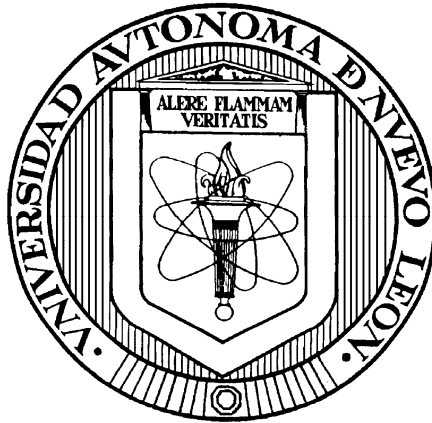


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.

FACULTAD DE MEDICINA.



**CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR ADENOVIRAL AD-UBV2/E1A Δ 24 Y EVALUACIÓN
COMPARATIVA CON EL VECTOR ONCOLÍTICO TEJIDO ESPECÍFICO
AD-URR/E1A Δ 24.**

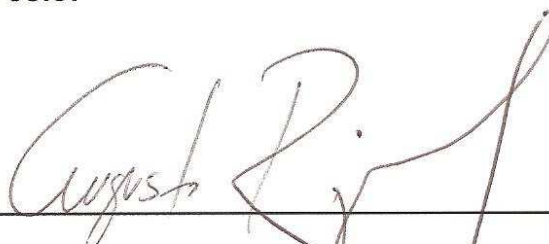
Por: Q.B.P. Magda Elizabeth Vera García.

**Como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias con
Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.**

Monterrey, N.L., Octubre 2011.

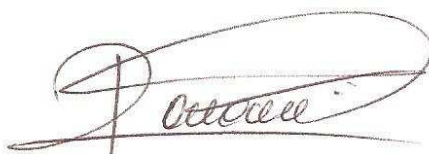
CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR ADENOVIRAL AD-UBV2/E1A Δ 24 Y EVALUACIÓN
COMPARATIVA CON EL VECTOR ONCOLÍTICO TEJIDO ESPECÍFICO
AD-URR/E1A Δ 24.

Aprobación de la Tesis:



DR. C. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ.

Director de Tesis.



DRA. C. ROCÍO ORTÍZ LÓPEZ.

Co-Directora de Tesis



DR. C. IVÁN DELGADO ENSCISO.

Co-Director de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Medicina y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Augusto Rojas Martínez, codirección de la Dra. Rocío Ortiz López, siendo parte de la comisión de tesis el Dr. Iván Delgado Enciso.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios por permitirme vivir, conocer algunas de las maravillas del universo y ayudarme a abrir las puertas del entendimiento para dar un salto a otra etapa profesional y personal.

A mis padres Juan Horacio Vera Ortíz y Magda Guadalupe García Rodríguez, por su gran e incondicional amor así como su apoyo en situaciones adversas en mi vida. A mis hermana Jessica y Verónica por su cariño, apoyo y comprensión. A mis abuelos Hermilo García y Amparo Rodríguez por todo el cariño y apoyo que siempre han mostrado.

A toda mi familia por ser parte de lo que soy.

Al Dr. Augusto Rojas por aceptar mi integración a este proyecto de investigación, enseñarme a hacerme cargo de mis proyectos profesionales y su gran paciencia en la realización de este trabajo.

A la Dra. Herminia por mostrarme su gran paciencia y sabiduría mediante palabras y acciones.

A Gissela Borrego por todos los conocimientos y asesoría transmitidos durante la realización de este proyecto de tesis, sin su apoyo no lo hubiera logrado.

A la Dra. Rocío Ortiz y los doctores Iván Marino, Iván Enciso y Daniel Cervantes que con sus comentarios oportunos me ayudaron a concretar muchos experimentos.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Sergio, Jaz, Goyo, Gis, Iván, Jorge, Gloria, Adelina, Alí 1, Alí2, Richard, Mario, que me han estado conmigo en situaciones buenas y malas, enseñándome de alguna u otra forma a tomar mejores decisiones. Se han ganado mi cariño y aprecio.

A todos los integrantes del laboratorio de Biotec por su valiosa cooperación.

Al personal del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, todos han contribuido de alguna u otra forma a la elaboración de este proyecto.

A esos raros hechos de la vida que nos ayudan a ser más fuertes y mejores.

A CONACYT por proporcionarme la oportunidad y los medios para obtener el grado de M.C.

RESÚMEN

Estudiante: Q.B.P. Magda Elizabeth Vera García.

Universidad Autónoma de Nuevo León.

Facultad de Medicina.

Título del estudio: CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR ADENOVIRAL AD-UBV2/E1A Δ 24 Y EVALUACIÓN COMPARATIVA CON EL VECTOR ONCOLÍTICO TEJIDO ESPECÍFICO AD-URR/E1A Δ 24.

Número de páginas: 59.

Candidato para titulación de: Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Introducción: El virus del papiloma humano (VPH) es el principal factor de riesgo asociado al cáncer cervicouterino (CaCU). El promotor y controlador de la expresión de genes virales en el VPH-16, un VPH de alto riesgo asociado a oncogénesis, se denomina región reguladora río arriba (URR) cuya activación induce la expresión de los oncogenes E6 y E7. La activación de la URR está relacionada con múltiples factores de transcripción, siendo uno de ellos Brn-3a, el cual está asociado con el desarrollo neuronal y cardíaco. Los niveles de expresión de Brn-3a disminuyen a niveles indetectables en la etapa adulta de ratones y humanos. La URR de la variante 2 (UBV2) del VPH está asociada con una fuerte inducción de la expresión del gen E6 y dicha activación se ha asociado a la estimulación con la proteína Brn-3a. El adenovirus 5 es uno de los vectores más seguros como tratamiento en humanos. Una estrategia para el diseño de vectores de replicación competente más seguros es el uso del gen de replicación E1A (mutación D24), la cual codifica para un factor de transcripción viral incapaz de interactuar con la proteína pRb que controla el ciclo celular. En contraste, este promotor puede ser activado por Brn-3a presente en el núcleo de la célula, proporcionando la capacidad viral selectiva en células cancerosas de CaCU.

Objetivo: Construir un vector adenoviral oncolítico selectivo y potente, cuya replicación y expresión sean estimuladas por el factor de transcripción Brn-3a.

Material y método: Se contruyó el vector adenoviral Ad-UBV2/E1A Δ 24 mediante la recombinación de los plásmidos pShuttle-UBV2/E1A Δ 24 y pAd-Easy1. Los vectores adenovirales Ad-UBV2/E1A Δ 24, Ad-URR/E1A Δ 24, Ad-WT y Ad-CMV-Luc fueron producidos, purificados y titulados y posteriormente sometidos a ensayos de citotoxicidad de líneas celulares VPH (+) y VPH (-) mediante análisis microscópico.

Resultado: Se determinó la correcta recombinación plasmídica, así como la construcción del vector adenoviral Ad-UBV2/E1A Δ 24. Los ensayos de citotoxicidad mostraron un fuerte efecto citotóxico por parte de los adenovirus Ad-URR/E1A Δ 24 y Ad-WT obteniendo la selectividad reportada. El adenovirus Ad-UBV2/E1A Δ 24, al igual que Ad-CMV-Luc, solo mostraron efecto en la línea celular permisiva HEK293.

Conclusiones: El vector diseñado y generado no produjo el efecto citolítico esperado en las células VPH (+). La poca funcionalidad del vector Ad-UBV2/E1A Δ 24 puede haberse debido a problemas a nivel de pH, concentración de sales o concentración de partículas en el momento de su purificación. El sitio MAR presente en la UBV2 puede estar asociado con una represión de este promotor. Es importante la determinación de la activación de la UBV2 y la correlación de su activación en presencia de Brn-3a mediante ensayos in vitro, con el fin de determinar la funcionalidad de este promotor y del vector adenoviral.

CONTENIDO.

INDICE.....	1
FIGURAS Y TABLAS.....	3
ABREVIATURAS.....	7
I. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 CÁNCER.....	10
1.1.1 EPIDEMIOLOGÍA.....	10
1.2 CÁNCER CERVIOUTERINO.....	11
1.3 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH).....	12
1.3.1 URR.....	15
1.3.2 UBV2.....	17
1.4 BRN-3A.....	18
1.5 TERAPIA GÉNÉTICA.....	20
1.5.1 VECTORES ADENOVIRALES.....	21
1.5.2 Ad-URR/E1A Δ 24.....	23
II. JUSTIFICACIÓN.....	25
III. OBJETIVO.....	26
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	26
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	26
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
4.1 MATERIAL.....	27
4.2 METODOLOGÍA.....	28

4.2.1 LÍNEAS CELULARES.....	28
4.2.2 CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDO pShuttle-UBV2/E1A Δ 24.....	29
4.2.3 CONSTRUCCIÓN DEL GENOMA ADENOVIRAL pAd-UBV2/E1A Δ 24.....	30
4.2.4. GENERACIÓN DEL VARS AD-UBV2/E1A Δ 24.....	31
4.2.5 PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE VECTORES ADENOVIRALES.....	32
4.2.6 TITULACIÓN DE VECTORES ADENOVIRALES POR TCID ₅₀	34
4.2.7 EVALUACIÓN DE EFECTO CITOTÓXICO DE LOS VECTORES ADENOVIRALES.....	35
V. RESULTADOS.....	36
5.1 CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDO pShuttle-UBV2/E1A Δ 24.....	36
5.2 CONSTRUCCIÓN DEL GENOMA ADENOVIRAL pAd-UBV2/E1A Δ 24.....	39
5.3 GENERACIÓN DEL VARS Ad-UBV2/E1A Δ 24.....	43
5.4 PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y TITULACIÓN DE VECTORES ADENOVIRALES.....	44
5.5 EVALUACIÓN DE EFECTO CITOTÓXICO DE LOS VECTORES ADENOVIRALES.....	46
VI. DISCUSIÓN.....	49
VII. CONCLUSIÓN.....	54

VIII. LITERATURA CONSULTADA.....	55
---	-----------

FIGURAS Y TABLAS.

FIGURA 1. Tasa de mortalidad por CaCU por entidad federativa en el año 2007.....	11
FIGURA 2. Estructura genética del VPH-16.....	14
FIGURA 3. Esquema de la expresión génica viral orquestada en una infección productiva del VP.....	14
FIGURA 4. Representación esquemática de la URR del VPH-16, el cual puede ser considerado como un modelo para la URR de todos los VPH genitales.....	17
FIGURA 5. Diagrama de la UBV2 y su sitio de unión para Brn-3a.....	18
FIGURA 6. Esquema de la relación de Brn-3a con el desarrollo del CaCU mediante su interacción con las proteínas del ciclo celular p53 y pRB y las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16.....	20
FIGURA 7. Estructura tridimensional del Ad y esquema de ventajas y desventajas en su uso como vector de terapia génica.....	22
FIGURA 8. Esquema del plásmido lanzadera pShuttle URR/E1A Δ 24 conteniendo la URR de una variante del VPH-16 AA dirigiendo la expresión del gen adenoviral E1A Δ 24.....	24
FIGURA 9. Estrategia general.....	28

FIGURA 10. Digestión enzimática de los plásmidos pDIT-Smart UBV2 y pShuttle con las enzimas <i>SalI</i> y <i>SpeI</i> , para la liberación del promotor UBV2 (808pb) y URR (638pb) observada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.....	37
FIGURA 11. Verificación de la integridad del DNA de colonias resistentes a kanamicina crecidas en agar LB seleccionadas para identificación de la presencia de pShuttle-UBV2/E1A Δ 24 mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	37
FIGURA 12. Selección de clonas portadoras del plásmido pShuttle-UBV2/E1A Δ 24 mediante el análisis del DNA por la restricción con las endonucleasas <i>AflIII</i> y <i>SpeI</i> del DNA de colonias con resistencia a kanamicina crecidas en agar LB.....	38
FIGURA 13. Determinación de la presencia de la UBV2 en el plásmido pShuttle-UBV2/E1A Δ 24 mediante la técnica de PCR. Gel de agarosa al 2%...	38
FIGURA 14. Determinación de clonas portadoras del plásmido pAdEasy-1 mediante digestión con la enzima <i>HindIII</i> . Electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	40
FIGURA 15. Linearización del plásmido pShuttleUBV2/E1A Δ 24 con la enzima <i>BstZI</i> . Electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	41
FIGURA 16. Esquema de generación del plásmido pAd-UBV2/E1A Δ 24.	

Recombinación de los plásmidos pShuttle-UBV2/E1A Δ 24 linearizado y pAd-Easy1.....	41
FIGURA 17. Evaluación de patrón de restricción de las endonucleasas PacI y BamHI para selección de clonas recombinantes positivas portadoras del pAd-UBV2/E1A Δ 24. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	42
FIGURA 18. Selección de clonas recombinantes positivas portadoras del plásmido pAd-UBV2/E1A Δ 24 mediante digestión de DNA con la enzima de restricción BamHI. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	42
FIGURA 19. Digestión del DNA de la clona portadora del plásmido pAd-UBV2/E1A Δ 24 con la enzima BamHI. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.....	43
FIGURA 20. Determinación de la producción de partículas del virus Ad-UBV2/E1A Δ 24 mediante observación microscópica del efecto citopático inducido en células HEK293 posterior a la lipofección con el genoma del pAd-UBV2/E1A Δ 24 linearizado.....	43
FIGURA 21. Determinación de la presencia de la región promotora UBV2 mediante la técnica de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 2%.....	44
FIGURA 22. Titulación del vector adenoviral Ad-UBV2/E1A Δ 24. Imágenes microscópicas al 10X obtenidas a partir de la titulación del virus Ad-	45

UBV2/E1A Δ 24.....

FIGURA 23. Evaluación del efecto citotóxico de los vectores adenovirales con 100 MOI por célula en las líneas celulares HEK293, HeLa, C33a, Huh-7, Sk-N-MC y PC3..... 48

Tabla 1. Títulos adenovirales obtenidos mediante la técnica de TCID₅₀..... 44

ABREVIATURAS.

°C	Grados Celsius
μL	Microlitro.
AA	Asiático americana.
Ad	Adenovirus.
Ad-2	Adenovirus serotipo 2.
Ad-5	Adenovirus serotipo 5.
Ad-WT	Adenovirus 5 silvestre.
CaCU	Cáncer cervicouterino.
CAR	Receptor de adenovirus y coxsackievirus, del inglés: Coxsackievirus and adenovirus receptor.
CIN3	Neoplasia intrapitelial cervical grado 3, del inglés: Cervical Intraepitelial Neoplasia grade 3.
CsCl	Cloruro de cesio.
CRAD	Adenovirus de replicación condicionada.
DNA	Acido desóxiribonucleico.
E1AΔ24	Gen E1A del adenovirus 5 con una deleción de 24 pares de bases.
kDa	Kilo Daltons.
Kpb	Kilo pares de bases.
LCR	Región larga de control, del inglés: Long control región –.
mL	Mililitro.
MOI	Multiplicidad de infección, del inglés: Multiplicity of infection.

ORF	Marco abierto de lectura, del inglés: Open read frame.
pA	Poliadenilación.
Pb	Pares de bases.
POU	Pit-Oct-Unc
RB	Retinoblastpma
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción, del inglés: Restriction Fragment Lenght Polymorphism.
RNA	Acido ribonucléico.
RNAm	Acido ribonucleico mensajero.
SFB	Suero fetal bovino.
TCID₅₀	Dosis infecciosa 50 en cultivo de tejido, del inglés: Tissue culture infectious dose 50.
URR	Región reguladora río arriba, del inglés: Up regulatory region.
UBV2	Región reguladora río arriba de la variante 2 del VPH-16
VHS	Virus del herpes simple
VHS-1	Virus del herpes simple tipo 1.
VP	Virus del papiloma.
VPH	Virus del papiloma humano.
VPH (+)	Positiva para el virus del papiloma humano.
VPH (-)	Negativa para el virus del papiloma humano.
VPH-16	Virus del papiloma humano tipo 16.
VPH-18	Virus del papiloma humano tipo 18.

I. INTRODUCCIÓN.

1.1 CÁNCER.

El cáncer es un conjunto de enfermedades originadas a partir de la transformación de una célula normal a cancerosa en un proceso multifásico, pasando generalmente por una lesión precancerosa antes de llegar al tumor maligno, manifestando alteraciones en la fisiología celular como lo son la suficiencia propia de señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, e invasión de tejido y metástasis (1, 2, 3, 4, 5). Esta malignidad puede originarse a partir de cualquier tipo de célula de los diferentes tejidos del organismo reportándose actualmente más de 100 distintos tipos de cáncer y subtipos de tumores (2).

1.1.1 EPIDEMIOLOGÍA.

El cáncer es la segunda causa de muerte en países económicamente desarrollados (siguiendo a las enfermedades del corazón) y la tercera causa de muerte en países en desarrollo (siguiendo enfermedades del corazón y enfermedades infecciosas). (5).

Actualmente, dos de los tres principales tipos de cáncer en hombre (estómago e hígado) y en mujeres (cérnix y estómago) en países en desarrollo están relacionados con infecciones. Aproximadamente el 15% de la incidencia del cáncer a nivel mundial es atribuido a infecciones. Este porcentaje es tres veces mayor en países en desarrollo (26%) que en países desarrollados (8%) (6).

En México se registraron 514 mil 420 defunciones en el año 2007, siendo los tumores malignos la segunda causa de muerte (14.6% defunciones femeninas y 11.1% masculinas). El 12.09% de los fallecimientos debido a cáncer en la población femenina se debió al cáncer cervicouterino (CaCU), posicionándose como la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer, tanto en México como a nivel mundial (Fig.1) (6, 7).

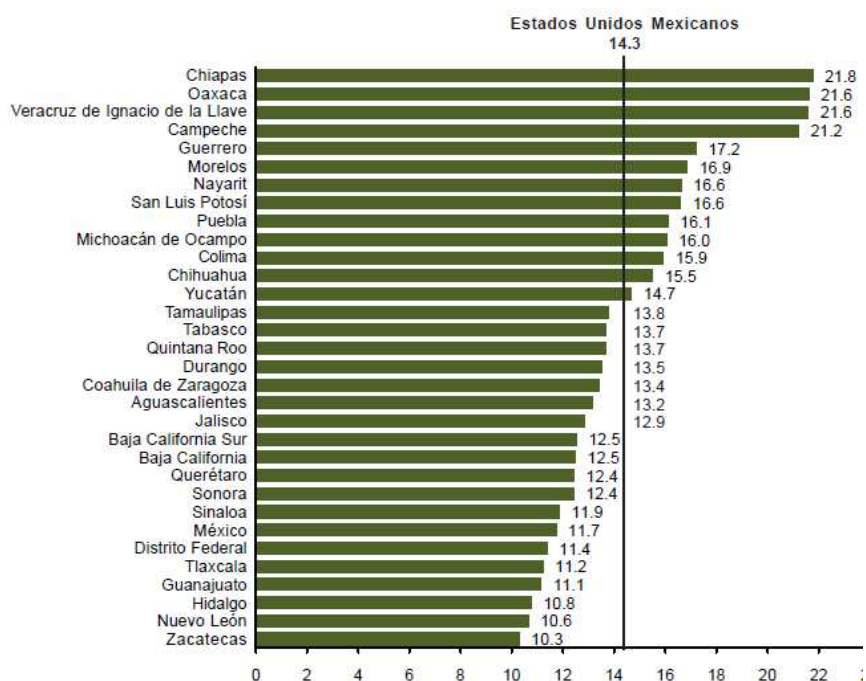


FIGURA 1. Tasa de mortalidad por CaCU por entidad federativa de los Estados Unidos Mexicanos en el año 2007 (Por 100 000 mujeres de 25 años y más) (6).

1.2 CÁNCER CERVICOUTERINO (CaCU).

El CaCU se origina debido a la transformación maligna de células localizadas en la superficie del cérvix, afectando el sistema reproductivo de la mujer (6).

Algunos factores de alto riesgo para el CaCU son el inicio a edad temprana de la actividad sexual, alto número de compañeros sexuales, elevado número de partos, grupo étnico, nivel socioeconómico, el uso de anticonceptivos orales, tabaquismo e

infecciones de transmisión sexual (7,8, 9, 10, 11, 12, 13), sin embargo de acuerdo con hallazgos en la investigación clínica y epidemiológica se considera al virus del papiloma humano (VPH) como el principal factor de riesgo para el carcinoma del cérvix, asociándose al 99.7% de los casos de CaCU (13).

1.3 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH).

Los virus del papiloma (VP) son un grupo de virus pequeños no envueltos con DNA de doble cadena circular de alrededor de 8 kpb de replicación multicopia y un virión de tamaño aproximado de 55 nm. Este grupo de virus infecta varios animales desde aves hasta mamíferos, incluyendo humanos, teniendo un marcado tropismo a infectar tejidos epiteliales de ciertas especies. Actualmente han sido secuenciados más de 100 genotipos de VPH y animales (13,14, 15, 16).

Los VPH de los géneros alfa están subcategorizados con base en la asociación con el riesgo de transformación oncogénica, en genotipos de bajo y alto riesgo. De acuerdo a la evidencia epidemiológica 13 tipos de VPH conforman el grupo de bajo riesgo: tipos 6, 6a, 6b, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81, los cuales causan neoformaciones benignas. En el grupo de alto riesgo se incluyen 19 genotipos de VPH, los tipos 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68a, 73 y 82. Estos virus están asociados con carcinomas anogenitales, principalmente CaCU, carcinomas orofaríngeos de células escamosas y otras malignidades como cáncer de piel no melanoma (14). El VPH-16 es responsable del desarrollo del 58.9% del CaCU (13, 14).

El genoma del VPH puede ser dividido en general en tres regiones principales: temprana, tardía y la región regulatoria río arriba (URR, LCR o región no codificante) (Fig.2). Estas tres regiones en todos los VP están separadas por dos sitios de poliadenilación (pA): temprano (AE) y tardío (AL) (15, 16).

-La región temprana ocupa cerca del 50% del genoma viral a partir de la mitad del 5' y codifica 6 marcos abiertos de lectura: E1, E2 y E4 corresponden a genes regulatorios involucrados en la transcripción y replicación, mientras que E5, E6 y E7 son oncogenes involucrados en la inmortalización y transformación maligna de la célula (14, 15, 16).

-La región tardía cubre casi el 40% del genoma viral se localiza río abajo de la región temprana y codifica los ORFs (marco abierto de lectura del inglés Open read frame) L1 y L2 para traducir en las proteínas de cápside mayor (L1) y menor (L2). Las cápsides de los VP son aproximadamente de 50 nm de diámetro y están compuestas de 72 capsómeros pentaméricos arreglados en lálices icosaédricos T=7. Las proteínas de cápside L1 y L2 son sintetizadas tardíamente en el ciclo de infección y su función es la encapsidación del mini-cromosoma (14, 16).

-La región URR, un segmento de cerca de 850 pb (10% del genoma) no tiene la función de codificar proteínas, sin embargo porta el origen de replicación, así como múltiples sitios de unión para factores de transcripción que son importantes en la regulación de la transcripción de la RNA polimerasa II iniciada a partir de los promotores tempranos y tardíos (11, 14, 18).

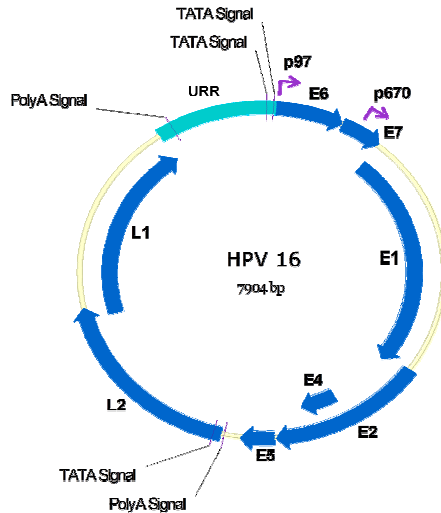


FIGURA 2. Estructura genética del VPH-16. Compuesta por tres regiones principales: región temprana que contiene los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7; región tardía conteniendo a los genes L1 y L2; y la región URR la cual es una secuencia no codificante con múltiples sitios de regulación de la expresión de los oncogenes E6 y E7.

El virus infecta los queratinocitos de las capas basales del epitelio escamoso estratificado, replicándose de forma muy controlada en el núcleo. La expresión de los genes virales tempranos es llevada a cabo en queratinocitos indiferenciados o medianamente diferenciados, mientras que los genes tardíos son expresados en queratinocitos completamente diferenciados. El VPH no codifica las enzimas de replicación del DNA, por lo que la síntesis del genoma viral está ligada a la replicación del DNA celular (Fig. 3) (14, 15, 16).

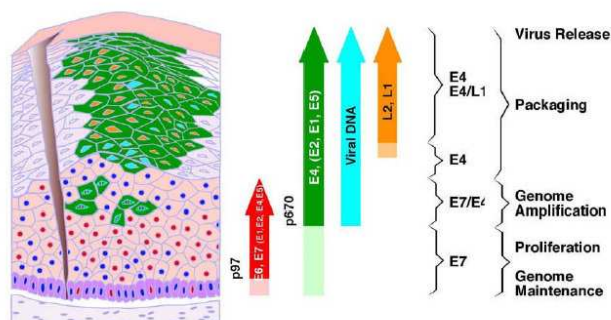


FIGURA 3. Esquema de la expresión génica viral orquestada en una infección productiva del VP (16).

Durante la progresión carcinogénica el genoma del VPH frecuentemente se integra al cromosoma hospedero y las proteínas E6 y E7 son las únicas expresadas consistentemente en líneas de CaCU VPH (+). La carcinogénesis inducida por el VPH es el resultado de la expresión desregulada de las proteínas E6 y E7 del VPH las cuales tienen como función estabilizar y/o mantener un ambiente celular que soporte la replicación viral, además desregulan las vías de arresto de crecimiento celular durante la diferenciación. Las proteínas E6 y E7 comprometen a las proteínas supresoras de tumor p53 y pRb, respectivamente. Este proceso de inactivación es menos eficiente en VPH de bajo riesgo en comparación con los de alto riesgo (15, 16,17, 18, 19). La unión de E7 con pRb inactiva al complejo pRb-E2F represor del ciclo celular descontrolando la progresión del ciclo celular, la síntesis nucleotídica, la replicación de DNA, la reparación de DNA y la apoptosis (16, 19).

1.3.1 URR.

La organización de la URR puede ser dividida en tres segmentos: el segmento 5', el segmento central y el segmento 3' (Fig. 4).

-El segmento 5' de la URR de los VPH genitales tienen un tamaño de aproximadamente 300 pb, se encuentra delimitado por el codón de terminación de la L1 y un sitio de unión de E2. Este segmento contiene la terminación de la transcripción y los sitios de poliadenilación para los transcritos tardíos, así como elementos regulatorios negativos que actúan a nivel de la estabilidad del RNAm tardío. La función del sitio de unión de E2 al lado 3' de este segmento es desconocida, aunque se ha reportado que influyen la transcripción *in vitro* del promotor remoto E6/E7 (20).

-El segmento central de la URR de los VPH genitales, el cual está flanqueado por dos sitios de unión de E2, tiene un tamaño de alrededor de 400 pb y se ha demostrado su función en VPH-11, VPH-16 y VPH-18 como potenciador transcripcional específico de epitelio. Aunque actualmente se cree que es el potenciador específico de tejido, el cual podría determinar el tropismo epitelial desplegado por el VPH, no existen pruebas científicas que apoyen esta explicación. Originalmente se pensaba que podrían existir factores tejido específicos de unión a DNA, sin embargo esto no ha sido demostrado. Una hipótesis alternativa propuesta involucra las diferencias cualitativas o cuantitativas en factores aparentemente ubicuos, como las proteínas de los diferentes miembros de la familia de factores transcripcionales NFI y Jun. Otra propuesta es que podrían existir cofactores tejido específicos que no se unieran directamente al DNA, pero que pudieran requerir de la activación mediante interacciones proteína-proteína.

Se ha demostrado que al menos 11 factores de transcripción celular se unen *in vitro* a más de veinte diferentes sitios de unión de los potenciadores del VPH-16, estos son AP1, cEBP, receptor de glucocorticoides, receptor de progesterona, NFI, NF-IL6, Oct-1, PEF-1, TEF-1, TEF-2 y YY-1 (20).

-El segmento 3' de la URR de los VPH genitales se encuentra delimitado por el segundo sitio de unión de E2 y el gen E6 y tiene un tamaño cercano a 140 pb. Este segmento contiene un solo sitio de unión de E1, el cual identifica el origen de replicación. El sitio de inicio de la transcripción, el cual está 5 pb río arriba del ATG de E6, está localizado alrededor de 90 pb río abajo del sitio de unión de E1. Un segmento de cerca de 45 pb en estas 90 pb contiene un sitio de unión para el factor de

transcripción celulares los cuales son generalmente expresados ubicuitamente (9, 11, 16,18, 20).

En un estudio de 100 mujeres infectadas con VPH-16 se determinó la relación de diversas variantes del virus, clasificadas mediante un análisis de RFLP (del inglés: Restriction Fragment Length Polymorphism) del gen E5 y secuenciación de la URR, con diferentes grados de progresión de la enfermedad cervical. Se obtuvieron tres principales variantes: la variante 5 asociada a lesiones de bajo grado, la variante 1 que se encontró en lesiones de bajo y alto grado por igual y la variante 2, la cual fue asociada con agresividad tumoral debido a que fue identificada en lesiones intraepiteliales de alto grado (11, 21). Estudios posteriores correlacionaron la presencia de estas variantes con el riesgo de progresión cancerígena y los niveles de Brn-3a encontrados en lesiones cervicales, demostrando la asociación de altos niveles de Brn-3a con lesiones de mayor grado, particularmente con la variante 2 (Fig. 5). De esta forma la variante 2 del VPH-16 se relaciona con un alto riesgo de progresión de la enfermedad y alto nivel de concentraciones de Brn-3a (21, 22).



FIGURA 5. Diagrama de la UBV2 y su sitio de unión para Brn-3a.

1.4 BRN-3A

La familia POU (Pit-Oct-Unc) de factores transcripcionales fue definida originalmente mediante una región común de aproximadamente 150-160 aminoácidos la cual

constituye un sitio de unión a DNA que les permite unirse a secuencias relacionadas al motivo octamérico ATGCAAAT en genes blanco e influir en su transcripción (23, 24).

Brn3 es una familia de factores transcripcionales perteneciente a la clase IV de la familia POU en donde se incluyen las proteínas Brn-3a, Brn-3b y Brn-3c, las cuales son codificadas en genes distintos y están relacionadas con el desarrollo del sistema nervioso y cardíaco en mamíferos (23, 24, 25). Se observaban niveles elevados en la expresión de Brn-3a en etapas embrionarias, que se distinguen a niveles indetectables después del nacimiento (25, 26).

El factor de transcripción Brn-3a se ha encontrado sobreexpresado en muestras de pacientes humanos con diversos tipos de cáncer como CaCU (18, 22), neuroblastoma y tumores neuroendocrinos (27) y próstata (28).

En el caso del CaCU, se han realizado estudios en mujeres encontrando un incremento en la expresión del RNAm de Brn-3a de 300 veces en pacientes con CIN3 en comparación con muestras de pacientes sin anomalías cervicales detectables. También fue observada una expresión elevada de Brn-3a en segmentos histológicos normales del cérvix adyacente a la región CIN3, comparada con las muestras de individuos sin anomalías cervicales y sin VPH detectable, indicando que la región adyacente a la región CIN3, aunque histológicamente normal, también sobreexpresa Brn-3a (18). Por otra parte, se ha demostrado mediante estudios *in vitro* que la expresión de E6 tiene una regulación proporcional con la expresión de Brn-3a, sugiriendo un papel de Brn-3a en la activación de la expresión del VPH y en los cambios celulares resultantes (29).

Se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* que Brn-3a transactiva al RNAm del gen antiapoptótico Bcl-2, generando una vía alternativa para la desregulación de la apoptosis. La coexpresión del gen proapoptótico p53 y Brn-3a antagonizan la expresión de genes propapotóticos blanco tales como Bax y Noxa. La unión entre Brn-3a y p53 se efectúa en el dominio POU de Brn-3a y el sitio de unión a DNA de p53 (Fig. 6) (26, 30).

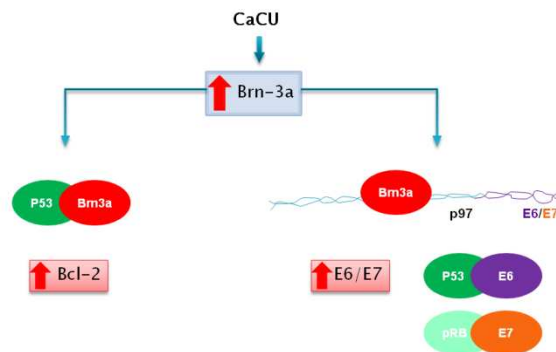


FIGURA 6. Esquema de la relación de Brn-3a con el desarrollo del CaCU mediante su interacción con las proteínas del ciclo celular p53 y pRb y las oncoproteínas E6 y E7 del VPH-16.

1.5 TERÁPIA GÉNICA.

La terapia génica puede ser ampliamente definida como el tratamiento de enfermedades o desordenes médicos mediante la introducción de genes terapéuticos en los blancos celulares adecuados. Estos genes terapéuticos pueden corregir consecuencias deletéreas de mutaciones genéticas específicas o reprogramar funciones celulares para dar tratamiento a una enfermedad (31). Más de mil ensayos clínicos de terapia génica han sido aprobados alrededor del mundo, siendo el cáncer el primer campo de aplicación. La viroterapia oncolítica, una variedad de la terapia génica, está siendo ampliamente estudiada (32).

Un vector oncolítico es un virus que tiene selectividad intrínseca o diseñada y especialmente tiene como objetivo la lisis de las células tumorales, sin destruir células normales. Entre los virus oncolíticos que han sido desarrollados y reportados se incluyen a los adenovirus, el virus de vaccina, los virus del herpes simple (VHS), los virus de la enfermedad de Newcastle y reovirus (32).

1.5.1 VECTORES ADENOVIRALES.

Los adenovirus son virus de DNA no envueltos que comúnmente causan infecciones en las vías respiratorias altas. El genoma adenoviral contiene un DNA de doble cadena, con una longitud total de cerca de 36 kpb. Los adenovirus tienen la habilidad de infectar un amplio rango de células y tejidos. La internalización del adenovirus 5 (Ad-5) a las células ocurre a través de un proceso de endocitosis mediada por el receptor CAR (del inglés: Coxsackievirus and adenovirus receptor), posteriormente la nucleocápside es liberada en el citoplasma y transportada al núcleo, donde el genoma viral es liberado. En la infección de una célula permisiva, el ciclo de replicación puede ser dividido en tres fases de expresión génica: temprana inmediata (gen E1), temprana (genes E1-E4) los cuales siguen la irrupción de la replicación del DNA viral y tardía (genes L1 y L2).

El primer gen en activarse es E1 el cual codifica una serie de activadores transcripcionales que promueven la progresión a la fase temprana, la cual se encuentra asociada con la progresión del ciclo celular a S1, inicio de la replicación del DNA viral, así como la producción de los productos génicos asociados con la evasión de defensas antivirales del hospedero (33).

ONYX-015 fue el primer adenovirus oncolítico que fue sometido a un protocolo clínico. Una de las medidas de seguridad implementadas en el Ad-5 es el control de la replicación defectiva, el cual se realiza a través de deleciones en los genes E1 y E2, o a través de combinaciones de estos, permitiendo una inserción de material génico exógeno de hasta 10 kpb. Ninguna deleción es neutral y presentará efectos variables en la producción, replicación, expresión y toxicidad del vector viral. Los adenovirus recombinantes deficientes en replicación son comúnmente crecidos en células 293 transcomplementarias que expresan una copia integrada del gen E1 de Ad-5, complementada por otras regiones en el caso de deleciones en el gen E2.

Los vectores adenovirales tienen algunas ventajas para la terapia génica incluyendo: obtención de títulos virales altos (10^{12} partículas virales /mL), replicación en células en división o quiescentes, y expresión temporal del gen insertado. También tienen algunas desventajas como: entrada a células tumorales dependiente de CAR, los cuales pueden limitar la eficacia de la transducción y el esparcimiento y la administración sistémica están limitadas debido a su alta inmunogenicidad (Fig. 7) (40).

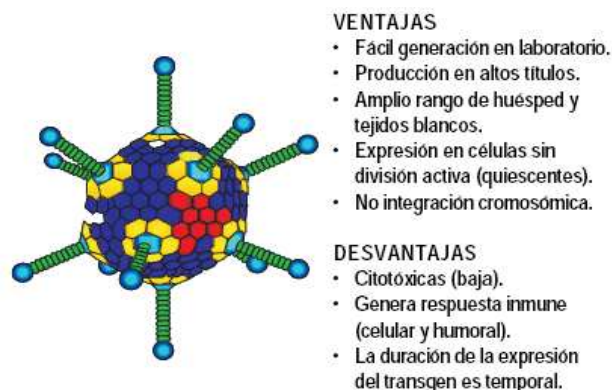


FIGURA 7. Estructura tridimensional del Ad y esquema de ventajas y desventajas en su uso como vector de terapia génica (34).

1.5.2 Ad-URR/E1A Δ 24.

Se ha descrito un vector adenoviral con una delección de 24 pb en la región CR2 del gen de replicación E1A (E1A Δ 24) que impide su unión con pRb, el cual ha demostrado ser más eficiente que los VARS mutados en otras regiones de E1A y E1B, aunque no muestra selectividad en algún cáncer en particular. Por otra parte la proteína E7 del VPH-16 es capaz de complementar las delecciones en E1A, así como mediante su unión con pRb, y permitiendo la activación de genes tempranos adenovirales en las células malignas, los cuales no se activarán con la misma intensidad en ausencia de E7, promoviendo así la replicación selectiva en tumores asociados con VPH (34, 35).

En los vectores Ad con delecciones del gen E1A, los transgenes son generalmente insertados en la región E1 bajo el control de promotores virales exógenos (RSV-LTR, IE-hCMV), y pueden ser específicos de células, combinados con otros promotores inducibles u otros elementos que incrementan los niveles de expresión (35, 36).

En el Laboratorio de Terapia Génica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. se ha desarrollado el adenovirus de replicación competente y selectiva Ad-URR/E1A Δ 24, cuya replicación es dirigida por una URR modificada genéticamente de la variante asiático-americana del VPH-16 localizada río debajo de E1A Δ 24 (Fig. 8). Este vector mantiene un comportamiento replicativo y citolítico muy similar al Ad-5 silvestre (Ad-WT) en líneas celulares VPH (+) como SiHA y HeLa y se encuentra fuertemente reprimido en líneas celulares VPH (-) como C33, así como las líneas hepáticas Huh-7 y HepG2. Estas características de selectividad oncolítica lo posicionan como un vector seguro para el uso en humanos (34, 35, 36).

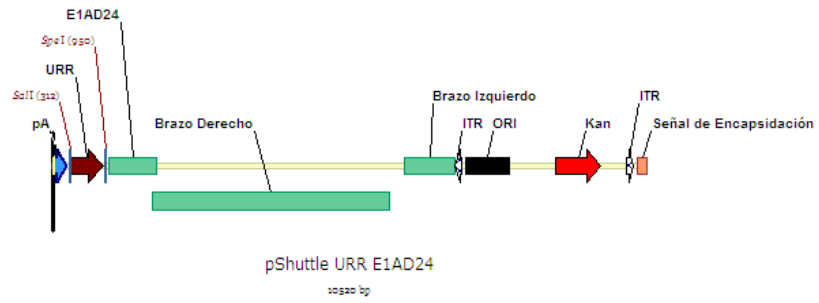


FIGURA 8. Esquema del plásmido lanzadera pShuttle-URR/E1A Δ 24 conteniendo la URR de una variante del VPH-16 AA dirigiendo la expresión del gen adenoviral E1A Δ 24.

II. JUSTIFICACIÓN.

Conociendo el compromiso del factor transcripcional Brn-3a en la regulación del VPH y en la transformación del epitelio cervical, así como su limitada expresión en los diversos tejidos adultos humanos; en el siguiente trabajo se propone diseñar y estudiar el efecto de un vector adenoviral oncolítico conteniendo el gen de replicación E1A Δ 24 regulado por el promotor UBV2 y cuya activación se encuentra relacionada con la presencia de Brn-3a.

De esta forma se plantea el diseño de un vector adenoviral como alternativa en el tratamiento del cáncer cervical mediante una estrategia de selectividad de replicación basada en la presencia de la proteína Brn-3a en el ambiente tumoral cervical.

III. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GENERAL.

Construir un vector adenoviral oncolítico selectivo y potente, cuya replicación y expresión sean estimuladas por el factor de transcripción Brn-3a.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1) Construcción del vector adenoviral Ad-UBV2/E1A Δ 24.
- 2) Producción y titulación de los vectores Ad-UBV2/E1A Δ 24, Ad-URR/E1A Δ 24, Ad-Luc y Ad-WT.
- 3) Determinación del efecto oncolítico y selectivo inducido por los vectores adenovirales Ad-UBV2/E1A Δ 24, Ad-URR/E1A Δ 24, Ad-CMV-Luc y Ad-WT en líneas celulares VPH (+) y (-).

IV. MATERIAL Y METODOLOGÍA

4.1 MATERIAL.

Beckman (Palo Alto, California, EUA): Tubos para centrifuga de polialómero

Beckton-Dickinson (Sparks, MA, EUA): Bacto agar, extracto de levadura bacto y triptona.

Biomol (México): Puntillas para micropipeta de 20 μ L, 200 μ L y 1000 μ L.

Biosource International (Camarillo, California, EUA): Azul Alamar.

Corning (NY, EUA): Criotubos 2mL y scrapper.

Costar (NY, EUA): Pipeta serológica 2mL, pipeta serológica de 5mL, pipeta serológica 10mL, pipeta serológica 50mL y plato de cultivo celular de 96 pozos.

Hyclone (Logan Utah, EUA): Suero fetal bovino.

ICN (Ohio, EUA): Cloruro de cesio

Invitrogen (California, EUA): Dulbecco's modified Eagle's media advanced, lipofectamina.

New England Biolabs (Beverly, MA, EUA): Enzimas de restricción: AflIII, BamHI, HindIII, PacI, SpeI, Sall; DNA polimerasa de T4 y DNA ligasa de T4.

Promega (California, EUA): DNA polimerasa y columna de extracción.

Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania; St. Louis MO, EUA): Acetato de potasio (CH₃COOK), alcohol etílico (C₂H₅OH), hidróxido de sodio (NaOH), fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄), fosfato monobásico de potasio (NaH₂PO₄), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de calcio (CaCl₂), sulfato de magnesio (MgSO₄), sulfato cúprico (CuSO₄), aceite mineral, dimetil sulfóxido, duodecil sulfato de sodio (SDS).

TPP (Suiza): Botella para cultivo celular 25cm², 75cm² y 150cm².

Thermo Fisher Scientific (Illinois, EUA): Membrana de diálisis.

4.2 METODOLOGÍA.

Estrategia General.

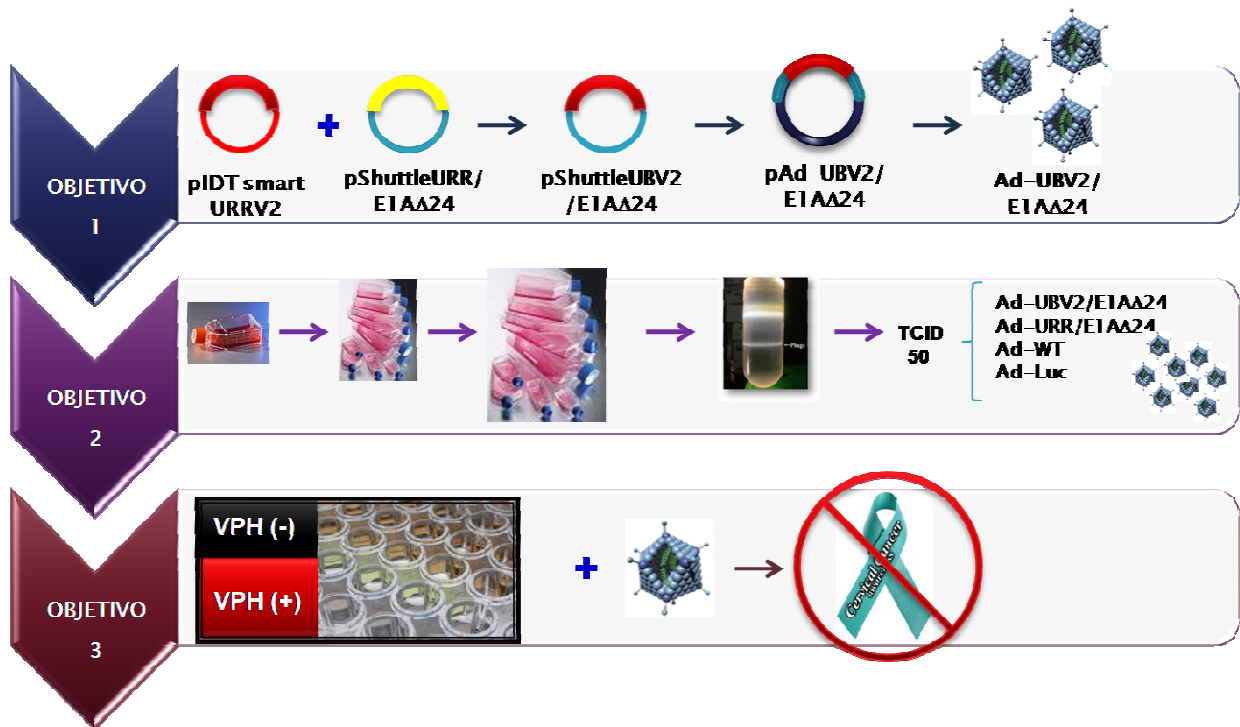


FIGURA 9. Estrategia general. Esta consta de tres objetivos principales: 1) clonación del genoma del virus Ad-UBV2/E1AΔ24 y obtención de la partícula viral, 2) producción, purificación y titulación del virus Ad-UBV2/E1AΔ24, y los virus controles Ad-URR/E1AΔ24, Ad-WT y Ad-Luc y 3) evaluación del efecto citotóxico del adenovirus Ad-UBV2/E1AΔ24 en comparación con los virus control.

4.2.1 Líneas celulares.

Se utilizaron las líneas celulares cervicales humanas: HeLa (VPH +) y C33a (VPH -) (carcinoma cervical) y las líneas celulares no cervicales: HEK293 (riñón de embrión), SK-N-SH (neuroblastoma), Huh-7 (hepatocarcinoma) y PC3 (adenocarcinoma prostático).

Todas las líneas fueron cultivadas en medio DMEM-Advanced (GIBCO) suplementado al 5% de suero fetal bovino (SFB) y antibiótico y antimicótico (Cellgro) e incubadas a 37°C y 5% CO₂.

4.2.2 Construcción de plásmido pShuttle-UBV2/E1A Δ 24.

El plásmido pShuttle-UBV2/E1A Δ 24, acarreador de la UBV2 y el gen E1A Δ 24, fue construido a partir de dos plásmidos: pShuttle-URR/E1A Δ 24, portador de una secuencia URR de VPH-16 de 636 pb y el gen E1A Δ 24, y el segundo plásmido fue el pIDTSmart-UBV2 portador de la UBV2 de 808 pb.

Con el fin de liberar las secuencias URR de ambos plásmidos, las cuales se encontraban flanqueadas por sitios de corte para las endonucleasas de restricción *SalI* y *SpeI*, se realizó la digestión con dichas enzimas. El fragmento de 808 pb liberado por el plásmido pIDTSmart-UBV2 fue identificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Posteriormente fue extraído y purificado por medio del estuche de purificación de DNA por columna. El plásmido pShuttle-URR/E1A Δ 24 digerido fue purificado por el método fenol-cloroformo. Se hizo una reacción de ligación para unir el promotor UBV2 y el acarreador pShuttle-E1A Δ 24, obteniendo el plásmido pShuttle-UBV2/E1A Δ 24. Este plásmido fue clonado en bacterias *E. coli* Turbo calcio competentes, mediante la técnica de choque térmico. Estas fueron sembradas por extensión en placas de agar LB con kanamicina (30 μ g/mL) por extensión durante 18 horas. Las clonas seleccionadas fueron crecidas en 4 mL de medio LB con kanamicina (30 μ g/mL)

durante 18 horas en agitación a 37°C. Las bacterias crecidas fueron recuperadas y su DNA fue extraído mediante lisis alcalina/miniprep. Se determinó la positividad de las clonas mediante la restricción con las endonucleasas *AflIII* y *SpeI* obteniendo el patrón esperado de 5430, 2882, 1044, 1015, 319 y 170 pb. El DNA de la clona seleccionada fue obtenido mediante el protocolo midiprep de lisis alcalina.

Se identificó la presencia de la secuencia UB2 mediante la PCR del pShuttle-UB2/E1A Δ 24 en las siguientes condiciones: 5 minutos de desnaturalización a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de alineación a 56.7°C y 1 minuto de extensión a 72°C, finalizando con 5 minutos de extensión a 72°C. La amplificación fue analizada mediante un gel de agarosa al 2%.

4.2.3 Construcción del genoma adenoviral pAd-UB2/E1A Δ 24.

Para la construcción del genoma viral pAd-UB2/E1A Δ 24 se utilizó como esqueleto del genoma adenoviral el plásmido pAd-Easy1 y como acarreador de la UB2 y el gen E1A Δ 24, al plásmido pShuttle-UB2/E1A Δ 24. Las bacterias *E. coli* BJ5183 fueron crecidas en estreptomicina (30 μ g/mL), sometidas a estrés de membrana con calcio, transformadas con el plásmido pAd-Easy1 mediante choque térmico e incubadas en agar LB con ampicilina (50 μ g/mL). Las colonias obtenidas fueron cultivadas en tubos de 4 mL con medio LB con ampicilina (50 μ g/mL) durante 15 horas. Posteriormente se realizó la extracción del DNA plasmídico por el protocolo de miniprep. Las clonas fueron caracterizadas mediante la digestión con la enzima *HindIII* y se seleccionó una clona positiva.

La clona seleccionada fue crecida, hecha calcio competente y transformada mediante choque térmico con el plásmido pShuttle-UBV2/E1A Δ 24 previamente linearizado con la endonucleasa BstZ17I con un sitio único de corte en dicho plásmido. Las colonias obtenidas fueron crecidas en tubos con 4 mL de medio LB y el DNA plasmídico fue obtenido mediante la técnica de miniprep. Las clonas positivas fueron caracterizadas mediante la restricción con la enzima BamHI. Se seleccionó una clona positiva cuyo DNA fue utilizado para la transformación de bacterias *E. coli* Turbo. Se seleccionó una clona positiva para el plásmido pAd-UBV2/E1A Δ 24. Esta fue cultivada en medio LB y sometida a extracción de DNA plasmídico por maxiprep.

4.2.4 Generación del VARS Ad-UBV2/E1A Δ 24.

El genoma adenoviral pAd-UBV2/E1A Δ 24 fue digerido con la enzima de restricción PacI con el fin de exponer las regiones ITR del genoma adenoviral. El DNA obtenido fue purificado por precipitación con acetato de sodio e isopropanol. Se incubó una caja de 6 pozos con 1×10^5 células HEK293 hasta alcanzar un 70% de confluencia. Posteriormente se realizó la transfección por lipofección con 0.2, 2 y 20 ng de DNA del genoma viral pAd-UV2/E1A Δ 24 linearizado siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial. Posterior a la transfección se realizó la incubación de las células HEK293 durante 14 días, tiempo requerido para observar focos de lisis celular producida por el nuevo vector generado. Con la ayuda de un scrapper se procedió a recuperar el sobrenadante y células, los cuales fueron sometidos a 3 ciclos de congelación y descongelación a -80°C y 37°C respectivamente, pasando por homogenización en un vórtex entre cada ciclo.

4.2.5 Producción y purificación de vectores adenovirales

Los vectores adenovirales Ad-UBV2/E1A Δ 24, Ad-URR/E1A Δ 24 y Ad-WT fueron producidos y purificados por el método que a continuación se describe. Para el caso del Ad-UBV2/E1A Δ 24, a partir del lisado celular obtenido en la transfección conteniendo las nuevas partículas virales, se procedió a la producción del vector en cuatro escalas. En el caso de los adenovirus Ad-UBV2 Δ 24 y Ad-WT se partió de un stock purificado.

En la pequeña escala las células HEK293 fueron cultivadas en un frasco de 25 cm². Al alcanzar un 70% de confluencia se retiró el sobrenadante y fueron infectadas con 1 mL del lisado celular conteniendo el Ad-UBV Δ 24 e incubadas por 2 horas. En el caso de los vectores Ad-URR Δ 24 y Ad-WT la transducción fue realizada con 5 μ L del stock viral y al frasco se agregó medio DMEM advance a un volumen final de 1 mL. Posteriormente se adicionaron 4 mL de medio DMEM advance al 2% de SFB, las células fueron incubadas por 5 días hasta la apreciación visual del cambio morfológico y lisis celular característicos. A continuación se obtuvieron el sobrenadante y las células mediante un scrapper. Éstos fueron sometidos a 3 ciclos de congelación a -80°C y descongelación a 37°C homogenizando con la ayuda de una vórtex entre cada ciclo. En el segundo escalamiento se realizó el mismo procedimiento de transducción previamente mencionado, partiendo de células HEK293 cultivadas en un frasco de 75 cm² a un 70% de confluencia. Posterior a la eliminación del sobrenadante se adicionaron 3 mL de lisado previamente obtenido, se incubó durante 2 horas y se añadieron 4 mL de medio DMEM advance al 2% de SFB. Las células fueron incubadas a 37°C hasta la aparición del efecto citopático. La recolección y lisado celular fueron

realizados en la misma forma descrita para la pequeña escala en todas las etapas de recolección en la producción a gran escala.

La mediana escala fue realizada en cinco frascos de 75 cm² con células HEK293 al 70% de confluencia. A los 5 mL del lisado celular obtenido en la escala anterior se le agregaron 5 mL de medio DMEM advance fresco. Posterior a la eliminación del sobrenadante se utilizaron 2 mL del lisado para realizar la transducción en cada frasco, se incubó durante 2 horas y se adicionaron 5 mL de medio DMEM advance 2% SFB. De la misma manera descrita previamente se realizó la incubación, recolección y lisado celular. El escalamiento final de los vectores se llevó a cabo a partir de 25 frascos de 150 cm² con células HEK293 a un 70% de confluencia, a las cuales se les retiró el sobrenadante. El lisado obtenido en la producción a mediana escala fue diluido en un volumen final de 125 mL y fueron distribuidos 5 mL por frasco, la transducción fue incubada por 2 horas. Posteriormente se adicionaron 5 mL de medio. La recolección fue realizada de la misma forma previamente descrita. El sobrenadante y las células obtenidas fueron centrifugadas en tubos Falcon de 50 mL a 4000 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue conservado a -80°C, mientras que la pastilla fue lisada por el método de congelación y descongelación previamente mencionado.

A partir del lisado celular obtenido en la producción a gran escala se obtuvieron las partículas virales mediante un gradiente de densidad de CsCl. El lisado celular fue centrifugado a 4,000 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue sometido a un gradiente discontinuo en donde a los tubos de polipropileno se agregaron lentamente por las paredes del tubo 4 mL de CsCl a una densidad de 1.4 g/mL, 3 mL

de CsCl a 1.2 g/mL y el sobrenadante. Los tubos fueron balanceados agregando aceite mineral en la parte superior de los tubos. Se centrifugó a 35,000 rpm por 2 horas a 4°C. Se recuperó la banda localizada en la parte inferior del gradiente y fue sometida a una nueva centrifugación de gradiente continuo en donde se agregaron 7 mL de CsCl 1.35 g/mL y la banda obtenida en la purificación, balanceando de igual forma con aceite mineral. Se centrifugó a 35,000 rpm por 18 horas a 4°C. Posteriormente se realizó la obtención de la banda localizada en la parte inferior del gradiente utilizando una micropipeta de 1000 µL. El líquido obtenido fue introducido en una membrana en cassette (Slide-A-Lyser) de 3 a 10 mL previamente acondicionada en buffer. Se realizaron 2 diálisis con buffer nuevo y una tercera con buffer de stock. El vector fue obtenido, alícuotado y conservados a -80°C.

Para comprobar la constitución genética del vector se realizó la extracción del DNA viral del adenovirus Ad-UBV2/E1AΔ24 mediante el método de Hirt. Se identificó la presencia de la secuencia UBV2 mediante el PCR del genoma adenoviral pAd-UBV2/E1AΔ24 utilizando los iniciadores Var2-SS-F (5' TCTACAACCTGGTCGACTGTAAGTATTGTAT 3') y Var2-SS-R (5' ACCATTGAAAGTGATCAGTATTTTACAGAC 3') en las siguientes condiciones: 5 minutos de desnaturalización a 95°C, 45 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de alineación a 50°C y 1 minuto de extensión a 72°C, finalizando con 5 minutos de extensión a 72°C. La amplificación fue analizada mediante un gel de agarosa al 2%.

4.2.6 Titulación de vectores adenovirales por TCID₅₀.

Se utilizó la técnica de TCID₅₀ (del inglés: Tissue culture infectious dose 50) para la determinación de las partículas virales infecciosas de los vectores adenovirales Ad-UBV2/E1AΔ24, Ad-URR/E1AΔ24, Ad-WT y Ad-CMV-Luc. Se cultivaron 1 x 10⁴ células por pozo en placas de 96 pozos con medio DMEM 2% SFB. Fueron incubadas hasta alcanzar 50% de confluencia, posteriormente se retiró el medio. Partiendo de los vectores en almacenamiento, se realizaron diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻¹² utilizando como diluyente medio DMEM 2% SFB. Se realizó la transducción de 10 pozos para cada dilución partiendo de la dilución 10⁻⁵ hasta la 10⁻¹². Se incubó durante 10 días y al término se evaluó la cantidad de pozos infectados para la determinación de la TCID₅₀ de acuerdo a las instrucciones del manual del vector Ad-Easy (40).

4.2.7 Evaluación de efecto citotóxico de los vectores adenovirales.

Las líneas celulares utilizadas para este ensayo fueron: HeLa, C33a, Huh-7, SK-N-MC, PC3 y HEK293. Se llevó a cabo la siembra de 1 x 10⁴ células por pozo en placas de 96 pozos en un volumen de 100 μL de medio DMEM advance al 2% de SFB y se incubaron durante 24 horas. Posteriormente se realizó la transducción de los vectores adenovirales Ad-UBV2/E1AΔ24, Ad-URR/E1AΔ24, Ad-WT y Ad-CMV-Luc utilizando las siguientes concentraciones virales: 0.1, 1, 10 y 100 MOIs (del inglés: Multiplicity Of Infection) en un volumen de 50 μL de medio DMEM advance fresco. Las células fueron incubadas durante 6 días y al término de la incubación las placas fueron analizadas microscópicamente con el fin de determinar la presencia de efecto citopático (35, 36).

V. RESULTADOS.

5.1 Construcción de plásmido pShuttle-UBV2/E1A Δ 24.

Se llevó a cabo la obtención de la UBV2 y el plásmido lanzadera portador del gen E1A Δ 24 mediante la digestión con las endonucleasas *SalI* y *SpeI* (Fig. 10). La obtención de los fragmentos esperados indica la correcta liberación de las secuencias promotoras almacenadas en ambos plásmidos, así como la disponibilidad del plásmido acarreador del gen E1A Δ 24 para la ligación de la UBV2. Posteriormente se realizó la clonación del nuevo plásmido pShuttle-UBV2/E1A Δ 24 en bacterias *E.coli* Turbo calcio competentes. Se recuperaron colonias resistentes a kanamicina como primer indicativo de la presencia del plásmido pShuttle-UBV2/E1A Δ 24 con el gen de resistencia a kanamicina. Se extrajo su DNA, cuya integridad fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Fig. 11) y posteriormente caracterizado mediante la digestión con las endonucleasas *AflIII* y *SpeI* (Fig. 12). El patrón de restricción esperado para el plásmido pShuttle-URR/E1A Δ 24 es de 5430, 2882, 1164 y 1044 pb, mientras que para pShuttle-UBV2/E1A Δ 24 es de 6115, 2882, 1044, 526, 121 y 2 pb. Se obtuvieron varias clonas positivas siendo seleccionada la clona 8 para su manejo en los siguientes ensayos. La presencia de la UBV2 en dicha clona fue analizada mediante una reacción de PCR, cuyos sitios de amplificación son los sitios flanqueantes de esta secuencia promotora, en donde se encuentran localizados los sitios de corte para la extracción de la misma, por lo que fue amplificada por completo y coincidiendo con el control positivo el plásmido pIDT-Smart-UBV2 (Fig. 13).

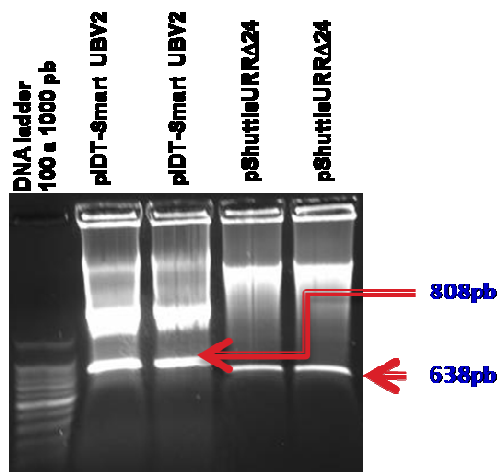


FIGURA 10. Digestión enzimática de los plásmidos pIDT-Smart-UBV2 y pShuttle-URR/E1AΔ24 con las enzimas *SalI* y *SpeI*, para la liberación del promotor UBV2 (808pb) y URR (638pb) observada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

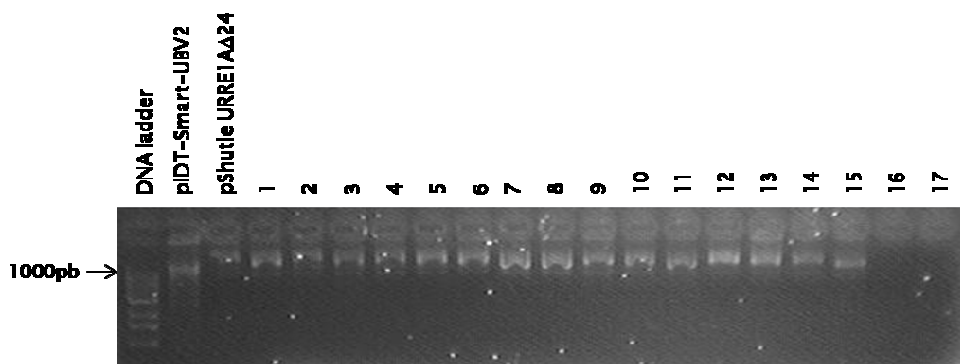


FIGURA 11. Verificación de la integridad del DNA de colonias resistentes a kanamicina crecidas en agar LB seleccionadas para identificación de la presencia de pShuttle-UBV2/E1AΔ24 mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

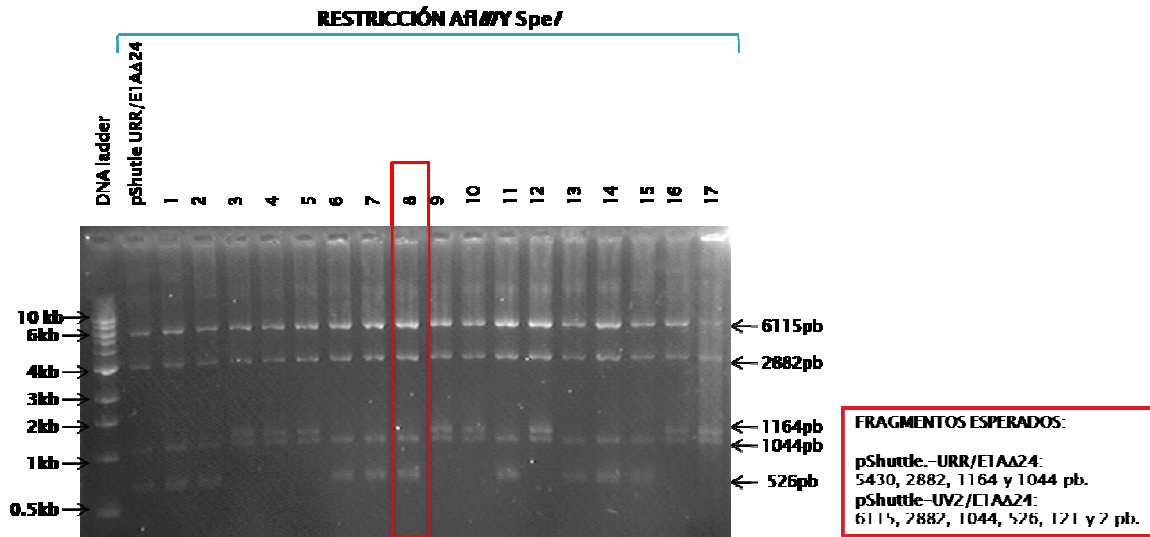


FIGURA 12. Selección de clonas portadoras del plásmido pShuttle-UBV2/E1AΔ24 mediante el análisis del DNA por la restricción con las endonucleasas AflIII y SpeI del DNA de colonias con resistencia a kanamicina crecidas en agar LB.

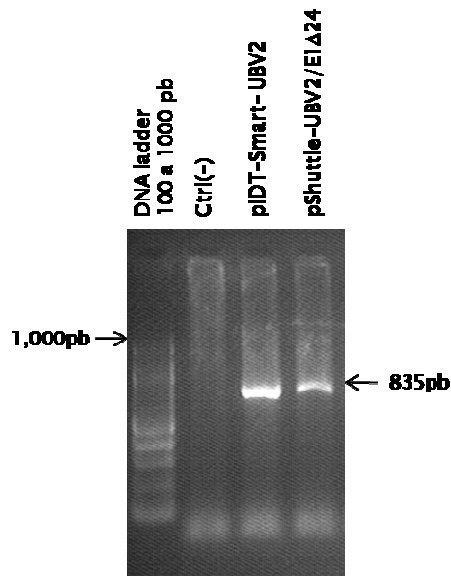


FIGURA 13. Determinación de la presencia de la UBV2 en el plásmido pShuttle-UBV2/E1AΔ24 mediante la técnica de PCR. Gel de agarosa al 2%.

5.2 Construcción del genoma adenoviral pAd-UBV2/E1A Δ 24.

El genoma del virus Ad-UBV2/E1A Δ 24 fue obtenido mediante la recombinación del plásmido pShuttle-UBV2/E1A Δ 24 y el pAd-Easy1. Para llevar a cabo la recombinación se utilizaron las bacterias *E.coli* BJ5183, positivas para el gen de la enzima RecBC, la cual promueve la recombinación homóloga por medio de la vía RecA-RecB. Debido a sus alta actividad recombinante se utilizó un tiempo de crecimiento menor al utilizado para las bacterias Turbo. El plásmido pAd-Easy1 portador del gen de resistencia a ampicilina y del genoma adenoviral, con excepción de los genes E1 y E3, fue clonado en estas bacterias. El DNA obtenido de las clonas resistentes a ampicilina fue extraído por lisis alcalina y analizado por restricción con la enzima HindIII. Todas las clonas fueron positivas, sin embargo se eligió la clona 2 (Fig. 14), que fue crecida en un matraz con caldo LB para someterla al proceso de calcio-competencia. Las bacterias BJ5183 calcio-competentes portadoras del plásmido pAd-Easy1 fueron tratadas por shock térmico para la introducción del gen E1A Δ 24, la UBV2 y la señal de encapsidación. La recombinación fue llevada a cabo mediante sitios de homología localizados tanto en el pAd-Easy1 como en el pShuttle-UBV2/E1A Δ 24, el cual fue linearizado con el fin de la exposición de los brazos de homología para facilitar su correcta recombinación (Fig. 15). Se obtuvo como producto final el plásmido pAd-UBV2/E1A Δ 24 conteniendo el genoma de un virus de replicación competente, el gen de resistencia a kanamicina y pérdida tanto del origen de replicación como el gen de resistencia a ampicilina del plásmido pAd-Easy1 (Fig. 16). Las células incubadas en agar LB con kanamicina fueron obtenidas, crecidas en caldo LB con kanamicina y su

DNA fue extraído. Para la determinación de la correcta recombinación plasmídica previamente fue llevado a cabo un ensayo previo para elegir la enzima de restricción más adecuada para esta tarea, siendo seleccionada la enzima BamHI con el patrón de restricción de pAd-UBV2/E1A Δ 24 de 3286, 11754 y 23642 pb y para pShuttle-UBV2/E1A Δ 24 de 3286, 7404 pb y pAdEasy-1 de 3286, 11745 y 21704 pb. La mayoría de las clonas presentaron un patrón de restricción de coincidencia con el esperado para el pShuttle-UBV2/E1A Δ 24. Sin embargo, se caracterizaron dos clonas positivas para pAd-UBV/E1A Δ 24, de las cuales se observó una baja cantidad de DNA y se seleccionó a la clona 5 (Fig. 18 y Fig. 19).

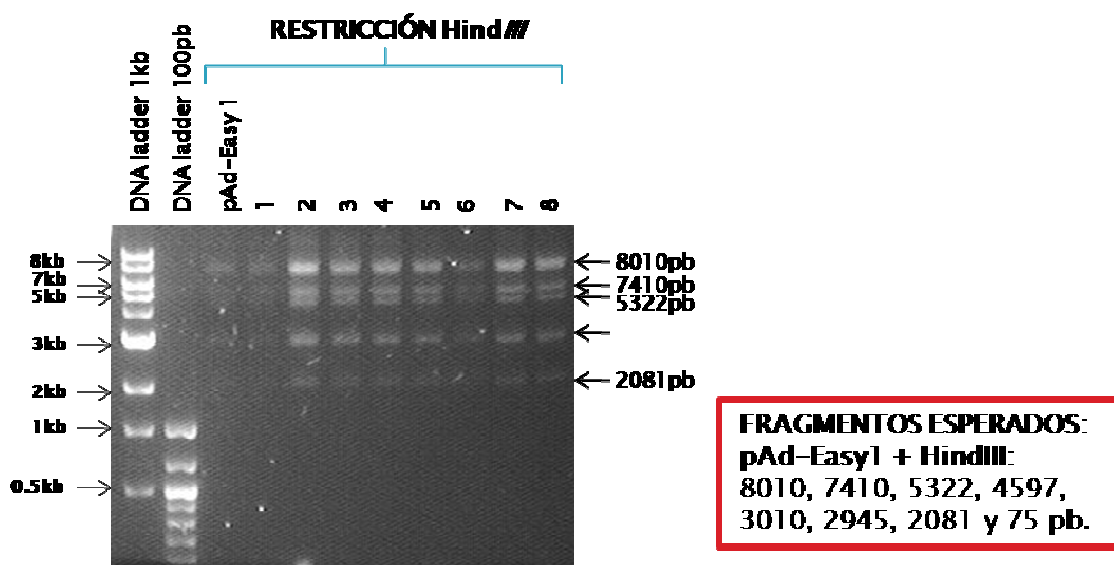


FIGURA 14. Determinación de clonas portadoras del plásmido pAdEasy-1 mediante digestión con la enzima HindIII. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

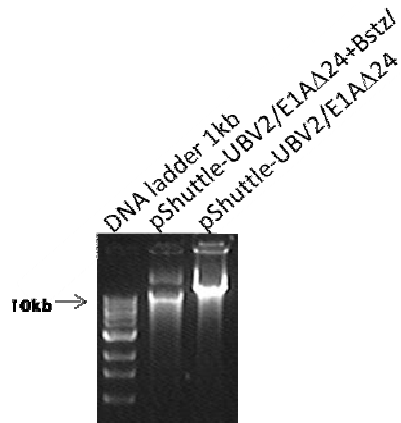


FIGURA 15. Linearización del plásmido pShuttle-UBV2/E1A Δ 24 con la enzima BstzI. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

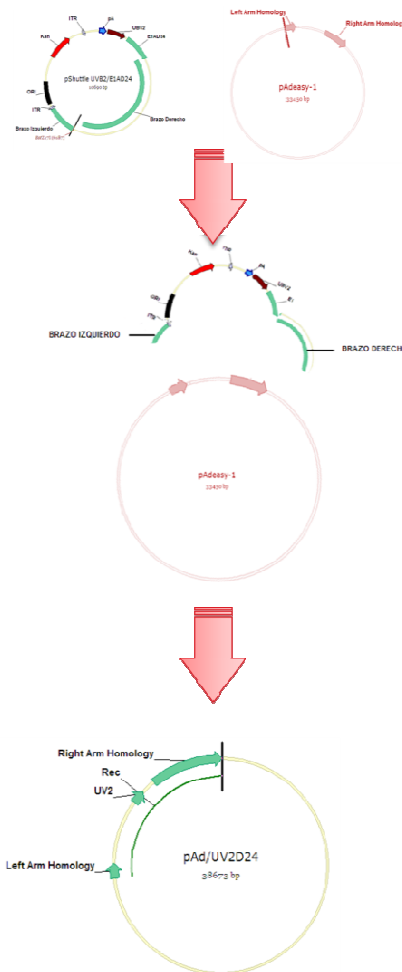


FIGURA 16. Esquema de generación del plásmido pAd-UBV2/E1A Δ 24. Recombinación de los plásmidos pShuttle-UBV2/E1A Δ 24 linearizado y pAd-Easy1.

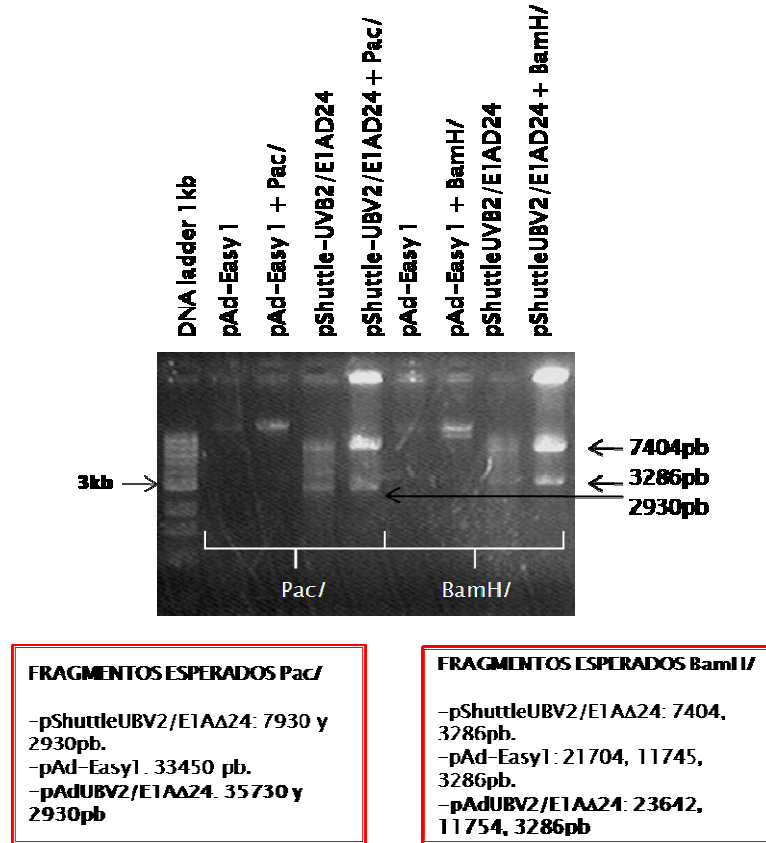


FIGURA 17. Evaluación de patrón de restricción de las endonucleasas PacI y BamHI para selección de clonas recombinantes positivas portadoras del pAd-UBV2/E1AΔ24. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

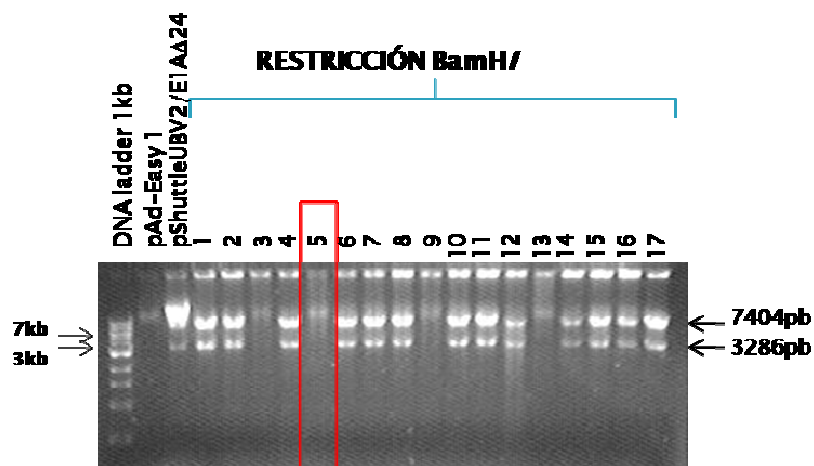


FIGURA 18. Selección de clonas recombinantes positivas portadoras del plásmido pAd-UBV2/E1AΔ24 mediante digestión de DNA con la enzima de restricción BamHI. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

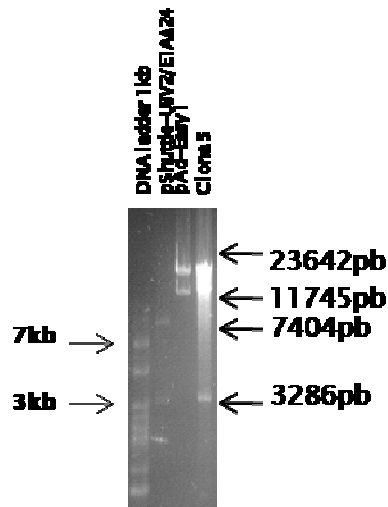


FIGURA 19. Digestión del DNA de la clona portadora del plásmido pAd-UBV2/E1A Δ 24 con la enzima BamHI. Electroforesis en gel de agarosa al 1%.

5.3 Generación del VARS Ad-UBV2/E1A Δ 24.

Se obtuvo el DNA de la clona 5 portadora del pAd-UBV2/E1A Δ 24, este fue sometido a digestión mediante la enzima PacI con el fin de linearizar el plásmido y exponer las secuencias ITR (región terminal invertida) del mismo. Posteriormente fue introducido en células HEK293 mediante la técnica de lipofección, hasta la detección de cambio morfológico celular y focos de lisis (Fig. 20).

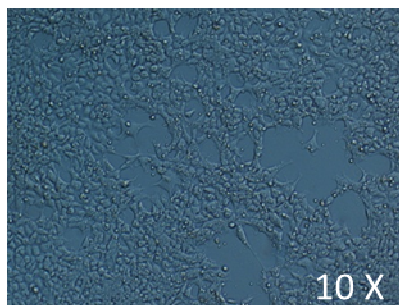


Figura 20. Determinación de la producción de partículas del virus Ad-UBV2/E1A Δ 24 mediante observación microscópica del efecto citopático inducido en células HEK293 posterior a la lipofección con el genoma del pAd-UBV2/E1A Δ 24 linearizado.

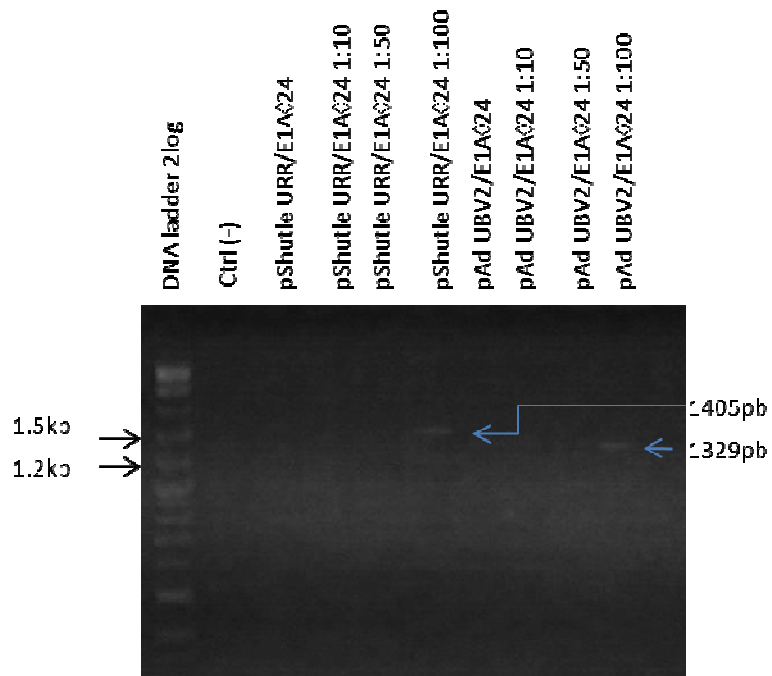


FIGURA 21. Determinación de la presencia de la región promotora UBV2 mediante la técnica de PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 2%.

5.4 Producción, purificación y titulación de vectores adenovirales.

Se llevó a cabo la producción a gran escala y purificación de los vectores Ad-UBV2/E1A Δ 24, Ad-URR/E1A Δ 24 y Ad-WT. Posteriormente se determinó mediante la titulación por el método de TCID₅₀ la cantidad de partículas virales funcionales de los vectores Ad-UBV2/E1A Δ 24, Ad-URR/E1A Δ 24, Ad-WT y Ad-CMV-Luc (Tabla 1).

Adenovirus	Título (PFU/mL)
Ad-UBV2/E1A Δ 24	2.12×10^8 PFU/mL
Ad-URR/E1A Δ 24	7.08×10^9 PFU/mL
Ad-WT	8.03×10^9 PFU/mL
Ad-CMV-Luc	1.23×10^{11} PFU/mL

Tabla 1. Títulos adenovirales obtenidos mediante la técnica de TCID₅₀.

El nuevo vector adenoviral presentó irregularidades en comparación con el resto de los adenovirus titulados.

No se logró observar un efecto citopático fuerte. Se encontraron algunos pozos con dicho efecto, pero con una baja cantidad de lisis celular, además de no observar una disminución del efecto citopático al aumentar las diluciones. Por el contrario, se observaron pozos con elevada lisis celular en diluciones muy altas como la 10 y muy baja cantidad de lisis celular en diluciones muy bajas como la 5 y 6. Este efecto se presentó de forma irregular (Fig. 22). Por el contrario los vectores Ad-URR/E1A Δ 24, Ad-WT y Ad-CMV-Luc mostraron una fuerte lisis celular en las diluciones 5, 6, 7 y 8, la cual disminuyó gradualmente al aumentar el número de dilución, presentando generalmente poca cantidad de pozos infectados en las diluciones 11 y 12.

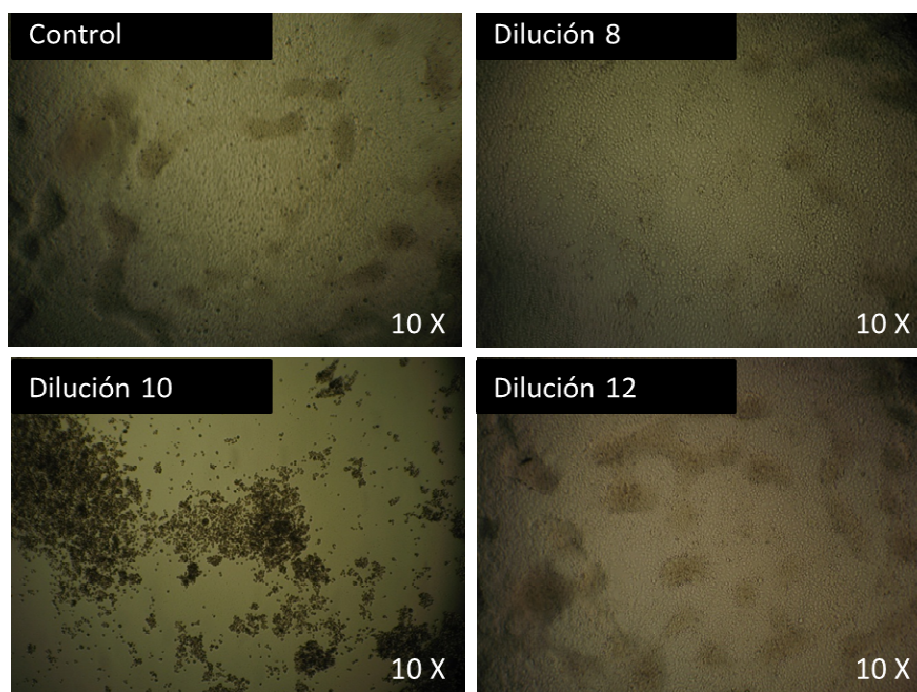


FIGURA 22. Titulación del vector adenoviral Ad-UBV2/E1A Δ 24. Imágenes microscópicas al 10X obtenidas a partir de la titulación del virus Ad-UBV2/E1A Δ 24.

5.5 Evaluación de efecto citotóxico de los vectores adenovirales

Se evaluó el efecto citotóxico inducido por los diferentes adenovirus en líneas celulares. En este ensayo se utilizó al Ad-URR/E1A Δ 24 como punto de referencia para la evaluación del nuevo vector generado Ad-UBV2/E1A Δ 24, debido a que presentan como diferencia única la sustitución de la región promotora URR que dirige al gen de replicación E1A Δ 24. El Ad-WT fue utilizado como control positivo de lisis celular, ya que presenta el genoma adenoviral incluyendo los genes de replicación, mientras que el Ad-CMV-Luc fue utilizado como control negativo debido a que presenta deleciones de los genes de replicación y esta es condicionada al ambiente intracelular proporcionado en las células HEK293.

El resultado de este ensayo fue determinado mediante observación microscópica (Fig.23) en donde se logró identificar la selectividad referenciada para el Ad-URR/E1A Δ 24 ya que tanto para las líneas HeLa, C33a y Sk-N-MC se observó un fuerte efecto citotóxico, el cual fue notoriamente disminuido en las líneas Huh-7 y PC-3 en las cuales si bien se observó el cien por ciento de lisis celular, esta se presentó en concentraciones virales mayores.

En el caso de las infecciones adenovirales de las células HEK293 se presentó una marcada lisis celular conforme a lo esperado, debido a la permisibilidad del su ambiente intracelular, en todos los vectores analizados. Sin embargo, el vector Ad-UBV2/E1A Δ 24 junto con Ad-CMV-Luc fueron los que presentaron menor citotoxicidad. En el resto de las líneas celulares, tanto Ad-UBV2/E1A Δ 24 como Ad-CMV-Luc

mostraron un efecto citotóxico nulo, observándose una morfología celular similar a la presentada por las células sin tratamiento.

Por otra parte el Ad-WT mostró un efecto citotóxico agresivo para todas las líneas celulares, con excepción de Sk-N-MC, donde la totalidad de muerte celular fue observada a mayor concentración del virus que lo observado en el vector Ad-URR/E1A Δ 24.

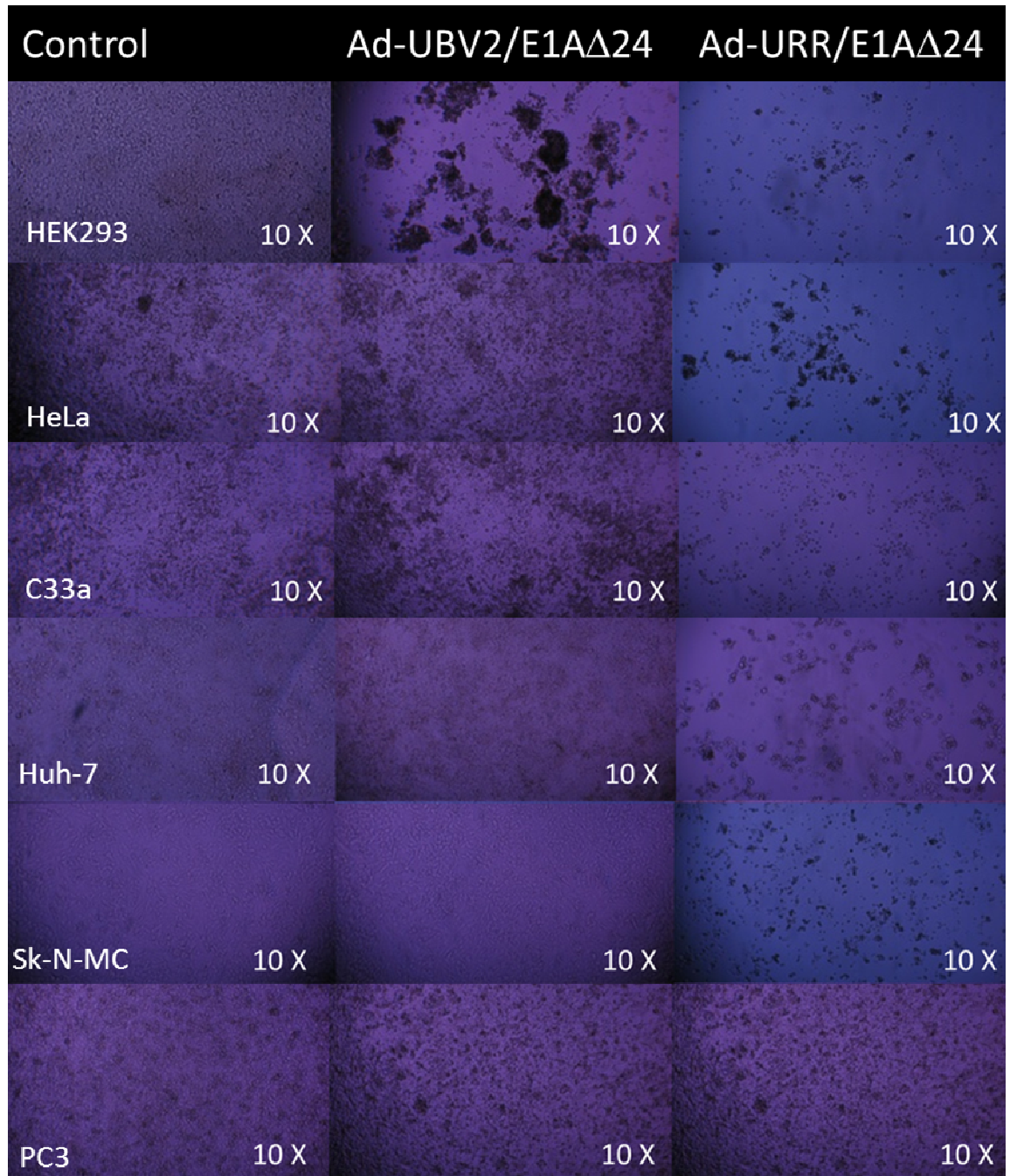


FIGURA 23. Evaluación del efecto citotóxico de los vectores adenovirales con 100 MOI por célula en las líneas celulares HEK293, HeLa, C33a, Huh-7, Sk-N-MC y PC3.

VI. DISCUSIÓN.

En este trabajo de investigación se planteó la generación de un vector adenoviral de replicación competente y selectiva denominado Ad-UBV2/E1A Δ 24, para cuyo análisis se hará uso de los vectores Ad-URR/E1A Δ 24, Ad-WT y Ad-CMV-Luc con fines comparativos.

De acuerdo a los resultados obtenidos a través de los diferentes puntos del desarrollo del vector adenoviral, las técnicas de ingeniería genética utilizadas, tales como la restricción con endonucleasas y PCR, respaldan la inserción de la UBV2 en el plásmido pShuttle-UBV2/E1A Δ 24, pAd-UBV2E1A Δ 24 y el vector Ad-UBV2/E1A Δ 24. Esto aunado a la lisis celular evidenciada en la transducción de células HEK293 con el vector Ad-UBV2/E1A Δ 24 confirman la replicación de este vector adenoviral en células permisivas.

Los ensayos de citotoxicidad evidenciaron la presencia de lisis celular en la línea HEK293 inducida por los cuatro adenovirus. Sin embargo, Ad-UBV2/E1A Δ 24 presentó un efecto débil en comparación con el resto de vectores, además no logró infectar exitosamente al resto de las líneas celulares VPH (+) o VPH (-), observándose una morfología y confluencia celular similar a la encontrada tanto en el Ad-CMV-Luc como en el control sin tratamiento. Contrario a lo esperado, los adenovirus Ad-WT y Ad-URR/E1A Δ 24 desplegaron un fuerte efecto citotóxico, confirmando la selectividad reportada para Ad-URR/E1A Δ 24 hacia las líneas cervicales HeLa y C33a, así como de neuroblastoma Sk-N-MC.

Por otra parte es importante mencionar que debido a problemas técnicos fue necesaria la doble ultracentrifugación en la etapa del gradiente isocrático de 18 horas en la purificación del adenovirus Ad-UBV2/E1A Δ 24, obteniendo dos bandas densas muy cercanas y presentando dificultad en la recolección de la banda de mayor peso, la cual contiene las partículas virales funcionales. Las titulaciones virales llevadas a cabo por el método de TCID₅₀ fueron exitosas para todos los adenovirus con excepción de Ad-UBV2/E1A Δ 24, el cual mostró un efecto anormal en comparación con el resto de los adenovirus y con la literatura (35, 36).

Existen varios factores que pueden haber contribuido a la disfuncionalidad observada en el Ad-UBV2/E1A Δ 24 en la infección de células no permisivas. El primero de ellos puede ser un error en la preparación del vector. Una alternativa es la formación de agregados virales durante el proceso de purificación, existiendo cuatro factores involucrados en este proceso: 1) fuerza iónica, mediante el uso inadecuado de sales en las soluciones de dializado o una mala diálisis, 2) el pH ácido de 4 a 5 favorece el proceso de agregación, siendo irreversible en valores de pH menores a 4, 3) concentración de partículas, la dilución de stocks virales concentrados inhibe la formación de agregados, 4) temperatura, el grado de agregación en un rango de 25 a 37°C es constante, pero decreciente cuando la temperatura cae a -20°C. A 4°C no hay agregación (38). Todos estos factores, con excepción de la temperatura, podrían haber influido en un proceso de agregación viral, el cual se relacionaría con el efecto anormal observado en la titulación del Ad-UBV2/E1A Δ 24, sugiriendo de esta forma que en el aumento de las diluciones seriadas realizadas para la transducción se pudo haber

restablecido el ambiente favorable para la funcionalidad viral en cuanto a condiciones de pH, concentración de sales y de partículas virales, revirtiendo los agregados previamente formados e inactivando al virus.

Una segunda alternativa es la presencia de numerosas partículas virales no infecciosas interferentes debido a una mala recolección de la banda de partículas virales funcionales en el gradiente de CsCl continuo realizado. De acuerdo con la literatura, cuando los virus son sometidos a pasajes bajo condiciones de elevada MOI surgen frecuentemente partículas con un contenido de genomas truncados o aberrantes. Estas partículas son de replicación defectuosa; esto es, que requieren de la presencia de virus de tipo silvestre para su replicación y el rendimiento del virus transductor es reducido significativamente. De esta forma, las partículas defectivas interfieren con la replicación del virus infeccioso y son designadas interferentes. Para evitar problemas ocasionados por su interferencia con la replicación, es importante evitar la presencia de altos niveles de partículas interferentes cuando se preparan los stocks virales. Esto es fácilmente logrado mediante el uso de inóculos virales diluidos para la preparación de los stocks. Bajo dichas condiciones, las partículas interferentes y las partículas estándar infectan diferentes células y las partículas interferentes son incapaces de replicar. Así, los stocks virales son usualmente preparados usando una MOI baja y permitiendo múltiples ciclos de replicación. Un inóculo inicial que es relativamente libre de partículas interferentes puede ser obtenido también mediante purificación de placas de virus, asegurando que la progenie viral proviene del genoma parental (37, 38).

Otro factor importante podría encontrarse a nivel del diseño del vector, sugiriendo la presencia de una región MAR (del inglés: matrix attachment region). El DNA del sitio MAR es una secuencia de unión a la matriz nuclear presente en el segmento 5' de la URR del VPH-16, ubicado aproximadamente en la región de 7150 a 7450 pb del genoma viral, la cual se ha asociado a la represión de la actividad del promotor p97 y por consecuencia a la represión del gen E6, esto mediante su interacción con proteínas nucleares. Un factor de transcripción que se ha involucrado en esta represión, debido a la presencia de diez sitios de unión para el factor transcripcional CDP/Cut dentro de MAR. En el caso de la UBV2, utilizada para dirigir la expresión del gen E1A Δ 24, se tomó la secuencia URR completa de la variante 2 del VPH-16, mientras que la URR perteneciente al vector Ad-URR/E1A Δ 24, que mostró fuerte actividad selectiva en los ensayos de citotoxicidad, fue modificada genéticamente para la remoción de la región MAR (39). De ser contundente el efecto represor del MAR para la URR, se esperaría la represión del gen E1A Δ 24 en el vector Ad-UBV2/E1A Δ 24 y un efecto citotóxico limitado a células HEK293, simulando un vector de replicación no competente.

Debido a las dificultades en la determinación de la funcionalidad del Ad-UBV2/E1A Δ 24 y por lo tanto en su capacidad de transfección y oncolísis en las líneas celulares no permisivas, es necesaria la determinación de la activación de la UBV2 mediante ensayos de expresión de luciferasa *in vitro* en líneas celulares VPH (+) y VPH (-) y posteriormente la realización de un análisis de correlación de dicha activación esperada con la presencia de la proteína Brn-3a. Se esta forma se podrá evaluar la eficiencia de

la UBV2 como promotor de un vector adenoviral asegurando a su vez la expresión del gen de replicación E1A Δ 24 y la oncolisis.

CONCLUSIONES.

- ▶ Se logró producir y caracterizar al vector adenoviral Ad-UBV2/E1A Δ 24.
- ▶ El adenovirus Ad-UBV2/E1A Δ 24 no mostró un efecto oncolítico en las líneas celulares HeLa, C33a, Sk-N-MC, Huh-7 y PC3.
- ▶ El efecto oncolítico evidenciado en la transfección del Ad-UBV2/E1A Δ 24 en células HEK293 indica la replicación del adenovirus y un probable problema en la purificación del mismo a nivel de pH, concentración de sales, concentración de partículas o presencia de partículas no infecciosas interferentes.
- ▶ La presencia del sitio MAR puede estar involucrada en la incapacidad de replicación de Ad-UBV2/E1A Δ 24 en las líneas celulares no permisivas HeLa, C33a, Sk-N-MC, Huh-7 y PC3.
- ▶ Es necesaria la determinación in vitro de la activación de la UBV2, para el aseguramiento de la funcionalidad del virus, así como la relación de dicha activación con la presencia de la proteína Brn-3a.

VIII. LITERATURA CONSULTADA.

1. Garcia M y cols. Global Cancer Facts & Figures 2007. American Cancer Society, 2007.
2. Hanahan D y Weinberg R. The Hallmarks of Cancer Review. Cell 100: 57–70, 2000.
3. Latchman D y cols. The Cellular Transcription Factor Brn-3a and the Smoking-Related Substance Nicotine Interact to Regulate the Activity of the HPV URR in the Cervix. Oncogene 29(18): 2701-2711, 2010.
4. Demaria SJ y cols. Cancer and Inflammation: Promise for Biologic Therapy. Journal of Immunotherapy 33(4):335-51, 2010.
5. Jemal A y cols. Cancer Statistics, 2007. A Cancer Journal for Clinicians 57:43–66, 2007.
6. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers in Mexico. Summary Report, 2010.
7. Hidalgo-Martínez A. El Cáncer Cérvico-Uterino, su Impacto en México y el Porqué No Funciona el Programa Nacional de Detección Oportuna. Revista Biomédica 17: 81-84, 2006.
8. <http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/cervix/page7>
9. Bible J y cols. Cervical Lesions are Associated with Human Papillomavirus Type 16 Intratypic Variants that Have High Transcriptional Activity and Increased Usage of Common Mammalian Codons. Journal of General Virology 81: 1517-1527, 2000.
10. Tinelli A y cols. Human Papillomavirus Genital Infection in Modern Gynecology: Genetic and Genomic Aspects. European Clinics in Obstetrics and Gynecology 3(1): 1-6, 2006.

11. Ndisang D y cols. Differential Regulation of Different Human Papilloma Virus Variants by the Pou Family Transcription Factor Brn-3a. *Oncogene* 25(1): 55-60, 2006.
12. Stark A y cols. Human Papillomavirus, Cervical Cancer and Women's Knowledge. *Cancer Detection and Prevention* 32(1): 15-22, 2008.
13. Antonishyn N y cols. Human Papillomavirus Typing and Viral Gene Expression Analysis for the Triage of Women With Abnormal Results From Papanicolaou Test Smears to Colposcopy. *Archives of pathology & laboratory medicine* 133(10):1577-86, 2009.
14. Lowe J y cols. Evolutionary And Structural Analyses of Alpha-Papillomavirus Capside Proteins Yields Novel Insights Into L2 Structure and Interaction with L1. *Virology Journal* 17: 5-150, 2008.
15. Mileo A. Human Papillomavirus-16 E7 Interacts with Glutathione S-Transferase P1 and Enhances its Role in Cell Survival. *PloS One* 4(10): e7254, 2009.
16. Zheng Z y Baker C. Papillomavirus Genome Structure, Expression, and Post-Transcriptional Regulation. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 11: 2286-302, 2006.
17. Morris P y cols. The Octamer Binding Site in the HPV16 Regulatory Region Produces Opposite Effects on Gene Expression in Cervical and Non-Cervical Cells. *Nucleic Acids Research* 21(4): 1019-23, 1993.
18. Ndisang D y cols. The HPV-Activating Cellular Transcription Factor Brn-3a is Overexpressed in CIN3 Cervical Lesions. *The Journal of clinical investigation* 101(8): 1687-92, 1998.
19. Scheffner M y cols. Targeted Degradation of the Retinoblastoma Protein by Human Papillomavirus E7 -E6 Fusion Proteins. *EMBO Journal* 11(7): 2425-31, 1992.

20. O'Connor M y cols. Transcription Factor Binding Sites in the Long Control Region of Genital HPVs. Institute of Molecular and Cell Biology, National University of Singapore (1995).
21. Bible J y cols. Cervical Lesions are Associated with Human Papillomavirus Type 16 Intratypic Variants that Have High Transcriptional Activity and Increased Usage of Common Mammalian Codon. *Journal of Genetic Virology* 81: 1517-27, 2000.
22. Ndisang D y cols. The Cellular Transcription Factor Brn-3a and the Smoking-Related Substance Nicotine Interact to Regulate the Activity of the HPV URR in the Cervix. *Oncogene* 29(18): 2701-11, 2010.
23. Bhargava A y cols. Differential Expression of Four Members of the POU Family of Proteins in Activated and Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-Treated Jurkat T Cells (Interleukin 2). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(21): 10260-4, 1993.
24. Morris P y cols. The Opposite and Antagonistic Effects of the Closely Related POU Family Transcription Factors Brn-3a and Brn-3b on the Activity of a Target Promoter Are Dependent on Differences in the POU Domain. *Molecular and cellular biology* 4(10):6907-14, 1994.
25. Hudson C y cols. Brn-3a Transcription Factor Blocks p53-mediated Activation of Proapoptotic Target Genes Noxa and Bax in Vitro and in Vivo to Determine Cell Fate. *The Journal Of Biological Chemistry* 280(12): 11851-8, 2004.
26. Farooqui-Kabir S y cols. Cardiac Expression of Brn-3a and Brn-3b POU Transcription Factors and Regulation of Hsp27 Gene Expression. *Cell Stress & Chaperones* 3(3): 297-312, 2008.
27. Leblond-Francillard M y cols. High Expression of the POU Factor Brn3a in Aggressive Neuroendocrine Tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 82(1): 89-94, 1997.

28. Diss J y cols. Brn-3a Neuronal Transcription Factor Functional Expression in Human Prostate Cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 9(1): 83-91, 2006.
29. Latchman D y cols. The Brn-3a Transcription Factor Plays a Key Role in Regulating the Growth of Cervical Cancer Cells in Vivo. *Oncogene* 20(35): 4899-903, 2001.
30. Chiarugi y cols. Brn-3a, a Neuronal Transcription Factor of the POU Gene Family: Indications for its Involvement in Cancer and Angiogenesis. *Molecular Biotechnology* 22(2): 123-7, 2010.
31. Escors D y Breckpot K. Lentiviral Vectors in Gene Therapy: Their Current Status and Future Potential. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis* 58(2): 107-19, 2010.
32. Yu W y Fang Hu. Clinical Trials with Oncolytic Adenovirus in China. *Current Cancer Drug Targets* 7(2): 141-8, 2007.
33. Russel W. Adenoviruses: Update on Structure and Function. *The Journal of General Virology* 90: 1-20, 2009.
34. Cervantes-García D y cols. Oncolytic Virotherapy. *Annals Of Hepatology: Official Journal Of The Mexican Association Of Hepatology* 7(1): 34-45, 2008.
35. Delgado-Enciso I y cols. A Potent Replicative Delta-24 Adenoviral Vector Driven by the Promoter of Human Papillomavirus 16 that is Highly Selective for Associated Neoplasms. *The Journal of Gene Medicine* 9(10): 852-61, 2007.
36. Delgado-Enciso I y cols. Preclinical Evaluation of the Therapeutic Effect of Adenoviral Vectors in Human Papillomavirus-Dependent Neoplasias. *Revista de Investigación Clínica: Órgano del Hospital de Enfermedades de la Nutrición* 60(2): 101-6, 2008.
37. Becker T y cols. Protein expression in animal cells. *Methods in cell Biology* 43, 1994.

38. Galdiero F. Adenovirus Aggregation and Preservation in Extracellular Environment. Archives of Virology 59(1-2): 99-105, 1979.
39. Nkel W y cols. Nuclear Matrix Attachment Regions of Human Papillomavirus Type 16 Repress or Activate the E6 Promoter, Depending on the Physical State of the Viral DNA. Journal of Virology 74(6): 2489-2501, 2000.