5/3-UV2-Δ24 PARA
NEOPLASIAS ASOCIADAS A VPH.**

Aprobación de la tesis:



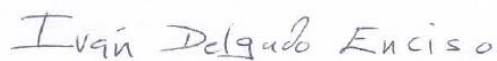
Dr. C. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ

Director de Tesis



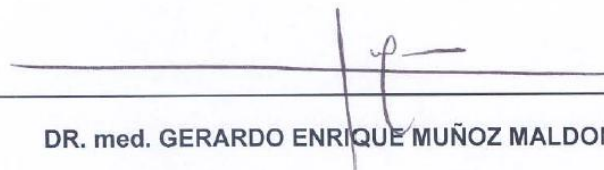
Dr. C. ROCÍO ORTÍZ LÓPEZ

Co-Director de Tesis



Dr. C. IVÁN DELGADO ENCISO

Co-Director de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO

Subdirector de Estudios de Posgrado.

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular 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. Iván Delgado Enciso.

DR. C. AUGUSTO ROJAS MARTINEZ

Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Augusto Rojas Martínez por permitirme participar en este proyecto y formar parte de la UTGC, por haber confiado en mí, por su enorme paciencia y dedicación, por estar siempre dispuesto a ayudarme a superar cada reto que implicó la realización de este trabajo. Por todos sus consejos, instrucciones y enseñanzas.

Gracias a la comisión de tesis. A la Dra. Rocío Ortíz López por su apoyo y por permitirme trabajar en las instalaciones de UDM y Biología Molecular en el CIDCS. Al Dr. Iván Delgado por sus consejos y todas las atenciones prestadas.

Al Dr. Iván Alberto Marino Martínez por ser el primero en enseñarme a trabajar en el laboratorio, por toda su paciencia y por su dirección que hicieron que fuera posible la realización de esta tesis. Pero principalmente, gracias por su amistad, por hablarme siempre con sinceridad y brindarme sus consejos y mostrarme esas lecciones de la vida que no debo olvidar.

A la M.C. Gisela Borrego Soto, por ser tan buena maestra y guiarme con paciencia durante el miniproyecto y cada vez que recurría a ella con alguna duda, por iniciarme en el área de cultivo celular, por su amistad, por todos esos momentos que me hacían recordar mi Sonora querida, por hacerme sentir que no era la única diferente del lugar y compartir el orgullo de ser sonoreNSE.

A mis compañeros de la UTGC: Iván, Gisela, Adelina, Sergio, Magda Alí, Idalia, Daniel, Manuel, Marcela, Nidia y Cecilia. Por compartir conmigo esta etapa, por sus consejos y tips y toda la ayuda que me brindaron, por hacerme pasar momentos muy agradables y siempre hacerme reír. Especialmente a Dante por ser mi amigo y escucharme siempre, por su gran ayuda y su dedicación, por sus ganas de aprender, por su paciencia y por aguantar mis regaños.

A mis compañeros y amigos de la generación 2009-2011, por formar una parte muy especial en esta etapa de mi vida, por todos esos buenos y malos momentos que pasamos juntos y nos unieron más como amigos. Principalmente a mis amigos Azalea Arreola, Artemisa Lévano, Selene García, Sonia Lozano y Mario Simental. Quienes siempre estuvieron conmigo, aportando su alegría y haciendo que este proceso fuera más fácil, gracias por todas sus enseñanzas, sus consejos, sus tips, incluso sus regaños. Gracias Aza por toda tu paciencia, cariño y comprensión, mejor compañera

no pude tener. Gracias Arte por ser una gran mujer y mostrarme con el ejemplo grandes lecciones de vida. Gracias Selene por escucharme y aconsejarme sin juzgarme. Gracias Mario por ser un gran amigo y hacerme siempre reír, gracias por tus consejos y regaños. Gracias Soni por tu amistad y por ser tan divertida y sencilla. Gracias amigos porque sin su apoyo y cariño no lo hubiera logrado

A mis compañeros y amigos de bioquímica, gracias porque sin todos sus consejos y enseñanzas no hubiera sido posible la realización de esta tesis. Especialmente a Alan Márquez, por ser mi amigo y hermano en Cristo, gracias por permitirme compartir esta etapa de mi vida contigo, por tus consejos sabios que me acercaron más a Dios. Gracias a todo el personal Juani, Normita, Lupita, Ariadna, Licenciado, Daniel y demás personal que facilitaron de alguna forma u otra el proceso de la maestría. Sobre todo a ti Juani por todo el esfuerzo y dedicación.

A mis padres por amarme tanto, por sus sabias enseñanzas, por estar siempre conmigo cuando más los necesito, por siempre apoyarme y alentarme a superarme y ser mejor persona y profesional, por mostrarme la importancia de la educación y por ser los primeros en ocuparse de ella desde pequeña, por proveer los medios para permitirme llegar hasta donde he llegado, nunca podré pagarles todo el esfuerzo y dedicación que me han brindado. Gracias papá por heredarme el amor a la ciencia, por mostrarme con el ejemplo que sí se puede. Gracias mamá por mostrarme el camino a Dios, por ser mi mejor amiga y consejera, por mostrarme el valor del amor y los sacrificios que conlleva y por tu ejemplo de una gran MUJER. Gracias, porque nunca me han dejado darme por vencida.

A mi familia a quienes amo tanto. Carlos e Iván gracias por permitirme ser la hermana mayor regañona, por todo su cariño y su apoyo, sé que esto también significó un sacrificio para ustedes, gracias por ser los mejores hermanos del mundo. A mis abuelos, gracias por todo su cariño y apoyo, por todas sus enseñanzas y por transmitirme su sabiduría. A mis tíos, primos y familia adoptada con el tiempo, por su cariño y apoyo. Los llevo siempre en mi corazón.

A ti Jaime por brindarme todo tu amor incondicional por tu comprensión y paciencia, por mostrarme con el ejemplo el valor de la perseverancia, por alentarme a luchar por lo que quiero, porque nunca me has dejado darme por vencida, por crecer conmigo estos 5 años y enseñarme a valorar las cosas de verdad importantes en la vida. Pero

sobretudo, por mostrarme el amor de Dios hacia nosotros y enseñarme a amarlo y por ayudarme a regresar al camino cada vez que comenzaba a apartarme.

Gracias a ti mi Dios Todopoderoso que me diste la vida, me diste tu amor y hermosos regalos como el hambre de sabiduría y ciencia. Gracias por permitirme llegar hasta donde ahora he llegado, por estar siempre conmigo, por levantarme cuando estoy a punto de caer, por extenderme tu mano siempre, por ser mi fortaleza y mi razón de vivir. Gracias por permitirme ser tu hija, yo se que nunca podre pagarte todo lo que haces por mí, más espero algún día pueda ser tu hija amada en quien encuentres complacencia.

Por último, quiero agradecer a todos aquellos quienes formaron parte de éstos dos años de mi vida y que de alguna manera u otra me enseñaron valiosas lecciones y me mostraron el camino para ser una mejor persona y aprender a valorar aquello que de verdad se lo merece.

DEDICATORIA

A ti mi Dios Todopoderoso, mi amor, mi luz, mi salvación, mi camino, mi esperanza...

Bienaventurado el hombre que halla la sabiduría y que obtiene la inteligencia; porque su ganancia es mejor que la ganancia de la plata, y sus frutos más que el oro fino.

Más preciosa es que las piedras preciosas; y todo lo que puedes desear, no se puede comparar a ella.

Proverbios 3: 13-15.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 El virus del papiloma humano (VPH).	2
1.1.1. El VPH y su clasificación.	2
1.1.2 Estructura y organización genómica del VPH.	3
1.1.3 Ciclo biológico del VPH.	4
1.2 Cáncer cérvico uterino (CaCu).	5
1.2.2 Epidemiología.	5
1.2.3 Mecanismos moleculares del CaCU.....	6
1.2.3.1 Proliferación ilimitada.	7
1.2.3.2 Evasión de la apoptosis.	8
1.2.3.3 Inducción de inestabilidad genómica.	8
1.2.4 Estrategias terapéuticas contra el CaCU.	8
1.3 Viroterapia oncolítica.	10
1.3.2 Adenovirus. Virología general.	10
1.3.3 Adenovirus como vectores de transferencia genética.	12
1.3.4 Vectores adenovirales de replicación selectiva.	13
1.3.5 Transducción dirigida hacia células malignas.	14
1.3.5.1 Quimerismo de la proteína fibra	15
1.3.6 Transcripción dirigida hacia células malignas.	15
1.3.6.1 Promotores específicos de tejido para CaCu.....	16
1.3.7 El oncogén E7 de VPH y su relación con el gen E1A adenoviral.	16
II. JUSTIFICACIÓN.....	18
III. OBJETIVOS	19
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	20

4.1	Materiales y reactivos.....	20
4.2	Material biológico.....	21
4.2.1	Células competentes y líneas celulares.....	21
4.2.2	Iniciadores.....	21
4.2.3	Plásmidos.....	22
4.3	Estrategia general.....	23
4.4	Diseño del vector adenoviral recombinante pAd5/3-UV2- Δ 24.....	23
4.5	Preparación del plásmido pShuttle-UV2- Δ 24.....	24
4.6	Preparación del plásmido pTU5/3.....	25
4.7	Construcción del genoma adenoviral recombinante.....	27
	pAd5/3UV2- Δ 24.....	27
4.8	Generación del VARS Ad5/3-UV2- Δ 24.....	28
V.	RESULTADOS.....	30
VI.	DISCUSIÓN.....	38
VII.	CONCLUSIONES.....	40
	BIBLIOGRAFÍA.....	41
	ANEXOS.....	44

RESUMEN

Q.B.C. Gloria Carolina López Romero

Universidad autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina.

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

Titulo del estudio: **GENERACIÓN DEL VECTOR ADENOVIRAL AD5/3-UV2-Δ24 PARA NEOPLASIAS ASOCIADAS A VPH.**

Introducción: El cáncer cérvico uterino (CaCU) es el 2º cáncer más frecuente en mujeres en el mundo. Sin embargo, más del 85% de las muertes ocurren en países en desarrollo. En México, constituye el 2º lugar en frecuencia y mortalidad, donde en promedio fallece una mujer cada 2h a causa de CaCU. Esto se debe principalmente a que la mayoría de las pacientes son diagnosticadas en fases en las que solo se pueden ofrecer tratamientos paliativos con poco impacto en la supervivencia, lo cual alienta el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas.

Objetivo. El objetivo de este trabajo fue diseñar y generar un vector adenoviral oncolítico dirigido específicamente contra células transformadas por VPH-ar usando tres modificaciones: Un promotor viral tejido-específico (UV2), la delección Δ24 en el gen de replicación de adenovirus E1A y una proteína fibra quimera en la cápside conformada por los serotipos Ad5-Ad3, para incrementar tropismo por células tumorales.

Material y Métodos. Plásmidos: pShuttle-UV2-Δ24, pXC1, pTU5/3, Ad5/3-UV2-Δ24. Cepas bacterianas: *E. coli DH5a*, *E. coli turbo*, *E. coli BJ5183*. Líneas celulares: HEK-293. Para construir el genoma del vector Ad5/3-UV2-Δ24 se emplearon dos plásmidos: a) pShuttleUV2-Δ24 plásmido acarreador construido y modificado en el laboratorio; b) pTU5/3 portador del esqueleto adenoviral, incluyendo gen fibra modificado. Ambos se recombinaron en bacterias *E. coli* BJ5183 para generar un genoma que incluyera las tres modificaciones deseadas, éste se caracterizó y transfectó en células HEK293 para producir las partículas virales Ad5/3-UV2-Δ24 y se caracterizó por PCR.

Resultados. Se obtuvieron clones BJ5183 recombinantes, se extrajo el DNA plasmídico y se caracterizó por digestión con enzimas *PmeI*, *SpeI* y la amplificación de las regiones UV2, K3 y D24 por PCR, las partículas virales se produjeron en células HEK293.

Conclusiones. Se diseñó, construyó y generó el vector adenoviral oncolítico Ad5/3-UV2-Δ24 dirigido específicamente contra células transformadas por VPH-ar usando tres modificaciones en su genoma para incrementar el tropismo hacia las células tumorales asociadas a la infección por VPH. Además, se logró implementar una estrategia para recombinar eficientemente el plásmido pTU5/3 con un plásmido acarreador en bacterias *E. coli* BJ5183.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estructura y organización genómica del VPH.	3
Figura 2 Ciclo de vida del VPH.	5
Figura 3 Estructura de Adenovirus.	12
Figura 4 Plásmidos empleados.	22
Figura 5 Estrategia general del estudio.	23
Figura 6 Estrategia para realizar cambio de resistencia a antibiótico.	25
Figura 7 Modificación realizada en pTU5/3	26
Figura 8 Estrategia de recombinación en bacterias BJ5183.	28
Figura 9 Caracterización de pShuttle-UV2- Δ 24.	30
Figura 10 Purificación de las bandas pShuttle y pXC1	31
Figura 11 Caracterización de las clonas pShuttle-UV2- Δ 24 Ar.	32
Figura 12 Caracterización de pTU5/3.	33
Figura 13 Comparación de regiones homologas en pTU5/3 y pShuttle-UV2- Δ 24.	34
Figura 14 Caracterización del genoma recombinante pAd5/3-UV2- Δ 24.	35
Figura 15 Caracterización de clona elegida de pAd5/3-UV2- Δ 24.	36
Figura 16 Generación del VARS Ad5/3-UV2- Δ 24.	37

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Tipo de VPH y enfermedad asociada.....	2
Tabla 2 Iniciadores empleados para la realización de este trabajo.	21
Tabla 3 Plásmidos empleados para la realización del presente estudio.....	22
Tabla 4 Condiciones de temperaturas PCR UV2.	24
Tabla 5 Condiciones de la reacción de ampificación de UV2.	24
Tabla 6 Condiciones de temperaturas PCR K3.....	26
Tabla 7 Condiciones de la reacción de ampificación de K3.....	26
Tabla 8 Condiciones de temperaturas PCR D24.....	27
Tabla 9 Condiciones de la reacción de ampificación de D24.	27
Tabla 10 Regiones de homología en pTU5/3 y pShuttle-UV2- Δ 24 Ar.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Asiático americana
Ad	Adenovirus
Ad5/3	Adenovirus con fibra quimera
CaCU	Cáncer cérvico uterino
CR1	Región conservada 1
CR2	Región conservada 2
DNA	Acido desoxirribonucleico
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
dNTPs	Trifosfato de deoxinucleósidos
D24	Delección de 24 pares de bases
Δ 24	Delección de 24 pares de bases
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
H	Horas
H ₂ O	Agua
ITR	Repetición terminal invertida (del inglés)
Kpb	Kilo pares de bases
Log	Logaritmo base 10
M	Marcador de peso molecular
mg	Miligramos
Min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mQ	mili Q (Agua Ultrapura)
μ g	Microgramo

μL	Microlitro
μM	Micromolar
p300	Proteína celular de 300 Kilo Daltones
p53	Proteína celular p53
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pRb	Proteína celular de retinoblastoma
pShuttle	Plásmido acarreador con resistencia a kanamicina
pXC1	Plásmido acarreador con resistencia a ampicilina
pTU5/3	Plásmido portador del esqueleto adenoviral y fibra quimera
Rec A+	Actividad de recombinasa A
Rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero fetal bovino
U	Unidad internacional
URR	Región reguladora rio arriba de VPH16 variante AA
UV2	Región reguladora rio arriba de VPH16 variante 2
VARS	Vector adenoviral de replicación selectiva
VPH	Virus del papiloma humano
Ψ	Señal de encapsidación
~	Aproximadamente

CAPÍTULO

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es la segunda causa de muerte alrededor del mundo. En el año 2008 se registraron un total de 7.6 millones de muertes y se estima que para el año 2030 el número de muertes alcancen los 12 millones [1]. El cáncer es un término genérico de un gran grupo de enfermedades que puede afectar cualquier parte del cuerpo. Otros términos empleados para describir la enfermedad son tumores malignos y neoplasias. Una característica que define al cáncer es la rápida proliferación de células anormales que crecen sobrepasando sus barreras normales. Dichas células pueden invadir partes del cuerpo cercanas y diseminarse hacia otros órganos. Este proceso se denomina metástasis y constituye la mayor causa de muerte por cáncer. El cáncer comienza a partir de cambios en una célula. El cambio puede empezar por agentes externos o factores genéticos. Los tipos de cáncer más frecuentes difieren entre hombres y mujeres. En hombres se presentan con mayor frecuencia cáncer de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado. En cuanto a los cánceres en mujeres, se presentan cáncer de pecho, colorrectal, cervical, pulmón y estómago. Estos causan la mayoría de las muertes por año en el mundo, de las cuales, más del 30% puede ser prevenida [2]. El cáncer cérvico uterino (CaCu) es el cáncer más común que afecta a mujeres en los países en desarrollo. Se estima que es responsable de casi 260,000 muertes y aproximadamente el 80% de ellas ocurre en países en desarrollo. El CaCu es causado por el virus del papiloma humano (VPH). El VPH es un virus de DNA que infecta células del epitelio o de mucosas. Existen más de 100 tipos de VPHs y al menos 15 son capaces de causar cáncer cérvico uterino, además de estar asociados con otros cánceres como los tumores anogenitales y de cabeza y cuello. Estos tipos de VPHs son nombrados de alto riesgo. Los genotipos de alto riesgo más comunes son VPH-16 y VPH-18, que causan cerca del 70% de las neoplasias cervicales. El CaCu se puede prevenir y curar a un costo y riesgo bajo cuando se realiza el tamizaje para facilitar la detección oportuna de lesiones precursoras [2].

1.1 El virus del papiloma humano (VPH).

1.1.1. El VPH y su clasificación.

Durante los últimos 30 años se han descubierto muchos tipos diferentes de VPHs así como también se ha demostrado su papel en el cáncer y su valor como blancos estratégicos para diagnóstico temprano y terapia. Los VPHs constituyen un grupo de virus pequeños no envueltos de DNA de doble cadena pertenecientes a la familia *Papillomaviridae*. Son virus epitelio específicos, mostrando un tropismo por el epitelio escamoso; cutáneo o mucoso [3].

Tabla 1 Tipo de VPH y enfermedad asociada. (Números resaltados indican mayor frecuencia de asociación). [4]

Enfermedad	Tipo de VPH
Verrugas plantares	1, 2, 4, 63
Verrugas comunes	2, 1, 7, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65, 77, 1, 3, 4, 10, 28
Verrugas planas	3, 10, 26, 27, 28, 38, 41, 49, 75, 76
Otras lesiones cutáneas (ej. Quistes epidermoides, carcinoma laríngeo)	6, 11, 16, 30, 33, 36, 37, 38, 41, 48, 60, 72, 73
Epidermodisplasia verruciforme	2, 3, 10, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 50
Papilomatosis respiratoria recurrente	6, 11
Hiperdisplasia epitelial focal de Heck	13, 32
Papilomas/carcinomas de la conjuntiva	6, 11, 16
Condiloma acuminata (verrugas genitales)	6, 11, 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55, 70
Neoplasia intraepitelial cervical	
No especificado	30, 34, 39, 40, 53, 57, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69
Bajo riesgo	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 74
Alto riesgo	16, 18, 6, 11, 31, 34, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 66
Carcinoma cervical	16, 18, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 66, 68, 70

Hasta ahora se han identificado más de 200 tipos de VPHs, de los cuales se han caracterizado alrededor de 100 genotipos y hay más de 120 en proceso [3-4]. Se sabe que aproximadamente 40 tipos de VPH infectan el tracto genital. Estos pueden ser clasificados como de bajo riesgo y alto riesgo con base en su asociación con el cáncer. Los primeros incluyen los tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81 y son encontrados en su mayoría en displasias de bajo grado, células escamosas atípicas (ASCs), lesiones intraepiteliales escamosas (SILs), lesiones intraepiteliales de bajo grado (SIL) y verrugas genitales externas, entre otras lesiones. Por otro lado, los VPH de alto riesgo se encuentran significativamente asociados con la progresión a CaCu

invasivo. El número de tipos de alto riesgo varía desde 13 a 19 serotipos, siendo alrededor de 15 de ellos consistentemente clasificados en el grupo asociado a CaCu (16, 18, 31, 33, 35, 39, 44, 51, 52, 56 y 58) (Tabla 1) [4-8].

1.1.2 Estructura y organización genómica del VPH.

El virus del papiloma humano es relativamente pequeño, no envuelto y consta de un diámetro de 55 nm. Tiene una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros, los cuales contienen al menos dos proteínas: L1 y L2. Cada capsómero es un pentámero de la proteína mayor de la cápside L1. Cada cápside del virión contiene varias copias (aproximadamente 12 por virión) de la proteína menor de la cápside L2. [4]

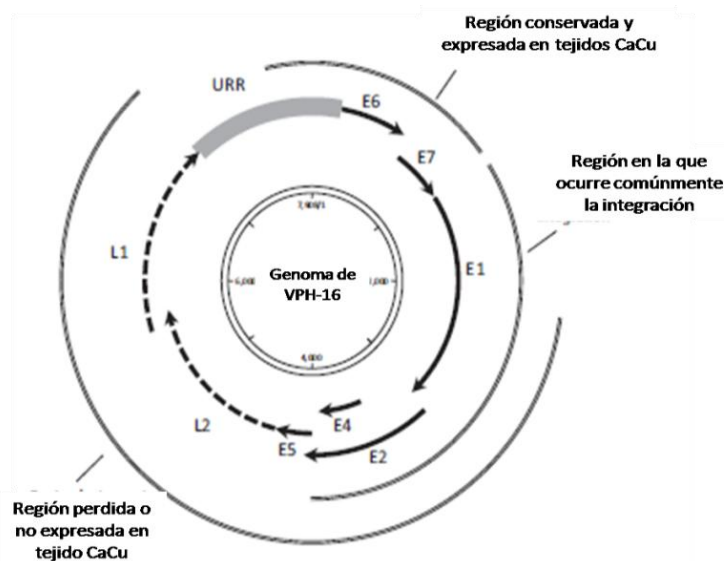


Figura 1 Estructura y organización genómica del VPH. [9]

Los VPHs poseen genomas circulares de DNA de cadena doble con un tamaño aproximado de 7,900 pb, el cual puede dividirse en principalmente tres regiones: región reguladora río arriba (URR), región temprana (E) y región tardía (L) (Figura 1). Las tres regiones en todos los papilomavirus están separadas por dos sitios de poliadenilación (pA): temprano (A_E) y tardío (A_L). La primera es una región río arriba no codificante de 400-1000 pb, también nombrada región no codificante (NCR), región larga de control (LCR) o región reguladora río arriba (URR). Esta no codifica para algún producto funcional, pero constituye un origen de replicación así como sitio de unión a múltiples factores de transcripción importantes para la regulación del virus. La región temprana ocupa más del 50% del genoma del virus y contiene los marcos de lectura abiertos (ORFs) E1, E2, E4, E5, E6 y E7 involucrados en múltiples funciones, incluidas la *trans-*

activación, transcripción, transformación, replicación y adaptación viral. La región tardía codifica para las proteínas L1 y L2 de la cápside viral, las cuales forman la estructura del virión y facilitan el empaquetamiento viral y la maduración. [4, 9-10]

El genoma del VPH se replica episomalmente en las células del huésped, pero frecuentemente se puede encontrar el DNA del VPH integrado en los cromosomas de las células cancerosas. El tiempo de integración viral parece corresponder al desarrollo de neoplasia intraepitelial cervical de alto grado, como consecuencia del alto nivel de expresión de los genes E6 y E7 [11]

1.1.3 Ciclo biológico del VPH.

El VPH es exclusivamente epiteliotrópico y su replicación se encuentra íntimamente ligada al proceso de diferenciación de las células huésped. Las células epiteliales escamosas normales crecen como epitelio estratificado. Después de la división, una de las células hijas migra hacia arriba del epitelio y comienza a experimentar diferenciación terminal, mientras que la otra permanece en la capa basal en un ciclo lento como población de auto renovación [12].

La infección por VPH comienza cuando los viriones infecciosos ganan acceso a las células de la capa basal. Esto requiere una abrasión moderada o un micro-trauma de la epidermis [4]. En varios estudios se han propuesto receptores de la célula huésped involucrados en la facilitación de la entrada del virus tales como el receptor de célula epitelial α_6 -integrina, la proteína lamina-5 y el proteoglicano heparán sulfato de superficie. No obstante, aún se desconoce la participación de un receptor en particular. El proceso de internalización generalmente ocurre a través de vesículas cubiertas de clatrina [4, 13-14]. El genoma viral se mantiene en esas células como un episoma estable a un bajo número de copias [12].

Debido a que los VPH codifican solo 8-10 proteínas, estos deben emplear los factores de la célula huésped para regular la replicación y la transcripción viral. La replicación del VPH inicia con los factores de la célula huésped, los cuales interactúan con la región URR del virus y comienza la transcripción de los genes virales E6 y E7, cuyos productos desregulan el ciclo celular y modifican el ambiente en la célula para facilitar la replicación viral [4]. Los genes tempranos E1 y E2 mantienen la replicación del VPH y su segregación para que las células infectadas puedan ser mantenidas en la lesión por un largo periodo. Cuando las células hijas infectadas migran hacia la superficie

epitelial y comienzan su diferenciación, se producen las proteínas virales tardías L1 y L2 para iniciar la fase vegetativa del ciclo de del VPH. Esto da como resultado un aumento en la amplificación del genoma viral. En las capas externas del epitelio se empaqueta el DNA dentro de las cápsides virales y la progenie de viriones es liberada, a la vez que las células ya diferenciadas se desprenden para re-iniciar la infección (Fig. 2). El ciclo productivo del VPH no es citolítico y no causa inflamación ni producción de citocinas proinflamatorias. A pesar de esta evasión de la respuesta del huésped hacia el virus, la mayoría de las infecciones son pasajeras y las lesiones se revierten en el primer año. No obstante, la infección persistente puede establecerse en una pequeña cantidad de células y permanecer durante años o décadas en aproximadamente 1% de las mujeres infectadas. [11-12]

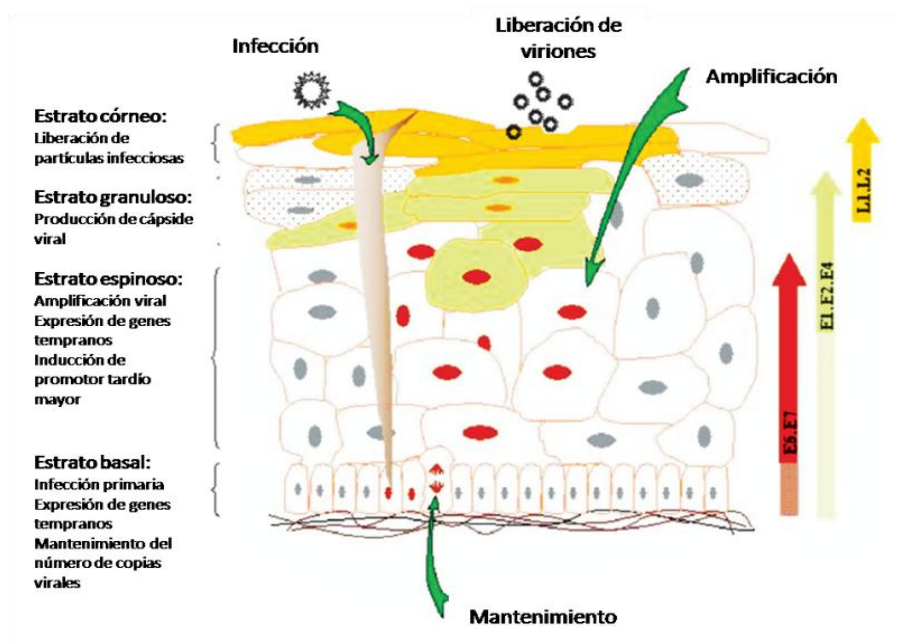


Figura 2 Ciclo de vida del VPH. Se muestra la coordinada expresión de las diferentes proteínas virales durante el curso de una infección. [12].

1.2 Cáncer cérvico uterino (CaCu).

1.2.2 Epidemiología.

El cáncer cérvico uterino es el segundo cáncer más frecuente en mujeres en el mundo y aun cuando se conoce la causa y patogénesis, éste aún se expande en algunas regiones. En el año 2008, se estimaron 530,000 nuevos casos y 275,000 muertes en el mundo debido al CaCu [1]. Más del 85% de las muertes por este cáncer ocurren en países en desarrollo, donde dicho porcentaje representa el 13% de todos los cánceres

en la mujer. En México se reportan 10,186 casos anuales y 5,061 muertes debido al CaCu [15]. Se estima que para el 2025 los números de casos y muertes anuales en México aumenten a 15,000 y 8,000, respectivamente. La infección persistente de alguno de los cerca de 15 genotipos del virus del papiloma humano (VPH) carcinogénicos causa casi todos los casos de neoplasias.

Existen cuatro principales pasos en el desarrollo del cáncer: infección del epitelio metaplásico en la zona de transformación cervical, persistencia viral, progresión del epitelio persistentemente infectado hacia lesiones pre-cancerosas cervicales e invasión a través de la membrana basal del epitelio [16]. Virtualmente todos los casos de CaCu están ligados a la infección genital con VPH (99%), la cual constituye la infección viral más común en el tracto reproductivo. El VPH puede estar asociado a otros tipos de cáncer como neoplasias anogenitales y de cabeza y cuello; además de verrugas genitales y lesiones menores en mujeres y hombres. Las infecciones por VPH se transmiten a través de contacto sexual. La infección es extremadamente común en mujeres jóvenes en su primera década de actividad sexual y es generalmente asintomática. El sistema inmune es altamente eficiente en erradicar las infecciones por VPH. Sin embargo, un porcentaje bajo de mujeres infectadas, calculado en cerca del 1%, no logra eliminar el virus y presenta infección persistente. Aproximadamente el 1% de las infecciones persistentes desarrolla CaCu. Las infecciones persistentes y el pre-cáncer se establecen generalmente en un periodo de 5-10 años después de la infección. Cada genotipo de VPH actúa como una infección independiente, con diferentes riesgos de carcinogénesis ligados a la especie [2].

1.2.3 Mecanismos moleculares del CaCu.

Existen dos importantes características en el ciclo de vida del VPH que indirectamente contribuyen al desarrollo de cáncer. Primero, la fase replicativa del VPH está confinada a células epiteliales en diferenciación que ya han salido del ciclo celular, las cuales generalmente no permiten la síntesis de DNA gracias a la acción reguladora de las proteínas celulares p53 y pRb [4]. Debido a que el VPH emplea las enzimas celulares para replicar sus genomas, éstos deben inducir la maquinaria de replicación mientras mantienen simultáneamente la diferenciación, lo cual se logra mediante la actividad combinada de las oncoproteínas virales E6 y E7 [12]. Los genes E6 y E7 se encuentran expresados invariablemente en células VPH (+) y juegan roles muy importantes en la carcinogénesis, así como en el mantenimiento del fenotipo

transformado [11]. En las células basales post-mitóticas, los genes E6 y E7 inducen de nuevo la entrada a la fase S del ciclo celular, activando la maquinaria de replicación del huésped necesaria para la amplificación del genoma viral antes de la síntesis de los viriones [12]. El objetivo es la estimulación de la síntesis de DNA y de la proliferación celular [4].

El producto del gen E7 interactúa con varias proteínas. La mayoría de ellas son importantes reguladoras de crecimiento celular, especialmente durante la transición de la célula de la fase G1 hacia la fase S en la mitosis. La proteína E7 se asocia con la familia de proteínas supresoras de tumores RB (pRb, p107, p130), histonas desacetilasas, factores de transcripción AP-1, proteínas de unión a cajas TATA, ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas (CDK), inhibidores de CDK, así como a la piruvatoquinasa. Estas interacciones representan vías por las cuales la proteína E7 desregula el ciclo celular y por lo tanto permite un incremento en la proliferación, la inmortalización y finalmente, la transformación de la célula infectada [3-4, 9, 11-12, 17]. La expresión de E6 causa la proliferación de las células epiteliales, retraso en la diferenciación, bloquea la apoptosis, altera la maquinaria de transcripción e interrumpe interacciones célula-célula. Para llevar a cabo estas actividades, E6 se une a proteínas como p53, CBP/p300, proteína asociada a E6 (E6-AP), Bak, Tyk2, proteincinasa N, Gps2, factor regulatorio de interferón-3, entre otras. Además, altera la tasa de transcripción de los genes que codifican para la subunidad catalítica de la telomerasa humana (hTERT) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) [3-4, 9, 11-12, 17].

1.2.3.1 Proliferación ilimitada.

Los miembros de la familia RB juegan un papel crucial en la regulación del ciclo celular. La proteína Rb hipofosforilada se une a factores de transcripción de la familia E2F y reprime la transcripción de genes particulares del ciclo celular. Cuando las células progresan en la mitosis hacia la fase S, la proteína Rb se hiperfosforila por ciclinas-cdks de la fase G1 liberando el factor de transcripción E2F, el cual activa genes involucrados en la síntesis del DNA y la progresión del ciclo celular. La proteína E7 se une a Rb hipofosforilada e induce con ello a que las células entren en una fase S prematura, rompiendo el complejo Rb-E2F [3, 11, 17].

1.2.3.2 Evasión de la apoptosis.

Condiciones de estrés celular pueden inducir el aumento en los niveles de la proteína p53, la cual puede bloquear la célula en la fase G1. Este bloqueo le permite a la célula reparar el DNA dañado antes de continuar con el ciclo celular. La proteína p53 es un factor de transcripción que estimula la expresión de genes involucrados en el arresto del ciclo celular y la apoptosis. La proteína E6 se une a la proteína p53 permitiendo la degradación mediada por ubiquitina. Por otro lado, la unión de dichas proteínas permite la retención de la proteína p53 en el citoplasma, bloqueando su traslocación hacia el núcleo, evitando así la activación o represión de genes diana de la proteína p53 [3, 11, 17].

1.2.3.3 Inducción de inestabilidad genómica.

La unión de E6 y E7 a las proteínas celulares interfiere con su función normal y puede llevar a un aumento en la tasa de proliferación e inestabilidad genómica. Como consecuencia, la célula huésped acumula DNA dañado, el cual es imposible de reparar. La eficiente immortalización requiere a las proteínas E6 y E7 trabajando en conjunto. Sin embargo, altos niveles de la proteína E7 son capaces de presentar dicho efecto. Las proteínas E6 y E7 inducen cooperativamente aberraciones numéricas en los centrosomas y eventualmente, aneuploidias en células que sobre-expresan estas proteínas, así como anomalías estructurales en los cromosomas que pueden llevar a rearrreglos estructurales como traslocaciones, adiciones y deleciones. Eventualmente, las mutaciones se acumulan permitiendo la generación de células transformadas. En suma a los efectos de los oncogenes activados e inestabilidad cromosómica, los mecanismos que pueden contribuir al proceso de transformación incluyen la metilación del DNA viral y celular, la activación de la telomerasa y los factores hormonales e inmunogénicos. La progresión de las células hacia cáncer generalmente toma lugar en un periodo aproximado de 10-20 años. Algunas lesiones llegan a transformarse más rápidamente, algunas dentro del primer o segundo año [3-4, 11].

1.2.4 Estrategias terapéuticas contra el CaCu.

Las opciones para el tratamiento para CaCu dependen de la etapa en la que se encuentre la enfermedad; etapa definida por el tamaño, profundidad de la invasión y grado de dispersión. Generalmente se emplean métodos quirúrgicos, quimioterapia y radioterapia para su tratamiento [4]. La cirugía se enfoca en remover el tejido tumoral,

la radioterapia emplea rayos X de alta energía para eliminar las células neoplásicas localmente, mientras que la quimioterapia elimina las células dañadas, pero también afecta a células normales. Para ésta última, las drogas más frecuentemente empleadas incluyen el cisplatino, el fluorouracilo (FU-5), el paclitaxel (Taxol), el topotecan y la ifosfamida [18].

En la etapa cero (carcinoma *in situ*) pueden realizarse tratamientos como la conización por asa diatérmica, la cirugía láser, la conización, la criocirugía, la histerectomía total (opcional) y la radiación focalizada. En cuanto a la etapa IA, se emplea como tratamiento histerectomía total con salpingooforectomía bilateral o sin esta, conización, histerectomía radical modificada, extirpación de ganglios linfáticos y radioterapia interna. En las etapas IB y IIA el tratamiento puede incluir una combinación de terapias por radiación focalizada y radiación externa con o sin quimioterapia, histerectomía radical y extirpación de los ganglios linfáticos seguida o no por radioterapia y quimioterapia, así como terapia por radiación más quimioterapia. Las pacientes con CaCu en estadios IIB, III y IVA pueden recibir radioterapia focal y externa combinada con quimioterapia. Sin embargo, el tratamiento del CaCu en estadio IVB solo puede incluir como tratamiento paliativo a la radioterapia y la quimioterapia, así como alentar la participación en ensayos clínicos de medicamentos nuevos [19].

El principal papel para la protección contra la infección por el VPH lo tiene el sistema inmune del huésped. Debido a este hecho, se han realizado mayores esfuerzos en el desarrollo de candidatos para vacunas de uso profiláctico o terapéutico. Estudios recientes demuestran que las proteínas estructurales L1 y L2 son altamente inmunogénicas y aprovechando dicha característica, se han generado partículas similares a virus (VLPs) morfológicamente idénticas al VPH, pero carentes del genoma viral. En el año 2006 se aprobó una vacuna cuadrivalente contra VPH 16, 18, 6 y 11 nombrada GARDASIL®. Además, una nueva vacuna bivalente denominada Cervarix™ contra VPH 16 y 18 se encuentra actualmente disponible. Sin embargo, éstas no parecen tener efecto sobre infecciones ya establecidas, lesiones precursoras de CaCu o verrugas genitales pre-existentes o contra infecciones causadas por tipos de VPH de alto riesgo diferentes a VPH 16 y 18. [8, 11-12, 20]. Por otro lado, las vacunas terapéuticas se encuentran basadas en la evidencia de que las células que expresan E2 son sensibles al tratamiento con interferón (IFN), además de que E2 actúa como represor de la transcripción de E6 y E7. La combinación de la re-expresión exógena de

E2, aunado al tratamiento con IFN podría ser útil en lesiones pre-malignas y malignas [11]. Además de E2, las proteínas E6 y E7 constituyen blancos ideales para el desarrollo de vacunas terapéuticas contra VPH debido a que se comienzan a producir desde las etapas tempranas de la infección y continúan expresándose durante todo el ciclo. El objetivo es generar la respuesta inmune mediada por células contra las éstas proteínas tempranas [21-22].

Otra estrategia para el tratamiento del CaCu es la terapia génica. Los alcances hasta el momento pueden dividirse en distintas categorías: A) Inactivación de la expresión de genes involucrados en el desarrollo del cáncer empleando ribozimas, RNA de interferencia y oligonucleótidos que interfieran en la traducción de E6 y E7 [23]. B) Inserción de genes en las células malignas que las hagan más susceptibles a la quimioterapia, la radioterapia, e incluso, a la respuesta inmune a otros tratamientos. C) Otro alcance involucra la inserción de genes suicidas dentro de las células dañadas y la posterior administración de un pro-medicamento al paciente, que es convertido en una sustancia tóxica por enzimas codificadas por los genes suicidas, y que está restringida a las células cancerosas transducidas. D) Finalmente, los virus oncolíticos representan otra estrategia muy prometedora en cuanto al tratamiento de este y muchos otros tipos de cáncer [24].

1.3 Viroterapia oncolítica.

Los virus oncolíticos son virus replicativos que infectan y lisan selectivamente células cancerosas. Las células son destruidas al final de la replicación viral por el proceso de liberación natural de las partículas virales, las cuales están capacitadas para infectar y lisar más células malignas. Una variedad de especies de virus han mostrado poseer propiedades oncolíticas. Dentro de los virus oncolíticos más estudiados por su aplicación en terapia génica del cáncer son: los adenovirus, el virus del herpes simple, el reovirus, el virus vaccinia, el virus atenuado de la enfermedad de New Castle y el virus de la estomatitis vesicular.

1.3.2 Adenovirus. Virología general.

Los adenovirus han sido extensamente caracterizados desde su descripción inicial en 1950. Se considera que no son altamente patogénicos y en su mayoría, están asociados a infecciones respiratorias, conjuntivitis y gastroenteritis infantil. Sin embargo, en niños y personas inmunocomprometidas estos virus pueden generar

graves infecciones [24]. La familia *Adenoviridae* está dividida en cuatro géneros: *Aviadenovirus*, *Atadenovirus*, *Mastadenovirus* y *Siadenovirus*. Existen 51 serotipos de adenovirus humanos clasificados por su habilidad para ser neutralizados por antisueros específicos de animales. Estos serotipos pueden a su vez dividirse en seis especies o subgrupos (A-F) basados en la capacidad de aglutinar eritrocitos humanos, de rata y de mono [25].

Los adenovirus son partículas icosaédricas no envueltas de aproximadamente 90 nm de diámetro, con fibras proyectándose desde los vértices del icosaedro. La cápside consiste en 12 proteínas pentón, proteínas fibra saliendo de cada una de éstas y 240 subunidades hexón, además de proteínas estructurales menores. El genoma del virus consiste de una doble cadena de DNA lineal de 35-36 Kpb asociado a las proteínas virales V y VII en el core. Este contiene cinco unidades de transcripción temprana (E1A, E1B, E2, E3 y E4), dos unidades tempranas retardadas (IX y IVa2) y una unidad de transcripción tardía mayor, la cual produce cinco especies de RNAm (L1-5). La transcripción ocurre desde ambas cadenas del cromosoma viral. Con excepción de la región E4, cada unidad de transcripción codifica proteínas con funciones similares [26].

El ciclo de infección del adenovirus puede dividirse en las fases temprana y tardía. La fase temprana comprende la entrada del virus en la célula huésped y el paso del genoma viral al núcleo, seguido de la transcripción selectiva y traducción de los genes tempranos [25]. La entrada del ciclo se inicia a través de la unión de la proteína fibra a receptores específicos en la superficie de la célula diana. El receptor de unión para adenovirus de los subgrupos A y C-F es el receptor coxsakie-adenovirus (CAR). Después de la interacción con el receptor primario de unión celular, las $\alpha\beta$ -integrinas interactúan con el motivo arginina-glicina-acido aspártico (RGD) en la base pentón, iniciando así la endocitosis en vesículas cubiertas de clatrina. Mientras el endosoma con el virus se mueve hacia el núcleo, el pH cambia y permite que el virión se desensamble parcialmente. Posteriormente la membrana del endosoma se rompe y las partículas virales se unen al complejo de poro nuclear en el núcleo. En ese lugar, el DNA viral es inyectado al núcleo y se inicia la transcripción. Dentro de la célula, el único gen adenoviral que puede expresarse independientemente del huésped es el gen E1A que contiene tres regiones conservadas: CR1, CR2 y CR3. A través de dichos dominios la proteína E1A se une a proteínas celulares, muchas de las cuales regulan la transcripción y control del ciclo celular. Las células responden a la infección viral

Generación del vector adenoviral oncolítico Ad5/3-UV2-D24 para neoplasias asociadas a VPH

mediante mecanismos que involucran las respuestas inmunes innata y adaptativa mediadas por el factor de transcripción NF- κ B. Además, las células infectadas pueden inducir apoptosis a través de varias rutas, las más importantes a través de las vías p53 y pRb. Las proteínas E1A y E1B son capaces de bloquear dichos mecanismos para asegurar la replicación viral. La proteína E2 provee la maquinaria para la replicación del DNA viral. La proteína E3 interviene con los mecanismos de defensa del huésped. La proteína E4 facilita el metabolismo del RNAm del virus y provee funciones para promover la replicación viral y apagar la síntesis de proteínas del huésped. La transcripción de los genes tardíos L1-L5 permite la producción de los componentes estructurales del virus y la encapsidación y maduración de las partículas en el núcleo [24-25, 27].

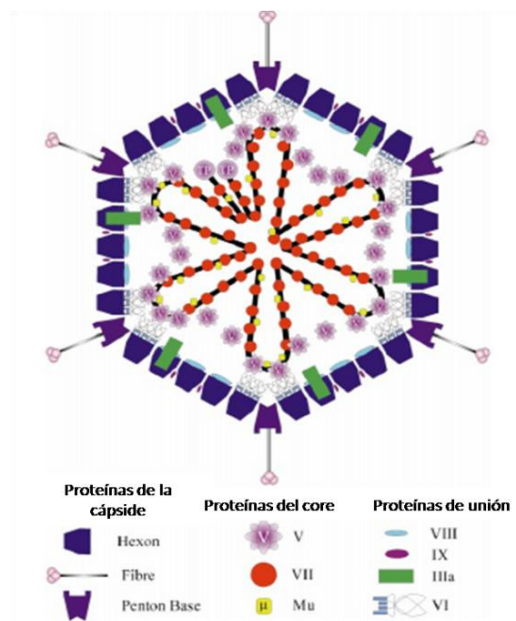


Figura 3 Estructura de Adenovirus. [25]

1.3.3 Adenovirus como vectores de transferencia genética.

Los adenovirus fueron uno de los primeros sistemas de vectores virales usados para la transferencia de genes. Su desarrollo ha progresado significativamente desde su descubrimiento y en la actualidad se emplean principalmente los vectores derivados de los serotipos 2 y 5. Los vectores basados en adenovirus 5 son los más empleados ya que median altos niveles de transducción, tanto en células quiescentes como en proliferación [28]. La expresión de transgenes por adenovirus tipo 5 es transitoria, debido a que su genoma no se integra a los cromosomas de la célula huésped. La

primera generación de vectores adenovirales de replicación deficiente se desarrolló por la delección de regiones de los genes E1, necesarios para la expresión de E2, y los genes tardíos requeridos para la síntesis del DNA, la expresión de proteínas de la cápside y la replicación viral. Subsecuentes delecciones incluyeron la delección en regiones de los genes E3 involucrados en la inmunidad anti-huésped, así como los genes E2 y E4. Estos vectores dieron lugar a la segunda generación de vectores adenovirales, los cuales causan una respuesta inmune del huésped más leve y una expresión del transgen más prolongada, comparados con la primera generación. Estas delecciones permiten además insertar transgenes de mayor tamaño. Posteriormente, para disminuir la inmunogenicidad e incrementar la carga genética útil, se construyeron los vectores adenovirales gutless (“destripados”), en los cuales básicamente se han eliminado todos los genes virales, excepto las regiones ITR y las señales de empaquetamiento [24, 28-29].

1.3.4 Vectores adenovirales de replicación selectiva.

La terapia génica contra el cáncer basada en adenovirus de replicación selectiva constituyen una nueva estrategia para el tratamiento del cáncer resistente a las modalidades terapéuticas ya establecidas. Las masas tumorales sólidas son grandes y complejas y desafortunadamente, la eficacia de los vectores adenovirales de la primera generación fue muy pobre en los ensayos clínicos. Para tratar de solucionar estos problemas se diseñaron los vectores adenovirales de replicación selectiva (VARS). Estos virus oncolíticos pueden ser útiles por su ventaja de multiplicarse dentro de la célula tumoral y ser capaces de diseminarse más eficientemente y posteriormente transducir a otras células cancerosas. La infección de los vectores en las células cancerosas se logra mediante métodos de transcripción y transducción dirigida. La replicación de los VARS está restringida a las células cancerosas mediante delecciones en los genes adenovirales necesarios para la replicación en las células normales, pero cuyas funciones han sido remplazadas por alteraciones genéticas propias del proceso de transformación.

El primer VARS publicado se denominó dl1520 y es mejor conocido como ONYX-015. Fue descrito por Bishoff en 1996 y consistió en un vector con dos mutaciones del gen E1B, el cual codifica para la proteína E1B-55KDa. Esta proteína se une e inactiva a la proteína p53 bloqueando la apoptosis e induciendo la entrada a la fase S del ciclo celular. La delección de este gen deja al virus incapaz de replicarse en las células

normales, debido a que la proteína p53 iniciaría el arresto celular o la apoptosis. Sin embargo, como la mayoría de las células cancerosas presentan una vía p53 deficiente, el virus puede replicarse libremente en la célula [23-24, 29-30]. Otra estrategia en cuanto a los VARS es la delección de 24 pb de la región constante 2 del gen E1A, el resultado es una proteína E1A incapaz de inactivar la función de pRb. La replicación de los VARS con esta característica es deficiente en las células normales, pero en células cancerosas muestra una alta capacidad replicativa [23-24, 31-33].

1.3.5 Transducción dirigida hacia células malignas.

El objetivo de la transducción dirigida es eliminar el tropismo del adenovirus tipo 5 en células epiteliales normales y/o potenciar la infectividad del virus hacia células tumorales deficientes de CAR [31].

Datos recientes sugieren que la expresión del receptor CAR puede ser altamente variable en las células tumorales, resultando en una resistencia a la infección. En consecuencia, se han evaluado varias estrategias para modificar el tropismo del adenovirus y superar la deficiencia del receptor CAR. La manipulación genética de la cápside adenoviral es la estrategia más directa para modificar el tropismo del virus [31]. En general existen tres estrategias básicas para la modificación de genética del tropismo a través de la modificación estructural de la proteína fibra del adenovirus: 1) quimerismo de la proteína fibra o "fiber pseudotyping", 2) incorporación de ligandos a la proteína fibra o al dominio de unión al receptor y 3) eliminación del dominio de unión [34]. La primera consiste en la alteración del tropismo viral mediante la sustitución de las proteínas fibra de unión a receptor con otras pertenecientes a otros serotipos, tal es el caso de la sustitución de la proteína fibra del adenovirus tipo 5 por la del adenovirus tipo 3. Las quimeras adenovirales 5/3 poseen una infectividad potenciada en células de varios tipos de cáncer, sin incrementar la dirección de los adenovirus al hígado [30, 35-40]. Wickham y colaboradores (1997) modificaron el dominio de unión (knob) de la proteína fibra añadiendo una cola de 7 polilisinas al C-terminal de la proteína (pK7) para mediar la unión del adenovirus a los proteoglicanos heparán sulfato (HSPG), los cuales se encuentran altamente expresados en células cancerosas. Los adenovirus con pK7, han demostrado mejorar la transducción hacia las células cancerosas. Otra estrategia ha sido la incorporación de motivos arginina-glicina-acido aspártico (RGD) en el asa HI del dominio de unión de la proteína fibra, el cual se encuentra expuesto hacia el exterior y puede tolerar la inserción de hasta 100 aminoácidos. La inserción

resulta en la potenciación de la infectividad de varios tipos de células cancerosas [24, 28, 30-31, 34].

1.3.5.1 Quimerismo de la proteína fibra

En 1996 Krasnykh y colaboradores fueron los primeros en reportar la construcción de un vector oncolítico que expresaba una proteína fibra quimérica constituida por el dominio tallo del adenovirus serotipo 5 (Ad5) y el dominio cabeza o knob del adenovirus serotipo 3 (Ad3). A partir de entonces se han evaluado vectores portadores de modificaciones en la proteína fibra, dentro de los cuales se han destacado los adenovirus 5/3. Los Ad5/3 han demostrado aumentar el tropismo hacia distintos tipos celulares malignos, tanto en ensayos *in vitro* como en ensayos pre-clínicos y algunos de ellos hasta en clínicos [35-45].

Dentro de las ventajas que ofrecen este tipo de vectores es el ser reconocidos por un receptor en las células huésped distinto al receptor CAR: la proteína desmogleína 2 (DSG-2), la cual aparentemente tiene funciones de adhesión celular [46] y se ha encontrado expresada en varias líneas celulares transformadas. Además, se ha observado que los adenovirus con fibras quiméricas podrían evadir la respuesta inmune del huésped al momento de administrarse como tratamiento sistémico, ya que no serían reconocidos fácilmente en el paciente, pues se esperaría que no existieran anticuerpos neutralizantes que bloqueen su efecto [47-48].

1.3.6 Transcripción dirigida hacia células malignas.

A diferencia de la transducción dirigida, la transcripción dirigida no involucra un cambio en el tropismo del virus; en su lugar, restringe la expresión génica a las células diana. Esta estrategia se logra colocando el gen o transgen bajo el control de un promotor tumor/tejido específico (TSP). Los virus son capaces de infectar varios tipos celulares, pero solo pueden expresar los genes que portan en los tipos celulares que expresan activamente los factores de transcripción necesarios para la actividad del TSP [31]. Se han evaluado una gran variedad de promotores TSP con resultados prometedores en estudios preclínicos, entre los cuales destacan los promotores del antígeno carcinoembrionario (CEA), un promotor de cáncer gástrico y de pulmón, de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) para cáncer gástrico, pancreático y de ovario, así como elementos de respuesta a hipoxia (HREs) en cáncer de riñón [24, 29-32].

1.3.6.1 Promotores específicos de tejido para CaCu.

Virtualmente todos los casos de cáncer cervical están ligados a la infección genital con VPH (99%). La regulación genética de los VPH reside en la región reguladora río arriba URR. En el año 2006 Delgado-Enciso y colaboradores reportaron un VARS dirigido por la URR de la variante asiático-americana de VPH-16 y con la delección de 24 pb en el gen E1A. Este vector, denominado Ad-URR/E1A Δ 24, mostró un gran efecto oncolítico y altamente selectivo para líneas celulares VPH (+), asimismo éste vector logró controlar el crecimiento tumoral en ensayos pre-clínicos. [49]. La URR de VPH constituye un origen de replicación y un sitio de unión a múltiples factores de transcripción. Actualmente se sabe que, factores como la proteína activadora 1 (AP1), los factores SP1, TEF-1, TEF-2, Gre y Ying-Yang 1, la proteína E2, así como el factor Brn-3a, entre otros, se unen a sitios consenso presentes en la URR y son importantes para la regulación del virus [23]. Brn-3a es un importante factor de transcripción que se une a un motivo ATGCAATT en la región promotora del genoma del VPH-16 y VPH-18, el cual controla la transcripción de los genes E6 y E7 y activa la transcripción [50]. Aunque originalmente este factor fue encontrado en tejido neuronal, Ndisang y colaboradores (1998) encontraron niveles de Brn-3a elevados alrededor de 300 veces en material cervical proveniente de mujeres con neoplasia intraepitelial tipo 3, comparada con material similar de personas sin anomalías cervicales detectables [51]. Posteriormente se descubrió que los niveles elevados de Brn-3a inducen el incremento de los niveles de producción de las proteínas E6 y E7 [52]. Recientemente se encontró que variantes del VPH-16 presentan diferentes riesgos de progresión a malignidad. En un estudio en el que se analizó material cervical de mujeres infectadas con VPH-16, se encontró que en tejidos infectados con la variante 2, los niveles de expresión de Brn-3a correlacionaban directamente con los niveles de E6, proteína implicada en el proceso de transformación de la célula huésped [53].

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

Tanto los VPH oncogénicos como los adenovirus poseen mecanismos similares para usurpar la regulación del ciclo celular, con el fin de facilitar la replicación del DNA viral. Esto lo hacen dirigiendo los mismos reguladores celulares pRb, p107 y p130 a través de las proteínas E1A del adenovirus y E7 de VPH. E1A es la primera unidad de transcripción en expresarse en la infección por adenovirus en células en cultivo y se requiere para la movilización del ciclo celular y transactivación de otros promotores

Generación del vector adenoviral oncolítico Ad5/3-UV2-D24 para neoplasias asociadas a VPH

tempranos del virus. Los polipéptidos de E1A comparten homología con la proteína del VPH E7 en las regiones conservadas CR1 y CR2, las cuales se unen e inactivan a pRb y proteínas relacionadas. E1A y VPH E7 pueden transactivar el promotor E2 de adenovirus en ensayos *in vitro*, así como también genes celulares involucrados en la entrada a la fase S. Así pues, si se generan deleciones en CR2 de E1A del adenovirus, se verá afectada la unión de la proteína resultante. Esta mutación limitaría la replicación del virus en células en las cuales la función de pRb y p53 se encuentra intacta, como es el caso de las células no transformadas que rodean al tumor. Sin embargo, no interferiría en la replicación viral en células cancerosas, donde la función de pRb ha sido afectada por el proceso de malignización. En este contexto, la proteína E7 de VPH puede restaurar la actividad transcripcional de la deleción en CR2. De esta forma, la replicación de los adenovirus mutantes defectuosos puede complementarse por los oncogenes de VPH, restringiendo así su replicación a células cancerosas VPH positivas [4, 23]. En el año 2000 Fueyo y colaboradores describen un vector portador de una deleción de 24 pb en el gen E1A ($\Delta 24$). Ésta deleción impide la unión de la proteína pRb a su sitio de unión en E1A. Sin embargo, los vectores $\Delta 24$ pueden replicarse y lisar células cancerosas con una alta eficiencia [33]. Este vector es uno de los VARS que logra mejor replicación en células neoplásicas en cultivo e implantadas en modelos murinos.

CAPÍTULO

II. JUSTIFICACIÓN

En México, la mayoría de las pacientes son diagnosticadas en fases avanzadas de CaCU, en la que solo se pueden ofrecer tratamientos paliativos con poco impacto en la supervivencia, que alientan el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas. En esta propuesta se pretende diseñar y generar un vector adenoviral oncolítico dirigido específicamente contra células transformadas por VPH-ar usando tres modificaciones: Uso de un promotor viral tejido-específico (UV2), deleción $\Delta 24$ en el gen E1A y el cambio de serotipo del knob (Ad3) en la proteína fibra para incrementar tropismo por células tumorales.

CAPÍTULO

III. OBJETIVOS

General

Generar un vector adenoviral oncolítico diseñado para infectar específicamente células transformadas por VPH-ar usando tres modificaciones: Un promotor viral tejido-específico (UV2), la delección $\Delta 24$ en el gen E1A y una proteína fibra quimera en la cápside conformada por los serotipos Ad5 y Ad3.

Específicos

1. Diseñar y construir el genoma adenoviral recombinante en bacterias *E. coli* BJ5183.
2. Generar y producir el VARS Ad5/3-UV2- $\Delta 24$ en células HEK293.

CAPÍTULO

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales y reactivos

A continuación se enlistan las enzimas, medios de cultivo celular, kits y consumibles empleados durante el desarrollo de este trabajo.

AMRESCO

Triptona
Hidróxido de Sodio
Cloruro de Sodio
Extracto de Levadura
Extracto de levadura (Cerrado)
Buffer pH 4.01
Buffer pH 7.01
Buffer pH 10.01
Agar Bacteriológico
TRIS Grado Ultrapuro (Cerrado)
Cloruro de Sodio
EDTA, Disodio, Dihidrato
Triptona, Caseína Peptona

SIGMA

Hidróxido de Sodio
Cloruro de Sodio
Alcohol Isopropílico
Cloroformo 99.8+ %
Agarosa Ultrapura

J.T. BAKER

Glicerol, Anhídrido

CORNING

Tubos para microcentrífuga 0.65mL
Tubos PCR 0.2mL

Generación del vector adenoviral oncolítico Ad5/3-UV2-D24 para neoplasias asociadas a VPH

Cajas de cultivo 150mm x 25mm
Botellas de cultivo 75 cm²
Tubos Falcon 15ml
Placas de cultivo 96 celdas
Botellas de cultivo 150cm²
Botellas de cultivo 25cm²
Cajas de cultivo 100mm x 20 mm
Tubos Eppendorf 0.2 ml
Puntillas 0.2-10 microlitros
Placas de cultivo 96 celdas
Puntillas azules 100-1000 microlitros
Sistema de filtración 500 ml
Sistema de filtración 250 ml
Sistema de filtración 1 litro
Cajas de cultivo 100mm x 20 mm

COSTAR

Pipeta seriológica 5ml (desechable)
Pipeta seriológica 50ml (desechable)
Pipeta seriológica 2ml (desechable)
Pipeta seriológica de 10ml (desechable)
Scraper

4.2 Material biológico.

4.2.1 Células competentes y líneas celulares.

Se emplearon bacterias competentes *E. coli* DH5a, *E. coli* Turbo y *E. coli* BJ5183 (Stratagene, La Jolla CA). Se empleó la línea celular: HEK-293 (ATCC CRL-1573TM, riñón embrionario humano).

4.2.2 Iniciadores

Tabla 2 Iniciadores empleados para la realización de este trabajo.

Nombre	Secuencia	Tamaño	T _m °C
Var2-SS-F	TCTACAACCTGGTCGACTGTA	20	52
Var2-SS-R	TGGTAACTTTCACTAGTCATA	21	48
Var2-HK-F	GGTACCTGTAAGTATTGTAT	20	43
Var2-HK-R	AAGCTTCATAAAATGTCTG	19	48
K3 (S)	GCACAGGTGCCATTACAGTAG	21	55.8
K3 (AS)	TCATTATGTGTTCCCGCATA	21	51.9
D24 L1	GTCCGGTTTCTATGCCAAAC	20	57.1
D24 R1	CACCCTCTTCATCCTCGTC	19	57.1

4.2.3 Plásmidos.

Tabla 3 Plásmidos empleados para la realización del presente estudio

Plásmido	Gen (es) de interés	Resistencia a antibiótico	Tamaño (pb)	Fuente
pShuttle-UV2-Δ24	UV2 E1AΔ24	Kanamicina	10,690	Vera M.
pShuttle-UV2-Δ24	UV2 E1AΔ24	Ampicilina	10,039	López G.
pTU5/3	Esqueleto Ad5/3	Kanamicina	33 400	Hemminki A.
pAd5/3UV2 E1AΔ24	Genoma adenoviral recombinante	Ampicilina	39198	López G.

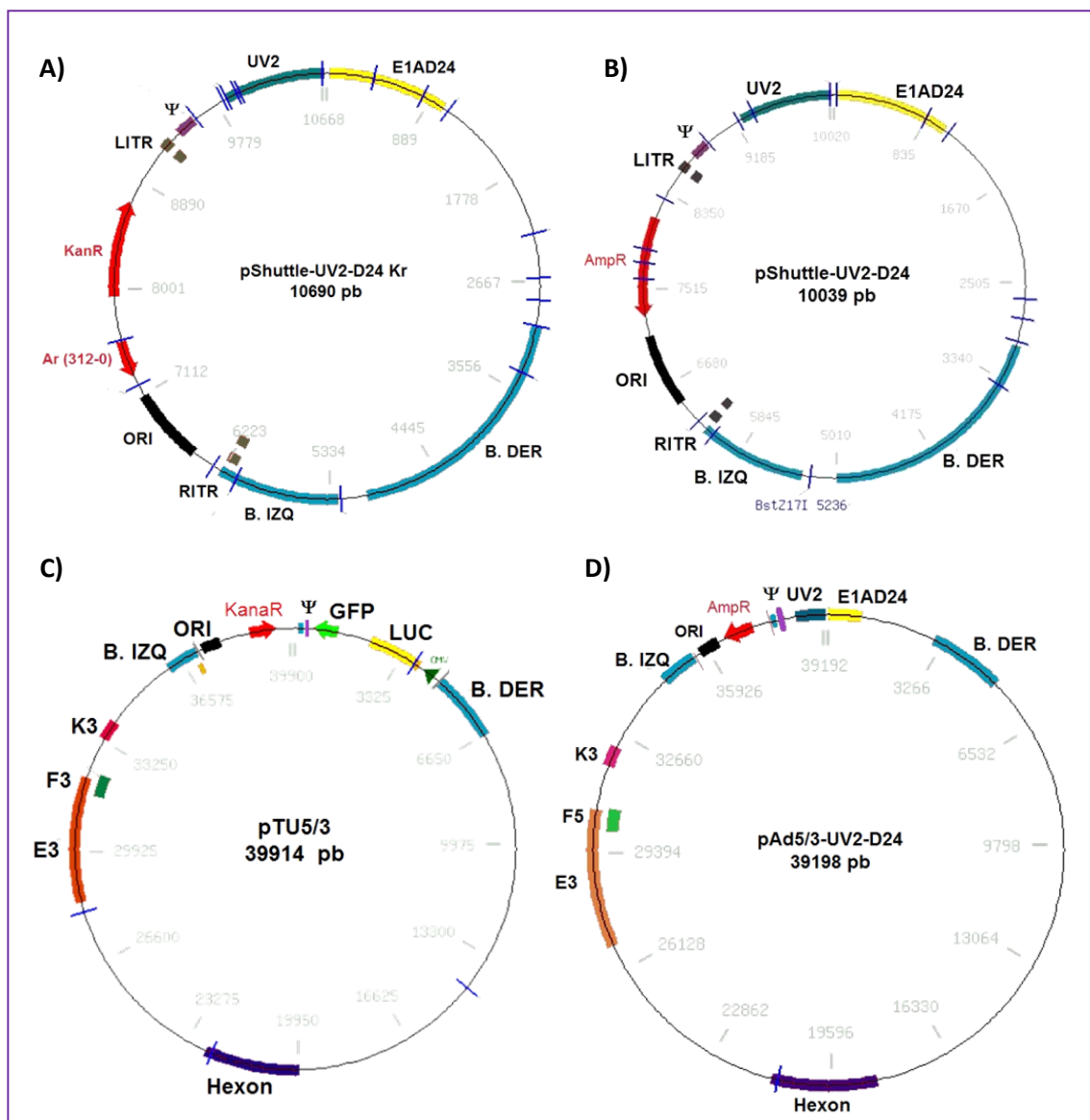


Figura 4 Plásmidos empleados en el desarrollo de esta tesis.

4.3 Estrategia general.

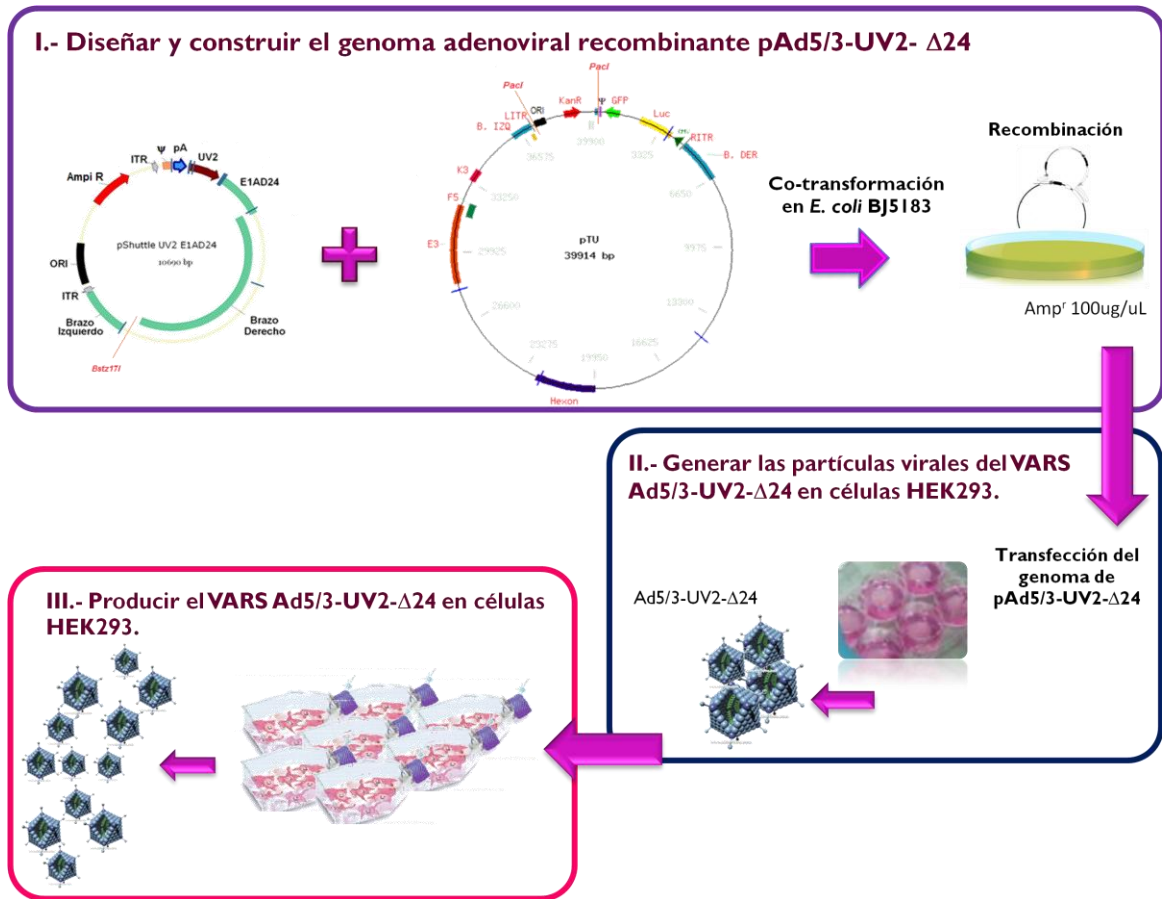


Figura 5 Estrategia general del estudio.

4.4 Diseño del vector adenoviral recombinante pAd5/3-UV2-Δ24.

Se planeó llevar a cabo la recombinación en bacterias *E. coli* BJ5183, las cuales son Rec A+. Se analizaron los plásmidos con los cuales se contaba para la construcción del vector adenoviral. Se observó que deberían hacerse algunos cambios para seleccionar eficazmente las clonas recombinantes en bacterias. Se realizó un cambio en la resistencia a antibiótico en pShuttle-UV2-Δ24. Posteriormente se analizaron más a fondo las secuencias de ambos plásmidos a recombinar haciendo un alineamiento (BLAST) y ubicando regiones de homología. Se decidió eliminar una región de homología extra en pTU5/3 cortando el plásmido con la enzima *PacI*.

4.5 Preparación del plásmido pShuttle-UV2-Δ24.

El plásmido pShuttle-UV2-Δ24 (construido por Q.B.P. Magda Vera) se caracterizó por corte con la enzima *Afl III* y por PCR de la región promotora UV2. En las tablas 4 y 5 se muestran las condiciones estandarizadas para la amplificación de UV2.

Tabla 4 Condiciones de temperaturas PCR UV2.

Paso	Temperatura °T	Tiempo (min)
1	94	5
2	94	0.5
3	56.7	0.5
4	72	1
5	Ir a Paso 2 30 veces	
6	72	5
7	Final	

Tabla 5 Condiciones de la reacción de amplificación de UV2.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen 1X (μL)
Buffer (Epicentre)	10X	1X	1.25
Cloruro de Magnesio	25mM	2mM	1.0
dNTPs	10mM	200 μM	0.25
Var2-SS-F	5 μM	0.6 μM	1.5
Var2-SS-R	5 μM	0.6 μM	1.5
Taq DNA Polimerasa (Epicentre)	5 U/μL	0.5 U	0.1
H ₂ O mQ	-	a 12.5 μL	5.9
DNA	-	100 ng	1.0
		Vf	12.5

Se realizó un cambio en la resistencia a antibiótico en pShuttle-UV2-Δ24 de kanamicina a ampicilina, para lo cual, se digirió pShuttle-UV2-Δ24 con las enzimas *NdeI* y *XmnI* para liberar el fragmento correspondiente al origen de replicación y el gen de resistencia a kanamicina (2903 pb). El plásmido pXC1 se digirió con las enzimas *NdeI* y *EcoRV* para liberar la región que comprende el origen de replicación y el gen de resistencia a ampicilina, ambos se dejaron digiriendo toda la noche a 37°C y posteriormente se corrieron en un gel de agarosa al 1%, se cortaron las bandas de interés y se purificó el DNA por columna con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos purificados se ligaron con la enzima T4 DNA Ligasa de Promega y el producto de ligación se transformó en bacterias *E. coli* DH5α. Se tamizaron colonias digiriendo con las enzimas de restricción *EcoRI*, *HindIII* y *BamHI*. Además de realizar la detección del

Generación del vector adenoviral oncolítico Ad5/3-UV2-D24 para neoplasias asociadas a VPH

promotor UV2 por PCR, se eligió una clona positiva pShuttleUV2-Δ24 A^r para crecerla a mayor escala, congelarla y emplearla posteriormente para la recombinación.

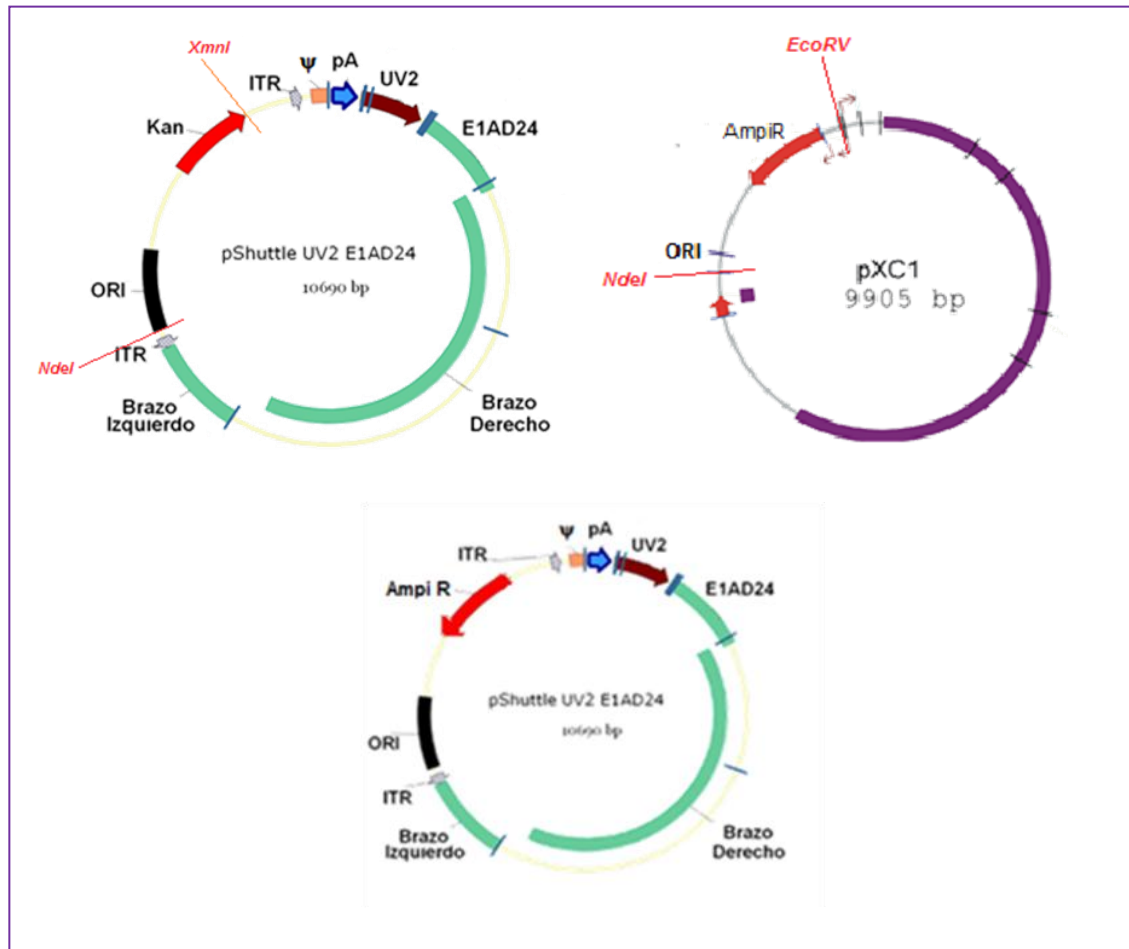


Figura 6 Estrategia para realizar cambio de resistencia a antibiótico en pShuttle-UV2-Δ24.

4.6 Preparación del plásmido pTU5/3.

El plásmido pTU5/3 (donado por PhD Akseli Hemminki) se caracterizó por corte con las enzimas *NdeI*, *AflIII*, *BamHI*, *XbaI*, *XhoI*. y por amplificación de la región knob 3 de la proteína fibra quimera. En las tablas 6 y 7 se muestran las condiciones estandarizadas para la amplificación de K3.

El plásmido pTU5/3 se digirió con la enzima *PacI* toda la noche a 37°C y al día siguiente se corrió en un gel de agarosa al 0.7%, se cortó el fragmento de interés (37 Kpb) y se purificó el DNA por columna siguiendo las instrucciones del fabricante (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega).

Generación del vector adenoviral oncolítico Ad5/3-UV2-D24 para neoplasias asociadas a VPH

Tabla 6 Condiciones de temperaturas PCR K3.

Paso	Temperatura °T	Tiempo (min)
1	94	5
2	94	0.5
3	53.0	0.5
4	72	1
5	Ir a Paso 2 30 veces	
6	72	5
7	Final	

Tabla 7 Condiciones de la reacción de amplificación de K3.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen 1X (µL)
Buffer (Epicentre)	10X	1X	1.25
Cloruro de Magnesio	25mM	2mM	1.0
dNTPs	10mM	200 µM	0.25
K3 (S)	5 µM	0.6 µM	1.5
K3 (AS)	5 µM	0.6 µM	1.5
Taq DNA Polimerasa (Epicentre)	5 U/µL	0.5 U	0.1
H ₂ O mQ	-	a 12.5 µL	5.9
DNA	-	100 ng	1.0
		Vf	12.5

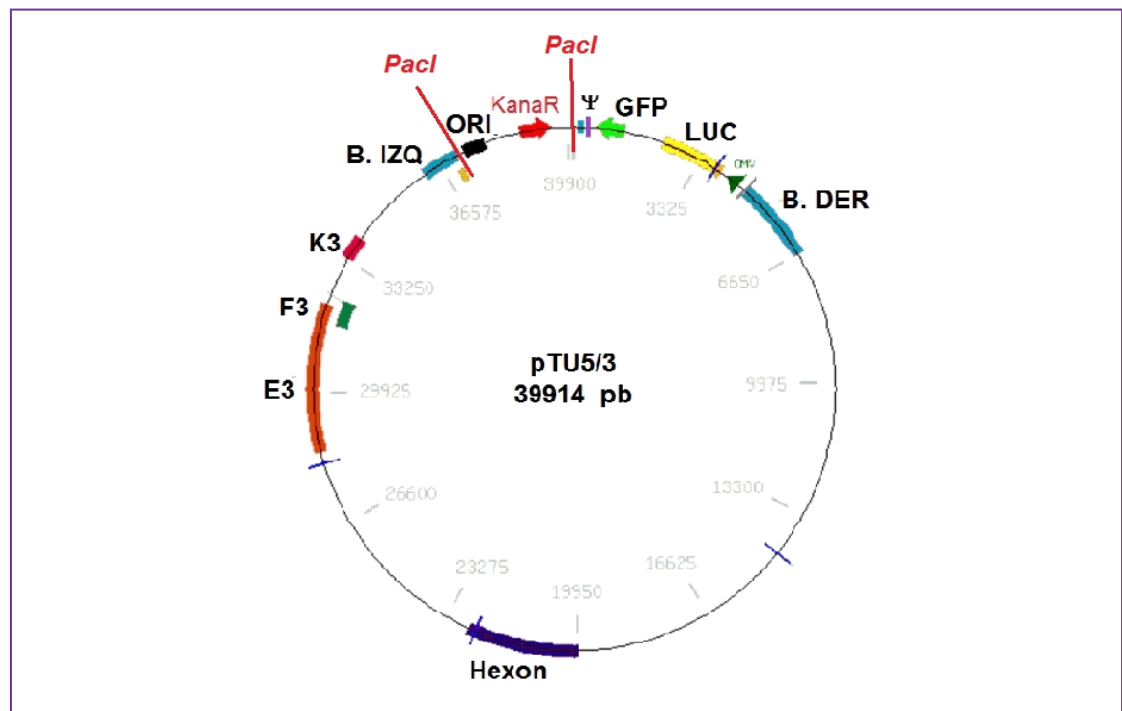


Figura 7 Modificación realizada en pTU5/3 en el cual se libero la región de homología extra encontrada en la secuencia.

4.7 Construcción del genoma adenoviral recombinante

pAd5/3UV2-Δ24.

El genoma del vector adenoviral pAd5/3-UV2-Δ24 se construyó co-transformando en bacterias *E. coli* BJ5183 el DNA pShuttleUV2-Δ24 A' linearizado con la enzima *Bstz171* y el vector pTU5/3 linearizado con *PacI* a una relación 1:2 respectivamente. Las bacterias transformadas se crecieron en placas con medio LB y las clonas recombinantes fueron seleccionadas por su resistencia a ampicilina (100 µg/mL). Se emplearon controles de transformación y otro control con pShuttleUV2-Δ24 A' linearizado con *Bstz171*. Las clonas crecidas se tamizaron por digestión con enzimas de restricción *PmeI*, *SpeI* y además por la detección del promotor UV2, el gen fibra K3 y la delección Δ24 en E1A por PCR. Para la reacción de PCR se siguieron las condiciones mostradas en las tablas 4-9.

Tabla 8 Condiciones de temperaturas PCR D24.

Paso	Temperatura °T	Tiempo (min)
1	94	5
2	94	0.5
3	56.7	0.5
4	72	1
5	Ir a Paso 2 30 veces	
6	72	5
7	Final	

Tabla 9 Condiciones de la reacción de amplificación de D24.

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen 1X (µL)
Green Gotaq™ Buffer (Promega)	5X	1X	3
Cloruro de Magnesio*	-	1.5mM	-
dNTPs	10mM	200 µM	0.3
D24 R1	5 µM	0.6 µM	1.0
D24 L1	5 µM	0.6 µM	1.0
Biotaq**	~ 5 U/µL	~ 1U	0.25
H ₂ O mQ	-	a 15 µL	7.45
DNA	-	~ 100 ng	2.0
		Vf	15

Generación del vector adenoviral oncolítico Ad5/3-UV2-D24 para neoplasias asociadas a VPH

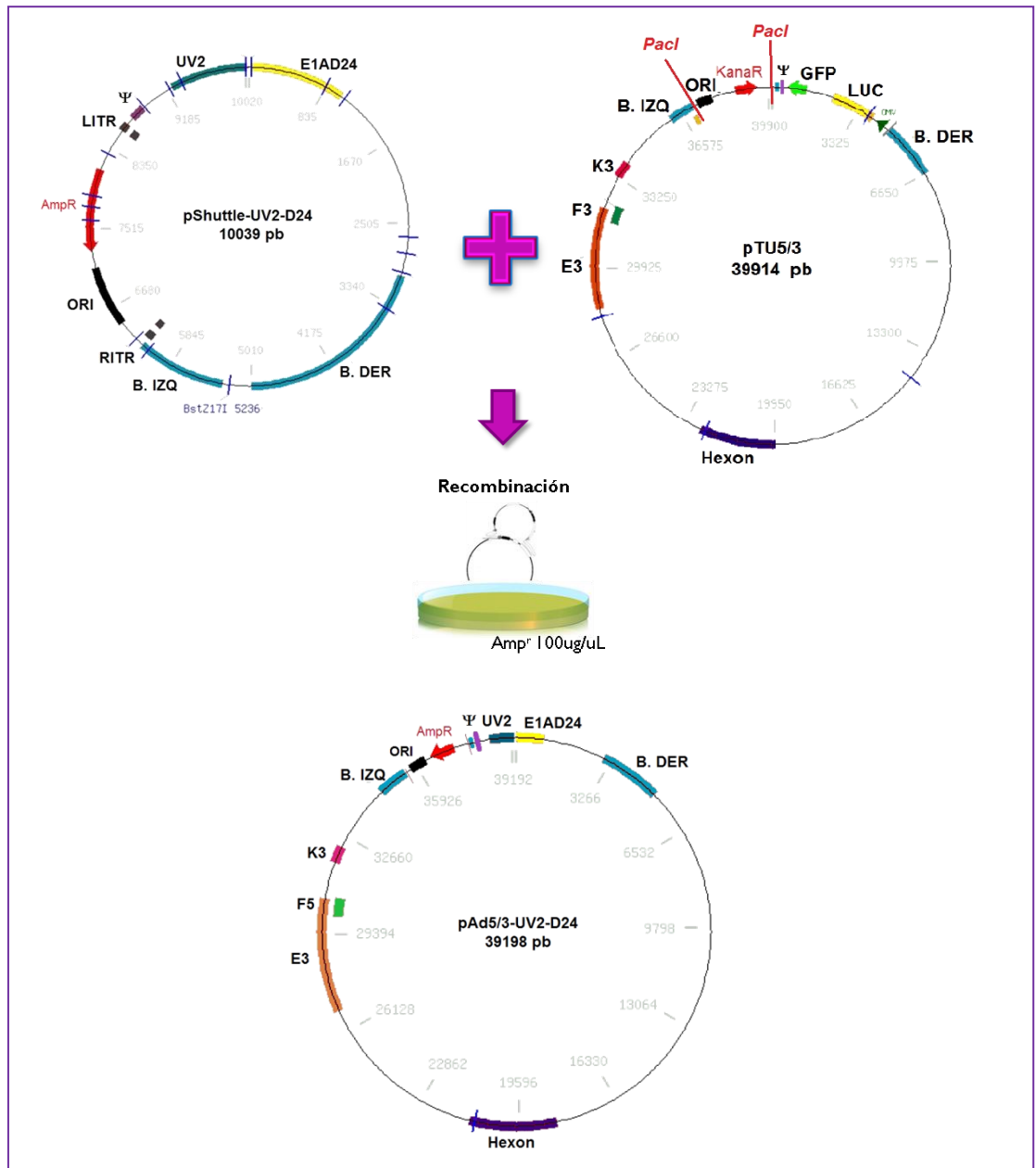


Figura 8 Estrategia de recombinación en bacterias BJ5183.

4.8 Generación del VARS Ad5/3-UV2- Δ 24.

El plásmido recombinante pAd5/3-UV2- Δ 24 se creció a mediana escala y se realizó la extracción de DNA mediante el Kit PureYield™ Plasmid Midiprep System de Promega, siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA obtenido se cuantificó y se digirió con *Pac*I toda la noche. Al día siguiente el DNA digerido se precipitó con acetato de amonio e isopropanol y los lavados del DNA se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar. El DNA se resuspendió en 30 μ L de agua

Generación del vector adenoviral oncolítico Ad5/3-UV2-D24 para neoplasias asociadas a VPH

mQ estéril y se cuantificó en nanodrop 2000. El DNA de pAd5/3-UV2-Δ24 se empleó para transfectar 700,000 células HEK293/pozo en una placa de seis pozos empleando como agente transfectante Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen™) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se emplearon las relaciones DNA: Lipofectamina 0.5:1, 1:1 y 1: 0.75. Se incubó a 37° C y 5% de CO₂ hasta observar efecto citopático en las células. Una vez que el efecto citopático se observó en el 80% de las células, éstas fueron cosechadas y lisadas por tres ciclos de congelación y descongelación (-80°C y 37°C respectivamente) y el lisado fue empleado para infectar tres cajas T-25. Posteriormente, al observarse efecto citopático en el 80% de las células, éstas fueron cosechadas, lisadas y el sobrenadante obtenido se empleó para infectar dos cajas T-75. Una vez observado efecto citopático en el 80% de las células, éstas fueron cosechadas y lisadas y se tomó ¼ del lisado para realizar caracterización del vector por PCR de las regiones UV2, K3 y D24 y ¾ se guardaron para continuar la producción a gran escala posteriormente.

CAPÍTULO

V. RESULTADOS

El genoma adenoviral pAd5/3-UV2-Δ24 se construyó recombinando los plásmidos pShuttle-UV2-Δ24 y pTU5/3, los cuales fueron previamente modificados para facilitar el proceso de recombinación en bacterias. El plásmido pShuttle-UV2-Δ24 fue caracterizado por digestión con *Afl III* y PCR del promotor UV2 (Fig. 9). En la tabla 4 se muestran las condiciones estandarizadas para la amplificación del promotor UV2. La secuencia de los oligonucleótidos o iniciadores empleados para las diversas caracterizaciones se muestran en la tabla 2.

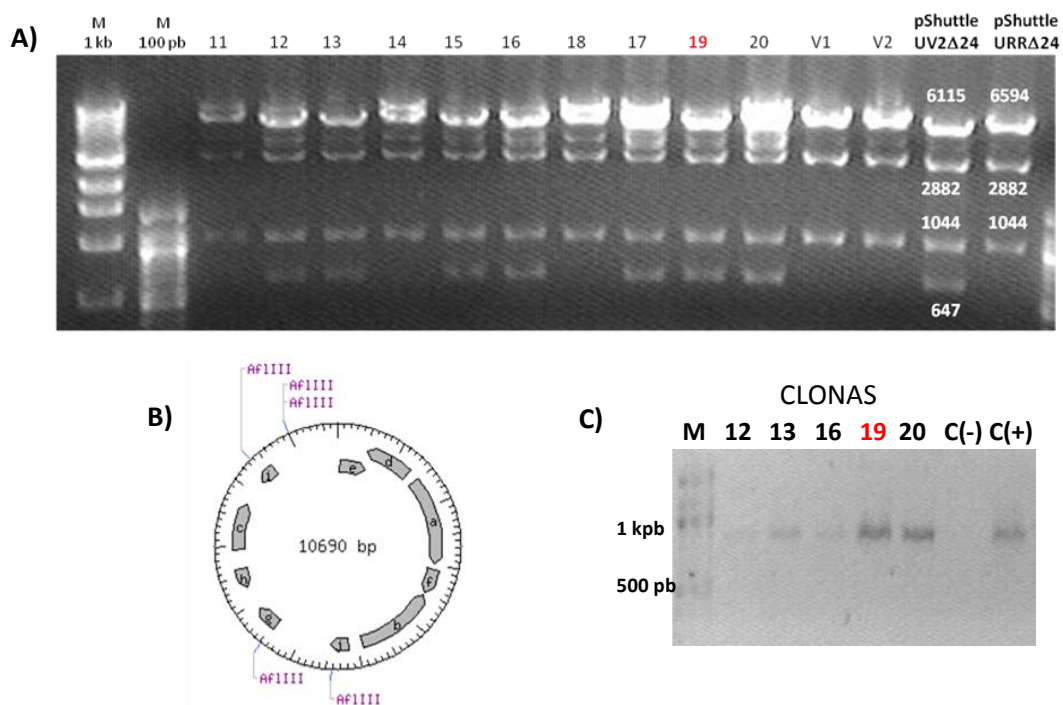


Figura 9 Caracterización de pShuttle-UV2-Δ24. A) Digestión con *Afl III*. B) Esquema de cortes en el plásmido. C) PCR región UV2, amplicón generado de 808 pb.

Una vez caracterizado pShuttle-UV2-Δ24 se llevó a cabo el cambio en la resistencia a antibiótico de kanamicina a ampicilina. Para ello, el plásmido previamente referido se

Generación del vector adenoviral oncolítico Ad5/3-UV2-Δ24 para neoplasias asociadas a VPH

digirió con *NdeI* y *XmnI* para liberar el fragmento correspondiente al origen de replicación y el gen de resistencia a kanamicina (2903 pb). Por otro lado, el plásmido pXC1 se digirió con las enzimas *NdeI* y *EcoRV* para liberar la región que comprende el origen de replicación y el gen de resistencia a ampicilina (2252 pb). En la figura 10 se puede observar un gel de agarosa al 0.7 % en el cual se corrieron los plásmidos digeridos. Se purificaron las bandas de interés, las cuales corresponden al vector pShuttle-UV2-Δ24 de 7787 pb y al fragmento correspondiente al origen de replicación y el gen de resistencia a ampicilina de 2252 pb.

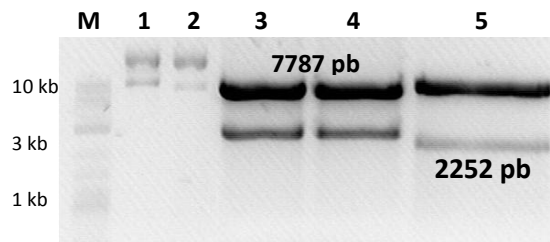


Figura 10 Purificación de las bandas pShuttle y pXC1. Gel de agarosa al 1% empleado para purificar las bandas del vector pShuttleUV2 sin resistencia a antibiótico y el gen de resistencia a ampicilina y origen de replicación provenientes de pXC1. Carril 1 pShuttle-UV2-Δ24 no cortado, 2 pXC1 no cortado, 3 y 4 pShuttle-UV2-Δ24 (*XmnI* + *NdeI*), 5 pXC1 (*EcoRV*+ *NdeI*).

Se realizó una reacción de ligación con los fragmentos purificados, esperando obtener un plásmido de 10 039 pb denominado pShuttle-UV2-Δ24 Ar. Los productos de ligación se transformaron en *E. coli* DH5α y se tamizaron colonias digiriendo con enzimas de restricción y PCR del promotor UV2 (Fig. 11).

Generación del vector adenoviral oncolítico Ad5/3-UV2-D24 para neoplasias asociadas a VPH

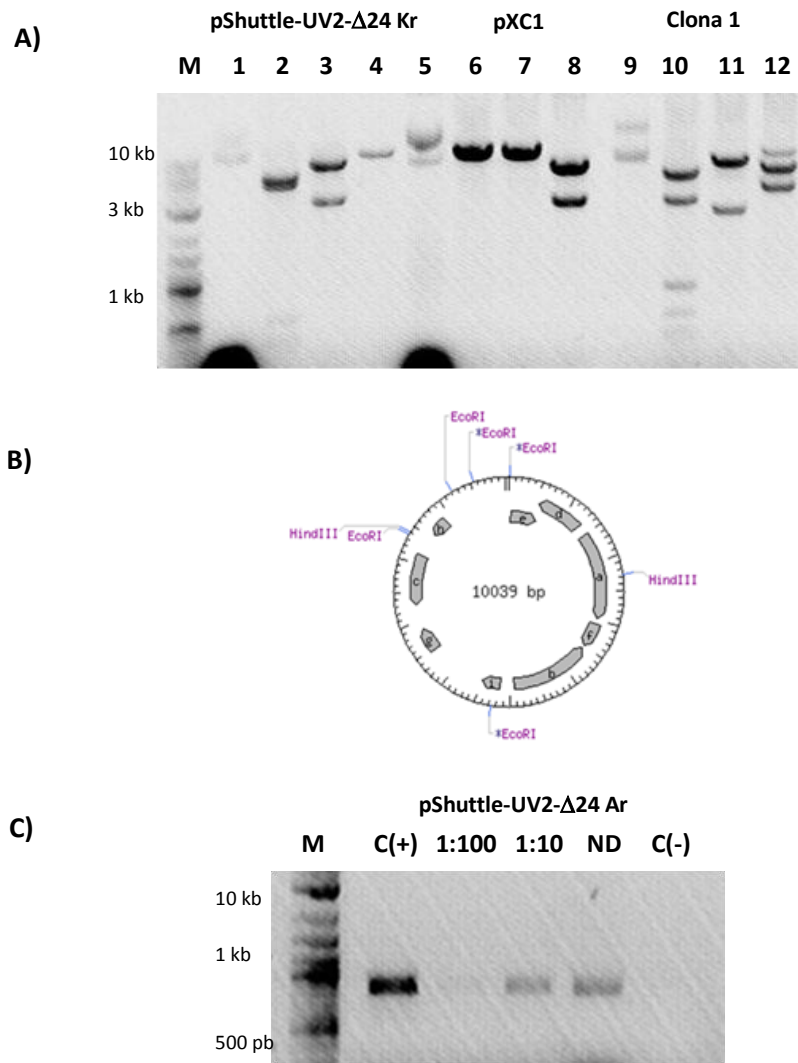


Figura 11 Caracterización de las clonas pShuttle-UV2-Δ24 Ar. A) Por corte con las enzimas *EcoRI*, *BamHI* y *HindIII*. En los carriles del 1-4 se muestra pShuttle-UV2-Δ24 Kr: 1 No cortado, 2 cortado con *EcoRI*, 3 cortado con *BamHI*, 4 cortado con *HindIII*. Carriles 5-8 plásmido pXC1: 5 no cortado, 6 cortado con *EcoRI*, 7 cortado con *BamHI*, 8 cortado con *HindIII*. Carriles 9-12 muestran el plásmido obtenido de la clona 1: 9 plásmido no cortado, 10 plásmido cortado con *EcoRI*, 10 plásmido cortado con *BamHI*, 11 plásmido cortado con *HindIII*. B) Esquema de cortes con *EcoRI*, *BamHI* y *HindIII* en el plásmido pShuttle-UV2-Δ24 Ar. C) PCR del promotor UV2, amplicón esperado de 808 pb. El control positivo es pShuttle-UV2-Δ24 Kr.

El plásmido pTU5/3 fue caracterizado por corte con enzimas de restricción y PCR de la región Knob 3 de la fibra adenoviral (Fig. 12).

Generación del vector adenoviral oncolítico Ad5/3-UV2-D24 para neoplasias asociadas a VPH

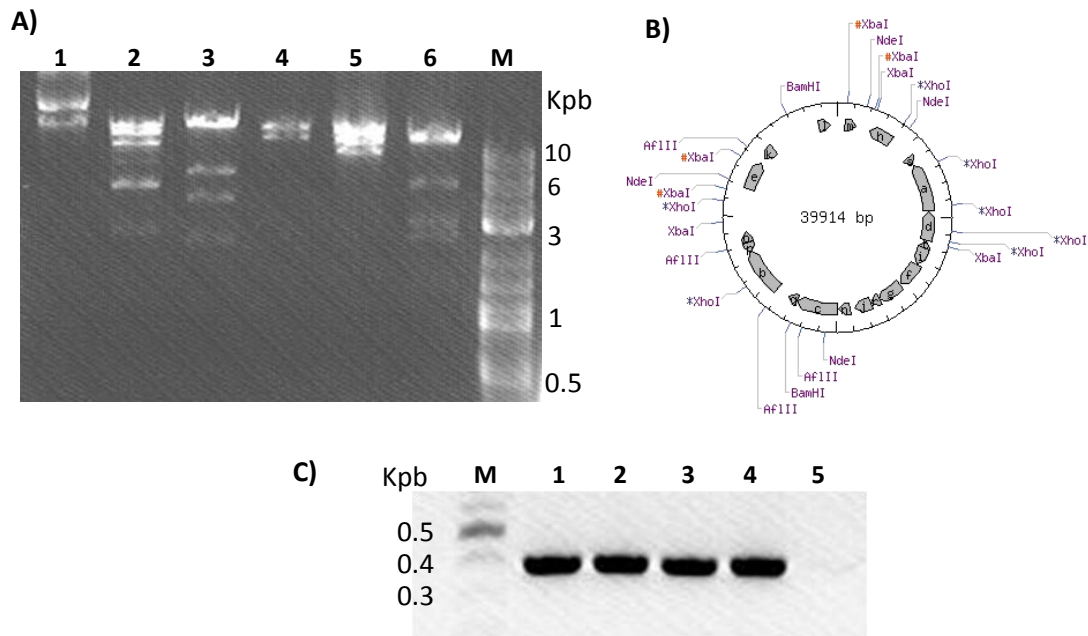


Figura 12 Caracterización de pTU5/3. A) Corte con enzimas de restricción. Carril 1 muestra el plásmido sin cortar, 2 plásmido cortado con *XbaI*. B) Esquema de cortes con enzimas de restricción empleadas para caracterizar en el plásmido pTU5/3. C) PCR de la región K3, amplicón esperado de 394 pb. Carril 1-4 clonas transformadas con pTU5/3, el carril 5 es el control negativo de la reacción.

Se realizó el alineamiento de la secuencia de los plásmidos a recombinar pShuttle-UV2- Δ 24 Ar y pTU5/3 (ver anexo) y se encontraron regiones de homología extra en pTU5/3 (Tabla 10). La primera región de homología extra (Homol1) comienza desde donde acaba el ITR (36,908 – 37,021) hasta antes del gen de resistencia a kanamicina en el mismo plásmido. Es decir, la región Homol1 comprende desde la posición 37,030 hasta 38,329 en pTU5/3 con un tamaño de 1,300 pb. La segunda región de homología comprende (Homol2) parte del siguiente ITR (28 - 108) e incluye toda la señal de encapsidación (188 - 336). Es decir, la región Homol2 va desde el nucleótido 28- 345 con un tamaño de 318 pb. Para liberar dichas regiones de homología se digirió el plásmido pTU5/3 con *PacI* el cual corta desde el nucleótido 37,017 hasta el 39,914. Sin embargo, este corte solo liberó la región Homol1, la cual es la más larga y la región Homol2 quedó incorporada en el resto del genoma.

En la figura 13 se ilustran las diferentes regiones involucradas o cercanas a los sitios de homología entre el plásmido pTU5/3 y pShuttle-UV2- Δ 24, se muestran en rojo los

Generación del vector adenoviral oncolítico Ad5/3-UV2-D24 para neoplasias asociadas a VPH

sitios de corte por la enzima *PacI* en pTU5/3 La región liberada por el corte con la enzima *PacI* fue de 2,897 pb y se purificó por columna el fragmento de 37,017 pb correspondiente a los genes del esqueleto adenoviral sin la región Homol1.

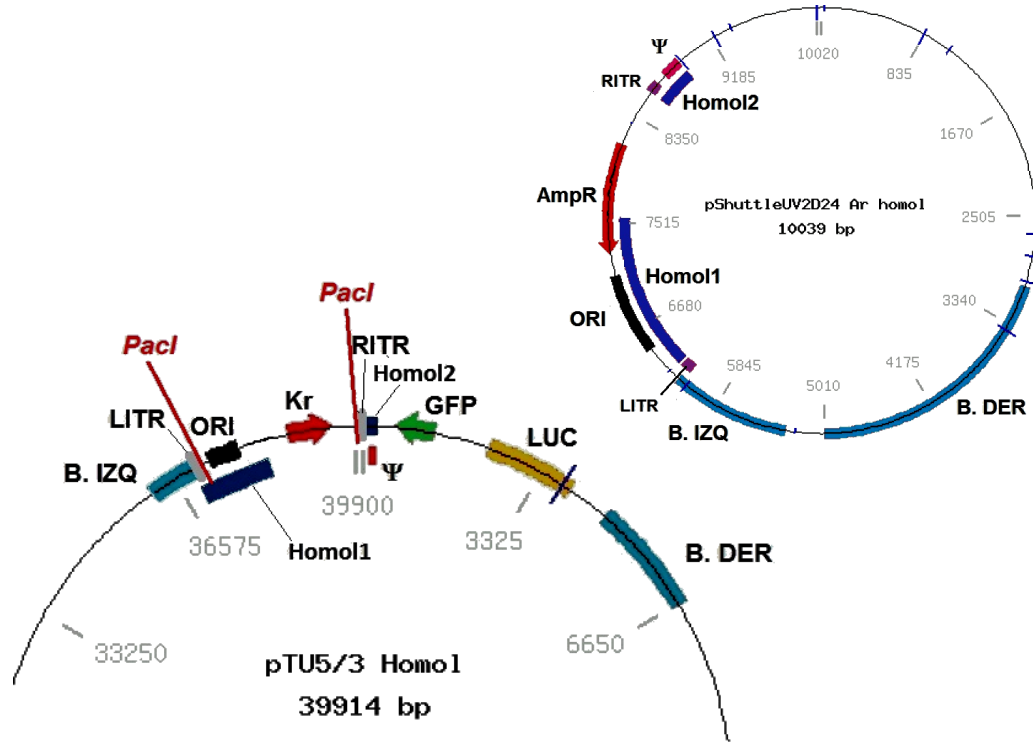


Figura 13 Comparación de regiones homólogas en pTU5/3 y pShuttle-UV2-Δ24.

Tabla 10 Regiones de homología en pTU5/3 y pShuttle-UV2-Δ24 Ar

Región	pTU5/3			pShuttle-UV2-Δ24 Ar		
	Inicio	Final	Tamaño (pb)	Inicio	Final	Tamaño (pb)
B. IZQ	36057	36958	902	5321	6222	902
LITR	37003	36908	95	6274	6172	103
Homol1	37030	38329	1300	6301	7600	1300
Ori	37867	37248	620	7138	6519	620
Kr	38667	39455	789	-	-	-
RITR	28	108	80	8562	8664	103
Homol2	28	345	318	8583	8901	318
Encap (Ψ)	188	336	149	8744	8892	149
B. DER	4605	6603	1999	3028	5026	1999
<i>PacI</i>	37017	39914	2897	-	-	-

Los plásmidos pShuttle-UV2-Δ24 Ar y pTU5/3 linealizados con las enzimas *Bstz17I* y *PacI* respectivamente, se co-transformaron en bacterias *E. coli* BJ5183. Las clonas obtenidas se caracterizaron por PCR para identificar las modificaciones realizadas en

Generación del vector adenoviral oncolítico Ad5/3-UV2-Δ24 para neoplasias asociadas a VPH

el genoma adenoviral: la delección de 24 pb en E1A, el promotor UV2 y el Knob 3 de la fibra quimera (Fig. 14).

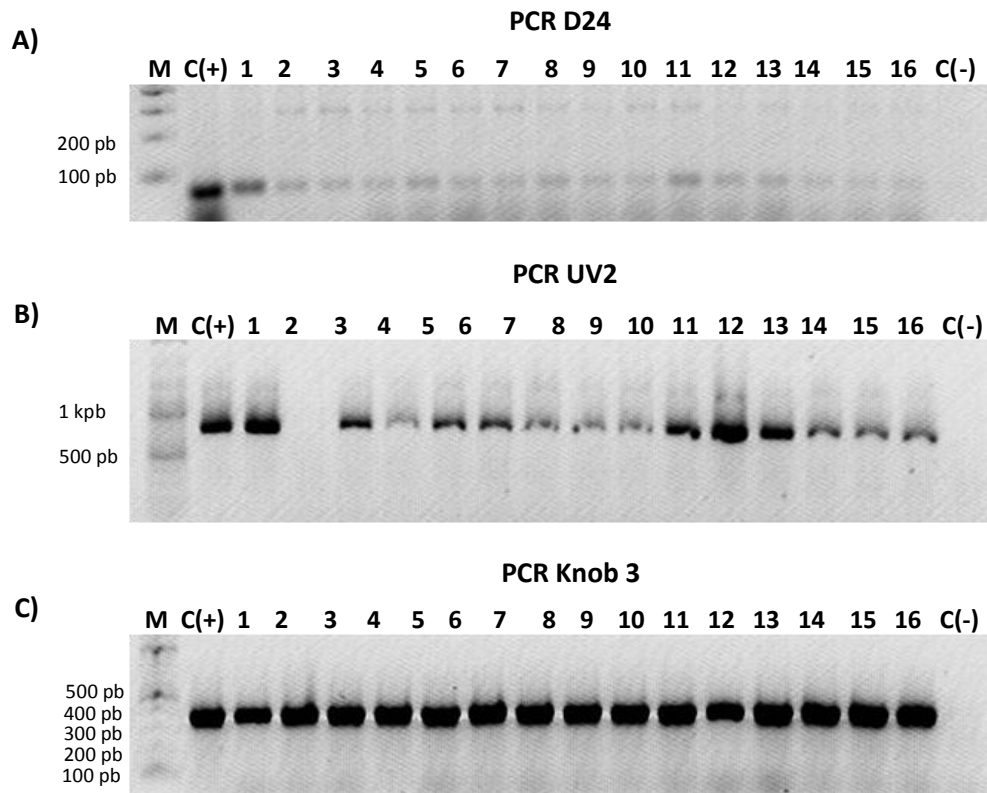


Figura 14 Caracterización del genoma recombinante pAd5/3-UV2-Δ24 por PCR de las tres modificaciones. A) Delección en E1A, amplicón esperado 82 pb. Control positivo pShuttle-UV2-Δ24 Ar; 1-16 clonas recombinantes; control negativo de la reacción. B) Promotor UV2, amplicón esperado 808 pb. Control positivo pShuttle-UV2-Δ24 Ar; 1-16 clonas recombinantes; control negativo de la reacción. C) Knob 3 de la fibra quimera, amplicón esperado 394 pb. Control positivo pTU5/3; 1-16 clonas recombinantes; control negativo de la reacción.

Se eligió una clona recombinante (clona 3) y se transformó en bacterias *E. coli* DH5α para producir el plásmido a mayor escala y nuevamente se tamizaron colonias y se eligió una de ellas. En la figura 15 se muestra la caracterización por corte con enzimas de restricción y PCR de la clona recombinante final elegida.

El plásmido pAd5/3-UV2-Δ24 se linearizó con *PacI* para liberar los ITRs del genoma adenoviral. Éste se transfectó en células HEK 293 para generar las partículas virales. En la figura 16 se muestran micrografías del efecto citopático observado al día 4 de la transfección con el DNA recombinante, lo cual indica que se generó el VARS.

Generación del vector adenoviral oncolítico Ad5/3-UV2-D24 para neoplasias asociadas a VPH

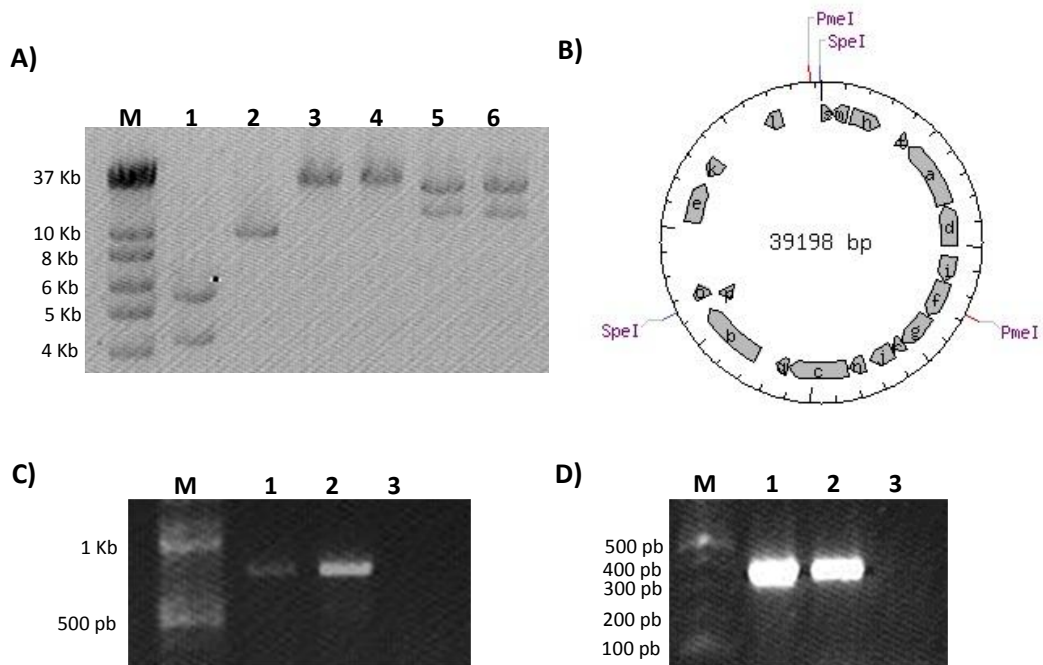


Figura 15 Caracterización de la clona final elegida de pAd5/3-UV2-Δ24. A) Corte con enzimas *SpeI* y *PmeI*. 1. pShuttle-UV2-Δ24 digerido con *PmeI*; 2. pShuttle-UV2-Δ24 digerido con *SpeI*; 3: pTU5/3 digerido con *PmeI*; 4. pTU5/3 digerido con *SpeI*; 5. pAd5/3-UV2-Δ24 digerido con *PmeI*; 6. pAd5/3-UV2-Δ24 digerido con *SpeI*. B) Esquema de los sitios de corte en el plásmido recombinante. C) PCR del promotor UV2. 1. Control positivo pShuttle-UV2-Δ24; 2. pAd5/3-UV2-Δ24; 3. Control negativo. D) PCR del Knob 3. 1. Control positivo pTU5/3; 2. pAd5/3-UV2-Δ24; 3. Control negativo.

Generación del vector adenoviral oncolítico Ad5/3-UV2-D24 para neoplasias asociadas a VPH

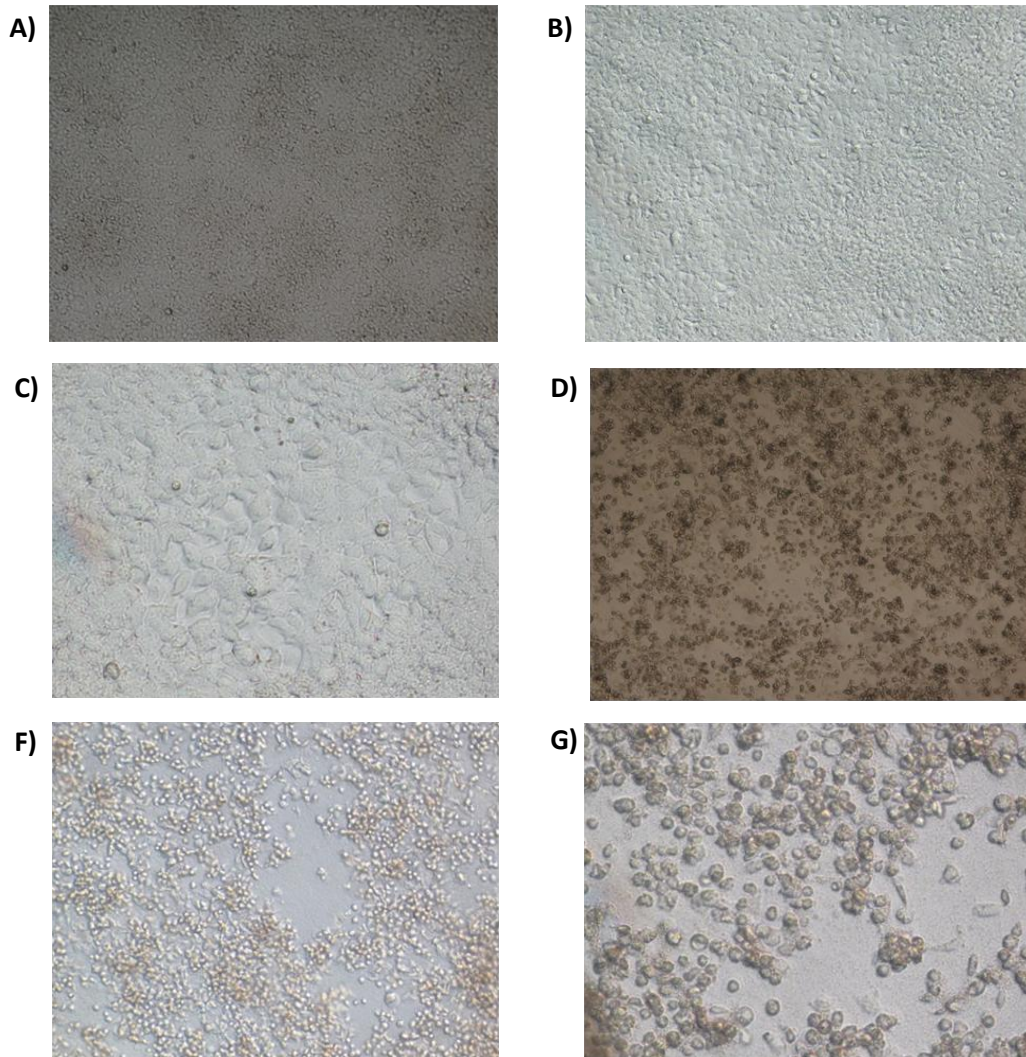


Figura 16 Generación del VARS Ad5/3-UV2- Δ 24. Efecto citopático en células HEK 293 por la generación de las partículas virales Ad5/3-UV2- Δ 24. A-C) Micrografías de células sanas que solo recibieron como tratamiento DMEM 1% SFB. 5X, 10X y 20X respectivamente. D-G) Micrografías de células transfectadas con el pAd5/3-UV2- Δ 24-Lipofectamina™ 2000 y DMEM al 1% SFB. 5X, 10X y 20X respectivamente.

CAPÍTULO

VI. DISCUSIÓN

La unión de un vector oncolítico a la célula huésped representa un factor determinante en la eficiencia de transducción y por lo tanto en la efectividad de lisis. Debido a la variable expresión del receptor CAR en las células tumorales, puede verse comprometida la utilización de adenovirus serotipo 5 como vector oncolítico. No obstante, puede modificarse el tropismo de Ad5 para potenciar la infectividad hacia las células transformadas. Una estrategia es creando fibras quiméricas que posean dominios knob (cabeza) de otros serotipos adenovirales [42]. En varios estudios se ha reportado que el uso de fibras quiméricas aumenta considerablemente los niveles de transducción en múltiples líneas celulares [35, 40, 54-55].

En este trabajo se construyó un VARS portador de tres modificaciones en su genoma para incrementar el tropismo y selectividad hacia células infectadas por VPH de alto riesgo. La construcción se llevó a cabo recombinando dos plásmidos: pShuttle-UV2- Δ 24 y pTU5/3. El primero es el plásmido acarreador y porta el promotor UV2 y el gen E1A Δ 24, además de contener secuencias necesarias para el empaquetamiento del adenovirus y dos secuencias de homología que le permiten recombinar con el plásmido pTU5/3, el cual incluye los genes del esqueleto adenoviral, la modificación en el gen que codifica la proteína fibra de la cápside (F5/K3) y regiones de homología que le permiten recombinar con el plásmido acarreador. Para recombinar ambos vectores plasmídicos en el sistema de recombinación en bacterias *E. coli* BJ5183, fue necesario realizarles ciertos cambios debido a que se observaron características en ambos que como tales no podrían haber sido recombinados en el sistema en bacterias:

- A. En pShuttle-UV2 Δ 24: se realizó un cambio de resistencia a antibiótico de kanamicina a ampicilina.
- B. En pTU5/3: se realizó la liberación de una región de homología extra.

El cambio en la resistencia a antibiótico se llevó a cabo para facilitar la selección de clones recombinantes positivos debido a que en el proceso se da un intercambio de

secuencias, el plásmido acarreador aporta el gen de resistencia antibiótico con el cual se queda el plásmido recombinante al final y éste puede ser seleccionado creciendo las bacterias en un medio con dicho antibiótico.

Por otro lado, al analizar la secuencia de pTU5/3 se observó que éste poseía regiones extra de homología, las cuales resultaban en múltiples recombinaciones en una misma clona bacteriana. Éstas regiones se deben a que el plásmido pTU5/3 fue construido mediante recombinación con un plásmido pShuttle [56]. Cabe destacar que éste plásmido se ha empleado en una serie de construcciones de VARS [55-56]. Sin embargo todas ellas se han realizado recombinando en líneas celulares (HEK293, 911 ó A549), y hasta hoy, no se ha reportado su recombinación con otro vector pShuttle en bacterias, lo cual hace que éste trabajo sea el primero en reportar dicho procedimiento. Algunas de las ventajas de contar con el sistema de recombinación en bacterias son que el procedimiento es rápido, el costo de materiales y reactivos es menor, el sistema es de fácil manipulación y se obtiene un alto nivel de eficiencia

Una vez realizados los cambios en ambos plásmidos, se co-transformaron en bacterias *E. coli* BJ5183 y se incrementó considerablemente la eficiencia de recombinación, al observar que todas las clonas tamizadas fueron positivas.

El plásmido recombinante se transfectó en células HEK 293, dentro de las cuales se empaquetan y generan las partículas virales. Se emplearon tres dosis de DNA. Se observó que la relación DNA: Lipofectamina™ 2000 1:1 resultó ser la más eficiente al mostrar más rápidamente efecto citopático. Se observó interesantemente un efecto citopático a en las células HEK 293 a partir del día 2 post-transfección y dicho efecto citopático alcanzó el 80% de las células al día 4 de la transfección. En previos trabajos en el laboratorio en construcciones de adenovirus recombinantes se ha observado un efecto citopático con un mínimo de 7 días y un efecto lítico en el 80% de las células en hasta dos semanas. Lo cual indica una tasa de replicación más acelerada. Es posible que este efecto se deba a la presencia de la proteína fibra modificada. Sin embargo, no es posible concluir un efecto citolítico incrementado hasta observar los niveles de transducción del vector generado en varias líneas celulares. Debido a que la línea celular HEK 293 posee genes de adenovirus que pueden potenciar la replicación del vector.

CAPÍTULO

VII. CONCLUSIONES

Se diseñó y construyó el vector adenoviral oncolítico Ad5/3-UV2- Δ 24 dirigido específicamente contra células transformadas por VPH-ar usando tres modificaciones en su genoma para incrementar el tropismo hacia las células tumorales asociadas a la infección por VPH.

Además, se logró implementar una estrategia para recombinar eficientemente el plásmido pTU5/3 con un plásmido acarreador en bacterias *E. coli* BJ5183.

BIBLIOGRAFÍA

1. Globocan and I.A.f.R.o. Cancer. *Fast Stats World*. 2011 2008; Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>.
2. WHO. *Cervical Cancer*. 2010; Available from: <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/cancers/en/>.
3. McLaughlin-Drubin, M.E. and K. Munger, *Oncogenic activities of human papillomaviruses*. *Virus Res*, 2009. **143**(2): p. 195-208.
4. Burd, E.M., *Human papillomavirus and cervical cancer*. *Clin Microbiol Rev*, 2003. **16**(1): p. 1-17.
5. Muñoz, N., et al., *Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(6): p. 518-27.
6. de Villiers, E.M., et al., *Classification of papillomaviruses*. *Virology*, 2004. **324**(1): p. 17-27.
7. Clifford, G.M., et al., *Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis*. *Br J Cancer*, 2003. **88**(1): p. 63-73.
8. Hariharan, I. and M.R. Pillai, *Genotypes of the human papillomavirus: relevance to Indian field trials of the vaccine*. *Indian J Med Res*, 2009. **130**(3): p. 247-60.
9. Burk, R.D., Z. Chen, and K. Van Doorslaer, *Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity*. *Public Health Genomics*, 2009. **12**(5-6): p. 281-90.
10. Zheng, Z.M. and C.C. Baker, *Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation*. *Front Biosci*, 2006. **11**: p. 2286-302.
11. Yugawa, T. and T. Kiyono, *Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins*. *Rev Med Virol*, 2009. **19**(2): p. 97-113.
12. Grm, H.S., M. Bergant, and L. Banks, *Human papillomavirus infection, cancer & therapy*. *Indian J Med Res*, 2009. **130**(3): p. 277-85.
13. Horvath, C.A., et al., *Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview*. *Virol J*, 2010. **7**: p. 11.
14. Letian, T. and Z. Tianyu, *Cellular receptor binding and entry of human papillomavirus*. *Virol J*, 2010. **7**: p. 2.
15. Globocan. *Fast Stats Mexico*. 2011 2008; Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=484>.
16. Schiffman, M., et al., *Human papillomavirus and cervical cancer*. *Lancet*, 2007. **370**(9590): p. 890-907.
17. Chakrabarti, O. and S. Krishna, *Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression*. *J Biosci*, 2003. **28**(3): p. 337-48.
18. ACS. *Cervical cancer*. 2009 14/09/10; Available from: <http://www.cancer.org/Cancer/CervicalCancer/DetailedGuide/index>.
19. NCI. *Cervical Cancer Treatment*. 2010; Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/cervical/HealthProfessional>.

Generación del vector adenoviral oncolítico Ad5/3-UV2-D24 para neoplasias asociadas a VPH

20. Schiffman, M. and P.E. Castle, *Human papillomavirus: epidemiology and public health*. Arch Pathol Lab Med, 2003. **127**(8): p. 930-4.
21. Chuang, C.M., et al., *Treatment with imiquimod enhances antitumor immunity induced by therapeutic HPV DNA vaccination*. J Biomed Sci, 2010. **17**: p. 32.
22. Huang, C.F., et al., *DNA vaccines for cervical cancer*. Am J Transl Res, 2010. **2**(1): p. 75-87.
23. Cervantes-García, D., *Evaluación in vitro de VARS URR16aa/delta24 para tumores VPH positivos*, in *Terapia Génica*. 2006, Universidad autónoma de Nuevo León: Monterrey. p. 59.
24. Guse, K., *Genetically engineered oncolytic adenoviruses for the treatment of kidney and breast cancer*, in *Cancer Gene Therapy Group*. 2009, University of Helsinki: Helsinki, Finland. p. 74.
25. Russell, W.C., *Update on adenovirus and its vectors*. Journal of General Virology, 2000. **81**: p. 2573-2604.
26. Young, A. and I.A. McNeish, *Oncolytic adenoviral gene therapy in ovarian cancer: why we are not wasting our time*. Future Oncol, 2009. **5**(3): p. 339-57.
27. Russell, I.A., J.A. Royds, and A.W. Braithwaite, *Exploitation of cell cycle and cell death controls by adenoviruses: the road to a productive infection*. Prog Mol Subcell Biol, 2004. **36**: p. 207-43.
28. Campos, S.K. and M.A. Barry, *Current advances and future challenges in Adenoviral vector biology and targeting*. Curr Gene Ther, 2007. **7**(3): p. 189-204.
29. Sharma, A., et al., *Adenoviral vector-based strategies for cancer therapy*. Curr Drug Ther, 2009. **4**(2): p. 117-138.
30. Rein, D.T., M. Breidenbach, and D.T. Curiel, *Current developments in adenovirus-based cancer gene therapy*. Future Oncol, 2006. **2**(1): p. 137-43.
31. Kanerva, A. and A. Hemminki, *Modified adenoviruses for cancer gene therapy*. Int J Cancer, 2004. **110**(4): p. 475-80.
32. Everts, B. and H.G. van der Poel, *Replication-selective oncolytic viruses in the treatment of cancer*. Cancer Gene Ther, 2005. **12**(2): p. 141-61.
33. Fueyo, J., et al., *A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo*. Oncogene, 2000. **19**(1): p. 2-12.
34. Glasgow, J.N., M. Everts, and D.T. Curiel, *Transductional targeting of adenovirus vectors for gene therapy*. Cancer Gene Ther, 2006. **13**(9): p. 830-44.
35. Kanerva, A., et al., *Systemic therapy for cervical cancer with potentially regulatable oncolytic adenoviruses*. PLoS One, 2008. **3**(8): p. e2917.
36. Koski, A., et al., *Treatment of cancer patients with a serotype 5/3 chimeric oncolytic adenovirus expressing GMCSF*. Mol Ther, 2010. **18**(10): p. 1874-84.
37. Pesonen, S., et al., *Prolonged systemic circulation of chimeric oncolytic adenovirus Ad5/3-Cox2L-D24 in patients with metastatic and refractory solid tumors*. Gene Ther, 2010. **17**(7): p. 892-904.
38. Raki, M., et al., *Oncolytic adenovirus Ad5/3-delta24 and chemotherapy for treatment of orthotopic ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2008. **108**(1): p. 166-72.
39. Tyler, M.A., et al., *Enhanced transduction of malignant glioma with a double targeted Ad5/3-RGD fiber-modified adenovirus*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(9): p. 2408-16.
40. Volk, A.L., et al., *Enhanced adenovirus infection of melanoma cells by fiber-modification: incorporation of RGD peptide or Ad5/3 chimerism*. Cancer Biol Ther, 2003. **2**(5): p. 511-5.

41. Bauerschmitz, G.J., et al., *Triple-targeted oncolytic adenoviruses featuring the cox2 promoter, E1A transcomplementation, and serotype chimerism for enhanced selectivity for ovarian cancer cells*. Mol Ther, 2006. **14**(2): p. 164-74.
42. Kanerva, A., et al., *Targeting adenovirus to the serotype 3 receptor increases gene transfer efficiency to ovarian cancer cells*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(1): p. 275-80.
43. Kawakami, Y., et al., *Substitution of the adenovirus serotype 5 knob with a serotype 3 knob enhances multiple steps in virus replication*. Cancer Res, 2003. **63**(6): p. 1262-9.
44. Tsuruta, Y., et al., *A mosaic fiber adenovirus serotype 5 vector containing reovirus sigma 1 and adenovirus serotype 3 knob fibers increases transduction in an ovarian cancer ex vivo system via a coxsackie and adenovirus receptor-independent pathway*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(9): p. 2777-83.
45. Zhu, Z.B., et al., *Targeting of a conditionally replicative adenovirus agent to human squamous cell carcinomas of the head and neck*. Int J Oncol, 2007. **31**(5): p. 1213-22.
46. Wang, H., et al., *Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14*. Nat Med, 2011. **17**(1): p. 96-104.
47. Raki, M., et al., *Switching the fiber knob of oncolytic adenoviruses to avoid neutralizing antibodies in human cancer patients*. J Gene Med, 2011. **13**(5): p. 253-61.
48. Sarkioja, M., et al., *Changing the adenovirus fiber for retaining gene delivery efficacy in the presence of neutralizing antibodies*. Gene Ther, 2008. **15**(12): p. 921-9.
49. Delgado-Enciso, I., et al., *A potent replicative delta-24 adenoviral vector driven by the promoter of human papillomavirus 16 that is highly selective for associated neoplasms*. J Gene Med, 2007. **9**(10): p. 852-61.
50. Morris, P.J., et al., *The opposite and antagonistic effects of the closely related POU family transcription factors Brn-3a and Brn-3b on the activity of a target promoter are dependent on differences in the POU domain*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(10): p. 6907-14.
51. Ndisang, D., V. Budhram-Mahadeo, and D.S. Latchman, *The Brn-3a transcription factor plays a critical role in regulating human papilloma virus gene expression and determining the growth characteristics of cervical cancer cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(40): p. 28521-7.
52. Ndisang, D., et al., *The Brn-3a transcription factor plays a key role in regulating the growth of cervical cancer cells in vivo*. Oncogene, 2001. **20**(35): p. 4899-903.
53. Ndisang, D., et al., *Differential regulation of different human papilloma virus variants by the POU family transcription factor Brn-3a*. Oncogene, 2006. **25**(1): p. 51-60.
54. Kanerva, A., *Adenoviral gene therapy for ovarian cancer*, in *Cancer Gene Therapy Group*. 2004, University of Helsinki.
55. Kanerva, A., et al., *Enhanced therapeutic efficacy for ovarian cancer with a serotype 3 receptor-targeted oncolytic adenovirus*. Mol Ther, 2003. **8**(3): p. 449-58.
56. Uil, T.G., et al., *Generation of an adenoviral vector containing an addition of a heterologous ligand to the serotype 3 fiber knob*. Cancer Gene Ther, 2003. **10**(2): p. 121-4.

ANEXOS

Alineamiento pTU5/3 (39 914 pb) – pShuttle-UV2-Δ24 (10 039 pb)

Secuencia HOMOL1

Score = 2401 bits (1300), Expect = 0.0
Identities = 1300/1300 (100%), Gaps = 0/1300 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 37030 CGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCT 37089
          |||
Sbjct 6301 CGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCT 6360

Query 37090 TCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCAC 37149
          |||
Sbjct 6361 TCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCAC 6420

Query 37150 TCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGA 37209
          |||
Sbjct 6421 TCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGA 6480

Query 37210 GCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCAT 37269
          |||
Sbjct 6481 GCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCAT 6540

Query 37270 AGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAC 37329
          |||
Sbjct 6541 AGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAC 6600

Query 37330 CCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCT 37389
          |||
Sbjct 6601 CCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCT 6660

Query 37390 GTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCG 37449
          |||
Sbjct 6661 GTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCG 6720

Query 37450 CTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTTCGCTCCAAGCTG 37509
          |||
Sbjct 6721 CTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTTCGCTCCAAGCTG 6780

Query 37510 GGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGT 37569
          |||
Sbjct 6781 GGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGT 6840

Query 37570 CTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGG 37629
          |||
Sbjct 6841 CTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGG 6900

Query 37630 ATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTAC 37689
          |||
Sbjct 6901 ATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTAC 6960

Query 37690 GGCTACACTAGAAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA 37749
          |||
Sbjct 6961 GGCTACACTAGAAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGA 7020

Query 37750 AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGttttttt 37809
          |||
Sbjct 7021 AAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTT 7080
```

Generación del vector adenoviral oncolítico Ad5/3-UV2-D24 para neoplasias asociadas a VPH

pTU53	37810	GTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGaaaaaaGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTT	37869
pShut	7081	GTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTT	7140
pTU53	37870	TCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGA	37929
pShut	7141	TCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGA	7200
pTU53	37930	TTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATC	37989
pShut	7201	TTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAAATCAATC	7260
pTU53	37990	TAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCT	38049
pShut	7261	TAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCT	7320
pTU53	38050	ATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATA	38109
pShut	7321	ATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATA	7380
pTU53	38110	ACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCA	38169
pShut	7381	ACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCA	7440
pTU53	38170	CGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGA	38229
pShut	7441	CGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGA	7500
pTU53	38230	AGTGGTCCTGCAACTTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGA	38289
pShut	7501	AGTGGTCCTGCAACTTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGA	7560
pTU53	38290	GTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTG	38329
pShut	7561	GTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTG	7600

Secuencia HOMOL2

Score = 582 bits (315), Expect = 3e-171
 Identities = 318/319 (99%), Gaps = 1/319 (0%)
 Strand=Plus/Plus

pTU53	28	TTTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGGGGGTGGAGTTTGTGACGTGGCGC-GGGCGT	86
pShut	8583	TTTTGGATTGAAGCCAATATGATAATGAGGGGGTGGAGTTTGTGACGTGGCGCGGGGCGT	8642
pTU53	87	GGGAACGGGGCGGGTGACGTAGTAGTGTGGCGGAAGTGTGATGTTGCAAGTGTGGCGGAA	146
pShut	8643	GGGAACGGGGCGGGTGACGTAGTAGTGTGGCGGAAGTGTGATGTTGCAAGTGTGGCGGAA	8702
pTU53	147	CACATGTAAGCGACGGATGTGGCAAAAGTACGTTTTTGGTGTGCGCCGGTGTACACAGG	206
pShut	8703	CACATGTAAGCGACGGATGTGGCAAAAGTACGTTTTTGGTGTGCGCCGGTGTACACAGG	8762
pTU53	207	AAGTGACAATTTTCGCGCGGTTTTAGCGGATGTTGTAGTAAATTTGGGCGTAACCGAGT	266
pShut	8763	AAGTGACAATTTTCGCGCGGTTTTAGCGGATGTTGTAGTAAATTTGGGCGTAACCGAGT	8822
pTU53	267	AAGATTTGGCCATTTTCGCGGGAAAACCTGAATAAGAGGAAGTGAATCTGAATAATTTTG	326
pShut	8823	AAGATTTGGCCATTTTCGCGGGAAAACCTGAATAAGAGGAAGTGAATCTGAATAATTTTG	8882
pTU53	327	TGTTACTCATAGCGCGTAA	345
pShut	8883	TGTTACTCATAGCGCGTAA	8901