

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA**



**GENERACION DE UN VARS DIRIGIDO POR EL  
PROMOTOR DEL GEN hGH-N PARA CANCERES  
HIPOFISIARIOS**

**Por  
Q.F.B. ANGELES EDITH ESPINO SALDAÑA**

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

**ENERO, 2005**

TM

RC280

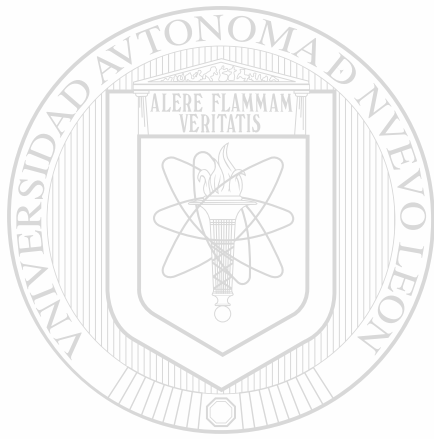
.P5

E7

2005

c.1

**Q.F.B. ANCELTRES EDITIHI ESPINO SALLDANA**



# UANL

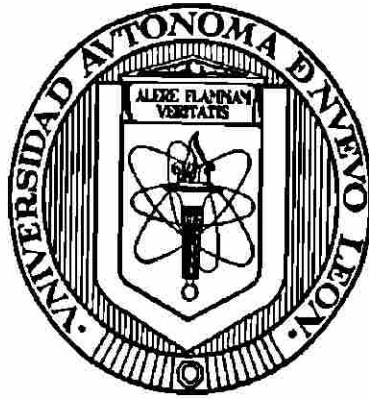
---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**GENERACIÓN DE UN VARS DIRIGIDO POR EL  
PROMOTOR DEL GEN hGH-N PARA CÁNCERES  
HIPOFISIARIOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

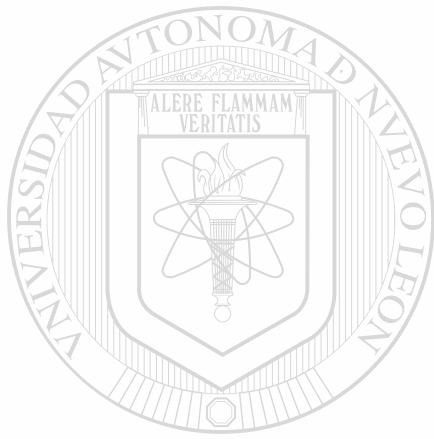
Por

**Q.F.B. ANGELES EDITH ESPINO SALDAÑA**

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

Enero, 2005

TM  
RC 280  
.P5  
E7  
2005



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

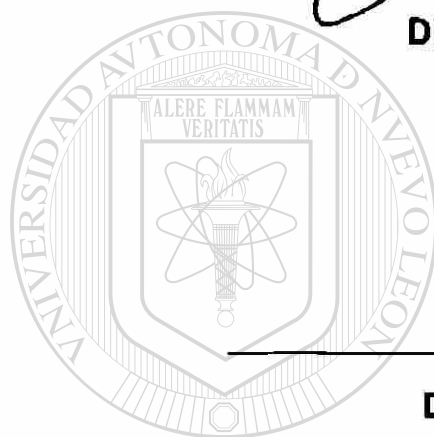


**GENERACIÓN DE UN VARS DIRIGIDO POR EL PROMOTOR DEL GEN  
hGH-N PARA CÁNCERES HIPOFISIARIOS**

Aprobación de la tesis:



**DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ**  
Director de Tesis



**DR. HUGO BARRERA SALDAÑA**  
Co-Director de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**DRA. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**  
Co-Director de Tesis



**DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO**  
Subdirector de investigación  
y estudios de Postgrado

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de  
Terapia Génica de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería  
y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la  
Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Bajo la Dirección del Dr. Augusto Rojas Martínez y la  
Co-Dirección del Dr. Hugo Barrera Saldaña y la  
Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Vo.Bo.

---

**DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ**  
Director de Tesis

## AGRADECIMIENTOS

*Al Dr. Augusto Rojas,*

*Por su valiosa asesoría en la realización de esta Tesis.*

*A la Dra. Herminia Martínez y el Dr. Hugo Barrera Saldaña,*

*Por su gran apoyo y por sus comentarios y sugerencias.*

*A los miembros del laboratorio de Terapia Génica,*

*Ivan, Cristian, Angel, Naica e Irma por sus consejos y por haber compartido su tiempo y sus experiencias conmigo.*

*A todos los miembros de la ULIEG, especialmente a Mary, Margarita, Iram, Polo, Virgilio, Rafa, Karina, Rebeca, Eda, Jorge, Chiu,*

*Victor, Andrés, Denise y Norma (de Postgrado).*

*A los Doctores, Agnés Revol, Francisco Velásquez, Gerardo Padilla,*

*Ana María Rivas y Ricardo Cerda (CIBIN), por haber contribuido a mi formación.*

*A mi familia, Blanca Saldaña, Luis Macías e Iris de María Espino*

*Por todo su apoyo.*

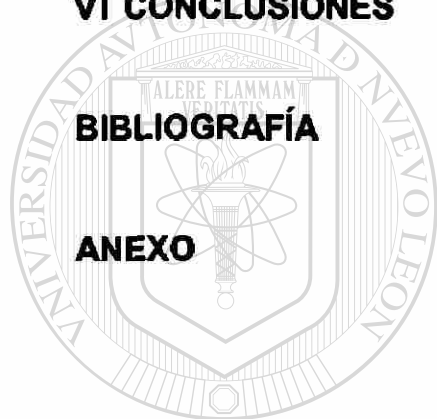


## TABLA DE CONTENIDO

<b>Capítulo</b>	<b>Página</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	v
<b>ABREVIATURAS</b>	vii
<b>RESUMEN</b>	x
<b>I INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Tumores hipofisarios	1
1.1.1 Clasificación de los adenomas hipofisarios	2
1.1.2 Adenomas hipofisarios secretores de GH	2
1.1.3 Tratamiento de los tumores hipofisarios	3
1.2 Terapia viral oncolítica	4
1.3 Adenovirus	6
1.3.1 Vectores adenovirales para terapia viral	8
1.4 Vectores adenovirales de replicación selectiva (VARS)	9
1.4.1 VARS con deleciones en genes virales	10
1.4.2 VARS dirigidos por promotores específicos	10
1.5 Estudios de terapia génica dirigidos a tumores hipofisarios	12
1.6 Actividad del promotor de GH	13
1.7 JUSTIFICACIÓN	15
<b>II OBJETIVOS</b>	16
2.1 OBJETIVO GENERAL	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16

<b>III MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>17</b>
3.1. Origen de los reactivos e insumos	17
3.2 Estrategia general	19
3.3 Origen de los plásmidos pSp_pGH(0.5)E1Awt, pSK-pATK y pSport_pGH(2.3) y su caracterización	20
3.4 Construcción del plásmido pSport-pApGHn(2.3)	22
3.5 Construcción del plásmido pSp_pApGH(2.3)E1Awt	24
3. 6 Estrategia de construcción del plásmido pBGH10_pGH(2.3)E1Awt	26
3.6.1 Purificación del plásmido pBGH10_pGH	27
3.6.2 Cuantificación del plásmido pBGH10_pGH	27
3.6.3 Secuencia de los iniciadores utilizados para secuenciar el promotor de hGH	28
3.7 Transfección de células HEK293 con el plásmido pBGH10_pGH	29
3.8 Estrategia de construcción del plásmido pAdEasy_pGH	29
3.9 Estudios en líneas celulares: Efecto antineoplásico	30
3.9.1 Líneas celulares	31
3.9.2 Análisis de los resultados de los ensayos citopático	31
<b>IV RESULTADOS</b>	<b>32</b>
4.1 Generación del vector acarreador que contenga el gen E1A dirigido por el promotor del gen hGH-N	32
4.1.1 Caracterización de los plásmidos pSp_pGH(0.5)E1Awt, pSK-pATK y pSport_pGH(2.3)	32
4.1.2 Construcción del plásmido intermediario pSport-pApGHn(2.3)	34
4.1.3 Construcción del plásmido acarreador pSp_pApGH(2.3)E1Awt	36
4.2 Generación del vector adenoviral pBGH10_pGH(2.3)E1Awt	38

4.2.1 Construcción del plásmido pBGH10_pGH	38
4.2.2 Secuenciación del promotor de hGH	40
4.3 Transfección de células HEK293 con el plásmido pBGH10_pGH	40
4.4 Construcción del vector adenoviral pAdEasy_pGH	41
4.5 Estrategia alternativa	43
4.5.1 Estudios en líneas celulares: Efecto antineoplásico	44
<b>V DISCUSIÓN</b>	<b>49</b>
<b>VI CONCLUSIONES</b>	<b>53</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO</b>	<b>60</b>



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN<sup>®</sup>  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

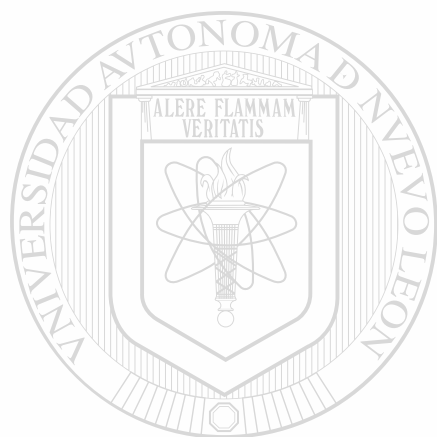
## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los adenomas hipofisarios, listados en orden decreciente de frecuencia	3
<b>Tabla 2.</b> Característica de los vectores virales más usados	5
<b>Tabla 3.</b> Caracterización del plásmido pSk-pATK	21
<b>Tabla 4.</b> Caracterización del plásmido pSp_pGH(0.5)E1Awt	21
<b>Tabla 5.</b> Caracterización del plásmido pSport_pGH(2.3)	22
<b>Tabla 6.</b> Digestiones preparativas del plásmido pSk-pATK (A) y del plásmido pSport_pGH(2.3) (B)	23
<b>Tabla 7.</b> Reacción de ligación del fragmento de la señal de poliadenilación con el plásmido pSport_pGH(2.3)	23
<b>Tabla 8.</b> Digestiones preparativas del plásmido pSport_pApGHn(2.3) y pSp_pGH(0.5)E1Awt	25
<b>Tabla 9.</b> Reacción de ligación del fragmento correspondiente al promotor de hGH y a la señal de poliadenilación con el plásmido pSport_pGH(2.3).	25
<b>Tabla 10.</b> Digestión para linearizar el plásmido acarreador	27
<b>Tabla 11.</b> Valores de significancia resultado de la comparación de la línea hipofisaria contra cada una de las líneas no hipofisarias	47
<b>Tabla. 12.</b> Valores de DL <sub>50</sub> de los VARS AdGH y AdWT e Índices de atenuación citolítica (IAC) en las diferentes líneas celulares	48

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Fig. 1. Micrografía de un adenovirus y esquema de su estructura morfológica y genética típico	7
Fig. 2. Interacción del adenovirus con la célula	8
Fig. 3. Modelo del mecanismo de acción de los VARS con promotores específicos de células tumorales o de tejido	12
Fig. 4. Representación esquemática de la región promotora de los genes del locus hGH/hPL	14
Fig. 5. Estrategia general del trabajo	19
Fig. 6. Mapa de los plásmidos pSp_pGH(0.5)E1Awt, pSk-pATK y pSport_pGH(2.3)	20
Fig. 7. Esquema de la construcción del plásmido pSport_pApGHn(2.3)	22
Fig. 8. Esquema de la construcción del plásmido pSp_pApGH(2.3)E1Awt	24
Fig. 9. Esquema de la construcción del plásmido pBGH10_pGH(2.3)E1Awt	26
Fig. 10. Esquema del promotor de GH	28
Fig. 11. Esquema de la construcción del plásmido pAdEasy_pGH(2.3)E1Awt	30
Fig. 12. Caracterización de los plásmidos pSp_pGH(0.5)E1Awt, pSk-pATK y pSport_pGH(2.3)	33
Fig. 13. Obtención del plásmido pSport_pApGHn(2.3)	35
Fig. 14. Construcción del plásmido acarreador	36
Fig. 15. Obtención del plásmido pSp_pApGH(2.3)E1Awt	37
Fig. 16. Obtención del plásmido pBGH10_pGH(2.3)E1Awt	39
Fig. 17. Esquema de la preparación de pAdEasy_pGH(2.3)E1Awt	41

<b>para la transfección</b>	
<b>Fig. 18. Análisis de las clonas putativas pAdEasy_pGH</b>	<b>42</b>
<b>Fig. 19. Análisis del plásmido pSp_pApGH(2.3)E1Aw</b>	<b>42</b>
<b>Fig. 20. Recaracterización del plásmido pSp_pGH(0.5)E1Aw</b>	<b>43</b>
<b>Fig. 21. Viabilidad celular tras la infección con el VARS</b>	<b>46</b>
<b>Fig. 22. Comparación del efecto del vector AdGH en la línea hipofisiaria contra las líneas no hipofisarias.</b>	<b>47</b>
<b>Fig. 23. Eventos de recombinación entre el plásmido acarreador con la inserción y los esqueletos adenovirales</b>	<b>51</b>



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LISTA DE ABREVIATURAS

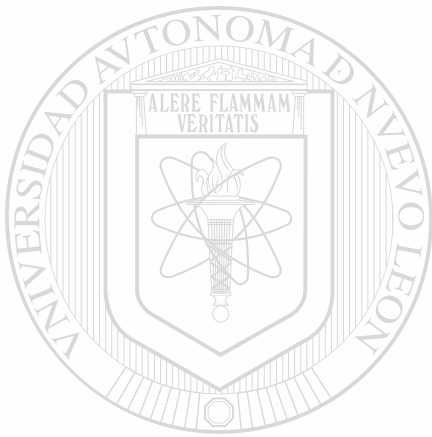
---

<b>Ad</b>	Adenovirus
<b>AdGH</b>	VARs con el promotor de 0.5 kb de hGH-N
<b>AdWT</b>	Adenovirus silvestre
<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotrópica
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal 50
<b>DMEM</b>	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<hr/>	
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetracético.
<b>g</b>	gramos
<b>hGH-N</b>	Hormona de crecimiento humana normal
<b>h</b>	Horas
<b>ITR</b>	Repetición invertida terminal (por sus siglas en inglés)
<b>kb</b>	Kilobases
<b>Log</b>	Logaritmo base 10
<b>M</b>	Molaridad
<b>mg</b>	Miligramos
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloruro de magnesio
<b>min</b>	minutos

<b>ml</b>	<b>Militros</b>
<b>mM</b>	<b>Milimolar</b>
<b>MPM</b>	<b>Marcador de peso molecular</b>
<b>MQ</b>	<b>Agua ultrapura (NANO pore)</b>
<b>µg</b>	<b>Microgramos</b>
<b>µl</b>	<b>Microlitros</b>
<b>µM</b>	<b>Micromolar</b>
<b>No.</b>	<b>Número</b>
<b>NaCl</b>	<b>Cloruro de sodio</b>
<b>ng</b>	<b>Nanogramos</b>
<b>p</b>	<b>Significancia</b>
<b>pb</b>	<b>Pares de bases nucleotídicas</b>
<b>PBS</b>	<b>Solución amortiguadora salina de fosfatos (por su siglas en inglés)</b>
<b>PCR</b>	<b>Reacción en cadena de la polimerasa (por su siglas en inglés)</b>
<b>pGH</b>	<b>Promotor del gen de la hormona de crecimiento humana normal®</b>
<b>pH</b>	<b>Potencial de hidrógeno</b>
<b>poli-A</b>	<b>Poliadenilación</b>
<b>pRb</b>	<b>Proteína de retinoblastoma</b>
<b>PRL</b>	<b>Prolactina</b>
<b>RNA</b>	<b>Ácido ribonucleico</b>
<b>rpm</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>SBF</b>	<b>Suero bovino fetal</b>
<b>seg</b>	<b>Segundos</b>
<b>TBE</b>	<b>Tris-borato-EDTA</b>



<b>TSH</b>	<b>Homona estimuladora de la tiroides</b>
<b>TK</b>	<b>Timidina quinasa</b>
<b>U</b>	<b>Unidades internacionales</b>
<b>UV</b>	<b>Ultravioleta</b>
<b>V</b>	<b>Voltios</b>
<b>VARS</b>	<b>Vectores adenovirales de replicación selectiva</b>
<b>X-gal</b>	<b>Reactivo para revelar la presencia de <math>\beta</math>-galactosidasa</b>



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## RESUMEN

Q.F.B. Ángeles Edlith Espino Saldaña

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina.

Fecha de graduación: Enero, 2005.

Área de estudio: Terapia Génica

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

Número de páginas: 63

Título del estudio: "GENERACIÓN DE UN VARS DIRIGIDO POR EL PROMOTOR DEL GEN hGH-N PARA CÁNCERES HIPOFISIARIOS".

**Introducción.** En México, los tumores hipofisarios ocupan el 2º lugar dentro de las neoplasias intracraneales, después de los gliomas. El tratamiento requiere un abordaje quirúrgico y endocrinológico asociado a efectos adversos en algunos casos. La terapia viral promete ofrecer un tratamiento efectivo con menos efectos colaterales, pero hay pocos estudios dirigidos a demostrar su eficacia en este tipo de tumores. En este proyecto se planteó construir un vector adenoviral de replicación selectiva (VARS) con el promotor del gen hGH-N de 2.3 kb. El mecanismo empleado por este virus sería la lisis de las células tumorales debido a la producción y liberación selectiva de la progenie viral en este tipo celular.

**Objetivo.** Generar y demostrar la eficacia antineoplásica y la selectividad de un VARS para tumores hipofisarios, en el cual el promotor del gen hGH-N dirija la actividad del gen E1A que a su vez controla la replicación del vector.

**Material y Métodos:** Se planteó construir un plásmido acarreador portador del promotor de 2.3 kb de hGH-N. Posteriormente, se construyó un plásmido adenoviral con este promotor por recombinación, a partir del plásmido acarreador construido y un plásmido que contiene el genoma adenoviral. Con este vector, se transfectaron células HEK293 para generar partículas virales. Se determinó el efecto oncolítico en varias líneas celulares hipofisarias y no hipofisarias mediante un ensayo de medición de actividad metabólica con Azul Alamar®.

**Resultados:** No se logró generar el adenovirus recombinante con el promotor de 2.3 kb del gen hGH-N. Como alternativa, se estudió el efecto oncolítico del VARS dirigido por la versión corta de 500 pb del promotor de hGH-N, el cual es una versión más corta del promotor que se planeaba utilizar en este trabajo. Este VARS mostró ser específico y potente para células de hipófisis.

**Contribuciones y Conclusiones:** El VARS que contiene el promotor de hGH de 0.5 kb mostró cierta selectividad y una potencia oncolítica suficientes como para seguir explotando su potencial uso terapéutico contra tumores hipofisarios. Estos resultados alientan a tratar de superar los obstáculos encontrados en este trabajo para construir el VARS que tenga la versión larga del promotor, con lo que se esperaría generar un vector que sea más potente y específico.



DR. AUGUSTO ROJAS M.  
Director de tesis



DR. HUGO BARRERA S.  
Co-Director de tesis



DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ R.  
Co-Director de tesis

## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

En México, los tumores hipofisarios ocupan el 2º lugar dentro de las neoplasias intracraneales, después de los gliomas<sup>1</sup>. El tratamiento requiere un abordaje quirúrgico y endocrinológico, pero está asociado a efectos adversos en algunos casos. La terapia viral promete ofrecer un tratamiento efectivo con menos efectos colaterales, pero hay pocos estudios dirigidos a demostrar su eficacia en este tipo de tumores. Es por esto que en este trabajo se planteó construir un vector adenoviral de replicación selectiva (VARS) con el promotor completo del gen hGH-N de 2.3 kb. El mecanismo empleado por este virus sería la lisis selectiva de las células hipofisarias tumorales debido a la producción y liberación de la progenie viral.

#### **1.1 Tumores hipofisarios**

Los adenomas hipofisarios son tumores epiteliales que proceden de la adenohipófisis y pueden manifestarse con síntomas neurológicos<sup>1</sup>. Estos van desde efectos locales debidos al crecimiento tumoral, como dolores de cabeza, alteraciones visuales, presión intracraneal incrementada; hasta una variedad de entidades clínicas dependiendo de las hormonas que se secreten. Estos tumores pueden ser encontrados en cualquier edad, aunque raramente aparecen antes de la pubertad<sup>2</sup>.

### **1.1.1 Clasificación de los adenomas hipofisarios**

Se han propuesto varias clasificaciones. Estas consideran los hallazgos clínicos y de laboratorio, resultados de imagenología, pruebas histológicas e inmunoquímicas y características ultraestructurales de las células tumorales, pero solo algunas de ellas han sido aceptadas por la "Clasificación Histológica de Tumores de la Organización Internacional de la Salud" (Health Organization International Histological Classification of Tumours)<sup>3</sup>. Una de estas clasificaciones, intenta abarcar varios de estos aspectos, enfatizando la relación estructura-función y correlacionando las características morfológicas con la actividad secretora del tumor (Tabla1).

### **1.1.2 Adenomas hipofisarios secretores de GH**

Estos adenomas conforman el 30% de todos los tumores hipofisarios endocrinos activos. En la mayoría de los pacientes se presentan como macroadenomas a una edad entre los 30 y los 50 años. Tienen un curso subclínico largo que va de 4 a 10 años<sup>5</sup>. El exceso de GH, generalmente se manifiesta como acromegalia o gigantismo. Algunos pacientes desarrollan organomegalia, hipertensión, cardiomiopatía, falla cardíaca congestiva, enfermedad restrictiva pulmonar, apnea del sueño y artropatías. Los síntomas progresivos están asociados con una mortalidad de hasta un 50% en pacientes no tratados<sup>6</sup>.

**Tabla 1. Clasificación de los adenomas hipofisarios, listados en orden decreciente de frecuencia<sup>4</sup>.**

Origen celular del adenoma	Hormona secretada	Síndrome clínico
Lactotrófico	Prl	Hipogandismo, amenorrea-galactorrea, infertilidad, en hombres decremento de la libido e impotencia.
Gonadotrófico	FSH, LH, subunidad $\alpha$	Hipogonadismo o asintomático
Somatotrófico	GH	Acromegalia, gigantismo
Corticotrófico	ACTH	Enfermedad de Cushing
Mezcla de células productoras de GH y Prl	Prl, GH	Acromegalia, o hipogonadismo
Células madre acidofílicas	Prl, GH	Hipogonadismo, acromegalia
Mamosomatotróficos	Prl, GH	Hipogonadismo, acromegalia
Tirotrófico	TSH	Hipertiroidismo
Células nulas	--	Fallo en el funcionamiento de la hipófisis
Oncocitoma	--	Fallo en el funcionamiento de la hipófisis

### 1.1.3 Tratamiento de los tumores hipofisarios

El tratamiento de estos tumores requiere un abordaje quirúrgico y endocrinológico de manera simultánea<sup>7</sup>. Para los microadenomas, la cirugía trans-esfenoidal, es exitosa en 70-90% de los casos<sup>8</sup>. Sin embargo los grandes macroadenomas raramente son eliminados en su totalidad únicamente con la cirugía<sup>9</sup>. Para algunos tipos de tumores hipofisarios hay disponible terapia farmacológica, pero ésta no elimina el tumor, y si se interrumpe su uso, hay regresión tumoral. Algunos pacientes no responden a los medicamentos o no

pueden tolerar los efectos secundarios que causan. En pacientes con tumores somatotrofos, el uso de radiación convencional externa reduce los niveles de GH en el 50 a 70% de los casos, pero para que esto suceda se requieren hasta 10 años de tratamiento<sup>10</sup>.

Aunque ha habido avances importantes en el tratamiento de los tumores hipofisarios, todavía no está disponible una terapia completamente satisfactoria. El surgimiento de nuevas modalidades terapéuticas, tales como la terapia génica y terapia viral, abre la vía a la investigación y desarrollo de tratamientos experimentales novedosos y alternativos para el tratamiento de estos tumores. Estos podrían enfocarse simultáneamente a eliminar o limitar la expansión de la masa tumoral y disminuir las complicaciones quirúrgicas asociadas al tratamiento de estas neoplasias.

## **1.2 Terapia viral oncolítica**

En la terapia viral, los vectores empleados "infectan" las células tumorales y contienen, salvo pequeñas deleciones, el grupo completo de genes que les permiten propagarse. Esto es diferente en los vectores de terapia génica convencional, donde los virus que son empleados como vehículos de genes terapéuticos para transducir las células blanco no pueden replicarse<sup>11</sup>. Los mecanismos empleados por los virus replicativos para atacar las células tumorales son:

- a) Ruptura directa de la célula como consecuencia de la producción y liberación de la progenie.
- b) Producción de toxinas constitutivas del virus o codificadas en un gen heterólogo.

c) Activación de la respuesta inmune.

Actualmente, se están desarrollando diferentes vectores virales, cada uno con sus ventajas y desventajas. La mayoría de los estudios están enfocados en retrovirus<sup>12</sup>, adenovirus<sup>13</sup>, lentivirus<sup>14</sup>, virus herpes simples (HSV)<sup>15</sup> y virus adeno-asociados (AAV)<sup>16</sup> (Tabla 2).

**Tabla 2. Característica de los vectores virales más usados [Modificado de (11)].**

Vector	Genoma	Ventajas	Desventajas
Retrovirus	Virus diploides de RNA de cadena sencilla.	Alta expresión prolongada. Alta eficiencia de transfección <i>ex vivo</i> . Baja inmunogenicidad.	Baja eficiencia de transfección <i>in vivo</i> . Límite de tamaño del inserto de 8 kb. Transfección solo de células proliferativas. Puede haber mutagénesis insercional porque se puede integrar al DNA.
Adenovirus	Virus de DNA lineal de doble cadena.	Alta eficiencia de transfección <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> . Transfección de células proliferativas y no proliferativas.	Genera respuesta inmune. Límite de tamaño del inserto de 7.5 kb. Corta duración de la expresión.
Lentivirus	Virus diploides de RNA de cadena sencilla, de la familia de los retrovirus.	Transfección de células proliferativas y no proliferativas. Baja inmunogenicidad.	Límite de tamaño del inserto de 4.5 kb. Manufactura y control de calidad muy difícil. Puede haber mutagénesis insercional. Genera respuesta inmune.
HSV	Virus de DNA de doble cadena lineal con envoltura.	Su genoma permite insertos muy grandes. Expresión del transgen por tiempos muy prolongados.	Altamente tóxico. Genera respuesta inmune.
AAV	Parvovirus simple de DNA lineal de cadena sencilla.	Buena eficiencia de transfección en una gran variedad de células <i>in vivo</i> . Expresión muy prolongada <i>in vivo</i> . Baja inmunogenicidad.	Eficiencia de transfección muy baja <i>in vivo</i> . Muy baja duración de la expresión.

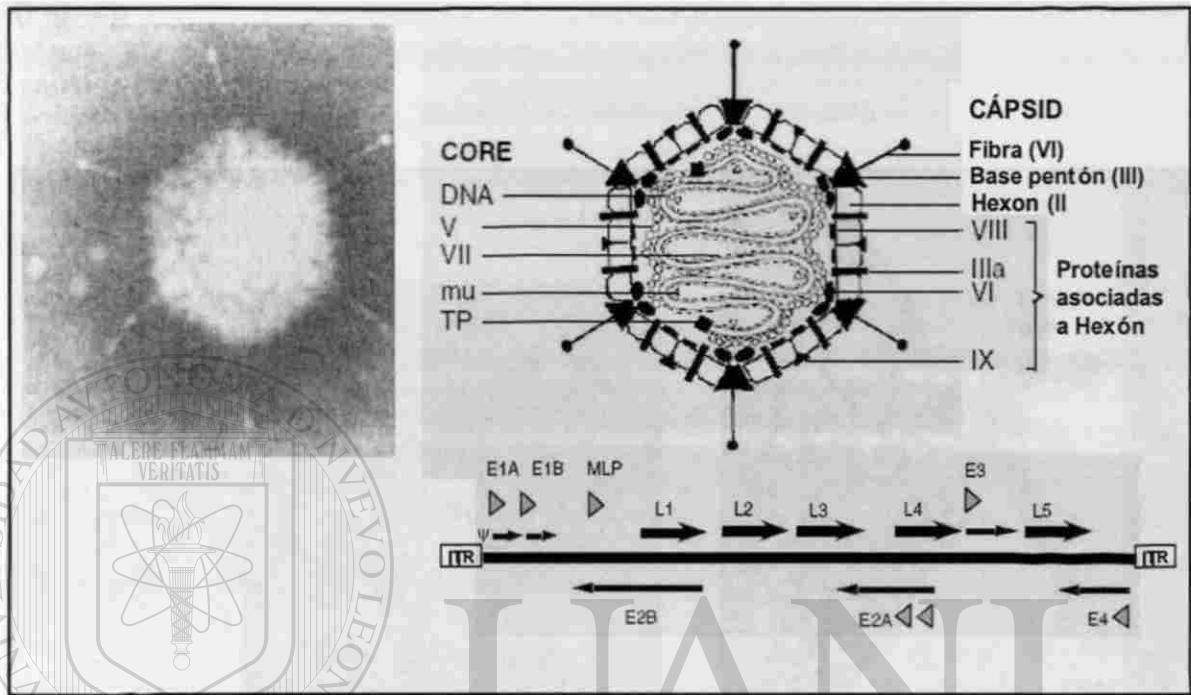
En los últimos años se han comenzado a investigar otros virus aunque en menor grado, tales como los reovirus<sup>18</sup>, los poxvirus, los virus de la enfermedad de Newcastle<sup>19</sup>, los alfavirus<sup>20</sup> y los virus de estomatitis vesicular<sup>21</sup>.

### 1.3 Adenovirus

Los vectores adenovirales se derivan de los adenovirus humanos que pertenecen a la familia *Adenoviridae*. Se conocen más de 50 serotipos virales diferentes, clasificados en 6 subgrupos que van del A al F<sup>22</sup>.

La partícula viral contiene 13 % de DNA y 87% de proteína. La cápside es un icosaedro de 65 a 80 nm de diámetro y está compuesta de las proteínas pentón, hexón y fibra. Su genoma es lineal y tiene una longitud de aproximadamente 38 kb. Contiene cuatro grupos de genes de transcripción temprana: E1, E2, E3 y E4. Cuando el DNA del virus llega al núcleo, el grupo E1 es el primero que se expresa. Contiene las unidades de transcripción E1A y E1B. Ambas codifican, entre otras, para proteínas virales que inactivan a proteínas de la célula huésped involucradas en la regulación del ciclo celular y la apoptosis, tales como Rb y p53. De esta manera, se induce a la célula a entrar en mitosis, se bloquea la apoptosis, y después de esto el adenovirus es capaz de replicarse, asegurando así la perpetuidad del virus<sup>23</sup>. La región E3 codifica proteínas que le permiten al virus evadir la respuesta inmune<sup>24</sup> (Fig.1).

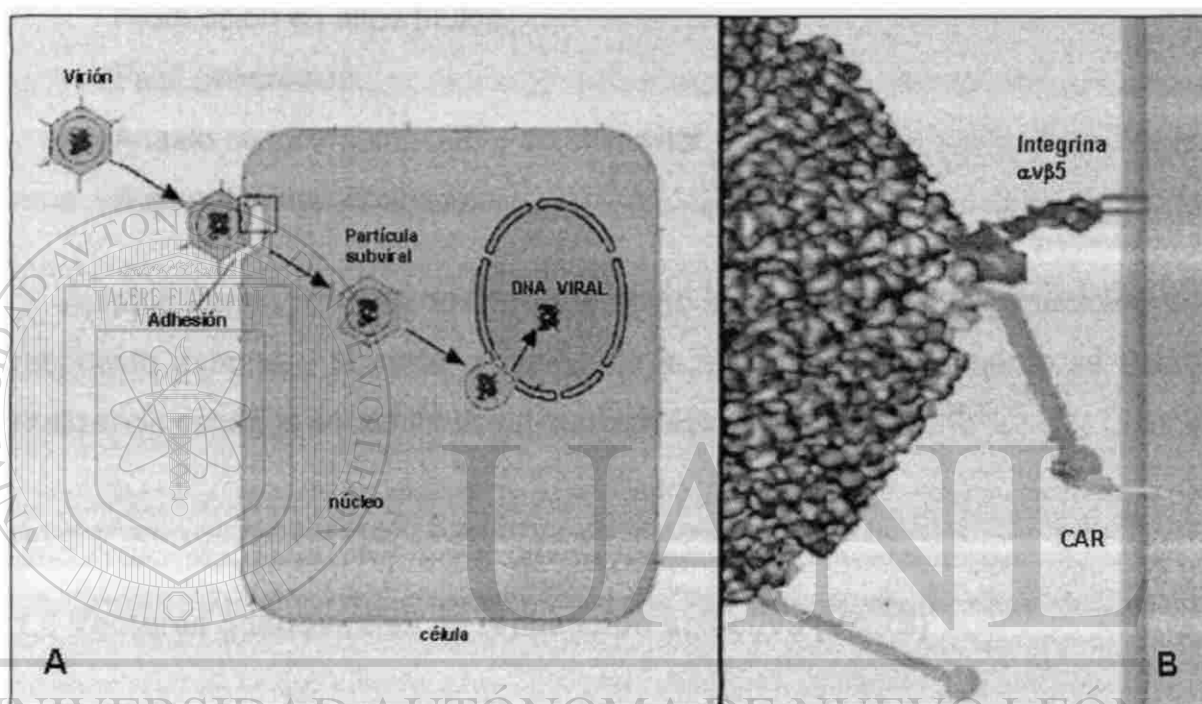




**Fig. 1.** Micrografía de un adenovirus y esquema de su estructura morfológica y genética típica [Modificado de (22 y 25)]. ITR, repetición invertida terminal;  $\Psi$ , señal de empaquetamiento; E1A/B, codifican para proteínas involucradas en la regulación de la transcripción de genes virales; E2A/B, codifican para proteínas involucradas en replicación vira; E3, involucrada en la prevención de la citólisis por linfocitos T y citocinas; E4, involucrada en la replicación del DNA; MLP, promotor mayor tardío, dirige la transcripción de los genes tardíos; L1-L5, genes tardíos, codifican los elementos estructurales de los virus.

La infección viral se inicia cuando la proteína fibra del adenovirus se une al receptor de coxsackie y adenovirus (CAR) que se encuentra en la superficie de la célula<sup>26</sup>, seguida de una interacción secundaria entre el pentón del adenovirus y las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$  de la célula<sup>27</sup>. El adenovirus entra a la célula por endocitosis, accionado por la interacción pentón-integrina y escapa del endosoma antes de que se forme el lisosoma. El virión es transportado al

núcleo a través de la red de microtúbulos. Durante este tiempo se va desensamblando y la proteína hexón se mantiene en la membrana nuclear mientras el DNA es librado dentro del núcleo y se mantiene en forma episomal<sup>28</sup> (Fig. 2).



**Fig. 2. Interacción del adenovirus con la célula<sup>29</sup>.** A) Eventos tempranos de la infección por adenovirus: unión a los receptores de la célula, penetración del virus, pérdida de la cápside e introducción del DNA al núcleo de la célula<sup>30</sup>. B) Modelo de la interacción del adenovirus con los receptores de la superficie de la célula<sup>31</sup>. La fibra es reconocida por el receptor adenoviral y de coxsackie (CAR) y luego la proteína pentón se une a las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$ .

### 1.3.1 Vectores adenovirales para terapia viral

Los vectores adenovirales ofrecen muchas ventajas sobre los otros vectores y están siendo usados ampliamente en protocolos de terapia viral<sup>32</sup>.

Las principales ventajas que ofrecen son:

- Alta eficiencia de transducción.
- Expresión en células tanto proliferativas como no proliferativas.
- No integración cromosómica.
- Accesibilidad de su genoma en forma de plásmidos
- Producción en altos títulos.
- Fácil generación.
- Amplio conocimiento sobre su ciclo vital.
- Bajo potencial citotóxico.

Aunque tienen algunas desventajas como la citotoxicidad, la generación de respuesta inmune y la corta duración de la expresión, actualmente se están realizando estudios encaminados a superar estos problemas<sup>33,34,35</sup>.

#### **1.4 Vectores adenovirales de replicación selectiva (VARS)**

Estos vectores tienen la capacidad de replicarse de manera casi exclusiva en un tejido tumoral bajo condiciones moleculares muy específicas, lo que permite eliminar a dichas células mediante un proceso infeccioso limitado. Adicionalmente, la replicación amplifica la dosis de entrada de los adenovirus oncolíticos y ayuda a tener una mejor diseminación del agente hacia células tumorales vecinas<sup>36</sup>.

En años recientes se han desarrollado dos estrategias básicas para lograr la replicación selectiva en el tejido tumoral, las cuales se describen a continuación.

### **1.4.1 VARS con deleciones en genes virales**

En la primera estrategia, se provocan deleciones en genes virales que son prescindibles en células tumorales, como los genes responsables de activar el ciclo celular o de controlar la apoptosis al unirse a Rb o p53 respectivamente. El representante más notorio de este grupo es el vector ONYX-015 (dl1520)<sup>37</sup>, que tiene una deleción del gen E1B-55kD y por lo tanto, es incapaz de interactuar con p53. Este vector mostró resultados muy alentadores para el tratamiento de cáncer de cuello, páncreas, ovario, colon y oral<sup>38</sup>, alcanzando estudios preclínicos I, II y III en algunos casos. Pero estudios recientes han reportado una falta de correlación entre el estatus de p53 y la replicación de dl1520. La línea celular U373, carente de la función de la proteína p53 (p53<sup>-</sup>), produce niveles 100 veces menores de dl1520 que del adenovirus silvestre; por otra parte, la línea celular U87, con una proteína p53 funcional (p53<sup>+</sup>) es capaz de sostener la replicación de ambos tipos virales<sup>39</sup>.

Otro mutante adenoviral propuesto para replicación específica está basado en una deleción de la región E1A en el sitio de unión al pRb. Estos mutantes no pueden inducir a las células a pasar el punto de control G1/S y progresar a la mitosis. Un vector con una de estas mutaciones, llamado Ad $\Delta$ 24<sup>®</sup>, ha sido uno de los VARS que logra mejor replicación en células neoplásicas, tanto en cultivo, como en células implantadas en modelos murinos<sup>40</sup>. Recientemente, se ha descrito el efecto antineoplásico de VARS con E1A $\Delta$ 24 en líneas de CaCU y en epitelio de prepucio transformado con E6/7 de HPV-16<sup>41</sup>.

### **1.4.2 VARS dirigidos por promotores específicos**

En la segunda estrategia, la transcripción de genes virales ha sido controlada reemplazando los promotores virales nativos por promotores tejido

específicos (Fig. 3). En los vectores CN706<sup>42</sup> y CV787<sup>43</sup> se sustituyó el promotor del gen E1A por el promotor del gen del antígeno prostático específico (PSA) y del gen de la probasina, respectivamente; ambos vectores se replican específicamente en células de próstata y están diseñados para el tratamiento del cáncer de dicha glándula. También, se ha usado el promotor del antígeno carcinoembrionario (CEA) en las neoplasias del tracto gastrointestinal y en líneas celulares de cáncer de pulmón<sup>44</sup>; el promotor del gen de la  $\alpha$ -fetoproteína se ha usado en cáncer hepatocelular<sup>45</sup> y el de la L-plastina en el de ovario<sup>46</sup>.

Las células hipofisarias, debido al patrón de expresión específico de los genes de las hormonas que sintetizan, representa un modelo ideal para el desarrollo de vectores de replicación selectiva. Dentro de dichos genes se encuentran los de las principales hormonas hipofisarias, como la hormona de crecimiento (GH) y la prolactina (Prl), así como los factores transcripcionales involucrados en el desarrollo de la glándula, como el GHF-1 (también llamado Pit-1)<sup>47</sup>.

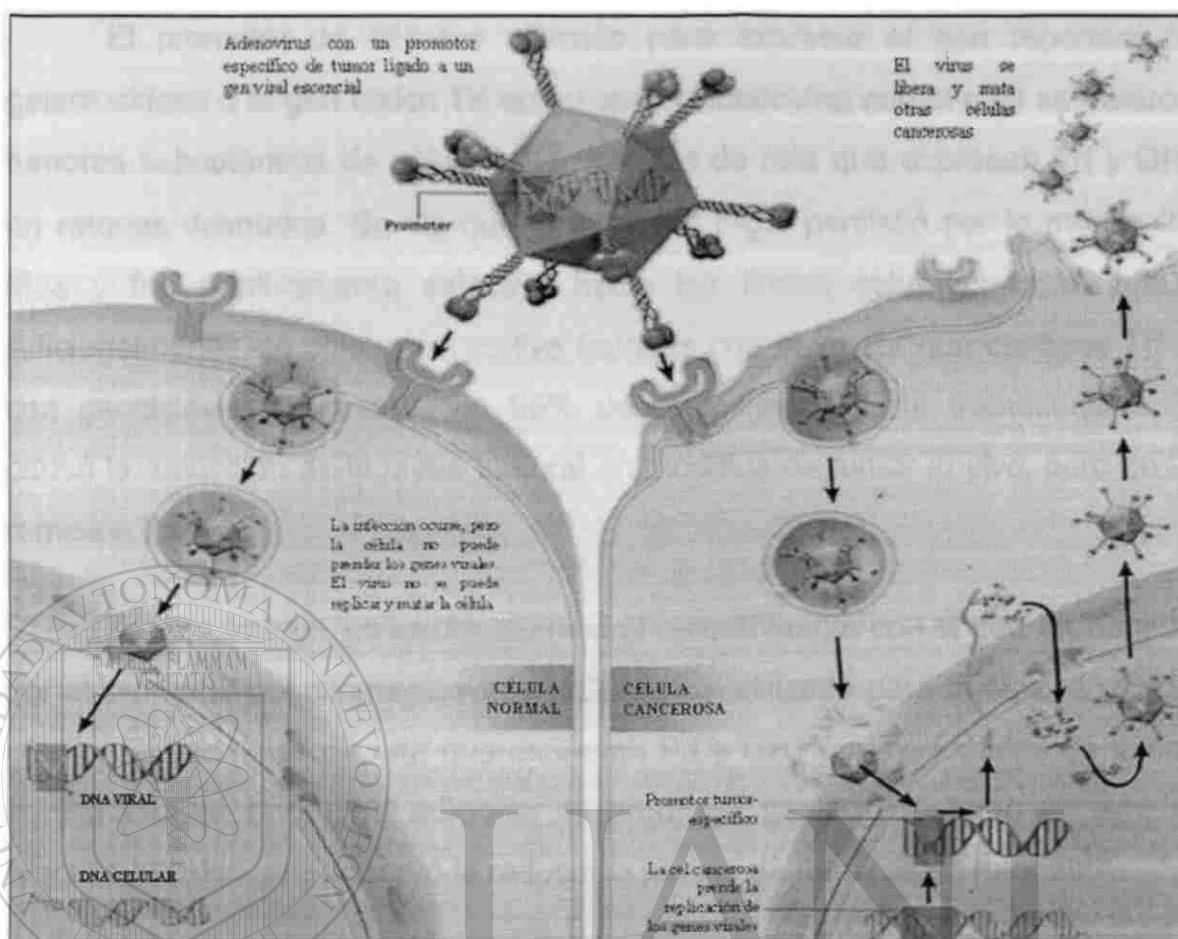


Fig. 3. Modelo del mecanismo de acción de los VARS con promotores específicos de tejido. Al infectar una célula tumoral, el promotor específico que contiene el VARS es activo, y por lo tanto, el virus se replica y mata a la célula al liberarse la progenie. Al entrar a una célula normal, como el promotor es inactivo, el virus es incapaz de replicarse.

### 1.5 Estudios de terapia génica dirigidos a tumores hipofisarios

A la fecha se han realizado diversos estudios de terapia génica para abordar a los adenomas hipofisarios<sup>48,49,50</sup>. Sin embargo, son pocos los trabajos donde se ha tomado la ventaja de usar algún promotor específico para dirigir el efecto terapéutico de un vector adenoviral. En todos estos casos se han utilizado vectores adenovirales no replicantes<sup>51,52, 53,54</sup>.

El promotor de GH fue utilizado para expresar el gen reportero  $\beta$ -galactosidasa o el gen tóxico TK en un vector adenoviral con el cual se trataron tumores subcutáneos de células GH<sub>3</sub> (células de rata que expresan Prl y GH) en ratones desnudos. Se vio que la actividad  $\beta$ -gal persistió por lo menos 21 días y fue relativamente selectivo hacia las líneas celulares hipofisarias. Adicionalmente, en células en cultivo tratadas con el vector que contiene TK y con ganciclovir, se observó un 95% de citotoxicidad. Este tratamiento solo causó la reducción de la masa tumoral en modelos de tumor *in vivo*, pero no la remisión total<sup>51,52</sup>.

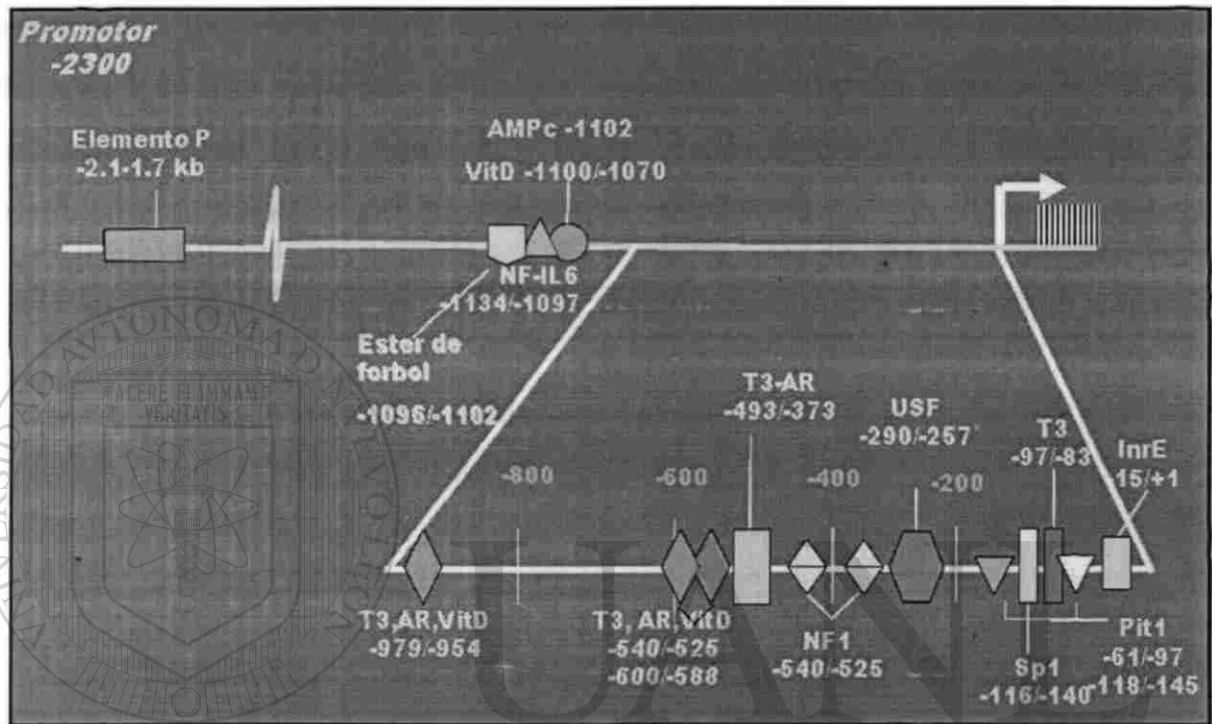
En otro trabajo, un vector adenoviral recombinante con el gen TK dirigido por el promotor del citomegalovirus (hCMV) fue utilizado para tratar cultivos de células GH<sub>3</sub> (células de rata que expresan Prl y GH) y AtT<sub>20</sub> (células de tumor corticotrofo de ratón). Al adicionar la prodroga ganciclovir, hubo un amplio efecto citotóxico y se observó la reducción parcial de tumores en ratones<sup>53</sup>.

También un vector con el gen TK, pero bajo el control del promotor Prl, mostró buenos resultados en células GH<sub>3</sub> en cultivo, pero no fue capaz de reducir la masa tumoral *in vivo* de prolactinomas<sup>54</sup>.

## 1.6 Actividad del promotor de GH

Castillo-Ureta y cols., utilizaron 2 versiones del promotor de GH de 0.5 o de 2.3 kb (Fig. 4) para construir vectores de expresión donde el gen de  $\beta$ -galactosidasa fuera controlado por estas versiones del promotor, con los cuales transfectaron tanto células hipofisarias CN4 como células derivadas de placenta (JAR). Se observó que el promotor de 2.3 kb tiene mayor especificidad tisular y que es tres veces más activo que el de 0.5 kb<sup>55</sup>. Por eso se decidió en el presente trabajo utilizar el promotor de 2.3 kb para dirigir la transcripción del

gen E1A del adenovirus para obtener un vector adenoviral que sea más selectivo y más potente que el que contiene el promotor de 0.5 kb.



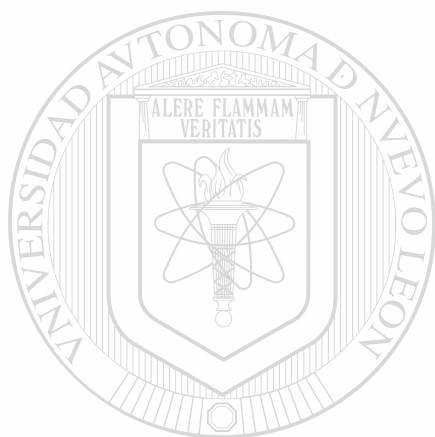
**Fig. 4. Representación esquemática de la región promotora de los genes del locus hGH/hPL. La región promotora posee distintos elementos de acción en cis sobre los cuales se unen distintos factores transcripcionales basales y específicos de tejido (modificado de [55,56]).**

Con el objeto generar un nuevo esquema de terapia que sea altamente eficiente para el tratamiento de adenomas hipofisarios, en el presente proyecto planteamos emplear la ya probada especificidad del promotor GH para dirigir la replicación de un adenovirus que destruya selectivamente a la estirpe celular formadora del tumor hipofisario.



## 1.7 JUSTIFICACIÓN

Debido a que el tratamiento de los tumores hipofisarios puede estar asociado a efectos adversos, se hace necesario investigar nuevas alternativas terapéuticas que sean más eficientes. Por ello, se propuso generar un VARS específico para estos tumores y hacer ensayos preclínicos tendientes a demostrar su potencia antineoplásica y su selectividad.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## **CAPÍTULO II**

### **OBJETIVOS**

#### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Generar y demostrar la eficacia antineoplásica y la selectividad de un VARS para tumores hipofisarios, en el cual el promotor del gen hGH-N dirija la actividad replicativa del gen E1A del adenovirus.

#### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Generar el plásmido acarreador que contenga el gen E1A dirigido por el promotor del gen hGH-N.
2. Generar el vector adenoviral por recombinación con el vector acarreador. ®
3. Generar partículas virales y producirlas a gran escala.
4. Demostrar el efecto oncolítico en ensayos con Azul Alamar® y determinar la atenuación del vector en las diferentes líneas celulares.

## CAPÍTULO III

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Origen de los reactivos e insumos

A continuación se citan las casas comerciales en donde se adquirieron los principales reactivos empleados en este trabajo:

**a. Becton Dickinson – Difco (Sparks, MD, EUA)**

Bacto agar, extracto de levadura bacto, triptona.

**b. Biosource International (Camarillo, California, EUA)**

Azul Alamar.

**c. Corning (NY, EUA)**

Criotubos 2ml, botella para cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup>, botella para cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup>, botella para cultivo celular de 150 cm<sup>2</sup>.

**d. Costar (NY, EUA)**

Pipeta serológica Stripette 5, 10 y 25 ml, plato de cultivo celular de 24 y 96 pozos.

**e. Hyclone (Logan Utah, EUA)**

Tripsina 0.25%, suero fetal bovino, suero de ternera.

**f. Invitrogen (California, EUA)**

Lipofectamina, reactivo Plus, agarosa ultrapura.

**g. New England BioLabs (Beverly, MA, EUA)**

Enzimas de restricción, DNA polimerasa de T4, DNA ligasa de T4.

**h. QIAGEN (Valencia, California, EUA; Alemania)**

QIAEX II Gel extraction kit, QIAGEN plasmid midi kit.

**i. SIGMA-ALDRICH (Steinheim, Alemania; St. Louis MO, EUA)**

DMEM

Glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ).

Acetato de potasio ( $CH_3COOK$ ).

Alcohol etílico ( $C_2H_5OH$ ).

Hidróxido de amonio ( $NH_4OH$ ).

Hidróxido de sodio ( $NaOH$ ).

Fosfato dibásico de sodio ( $Na_2HPO_4$ ).

Fosfato monobásico de potasio ( $NaH_2PO_4$ ).

Cloruro de sodio ( $NaCl$ ).

Cloruro de potasio ( $KCl$ ).

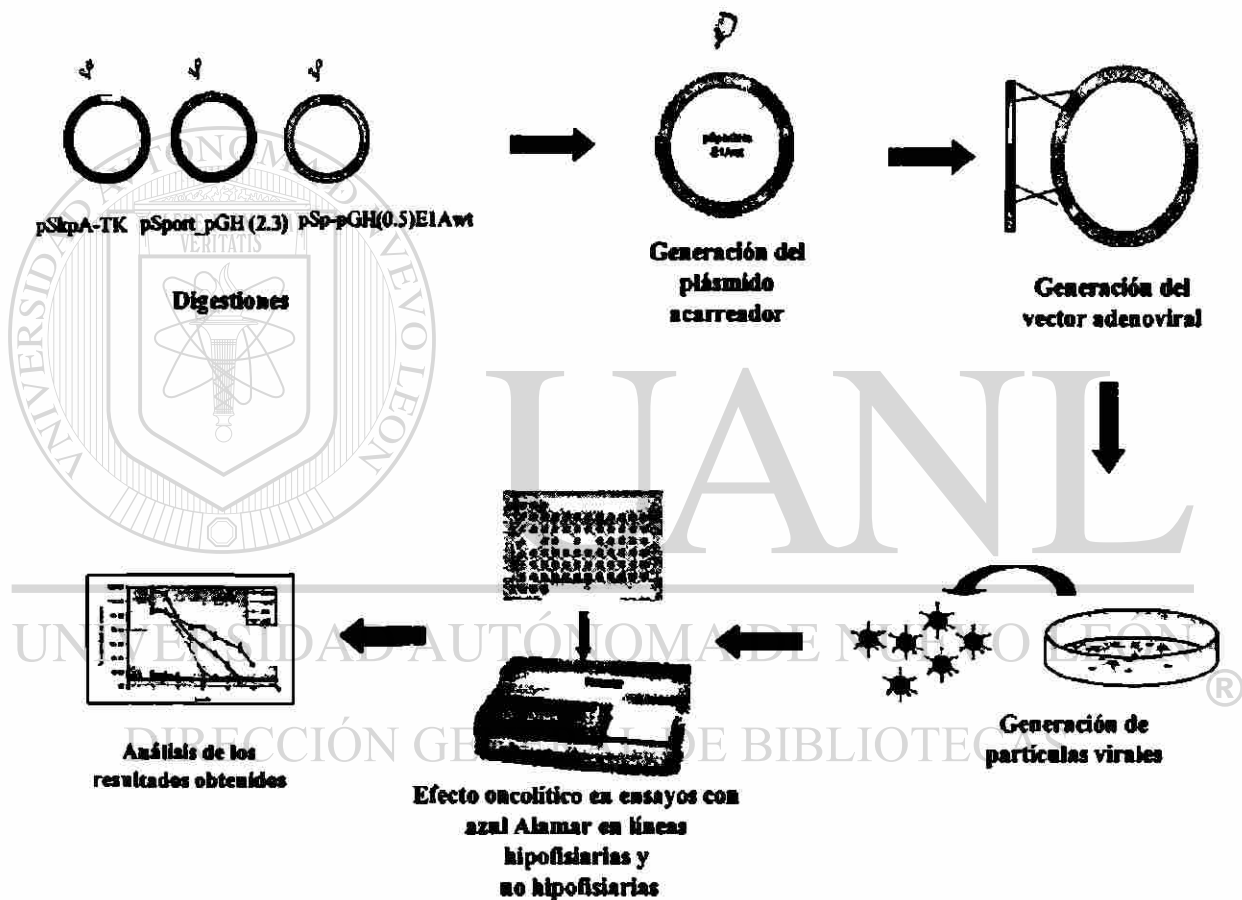
Cloruro de calcio ( $CaCl_2$ ).

Sulfato de magnesio ( $Mg SO_4$ ).

Dodecil sulfato de sodio SDS (L-5750).

### 3.2 Estrategia general

El esquema general de la estrategia utilizada en este trabajo se ilustra en la figura 5.



**Fig. 5. Estrategia general del trabajo.** La estrategia general de este proyecto se llevó a cabo de la siguiente manera: Construir un plásmido acarreador que contenga el promotor de 2.3 kb de hGH-N dirigiendo la expresión del gen adenoviral E1A y precedido por una señal de poliadenilación. Enseguida, construir el vector adenoviral a partir del plásmido acarreador construido y un plásmido que contiene el genoma adenoviral. Con este vector, transfectar células HEK293 para producir partículas virales. Determinar el efecto oncolítico del virus construido en varias líneas celulares hipofisarias y no hipofisarias. Y finalmente, analizar los resultados.

### 3.3 Origen de los plásmidos pSp\_pGH(0.5)E1Awt, pSk-pATK y pSport\_pGH(2.3) y su caracterización

El plásmido pSk-pATK que contiene la señal de poliadenilación y el plásmido pSp\_pGH(0.5)E1Awt que tiene los sitios de homología con el plásmido adenoviral fueron construidos por Delgado-Enciso<sup>56</sup>. El plásmido pSport-pGHn(2.3) que contiene el promotor largo de hGH-N fue construido por Castillo-Ureta<sup>55</sup>. Los mapas de restricción de estos plásmidos se muestran en la Fig. 6. Estos plásmidos fueron propagados en células XL1-Blue. El DNA plasmídico fue extraído utilizando los métodos de mini y midiprep descritos por Sambrook y Russell<sup>57</sup>. Una vez propagados, fueron caracterizados utilizando enzimas de restricción que flanquearan o cortaran los sitios de interés. Las condiciones de las reacciones se muestran en las tablas 3, 4 y 5.

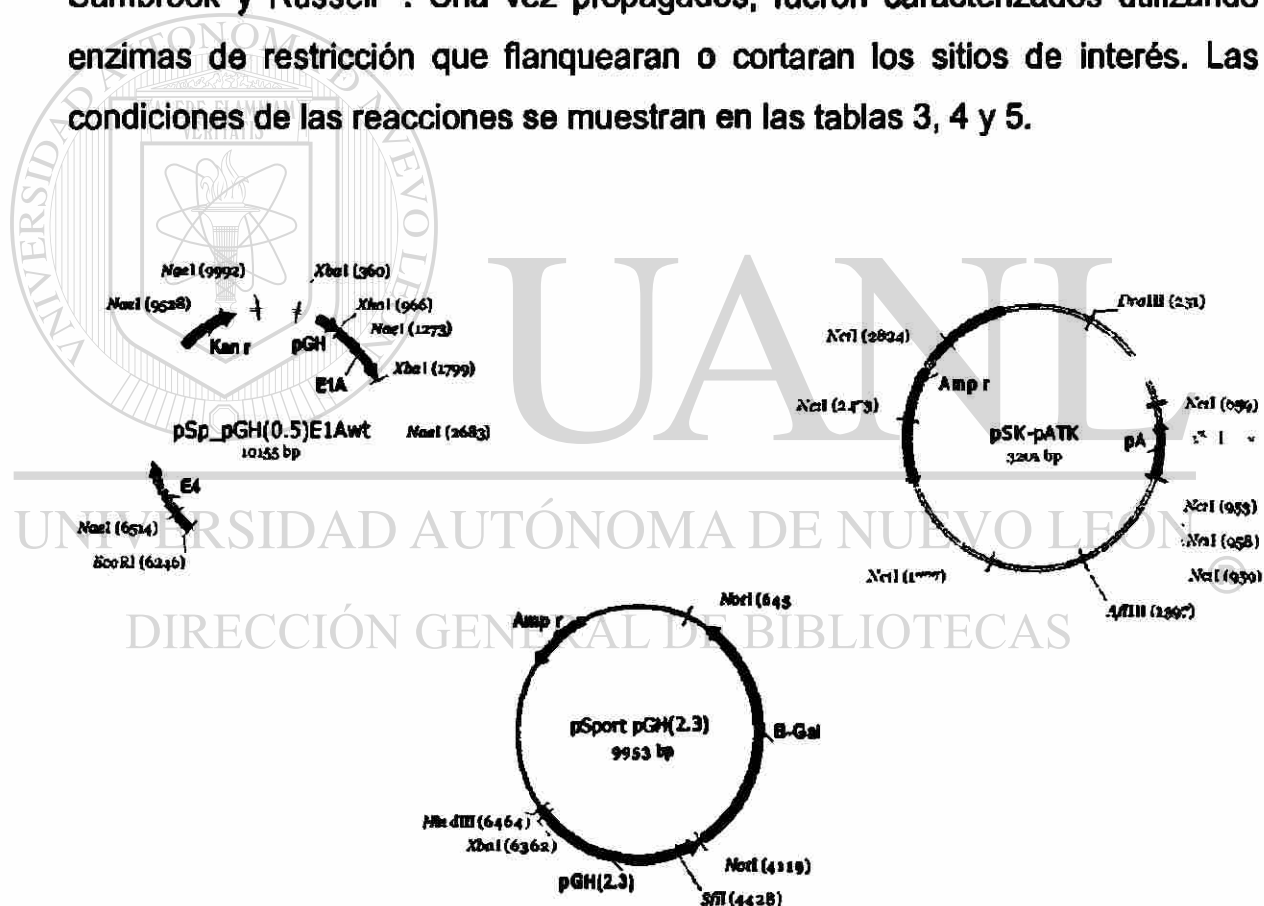


Fig. 6. Mapa de los plásmidos pSp\_pGH(0.5)E1Awt, pSk-pATK y pSport\_pGH(2.3). Mapa de los plásmidos que se utilizaron para construir el vector acarreador, donde se indican los sitios de corte de las enzimas con las que se caracterizaron y los elementos más importantes que contienen.

**Tabla 3. Caracterización del plásmido pSk-pATK.**

Reactivo	Volumen (1x)	Reactivo	Volumen (1x)	Reactivo	Volumen (1x)
Agua MQ	5.5 µl	Agua MQ	4.5 µl	Agua MQ	6.0 µl
NEBuffer 2 10X	1.0 µl	NEBuffer 3 10X	1.0 µl	NEBuffer 4 10X	1.0 µl
BSA 10X	1.0 µl	BSA 10X	1.0 µl	<b>NciI</b> 10 U/µl	1.0 µl
<b>XhoI</b> 20 U/µl	0.5 µl	<b>DraIII</b> 20 U/µl	0.5 µl	DNA ~ 2 µg/µl.	2.0 µl
DNA ~ 2 µg/µl.	2.0 µl	<b>AflIII</b> 5 U/µl	1.0 µl	<b>Volumen total</b>	10.0 µl
<b>Volumen total</b>	10.0 µl	DNA ~ 2 µg/µl.	2.0 µl		
		<b>Volumen total</b>	10.0 µl		

**Tabla 4. Caracterización del plásmido pSp\_pGH(0.5)E1Awt.**

Reactivo	Volumen (1x)	Reactivo	Volumen (1x)	Reactivo	Volumen (1x)
Agua MQ	5.5 µl	Agua MQ	5.0 µl	Agua MQ	6.5 µl
NEBuffer 2 10X	1.0 µl	NEBuffer 2 10X	1.0 µl	NEBuffer 1 10X	1.0 µl
BSA 10X	1.0 µl	BSA 10X	1.0 µl	<b>Nael</b> 10 U/µl	0.5 µl
<b>XhoI</b> 20 U/µl	0.5 µl	<b>XbaI</b> 20 U/µl	0.5 µl	DNA ~ 2 µg/µl.	2.0 µl
DNA ~ 2 µg/µl.	2.0 µl	<b>EcoRI</b> 20 U/µl	0.5 µl	<b>Volumen total</b>	10.0 µl
<b>Volumen total</b>	10.0 µl	DNA ~ 2 µg/µl.	2.0 µl		
		<b>Volumen total</b>	10.0 µl		

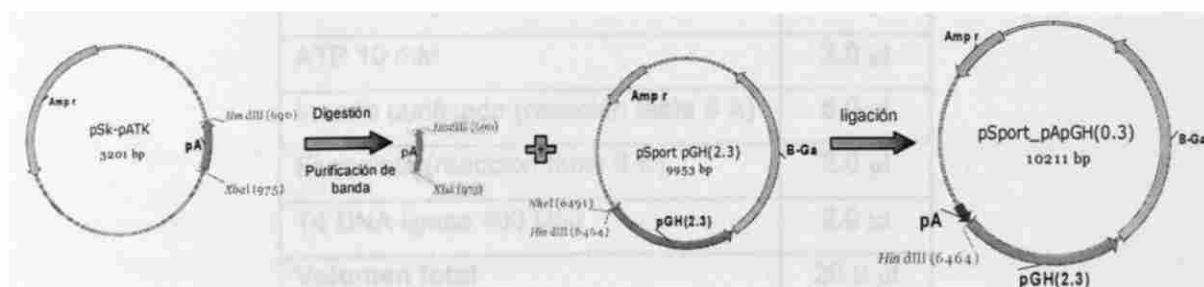
**Tabla 5. Caracterización del plásmido pSport\_pGH(2.3).**

Reactivo	Volumen (1x)
Agua MQ	5.0 $\mu$ l
NEBuffer 2 10X	1.0 $\mu$ l
BSA 10X	1.0 $\mu$ l
<i>Sfi</i> I 20 U/ $\mu$ l	1.0 $\mu$ l
<i>Hind</i> III 20 U/ $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
DNA ~ 2 $\mu$ g/ $\mu$ l.	1.5 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	<b>10.0 <math>\mu</math>l</b>

Reactivo	Volumen (1x)
Agua MQ	5.5 $\mu$ l
NEBuffer 2 10X	1.0 $\mu$ l
BSA 10X	1.0 $\mu$ l
<i>Xba</i> I 20 U/ $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
<i>Eco</i> RI 20 U/ $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
DNA ~ 2 $\mu$ g/ $\mu$ l.	1.5 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	<b>10.0 <math>\mu</math>l</b>

### 3.4 Construcción del plásmido pSport-pApGHn(2.3)

Este plásmido se construyó digiriendo el vector pSk-pATK con las enzimas *Hind*III y *Xba*I. El fragmento correspondiente a la señal de poliadenilación se recortó del gel y se purificó con el kit "QIAEX II Gel extraction kit" y se ligó con el plásmido pSport-pGHn(2.3) digerido previamente con las enzimas *Hind*III y *Nhe*I (Fig. 7). Las enzimas *Xba*I y *Nhe*I son compatibles para ligar. Las condiciones de las digestiones y la ligación se muestran en la tabla 6 y 7.



**Fig. 7. Esquema de la construcción del plásmido pSport\_pApGHn(2.3).** El plásmido pSk-pATK se digirió con las enzimas *Hind*III y *Xba*I, liberando un fragmento correspondiente a la señal de poliadenilación. El fragmento se ligó con el plásmido pSport\_pGH(2.3).



**Tabla 6. Digestiones preparativa del plásmido pSk-pATK (A) y del plásmido pSport\_pGH(2.3) (B) .**

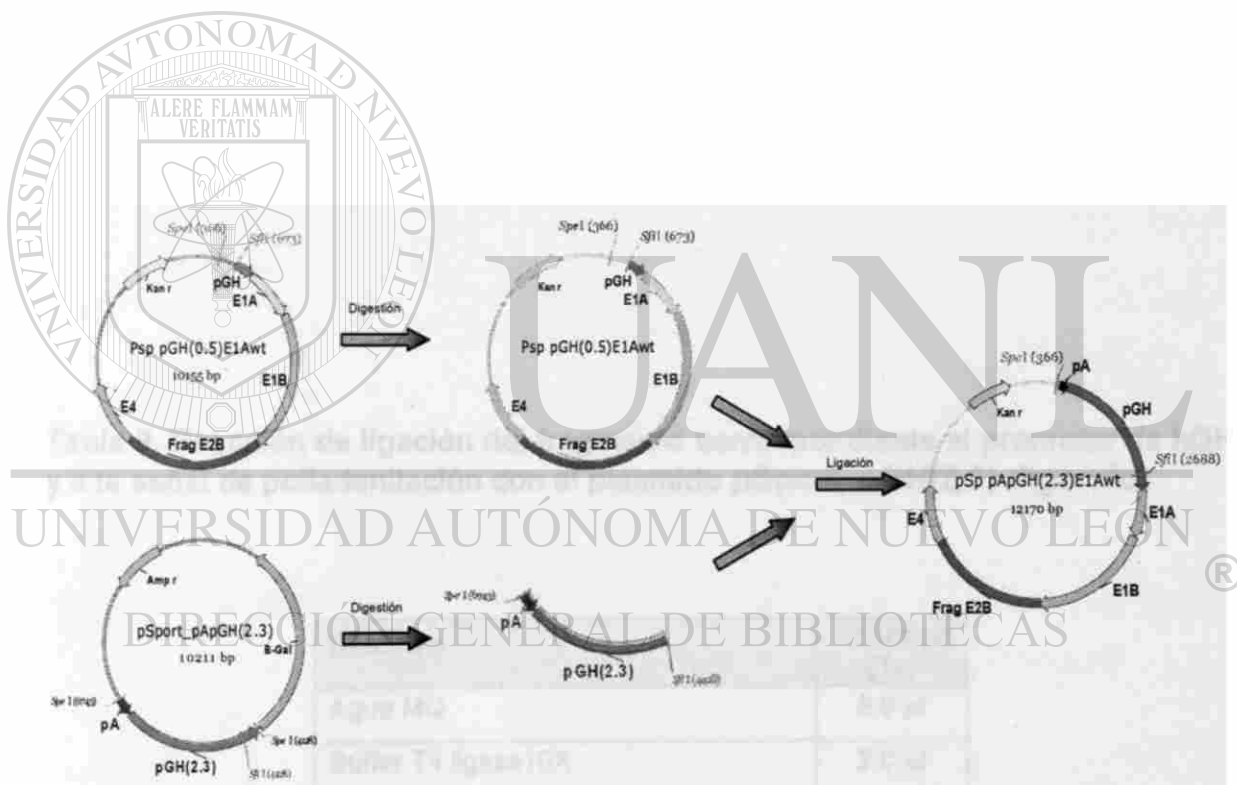
A)	Reactivo	Volumen (1x)	B)	Reactivo	Volumen (1x)
	Agua MQ	13.0 $\mu$ l		Agua MQ	11.0 $\mu$ l
	NEBuffer 2 10X	2.5 $\mu$ l		NEBuffer 2 10X	2.0 $\mu$ l
	BSA 10X	2.5 $\mu$ l		BSA 10X	2.0 $\mu$ l
	<i>Xba</i> I 20 U/ $\mu$ l	1.0 $\mu$ l		<i>Xba</i> I 20 U/ $\mu$ l	1.0 $\mu$ l
	<i>Hind</i> III 20 U/ $\mu$ l	1.0 $\mu$ l		<i>Nhe</i> I 10 U/ $\mu$ l	1.5 $\mu$ l
	DNA ~ 2 $\mu$ g/ $\mu$ l.	5 $\mu$ l		DNA ~ 2 $\mu$ g/ $\mu$ l.	2.5 $\mu$ l
	<b>Volumen total</b>	<b>25.0 <math>\mu</math>l</b>		<b>Volumen total</b>	<b>20.0 <math>\mu</math>l</b>

**Tabla 7. Reacción de ligación del fragmento de la señal de poliadenilación con el plásmido pSport\_pGH(2.3).**

Reactivo	Volumen (1x)
Agua MQ	6.0 $\mu$ l
Buffer T4 ligasa 10X	2.0 $\mu$ l
ATP 10 mM	2.0 $\mu$ l
Inserto purificado (reacción tabla 6 A)	6.0 $\mu$ l
Esqueleto (reacción tabla 6 B)	2.0 $\mu$ l
T4 DNA ligasa 400 U/ $\mu$ l	2.0 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	<b>20.0 <math>\mu</math>l</b>

### 3.5 Construcción del plásmido pSp\_pApGH(2.3)E1Awt

Este plásmido se construyó digiriendo el vector pSport\_pApGHn(2.3) construido previamente, con las enzimas *SpeI* y *SfiI*. El fragmento correspondiente a la señal de poliadenilación unida al promotor de GH se recortó del gel y se purificó con el estuche "QIAEX II Gel extraction kit" y se ligó con el plásmido pSp\_pGH(0.5)E1Awt, digerido con las mismas enzimas y purificado de la misma manera (Fig. 8). Las condiciones de las digestiones y la ligación se muestran en las tablas 8 y 9.



**Fig. 8.** Esquema de la construcción del plásmido pSp\_pApGH(2.3)E1Awt. El plásmido pSport\_pApGHn(2.3) se digirió con las enzimas *SpeI* y *SfiI*, liberando un fragmento de 2322 pb correspondiente a la señal de poliadenilación y al promotor de GH. El fragmento se ligó con el plásmido pSp\_pGH(2.3)E1Awt digerido con las mismas enzimas.

**Tabla 8. Digestiones preparativa del plásmido pSport\_pApGHn(2.3) y pSp\_pGH(0.5)E1Awt.**

**A)**

Reactivo	Volumen (1x)
Agua MQ	5.0 µl
NEBuffer 2 10X	1.5 µl
BSA 10X	1.5 µl
<b>SpeI</b> 20 U/µl	2.0 µl
DNA ~ 2 µg/µl.	5 µl
<b>Volumen total</b>	15.0 µl

**B)**

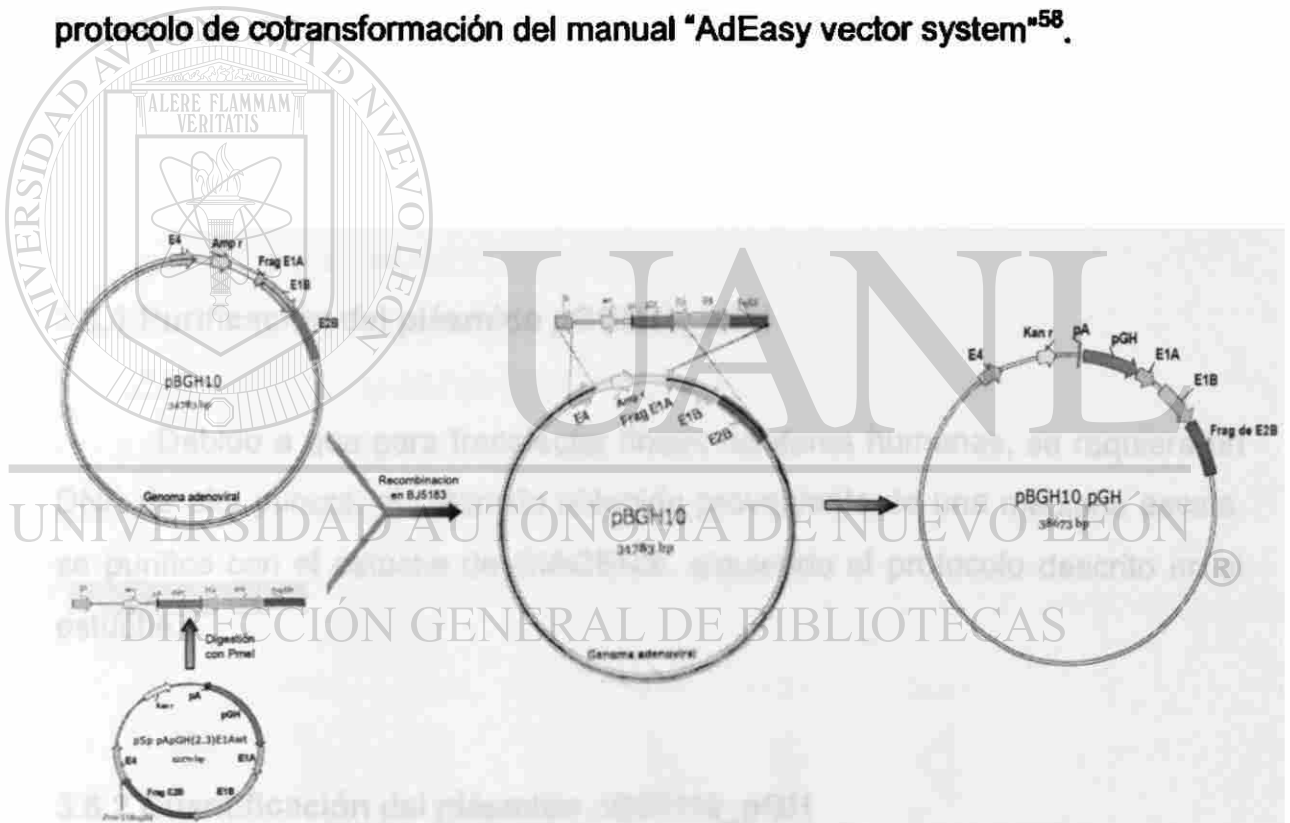
Reactivo	Volumen (1x)
Agua MQ	10.5 µl
NEBuffer 2 10X	1.5 µl
BSA 10X	1.5 µl
<b>SfiI</b> 20 U/µl	1.5 µl
Digestión I	15.0 µl
<b>Volumen total</b>	30.0 µl

**Tabla 9. Reacción de ligación del fragmento correspondiente al promotor de hGH y a la señal de poliadenilación con el plásmido pSport\_pGH(2.3) digerido.**

Reactivo	Volumen (1x)
Agua MQ	6.0 µl
Buffer T4 ligasa 10X	2.0 µl
ATP 10 mM	2.0 µl
Inserto purificado	6.0 µl
Esqueleto purificado	2.0 µl
T4 DNA ligasa 400 U/µl	2.0 µl
<b>Volumen total</b>	20.0 µl

### 3. 6 Estrategia de construcción del plásmido adenoviral pBGH10\_pGH

El plásmido pBGH10\_pGH se construyó por recombinación entre el plásmido acarreador pSp\_pApGH(2.3)E1Awt y un plásmido comercial (Microbix) que tiene el genoma adenoviral con las regiones E1A y E3 deletadas, llamado pBGH10 (Fig. 9). Previamente, el plásmido acarreador pSp\_pApGH(2.3)E1Awt se digirió con la enzima *PmeI* con las condiciones mostradas en la tabla 10. Una vez linearizado, se cotransformó junto con el plásmido pBGH10 en células calcio-competentes BJ5183 que son hiper-recombinantes, utilizando el protocolo de cotransformación del manual "AdEasy vector system"<sup>58</sup>.



**Fig. 9. Esquema de la construcción del plásmido pBGH10\_pGH(2.3)E1Awt.** El plásmido pSp\_pApGHn(2.3)wt se linearizó digiriendo con la enzima *PmeI* y se recombinó con el plásmido pBGH10 en células BJ5183.

**Tabla 10. Digestión para linearizar el plásmido acarreador.**

Reactivo	Volumen (1x)
Agua MQ	8.0 µl
NEBuffer 4 10X	2.0 µl
BSA 10X	2.0 µl
<i>PmeI</i> 20 U/µl	3.0 µl
DNA ~ 2 µg/µl.	5 µl
<b>Volumen total</b>	<b>20.0 µl</b>

### 3.6.1 Purificación del plásmido pBGH10\_pGH

Debido a que para transfectar líneas celulares humanas, se requiere un DNA de alta pureza, el plásmido obtenido proveniente de una mediana escala, se purificó con el estuche de QIAGEN®, siguiendo el protocolo descrito en el estuche.

### 3.6.2 Cuantificación del plásmido pBGH10\_pGH

La cantidad y la calidad del DNA plasmídico se determinó leyendo la absorbancia a 260 y 280 nm de una dilución 1:100 por triplicado. La cantidad se determina mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración DNA ( ng/µl )} = (\text{Dilución}) (50) (\text{Abs})$$

Y la calidad se determina mediante la relación de absorbancias a  $\lambda$  de 260/280, considerándose de buena calidad valores próximos o iguales a 1.8.

### 3.6.3 Secuencia de los Iniciadores utilizados para secuenciar el promotor de hGH

La integridad del promotor de hGH en el vector adenoviral construido pBGH10\_pGH se verificó por secuenciación utilizando iniciadores diseñados a partir de la secuencia del promotor reportada en el GenBank gi: 21463739 (Fig 10). Las condiciones de la reacción de secuenciación fueron las descritas en el estuche para secuenciación (Termo Sequenase Cycle Sequencing Kit). Los iniciadores fueron los siguientes:

PGH-1: 5' CAATACGCCCGCCTTTCTTCC 3'

PGH-2: 5' ACGTGTTTCATGGCAGTAACC 3'

PGH-3: 5' GAGTAGTTGGGATTACAGCTC 3'

PGH-4: 5' GATCTGAAAAGGAGGAGGAG 3'

PGH-5: 5' TCGGCGTGATGTGTTCTGAG 3'

PGH-6: 5' TTCTGTCTGGTGGGTGGAGG 3'

E1A-2: 5' ATCAGCTGCTCGAGAAGACTGG 3'

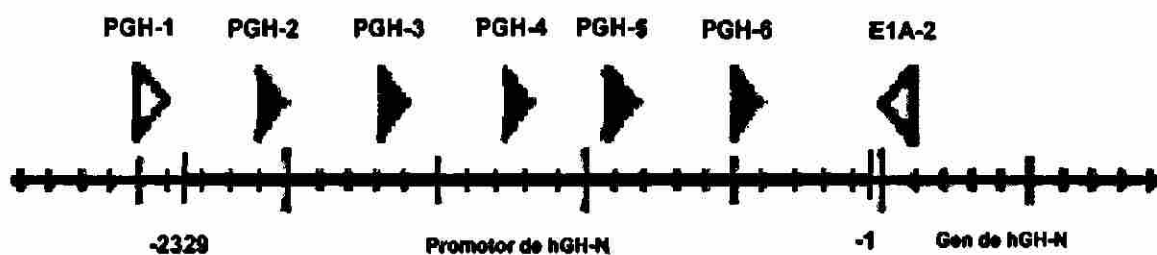



Fig. 10. Esquema del promotor de GH. Las puntas de flecha indican donde y en qué dirección se alinean los iniciadores utilizados para llevar a cabo la secuenciación.  100 pb.

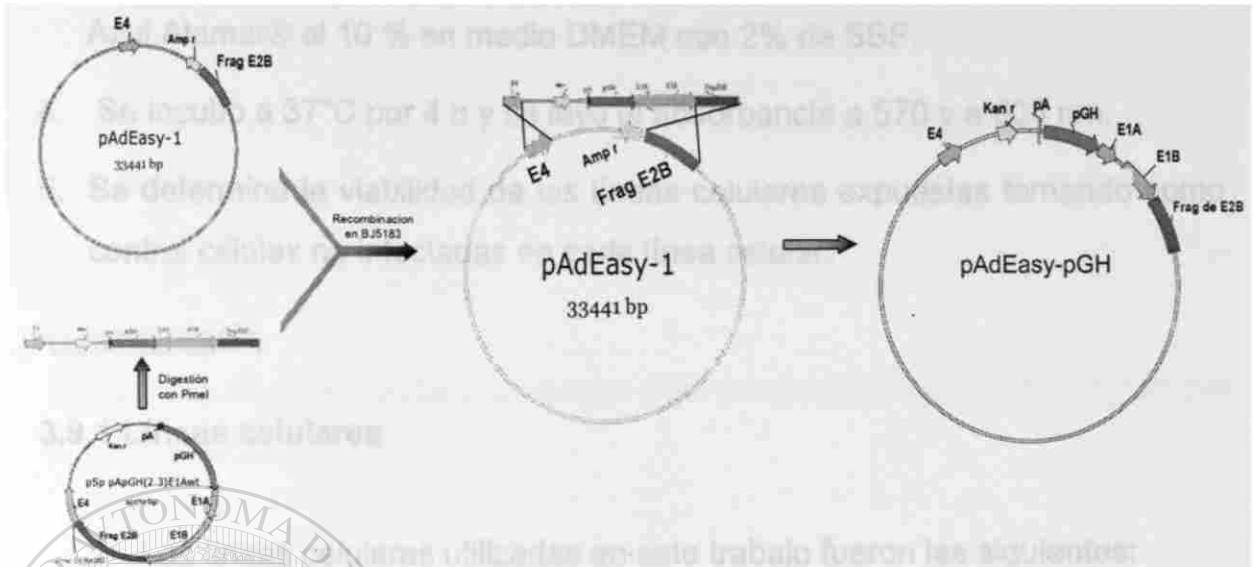
### **3.7 Transfección de células HEK293 con el plásmido pBGH10\_pGH**

Para tratar de generar las partículas virales, se transfectaron células HEK293 con el plásmido pBGH10\_pGH purificado utilizando lipofectamina con el siguiente protocolo:

- 1- Se sembraron  $1 \times 10^5$  células en placas de 24 pozos.
- 2- Se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  hasta tener una confluencia de un 70 %.
- 3- Se diluyó el DNA en 25  $\mu\text{l}$  de medio DMEM sin suero (se hicieron ensayos probando 200, 400, 1000, 1500, 2000 ng de DNA).
- 4- Se diluyó una cantidad de lipofectamina en 25  $\mu\text{l}$  de medio DMEM sin suero (se probaron 0.5, 1.0 y 2.0  $\mu\text{l}$ ).
- 5- Se combinaron las soluciones diluidas de DNA y lipofectamina, se mezclaron y se incubaron por 30 min. Mientras tanto, las células se lavaron con 200  $\mu\text{l}$  de medio DMEM sin suero.
- 6- Se agregaron a la mezcla 150  $\mu\text{l}$  de medio DMEM sin suero, se mezcló y se cubrieron las células con esta solución.
- 7- Se incubaron por 5 h.
- 8- Después de la incubación, se agregaron 400  $\mu\text{l}$  de medio DMEM con SBF al 2 %.
- 9- A las 24 h postransfección, se reemplazó el medio con medio fresco con suero.

### **3.8 Estrategia de construcción del plásmido pAdEasy\_pGH**

El plásmido pAdEasy\_pGH se construyó por recombinación en células BJ5183 entre el plásmido acarreador pSp\_pApGH(2.3)E1Awt linearizado y un plásmido comercial (Quantum Biotechnologies) llamado pAdEasy-1 de la misma manera como se hizo la recombinación con el plásmido pBGH10 (Fig. 11).



**Fig. 11.** Esquema de la construcción del plásmido pAdEasy\_pGH(2.3)E1Awt. El plásmido pSp\_pApGHn(2.3)wt se linearizó digiriendo con la enzima *PmeI* y se recombino con el plásmido pAdEasy-1 en células BJ5183.

### 3.9 Estudios en líneas celulares: Efecto antineoplásico

El efecto antineoplásico del VARS en líneas celulares se determinó mediante un ensayo de medición de actividad metabólica con un agente redox (Azul Alamar®). Utilizando el protocolo descrito en el manual (AlamarBlue™ assay) con modificaciones. Estos ensayos se realizaron por triplicado.

1. En una placa de cultivo de 96 pozos, se sembraron  $1 \times 10^4$  células en 100  $\mu$ l de medio DMEM con 5% de SBF, descartando los pozos periféricos para los ensayos.
2. 12 h después de sembrar las células, se eliminó el medio y se realizó la infección a concentraciones crecientes de los vectores (0,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  pv/ml) en 100  $\mu$ l de medio DMEM con 2% de SBF.



3. Al sexto día post-infección, se eliminó el medio y se agregaron 100  $\mu$ l de Azul Alamar® al 10 % en medio DMEM con 2% de SBF.
4. Se incubó a 37°C por 4 h y se leyó la absorbancia a 570 y a 600 nm.
5. Se determinó la viabilidad de las líneas celulares expuestas tomando como control células no infectadas en cada línea celular.

### 3.9.1 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

- C4Na<sup>55</sup> (Células inmortalizadas de hipófisis).
- HuH7 (Hepatoma humano).
- HepG2 (Hepatocarcinoma humano).
- HaCaT (Queratinocitos humanos inmortalizados).
- JAR (Coriocarcinoma humano).
- HeLa (Carcinoma cérvico-uterino humano Infectado con PVH-18).
- HEK293 (Células de riñón embrionario humano transformadas con E1A adenoviral (células empaquetadoras)).

### 3.9.2 Análisis de los resultados de los ensayos citopático

Para hacer el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS versión 10.0. Se hizo un análisis de varianza (ANOVA) para comparar el efecto del AdGH con el del AdWT en función del porcentaje de viabilidad celular respecto de las dosis probadas y para comparar el efecto del AdGH en la línea hipofisaria con las líneas no hipofisarias.

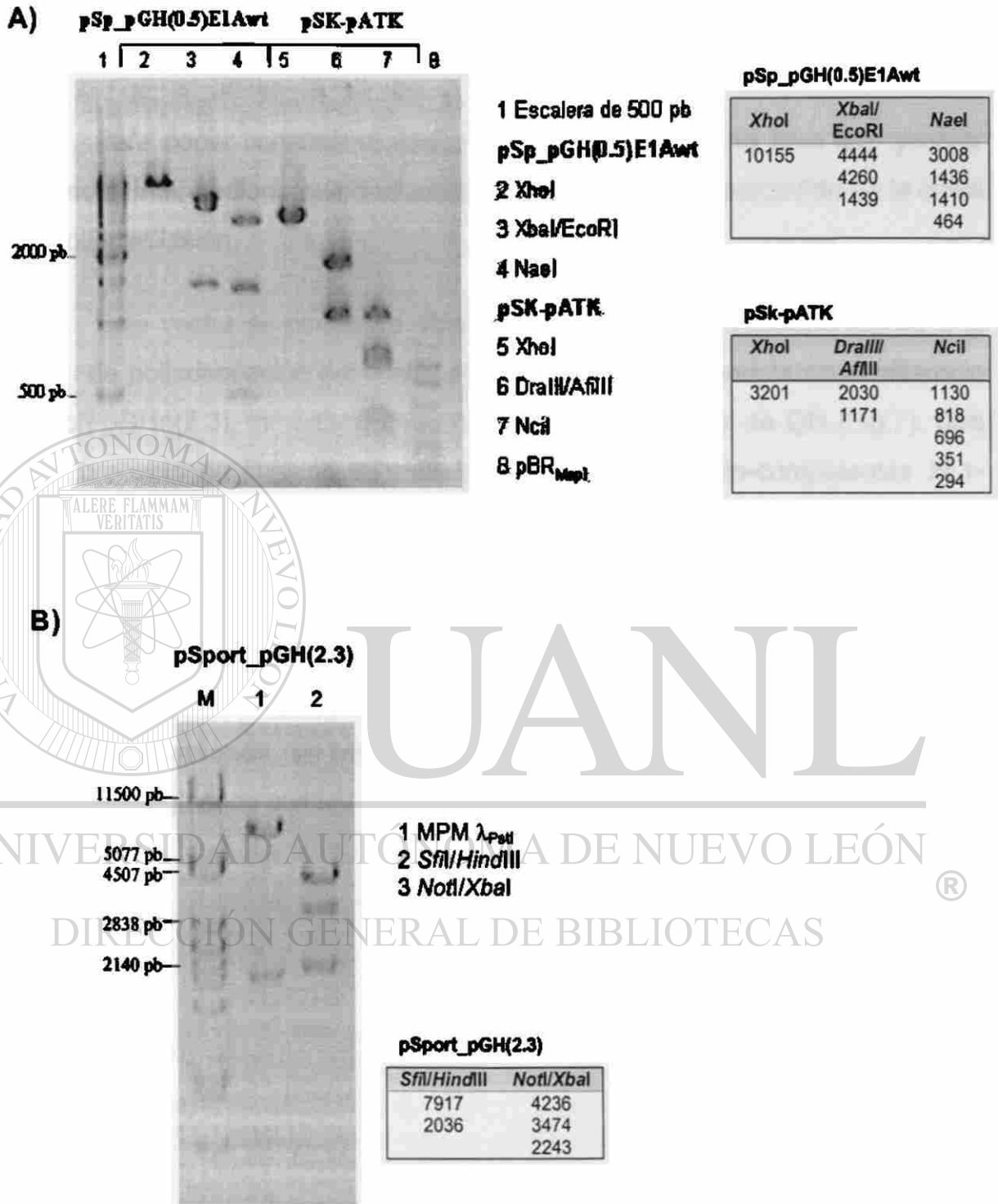
## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS**

#### **4.1 Generación del vector acarreador que contenga el gen E1A dirigido por el promotor del gen hGH-N**

##### **4.1.1 Caracterización de los plásmidos pSp\_pGH(0.5)E1Awt, pSK-pATK y pSport\_pGH(2.3)**

El vector acarreador pSp\_pApGH(2.5)E1AWT se generó a partir de los plásmidos pSk-pATK, pSport-pGHn(2.3) y pSp\_pGH(0.5)E1Awt. Estos plásmidos fueron caracterizados por su patrón de restricción para verificar su integridad. Se comparó el patrón obtenido de cada plásmido (Fig. 12), con el patrón virtual obtenido a partir de la secuencia nucleotídica de cada uno, observándose coincidencia entre los 2 patrones. Esto indicó que los 3 plásmidos parecían encontrarse íntegros, por lo que se prosiguió con la construcción del vector acarreador.



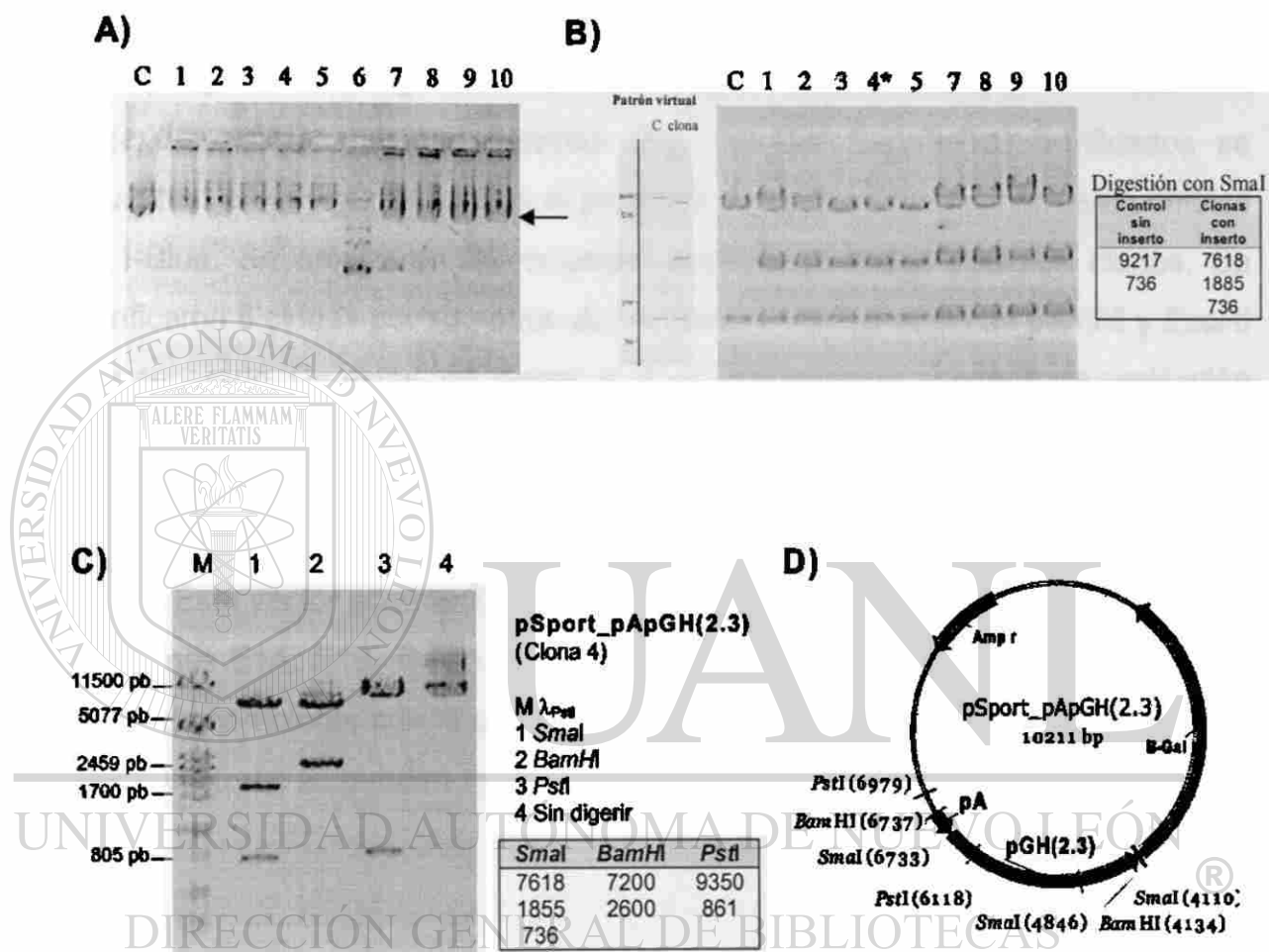
**Fig. 12. Caracterización de los plásmidos pSp\_pGH(0.5)E1Aw1, pSk-pATK y pSport\_pGH(2.3).** Electroforesis en gel de agarosa al 0.9 % de A) El plásmido pSp\_pGH(0.5)E1Aw1 digerido con las enzimas *XhoI*, *XbaI/EcoRI* y *NaeI*, y B) El plásmido pSk-pATK digerido con las enzimas *SfiI/HindIII* y *NotI/XbaI*. Los tamaños de los productos de las digestiones se muestran en un cuadro junto a la figura.

#### 4.1.2 Construcción del plásmido intermediario pSport-pApGHn(2.3)

Para poder construir el vector acarreador, primero se tuvo que generar un vector intermediario que contuviera el promotor de GH precedido de la señal de poliadenilación.

Este vector se construyó obteniendo el fragmento correspondiente a la señal de poliadenilación del vector pSk-pATK e introduciéndolo en el plásmido pSport-pGHn(2.3), inmediatamente río arriba del promotor de GH (Fig.7). Con este producto de ligación se transformaron células calcio-competentes XL1-Blue.

Se analizaron 10 colonias. Con excepción de la clona 6, las clonas mostraban el tamaño esperado. Estas 9 clonas se verificaron por su patrón de restricción con la enzima *SmaI*. Como todas las clonas mostraron el mismo patrón de restricción, se tomó una clona al azar (clona 4), y se confirmó su integridad digiriendo con las enzimas *SmaI*, *BamHI* y *PstI* (Fig. 13).

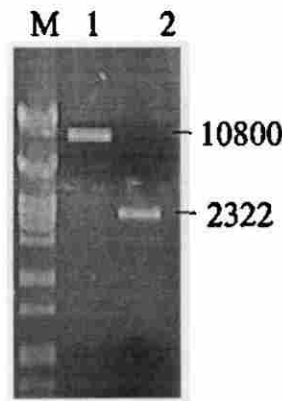


**Fig. 13. Obtención del plásmido pSport\_pApGHn(2.3).** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de: **A)** Las 10 clonas analizadas junto con el control sin inserto; **B)** Las 9 posibles clonas digeridas con SmaI; **C)** La clona 4 digerida con las enzimas indicadas. **D)** Mapa del plásmido obtenido, donde se indican los sitios de corte de las enzimas indicadas en el inciso C.

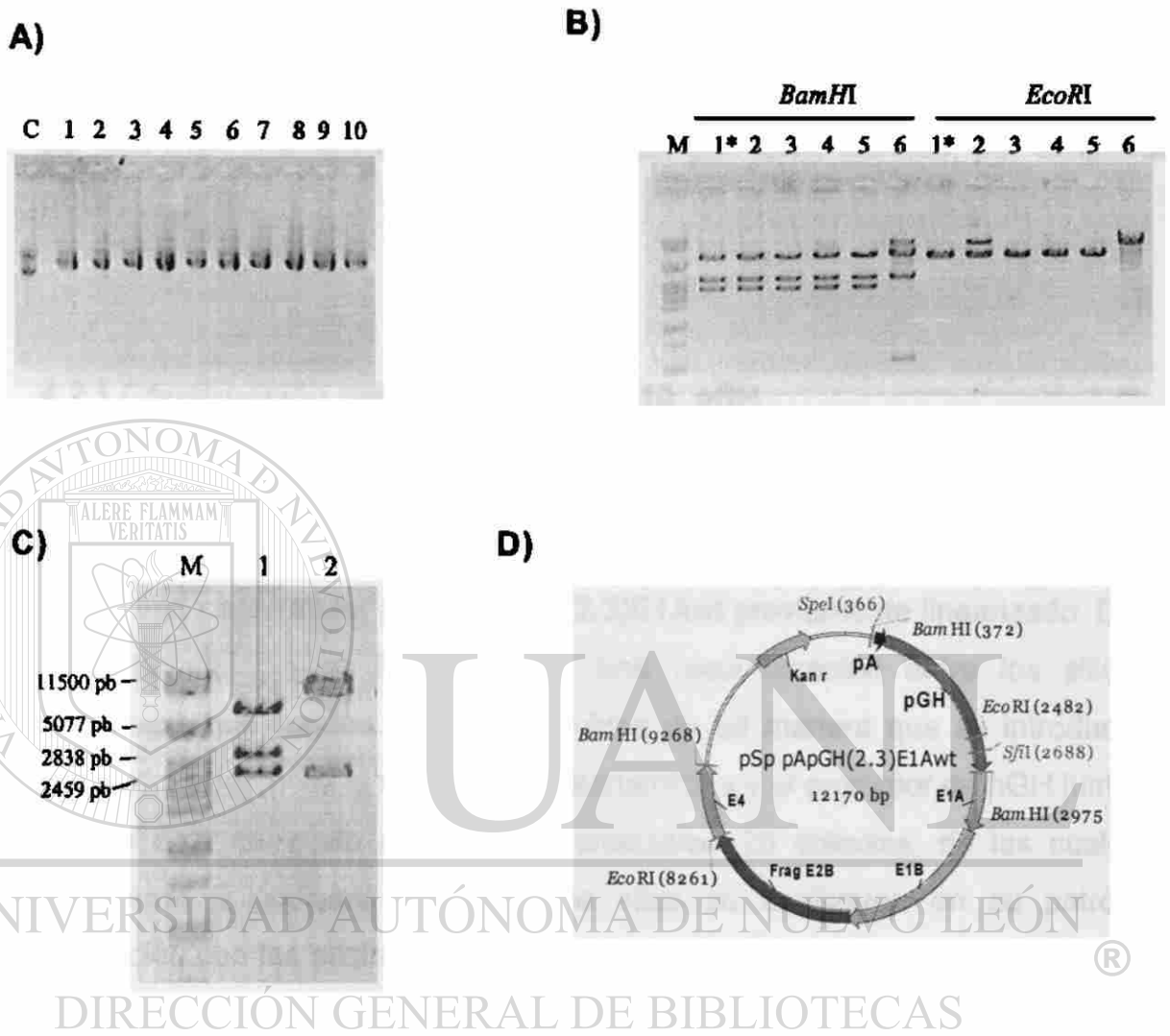
#### 4.1.3 Construcción del plásmido acarreador pSp\_pApGH(2.3)E1Awt

El plásmido acarreador pSp\_pApGH(2.3)E1Awt se construyó liberando el fragmento correspondiente a la señal de poliadenilación unida al promotor de GH del plásmido pSport\_pApGHn(2.3), digiriendo este con las enzimas *SpeI* y *SfiI* y ligando el fragmento liberado con el plásmido pSp\_pGH(0.5)E1Awt digerido con las mismas enzimas (Fig. 8). Los fragmentos purificados se muestran en la Figura 14. Con el producto de ligación se transformaron células XL1-Blue. Se analizaron 10 colonias, pareciendo todas posibles clonas. Se verificaron 6 clonas por su patrón de restricción con las enzimas *BamHI* y *EcoRI* por separado. De estas, las clonas 1, 3, 4 y 5 mostraron el patrón de restricción esperado. Se tomó la clona 1, se propagó haciendo un midiprep, y se confirmó su integridad digiriendo con las enzimas *BamHI* y *SpeI/SfiI* (Fig. 15).

Este vector acarreador construido, Además del promotor de GH, contiene los genes E1A, E1B, E4 y un fragmento de E2B de adenovirus, los cuales son sitios de homología con la secuencia del vector adenoviral, lo que posibilita que estos vectores se puedan recombinar.



**Fig. 14. Construcción del plásmido acarreador.** Gel de agarosa al 0.8 % de los fragmentos purificados correspondientes a 1) el esqueleto y 2) el fragmento pA-pGH, cuyo producto de ligación genera el plásmido pSp\_pApGH(0.5)E1AWT.



**Fig. 15.** Obtención del plásmido pSp\_pApGH(2.3)E1Awt. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de: **A)** las 10 clonas analizadas junto con el control sin inserto; **B)** 6 de las posibles clonas digeridas con *Bam*HI (6287, 3268 y 2603 pb) y *Eco*RI (6282 y 5876 pb); **C)** la clona 1 digerida con *Bam*HI y *Spe*I/*Sfi*I (9855 y 2315 pb). **D)** Mapa del plásmido construido, donde se indican los sitios de corte de las enzimas con que se caracterizó.

## 4.2 Generación del vector adenoviral pBGH10\_pGH(2.3)E1Awt

Se construyó un plásmido que contiene todo el genoma adenoviral pero que tiene el gen E3 deletado y además contiene la versión larga del promotor del gen hGH-N dirigiendo la expresión del gen E1A, llamado, por simplicidad pBGH10\_pGH.

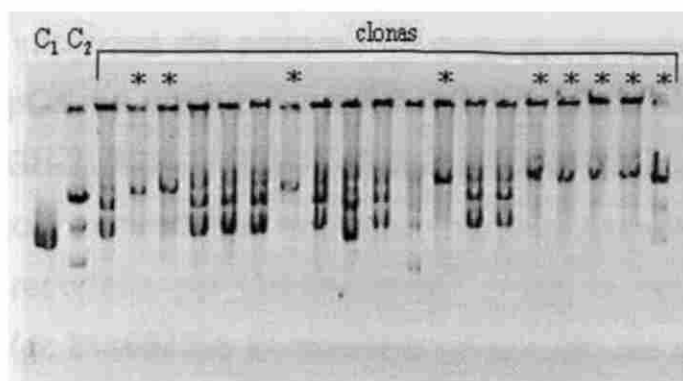
### 4.2.1 Construcción del plásmido pBGH10\_pGH

Para construir el vector adenoviral, se cotransformaron células hiper-recombinantes con el plásmido pBGH10 que tiene el genoma adenoviral y con el plásmido acarreador pSp\_pApGH(2.3)E1Awt previamente linearizado. Dentro de estas células se lleva a cabo una recombinación entre los sitios de homología que hay en ambos plásmidos de tal manera que se introducen al plásmido adenoviral la resistencia a kanamicina y el promotor de hGH junto con el gen E1A completo (Fig. 9). Se analizaron 20 colonias, de las cuales se obtuvieron 9 posibles clones. 5 de ellas se analizaron en su patrón de restricción con las enzimas *Xho*I y *Nsi*I por separado. De estas, las clones 2 y 3 mostraron el patrón de restricción esperado (Fig. 16 A y B), de ahí, se seleccionó la clona 2.

Cómo el plásmido se encontraba dentro de las bacterias hiper-recombinantes BJ5183, para propagarlo, y que no fuera a sufrir recombinaciones no deseadas, se transformaron células nulas en recombinación (XL1-Blue) con este plásmido, se extrajo y se verificó su integridad por patrón de restricción con las enzimas *Xho*I y *Nsi*I (Fig. 16 C). El plásmido proveniente de una mediana escala, se purificó con un kit de QIAGEN®. La concentración de plásmido después de esto fue de 1.9 µg/ µl y la relación de las absorbancias 260/280 fue de 1.83.

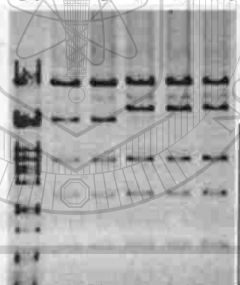


A)



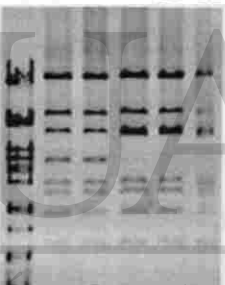
B)

M 2\* 3\* 7 16 18



XhoI
14500
14385
5282
2466
1445
595

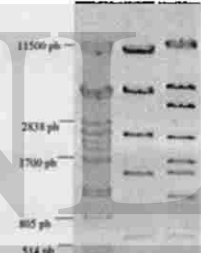
M 2\* 3\* 7 16 18



NsiI
21669
5796
3984
2344
1658
1658
1429
1042
573

C)

M 1 2



1 XhoI  
2 Nsi I

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Fig. 16. Obtención del plásmido pBGH10\_pGH(2.3)E1Awt.** Electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % de: A) Las 20 posibles clonas recombinantes (C<sub>1</sub>, Plásmido acarreador; C<sub>2</sub> Vector adenoviral; asterisco, posibles clonas recombinantes), B) 5 de las clonas caracterizadas por digestión con XhoI y con NsiI, C) caracterización con XhoI y NsiI de la clona recombinante seleccionada (clona 2). Los asteriscos indican las clonas que tienen el patrón de restricción esperado.

#### **4.2.2 Secuenciación del promotor de hGH**

La integridad del promotor de hGH en el vector adenoviral construido pBGH10\_pGH se verificó por secuenciación utilizando los iniciadores E1A-2, PGH-1, PGH-2, PGH-3, PGH-4, PGH-5 y PGH-6 (Fig. 10). Después de obtener la secuencia nucleotídica, se realizó un alineamiento con la secuencia del promotor reportada por Castillo-Ureta<sup>55</sup> y con la secuencia reportada en el GenBank (gi: 21463739). El resultado mostró que las secuencias nucleotídicas son idénticas (ver anexo 1), por lo que se concluyó que el promotor del gen hGH presente en el vector construido no sufrió ningún cambio y era adecuado para los propósitos de expresión de genes adyacentes al mismo.

#### **4.3 Transfección de células HEK293 con el plásmido pBGH10\_pGH**

Una vez que ya se tenía el plásmido pBGH10\_pGH purificado, se procedió a tratar de generar las partículas virales transfectando células HEK293 con el plásmido circular como está reportado<sup>60,61,62</sup>. Seis días después de la transfección debía observarse efecto citopático, por efecto de los virus generados a partir del plásmido. Se probaron varias condiciones (indicadas en Material y Métodos), pero no se lograron obtener las partículas virales.

La formación de partículas virales en las células HEK293 se facilita si se transfecta con el DNA viral linearizado<sup>63,64,65</sup>. Por esto, como alternativa, se procedió a construir otro vector utilizando como esqueleto adenoviral el plásmido pAdEasy-1. Este vector generado podría digerirse con PacI, de tal manera que se liberaría un fragmento correspondiente al origen de replicación bacteriano y la resistencia al antibiótico, quedando solo la secuencia del adenovirus de manera lineal (Fig 17), lo que facilitaría la formación de las partículas virales.

#### 4.4 Construcción del vector adenoviral pAdEasy\_pGH

Para construir el vector adenoviral pAdEasy\_pGH, se recombinaron los plásmidos pAdEasy-1 (esqueleto adenoviral) y pSp\_pApGH(2.3)E1Awt (acarreador) linearizado previamente (Fig. 17). Se analizaron 12 colonias en su patrón de restricción con la enzima *XhoI*. Todas las clonas dan el mismo patrón, en el cual una de las bandas no corresponde al tamaño esperado (Fig 18 A). El fragmento correspondiente a esta banda proviene del vector acarreador (Fig 18 B).

Debido a esto se hizo una recharacterización del vector acarreador con varias enzimas de restricción y se observó que, a pesar de que con algunas enzimas como *BamHI*, *EcoRI* y *SpeI/SfiI* aparentemente daba un patrón correcto (Fig. 14 B y C), con las enzimas *NsiI*, *NaeI* y *HindIII/EcoRI* aparecían bandas que no corresponden al patrón esperado (Fig. 19). Localizando sobre el mapa del plásmido los sitios de corte de estas enzimas y los fragmentos del DNA digerido que no corresponden a lo esperado, se llegó a la conclusión de que en la región de E1B debe haber una inserción.

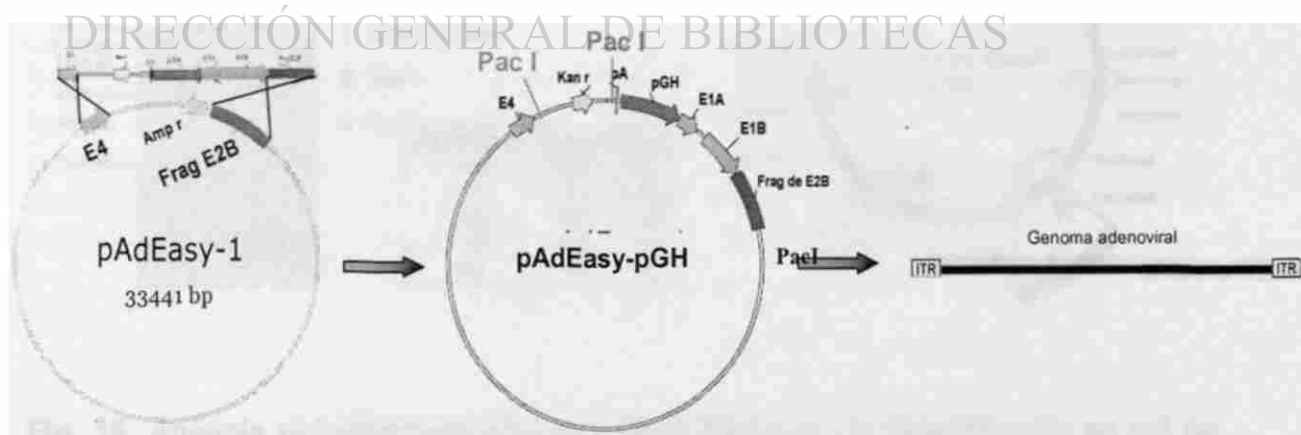
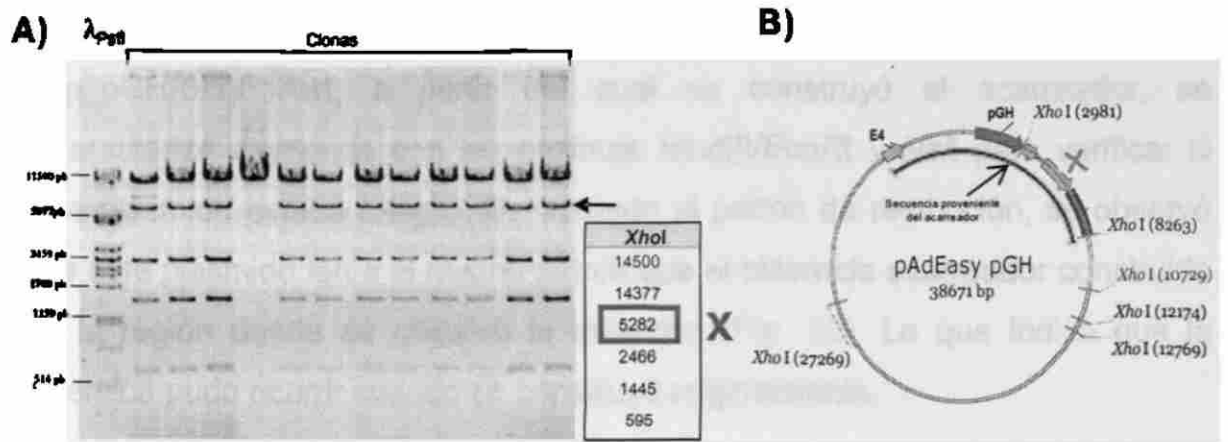
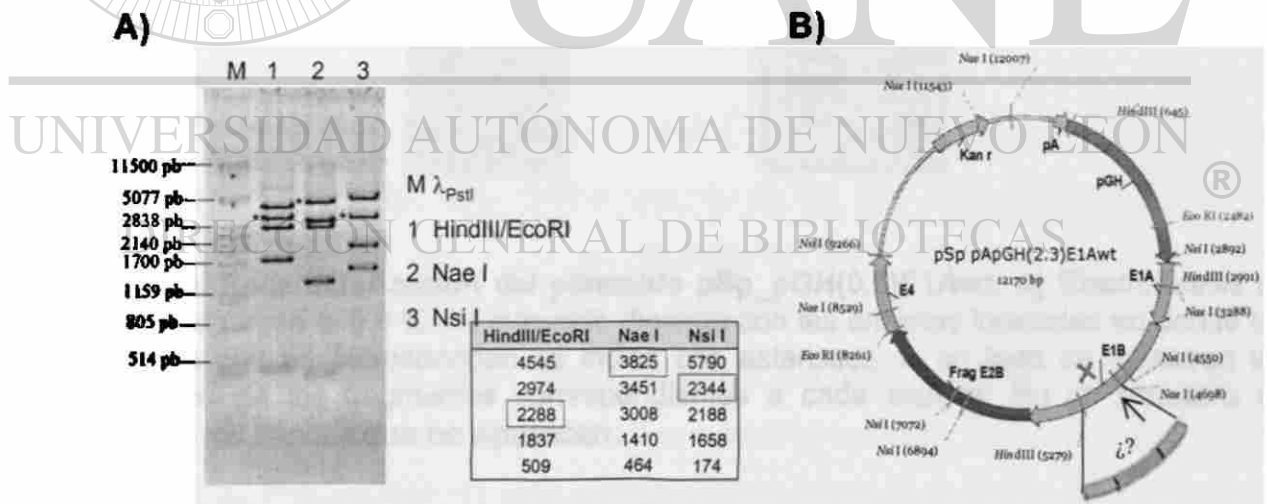


Fig. 17. Esquema de la preparación de pAdEasy\_pGH(2.3)E1Awt para la transfección. Después de recombinar con el acarreador, se introducen 2 sitios *PacI* que servirían para linearizar y eliminar el origen de replicación y la resistencia al antibiótico.

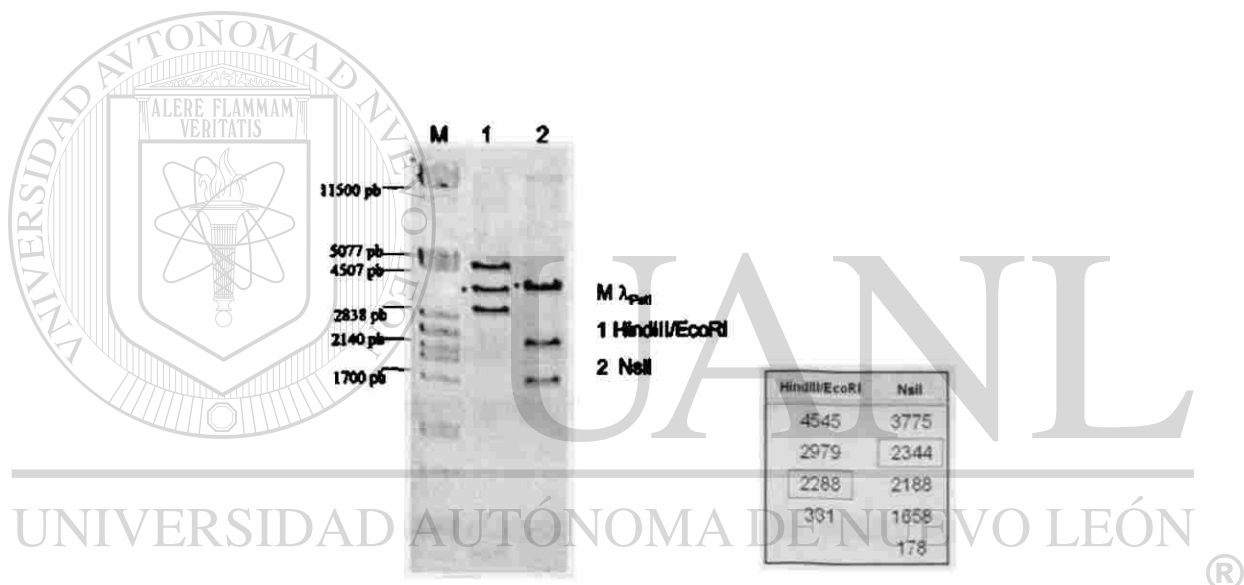


**Fig. 18. Análisis de las clonas putativas pAdEasy\_pGH. A)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % de las 12 clonas recombinantes analizadas. La flecha indica la banda que no corresponde. **B)** Mapa del plásmido pAdEasy\_pGH, donde se indican los sitios de corte de la enzima XhoI. La cruz indica el segmento que en las clonas da un fragmento de mayor tamaño que el esperado de 5282 pb.



**Fig. 19. Análisis del plásmido pSp\_pApGH(2.3)E1Awt. A)** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % del plásmido digerido con las enzimas indicadas en donde las bandas que no corresponden se indica con asteriscos. A un lado se muestran los tamaños de los fragmentos correspondientes a cada enzima. En un recuadro se indican las bandas que no corresponden. **B)** Mapa del plásmido donde se indican los sitios de corte de las enzimas con que se digirió. La cruz indica el segmento donde se localiza la inserción.

Tomando en cuenta la posibilidad de que la inserción hubiera ocurrido durante la construcción del plásmido acarreador (Fig. 14). El plásmido pSp\_pGH(0.5)E1Awt, a partir del cual se construyó el acarreador, se recharacterizó digiriendo con las enzimas *HindIII/EcoRI* y *NsiI* para verificar si éste plásmido estaba íntegro. De acuerdo al patrón de restricción, se observó que este plásmido tenía el mismo patrón que el plásmido acarreador construido en la región donde se observó la inserción (Fig. 20). Lo que indica que la inserción pudo ocurrir cuando se construyó originalmente.



**Fig. 20. Recaracterización del plásmido pSp\_pGH(0.5)E1Awt. A) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % del plásmido digerido con las enzimas indicadas en donde las bandas que no corresponden se indica con asteriscos. A un lado se muestran los tamaños de los fragmentos correspondientes a cada enzima. En un recuadro se indican las bandas que no aparecen.**

#### 4.5 Estrategia Alternativa

En el laboratorio de Terapia Génica se contaba con un VARS dirigido por la versión corta de 500 pb del promotor de hGH-N llamado AdGH construido por Delgado-Enciso y cols. en el 2003. No se habían hecho ensayos en líneas

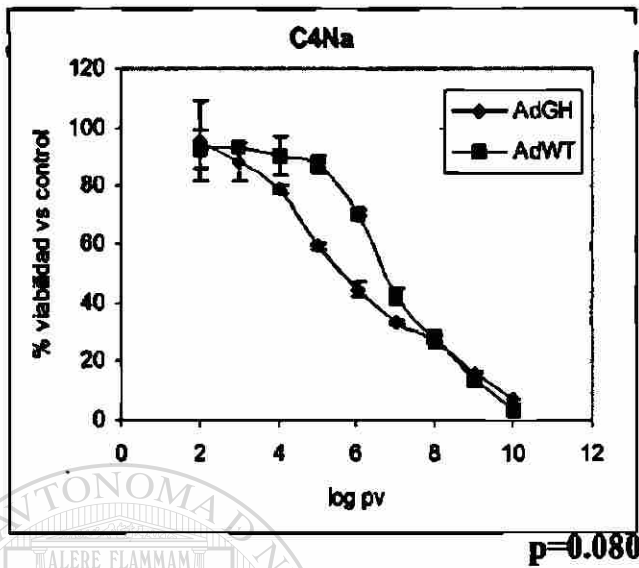
celulares humanas de hipófisis con este vector. Tomando en cuenta que no se pudo generar un vector con la versión larga del promotor del hGH-N, se decidió demostrar el efecto oncolítico en ensayos con Azul Alamar® del VARS con el promotor corto en diferentes líneas celulares, incluyendo una línea hipofisiaria, como alternativa al objetivo original.

#### 4.5.1 Estudios en líneas celulares: Efecto antineoplásico

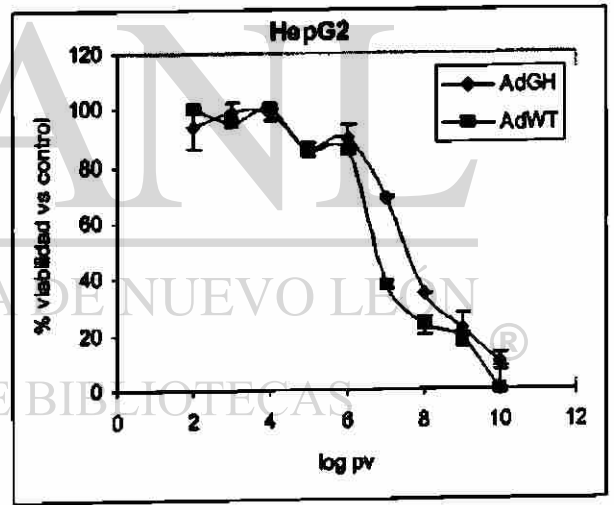
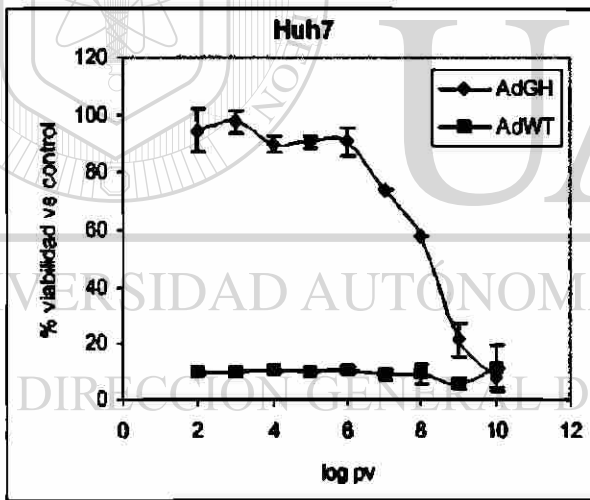
Se determinó el efecto antineoplásico del vector AdGH en varias líneas celulares mediante ensayos con azul Alamar®, comparado con el efecto del adenovirus silvestre, los resultados se muestran en la figura 21. A partir de estos resultados, se hizo un análisis de varianza (ANOVA) efectuando una comparación entre los dos vectores en cada línea celular. El valor de p se muestra al pie de cada figura. Valores arriba de 0.05 se consideran no significativos, y valores entre 0.05 y 0.06 se consideran con tendencia a ser significativos.

Si comparamos solamente el efecto del vector AdGH en las diferentes líneas celulares (Fig. 22), vemos que el vector lisa más eficientemente las células de hipófisis que a las no hipofisiarias. Este efecto se ve claramente hasta a una dosis de  $1 \times 10^7$ . Cuando se compara la potencia del vector AdGH en la línea hipofisiaria C4Na con la potencia del mismo vector en cada una de las líneas no hipofisiarias, se observa una tendencia hacia un efecto lítico mayor en la línea hipofisiaria que sólo resulta significativo cuando se compara con las líneas HuH7 y HeLa (Tabla 11).

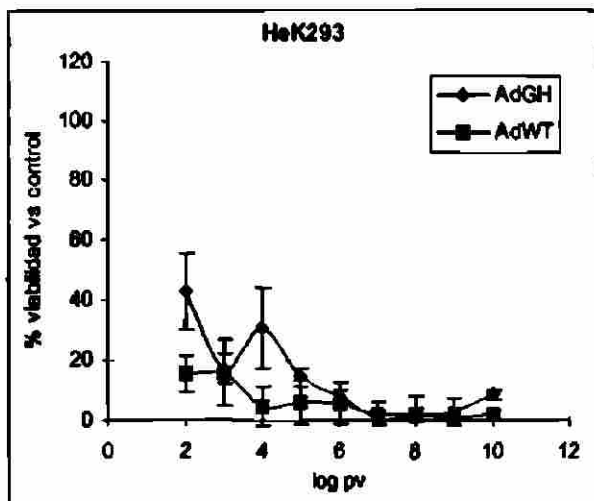
### A) Línea celular de hipófisis



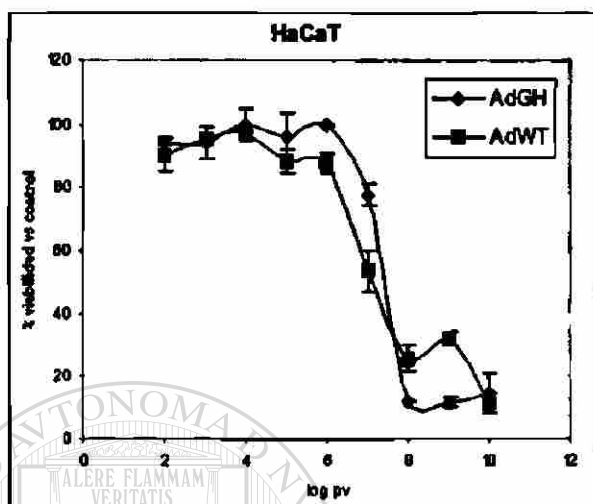
### B) Líneas celulares hepáticas



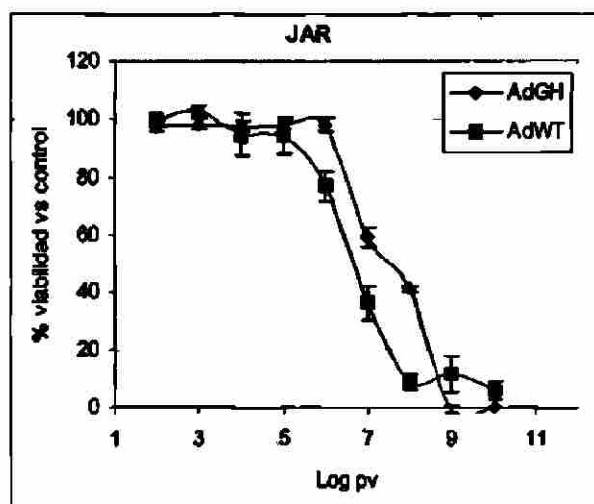
### C) Células empaquetadoras



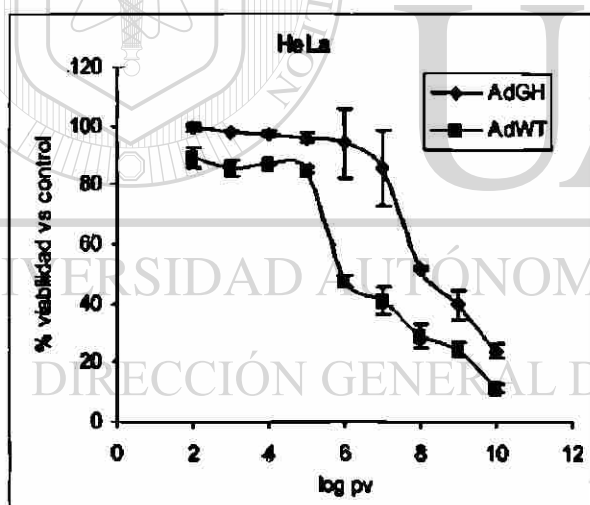
C) Líneas celulares no productoras de hGH



p=0.699



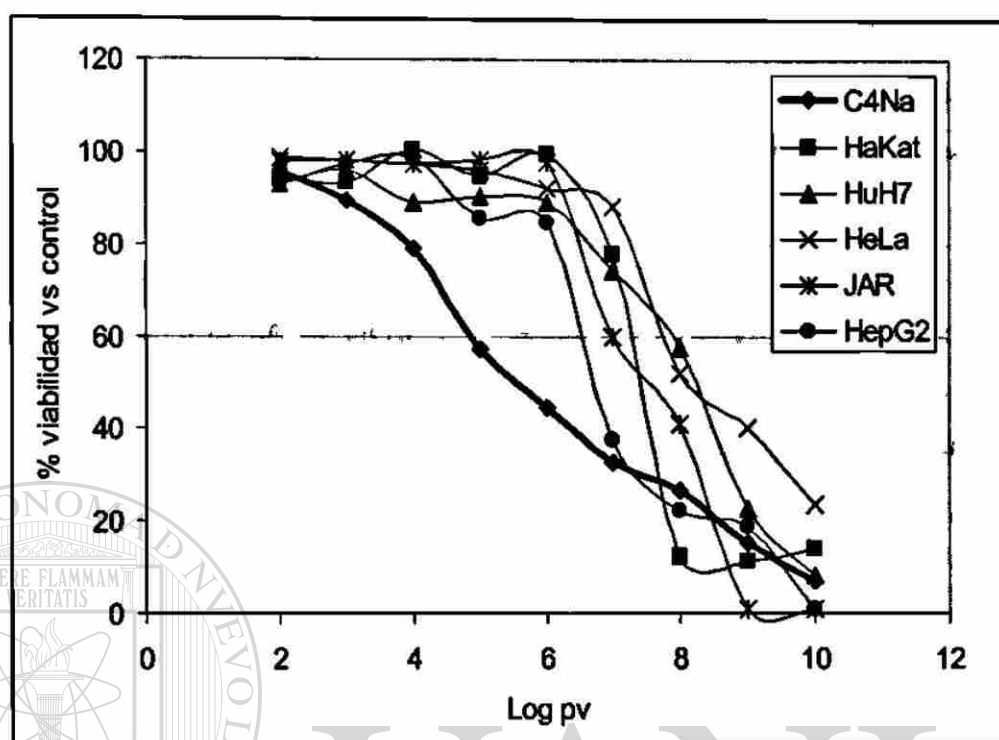
p=0.222



p=0.003\*

Fig. 21. Viabilidad celular tras la infección con el VARS. Se grafica el  $\log_{10}$  de la dosis probada contra el porcentaje de viabilidad de las células infectadas respecto de la viabilidad de las células no infectadas. A) Línea celular hipofisiaria, B) Líneas celulares hepáticas, C) Células empaquetadoras, D) Líneas celulares controles no productoras de hGH. Los ensayos se hicieron por triplicado. Las barras indican las desviaciones estándar. Al pie de la figura se muestra el valor de p correspondiente a la significancia que hay entre el efecto del AdGH y el AdWT y se marca con un asterisco los valores significativos.





**Fig. 22. Comparación del efecto del vector AdGH en la línea hipofisaria contra las líneas no hipofisarias.** Se grafica el  $\log_{10}$  de la dosis probada del vector AdGH contra el % de viabilidad celular. Por claridad, se omiten las desviaciones estándar, éstas se muestran en la Fig. 21.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Tabla 11. Valores de significancia resultado de la comparación de la línea hipofisaria contra cada una de las líneas no hipofisarias.**

Línea celular	Significancia <sup>a</sup>
HuH7	0.036*
HepG2	0.169
HaCaT	0.060
JAR	0.069
HeLa	0.004*

<sup>a</sup> Se marca con un asterisco los valores significativos ( $p < 0.05$ ).

A partir de los ensayos, se determinó la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) de ambos virus (Tabla 12). En la línea hipofisaria, la LD<sub>50</sub> del AdGH es menor que la del AdWT, mientras que en todas las demás líneas, aunque ésta es muy variable, siempre es menor la DL<sub>50</sub> del AdWT. Este dato también parece indicar que el vector AdGH es selectivo.

Se determinaron los índices de atenuación citolítica (IAC) obtenidos mediante la división de la DL<sub>50</sub> del VARS entre la DL<sub>50</sub> del vector silvestre (Tabla 12). Este índice indica el número de veces que está atenuada la citólisis del VARS con respecto al adenovirus silvestre. Las células HuH7 y HeLa presentan índices muy altos, aunque en las células HepG2 y HaCaT este índice no es tan alto.

Para evidenciar mejor la selectividad del VARS, se empleó un índice de selectividad (IS), el cual se obtuvo dividiendo el promedio de los IAC de las líneas no productoras de GH (JAR y HaCaT) entre el IAC de la línea hipofisaria. El valor obtenido es el número de veces que el VARS lisa con mayor eficiencia a las células hipofisarias C4Na, comparado con las otras líneas celulares. Se observa que el vector es 57 veces más potente en las células de hipófisis que en las células control.

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Tabla. 12. Valores de DL<sub>50</sub> de los vectores AdGH y AdWT e Índices de atenuación citolítica en las diferentes líneas celulares**

Línea celular	DL <sub>50</sub> AdGH	DL <sub>50</sub> AdWT	IAC
C4Na	4.05 x10 <sup>5</sup>	5.19x10 <sup>6</sup>	0.08
HuH7	1.62 x10 <sup>8</sup>	< 1 x10 <sup>2</sup>	1.27x10 <sup>7</sup>
HepG2	3.5 x10 <sup>7</sup>	5.46 x10 <sup>6</sup>	6.42
HaCaT	2.66 x10 <sup>7</sup>	1.33 x10 <sup>7</sup>	1.99
JAR	3.27 x10 <sup>7</sup>	4.6 x10 <sup>6</sup>	7.11
HEK293	< 1 x10 <sup>2</sup>	< 1 x10 <sup>2</sup>	3.70
HeLa	1.4 x10 <sup>8</sup>	8.72 x10 <sup>5</sup>	160.65

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN

Se construyó un plásmido que contiene el genoma adenoviral al cual se le insertó el promotor del gen hGH-N de 2.3 kb para que dirigiera la expresión del gen E1A del adenovirus. El promotor está precedido por una señal de poliadenilación para bloquear el efecto del promotor constitutivo del adenovirus.

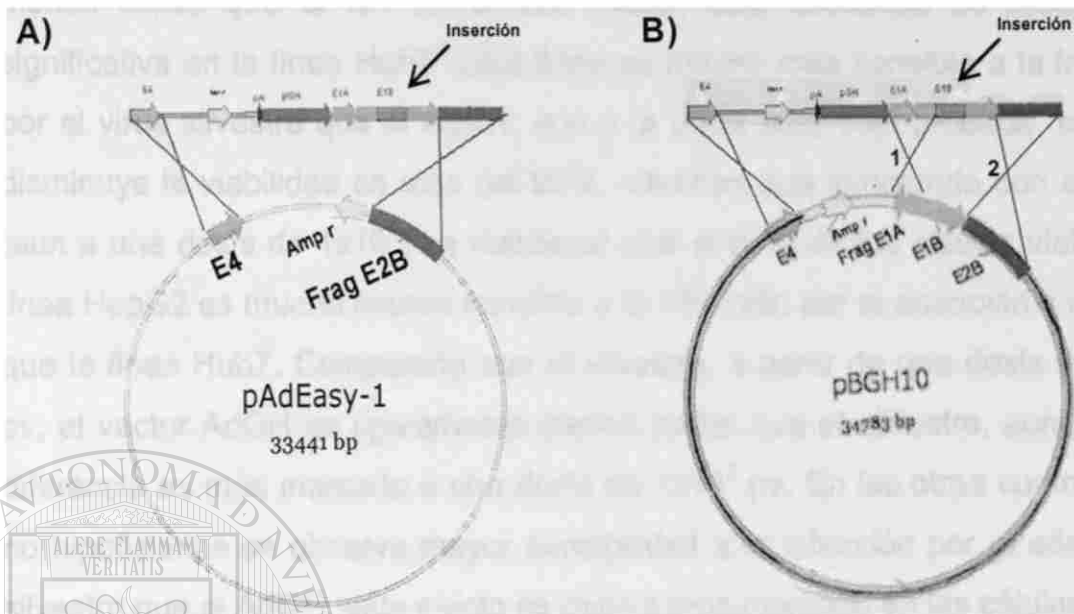
Con este plásmido, se transfectaron células empaquetadoras HEK293. Esta línea celular contiene el E1A del adenovirus, de tal manera que puede actuar de manera *trans* sobre un genoma adenoviral con E1A deletado o controlado por un promotor específico, permitiendo la expresión de las proteínas virales y la generación de partículas virales empaquetadas. Pero aunque se hicieron varios ensayos variando las condiciones, no se logró observar la formación de partículas virales. Para hacer las transfecciones, en la literatura se recomienda que se utilicen células HEK293 que no hayan sido propagadas en varias ocasiones. Las células con las que se contaba ya tenían muchos pases (mas de 40). Esto pudo haber influido para que no se generaran las partículas virales. Adicionalmente, aunque hay muchos trabajos donde generan partículas virales a partir de un plásmido circular<sup>60,61,62</sup>, éstos reportan el evento no es tan eficiente.

Se ha visto que la formación de partículas virales se facilita si las células HEK293 se transfectan con el DNA viral lineal<sup>64,65</sup>. En el caso del plásmido pBGH10-pGH construido, no se podía linearizar debido a que la enzima con que se lineariza comúnmente es *PacI*. Digiriendo con esta enzima, se libera la resistencia al antibiótico y el origen de replicación bacteriano quedando solo el

genoma adenoviral. Pero el plásmido pBGH10 tiene un sitio de corte para esta enzima en la posición correspondiente al gen E3 del adenovirus, de tal manera que no se podía utilizar esta enzima, y no hay ningún sitio para alguna enzima que corte el plásmido sin afectar el genoma adenoviral.

Como alternativa, se procedió a construir otro vector utilizando como esqueleto adenoviral el plásmido pAdEasy-1. El vector recombinante generado sí podría linearizarse digiriendo con PacI. Pero al tratar de construirse, nos dimos cuenta que el plásmido a partir del cual se construyó el vector acarreador venía con una modificación en la región de E1B, que posiblemente se trate de una inserción por recombinación que sufrió el plásmido al construirse originalmente. El plásmido pAdEasy-1 tiene deletada la región de E1 completa (E1A y E1B), de tal manera que solamente tiene homología en la región E2B con el plásmido acarreador (Fig. 22 A) y por consecuencia, el plásmido recombinante contiene el inserto en E2B, por lo que no se puede utilizar para generar partículas virales.

En el primer caso, donde se usaba el plásmido pBGH10, sí se generaba un plásmido íntegro porque este esqueleto adenoviral tiene deletado solamente E1A, y por consiguiente, puede tener dos eventos de recombinación; una en la región E1A (Fig. 22 B1) donde la inserción en E1B no se integra y la otra en la región E2B (Fig. 22 B2), donde la inserción en E1B sí se integra.



**Fig. 23. Eventos de recombinación entre el plásmido acarreador con la inserción y los esqueletos adenovirales. A)** El plásmido acarreador se recombina con el plásmido pAdEasy-1 en las regiones de E4 y E2B. **B)** El plásmido acarreador se recombina con el plásmido pBGH10 en las regiones de E4, y E1A (1) ó E2B (2).

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Tomando en cuenta que no se pudo generar un adenovirus con la versión larga del promotor del hGH-N, como alternativa al objetivo original se decidió demostrar el efecto oncolítico de un VARS dirigido por la versión corta de 500 pb del promotor de hGH-N llamado AdGH que estaba disponible en el laboratorio de Terapia Génica construido por Delgado-Enciso y cols. en el 2003, ya que no se habían hecho ensayos en líneas celulares humanas de hipófisis con este vector.

El vector AdGH lisa más eficientemente las células hipofisarias C4Na que el AdWT hasta una dosis de  $1 \times 10^7$ , después de esta dosis, el efecto de ambos vectores es muy similar. Este hecho parece indicar que el promotor sí es activo y además, es potente en este tipo de células.

Las líneas hepáticas se utilizaron para ver la especificidad del VARS y la posible toxicidad del vector en hígado. Aunque hay diferencia en el efecto de

ambos vectores sobre las dos líneas hepáticas probadas, el vector AdGH es menos tóxico que el WT en ambas líneas, esta diferencia es mucho más significativa en la línea Huh7. Esta línea es mucho más sensible a la infección por el virus silvestre que al AdGH, aun a la dosis mas baja probada, el AdWT disminuye la viabilidad en mas del 90%, mientras que infectando con el AdGH (aun a una dosis de  $1 \times 10^8$ ) se mantiene casi el 60% de las células viables. La línea HepG2 es mucho menos sensible a la infección por el adenovirus silvestre que la línea Huh7. Comparado con el silvestre, a partir de una dosis de  $1 \times 10^6$  pv, el vector AdGH es ligeramente menos tóxico que el silvestre, aunque esta diferencia es más marcada a una dosis de  $1 \times 10^7$  pv. En las otras cuatro líneas no hipofisarias se observa mayor sensibilidad a la infección por el adenovirus silvestre que al AdGH, este efecto es mucho más marcado en las células HeLa.

Todos estos resultados muestran que, al parecer, el vector tiene cierta especificidad y potencia hacia células hipofisarias, aunque para asegurar esto, habría que hacer ensayos en otras líneas hipofisarias, y además, hacer ensayos *in vivo* con este vector tratando tumores inducidos en ratones.

Existen algunos trabajos donde se ha utilizado el promotor de 0.5 kb para dirigir la expresión de un gen reportero como  $\beta$ -gal o un gen terapéutico como TK utilizado adenovirus no replicantes. Estos ensayos se han hecho tanto en líneas celulares como en tumores subcutáneos en ratones desnudos<sup>51,51</sup>. En estos trabajos también se encontró que hay cierta selectividad, pero baja potencia, similar a la observada en este trabajo. En tumores *in vivo* utilizando modelos murinos, encuentran que solo hay reducción de la masa tumoral, pero no la remisión total. Tomando en cuenta que con estos vectores la expresión del gen terapéutico es temporal y que en este trabajo se utilizó un adenovirus replicante, se esperaría que tal vez este VARS tuviera un efecto mayor en tumores *in vivo*.

## **CAPÍTULO VI**

### **CONCLUSIONES**

- 1- No se logró generar el adenovirus recombinante con el promotor de 2.3 kb del gen hGH-N.
- 2- Como alternativa, se estudió el efecto oncolítico de un VARS dirigido por la versión corta de 500 pb del promotor de hGH-N, el cual es muy similar al que se planeó construir en este trabajo, con la diferencia de que tiene solamente los 500 pb río arriba del gen hGH y no los 2.3 kb de la versión de este promotor.
- 3- Este VARS mostró selectividad y una potencia oncolítica suficiente en la línea celular hipofisaria como para seguir explorando su potencial uso terapéutico contra tumores hipofisarios.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## BIBLIOGRAFÍA

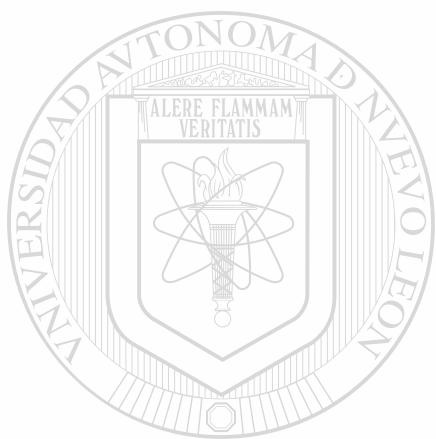
1. López-González MA y Sotelo J (2000) Brain tumors in México: characteristics and prognosis of glioblastoma. *Surg Neurol.* 53:157-162.
2. Thapar K, Kovacs K y Laws E, (1997) Pituitary tumors, in: P. Black, J. Loeffler (Eds.), *Cancer of the Nervous System*, Blackwell Science, Inc, Cambridge, p. 935.
3. Kovacs K, Horvath E y Vidal S (2001) Classification of pituitary adenomas. *J Neurooncol.* 54:121-7.
4. Castro M, Goverdhana S, Hu J, Jovel N, Yuan X y Lowenstein P (2003) Gene therapy for pituitary tumors: from preclinical models to clinical implementation. *Front Neuroendocrinol.* 24:62-77.
5. Castro MG, Cowen R, Williamson IK, David A, Jimenez-Dalmaroni MJ, Yuan X, Bigliari A, Williams JC, Hu J y Lowenstein PR. (1993) Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors. *Pharmacol Ther.* 98(1):71-108.
6. Jane JA Jr, Thapar K y Laws ER Jr (2001) Acromegaly. Historical perspectives and current therapy. *J Neurooncol* 54:129-37.
7. Melmed S, Casanueva FF, Cavagnini F, Chanson P, Frohman L, Grossman A, Ho K, Kleinberg D, Lamberts S, Laws E, Lombardi G, Vance ML, Werder KV y Wass J (2002) Guidelines for acromegaly management. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4054-8.
8. Gandhi CD, Post KD (2001) Historical movements in transsphenoidal surgery. *Neurosurg Focus* 11:1-4.
9. Woollons AC, Balakrishnan V, Hunn MK y Rajapaske YR (2000) Complications of trans-sphenoidal surgery: the Wellington experience. *Aust N Z J Surg.* 70:405-40.
10. Feek CM, McLelland J y Seth J (1984) How effective is external pituitary irradiation for growth hormone-secreting pituitary tumors? *Clin Endocrinol* 20:401-8.



11. Mountain A (2000) Gene therapy: the first decade. *Tibtech*. 18:119-128.
12. Rainov NG y Ren H (2003) Clinical trials with retrovirus mediated gene therapy-what have we learned? *J Neurooncol*. 65(3):227-36.
13. Volpers C y Kochanek S (2004) Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med*. 6 Suppl 1:S164-71.
14. Pandya S, Klimatcheva E y Planelles V (2001) Lentivirus and foamy virus vectors: novel gene therapy tools. *Expert Opin Biol Ther*. 1:17-4.
15. Yeung SN y Tufaro F. (2000) Gene therapy with herpes simplex virus vectors: progress and prospects for clinical neuroscience. *Neuroscientist*. 7(6):528-37.
16. Flotte TR y Carter BJ. (1999) Adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Gene Ther*. (6):357-62.
17. Gnant MF, Noll LA, Irvine KR, Puhmann M, Terrill RE, Alexander HR Jr y Bartlett DL (1999) Tumor-specific gene delivery using recombinant vaccinia virus in a rabbit model of liver metastases. *J Natl Cancer Inst*. 91(20):1744-50.
18. Coffey MC, Strong JE, Forsyth PA y Lee PW (1998) Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science*. 282(5392):1332-4.
19. Schirmacher V, Hass C, Bonifer R, Ahlert T, Gerhards R y Ertel C (1999) Human tumour cell modification by virus infection: an efficient and safe way to produce cancer vaccine with pleiotropic immune stimulatory properties when using Newcastle disease virus. *Gene Ther*. 6:63-77.
20. Wahlfors JJ, Zullo SA, Loimas S, Nelson DM y Morgan RA. (2000) Evaluation of recombinant alphaviruses as vectors in gene therapy. *Gene Ther*. 7(6):472-80.
21. Stojdl DF, Lichty B, Knowles S, Marius R, Atkins H, Sonenberg N y Bell JC (2000) Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med*. 6(7):821-5.
22. Shenk T (1996) Adenoviridae: The viruses and their replication. En: *Virology*, 3<sup>rd</sup> ed. Fields, BN (Ed). Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, EE.UU. pp. 2111-2148.
23. Boulanger PA y Blair GE (1991) Expression and interactions of human adenovirus oncoproteins. *Biochem J*. 275:281-99.

35. Yang Y, Trinchieri G y Wilson JM (1995) Recombinant IL-12 prevents formation of blocking IgA antibodies to recombinant adenovirus and allows repeated gene therapy to mouse lung. *Nat Med.* 1:890-93.
36. Kim DN, McCormick F (1996) Replicating viruses as selective cancer therapeutics. *Mol Med Today.* 2:519-27.
37. Bischoff JR, Kim DH, Williams A, Heise C, Horn S, Muna M, Ng L, Nye JA, Sampson-Johannes A, Fattaery A y McCormick F (1996) An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science.* 274:373-6.
38. Cohen EE, Rudin CM. (2001) ONYX-015: Onyx Pharmaceuticals. *Curr Opin Investig Drugs.* 2:1770-1775.
39. Rothmann T, Hengstermann A, Whitaker NJ, Scheffner M y zur Hausen K. (1998) Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J virol.* 72:9470-78.
40. Heise C, Hermiston T, Johnson L, Brooks G, Sampson-Johannes A, Williams A, Hawkins L y Kim D (2000) An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med.* &:1134-39.
41. Balague C, Noya F, Alemany R, Chow LT y Curial DT (2001) Human papillomavirus E6E7-mediated adenovirus cell killing: selectivity of mutant adenovirus replication in organotypic cultures of human keratinocytes. *J Virol.* 7:7602-11.
42. Rodríguez R, Schuur ER, Lim HY, Henderson GA, Simons JW y Henderson DR (1997) Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: A selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res.* 57:2559-63.
43. Yu DC, Chen Y, Seng M, Dilley J y Henderson DR (1999) The addition of adenovirus type 5 region E3 enables calydon virus 787 to eliminate distant prostate tumor xenografts. *Cancer Res.* 59:4200-3.
44. Toyoizumi T, Tsukuda K, Sandhu AK, Odaka M, Albelda SM y Amin K (2000) CEA-regulated replication-selective adenovirus for treatment of CEA-positive tumors. *Mol Ther.* 1:S159.
45. Hallenbeck PL, Chan YN, Hay C, Golightly D, Stewart D y Lin J (1999) A novel tumor-specific replication-restricted adenoviral vector for gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Hum Gen Ther.* 10:1721-33.

46. Zhang L, Peng XY, Kacinski B, Pizzorno G, Crystal R, Chung I y Ruthenford T (2000) L-plastin promoter confers tumor-specific gene expression and tumor-specific conditional replication competency on adenoviral vectors. *Mol Med.* 1:S141.
47. Oruckaptan HH, Senmevsim O, Ozcan OE y Ozgen T (2000) Pituitary adenomas: results of 684 surgically treated patients and review of the literature. *Surg Neurol.* 53:211-219.
48. Williams JC, Stone D, Smith-Arica JR, Morris ID, Lowenstein PR y Castro MG (2001) Regulated, adenovirus-mediated delivery of tyrosine hydroxylase suppresses growth of estrogen-induced pituitary prolactinomas. *Mol Ther.* 4:593-602.
49. Bolognani F, Albarino C, Romanowski V, Carri NG y Goya RG (2001) In vitro and in vivo herpetic vector-mediated gene transfer in the pituitary gland: impact on hormone secretion. *Eur J Endocrinol.* 145:497-503.
50. Smith-Arica JR, Williams JC, Stone D, Smith J, Lowenstein PR y Castro MG (2001). Switching on and off transgene expression within lactotrophic cells in the anterior pituitary gland *in vivo*. *Endocrinology*, 142:2521-2532.
51. Lee EJ, Anderson LM, Thimmapaya B y Jameson JL (1999) Targeted expression of toxic genes directed by pituitary hormone promoters: a potential strategy for adenovirus-mediated gene therapy of pituitary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:786-794.
52. Lee EJ, Thimmapaya B y Jameson JL (2000) Stereotactic injection of adenoviral vectors that target gene expression to specific pituitary cell types: implications for gene therapy. *Neurosurgery.* 46:1461-1468; discussion 1468-1469.
53. Windeatt S, Southgate TD, Dewey RA, Bolognani F, Perone MJ, Larregina AT, Maleniak TC, Morris ID, Goya RG, Klatzmann D, Lowenstein PR y Castro MG (2000) Adenovirus-mediated herpes simplex virus type-1 thymidine kinase gene therapy suppresses oestrogen-induced pituitary prolactinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 85:1296-1305.
54. Southgate TD, Windeatt S, Smith-Arica J, Gerdes CA, Perone MJ, Morris I, Davis JR, Klatzmann D, Lowenstein PR y Castro MG (2000) Transcriptional targeting to anterior pituitary lactotrophic cells using recombinant adenovirus vectors *in vitro* and *in vivo* in normal and estrogen/sulpiride-induced hyperplastic anterior pituitaries. *Endocrinology.* 141:3493-3505.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



