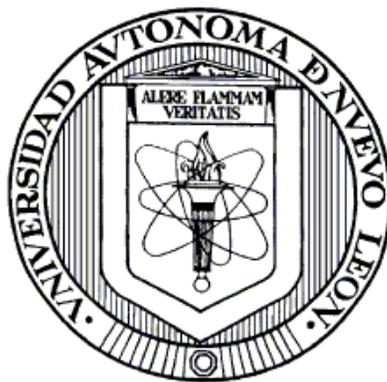


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



INCREMENTO DEL EFECTO CITOTÓXICO DE UN FÁRMACO
ANTINEOPLÁSICO MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE LA
GLICOPROTEÍNA FUSOGÉNICA DEL VIRUS SV 5

Por

MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en
Farmacia

Junio, 2010

INCREMENTO DEL EFECTO CITOTÓXICO DE UN FÁRMACO
ANTINEOPLÁSICO MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE LA
GLICOPROTEÍNA FUSOGÉNICA DEL VIRUS SV 5

Aprobación de la tesis:

Asesor de la tesis
Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño

Dra. Sandra Leticia Gracia Vásquez

Dra. Yolanda Araceli Gracia Vásquez

Dra. Martha Alicia Suárez Herrera

Dra. Lucía Gadalupe Cantú Cárdenas

Dr. Rogelio Monreal Puente

Dra. María Teresa Garza González
Sub-Directora de Investigación

RESUMEN

María Elena Cantú Cárdenas

Fecha de Graduación: Junio, 2010

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: Incremento del efecto citotóxico de un fármaco antineoplásico mediante la expresión de la glicoproteína fusogénica del paramyxovirus SV5.

Número de páginas: 113

Candidato para obtener el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Farmacia.

Área de Estudio: Farmacia

Propósito y Método del Estudio: Se investigó la capacidad de la glicoproteína fusogénica del paramyxovirus SV5 de potenciar el efecto citotóxico de la vincristina a dos dosis por debajo de la dosis letal media para células HeLa resistentes. Se determinó el efecto de la expresión de la glicoproteína fusogénica sobre la citotoxicidad de la vincristina mediante reducción de una sal de tetrazolio por acción de deshidrogenasas presentes en células metabólicamente activas. Se evaluó el daño en el núcleo celular por la combinación de la proteína F con la vincristina mediante microscopía de fluorescencia. Se realizó una cuantificación relativa por q-PCR de los niveles de expresión del gen de la caspasa 3 en células que fueron transfectadas con el vector codificante para la proteína F y tratadas con vincristina, en etapas tempranas del proceso de fusión de membranas.

Contribuciones y Conclusiones: Se demostró que la expresión de la proteína fusogénica del paramyxovirus SV5 en las etapas tempranas del proceso de fusión de membranas incrementa la citotoxicidad de la vincristina en un modelo celular resistente, siendo este efecto dependiente de la concentración de la vincristina hasta las 48 h, después de este tiempo el incremento en la citotoxicidad es independiente de la concentración.

La expresión de la glicoproteína fusogénica del paramyxovirus SV5 induce la expresión del gen de la caspasa 3 en etapas tempranas del proceso de fusión de membranas, además de incrementar los niveles de expresión de la caspasa 3 en células HeLa tratadas con vincristina.

Las células HeLa tratadas con vincristina 24 h después de la transfección con el gen codificante para la proteína F presentan cambios morfológicos en núcleos propios de los efectos de la vincristina como los asociados a la expresión de la glicoproteína fusogénica de SV5.

FIRMA DEL ASESOR: _____

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Ciencias Químicas y la Universidad Autónoma de Nuevo León, por la ayuda financiera y facilidades brindadas para la realización de este proyecto. Al Dr. Sergio S. Fernández Delgadillo, QFB. Emilia E. Vásquez Farías, QFB. Gloria Nelly Páez Garza, Dra. Yolanda A. Gracia Vásquez y Dra. María Aurora Hernández Benítez por su apoyo constante.

De una forma especial agradezco al Dr. J. Alberto Gómez Treviño, mi asesor, quien siempre estuvo pendiente de mis avances y compartió conmigo sus conocimientos y experiencia en el área de la Biología Molecular; además de brindarme su tiempo y consejos, así como apoyo, aliento y confianza en los momentos mas difíciles para mí durante estos años.

A la Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas de la Fac. de Ciencias Biológicas y a la Dra. Lourdes Garza Ocañas de la Fac. de Medicina de la UANL por permitirme usar los equipos empleados en los ensayos de citotoxicidad.

A las Dras. Elva Irene Cortés y Martha Dávila del Centro de Investigaciones Biomédicas del IMSS por las facilidades proporcionadas para el uso del microscopio de fluorescencia.

A mis revisores de tesis: Dra. Lucía G. Cantú Cárdenas, Dra. Sandra L. Gracia Vásquez, Dra. Yolanda A. Gracia Vásquez y Dr. Rogelio Monreal Puente por sus valiosas observaciones y aportaciones que enriquecieron esta tesis.

A la Dra. Martha Alicia Suárez Herrera, quien además de formar parte de mi Comité Tutorial y de Revisión de Tesis, me ha brindado su amistad, consejos y experiencia y por quien siento un profundo respeto y una gran admiración.

A la Dra. Ma. Elena Rodríguez Cantú, mi gran amiga, quien siempre me ha demostrado su cariño y aprecio, a través de sus consejos, palabras de aliento y de su tiempo para escucharme cuando me encontraba desesperada porque las cosas no salían como esperaba, muchas gracias.

A mis compañeros de laboratorio QFB. Eduardo I. de la Rosa Moreno y LQ Claudia G. Murga Sánchez, de quienes aprendí muchas cosas, por compartir su tiempo conmigo en el laboratorio, por escucharme y darme sus consejos y apoyo, a Margarita, Cindy, Rocío y Alejandra estudiantes de la carrera de QFB que realizaron una estancia en el laboratorio en los veranos de investigación científica y tecnológica, gracias a todos.

A mi familia: a mis padres, José Santos Cantú C. y María Elena Cárdenas V., por los que siento un gran orgullo y respeto, quienes me han demostrado con su ejemplo, que podemos alcanzar los objetivos trazados a través de la lucha constante y el esfuerzo, con paciencia y dedicación, y quienes en todo momento me han brindado su gran amor y apoyo incondicional. A mi esposo J. Sergio Mendoza y a mis hijos, Sergio, Carolina y Andrea por su amor y comprensión.

Les agradezco infinitamente por estar conmigo y por su cariño a mis hermanos, Juan José, Emilio, Félix, Gilberto y José Santos, y muy especialmente a mis hermanas Lucy, Tere y Olivia, a mis sobrinos, a quienes quiero mucho pero que no referiré sus nombres ya que la lista es muy larga.

A mis cuñadas y cuñados y de manera muy especial a Carolina quien me ha brindado su apoyo, sobre todo en estos últimos años.

Además quiero expresar un profundo agradecimiento a todas las personas que no cité anteriormente, pero que contribuyeron de alguna manera u otra para la realización de este trabajo de investigación.

DEDICATORIA

A mis padres, quienes hicieron de mi lo que soy.

A mis hijos, que son la razón de mi vida.

A mi esposo quien me ha brindado su amor y apoyo por tantos años.

A mis alumnos, por quienes decidí dar el siguiente paso en mi formación profesional.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	i
AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA.....	v
TABLA DE CONTENIDO	vi
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
NOMENCLATURA	xii
Capítulo 1 Introducción	1
1.1 Origen del problema.....	1
1.1.1 Definición del cáncer y epidemiología	1
1.1.2 Terapéutica para el cáncer	3
1.1.3 Vincristina en la quimioterapia	4
1.1.4 Resistencia en quimioterapia	6
1.1.5 Terapia génica	9
1.1.6 Estructura, función y mecanismo de acción de las proteínas virales de fusión	14
1.2 Antecedentes	20
1.2.1 Glicoproteína fusogénica en terapia génica	20
1.3 Hipótesis	24
1.4 Objetivo general	24
1.5 Objetivos particulares.....	24
Capítulo 2 Materiales y métodos.....	26
2.1 Construcción del vector de expresión	26
2.1.1 Amplificación del cDNA de la proteína fusogénica (F)	26
2.1.2 Clonación molecular del inserto en el plásmido pCI	27
2.1.3 Comprobación de la clonación	30
2.2 Línea celular.....	32
2.3 Estandarización de la transfección con vectores plasmídicos.....	33
2.3.1 Preparación del plásmido	34
2.3.2 Preparación de la mezcla de transfección	34
2.3.3 Preparación de las células	35

2.3.4 Ensayo de transfección	35
2.3.5 Tinción histoquímica	36
2.4 Determinación de la DL ₅₀ de vincristina	37
2.4.1 Preparación de la solución de vincristina	37
2.4.2 Ensayo para la determinación de DL₅₀	38
2.5 Desarrollo de una línea celular resistente a vincristina	41
2.6 Evaluación del efecto de la expresión de la proteína fusogénica de SV5 en la citotoxicidad de la vincristina.....	43
2.7 Evaluación del daño en el núcleo celular por la combinación de la proteína F con vincristina	46
2.7.1 Protocolo para Inmunoensayo (Actina/Yoduro de Propidio)	48
2.8 Evaluación del efecto de la expresión de la proteína F de SV5 y vincristina sobre la expresión de genes relacionados con muerte celular programada	50
2.9 Análisis Estadístico	54
Capítulo 3 Resultados Y DISCUSIÓN.....	55
3.1 Construcción del vector de expresión	55
3.1.1 Amplificación del cDNA de la proteína fusogénica (F)	55
3.1.2 Clonación molecular del inserto en el plásmido pCI	57
3.1.3 Comprobación de la clonación	59
3.2 Estandarización de la transfección con vectores plasmídicos.....	61
3.3 Determinación de DL ₅₀ de vincristina	65
3.4 Desarrollo de una línea celular resistente a vincristina	67
3.5 Evaluación del efecto de la expresión de la proteína fusogénica F de SV5 sobre la citotoxicidad de la vincristina.....	69
3.6 Evaluación del daño en el núcleo celular por la	73
combinación de la proteína F con vincristina	73
3.7 Evaluación del efecto de la expresión de la proteína F de SV5 y vincristina sobre la expresión de genes relacionados con muerte celular programada	79
Capítulo 4 Conclusiones	84
Bibliografía	86
APÉNDICE A	92
Lista de Material y Equipo	92
APÉNDICE B	95
Reactivos	95
APÉNDICE C	99

resumen autobiográfico..... 112

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.1	Proteínas de fusión de diferentes familias de virus con envoltura.	18
2.1	Componentes de la PCR.	31
2.2	Condiciones de amplificación de la secuencia del cDNA codificante para la glicoproteína fusogénica F.	31
2.3	Diferentes proporciones de los componentes para preparar la mezcla de transfección.	35
2.4	Composición de la solución de tinción histoquímica.	37
2.5	Preparación de medio con vincristina para la determinación de la DL ₅₀ .	39
2.6	Preparación del medio de cultivo con fármaco y distribución en la placa de 16 pozos.	48
2.7	Componentes de la mezcla de reacción para retrotranscripción acoplada a qPCR y secuencias de primers.	53
2.8	Condiciones para la retrotranscripción acoplada a qPCR.	53
3.1	Porcentaje de transfección obtenido con las diferentes proporciones de FuGENE:DNA empleadas en la estandarización.	63
3.2	Resultados del tratamiento de células HeLa con VC a diferentes concentraciones, para determinar la DL ₅₀ .	66

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.1	Estructura de la vincristina.	5
1.2	Vía común de fusión de membranas.	16
1.3	Características clave de una proteína de fusión de Clase I.	19
1.4	Efecto de AdF a nivel ultraestructura en células A-431.	22
2.1	Mapa del plásmido pCI.	27
2.2	Esquema de la construcción del vector y su clonación.	29
2.3	Reacción de reducción de sal de tetrazolio a formazán.	40
2.4	Esquema de una placa de 96 pozos donde se muestra la forma en que se dispusieron las muestras para la medición en el lector.	41
2.5	Placas Nalge nunc de 16 pozos para cultivo celular. Foto ilustrativa, no corresponde al ensayo realizado.	42
2.6	Esquema en el que se muestra el fundamento de la determinación de la lactato deshidrogenasa para evaluar la citotoxicidad.	45
3.1	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 0.5X del plásmido recombinante.	56
3.2	Colonias de <i>E. coli</i> HB 101 transformadas con pCI-F creciendo en agar LB/amp 50 µg/ml.	58
3.3	Fotografía en la que se muestra el patrón de bandas obtenido de los DNAs extraídos de las clonas 1 a la 24.	59

3.4	Confirmación del cDNA codificante para F en los plásmidos extraídos mediante electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de cada una de las clonas.	60
3.5	Fotomicrografías de la transfección de células HeLa con el plásmido de referencia después de tinción con X-Gal.	64
3.6	Gráfica mediante la cual se determinó la DL ₅₀ de la vincristina en células HeLa.	66
3.7	Imágenes de microscopía de los cambios morfológicos de células HeLa resistentes a vincristina.	68
3.8	Gráfica que muestran el efecto de la expresión de la glicoproteína fusogénica F a 24, 48 y 72 horas post-transfección en la citotoxicidad de la vincristina a 2 nM sobre células HeLa.	70
3.9	Gráfica que muestran el efecto de la expresión de la glicoproteína fusogénica F a 24, 48 y 72 horas post-transfección en la citotoxicidad de la vincristina a 5 nM sobre células HeLa.	71
3.10	Micrografías de fluorescencia de células HeLa tratadas con VC o pCI-F/VC	75
3.11	Micrografías de fluorescencia de células HeLa resistentes a VC tratadas con VC o pCI-F/VC	77
3.12	Nivel de expresión de la caspasa 3 en células HeLa resistentes a vincristina expuestas a diversos tratamientos.	80

NOMENCLATURA

Símbolo o abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
6HB	Agrupación de seis hélices
A	Absorbancia
ABC	Casete de unión a ATP (<i>ATP-binding cassette</i>)
AdF	Adenovirus recombinante con el gen que codifica para la glicoproteína fusogénica F
adv	Adenoviral
AMV	Transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar
ATP	Trifosfato de adenosina
bcl-2	Protooncogén bcl-2
BSA	Albúmina sérica bovina
c3	Caspasa 3
cDNA	DNA complementario
C _P	Puntos de cruce (<i>Crossing points</i>)
CO ₂	Dióxido de carbono
CYP-2B1	Enzima hepático de rata citocromo P450
DL50	Dosis letal media
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxiribonucleic acid</i>)
DNAp	DNA plasmídico
DNAr	DNA recombinante
EDTA	Ácido etilen diamino tetracético
erb-B2	Oncogén erb-B2
et al.	Y otros (lat. <i>et alteri</i>)
F	Glicoproteína fusogénica F
f	Subunidad de fusión
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (<i>Food and Drug Administration</i>)
GAPD	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
h	Horas
HN	Glicoproteína hemaglutinina-neuraminidasa
IP	Ioduro de propidio
kb	Kilo base
LB/amp	Medio Luria Bertani con ampicilina
LDH	Lactato deshidrogenasa
m.o.i.	Multiplicidad de infección (<i>multiplicity of infection</i>)
MDR	Resistencia a multifármacos
MDR-1	Gen de resistencia a multifármacos
min	Minutos

mQ	MiliQ
MRP-1	Proteína de resistencia a multifármacos MRP-1
MRP-2	Proteína de resistencia a multifármacos MRP-2
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nM	Concentración molar/ 1×10^9
p450-2B1	Enzima hepático de rata citocromo P450
p53	Gen supresor de tumor p53
PBS	Solución buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PES	Etosulfato de fenacina
PFA	Paraformaldehído
P-gp	Glicoproteína P
pH	Potencial de hidrógeno
qPCR	PCR cuantitativa
rb	Subunidad de unión al receptor
RNA	Ácido ribonucléico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SBF	Suero bovino fetal

SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SV5	Virus de simio 5 (<i>Simian virus 5</i>)
TAE	Solución buffer tris acetatos EDTA
TBE	Solución buffer tris boratos EDTA
TE	Solución buffer tris EDTA
TK	Timidina quinasa
UV	Ultravioleta
VC	Vincristina
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D- galactopiranosido

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Origen del problema

1.1.1 Definición del cáncer y epidemiología

El término “cáncer” puede definirse de diversas maneras, pero todas coinciden en que se trata de una alteración con bases genéticas en el control de la proliferación celular. Las células malignas experimentan cambios en su estructura y aspecto, que al multiplicarse dan origen a una colonia de células que se reproducen rápidamente invadiendo y destruyendo los tejidos sanos. La transformación de las células es el resultado de un proceso muy complejo que ocurre en varias etapas, e intervienen múltiples factores en su origen y mecanismo, como son, factores genéticos, ambientales e inmunológicos. Actualmente se sabe que a nivel molecular comprende alteraciones en los genes involucrados en la proliferación, apoptosis, reparación del DNA y envejecimiento celular (1-4).

Es considerada como una de las principales causas de muerte a nivel mundial. De acuerdo a las estadísticas oficiales, las neoplasias malignas constituyen la segunda causa de muerte en la población mexicana (47.6 por 100 mil) (5).

Sin duda, es una de las enfermedades que ha irrumpido con mayor ímpetu en el panorama epidemiológico de nuestro país desde finales del siglo XX convirtiéndose en un problema de salud pública a nivel mundial no sólo por sus graves manifestaciones clínicas y su alta letalidad, sino también por la gran variedad de factores de riesgo -individuales y ambientales- con los que se asocia.

En México, en el 2001 se registraron 102,657 tumores malignos que corresponden a 101.6 casos por 100,000 habitantes, se observó que el grupo de 0 a 4 años presentó mayor número de casos que los de 5 a 14 años, posteriormente se aprecia un aumento progresivo hasta alcanzar el máximo en el grupo de 70 años y más. De acuerdo al género, 34.8% fueron en hombres y 65.2% en mujeres, en ambos fue mayor el número de casos registrados en el grupo de 0 a 4 años y posteriormente se observó un aumento progresivo, en este aspecto, es importante destacar que en las mujeres el aumento más intenso fue a partir de los 20 años, mientras que en los hombres se apreció hasta los 40 años. En 2003, los principales tipos de tumores malignos que provocaron mortalidad en hombres fueron: bronquios y pulmón, próstata y estómago; en mujeres la mortalidad de cáncer se debió a cáncer cérvico-uterino, de mama y de estómago (6).

1.1.2 Terapéutica para el cáncer

En las últimas décadas se ha puesto de manifiesto un claro avance en el tratamiento del cáncer. Los tratamientos convencionales incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia. La cirugía es el tratamiento más utilizado cuando los tumores son pequeños y se encuentran bien localizados y no ramificados, pero existe el riesgo de que en el momento de la cirugía, algunas células malignas se desprendan del tumor, viajen por el sistema circulatorio y se establezcan en otros sitios originando tumores secundarios, proceso que se denomina con el término metástasis.

Los tratamientos basados en radioterapia pueden utilizarse en aquellos casos en que los tumores sean especialmente sensibles al tipo de radiación aplicada y no haya señales de haberse presentado metástasis. Pueden aplicarse previamente a la cirugía, y contribuir a la disminución de las dimensiones del tumor para hacer más fácil su extirpación. El tratamiento conjunto de radioterapia y quimioterapia se utiliza también a menudo. Es frecuente el empleo de quimioterapia antes de la aplicación de la radiación con el fin de sensibilizar a las células neoplásicas y asegurar así una mayor efectividad del tratamiento. En otra modalidad, se suele aplicar la radioterapia después de la quimioterapia para asegurar la eliminación de todas las células cancerosas en un tejido determinado.

La quimioterapia consiste en el empleo de fármacos para tratar el cáncer. Estos medicamentos tienen como función eliminar, dañar o retrasar el crecimiento de las células cancerosas. Es la principal forma de tratamiento para la enfermedad de Hodgkin, cáncer testicular y muchos cánceres de la infancia. La combinación de la quimioterapia con agentes citotóxicos que tiene diferentes blancos intracelulares ha sido particularmente efectiva. La principal desventaja de este tratamiento es la baja especificidad de los fármacos por el tejido blanco, ya que las células cancerosas se han generado de las células normales; por lo cual no hay diferencias significativas que permitan al fármaco distinguir unas de otras. Las drogas anti-neoplásicas tienen mayor efecto sobre las células que se dividen con gran rapidez, que es lo que suelen hacer las cancerosas, pero también existen otras células, que no son de origen neoplásico, que se dividen de forma rápida y que pueden verse afectadas en el desarrollo de la terapia (médula ósea, folículos pilosos y epitelio intestinal), toxicidad que suele limitar la utilidad de los productos farmacológicos. Además, la administración de este tipo de terapia debe ser supervisada de manera rigurosa pues es común el desarrollo de resistencia a las drogas por parte de las células neoplásicas (3, 7 y 8,11).

1.1.3 Vincristina en la quimioterapia

La vincristina (VC) es un miembro de la clase de alcaloides de la vinca, los cuales son agentes de quimioterapia para el cáncer extraídos de la planta *Catharanthus roseus*. En la figura 1.1 se muestra su estructura.

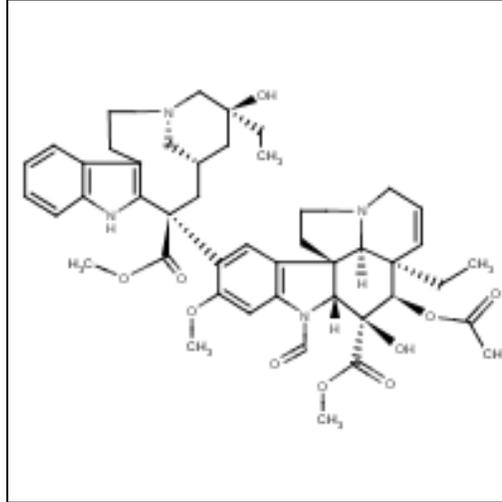


Figura 1.1. Estructura de la vincristina.

Principalmente ejerce sus efectos citotóxicos en la célula interfiriendo con los microtúbulos, los cuales componen las fibras del huso mitótico provocando la inhibición del ciclo celular en la metafase. Los alcaloides de la vinca se unen a un par común de sitios en cada subunidad de tubulina (alfa y beta) durante la fase M del ciclo celular. Hay al menos dos tipos de sitios de unión de la tubulina para los alcaloides de la vinca. Los sitios de alta afinidad, los cuales se encuentran en número reducido, son responsables de la interrupción del ensamblaje de los microtúbulos. Los alcaloides de la vinca, a concentraciones altas del fármaco, también se unen a los sitios de enlace de baja afinidad provocando la división de los microtúbulos en agregados espirales o protofilamentos espirales, lo cual conduce a la desintegración del microtúbulo.

Después de la exposición a los alcaloides de la vinca, algunas células sufren un bloqueo del ciclo celular, lo cual es sólo temporal. Si la concentración del fármaco cae por debajo de cierto nivel, esas células pueden evitar los efectos citotóxicos y dividirse normalmente.

La VC es usada en el manejo de muchos procesos malignos incluyendo leucemia linfoblástica aguda, carcinoma de mama, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, sarcomas de tejido suave, osteosarcoma y tumores de cerebro. La *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó su uso en 1984.

La toxicidad limitante de la dosis de la VC es la neurotoxicidad, la cual parece estar asociada a su baja polaridad, mientras que la de los otros alcaloides de la vinca es la mielosupresión. La diferencia puede deberse al incremento en la unión de la VC a los microtúbulos axonales. Debido a su lipofilidad, los alcaloides de la vinca son rápidamente incorporados por las células y alcanzan concentraciones intracelulares varios cientos de veces más altas que las concentraciones extracelulares (9, 10).

1.1.4 Resistencia en quimioterapia

La mayoría de los cánceres (renal, colon, etc.) son resistentes a la quimioterapia o adquieren resistencia durante el tratamiento (linfoma, cáncer de

pulmón y de mama). Esta capacidad de las células tumorales, intrínseca o adquirida, de ser resistentes a múltiples agentes quimioterapéuticos (resistencia a multi-fármacos) es el principal obstáculo para el éxito en la quimioterapia del cáncer. Múltiples estudios realizados *ex vivo* han demostrado que un mecanismo frecuente de resistencia celular a fármacos se debe a un gen de resistencia a multi-fármacos (MDR-1) el cual codifica una glicoproteína P (P-gp) capaz de bombear hacia fuera de las células de cáncer productos farmacéuticos naturales, previniendo la citotoxicidad (11 y 12). La P-gp, fue la primera proteína importante implicada en el fenómeno de resistencia a multi-fármacos (13). Líneas celulares de mamífero que sobre expresan esta proteína fueron inicialmente seleccionadas por resistencia a un solo fármaco citotóxico, pero subsecuentemente se encontró que presentan una resistencia cruzada a otros fármacos estructuralmente no relacionados (14–16). Después de este descubrimiento, se han identificado otras proteínas que también pueden conferir resistencia a multi-fármacos. Estas incluyen las proteínas ABC (*ATP-binding cassette*) de resistencia a multi-fármacos, MRP1 y MRP2; así como la topoisomerasa II y la proteína de resistencia de pulmón (11). La relevancia clínica de estas otras proteínas en la resistencia a multi-fármacos en el cáncer, está aun en investigación (17).

Hay evidencia considerable de que muchos tumores diferentes expresan P-gp (11, 18–20). En el cáncer renal y de colon la P-gp es expresada constitutivamente en relativamente grandes cantidades (21, 22). En otros cánceres (de pulmón, mieloma, de mama, de ovario, linfoma, leucemia mieloide

aguda), las células tumorales frecuentemente expresan P-gp sólo después de exposición a fármacos quimioterapéuticos o durante recaídas (23). Varios estudios han mostrado que la expresión de la P-gp es pronóstico predictivo de pobre respuesta a la quimioterapia y disminución en la supervivencia del paciente (19, 23-25).

Los fármacos anti-cáncer extraídos de forma más efectiva de las células tumorales por la P-gp son de origen natural. Las antraciclinas (doxorubicina, daunorubicina y mitoxantrona), alcaloides de la vinca (vincristina y vinblastina), epipodofilotoxinas (etopósido y tenipósido), taxanos (taxol y taxotere), y actinomicina D son algunos ejemplos (26).

La glicoproteína P de resistencia a multi-fármacos en el humano es clínicamente importante ya que contribuye al fenómeno de resistencia a multi-fármacos durante la quimioterapia en el cáncer y SIDA. Esta proteína usa la energía del ATP para transportar una amplia gama de compuestos citotóxicos estructuralmente no relacionados hacia el exterior de la célula. También sirve como modelo para comprender las estructuras y mecanismos de otros miembros de la superfamilia de proteínas ABC. La familia de proteínas ABC es la clase más grande de proteínas transportadoras.

El principal rol fisiológico de la P-gp es probablemente proteger al organismo de agentes tóxicos hidrofóbicos (17).

Fármacos no citotóxicos han mostrado revertir MDR *ex vivo* por inhibición de la P-gp. Desafortunadamente, fármacos tales como: verapamil, quinina, quinidina, amiodarona y trifluoperazina producen excesiva toxicidad con las dosis necesarias que se requieren para revertir MDR *in vivo* (12).

La quimioterapia puede también inducir otros mecanismos de resistencia a fármacos, denominados activación del sistema de detoxificación por glutatión y alteraciones en genes que controlan la apoptosis, especialmente p53 y bcl-2 (27).

Se piensa que la resistencia a los alcaloides de la vinca ocurre a través de un par de mecanismos. La resistencia a multifármacos (MDR) resulta en una disminución de la acumulación intracelular y retención del fármaco. El segundo mecanismo de resistencia se debe a alteraciones en las subunidades alfa y beta de la tubulina. Estos cambios resultan en la disminución de la unión de los fármacos o incremento de la resistencia de los microtúbulos al desensamblaje (9, 10).

1.1.5 Terapia génica

Los métodos básicos para el tratamiento del cáncer se encuentran en constante cambio. Las limitaciones derivadas de los tratamientos tradicionales han despertado el interés por el desarrollo de nuevos métodos terapéuticos que

ofrezcan a la par, eficiencia en el tratamiento y reducción de efectos secundarios.

Los protocolos clínicos exploran ahora terapias génicas, manipulaciones del sistema inmunitario, estimulación de los elementos hematopoyéticos normales, inducción de diferenciación en tejidos tumorales, e inhibición de angiogénesis. La investigación en estos nuevos terrenos ha permitido su aplicación experimental, y en algunos casos sistemática (7).

La terapia génica es la parte de la terapéutica que utiliza material genético en el tratamiento de enfermedades; intenta modular la función celular, pudiendo corregir la deficiencia causada por la pérdida o alteración de un gen al modificar la expresión de proteínas. Así, secuencias codificadoras de proteínas, sondas antisentido, DNA triples y ribozimas pueden ser considerados los fármacos de la terapia génica. Sus objetivos son la liberación de un transgén a un número adecuado de células y a un nivel efectivo de expresión suficiente para producir resultados terapéuticos.

Los problemas más importantes con los que se encuentra este conjunto de técnicas son de distribución de estos “fármacos”, es decir, la transferencia de este material a las células diana (27, 28).

El desarrollo de tecnologías de ácidos nucleicos ha proporcionado una visión dentro de las bases moleculares de la neoplasia. La detección resultante de las

alteraciones fenotípicas y genotípicas en las enfermedades neoplásicas ha incrementado el optimismo de que la intervención molecular podría conducir a mejorar el cuidado clínico de los pacientes con cáncer (27).

En el cáncer las líneas de investigación, tanto preclínicas como clínicas dentro de la terapia génica, pueden ser agrupadas en varias estrategias: (1) la compensación de mutaciones, en donde puede regularse la expresión de oncogenes dominantes, o bien, la expresión de supresores tumorales; (2) la inmunopotenciación genética, que mediante transducciones tanto *in vitro* como *in vivo* puede potenciar de manera específica la infiltración de linfocitos en tumores o generar antígenos asociados a tumores en las células diana; (3) la oncolisis mediada por virus, en la que las células son destruidas mediante vectores virales replicativos y (4) la quimioterapia molecular, en la cual es posible la eliminación de células y tejidos, ya sea por la expresión de toxinas o genes selectivos, o bien; por la protección de las células sanas durante la aplicación de quimioterapia a altas dosis (28-30).

1.1.5.1 Compensación de mutaciones

Un ejemplo de esta estrategia de terapia génica lo constituye el primer gen terapéutico aprobado en China en el año 2003. Este fue un vector adenoviral (adv) serotipo 5 manipulado genéticamente para expresar el gen supresor de tumor, TP53 (Gendicina) en combinación con quimioterapia para el tratamiento de pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.

1.1.5.2 Oncolisis mediada por virus

El gen terapéutico H101 (ONYX-015), un vector adenoviral modificado para replicarse y destruir células de cáncer con mutaciones TP53, aprobado en diciembre de 2005, constituye un ejemplo de esta estrategia terapéutica (27 y 29).

1.1.5.3 Quimioterapia molecular

En esta estrategia terapéutica existen varios genes cuyos productos proteicos metabolizan un profármaco inactivo en un fármaco citotóxico. El profármaco y el vector que transporta el gen activador se administran separadamente en el paciente. La cinasa de timidina (TK) fosforila el ganciclovir para permitir su incorporación en el ADN y detener su replicación. Existe un cierto efecto colateral, pues células adyacentes que no reciben el transgén pueden recibir el ganciclovir fosforilado a través de uniones intercelulares. Tras numerosos ensayos clínicos con retrovirus o adenovirus que expresan TK y administración sistémica de ganciclovir se ha comprobado que la eficiencia terapéutica requiere niveles de transducción más elevados de los que se han conseguido hasta el momento (31).

Para mejorar estos resultados se han usado genes que producen metabolitos más pequeños y que difunden mejor que el ganciclovir-trifosfato y que dañan al ADN sin necesidad de replicación celular, como por ejemplo, la nitrorreductasa de *Escherichia coli* activadora del profármaco dinitrobenzamida (CB 1954). En

la clínica, la toxicidad se ve limitada al tumor si el vector se administra intratumoralmente, puesto que el fármaco activado tiene una vida corta. En otros casos la acción selectiva sobre el tumor se consigue utilizando promotores selectivos de tumor para controlar la expresión del transgén. Por ejemplo, el promotor de erb-B2, que se sobreexpresa en un 20% de los tumores de mama, se ha utilizado para controlar la expresión de la citosina desaminasa. Esta enzima, ausente en mamíferos, hidroliza la 5-fluorocitosina a 5-fluorouracilo, que a su vez inhibe la síntesis de DNA y RNA en la fase S del ciclo celular (32). En un ensayo clínico en fase I, la inyección de un plásmido con citosina desaminasa bajo el promotor erb-B2 resultó en regresiones de los nódulos de mama inyectados en dos de doce pacientes; pero en seis pacientes el nivel de transducción de los nódulos inyectados no alcanzó el 30% de las células del tumor, evidenciando la dificultad de llevar el gen a un número significativo de células tumorales, incluso por inyección directa. La administración sistémica para el tratamiento efectivo de la enfermedad metastásica supone todavía un reto mucho mayor (32, 33).

1.1.5.4 Terapia combinada

Se ha llevado a cabo la aplicación conjunta de genes citotóxicos de activación de pro-drogas y un supresor tumoral como una alternativa de terapia combinada en el tratamiento del cáncer. Mercadé y col. (2001) desarrollaron un sistema en el que emplearon una línea celular derivada de un adenocarcinoma pancreático humano, la cual fue tratada con una combinación del citocromo p450-

2B1/ciclofosfamida y el gen supresor de tumor p53. Los resultados del empleo de esta combinación (un gen citotóxico de activación de pro-drogas y un supresor tumoral) muestran una pérdida mayor de viabilidad celular que con los tratamientos por separado, así como un incremento marcado en el perfil de ciclo celular de la población en la etapa sub-G1, la cual corresponde a la etapa previa a la fase de biosíntesis (34).

1.1.6 Estructura, función y mecanismo de acción de las proteínas virales de fusión

El medio clave por el cual todos los virus con cubierta entran a las células e inician sus ciclos de replicación causantes de enfermedades, es la fusión del virus a la célula. En todos los casos este proceso es llevado a cabo por una o más glicoproteínas virales de superficie, incluyendo una generalmente llamada proteína de fusión. Ciertas proteínas virales de fusión inducen la fusión célula-célula cuando se expresan en la superficie celular como consecuencia de la infección, y la fusión puede contribuir a la diseminación viral, a su virulencia o su persistencia y otras consecuencias desfavorables (35).

En años recientes se han tenido grandes avances en la comprensión de las proteínas y complejos proteicos que median la fusión entre los virus con envoltura y sus células hospederas. En particular, una gran cantidad de información indica que todas las proteínas virales de fusión caracterizadas median la fusión de membranas formando un confórmero común -un trímero de

horquillas- y coaccionando a través de las membranas una vía común de la dinámica de la membrana. Sin embargo, sorprendentemente, las proteínas de fusión en sí mismas son muy diversas en secuencia y estructura y son activadas por diversos mecanismos (36).

1.1.6.1 Mecanismo de fusión del trímero de horquillas

La fusión de membranas requiere llevar dos membranas separadas a un contacto íntimo y entonces la fusión de ellas en una sola. En la figura 1.2 se esquematiza el mecanismo de fusión mediante un trímero de horquillas. Este modelo representa el mecanismo de una proteína de Clase I, sin embargo, estructuras relacionadas como prehorquillas y trímeros de horquillas, que constituyen proteínas de fusión de Clase II y III, también promueven la fusión a través de estados de estrecha convergencia (iv), hemifusión (v), poros de fusión pequeños y grandes (vi) los cuales se presentan en este mecanismo. La proteína que aparece en esta figura es una de las que no requieren de otra proteína viral de superficie para la fusión, como *HA* del virus de la influenza o *Env* de un retrovirus; contiene una subunidad de unión al receptor, marcada como rb en la imagen (i), y una subunidad de fusión, marcada en las imágenes (i) a (iii) como f. La membrana blanco y la viral están, respectivamente, en la parte superior e inferior de las imágenes. La subunidad de unión al receptor (rb) se muestra sólo en la imagen i ya que no se conoce su localización en etapas avanzadas; sin embargo, en todos los casos estudiados, esta subunidad en las proteínas de clase I debe moverse o cambiar de posición, entonces la

subunidad f en el estado competente de fusión metaestable se libera permitiendo que proceda la fusión. En esta clase de proteínas de fusión se han visto agrupaciones de seis hélices (6HBs) en forma de haces (e) y de trímeros de horquilla (f), la longitud y posición del 6 HB varía según la proteína. Las imágenes inicial (i) y final (vi) representan estructuras que son conocidas para varias proteínas virales de fusión, sin embargo, hay falta de información estructural de alto nivel de los intermediarios.

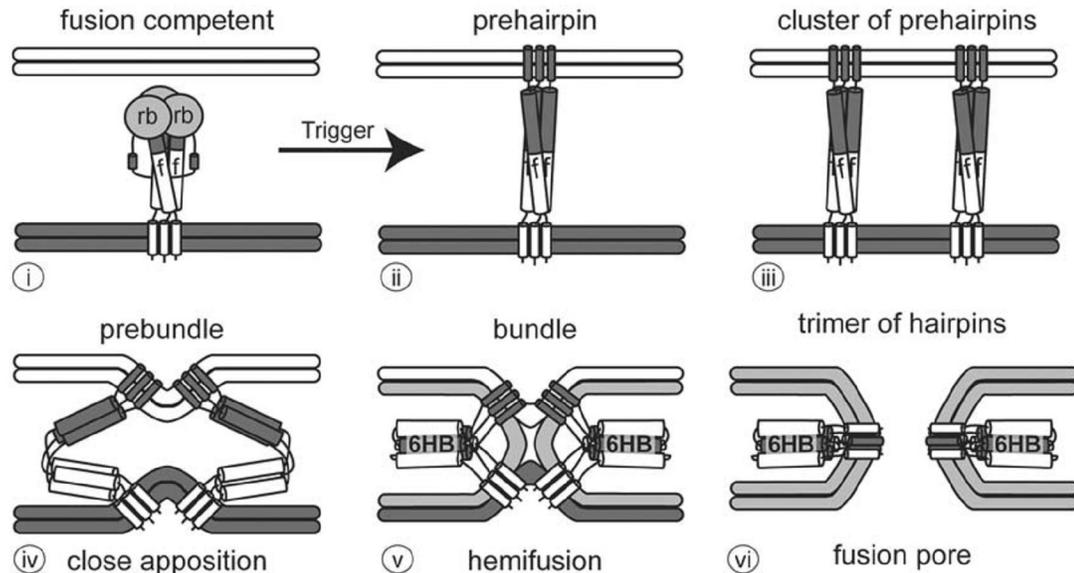


Figura. 1.2. Vía común de fusión de membranas del trímero de horquillas. Tomada de White, Delos, Brecher y Schornberg, 2008. (39)

Una etapa clave es la hemifusión, durante la cual pequeñas regiones de la monocapa externa se unen, mientras que la monocapa interna permanece intacta (figura 1.2 v). La resolución de los intermediarios de la hemifusión resulta en la fusión de las monocapas internas y la creación de un pequeño poro de fusión, el cual puede expandirse (figura 1.2 vi). Esta vía de hemifusión

de la membrana para la fusión, formación del poro y ampliación es también empleada durante reacciones de fusión celular, tanto en eventos de fusión intracelular como en reacciones de fusión célula-célula (37, 38).

La fusión virus-célula está mediada por una o más glicoproteínas de superficie de la envoltura del virus maduro. La fusión a la superficie celular puede ocurrir a pH neutro o dentro de un endosoma a pH bajo. Para algunos virus (por ejemplo, retrovirus) se requiere de una sola glicoproteína viral de superficie, mientras que para otros (por ejemplo, paramyxovirus y herpesvirus) se requieren proteínas virales adicionales (Tabla 1.1).

La proteína de fusión existe en la superficie viral madura en un estado competente de fusión 'nativo', el cual es muy frecuente, pero no siempre metaestable. Una vez que se desencadena el proceso, la proteína se convierte en una prehorquilla intermediaria la cual se inserta en la membrana blanco a través de una región no polar llamada péptido fusión (figura 1.2 ii).

En todos los casos estudiados, la prehorquilla intermediaria insertada en la membrana es un homotrímero de la subunidad de fusión, independientemente si el ectodominio de la proteína de fusión nativa es un dímero o un trímero. Se piensa que las siguientes etapas de fusión, involucran la participación de varias prehorquillas triméricas insertadas en la membrana en el sitio de fusión (figura 1.2 iii), seguida por una secuencia drástica de etapas de plegamiento, durante la cual la subunidad de fusión se convierte en un compacto trímero de horquillas

como un cilindro, cuya conformación por lo general es energéticamente más estable (figura 1.2 iv-vi).

TABLA 1.1. Proteínas de fusión de familias de virus con envoltura

Familia	Proteínas necesarias	Proteína de fusión Subunidad de Fusión	Clase	pH de fusión	Localización del péptido de fusión
Orthomyxoviridae	HA	HA1-S-S- <u>HA2</u>	I	Bajo	N-terminal
Retroviridae	Env	SU-S-S- <u>TM</u> , SU/ <u>TM</u> ^a	I	Neutro (Bajo) ^b	N-terminal (mayoría) Interna (ASLV)
Paramyxoviridae	F, HN ^c	F2-S-S- <u>F1</u>	I	Neutro ^b	N-terminal
Coronaviridae	S	S1/ <u>S2</u>	I	Neutro (Bajo) ^b	Interna
Togaviridae	E1/E2	<u>E1</u> /E2	II	Bajo	Interna
Flaviviridae	E(TBEV), E1/E2 (HCV)	<u>E</u> , E1/E2 ^d	II	Bajo	Interna
Bunyaviridae	G _N /G _C	G _N / <u>G</u> _C ^e	II ^f	Bajo	Interna ^e
Rhabdoviridae	G	<u>G</u>	III	Bajo	Interna (bipartita)
Herpesviridae	gB, gD, gH/L	<u>gB</u> ^f , gH/gL	III	Neutro (Bajo) ^b	Interna (bipartita)

Adaptado de Earp *et al.*, 2005. Información proporcionada para 9 de las 17 familias de virus con envoltura. Los virus en paréntesis representan ejemplos. (a) SU/TM, S1/S2, etc. señala que las subunidades indicadas están asociadas pero no unidas por enlaces disulfuro. (b) Algunos miembros de algunas familias se fusionan a pH neutro, mientras que otros requieren bajo pH, en algunos casos además de la unión al receptor. En el caso de herpesvirus, se han visto diferencias en el tipo de células. (c) Proteínas de unión a receptor de Paramyxovirus son denominadas HN, H, o G dependiendo del virus. (d) Para HCV, se han implicado varias regiones en E1 y E2. (e) Estos datos se basan sólo en un análisis predictivo (Garry and Garry, 2004). (f) gB es fundamental para la fusión y es una proteína de fusión de Clase III, pero el complejo gH/gL también participa.

La conversión al estado final se cree contribuye a superar la gran barrera de energía para fusionar ambas bicapas en una sola membrana (39, 40). La conversión de la prehorquilla homotrimérica insertada en la membrana al trímero de horquillas puede ocurrir en etapas, por ejemplo, por empaquetamiento secuencial de las tres regiones C-terminales contra el núcleo central trimérico N-terminal, estos segmentos de la proteína de fusión se pueden observar en la figura 1.3. La formación del ectodominio completamente cerrado del trímero de horquillas pudiera ser seguida por una conformación compleja entre el péptido de fusión y el dominio transmembrana (41). Durante estas etapas de plegamiento, las membranas podrían conseguir un contacto cada vez más estrecho y podría progresar a través de la hemifusión seguida por la apertura de poros lábiles de fusión y finalmente poros robustos de fusión que permiten el paso de la nucleocápside viral al citoplasma para iniciar la replicación. Los conformeros exactos (grados de formación de trímeros de horquillas) que dan lugar a una estrecha convergencia de membrana, hemifusión y luego la fusión es probable que varíen de una proteína de fusión a otra dependiendo de la arquitectura exacta de los extremos proximales de la membrana (41, 42).



Figura 1.3 Características clave de una proteína de fusión de Clase I desde el extremo N-terminal al C-terminal: un péptido de fusión (FP) en o cerca del extremo N-terminal, una N-hepta repetición (N-HR), una C-hepta repetición (C-HR), un dominio transmembrana (TMD), y una cola citoplásmica (gancho). Las líneas rectas indican conectores de longitud variable. La // entre las N- y C- hepta repeticiones indican que la longitud de estos conectores varía considerablemente. Tomada de White, Delos, Brecher y Schornberg, 2008. (39)

1.2 Antecedentes

1.2.1 Glicoproteína fusogénica en terapia génica

Gómez-Treviño y colaboradores (2002), propusieron el uso de la glicoproteína fusogénica del Paramyxovirus SV5 como un nuevo gen citotóxico para la eliminación de células tumorales, y en 2003 diseñaron un sistema con el que demostraron que la glicoproteína de fusión del Paramyxovirus SV5 incrementa la citotoxicidad de terapias basadas en el empleo de enzimas como activadores de pro-fármacos (43, 44).

También en 2003, Gómez-Treviño y colaboradores construyeron un adenovirus no replicativo para la expresión de la proteína F del Paramyxovirus SV5 en células tumorales. En este estudio se investigó la citotoxicidad, el efecto *bystander* y la fusión celular provocados por esta glicoproteína fusogénica viral, empleando tres líneas celulares tumorales y efectuando diferentes técnicas microscópicas y de inmunomarcaje (45).

Se determinó que la expresión de la proteína induce la formación de sincitios en un máximo de 72 h, después de lo cual se pierde progresivamente la viabilidad celular.

Las imágenes de la figura 1.4 muestran los resultados de la observación de preparaciones ultra finas de células tratadas con AdF a 75 m.o.i. (A y B), células

control (C), células tratadas con AdlacZ a 75 m.o.i. (D). Se puede apreciar una clara perturbación de la membrana citoplasmática consistente en continuas interrupciones en la continuidad de la misma (flechas en A y B), para las células que expresan la proteína F. En contraste, las células no infectadas o tratadas con el virus control AdlacZ mantienen la integridad de la membrana. En el análisis de crio-preparaciones con inmunomarcaje de partículas de oro de células A-431 que expresan F (E), y células tratadas con AdlacZ (F), se puede observar que las partículas de oro se detectan solo en las células que expresan la glicoproteína fusogénica F. Lo anterior puede apreciarse con detalle en el recuadro amplificado en (E), contrastando con la total ausencia de marcaje en las células tratadas con el virus control AdlacZ (45).

Es evidente que la membrana de las células presentó formación de poros asociados a la presencia de la glicoproteína F y sufrió rupturas, mientras que la estructura nuclear se preservó. La sobreexpresión de la proteína SV5 F en las células tumorales produjo una alta toxicidad comparable a la asociada al empleo de la estrategia de activación de prodroga timidina-kinasa/ganciclovir, además, se detectó un potente efecto *bystander* destructivo.

Estos resultados indican que la glicoproteína fusogénica del Paramyxovirus SV5 puede ser usada para eliminar células tumorales y alentar estudios enfocados a modificar su selectividad y combinar su expresión con otras estrategias citotóxicas para mejorar su eficiencia.

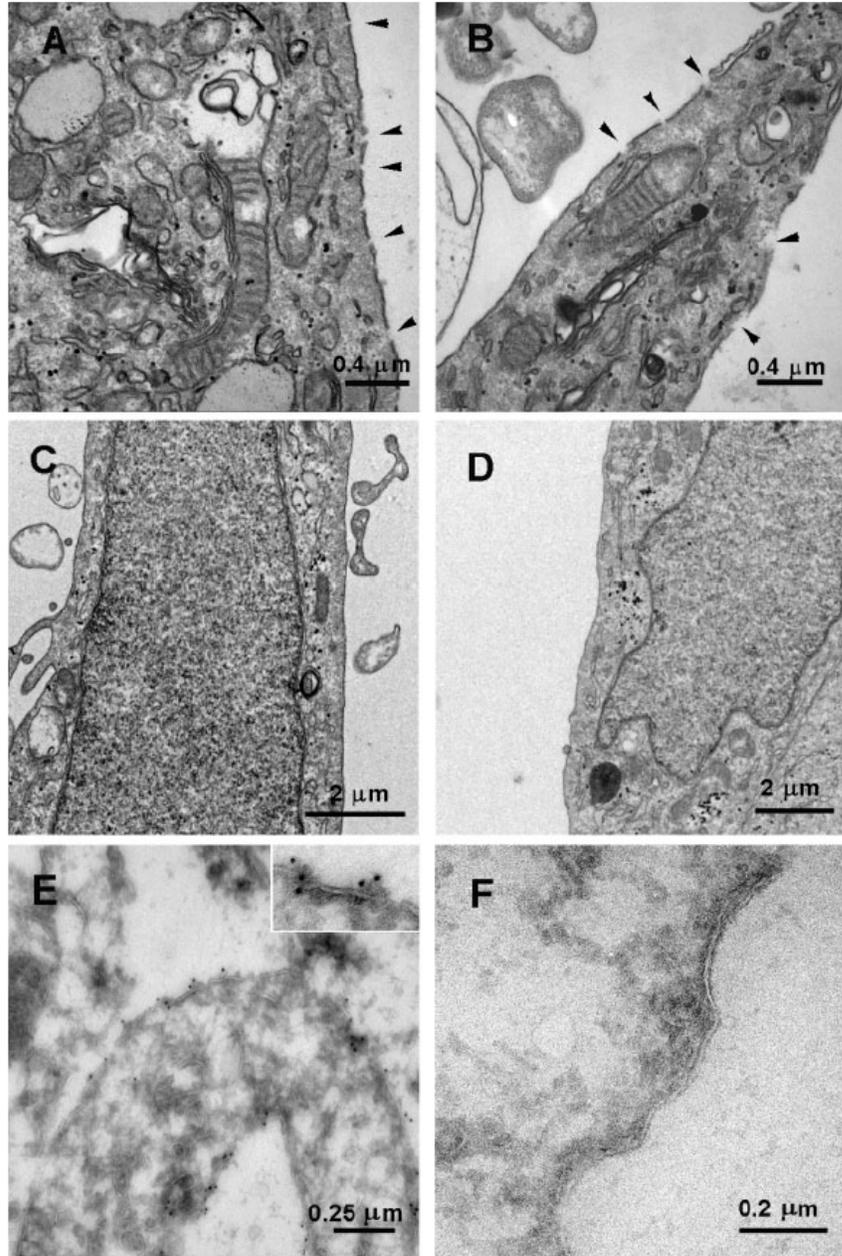


Figura 1.4. Caracterización ultra estructural de células A-431 mediante microscopía electrónica. (A y B), células tratadas con AdF a 75 m.o.i., (C) células control, (D) células tratadas con AdlacZ a 75 m.o.i. (E) crio-preparaciones con inmunomarcage de partículas de oro de células A-431 que expresan F y (F) células tratadas con AdlacZ. Tomado de: Gómez-Treviño, Castel, López-Iglesias, Cortadellas, Comas-Riu, y Mercadé, 2003. (45)

En este proyecto de investigación se plantea el desarrollo de una estrategia de quimioterapia molecular en la que se introducirá un gen que codifica para la glicoproteína fusogénica del Paramyxovirus SV5 (proteína F) como gen citotóxico, de manera simultánea a la exposición de vincristina, un fármaco antineoplásico ampliamente utilizado, para el cual, además, se han descrito los mecanismos de resistencia celular frente al mismo (9, 10, 34, 43-45).

El planteamiento general del proyecto involucra favorecer la difusión intracelular del alcaloide vincristina a través de la formación de poros de fusión, propios de las etapas tempranas del proceso fusogénico de membranas, mediante la expresión del gen de la glicoproteína fusogénica del Paramyxovirus SV5 en un modelo celular.

1.3 Hipótesis

Es posible incrementar el efecto citotóxico del alcaloide vincristina administrando simultáneamente el gen de la glicoproteína fusogénica F del paramyxovirus SV5 en células tumorales en cultivo.

1.4 Objetivo general

Desarrollar las bases para una terapia antineoplásica fundamentada en quimioterapia molecular, combinando la expresión de la glicoproteína fusogénica F y un fármaco de efecto antineoplásico.

1.5 Objetivos particulares

- Amplificar el gen de la glicoproteína fusogénica del Paramyxovirus SV5.
- Clonar el gen de la glicoproteína fusogénica del Paramyxovirus SV5 en un vector plasmídico de expresión.
- Comprobar la clonación del gen en el vector mediante análisis del patrón de restricción, así como con PCR para amplificar el inserto.
- Generar una línea celular resistente a la vincristina y determinar la DL_{50} .
- Evaluar la actividad citotóxica del gen de la proteína F en combinación con la vincristina empleando una línea celular tumoral.
- Evaluar el daño en el núcleo celular por el tratamiento con el vector de expresión que codifica para la proteína F en combinación con la vincristina, mediante microscopía de fluorescencia.

- Analizar el efecto que tiene la transfección con el vector codificante para la proteína F sobre la expresión de genes relacionados con muerte celular programada.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Construcción del vector de expresión

2.1.1 Amplificación del cDNA de la proteína fusogénica (F)

Para la construcción del vector de expresión se obtuvo el cDNA de la proteína fusogénica (F) del paramyxovirus SV5 a partir de una cepa de *Escherichia coli* transformada con el plásmido pACC-F.

Se preparó un cultivo de esta cepa en caldo LB con ampicilina a 50 µg/ml (LB/amp), se incubó en agitación a 37 °C y posteriormente se aisló y purificó el plásmido mediante la técnica de lisis alcalina (46).

Una vez caracterizado el plásmido pACC-F (10.6 kb) por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en buffer 0.5 X de tris-boratos EDTA (TBE 0.5 X), se liberó el inserto correspondiente al cDNA de la proteína F mediante reacciones de restricción secuenciales con las enzimas Eco RI y Kpn I. Las condiciones de las reacciones fueron las recomendadas por la casa comercial y la purificación del DNA entre una reacción y otra se llevó a cabo mediante el *kit Micropure EZ*.

Se efectuó una electroforesis preparativa en gel de agarosa al 1.0 % en solución buffer de tris-acetatos EDTA (TAE) 1X para separar el cDNA de la

proteína F (1.8 kb) del DNA plasmídico, llevando un marcador de peso molecular, el N3232S, para identificar la banda correspondiente al mismo. Se cortó la fracción del gel donde se encontraba la secuencia a clonar, posteriormente se extrajo y se purificó mediante el *kit GeneClean* para llevar a cabo la clonación en el vector de expresión.

2.1.2 Clonación molecular del inserto en el plásmido pCI

El plásmido pCI (figura 2.1) elegido como vector de expresión en células de mamífero, fue digerido de manera secuencial con Eco RI y Kpn I purificando entre las reacciones con el *kit Micropure EZ* para eliminar las enzimas de restricción, finalmente se purificó y concentró empleando el *kit MICROCON*.

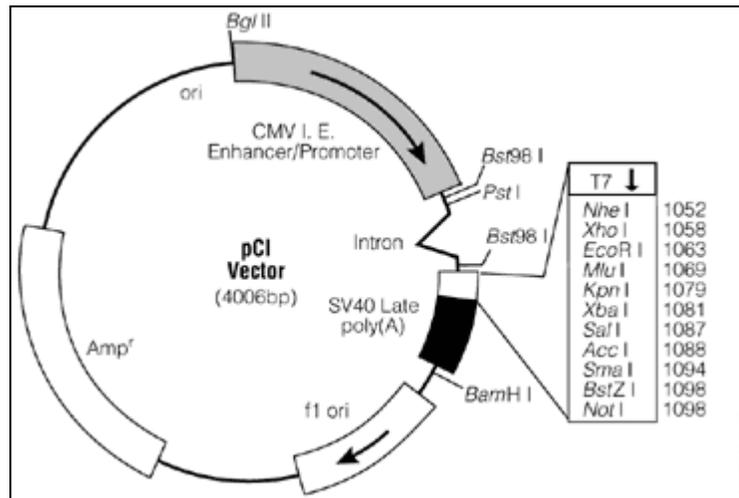


Figura 2.1 Plásmido pCI. Mapa del plásmido pCI, se presentan esquematizados los promotores CMV y T7, dianas de restricción de las enzimas indicadas en el sitio de poli-clonaje y el marcador de selección de resistencia a ampicilina.

Se evaluó la calidad y concentración del pCI digerido y el cDNA de la proteína F mediante espectrofotometría UV. Se preparó una reacción de ligación entre el pCI y el cDNA de la proteína F previamente digeridos, adicionándolos en una proporción 1:3 y 1:6 (vector:inserto). Se empleó la enzima T4 DNA ligasa y las condiciones de reacción fueron las recomendadas por el fabricante.

Una cepa de *E. coli* HB 101 se transformó mediante el método de células calcio competentes con 2 μ l del producto de la ligación y la selección de las clonas transformadas se realizó en placas con agar LB/amp. Se llevaron los controles correspondientes en los que la cepa empleada se trató igual que con el plásmido pero en su lugar se adicionaron 2 μ l de buffer TE 1X. El control positivo se inoculó en agar LB, y el negativo en LB/amp (46).

El esquema general de la construcción del vector y su clonación se muestra en la figura 2.2.

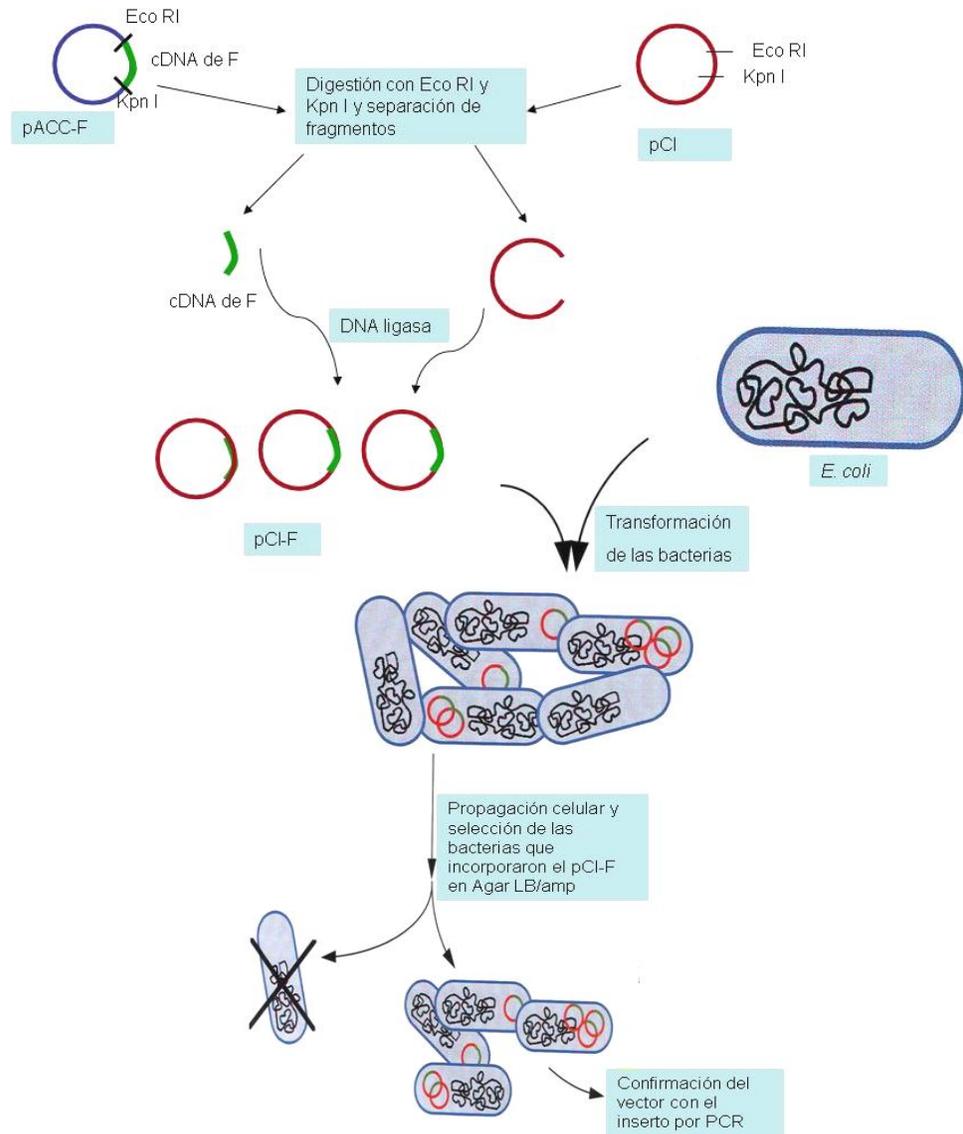


Figura 2.2. Esquema de la construcción del vector y su clonación. El cDNA que codifica para la glicoproteína F de SV5 se libera del plásmido pACC-F mediante enzimas de restricción, al igual que el vector (pCI). Posteriormente se separan y purifican para finalmente unirlos mediante reacción de ligación con DNA ligasa. Con el producto de la ligación se transforma una cepa de *E. coli* HB 101 y se seleccionan en agar LB/amp las que incorporaron el vector recombinante.

2.1.3 Comprobación de la clonación

Las clonas obtenidas en las diferentes placas se resembraron en otra placa con LB/amp donde se ordenaron y se marcaron para analizar la presencia del pCI-F y conservarlas temporalmente en refrigeración.

Cada una de las clonas se cultivó en caldo LB/amp y se siguió el método de lisis alcalina para la extracción del plásmido (46).

El plásmido aislado de cada clona se caracterizó mediante el patrón de restricción utilizando Eco RI y Kpn I, así como mediante la amplificación del inserto por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando *primers* específicos (*primer up*: 5'-aagaattcatgggtactataattcaatttctg-3' y *primer down* 5'-aaggtacctctgttccaagagttgcag-3'). Los componentes de la reacción, las concentraciones utilizadas y las condiciones de tiempo y temperatura de cada etapa se muestran en las tablas 2.1 y 2.2, respectivamente.

Se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % en TBE 0.5 X para analizar el producto amplificado empleando como marcador de peso molecular el N3232. Una vez confirmada la presencia del pCI-F en las clonas, a partir de la placa donde se habían ordenado y se mantenían en refrigeración, se eligió una de ellas y se cultivó nuevamente en caldo LB/amp. El cultivo se mezcló en una proporción 1:1 con glicerol estéril al 30% y se dividió en alícuotas de 1.0 ml en tubos Eppendorf, los cuales fueron conservados en congelación a -20 °C.

Tabla 2.1. Componentes de la PCR.

Componente	Volumen (μ l)	Conc. Final
Go Taq Buffer (5X)	10.0	1X
MgCl ₂ (25mM)	3.0	1.5 mM
dNTP's (10mM de c/u)	1.0	0.2 mM
Primer SV5Fup (10 μ M) 5'-aagaattcatgggtactataattcaatttctg-3'	1.0	0.2 μ M
Primer SV5Fdown (10 μ M) 5'-aaggtacctctgttccaagagttgcag-3'	1.0	0.2 μ M
GoTaq DNA polimerasa 5U/ μ l	0.25	1.25 U
DNA blanco (pCI-F, 10 ng/ μ l)	2.0	40 ng/50 μ l
Agua libre de nucleasas	32.0	-----

Tabla 2.2. Condiciones de amplificación de la secuencia del cDNA codificante para F.

No. de ciclos	Temperatura/Tiempo
1	94 °C/ 2 min
30 ciclos	94 °C/ 45 s 56 °C/ 45 s 72 °C / 60 s
1 ciclo	72 °C/ 2 min

2.2 Línea celular

En la etapa correspondiente a los bioensayos de este trabajo experimental se utilizó la línea celular HeLa, caracterizada y perteneciente a la colección de la *American Type Culture Collection* (ATCC), por lo que aspectos o datos informativos relacionados que no se incluyan en esta memoria de tesis, pueden obtenerse fácilmente a través de esta organización. Esta línea celular corresponde a la clasificación CCL-2 de la ATCC de *Homo sapiens*, son células con morfología epitelial aisladas de adenocarcinoma de cervix y de crecimiento adherente.

Las células fueron cultivadas en condiciones óptimas para su desarrollo, es decir; se mantuvieron a una temperatura de 37 °C, en una estufa de humedad controlada y se les proporcionó además una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Como medio de cultivo se empleó el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), y se adicionó con un suplemento de penicilina/estreptomicina y suero bovino fetal (SBF) al 10%.

El mantenimiento de esta línea celular de crecimiento adherente se llevó a cabo mediante la preparación de subcultivos o pases, aplicando el método de tripsinización. Dicho método permite disgregar las células mediante la acción de tripsina/EDTA (0.25/0.02%) una vez que se alcanza la confluencia y obtener así nuevos subcultivos destinados a la propagación de la línea celular. El cultivo se realizó utilizando material estéril desechable diseñado para cultivo celular.

Esta línea celular fue amplificada para obtener un número apropiado de subcultivos destinados a ser preservados como lotes de seguridad. Para ello se tripsinizaron y resuspendieron en DMEM suplementado con 20% de SBF y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotector. Una vez resuspendidas, se repartieron en viales para crioconservación y fueron congeladas a - 80 °C en una cámara de congelación controlada. Transcurridas 24 horas, se dispusieron para su conservación en nitrógeno líquido.

2.3 Estandarización de la transfección con vectores plasmídicos

Las células donde se llevaron a cabo las pruebas de terapia combinada se transfectaron mediante lipofección (FuGene), sin embargo, previo a estos ensayos fue necesario optimizar las condiciones de la transfección con un vector conocido que porta un gen reportero, en este caso se utilizó el plásmido pBud lac Z/CAT. Las células transfectadas con este vector se tornan de color azul en presencia de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal).

Mediante estos ensayos se determinó la proporción de reactivos y cantidad de DNA óptima para tener una transfección de al menos el 50% de las células a tratar.

2.3.1 Preparación del plásmido

A partir de una cepa de *E.coli* transformada con pBud lac Z/CAT conservada en congelación se preparó un cultivo de 24 h en 50 ml de LB/amp para llevar a cabo la extracción y purificación del plásmido, siguiendo la técnica de maxi-preparaciones (46).

La presencia del plásmido en la solución obtenida se confirmó por electroforesis en gel de agarosa y se evaluó su calidad y concentración por espectrofotometría UV.

Se preparó 1 ml de una solución a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en agua estéril y el resto del DNA se dividió en varias porciones las cuales se etiquetaron y conservaron en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.2 Preparación de la mezcla de transfección

La mezcla de transfección contiene el reactivo FuGENE, que es una mezcla de lípidos y otros componentes en etanol al 80%, diluido en el medio de cultivo sin suero y el DNA con el que se desean preparar los liposomas.

Se preparó en diferentes proporciones de reactivo de transfección FuGENE a DNA plasmídico (3:1, 3:2, 6:1), como se muestra en la tabla 2.3.

Tabla 2.3. Diferentes proporciones de los componentes para preparar la mezcla de transfección

Proporción	Medio libre de suero (μl)	Reactivo FuGENE (μl)	pBud lac Z/CAT (μg)
3:1	97	3	1
3:2	97	3	2
6:1	94	6	1

Para la preparación de la mezcla de transfección se diluyó el reactivo en el medio libre de suero, teniendo precaución de depositarlo sobre el medio y no tocar las paredes del tubo, se agitó en el vortex por 10 segundos y se centrifugó antes de abrirlo de nuevo. Se dejó reposar 5 min y finalmente se adicionó el volumen correspondiente de pBud lac Z/CAT, se agitó y centrifugó nuevamente. Se dejó reposar 10 min antes de adicionarlo a las células a transfectar.

2.3.3 Preparación de las células

Se preparó una placa de 96 pozos con 5×10^4 células por pozo, y se incubó en las condiciones adecuadas para su desarrollo por 24 h, tiempo necesario para alcanzar una confluencia celular entre 80 y 90%.

2.3.4 Ensayo de transfección

Para llevar a cabo el ensayo de transfección se dejó una línea de pozos con células sin transfectar, la cual se utilizó como control. A cada una de las

siguientes tres filas, se les adicionaron 5 μ l en cada pozo de las diferentes proporciones de la mezcla de transfección. Se agitó suavemente la placa y se volvió a llevar a incubar para observar a las 24 h y determinar la eficiencia de transfección mediante tinción histoquímica. Se contó un total de cien células determinando el porcentaje de células con coloración azul.

2.3.5 Tinción histoquímica

Se eliminó el contenido de los pocillos y se lavaron con buffer de fosfatos (PBS) 1 X dos veces. Se les agregaron 200 μ l de solución fijadora (formaldehído al 2% en PBS 1 X) y se dejó reposar 3 min. Se lavaron nuevamente con PBS 1 X y se les adicionaron 50 μ l de solución de tinción, cuya composición se presenta en la tabla 2.4.

La placa se llevó nuevamente a incubar por 24 h y posteriormente se lavó tres veces con PBS 1X, dejando un poco de solución en los pocillos en el tercer lavado para impedir que la preparación se secase.

Se llevó al microscopio para observar y determinar la proporción de reactivos y DNA a utilizar en el resto de los ensayos.

Tabla 2.4. Composición de la solución de tinción.

Componente	Concentración
Ferricianuro de potasio	5mM
Ferrocianuro de potasio	5mM
Cloruro de magnesio	2mM
X-Gal	1 mg/ml
PBS	1X

En los ensayos que se realizaron con el fin de evaluar el efecto de la proteína F sobre la citotoxicidad de la vincristina en células HeLa se realizó el procedimiento descrito anteriormente para la preparación del plásmido y de la mezcla de transfección. El plásmido pCI-F fue aislado y purificado a partir de una cepa de *E.coli* HB 101 con pCI-F conservada en congelación y la mezcla de transfección se realizó añadiendo los reactivos en la proporción con la que se obtuvieron los mejores resultados en la estandarización.

2.4 Determinación de la DL₅₀ de vincristina

2.4.1 Preparación de la solución de vincristina

Se utilizó sulfato de vincristina para preparar las soluciones del fármaco que se administraron a las células. Se prepararon 5 ml de una solución *stock* a una concentración de 10 ng/μl. A partir de aquí se realizaron las diluciones

necesarias para que el volumen adicionado a las placas o a los pozos fuera el adecuado para adicionarlo con las micropipetas de 2, 20 ó 200 μl .

2.4.2 Ensayo para la determinación de DL_{50}

Para determinar la dosis letal media experimental se preparó media placa de 24 pozos (2 filas de 6 columnas) con 5×10^4 células por pozo y 500 μl de medio DMEM suplementado con SBF al 10% en cada uno, teniendo una columna con dos pozos para cada concentración de vincristina, se incubó por 24 h a 37 °C y 5% CO_2 para permitir que las células se adhiriesen a la placa.

La placa se retiró de la incubadora para exponer las células a la vincristina, para lo cual se reemplazó el medio con SBF por el medio con el fármaco a las diferentes concentraciones.

A los pozos de la primera columna no se les cambió el medio, ya que no se les adicionó fármaco porque sirvieron de control de cultivo. Para la preparación del medio con vincristina, se colocó 1 ml de medio en cada uno de 4 tubos Eppendorf y se les adicionaron 100 μl de SBF, finalmente se les adicionó el volumen correspondiente de vincristina diluída a 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ para obtener las concentraciones a probar, ver tabla 2.5.

Tabla 2.5. Preparación de medio con vincristina para la determinación de DL₅₀.

Volumen de Vincristina 1 ng/μl (μl)	Concentración (nM)
1.846	2
3.692	4
5.538	6
7.384	8

Se distribuyeron 500 μl de estos medios en cada uno de los dos pozos de cada columna y la placa se llevó a incubar por 24 h con el fármaco en las condiciones descritas anteriormente.

La determinación del número de células viables se llevó a cabo empleando el *Kit CellTiter 96 AQueous One Solution*, el cual es un método colorimétrico empleado en ensayos de proliferación o citotoxicidad. El reactivo contiene un compuesto de tetrazolio, el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) y un reactivo de acoplamiento de electrones, el etosulfato de fenacina (PES), el cual tiene una elevada estabilidad química que le permite combinarse con MTS y formar una solución estable. El compuesto de tetrazolio es bio-reducido por las células a un producto coloreado de formazán es soluble en el medio de cultivo (figura 2.3). Esta conversión es presumiblemente lograda por NADPH o NADH producidos por deshidrogenasas en las células metabólicamente activas. Las lecturas se determinaron a 490 nm en un lector de placas.

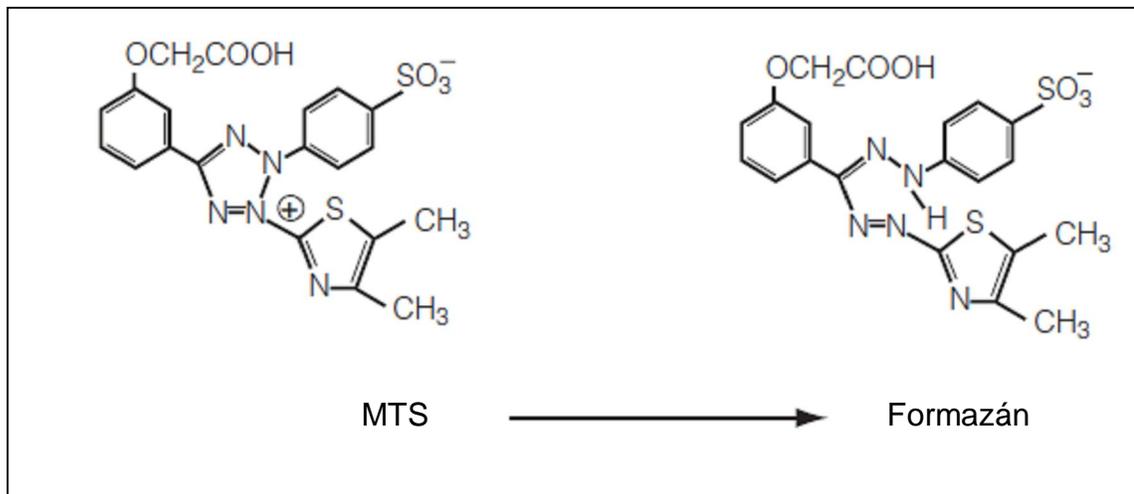


Figura 2.3 Reacción de reducción de sal de tetrazolio a formazán.

Para llevar a cabo la reacción de color se utilizó una placa de 96 pozos, en el primer pozo de la fila A se colocaron 100 μ l de medio de cultivo ya que es el pozo que el lector utiliza como blanco para ajustar el 100% de transmitancia y se le adicionaron 20 μ l del reactivo.

En la placa de 24 pozos se adicionaron 100 μ l del reactivo en cada uno con una pipeta multicanal. Se incubaron por una hora a 37°C en atmósfera húmeda y con 5% de CO₂. Se adicionaron 25 μ l de SDS al 10% para detener la reacción y para leer se transfirieron 100 μ l del producto de reacción de los pozos de la placa de 24 a la de 96, como se muestra en la figura 2.4 y protegiendo la placa de la luz se llevó al lector de placas a 490 nm.

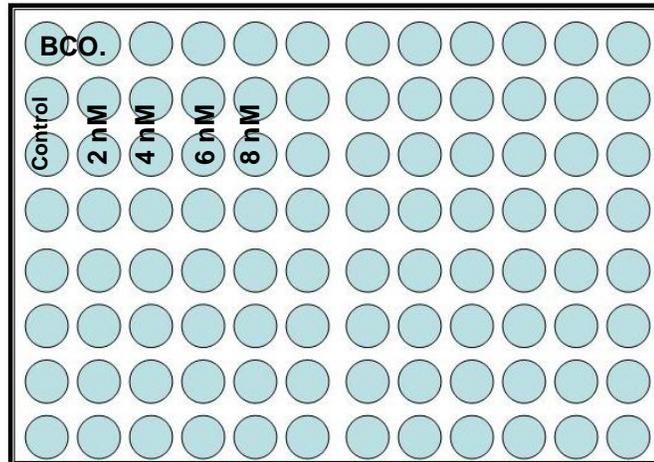


Figura 2.4. Esquema de una placa de 96 pozos donde se muestra la forma en que se dispusieron las muestras para la medición en el lector.

2.5 Desarrollo de una línea celular resistente a vincristina

Se desarrolló una línea celular de HeLa resistente a la vincristina para evaluar el efecto de la terapia combinada en células sin tratar y en células resistentes previamente tratadas con el fármaco antineoplásico.

Para este propósito se cultivaron las células en placas de cultivo de 10 cm de diámetro, conteniendo 10 ml de la suspensión celular y DMEM con antibiótico y antimicótico y SBF al 10%. Mediante microscopía se siguió su desarrollo, reemplazando medio agotado por medio fresco suplementado con SBF al 10% aproximadamente a las 72 h, previo lavado de las células en dos ocasiones con PBS 1X atemperado a 37°C. Una vez que se formó la monocapa de células, se adicionaron 50.76 μ l de vincristina a 1 ng/ μ l para obtener una concentración de 5 nM en el medio de cultivo. Se incubó por 24 h en las mismas condiciones y

posterior a la observación microscópica se retiró este medio, se lavaron las células en dos ocasiones con PBS 1X y en seguida se añadió medio sin fármaco. Se siguió su recuperación por microscopía y a las 72 h se tripsinizaron y se transfirieron en una proporción de 1:4 a una nueva placa. Se repitieron las etapas anteriores de exposición al fármaco, lavado de las células y adición de medio libre de fármaco dos veces más, tripsinizando antes de exponer a la siguiente concentración de fármaco. Las células se estuvieron exponiendo a dosis crecientes de vincristina, 10 nM y 20 nM.

Una vez que se concluyó el tratamiento anterior, las células se estuvieron manteniendo y exponiendo a vincristina 5 nM.

Adicionalmente se realizó un análisis microscópico de las células expuestas a la VC, para lo cual se prepararon placas de 16 pozos de paredes removibles (figura 2.5), conteniendo 100 μ l de medio con SBF al 10% y 1×10^4 células/pozo. Se siguió su desarrollo por microscopía y al alcanzarse una confluencia del 80 a 90% aproximadamente se adicionó la VC a 5, 10 y 20 nM. Se emplearon 2 pozos para cada tratamiento, dejando los primeros 2 como control de cultivo.



Figura 2.5. Placas Nalge Nunc de 16 pozos para cultivo celular. Foto ilustrativa, no corresponde al ensayo realizado.

A las 24 h de exposición al fármaco se retiró el medio contenido en los pocillos y se lavaron con PBS 1X. Se les agregaron 100 µl de paraformaldehído (PFA) al 3% en PBS 1X y se incubaron por 30 min. a temperatura ambiente. Se retiró el PFA y se lavaron tres veces con PBS 1X. Se separó la parte superior de la placa (paredes de los pozos) y se observó al microscopio en 20X.

2.6 Evaluación del efecto de la expresión de la proteína fusogénica de SV5 en la citotoxicidad de la vincristina

Para evaluar el efecto de la expresión de la proteína fusogénica F de SV5 sobre la citotoxicidad de la vincristina en células HeLa resistentes al fármaco se siguieron dos estrategias:

En la primera se prepararon tres placas de 96 pozos con células HeLa resistentes a la VC. En los pozos 1 al 3 de la fila A se adicionaron 100 µl de medio con SBF al 10% para posteriormente llevar el blanco de la reacción colorimétrica.

En los pozos del 1 al 9 de las filas B a la D se colocaron 5×10^4 células/pozo en 100 µl de medio con SBF al 10%. Se llevaron a incubar por 24 horas en las condiciones descritas anteriormente y posteriormente se realizó la transfección de los pozos de las filas C y D, adicionando 5 µl de solución de transfección, la

cual se preparó como se indica en la tabla 2.3 de estandarización de transfección en proporción 3:1, empleando pCI para la fila C y pCI-F para la D.

Se colocaron en la incubadora y a las 24 h post-transfección se retiró una de las placas para adicionar el fármaco; a los pozos 1 al 3 de las tres filas se les adicionó VC 5 nM, del 4 al 6 VC 2 nM y del 7 al 9 no se les adicionó el fármaco.

Se llevó nuevamente a incubar con el medicamento por 24 h y después de este tiempo se evaluó la viabilidad mediante una reacción colorimétrica empleando el *kit Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* como se indicó en la determinación de dosis letal media para la placa de 96 pozos.

A las 48 h post-transfección se retiró la segunda placa de la incubadora para realizar la adición del fármaco y se trató igual que la anterior y a la última placa se le adicionó la VC a las 72 h post-transfección recibiendo el mismo tratamiento que las primeras dos placas.

Para llevar a cabo la segunda estrategia se prepararon placas de cultivo de 96 pozos, de base blanca opaca con tapa incolora y transparente, especiales para medir fluorescencia, con 1×10^4 células/pozo.

La citotoxicidad se evaluó mediante una determinación fluorométrica empleando el *kit CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay*. Este ensayo mide la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) que se libera a través de la

membrana de las células dañadas. La LDH cataliza la oxidación del lactato a piruvato produciéndose NADH, el cual participa en la conversión de resazurina a resorufina en presencia de la diaforasa (figura 2.6).

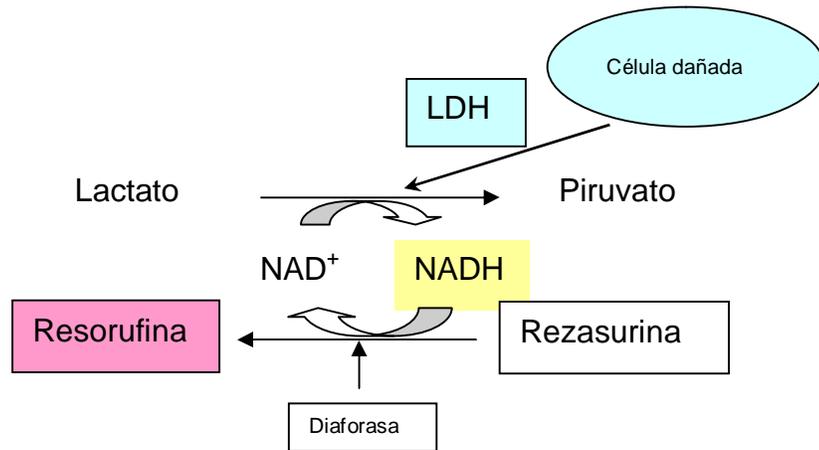


Figura 2.6. Esquema en el que se muestra el fundamento de la determinación de la lactato deshidrogenasa para evaluar la citotoxicidad.

La resorufina producida es proporcional a la cantidad de LDH presente en el sobrenadante. Este compuesto se cuantifica mediante fluorimetría ya que tiene una longitud de onda de excitación a 560 nm y una longitud de onda de emisión a 590 nm.

Las placas se prepararon y trataron igual que las de la primera estrategia, sólo que también se depositaron células en los pozos 10 al 12 de la fila B para llevar un control de 100% de células dañadas como control positivo, las cuales se lisaron al final del período de incubación previo a la reacción de cuantificación de la LDH.

Para llevar a cabo la reacción no es necesario separar el sobrenadante de las células, por lo cual sólo se retiró la placa de la incubadora y se dejó a temperatura ambiente por 30 min para que alcanzara una temperatura de 22 °C.

A los pozos del 10 al 12 de la fila B se les adicionaron 2 µl de solución de lisis (control positivo). Posteriormente a todos los pozos se les añadieron 100 µl del reactivo *CytoTox-ONE* con una pipeta multicanal, se agitaron por 30 segundos en un agitador oscilatorio y después se dejaron por 10 minutos en incubación a 22 °C, en seguida se les agregaron 50 µl de la solución de interrupción en el mismo orden en que se depositó el reactivo a los pozos, se agitó la placa por 10 segundos y se protegió de la luz para finalmente registrar las lecturas en un fluorómetro con una longitud de onda de excitación a 560 nm y una longitud de onda de emisión a 590 nm.

El ensayo se repitió tres veces, realizando cada uno por triplicado.

2.7 Evaluación del daño en el núcleo celular por la combinación de la proteína F con vincristina

Para evaluar el daño en el núcleo celular por la combinación de la proteína F con la vincristina se preparó una placa de 16 pozos con 1×10^4 células por pozo en 100 µl de medio con SBF 10%, empleando la línea celular de HeLa

resistente a vincristina, y otra placa con células HeLa que no se habían expuesto previamente al medicamento. Estas placas son especiales para llevar a cabo la observación microscópica de las células tratadas, ya que al final del tratamiento, fijación e inmunodetección se pueden separar las paredes de los pozos del fondo de la placa y quedar un portaobjetos con las células.

Ambas placas se llevaron a incubar por 24 h a 37 °C, con 5% CO₂ y atmósfera húmeda. Después de este tiempo se retiraron las placas de la incubadora para llevar a cabo la transfección. En ambas placas no se transfectaron las primeras cuatro filas de dos pozos para llevar los controles de cultivo en la primera fila, y los controles de células expuestas solamente al medicamento a concentraciones de 5, 10 y 20 nM en las otras tres. El resto de las filas se transfectaron adicionando 5 µl de solución de transfección, la cual se preparó como se indica en la tabla 2.3 de estandarización de transfección en proporción 3:1, empleando pCI-F, y se llevó a incubar en las condiciones descritas anteriormente por 24 h más.

A las 24 h post-transfección se adicionó el fármaco, para lo cual se retiró el medio de los pozos, excepto el de las filas 1 y 5, que son controles sin medicamento. Se lavaron dos veces con PBS 1X y se adicionaron 100 µl de DMEM con SBF al 10% y fármaco a la concentración correspondiente.

Para la preparación del medio con suero y fármaco, en un tubo estéril de 5 ml se colocaron 4 ml de DMEM y 400 μ l de SBF 10% y se mezclaron, posteriormente se distribuyeron en tres tubos eppendorf y se adicionó el fármaco para finalmente transferir 100 μ l de estas soluciones a las filas correspondientes como se muestra en la tabla 2.6.

Tabla 2.6. Preparación del medio de cultivo con fármaco y distribución en la placa de 16 pozos.

Tubo	Medio con SBF (μl)	VC 1 ng/μl (μl)	Filas a las que se transfiere
1	995	4.62	2 y 6
2	991	9.24	3 y 7
3	982	18.46	4 y 8

Las placas se incubaron por 24 h a 37 °C, 5% de CO₂ y atmósfera húmeda, finalmente se lavaron y fijaron con paraformaldehído al 3%.

2.7.1 Protocolo para Inmunoensayo (Actina/Yoduro de Propidio)

2.7.1.1 Fijación del cultivo

Se retiró el medio contenido en los pocillos y se lavaron con PBS 1X. Se les agregaron 100 μ l de paraformaldehído (PFA) al 3% en PBS 1X y se incubaron

por 30 min a temperatura ambiente. Se retiró el PFA y se lavaron tres veces con PBS 1X. Se les añadieron 50 μ l de tritón 100X 0.05% y se dejó por 10 min, finalmente se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 3% en PBS 1X por 30 min.

2.7.1.2 Inmunodetección

Se adicionaron 50 μ l de anticuerpo de conejo anti-actina a una dilución 1:100 en BSA 3% y se incubaron por espacio de una hora a 37 °C. Se lavaron tres veces con PBS 1X/BSA 3% durante 10 min. Se agregaron 50 μ l del anticuerpo secundario (Alexa flúor 488) diluído 1:75 en BSA 3% y se incubaron por 1 h a 37 °C. Se realizaron tres lavados de 5 min cada uno con PBS 1X.

2.7.1.3 Tinción con yoduro de propidio (IP)

Las células se trataron con RNasa A a 10 mg/ml durante 10 min, posteriormente se trataron durante 15 min a 37 °C con una solución de IP (10 ml de tritón 100X al 0.1 % en PBS, con 2 mg RNasa A libre de DNasa y 200 μ l de IP 1 mg/ml), retirar las paredes de los pozos y observar la preparación en microscopio de fluorescencia en 40X.

2.8 Evaluación del efecto de la expresión de la proteína F de SV5 y vincristina sobre la expresión de genes relacionados con muerte celular programada

Para evaluar este efecto se empleó la técnica de PCR en tiempo real. Como indicador molecular de la efectividad del tratamiento, se dio seguimiento a la expresión de la Caspasa 3 (C3) tanto en las células tratadas como en las células empleadas como controles.

El gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPD) se utilizó como gen de referencia.

Se preparó una placa de 96 pozos con células HeLa resistentes a VC. Se colocaron 5×10^4 células/pozo en 100 μ l de medio con SBF al 10% en los pozos del 1 al 9 de las filas A a la C. Se llevaron a incubar por 24 horas en atmósfera húmeda a 37 °C y 5% CO₂ y posteriormente se realizó la transfección de los pozos de las filas B y C, adicionando 5 μ l de solución de transfección, la cual se preparó como se indica en la tabla 2.3 de estandarización de transfección en proporción 3:1, empleando pCI para la fila B y pCI-F para la C.

La placa se incubó por 24 h más en las mismas condiciones, y después de este período se adicionó el fármaco a las células; a los pozos 1 al 3 de las tres filas se les adicionó VC 5 nM, del 4 al 6 VC 2 nM y del 7 al 9 no se les adicionó el

fármaco. Se incubó con el medicamento por 24 h y finalmente se llevó a cabo la extracción de RNA siguiendo el método del *TriPure Isolation Reagent*. A cada pocillo se le añadieron 100 μ l de *TriPure* y se mezcló con la micropipeta, el contenido de los pocillos se transfirió a tubos Eppendorf de 0.2 ml y se les agregaron 20 μ l de cloroformo, se agitaron en el vortex y se centrifugaron a 8000 rpm por 5 min.

La fase acuosa se transfirió a otro tubo, se le adicionó un volumen igual de isopropanol a 4 °C y se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. Se retiró el sobrenadante y al precipitado obtenido se le efectuaron tres lavados, adicionando 50 μ l de etanol al 75%, agitando en el vortex y centrifugando en cada uno de ellos.

Los tubos se dejaron destapados cerca del mechero para facilitar su secado y una vez que se logró esto, se resuspendió el precipitado en 50 μ l de agua mQ estéril libre de RNasas.

Se determinó su calidad y concentración mediante espectrofotometría UV y se conservaron a -20 °C en tanto se realizaban los análisis por qPCR.

Para llevar a cabo la cuantificación de la expresión génica se utilizó un termociclador en tiempo real (LightCycler® modelo 2.0 IVD con versión del *software* 4.1) con rotor para capilares de 20 μ l.

Para la retrotranscripción se utilizó el *kit Transcriptor Reverse Transcriptase* y para la detección por PCR cuantitativa, sondas *LightCycler DNA TaqMan Master*. Además, para la cuantificación también se utilizó el *kit AccessQuick* suplementado con *SYBR-Green I* al 1X, con el fin de comparar los resultados por ambos métodos.

Se utilizaron curvas de disociación para caracterizar el amplicón obtenido. En la tabla 2.7 se describen las componentes de la mezcla de reacción y las secuencias de los primers utilizados, y en la 2.8 las condiciones para la retrotranscripción acoplada a qPCR.

La cuantificación relativa de los transcritos fue obtenida a través del método comparativo C_P (48). Los resultados fueron normalizados a la expresión de GAPD. Las diferencias relativas se determinaron comparando cada grupo de tratamiento contra el control de cultivo.

Se hicieron cinco diluciones seriales 1:10 de una muestra control y se realizó una curva de estándares para determinar la eficiencia, a fin de corregir el cálculo de la expresión génica.

Tabla 2.7. Componentes de la mezcla de reacción y secuencias de primers para retrotranscripción acoplada a qPCR.

Componente	Volumen (μ l)	Concentración Final
AccessQuick™ Master Mix (2X)	10.0	1X
Mezcla de iniciadores ^a (5 μ M)	0.8	0.2 μ M
SYBR-Green I (100X)	0.2	1X
Muestra de RNA (1 μ g)	Variable	
Enzima AMV 5 U/ μ l	0.5	
Agua libre de nucleasas	completar a 20	
^a Primers SV5Fup: 5'-AAGAATTCATGGGTACTATAATTCAATTTCTG-3' SV5Fdown: 5'-AAGGTACCTCTTGTTC CAAGAGTTGCAG-3' C3 up: 5'-CTGGTTTTCGGTGGGTGT-3' C3 down: 5'-CACTGAGTTTT CAGTGTTCCTCCA-3' C3 Sonda: 6FAM-CTCTTCCCCATTCTCATTA--BBQ GAPD up: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' GAPD down: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'		

Tabla 2.8. Condiciones para la retrotranscripción acoplada a qPCR.

No. de ciclos	Temperatura/Tiempo
1	45 °C/ 20 min
1	95 °C/ 2 min
45 ciclos	95 °C/ 15 s
	60 °C/ 15 s
	72 °C/ 15 s
<i>Melting</i>	95 °C/ 0 s
	60 °C / 30 s
Lectura continua	95 °C / 0 s

La fórmula utilizada es la descrita por Pffalf en 2001(49):

$$\text{Radio Normalizado} = E_I^{\text{Cpl}(C)-\text{Cpl}(M)} \times E_R^{\text{CpR}(M)-\text{CpR}(C)}$$

Donde:

EI: Eficiencia del gen de interés.

ER: Eficiencia del gen de referencia.

Cpl: Punto de cruce del gen de interés.

CpR: Punto de cruce del gen de referencia

C: Calibrador.

M: Muestra desconocida.

2.9 Análisis Estadístico

Se aplicó estadística descriptiva, la prueba t de Student, ANOVA y la Prueba de Comparación Múltiple de Medias de Duncan para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa entre los resultados, utilizando el Programa SPSS v.11.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Construcción del vector de expresión

3.1.1 Amplificación del cDNA de la proteína fusogénica (F)

Se aisló el plásmido pACC-F a partir del cultivo de la cepa de *E. coli* transformada con éste y se caracterizó mediante una electroforesis en gel de agarosa. Se obtuvo una banda de aproximadamente 10.6 kb, ligeramente por arriba de la banda de mayor tamaño del marcador N3232, que indica 10 kb, la cual corresponde al tamaño de pACC-F. El fragmento correspondiente al gen codificante para la glicoproteína fusogénica F se liberó mediante reacciones de restricción y se ligó en el vector de expresión, el plásmido pCI.

El vector recombinante (pCI-F) también se caracterizó mediante electroforesis en gel de agarosa. En el carril donde se aplicó el producto de la ligación se observó la presencia de una banda que se encuentra aproximadamente a 6 kb, que concuerda con el peso de pCI-F (5.8 kb), en el carril donde se colocó el plásmido solo se obtuvo una banda a 4 kb la cual concuerda con el peso del pCI (figura 3.1).

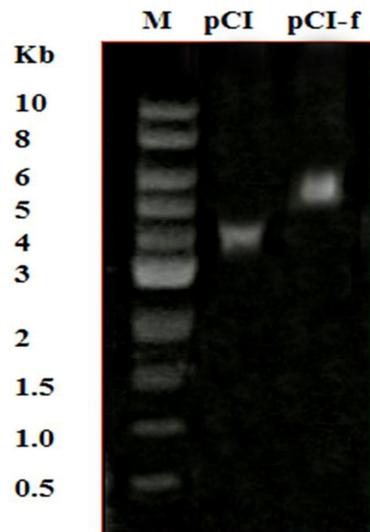


Figura 3.1 Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TBE 0.5 X. De izq. a der., carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 plásmido pCI, carril 3 plásmido pCI-F.

Las glicoproteínas fusogénicas de membrana de virus han sido investigadas como nuevas herramientas para promover la muerte de células tumorales a través de la fusión célula-célula. Por ejemplo, cepas de adenovirus oncolíticos (45, 51, 52), virus de estomatitis vesicular (53), y virus del herpes simplex 1 (51) que han sido modificados por ingeniería genética para expresar glicoproteínas fusogénicas de membrana virales mostraron un aumento de la eficacia oncolítica en cultivo de tejidos y en un sistema modelo en roedores. Además, la expresión de estas proteínas por vectores virales en combinación con tratamientos de quimioterapia puede tener efectos sinérgicos oncolíticos en modelos de cáncer de colon y de páncreas (51 y 52).

La proteína de fusión F del paramyxovirus es una excelente candidata como una glicoproteína fusogénica de membrana ya que la fusión célula-célula ocurre eficientemente a pH neutro, a diferencia de lo que ocurre con otras

glicoproteínas fusogénicas que requieren un pH menor a 6 para provocar la fusión y ser citotóxicas, como la proteína G del rhabdovirus de la estomatitis vesicular (VSV-G) estudiada por Bateman y colaboradores en el 2000 (54).

La fusión ocasionada por la proteína F del paramyxovirus SV5 es catalizada por una sola proteína con una estructura relativamente simple, a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de los paramyxovirus que requieren la coexpresión de las glicoproteínas F y HN para que se produzca la fusión de membranas. La actividad de fusión de F es controlada por rompimiento proteolítico, además que promueve la fusión de una célula infectada que está expresando la proteína F en la superficie celular con una célula vecina, resultando en un sincitio multinucleado (39, 55, 56).

3.1.2 Clonación molecular del inserto en el plásmido pCI

El producto de la ligación del pCI con el fragmento correspondiente al cDNA de la proteína F, se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* HB 101.

En la placa de LB donde se inoculó el control positivo, se observaron incontables colonias pequeñas, redondas, blancas y húmedas características de *E. coli*; en la del control negativo, LB con ampicilina, no hubo desarrollo de colonias.

En las placas de agar LB con ampicilina inoculadas con la cepa de *E. coli* transformada con el producto de la ligación, se obtuvieron colonias pequeñas, redondas, blancas y húmedas, lo que indica que la transformación fue exitosa ya que la incorporación del plásmido les permite desarrollarse en presencia del antibiótico. Las colonias que crecieron en las diferentes placas se sembraron y ordenaron en otra placa de agar LB/amp para realizar el análisis correspondiente a la comprobación de la transformación (figura 3.2).



Figura 3.2 Izq. Colonias de *E. coli* HB 101 transformadas con pCI-F creciendo en agar LB/amp 50 μ g/ml. Der. Se muestran las colonias después de haber sido ordenadas en el mismo medio para su análisis posterior.

La clonación del gen codificante de la glicoproteína fusogénica F se llevó a cabo en el plásmido pCI, el cual posee el origen de replicación derivado del plásmido *Col* E1, y el del fago filamentoso f1, lo que le permite replicarse en *E. coli*. Precediendo al sitio de policlonaje contiene la secuencia del promotor de la RNA polimerasa del fago T7, lo que permite la expresión de las proteínas codificadas por los genes insertados en esta región. El plásmido porta el marcador de selección de resistencia a ampicilina para identificar las células transformadas. De esta manera el plásmido puede ser conservado y amplificado cuando así se requiera en *E. coli*.

Además contiene el promotor del citomegalovirus precediendo al sitio de policlonaaje. Este es un promotor constitutivo, por lo que la expresión de la proteína recombinante en células eucariotas ocurre desde que el vector es incorporado por la célula, siendo esto una ventaja sobre los promotores inducibles, en los que se requiere la adición de un análogo estructural del sustrato sobre el que actúan las proteínas codificadas por los genes regulados por el promotor en el sistema nativo para que se dé la expresión.

3.1.3 Comprobación de la clonación

En la figura 3.3 aparecen las bandas correspondientes a los plásmidos aislados de las primeras 24 clonas transformadas que fueron analizadas para comprobar la presencia del pCI-F.



Figura 3.3 Patrón de bandas obtenido en las clonas analizadas, en el primer y último carril se colocó el marcador de peso molecular y del segundo carril en adelante aparecen los DNAs extraídos de las clonas 1 a la 24.

Aunque todos los cultivos utilizados para aislar el plásmido provenían de las colonias obtenidas de la transformación con pCl-F, no todas presentaron el mismo patrón de bandas, esto puede deberse a las diferentes conformaciones del plásmido, además de que el DNA del plásmido es circular y superenrollado y las bandas del marcador son de fragmentos de DNA lineal. Debido a que es posible que la posición de las bandas en la muestra no coincidan con el tamaño correspondiente del marcador, el plásmido aislado de cada clona se caracterizó mediante la amplificación del inserto por PCR y posteriormente mediante el patrón de restricción empleando Eco RI y Kpn I.

El producto amplificado mediante PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, y se observó que en todas las clonas se encuentra la secuencia correspondiente al cDNA que codifica para la proteína F, los segmentos amplificados son de aprox. 1.8 kb tal como corresponde a la banda esperada con la pareja de primers SV5up/SV5down (figura 3.4).

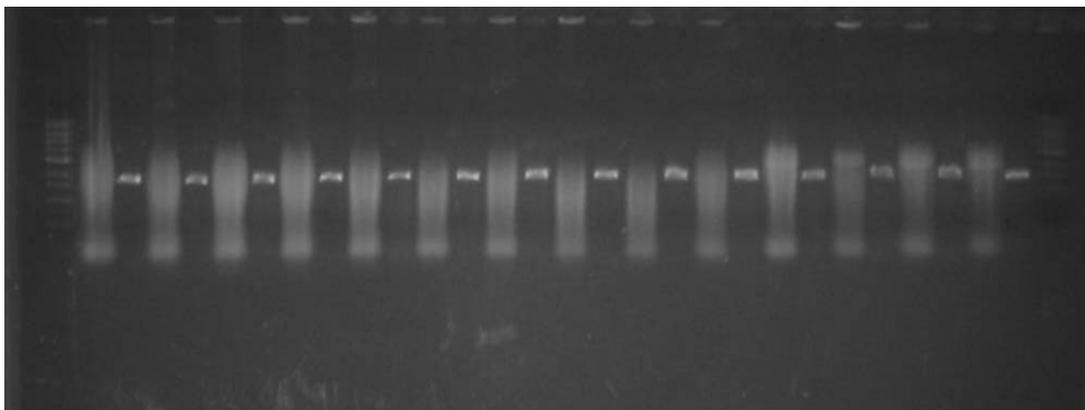


Fig. 3.4. Confirmación del cDNA codificante para F en los plásmidos extraídos mediante electroforesis en gel de agarosa. En el primer y último carril se colocó el marcador de peso molecular, en los carriles pares del 2 al 28 el DNA aislado correspondiente a las clonas de la 1 a la 14 y en los carriles nones del 3 al 29 se aplicó el producto de PCR de cada una de las clonas anteriores.

3.2 Estandarización de la transfección con vectores

plasmídicos

El desarrollo de nuevos vectores o métodos de transferencia de genes para los distintos tipos de terapia génica ha supuesto un gran esfuerzo en investigación. Los vectores empleados en los distintos trabajos, retrovirus, adenovirus y plásmidos-liposomas, transfieren el genoma de manera distinta y presentan ventajas y desventajas según las distintas aplicaciones.

Los vectores víricos son ampliamente utilizados ya que ofrecen muchas ventajas intrínsecas, como la unión y entrada específica a la célula, capacidad para prevenir su degradación intracelular y eficiencia de llevar el transgen hasta el núcleo de la célula, además que se logran eficiencias de transformación más elevadas que mediante vectores no virales, sin embargo, presentan algunas desventajas por las cuales en ocasiones se recurre a vectores no virales para transportar el material genético a las células a transfectar (27, 57).

Los retrovirus tienen dos limitaciones principales, por un lado, sólo pueden transportar genes de un tamaño que llega a 7-9 kb, y por otro sólo infectan células en división; por lo general se utilizan en el transporte de material genético *ex vivo*.

Los adenovirus son los segundos vectores víricos más utilizados, tienen la capacidad de transportar la misma cantidad de DNA que los retrovirus, 7.5 kb, pero poseen ciertas ventajas. Pueden infectar células que no están en división, se pueden producir en gran número y su material genético permanece epicromosomal, por lo que la posibilidad de producir mutagénesis insercional se reduce. Sin embargo, también presenta algunas desventajas, cuando se introducen *in vivo*, pueden infectar todas las células, incluyendo las germinales, lo cual es un problema ya que puede afectar a las generaciones siguientes. Pueden producir infecciones posteriores y evocar una respuesta inmunológica, lo cual reduce el tiempo disponible para la expresión del gen e impide la readministración.

Los complejos liposoma-plásmidos, o vesículas lipídicas, son membranas lipídicas a las que se asocia el material genético en forma de plásmidos. Estos complejos se combinan rápidamente con las membranas celulares y se han utilizado para el transporte de genes. Como vectores génicos presentan una serie de ventajas, ya que pueden ser utilizados para transportar genes de tamaño ilimitado, no pueden replicarse o recombinarse para formar un agente infeccioso y no provocan ninguna respuesta inmunitaria o inflamatoria porque carecen de proteínas (57). La desventaja que presentan es la baja eficiencia de tranfección en comparación con los virus como vectores, pero a pesar de ello son útiles ya que pueden transfectar una gran variedad de células, a diferencia de los virus, que por su limitado tropismo no pueden emplearse en todos los

tipos de células. Así mismo, evita la acumulación de proteínas víricas no asociadas al promotor, como suele ocurrir con los vectores adenovirales.

En esta investigación el gen codificante de la glicoproteína fusogénica del paramyxovirus SV5 se clonó en un vector plasmídico, este DNAr se combinó con una mezcla de lípidos (FuGENE) para la obtención de liposomas los cuales fueron empleados para llevar a cabo la transfección de la línea celular.

Después de 24 h de la transfección se contaron al microscopio 100 células en cada pozo determinando la proporción de células teñidas de color azul con X-Gal (tabla 3.1).

Tabla 3.1 .Porcentaje de transfección obtenido con las diferentes proporciones de Fu:GENE:DNA empleadas en la estandarización.

Proporción de FuGENE:DNA	% de células teñidas con X-Gal
3:1	95
3:2	95
6:1	97

Como se puede observar se obtuvieron las mismas eficiencias de transformación con las proporciones de 3:1 y 3:2, y con la adición del FuGENE en mayor proporción no se logró incrementar de manera significativa la eficiencia de transfección, por lo que en los experimentos con pCI-F se empleó la menor proporción de FuGENE:DNA.

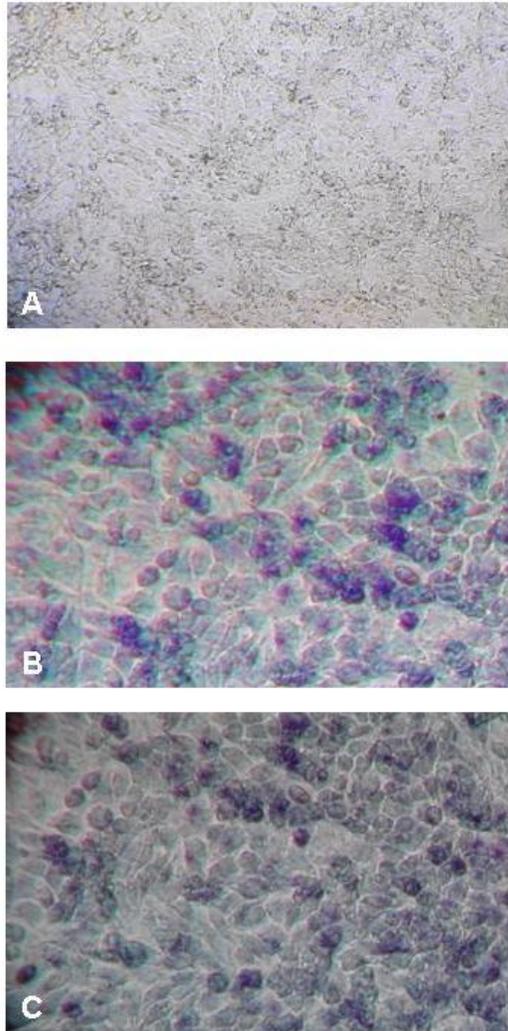


Figura 3.5. Fotomicrografías de la transfección de células HeLa con el plásmido de referencia (pBud lac Z/CAT) después de tinción con X-gal. A. Control de transfección, células HeLa sin transfectar (10X), B. Células HeLa transfectadas con FuGENE:DNA en proporción 3:1, (25X) y C. Células HeLa transfectadas con FuGENE:DNA en proporción 6:1, (25X).

En la figura 3.5 se puede observar que no hay presencia de células teñidas de azul en el control de transfección y el elevado porcentaje de células transformadas, teñidas de azul, en un campo microscópico de células HeLa transfectadas con dos diferentes proporciones de FuGENE:DNA.

3.3 Determinación de DL₅₀ de vincristina

Debido a que la reducción de la sal de tetrazolio es llevada a cabo por el NADPH y/o NADH producidos por las deshidrogenasas de las células metabólicamente activas, el control de cultivo (células HeLa que no se expusieron al fármaco) presenta absorbancias mayores con respecto a las células tratadas, ya que su actividad metabólica no se vió alterada. En las células tratadas con el fármaco se observó una disminución en la absorbancia a medida que se incrementaba la concentración de VC añadida. En la tabla 3.2 se presentan los promedios de las absorbancias obtenidas, así como los porcentajes de células vivas (viabilidad) y el de citotoxicidad. El primero se calculó comparando las absorbancias obtenidas en los tratamientos con respecto a la obtenida en el control de cultivo, asignándole a este cultivo el 100 % de viabilidad. El porcentaje de citotoxicidad se estimó por diferencia respecto al de las células vivas.

La DL₅₀ calculada con la ecuación de la línea de tendencia de la gráfica obtenida (figura 3.6) es de 8.9 nM, algo por debajo de lo informado en el Vademécum (47), en el que se reporta que *in vitro* se logra reducir el 50% de células a una concentración de VC de 10 nM en un período de tiempo entre 6 y 12 horas.

Sin embargo, es necesario considerar que las condiciones del ensayo y el método empleado para la cuantificación de células vivas pueden no ser los

mismos que los establecidos para el presente estudio, ya que no se especifican en la literatura. Además de que cada línea celular puede responder de forma diferente ante un estímulo, la vincristina en este caso, y el valor reportado de la DL₅₀ en la literatura es en líneas celulares de linfoma o leucemia, mientras que en este estudio se usó una línea celular epitelial aislada de adenocarcinoma de cervix (ATCC CCL-2).

Tabla 3.2. Promedios de absorbancias obtenidos del tratamiento de células HeLa con VC a diferentes concentraciones, para determinar su DL₅₀.

Concentración de VC (nM)	A	% Viabilidad	% Citotoxicidad
0	1.001	100	0
2	0.813	81.26	18.74
4	0.923	92.25	7.75
6	0.569	56.82	43.18
8	0.536	53.57	46.43

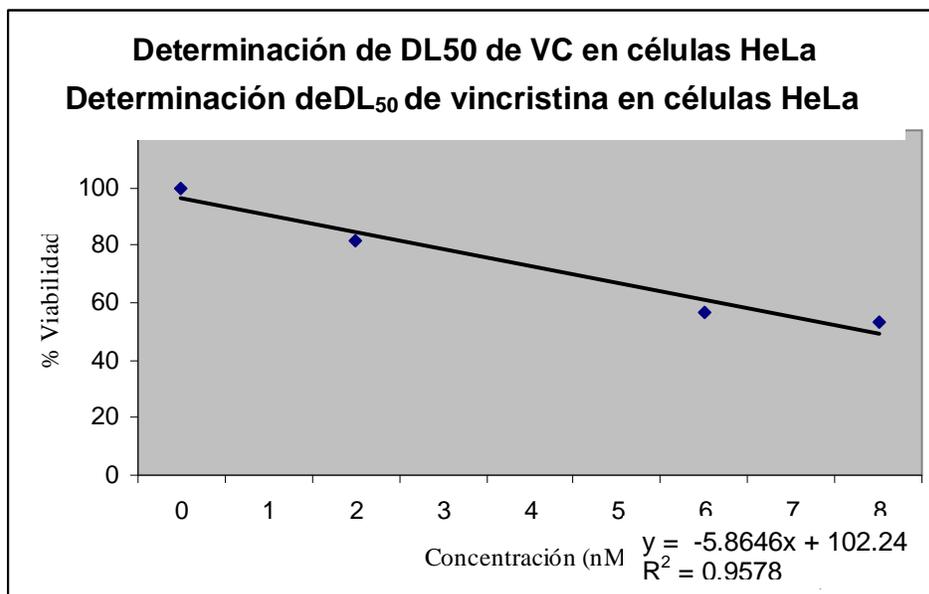


Figura 3.6. Gráfica para determinar la DL₅₀ de la vincristina en células HeLa.

3.4 Desarrollo de una línea celular resistente a vincristina

Debido a que las células tumorales tienen la capacidad, natural o adquirida de ser resistentes a fármacos, se desarrolló una línea de células HeLa resistente a la VC como modelo de estudio para evaluar el efecto de la glicoproteína fusogénica sobre la citotoxicidad de la vincristina.

Los resultados obtenidos tendrán mayor valor, ya que podremos determinar si la expresión de la glicoproteína incrementa el efecto citotóxico del fármaco aun en células que no responden adecuadamente al fármaco.

Además, la línea celular resistente deriva de la misma línea celular empleada en el estudio del efecto de la expresión de la glicoproteína F sobre la citotoxicidad de la VC, de manera que las condiciones en las que se cultivaron y mantuvieron son las mismas y las diferencias en los resultados son atribuibles a la condición de resistencia y no a factores adicionales, lo que ocurriría si se trabajase con una línea celular resistente disponible comercialmente.

Se realizó un análisis microscópico de las células tratadas con VC el cual reveló claramente cambios en la morfología celular. Es evidente el efecto citotóxico del fármaco sobre las células que mueren, éstas adquieren progresivamente una forma redondeada, se tornan refringentes y paulatinamente pierden viabilidad y se van desprendiendo del fondo de la placa.

En contraste, las células que toleran la presencia de VC y que sobreviven, presentan claros cambios en su forma de distribución en monocapa sobre la superficie de cultivo. Los cambios morfológicos observados son múltiples y se detectan como afecciones celulares.

Las células presentan núcleos distribuidos regularmente, aunque éstos se observan dilatados. Además, se observa distensión y rarefacción del citoplasma, así como abundantes vacuolas. Los cambios en la morfología celular como respuesta a la resistencia a VC se pueden observar en la figura 3.7. Ninguna de estas alteraciones se presentó en las células control.

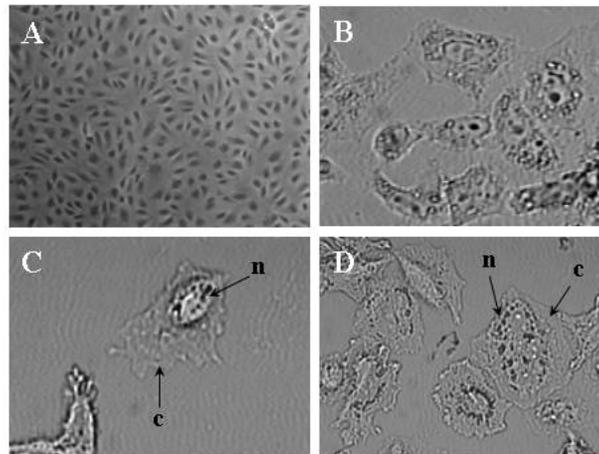


Figura 3.7. Imágenes de microscopía de los cambios morfológicos de células HeLa resistentes a VC. A. Células control en monocapa (10x). B-D. Células HeLa expuestas a 5, 10 y 20 nM de VC, respectivamente (40x). La posición del núcleo celular (n) y el citoplasma (c) se indican con flechas.

Los cambios morfológicos observados concuerdan con los reportados por Groth-Pedersen y colaboradores en 2007 (50) en un estudio en el que emplearon células de carcinoma de cervix (HeLa) y células de cáncer de mama

relativamente resistentes a VC (MCF-7) para estudiar las vías de muerte celular inducidas por la vincristina, aun que las técnicas empleadas para la observación microscópica y la concentración a la que se probó el fármaco fueron diferentes.

3.5 Evaluación del efecto de la expresión de la proteína fusogénica F de SV5 sobre la citotoxicidad de la vincristina

Como resultado de la expresión de la proteína de fusión F de SV5 se produce una desestabilización de la membrana citoplasmática. Para determinar la influencia de la expresión de F sobre la citotoxicidad de la vincristina se procedió a analizar la viabilidad celular determinando la biorreducción del MTS a formazán por las deshidrogenasas de las células metabólicamente activas transfectadas con pCI-F y expuestas al fármaco.

En las figuras 3.8 y 3.9 se muestran los resultados de la citotoxicidad de los distintos tratamientos, a diferentes tiempos y a las dos concentraciones de vincristina probadas.

En este ensayo cuando se administró la VC a una concentración de 2 nM a las 24 h post-transfección se obtuvo un 4.1 % de citotoxicidad; sin embargo, al incrementar la dosis a 5 nM, la citotoxicidad conseguida es mayor 4.2 veces, correspondiendo a un valor de 17.1 %, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Por el contrario, con la dosis de 2 nM adicionada a las 48 h después de la transfección la citotoxicidad se incrementó a 27.52%, un poco más de 7 veces el valor obtenido cuando fue administrada 24 h post-transfección, ligeramente por encima del valor obtenido con la VC 5 nM a este tiempo (22.79 %), después permaneció sin cambios importantes.

Se observó que independientemente de la dosis de VC administrada, a las 48 y 72 h post-transfección se presenta un comportamiento similar en cuanto a la disminución en la viabilidad celular.

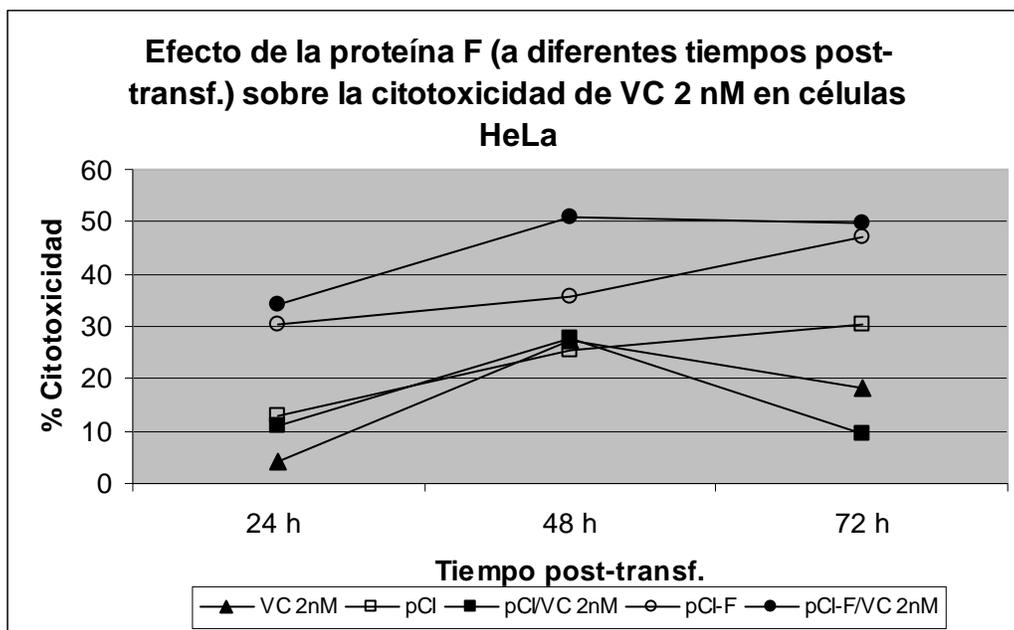


Figura 3.8. Gráfica que muestra el efecto de la expresión de F a 24, 48 y 72 horas post-transfección en la citotoxicidad de la vincristina a 2 nM sobre células HeLa.

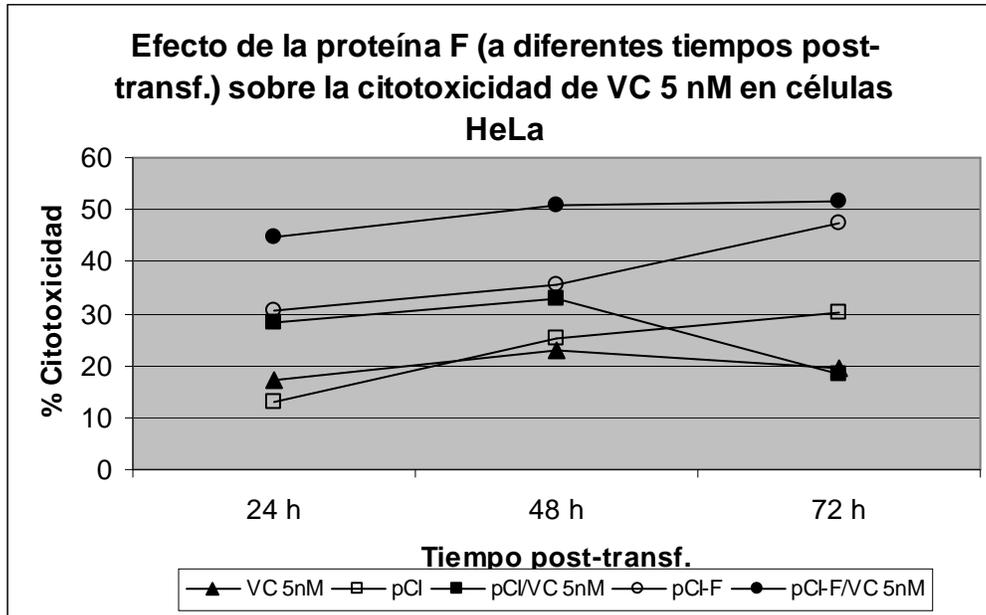


Figura 3.9. Gráfica que muestra el efecto de la expresión de F a 24, 48 y 72 horas post-transfección en la citotoxicidad de la vincristina a 5 nM sobre células HeLa.

Respecto a la presencia del plásmido en las células se observó que ejerce un efecto citotóxico que se incrementa con el tiempo post-transfección ya que se presentó una citotoxicidad de 13.01 % a las 24 h post-transfección y a las 72 h fue de 30.32 %.

La expresión de F provoca daño celular en las células transfectadas, ya que los porcentajes de citotoxicidad que presentan con respecto al plásmido sin el gen codificante para la proteína fusogénica son mayores. A las 24 h hay un 30.44 % de células dañadas en comparación de un 13.01 % de células dañadas con el plásmido sin el gen f. El porcentaje de células dañadas se eleva conforme pasa el tiempo de la transfección, la proteína F provoca la formación de poros en la membrana citoplasmática desestabilizándola y alterando el sistema fisiológico

celular, y aunque la célula aun está viva se manifiesta el daño celular desde las 24 h, llegando a un 47.8% de citotoxicidad a las 72 h, lo cual corresponde a un incremento superior al 50% respecto al valor obtenido a las 24 h.

Al analizar los resultados de citotoxicidad que presentan las células tratadas individualmente con el fármaco o con el pCI-F, así como los mostrados por las células que se trataron con ambos agentes tóxicos, se observa que la proteína F potencia el efecto de la VC, pero sólo hasta antes de las 72 h post-transfección, ya que a este tiempo los valores de viabilidad celular obtenidos son semejantes.

El efecto de la glicoproteína F sobre la citotoxicidad de la vincristina concuerda con un estudio realizado por Hoffman y Wildner en el 2006 (52) en donde evaluaron si la expresión de las glicoproteínas fusogénicas de membrana mejoraban la quimioterapia. En este estudio demostraron que la expresión de las glicoproteínas H y F del virus del sarampión *in vitro* en células de neoplasia pancreática en combinación con la gemcitabina intensifica significativamente los logros de la terapia, al ser comparados con las terapias individuales.

Es interesante considerar que la viabilidad celular en el tiempo máximo de exposición no parece presentar una diferencia estadísticamente significativa, lo cual puede ser atribuible a diversos factores, entre los cuales se puede destacar lo inherente al modelo celular empleado, el cual utiliza un determinado número de células, que si bien puede ser dinámico, no cuenta con un sistema de

eliminación de metabolitos o productos tóxicos como sucedería en un modelo con circulación sistémica. Lo anterior conduce a un planteamiento con base en fisiología celular que lleva a tomar en consideración la acumulación de los contenidos celulares, como son, productos de metabolismo, enzimas y organelos desestructurados, además de sustancias que fungen como señales intra e intercelulares que activan vías de muerte celular, tanto apoptóticas como necróticas.

Considerando lo arriba descrito y observando los valores de citotoxicidad, en cualquiera de los tratamientos que muestren valores iguales o superiores al 50% de muerte celular, no es posible asegurar que el efecto sea provocado exclusivamente por el tratamiento aplicado, puesto que ese desequilibrio entre las poblaciones de células vivas y muertas impacta sobre los efectos del tratamiento. Por lo tanto, el incremento del efecto citotóxico de la vincristina por la expresión de la glicoproteína F a de considerarse hasta antes de las 72 h, tiempo en el cual la diferencia entre el tratamiento combinado y los individuales es muy clara.

3.6 Evaluación del daño en el núcleo celular por la combinación de la proteína F con vincristina

El análisis microscópico de los efectos en la morfología celular reveló, mediante el doble marcaje por inmunofluorescencia, cambios evidentes en la morfología

nuclear. Las observaciones corresponden a las muestras de células tratadas con VC y pCI-F/VC con 24 h de exposición a cada uno de los tratamientos. La observación detallada de la monocapa permitió detectar núcleos cuya morfología corresponde con lo descrito anteriormente para las células tratadas únicamente con VC. En contraste, las células tratadas con pCI-F/VC presentan núcleos con una mayor distensión y cromatina condensada, no muestran la tendencia circular de los núcleos normales o tratados solo con VC, sino más bien se presentan con tendencia a la deformación y de mayor tamaño.

La figura 3.10 muestra la galería de imágenes obtenida mediante microscopía de fluorescencia correspondiente a lo anteriormente descrito, donde además se puede constatar que las células tratadas solo con VC (C, E y G) tienden a presentar características en sus núcleos propias de las que desarrollaron resistencia a éste fármaco (B). Así mismo, la combinación F/VC provoca los cambios morfológicos en núcleos propios de los efectos de la VC como los asociados a la expresión de la glicoproteína fusogénica de SV5, presentando núcleos dilatados, con muestras de condensación de cromatina y angulosos, o bien, mostrando imperfecciones a modo de aristas o discretas espículas en el contorno de la membrana nuclear. Además, puede apreciarse también una clara concentración de núcleos típica de las etapas tempranas previas al proceso de fusión y formación de sincitios (D, F, H). Ninguna de las alteraciones antes descritas han podido ser observadas en las células control. En estas células no se observa concentración de núcleos, y tanto su distribución como su tamaño se observan bastante uniformes.

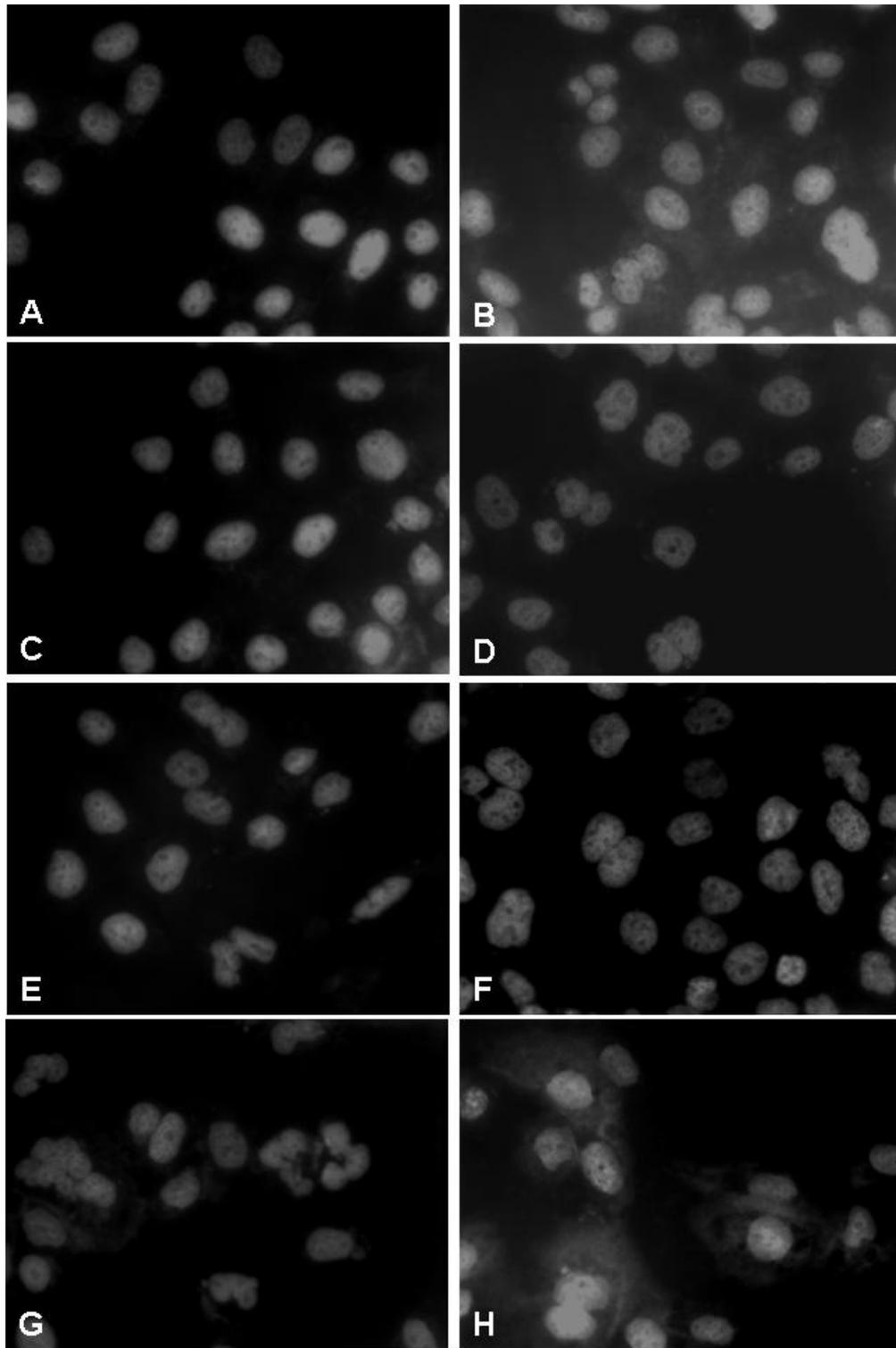


Figura 3.10 Micrografías de fluorescencia de células HeLa tratadas con VC o pCI-F/VC .Del lado izquierdo: A. Control de cultivo, C. con VC 5 nM, E. con VC 10 nM y G. con VC 20 nM. Del lado derecho: B. Control de cultivo de células resistentes a VC, D. con pCI-F/VC 5 nM, F. con pCI-F/VC 10 nM y H. pCI-F/VC 20 nM.

En la figura 3.11 aparecen las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia correspondientes a células resistentes tratadas con VC y pCI-F/VC con 24 h de exposición a cada uno de los tratamientos. En las imágenes C, E y G se pudieron observar las características morfológicas de los núcleos que presentan las células que sobreviven al tratamiento con VC, es decir, células resistentes a ella, las cuales ya fueron descritas previamente.

Así mismo, la combinación F/VC en células resistentes a VC (D, F y H) provoca cambios morfológicos en núcleos con leves diferencias a los mostrados por las células sensibles al fármaco. Si bien, las primeras presentan una distensión nuclear ligeramente mayor que estas últimas.

Al sobre-expresar la proteína F de SV5 en la membrana de las células tumorales se detecta un claro efecto citotóxico, observando un cambio en la morfología celular y en la distribución de las células en monocapa que se hace evidente a las 72 h post-transducción, y que da lugar a la formación de sincitios que progresivamente pierden viabilidad y finalmente mueren. Aproximadamente la mitad de las células del cultivo quedan integradas en sincitios, aunque el descenso en la viabilidad celular alcanza valores que oscilan entre 75 y 90% a los seis días de la infección con un adenovirus recombinante (Gómez-Treviño *et al.* 2003) (45).

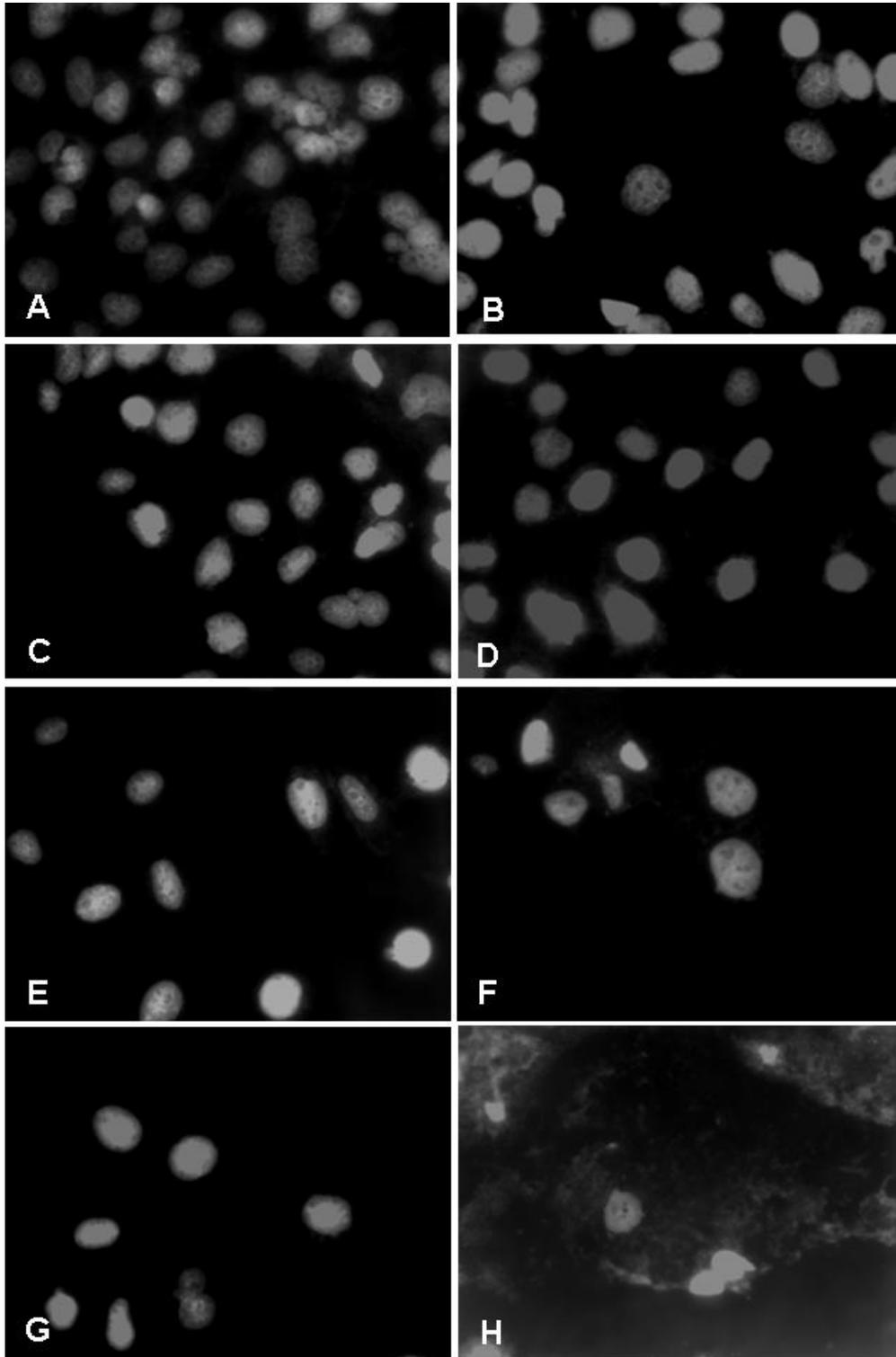


Figura 3.11 Micrografías de fluorescencia de células HeLa resistentes a VC tratadas con VC o pCI-F/VC .Del lado izquierdo: A. Control de cultivo de células resistentes a VC, C. con VC 5 nM, E. con VC 10 nM y G. con VC 20 nM. Del lado derecho: B. con pCI-F, D. con pCI-F/VC 5 nM, F. con pCI-F/VC 10 nM y H. pCI-F/VC 20 nM.

Sin embargo, la estrategia principal en este trabajo experimental se enfoca en el aprovechamiento de las etapas tempranas del proceso de fusión, mismas que están marcadas por la formación de poros en la membrana celular y que aún con ello permiten que la célula permanezca viva. Situación que hemos podido analizar en este apartado demostrando que previo a la formación de sincitios existe un estado celular viable, aún con tratamientos adicionales, que permite el análisis de sinergismo entre los dos tratamientos aplicados.

Nuestros resultados apoyan estos eventos, por un lado lo ya descrito en las imágenes de microscopía de las células que expresan F, mientras que por otra parte la liberación del deshidrogenasas nos indica la presencia de poros en la membrana citoplasmática. Esta alteración se explicaría por la acumulación de glicoproteínas fusogénicas en la membrana plasmática que dan lugar a la formación de agregados que no sólo pueden inducir la fusión celular sino que pueden perturbar la organización de la bicapa lipídica y desestabilizarla, lo cual sería motivo suficiente como describen algunos autores, para provocar la salida de materiales citoplasmáticos (Epanand, 1998; Nir y Nieva, 2000; Rinia et al., 2000; Kruijtzter et al., 2001). La implicación de la proteína F en la ruptura de la membrana celular queda demostrada en el estudio de inmunoelectromicroscopía sobre criosecciones por Gómez-Treviño y cols. en 2003, en las que se detecta la presencia de F asociada a discontinuidades en la bicapa lipídica, mientras que esto no sucede al utilizar un vector de expresión control o en células no infectadas. Ellos mismos demostraron que el tiempo

más temprano para detectar la presencia de F en membranas celulares es de 8 h, por lo que se puede establecer un intervalo de tiempo ideal para buscar el sinergismo entre ambas moléculas empleadas en este trabajo, es decir, un tiempo mínimo para esperar la formación de poros en membrana y un tiempo máximo para descartar que la muerte celular se deba a las etapas finales del proceso de fusión de membranas.

3.7 Evaluación del efecto de la expresión de la proteína F de SV5 y vincristina sobre la expresión de genes relacionados con muerte celular programada

En este estudio se evaluó la expresión de la caspasa 3, enzima involucrada en la muerte celular programada, y se analizaron los niveles de expresión en células tratadas simultáneamente con el fármaco y con el gen de la proteína F de SV5 y en células tratadas con ambos agentes citotóxicos de manera individual.

Se encontró que los niveles de expresión de la caspasa 3 en células HeLa resistentes a VC se incrementan con todos los tratamientos recibidos, esto se puede observar en la figura 3.12.

En las células transfectadas con pCI-F el nivel de expresión es de 5.5 veces más respecto a la expresión en el control de cultivo, con la VC 2 nM es de 9.8

veces el nivel de expresión. Sin embargo, cuando las células reciben el tratamiento combinado de transfección con pCI-F y VC 2 nM el nivel de mRNA de la caspasa se incrementa 71.9 veces, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

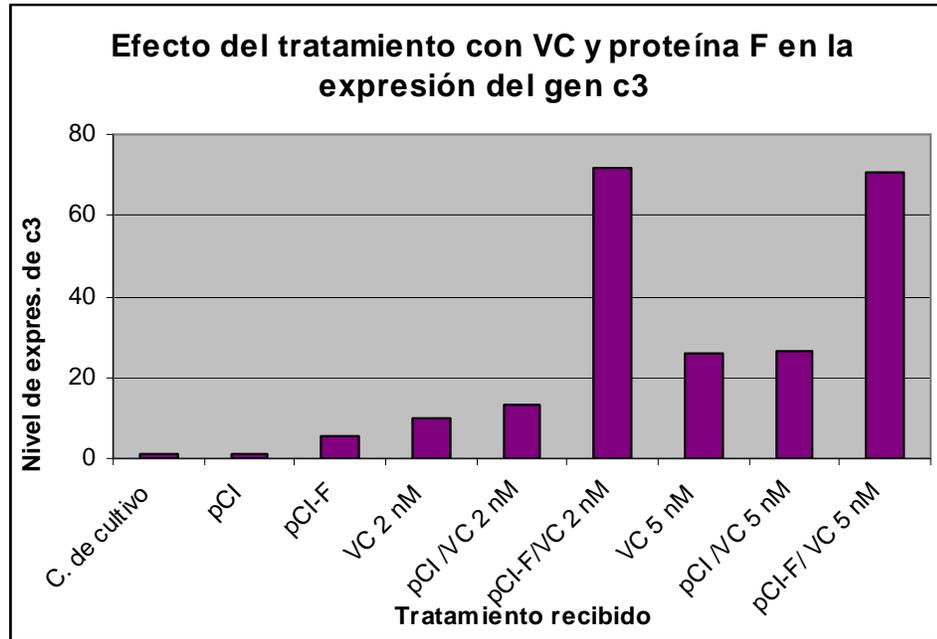


Figura 3.12 Nivel de expresión de la caspasa 3 en células HeLa resistentes a vincristina.

El comportamiento descrito previamente también se presentó con los tratamientos anteriores pero con VC 5 nM.

Al analizar el nivel de expresión del gen c3 en los tratamientos con VC 2 nM y 5 nM se determinó que el nivel de expresión con 5nM es más del doble que con 2nM, y que con pCI/VC 5 nM es aproximadamente el doble de la expresión que

con pCI/VC 2 nM, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En contraste, el nivel de expresión de la caspasa 3 con el tratamiento combinado, pero con la concentración de VC diferente, pCI-F/ VC 2nM y pCI-F/VC 5nM, no presenta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Tampoco existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre VC 2 nM y el control de cultivo, ni entre pCI-F y el mismo control.

Mediante el análisis anterior es posible establecer que la expresión de la glicoproteína F del SV5 en etapas tempranas del proceso de fusión de membranas induce la producción de los transcritos del gen de la caspasa 3, aunque en menor proporción que la VC.

Como se mencionó previamente, en el año 2007 mediante estudios de microscopía de fluorescencia y citometría de flujo, se estableció que las células HeLa tratadas con VC presentan cambios morfológicos típicos de la muerte por apoptosis (50), introduciendo un nuevo término para describirlos, *apoptosis-like*. En el año 2003 mediante diferentes técnicas microscópicas y de inmunomarcaje se demostró que la glicoproteína F de SV5 provoca muerte por necrosis (45), mientras que en otro estudio realizado con anterioridad, donde se evaluó la actividad citotóxica del cDNA de genes de glicoproteínas fusogénicas de membrana de tres virus diferentes (54), también encontraron a través de

microscopía confocal, que la citotoxicidad de las glicoproteínas fusogénicas de membrana se produce a través de mecanismos no apoptóticos.

Los reportes de estos investigadores (45, 54) coinciden en que las glicoproteínas fusogénicas virales inducen muerte por mecanismos no apoptóticos, sin embargo, es importante señalar que lo anterior fue establecido por evaluación microscópica, y en períodos de tiempo de 3 a 5 días respectivamente, mientras que en este estudio se utilizó una técnica molecular altamente sensible y precisa y en un período de tiempo menor.

Si bien otros autores no señalan que exista muerte por apoptosis provocado por el efecto de la expresión de glicoproteínas fusogénicas de membrana, aquí se ha evidenciado que ocurre la primera etapa de los sucesos que desencadenan la muerte celular programada, la cual no se puede finalizar debido a que en el modelo de estudio no se presentan el resto de los elementos requeridos para que esta vía de muerte celular se lleve a cabo.

La apoptosis es el programa de muerte celular mejor definido que contrarresta el crecimiento de un tumor. Se caracteriza por la activación de una familia de cisteín proteasas denominadas caspasas que desencadenan alteraciones morfológicas asociadas a la apoptosis, como la contracción de la célula, la condensación de la cromatina, y la desintegración de la célula en pequeños fragmentos.

En la muerte por necrosis la célula se hincha, pierde la integridad de su membrana y libera el contenido celular. Este hecho da lugar a una respuesta inflamatoria, iniciada fundamentalmente por las enzimas proteolíticas y los radicales libres que la célula muerta albergaba en su interior. Por el contrario, la célula apoptótica presenta una alteración de su membrana plasmática, la cromatina nuclear se condensa y disminuye su volumen. Además, diferentes mecanismos activan endonucleasas que degradan el DNA a nivel de los nucleosomas. Así, la célula apoptótica es rápidamente fagocitada y digerida por células fagocíticas vecinas, con lo cual no se libera su contenido y no se originan fenómenos inflamatorios.

La pérdida de la estructura característica de una célula por apoptosis es un proceso complejo, que implica el procesamiento de un gran número de sustratos celulares entre los que se encuentran proteínas de señal, de reparación de ADN, estructurales, factores de transcripción, etc., por las caspasas. Éstas son proteínas clave en la transducción y ejecución de la señal apoptótica inducida por una diversidad de estímulos (58, 59).

La mayoría de las vías de la apoptosis son iniciadas por sobre-regulación o modificación postraducciona l de proteínas BH3 de la familia Bcl-2. Entonces éstas activan las proteínas proapoptóticas Bax y Bak de esta misma familia, las cuales inducen la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y la liberación de citocromo c al citosol. El citocromo citosólico facilita el ensamblaje de los apoptosomas y sirve como una plataforma para activar la caspasa 9, la cual activa los llamados efectores de caspasas, caspasa 3 y caspasa 7 (50).

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

- ❖ Los métodos de DNA recombinante empleados permitieron la construcción de un vector plasmídico recombinante capaz de expresar la proteína fusogénica del paramyxovirus SV5.
- ❖ Se logró desarrollar una línea celular resistente a la vincristina.
- ❖ La DL₅₀ de la vincristina se estableció en 8.9 nM bajo las condiciones ensayadas.

- ❖ Se demostró que la expresión de la proteína fusogénica del paramyxovirus SV5 incrementa la citotoxicidad de la vincristina.

- ❖ El efecto de potenciación de la proteína fusogénica del paramyxovirus SV5 sobre la citotoxicidad de la vincristina es independiente de la concentración después de las 48 h post-transfección.

- ❖ Las células tratadas con vincristina después de 24 h de la transfección presentan cambios morfológicos en los núcleos, propios de los efectos de la VC como los asociados a la expresión de la glicoproteína fusogénica de SV5.

- ❖ Se demostró que en etapas tempranas del proceso de fusión de membranas la glicoproteína fusogénica del SV5 induce la expresión de transcritos del gen c3.

- ❖ Se demostró que la expresión de la proteína fusogénica del paramyxovirus SV5 incrementa los niveles de expresión de la caspasa 3 en células tratadas con vincristina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gutiérrez, A., Lemoine, N., y Sikora, K. Gene therapy for cancer. *The Lancet*, 339: 715-721. (1992)
2. Guízar-Vázquez, J. J. Genética Clínica. Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. 3ª. Edición. *El Manual Moderno*. México, 2001. ISBN 968-426-890-4. Cap. 34, pp. 653-666.

3. Young, L. Y., Koda-Kimble, M. A., Guglielmo, B. J., Kradjan, W. A. Handbook of Applied Therapeutics. 6th. Edition. Applied Therapeutics, Inc. USA, 1996. Cap. 86, 86.1-86.4 y 86.20
4. <http://www.monografias.com/trabajos55/nueva-definicion-del-cancer/nueva-definicion-del-cancer.shtml>. autor Dr. Luis Ferbeyre Binelfa.
consulta el 19 de octubre 2009 21:37
5. Mejía Aranguré, J. M., Ortega Álvarez, M. C. y Fajardo Gutiérrez A. Epidemiología de las leucemias agudas en niños. Parte 1. Revista Médica del IMSS, 43 (4): 349–356 (2005). <http://www.medigraphic.com>
6. Kuri Morales, P., Vargas Cortés, M., López Sibaja, Z. y Rizo Ríos, P. La situación epidemiológica del cáncer en México. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/RHNM.htm>.
consulta 18 de octubre 2009 20:52
7. Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10^a edición. Mc Graw Hill. México, 2003. Vol. II. Sección IX, Cap. 52 pp.1397-1404, 1433-1435.
8. Tratamientos contra el cáncer. publicalpha.com/29750/ consulta el 25 de octubre 2009. 18:55 hrs
9. Hoffman: Hematology: Basic Principles and Practice, 5th ed. Copyright © 2008 Churchill Livingstone, An Imprint of Elsevier Appendix 56-2 Clinical Pharmacology Of Antimicrotubule Agents
10. Jordan, M. A., Thrower, D., Wilson, L. Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca Alkaloids. Cancer Res, 51:2212-2222.(1991) [Revised 7/29/2009 3:05:00 PM] Drug Information Provided by Gold Standard Inc. © 2009 MC Consult Drug Monograph 270909 23:44hrs
11. Lehnert, M. Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. Eur. J. Cancer, 6: 912-920. (1996)
12. Friedenber, W. R., Spencer, S. K., Musser, C., Hogan, T. F., Rodvold, K. A., Rushing, D. A., Mazza, J. J., Tewksbury, D. A. y Marx, J. J. Multi-Drug resistance in Chronic Lymphocytic Leukemia. Leukemia and Lymphoma, 34: (1-2), 171-178. (1999)
13. Juliano, R. L. y Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim. Biophys. Acta, 455: 152-162. (1976)

14. Biedler, J. L. y Riehm, H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res.*, 30: 1174-1184. (1970)
15. Riordan, J. R. y Ling, V. Genetic and biochemical characterization of multidrug resistance. *Pharmacol. Ther.*, 28: 51-75. (1985)
16. Shen, D. W., Cardarelli, C., Hwang, J., Cornwell, M., Richert, N., Ishii, S., Pastan, I. y Gottesman, M. M. Multiple drug-resistant human KB carcinoma cells independently selected for high-level resistance to colchicine, adriamycin, or vinblastine show changes in expression of specific proteins. *J. Biol. Chem.*, 261: 7762-7770. (1986)
17. Loo, T. W. y Clarke, D. M. Molecular dissection of the human multidrug resistance P-glycoprotein. *Biochemistry and Cell Biology*, 77: 11-23. (1999)
18. Chan, H. S., Grogan, T. M., DeBoer, G., Haddad, G., Gallie, B. L. y Ling, V. Diagnosis and reversal of multidrug resistance in paediatric cancers. *Eur. J. Cancer*, 6: 1051-1061. (1996)
19. Fisher, G. A., Lum, B. L., Hausdorff, J. y Sikic, B. I. Pharmacological considerations in the modulation of multidrug resistance. *Eur. J. Cancer*, 6: 1082-1088. (1996)
20. Goldstein, L. J. MDR1 gene expression in solid tumours. *Eur. J. Cancer*, 6: 1039-1050. (1996)
21. Fojo, A. T., Shen, D. W., Mickley, L. A., Pastan, I. y Gottesman, M. M. Intrinsic drug resistance in human kidney cancer is associated with expression of a human multidrug-resistance gene. *J. Clin. Oncol.*, 5 : 1922-1927. (1987)
22. Weinstein, R. S., Jakate, S. M., Dominguez, J. M., Lebovitz, M. D., Koukoulis, G. K., Kuszak, J. R., Klusens, L. F., Grogan, T. M., Saclarides, T. J., Roninson, I. B. y Coon, J. S. Relationship of the expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human colon carcinoma to local tumor aggressiveness and lymph node metastasis. *Cancer Res.*, 51: 2720-2726. (1991)
23. Chan, H. S., DeBoer, G., Haddad, G., Gallie, B. L. y Ling, V. Multidrug resistance in pediatric malignancies. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 9: 275-318. (1995)

24. Leighton, J. Jr. y Goldstein, L. J. P-glycoprotein in adult solid tumors. Expression and prognostic significance. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 9: 251-273. (1995)
25. Marie, J. P. P-glycoprotein in adult hematologic malignancies. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 9: 239-249. (1995)
26. Sarkadi, B. y Muller, M. Search for specific inhibitors or multidrug resistance in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 8: 171-182. (1997)
27. Talmadge, E. y Cowan, K.H. Chapter 33-Gene Therapy in Oncology. *Abeloff: Abeloff's Clinical Oncology*, 4th. Ed. 2008. Churchill Livingstone, an Imprint of Elsevier.
28. Rozalén, J., Fernández Gómez, F., Ceña V. y Jordán, J. Aplicaciones de la Terapia Génica. *Ámbito Farmacéutico*, 22 (10): 142-150. (2003)
29. Goldman: Cecil Medicine, 23rd ed. Chapter 41. Gene Therapy Cancer. Copyright © 2007 Saunders, An Imprint of Elsevier
30. Gómez-Navarro, J., Curiel, D. T. y Douglas, J. T. Gene therapy for cancer. *European J. of Cancer*, 35 (6): 867-885. (1999)
31. Stermán, D. H., Treat, J., Litzky, L. A., Amin, K. M., Coonrod, L., Molnar-Kimber, K. Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy in patients with localized malignancy: results of a phase I clinical trial in malignant mesothelioma. *Hum Gene Ther.*, 9: 1083-1092. (1998)
32. Alemany Bonastre R., Barquineró Máñez J., Ramón y Cajal Agueras S. Terapia génica: realidades actuales y expectativas. *Rev. Clin Esp.*, 205 (4): 178-188. (2005)
33. Pandha, H. S., Martin, L. A., Rigg, A., Hurst, H. C., Stamp, G. W., Sikora, K. Genetic prodrug activation therapy for breast cancer: a phase I clinical trial of erbB-2-directed suicide gene expression. *J Clin Oncol.*, 17: 2180-2189. (1999)
34. Mercadé, E., Cascalló, M., Carrió, M., Calbó, J., Gómez-Treviño, A., Fillat, C. Treatment based on a combination of the CYP2B1/cyclophosphamide system and p53 delivery enhances tumor regression in human pancreatic cancer. *Annals of Oncology*, 12: 379-388. (2001)
35. Duelli, D. y Lazebnik, Y. Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer. *Nat Rev Cancer*, 7: 968–976. (2007)

36. White, J. M., Delos, S. E., Brecher, M. y Schornberg, K. Structures and Mechanisms of Viral Membrane Fusion Proteins: Multiple Variations on a Common Theme. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 43:189–219. (2008). Copyright © Informa Healthcare USA, Inc. ISSN: 1040-9238 print / 1549-7798 online. DOI: 10.1080/10409230802058320
37. Chernomordik, L. V., y Kozlov, M. M. Membrane hemifusion: crossing a chasm in two leaps. *Cell*, 123: 375–382. (2005)
38. Chernomordik, L. V., Zimmerberg, J. y Kozlov, M. M. Membranes of the world unite. *J Cell Biol*, 175: 201–207. (2006)
39. Earp, L. J., Delos, S. E., Park, H. E. y White, J. M. The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, 285: 25-66. (2005)
40. Cohen, F. S. y Melikyan, G. B. The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement. *J Membr Biol*, 199: 1–14. (2004)
41. Melikyan, G., Barnard, R., Markosyan, R., Young, J. y Cohen, F. Low pH is required for avian sarcoma and leukosis virus Env-induced hemifusion and fusion pore formation but not for pore growth. *J Virol*, 78: 3753–3762. (2004)
42. Melikyan, G., Markosyan, R., Hemmati, H., Delmedico, M., Lambert, D. y Cohen, F. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol*, 151: 413–423. (2000)
43. Gómez-Treviño, A. y Mercadé, E. Paramyxovirus SV5 Fusion Protein: a New Cytotoxic Gene to Eliminate Tumour Cells. *Abstracts of the European Society of Gene Therapy*. 10: 50. (2002)
44. Gómez-Treviño, A. y Mercadé, E. Paramyxovirus SV5 Fusion (F) Glycoprotein enhances cytotoxicity of enzyme/prodrug –based therapies. *Abstracts of the Spanish Society of Gene Therapy*. 2: 45. (2003)
45. Gómez-Treviño, A., Castel, S., López-Iglesias, C., Cortadellas, N., Comas-Riu, J. y Mercadé, M. Effects of adenovirus-mediated SV5 fusogenic glycoprotein expression on tumour cells. *The Journal of Gene Medicine*, 5(6): 483-492. (2003)

46. Sambroock, J., Russel, D. W. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd. Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 2001.
47. Vademécum. <http://www.igb.es/cbasicas/farma/farma04/v010.htm> consultado 27 de septiembre 2009.
48. Muska, A., Peck, E. y Palmer S. T. Real-Time PCR in Microbiology. From Diagnosis to Characterization. Cap. 4 Standards and Controls: Concepts for Preparation and Use in Real-Time PCR Applications. Primera edición. Ed. Caister Academic Press. 2007. pp.133-182.
49. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Research, Oxford University Press, 29(900): 2003-2007. (2001)
50. Groth-Pedersen, L., Stampe Ostenfeld, M., Høyer-Hansen, M., Nylandsted, J. y Ja"attela M. Vincristine Induces Dramatic Lysosomal Changes and Sensitizes Cancer Cells to Lysosome-Destabilizing Siramesine. Cancer Res., 67(5): 2217-2225. (2007) www.aacrjournals.org
51. Hoffman, D., Bangen, J. M. y Wildner O. Synergy between expression of fusogenic membrane proteins, chemotherapy and facultative virotherapy in colorectal cancer. Gene Ther., 13(21): 1534-1544. (2006)
52. Hoffman, D. y Wildner, O. Enhanced killing of pancreatic cancer cells by expresión of fusogenic membrana glycoproteins in combination with chemotherapy. Mol. Cancer Ther., 5(8): 2013-2022. (2006)
53. Shin, E. J., Chang, J. I., Choi, B., Wanna, G., Ebert, O., Genden, E. M. y Woo, S. L. C. Fusogenic vesicular stomatitis virus for the treatment of head and neck squamous carcinomas. Otolaryngol. Head Neck Surg., 136(5): 811-817. (2007)
54. Bateman, A., Bullough, F., Murphy, S., Emillusen, L., Lavillette, D., Cosset, F-L., Cattaneo, R., Russell, J. y Vile, R. G. Fusogenic membrane glycoproteins as a novel class of genes for the local and immune-mediated control of tumor-growth. Cancer Research, 60: 1492-1497. (2000)
55. Gainey, M. D., Manuse, M. J. y Parks, G. D. A hyperfusogenic F protein enhances the oncolytic potency of a Paramyxovirus Simian Virus 5 P/V mutant without compromising sensitivity to Type I Interferon. Journal of Virology, 82(19): 9369-9380. (2008)

56. Baker, K. A., Dutch, R. E., Lamb, R. A. y Jardetzky T. S. Structural basis for Paramyxovirus-mediated membrane fusion. *Molecular Cell*, 3: 309-319 (1999)
57. González-Merlo, J., González Bosquet, J. y colaboradores. *Ginecología Oncológica*. Cap. 1 Biología molecular en el cáncer ginecológico. 2da. edición. Ed. Masson. 2000. pp 15-18
58. Miñambres García E. y López Hoyos M. Apoptosis: implicaciones en Medicina Intensiva. *Med. Intensiva*, 28(6): 319-328. (2004)
59. Elinos-Báez c.E., Maldonado V. y Meléndez Z. J. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gaceta Médica Mexicana*, 139(5):493-500. (2003)

APÉNDICE A

Lista de Material y Equipo

Agitador oscilatorio (LAB-LINE MAX/Rotator)

Autoclave eléctrica (Tuttnauer 2540 M)

Balanza analítica (Sartorius BL 1500 S)

Baño de temperatura (Baxter B6990)

Bomba de vacío (GAST, presión max. 4.08 bar/60PSI)

Cámara de congelación controlada (Nalgene)

Cámara de conteo de Neubauer

Cámara de electroforesis (Termo EC Midicell Primo EC 330)

Cámara de electroforesis (Termo EC Minicell Primo EC)

Cámara fotográfica (SONY FD Mavica)

Campana de flujo laminar clase II (LABCONCO)

Centrífuga refrigerada (Eppendorf 5810 R)

Charolas para reactivos de 50 ml desechables (Costar, Corning)

Congelador -20 °C (LAB LINE Inst. Cool Lab)

Cubetas desechables (UView BIORAD 50-2000µl)

Espectrofotómetro UV/Vis (Jenway Genova)

Filtros de 25 mm diámetro y tamaño de poro 0.2 µm

Fluorómetro (Perkin Elmer)

Frascos de cultivo de 25 cm² CORNING

Frascos para reactivo CORNING

Fuente de poder (EC 105)

Incubadora (Thermolyne 37900)

Incubadora con agitación (Barnstead/LAB-LINE-Max Q 5000)

Incubadora con control de CO₂ (SHEL LAB TC2323)

Jeringas desechables de 10 ml

Lector de placas (BIORAD 550)

Material básico de laboratorio de vidrio

Microcentrífuga (Eppendorf 5415 C)

Micropipetas Eppendorf de 2.5, 20, 200 y 1000 µl

Microscopio de fluorescencia

Microscopio óptico invertido (Van Guard 1291 CMI)

Minishaker (MSI IKA)

Pipeta multicanal de 250 µl (Transferpette)

Pipetas Pasteur

Pipetas serológicas desechables de 10 ml (Costar, Corning)

Pipeteador manual (Drummond Pipet-Aid XP)

Placas de 16 pozos (Nalge nunc)

Placas de 24 pozos de fondo plano con tapa (Costar, Corning)

Placas de 96 pozos blancas de fondo claro con tapa (Costar, Corning)

Placas de 96 pozos de fondo plano con tapa (Costar, Corning)

Placas de cultivo de 10 cm de diámetro (FALCON y CORNING)

Plancha de calentamiento con agitación (Barnstead/Thermolyne)

Puntas blancas, amarillas y azules para micropipetas

Refrigerador (LG GR-739 DTC)

Tanque de nitrógeno líquido (CBS Cryosystems XC 20/20 Series)

Termociclador (Eppendorf Mastercycler epgradient)

Termociclador en tiempo real (LightCycler modelo 2.0, Roche)

Transiluminador (Spectroline BI-O-Vision)

Tubos de cultivo de 12 X 75 mm FISHER

Tubos de fondo cónico de 50 ml FALCON y CORNING

Tubos Eppendorf de 0.2, 1.5 y 2 ml

Tubos para centrifuga de 15 ml CORNING

Viales de 1.5 ml para crioconservación (nunc)

APÉNDICE B

Reactivos

Acetato de amonio 4 M

Acetato de amonio 7.5 M, pH 7.8

Agar LB

Agar LB/amp 50 mg/ml

Agarosa 0.8%

Albúmina sérica bovina (SIGMA)

Ampicilina (SIGMA)

Anticuerpo de conejo anti-actina (Invitrogen)

Anticuerpo secundario Alexa flúor 488 (Invitrogen)

Bromuro de etidio 2 mg/ml

Buffer de fosfatos 10X

CaCl₂ 100mM

Caldo LB

Caldo LB/amp 50 mg/ml

Cepa *E. coli* HB 101

Cepa *E. coli* transformada con PACC-F

Cloroformo (SIGMA)

CO₂ gas

Dimetil sulfóxido (SIGMA)

Enzimas de restricción Kpn I y Eco RI (Promega)

Etanol (SIGMA)

Etanol 70%

Etanol 75%

Ferricianuro de potasio 5 mM

Ferrocianuro de potasio 5mM

FuGENE (Roche)

Glicerol 30%

Ioduro de propidio (Invitrogen)

Isopropanol (SIGMA)

Jugo Azul 6X

Kit Access Quick RT-PCR System (Promega)

Kit Cell Titer 96Aqueous One Solution (Promega)

Kit CytoTox-ONE Homogeneous Membrane Integrity Assay (Promega)

Kit GeneClean (QBIgene)

Kit Go Taq flexi DNA (Promega)
Kit MICROCON (Millipore)
Kit Micropure EZ (Millipore)
Kit Transcriptor Reverse Transcriptase (ROCHE)
Línea celular HeLa
Marcador de peso molecular N3232S (NE BioLabs)
Medio DMEM (GIBCO)
MgCl₂ 2 mM
NaOH 10 N
Paraformaldehído (Fluka)
Penicilina/Estreptomicina 5000UI/ml/5000 mg/ml (GIBCO)
Plásmido pBud LacZ/CAT (Invitrogen)
Plásmido pCI (Promega)
RNasa A (Q-BIO gene)
SDS 10%
Solución amortiguadora de lisis
Sondas LightCycler DNA TaqMan Master (ROCHE)
Suero bovino fetal (GIBCO)
Sulfato de vincristina (MP Biomedicals)
SYBR-Green I 1X
T4 DNA Ligasa (Invitrogen)
TAE 1X
TBE 0.5X
TE 1X

Tripsina/EDTA 0.25%/1mM (GIBCO)

TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostic,USA)

Tritón X-100 (SIGMA)

X-Gal (Promega)

La preparación de los reactivos y soluciones se realizó de acuerdo a Sambroock y Russel (2001), (46).

APÉNDICE C

Tablas de resultados de prueba t de ensayos para evaluar el efecto de la expresión de F sobre la citotoxicidad de la vincristina a 2 concentraciones en células Hela

24 horas Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			48 horas Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			72 horas Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	<i>Control Cultivo</i>	<i>VC 2nM</i>		<i>Control Cultivo</i>	<i>VC2nM</i>		<i>Control Cultivo</i>	<i>VC2nM</i>
Media	1,17233333	1,14266667	Media	0,55	0,44	Media	0,291	0,23466667
Varianza	0,01268933	0,00153733	Varianza	0,001675	0,00845	Varianza	0,002457	0,00015233
Observaciones	3	3	Observaciones	3	2	Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,00711333		Varianza agrupada	0,00393333		Varianza agrupada	0,00130467	
Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4		Grados de libertad	3		Grados de libertad	4	
Estadístico t	0,43080209		Estadístico t	1,92133428		Estadístico t	1,91012283	
P(T<=t) una cola	0,34440563		P(T<=t) una cola	0,07522017		P(T<=t) una cola	0,06436385	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,35336343		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
P(T<=t) dos colas	0,68881127		P(T<=t) dos colas	0,15044035		P(T<=t) dos colas	0,12872769	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	3,1824463		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	24 horas			48 horas			72 horas	
	<i>Control</i>			<i>Control</i>			<i>Control</i>	
	<i>Cultivo</i>	<i>pCl</i>		<i>Cultivo</i>	<i>pCl</i>		<i>Cultivo</i>	<i>pCl</i>
Media	1,17233333	1,015	Media	0,55	0,413	Media	0,291	0,29533333
Varianza	0,01268933	0,000756	Varianza	0,001675	0,007824	Varianza	0,002457	0,00382533
Observaciones	3	3	Observaciones	3	3	Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,00672267		Varianza agrupada	0,0047495		Varianza agrupada	0,00314117	
Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4		Grados de libertad	4		Grados de libertad	4	
Estadístico t	2,35015001		Estadístico t	2,43468203		Estadístico t	0,09469395	
P(T<=t) una cola	0,03925124		P(T<=t) una cola	0,03580904		P(T<=t) una cola	0,46455595	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
P(T<=t) dos colas	0,07850248		P(T<=t) dos colas	0,07161808		P(T<=t) dos colas	0,9291119	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

	24 horas			48 horas			72 horas		
	Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	<i>Control</i>	<i>Cultivo</i>	<i>pCl</i>	<i>Control</i>	<i>Cultivo</i>	<i>pCl</i>	<i>Control</i>	<i>Cultivo</i>	<i>pCl</i>
Media	1,17233333		1,015	Media	0,55	0,413	Media	0,291	0,29533333
Varianza	0,01268933		0,000756	Varianza	0,001675	0,007824	Varianza	0,002457	0,00382533
Observaciones	3		3	Observaciones	3	3	Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,00672267			Varianza agrupada	0,0047495		Varianza agrupada	0,00314117	
Diferencia hipotética de las medias	0			Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4			Grados de libertad	4		Grados de libertad	4	
Estadístico t	2,35015001			Estadístico t	2,43468203		Estadístico t	0,09469395	
P(T<=t) una cola	0,03925124			P(T<=t) una cola	0,03580904		P(T<=t) una cola	0,46455595	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184678			Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
P(T<=t) dos colas	0,07850248			P(T<=t) dos colas	0,07161808		P(T<=t) dos colas	0,9291119	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511			Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

	24 horas		48 horas		72 horas			
	Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			
	<i>Control</i>	<i>pCI-F</i>	<i>Control</i>	<i>pCI-F</i>	<i>Control</i>	<i>pCI-F</i>		
	<i>Cultivo</i>		<i>Cultivo</i>		<i>Cultivo</i>			
Media	1,17233333	0,82566667	Media	0,55	0,35333333	Media	0,291	0,151
Varianza	0,01268933	0,08449733	Varianza	0,001675	0,00013433	Varianza	0,002457	9E-06
Observaciones	3	3	Observaciones	3	3	Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,04859333		Varianza agrupada	0,00090467		Varianza agrupada	0,001233	
Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4		Grados de libertad	4		Grados de libertad	4	
Estadístico t	1,92605803		Estadístico t	8,00814802		Estadístico t	4,88306074	
P(T<=t) una cola	0,06319361		P(T<=t) una cola	0,00065939		P(T<=t) una cola	0,00407132	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
P(T<=t) dos colas	0,12638722		P(T<=t) dos colas	0,00131878		P(T<=t) dos colas	0,00814263	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

24 horas			48 horas			72 horas		
Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	<i>Control</i>	<i>pCI/Vc 2nm</i>		<i>Control</i>	<i>pCI/Vc 2nm</i>		<i>Control</i>	<i>pCI/Vc 2nm</i>
	<i>Cultivo</i>			<i>Cultivo</i>			<i>Cultivo</i>	
Media	1,17233333	1,039	Media	0,55	0,4	Media	0,291	0,26033333
Varianza	0,01268933	0,008341	Varianza	0,001675	0,005529	Varianza	0,002457	0,00015633
Observaciones	3	3	Observaciones	3	3	Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,01051517		Varianza agrupada	0,003602		Varianza agrupada	0,00130667	
Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4		Grados de libertad	4		Grados de libertad	4	
Estadístico t	1,59248843		Estadístico t	3,06101202		Estadístico t	1,03903409	
P(T<=t) una cola	0,09324614		P(T<=t) una cola	0,01881066		P(T<=t) una cola	0,17873398	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
P(T<=t) dos colas	0,18649227		P(T<=t) dos colas	0,03762131		P(T<=t) dos colas	0,35746796	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

	24 horas		48 horas		72 horas			
	Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			
	<i>Control</i>		<i>Control</i>		<i>Control</i>			
	<i>Cultivo</i>	pCI-F/Vc 2nm	<i>Cultivo</i>	pCI-F/Vc 2nm	<i>Cultivo</i>	pCI-F/Vc 2nm		
Media	1,17233333	0,77266667	Media	0,55	0,27333333	Media	0,291	0,147
Varianza	0,01268933	0,01861433	Varianza	0,001675	0,01520633	Varianza	0,002457	0,000763
Observaciones	3	3	Observaciones	3	3	Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,01565183		Varianza agrupada	0,00844067		Varianza agrupada	0,00161	
Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4		Grados de libertad	4		Grados de libertad	4	
Estadístico t	3,91255946		Estadístico t	3,68819685		Estadístico t	4,39536741	
P(T<=t) una cola	0,00867814		P(T<=t) una cola	0,01052599		P(T<=t) una cola	0,00586672	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
P(T<=t) dos colas	0,01735629		P(T<=t) dos colas	0,02105199		P(T<=t) dos colas	0,01173343	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

24 horas			48 horas			72 horas		
Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	pCI-F	pCI-F/Vc 2nm		pCI-F	pCI-F/Vc 2nm		pCI-F	pCI-F/Vc 2nm
Media	0,82566667	0,77266667	Media	0,35333333	0,27333333	Media	0,151	0,147
Varianza	0,08449733	0,01861433	Varianza	0,00013433	0,01520633	Varianza	9E-06	0,000763
Observaciones	3	3	Observaciones	3	3	Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,05155583		Varianza agrupada	0,00767033		Varianza agrupada	0,000386	
Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4		Grados de libertad	4		Grados de libertad	4	
Estadístico t	0,28587922		Estadístico t	1,11873828		Estadístico t	0,24935149	
P(T<=t) una cola	0,39458229		P(T<=t) una cola	0,16294834		P(T<=t) una cola	0,40768497	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
P(T<=t) dos colas	0,78916457		P(T<=t) dos colas	0,32589669		P(T<=t) dos colas	0,81536995	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

24 horas			48 horas			72 horas		
Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	VC2nM	pCI-F/Vc 2nm		VC2nM	pCI-F/Vc 2nm		VC2nM	pCI-F/Vc 2nm
Media	1,14266667	0,77266667	Media	0,44	0,27333333	Media	0,23466667	0,147
Varianza	0,00153733	0,01861433	Varianza	0,00845	0,01520633	Varianza	0,00015233	0,000763
Observaciones	3	3	Observaciones	2	3	Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,01007583		Varianza agrupada	0,01295422		Varianza agrupada	0,00045767	
Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4		Grados de libertad	3		Grados de libertad	4	
Estadístico t	4,51447098		Estadístico t	1,60410836		Estadístico t	5,01886463	
P(T<=t) una cola	0,00535171		P(T<=t) una cola	0,1035138		P(T<=t) una cola	0,00369564	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,35336343		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
P(T<=t) dos colas	0,01070342		P(T<=t) dos colas	0,20702759		P(T<=t) dos colas	0,00739127	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	3,1824463		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

24 horas			48 horas			72 horas		
Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	<i>Control cultivo</i>	<i>Vc 5 nm</i>		<i>Control cultivo</i>	<i>Vc 5 nm</i>		<i>Control cultivo</i>	<i>Vc 5 nm</i>
Media	1,17233333	0,96766667	Media	0,55	0,42566667	Media	0,291	0,23233333
Varianza	0,01268933	0,00196933	Varianza	0,001675	0,00452633	Varianza	0,002457	0,00068033
Observaciones	3	3	Observaciones	3	3	Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,00732933		Varianza agrupada	0,00310067		Varianza agrupada	0,00156867	
Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4		Grados de libertad	4		Grados de libertad	4	
Estadístico t	2,92792878		Estadístico t	2,73467466		Estadístico t	1,8141438	
P(T<=t) una cola	0,0214512		P(T<=t) una cola	0,02609547		P(T<=t) una cola	0,07192634	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
P(T<=t) dos colas	0,04290239		P(T<=t) dos colas	0,05219093		P(T<=t) dos colas	0,14385267	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

24 horas			48 horas			72 horas		
Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	<i>Control cultivo</i>	<i>pCI/Vc 5nm</i>		<i>Control cultivo</i>	<i>pCI/Vc 5nm</i>		<i>Control cultivo</i>	<i>pCI/Vc 5nm</i>
Media	1,17233333	0,843	Media	0,55	0,36966667	Media	0,291	0,235
Varianza	0,01268933	0,019476	Varianza	0,001675	0,00397633	Varianza	0,002457	0,0003
Observaciones	3	3	Observaciones	3	3	Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,01608267		Varianza agrupada	0,00282567		Varianza agrupada	0,0013785	
Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4		Grados de libertad	4		Grados de libertad	4	
Estadístico t	3,18055045		Estadístico t	4,15490574		Estadístico t	1,84726955	
P(T<=t) una cola	0,01675878		P(T<=t) una cola	0,00710184		P(T<=t) una cola	0,06921341	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
P(T<=t) dos colas	0,03351755		P(T<=t) dos colas	0,01420368		P(T<=t) dos colas	0,13842681	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

	24 horas		48 horas		72 horas			
	Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			
	Control cultivo	pCl-F/Vc 5nm	Control cultivo	pCl-F/Vc 5nm	Control cultivo	pCl-F/Vc 5nm		
Media	1,17233333	0,65	Media	0,55	0,27433333	Media	0,291	0,139
Varianza	0,01268933	0,021283	Varianza	0,001675	0,00812233	Varianza	0,002457	0,000243
Observaciones	3	3	Observaciones	3	3	Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,01698617		Varianza agrupada	0,00489867		Varianza agrupada	0,00135	
Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4		Grados de libertad	4		Grados de libertad	4	
Estadístico t	4,9084648		Estadístico t	4,82381829		Estadístico t	5,06666667	
P(T<=t) una cola	0,00399762		P(T<=t) una cola	0,00424969		P(T<=t) una cola	0,00357354	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
P(T<=t) dos colas	0,00799525		P(T<=t) dos colas	0,00849938		P(T<=t) dos colas	0,00714708	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

24 horas			48 horas			72 horas		
Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	<i>pCI-F</i>	<i>pCI-F/Vc 5nm</i>		<i>pCI-F</i>	<i>pCI-F/Vc 5nm</i>		<i>pCI-F</i>	<i>pCI-F/Vc 5nm</i>
Media	0,82566667	0,65	Media	0,35333333	0,27433333	Media	0,151	0,139
Varianza	0,08449733	0,021283	Varianza	0,00013433	0,00812233	Varianza	9E-06	0,000243
Observaciones	3	3	Observaciones	3	3	Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,05289017		Varianza agrupada	0,00412833		Varianza agrupada	0,000126	
Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4		Grados de libertad	4		Grados de libertad	4	
Estadístico t	0,93550804		Estadístico t	1,50586258		Estadístico t	1,30930734	
P(T<=t) una cola	0,20124447		P(T<=t) una cola	0,10328213		P(T<=t) una cola	0,13028727	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
P(T<=t) dos colas	0,40248895		P(T<=t) dos colas	0,20656427		P(T<=t) dos colas	0,26057455	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

24 horas			48 horas			72 horas		
Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales			Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Vc 5 nm	pCI-F/Vc 5nm		Vc 5 nm	pCI-F/Vc 5nm		Vc 5 nm	pCI-F/Vc 5nm
Media	0,96766667	0,65	Media	0,42566667	0,27433333	Media	0,23233333	0,139
Varianza	0,00196933	0,021283	Varianza	0,00452633	0,00812233	Varianza	0,00068033	0,000243
Observaciones	3	3	Observaciones	3	3	Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0,01162617		Varianza agrupada	0,00632433		Varianza agrupada	0,00046167	
Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0		Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4		Grados de libertad	4		Grados de libertad	4	
Estadístico t	3,6082698		Estadístico t	2,33062742		Estadístico t	5,3200798	
P(T<=t) una cola	0,01129566		P(T<=t) una cola	0,04009848		P(T<=t) una cola	0,00300262	
Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678		Valor crítico de t (una cola)	2,13184678	
P(T<=t) dos colas	0,02259132		P(T<=t) dos colas	0,08019695		P(T<=t) dos colas	0,00600524	
Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511		Valor crítico de t (dos colas)	2,77644511	

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Ma. Elena Cantú Cárdenas

Candidato para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Farmacia

Tesis: INCREMENTO DEL EFECTO CITOTÓXICO DE UN FÁRMACO ANTINEOPLÁSICO MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA FUSOGÉNICA DEL PARAMYXOVIRUS SV5.

Campo de estudio: Farmacia.

Biografía:

Datos personales: Nacida en Monterrey Nuevo León México, el 29 de Enero de 1967, hija de José Santos Cantú Cantú y María Elena Cárdenas Villarreal.

Educación: Egresada en 1986 como Químico Farmacéutico Biólogo y en 2000 con el grado de Maestro en Ciencias con especialidad en Microbiología Industrial, por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Experiencia profesional:

De 1986 a 1988 Químico Analista en Cervecería Cuauhtémoc-Moctezuma, S.A de C.V.

De 1989 a la fecha maestra en la Facultad de Ciencias Químicas, impartiendo materias de las diferentes áreas pero principalmente en el área de Microbiología y Biotecnología. Coordinador de Laboratorios de Microbiología y de la Academia de Biotecnología en la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo de

1995 al 2007, y del 2007 a la fecha Coordinador de la Academia de Formación General Universitaria.

